



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SINALOA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICO-BIOLÓGICAS**  
**DOCTORADO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS**

**"Estudio hidrodinámico y cinético de la bioconversión de  
glucosa a fructosa utilizando sistemas enzimáticos  
inmovilizados"**

**TESIS**

Que presenta

**M.C. MARCO CÉSAR CARRAZCO ESCALANTE**

Para obtener el Grado de

**DOCTOR EN CIENCIA**

**Y**

**TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS**

Directores de Tesis

**DR. JOSÉ DE JESÚS CARO CORRALES**

**DR. OSCAR MARTÍN HERNÁNDEZ CALDERÓN**



## **UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SINALOA**

### **CARTA CESIÓN DE DERECHOS**

En la Ciudad de Culiacán, Rosales Sinaloa, el día 29 del mes de Enero del año 2019, el (la) que suscribe MC. Marco César Carrazco Escalante alumno (a) del Programa de Doctorado en Ciencia y Tecnología de Alimentos con número de cuenta 10266089, de la Unidad Académica Facultad de Ciencias Químico Biológicas, manifiesta que es autor (a) intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de los Dres. José de Jesús Caro Corrales y Oscar Martín Hernández Calderón y cede los derechos del trabajo titulado “Estudio hidrodinámico y cinético de la bioconversión de glucosa a fructosa utilizando sistemas enzimáticos inmovilizados”, a la Universidad Autónoma de Sinaloa para su difusión, con fines académicos y de investigación por medios impresos y digitales.

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

Marco Carrazco

Marco César Carrazco Escalante

El presente trabajo fue realizado en el Laboratorio de Mediciones Termofísicas del Posgrado en Ciencia y Tecnología de Alimentos de la Universidad Autónoma de Sinaloa, bajo la dirección del Dr. José de Jesús Caro Corrales y el Dr. Oscar Martin Hernández Calderón. El proyecto contó con financiamiento de la Universidad Autónoma de Sinaloa a través del Programa de Fomento y Apoyo a Proyectos de Investigación (PROFAPI 2014/086). El M.C. Marco César Carrasco Escalante recibió beca por parte del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT).

## AGRADECIMIENTOS

Primeramente agradezco a Dios por darme vida y salud para cumplir una meta más y por permitirme subir un escalón más en mi proyecto de vida.

A mis padres, Carlos Ramón y Dora Silvia, porque son mi soporte, son quienes están ahí para mí y quienes siempre me han apoyado incondicionalmente ante cualquier adversidad, ya sea emocional, económica o de cualquier ámbito. Gracias por todo.

A mi hermano Carlos Alberto, sus consejos fueron de vital importancia para decidirme a entrar al programa de doctorado en un momento en que tenía muchas dudas.

A Vida Mariel, que antes como amiga y ahora como pareja, siempre ha creído en mi potencial y me impulsa a ser la mejor versión de mí. Además de estar a mi lado en los momentos difíciles vividos durante el trayecto.

A la Universidad Autónoma de Sinaloa, a la Facultad de Ciencias Químico Biológicas y en especial al programa de Posgrado en Ciencia y Tecnología de Alimentos, por darme la oportunidad durante ocho años de seguir desarrollarme en el ámbito estudiantil y personal a través de sus programas de Maestría y Doctorado en Ciencia y Tecnología de Alimentos.

Al CONACYT por el apoyo económico brindado durante cuatro años.

Al PROFAPI por el financiamiento otorgado al proyecto.

Al Dr. José de Jesús Caro Corrales, quien ha sido un gran maestro y amigo. Su dedicación y su forma de ser con sus estudiantes hacen que realmente sea un modelo a seguir para algún día estar en su posición y que los estudiantes lleguen a verme como nosotros lo vemos a él.

Gracias por estar siempre ahí y aconsejarme cuando lo he necesitado, incluso en ámbitos que van más allá de lo estudiantil. Se ha desarrollado una gran confianza entre nosotros y aunque en ocasiones opinamos diferente sobre ciertas cosas, el cariño es mayor y lo veo como parte de mi familia.

Al Dr. Oscar Martín Hernández Calderón, gracias por toda su ayuda, sin duda una de las personas más inteligentes y con mayor capacidad de razonamiento que he conocido en mi vida, hacía lo difícil parecer fácil. Gracias por mostrar una actitud siempre amable y optimista, incluso en momentos de desesperación cuando me parecía que las cosas no me resultaban de la manera que yo esperaba. Es un gran ejemplo a seguir y gracias por todo.

A los miembros de mi comité de tesis: Dra. Erika, Dr. Ernesto y Dr. Roberto por todas sus atenciones y por estar en la mejor disposición de compartir sus ideas e inquietudes para mejorar mi proyecto de tesis.

A todos los compañeros y amigos de laboratorio que durante ocho años han llegado y se han marchado: Raúl, José Luis, Rossy, Yessica, David, Agustín, Carlos, Julio, Olivia, Felicitas, Rogelio y Luis Carlos por hacer mucho más agradable la convivencia durante todo este tiempo, pero especialmente por soportar todas mis loqueras y tonterías.

De manera especial a Rossy y Yessica quienes han sido mis compañeras desde 2011 y han recorrido la mayor parte del trayecto a mi lado. Gracias por su amistad incondicional.

A Elthon, Gaby, Milton, Claudia y el resto de mis amigos, que no son parte de mi equipo de trabajo, pero son personas que se han mantenido en mi vida con el paso de los años y con los que he forjado también una gran amistad.

## ÍNDICE

	ÍNDICE DE FIGURAS	iv
	ÍNDICE DE CUADROS	vii
I	RESUMEN	1
	ABSTRACT	3
II	INTRODUCCIÓN	5
III	REVISIÓN DE LA LITERATURA	9
	A. FRUCTOSA	9
	1. Generalidades	9
	2. Producción y consumo de fructosa	12
	B. GLUCOSA ISOMERASA	14
	1. Generalidades	14
	2. Aplicación industrial	14
	3. Inmovilización de enzimas	17
	a. Inmovilización de glucosa isomerasa a nivel comercial	18
	b. Otros métodos de inmovilización	18
	C. REACTORES ENZIMÁTICOS	19
	D. DESARROLLO MATEMÁTICO	23
	1. Mecanismo cinético	23
	2. Cinética con enzima inmovilizada	25
	3. Reactor de lecho empacado	26
	a. Propiedades físicas de lecho empacado y fluidificado	27
	1) Porosidad	28

	2) Coeficiente de transferencia de masa	28
	3) Coeficiente de dispersión axial	29
E.	MÉTODOS NUMÉRICOS	30
	1. Método de Runge-Kutta de cuarto orden	31
	2. Método de diferencias finitas	34
	3. Método de colocación ortogonal usando splines cúbicos de Hermite	38
IV	JUSTIFICACIÓN	47
V	OBJETIVOS	49
	A. OBJETIVO GENERAL	49
	B. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	49
VI	MATERIALES Y MÉTODOS	50
	A. MATERIALES	50
	B. MÉTODOS	50
	1. Estrategia general de trabajo	50
	2. Método de análisis de las muestras	50
	3. Sistemas de biorreacción	52
	a. Reactor de tanque agitado	52
	b. Reactor de lecho empacado	52
	4. Procedimientos experimentales	53
	a. Reactor de tanque agitado con enzima libre	53
	b. Reactor de tanque agitado con enzima inmovilizada	55
	c. Reactor de lecho empacado con enzima inmovilizada	57
	5. Método de ajuste del modelo	57

	a. Reactor de tanque agitado con enzima libre	57
	1) Estrategia de linealización	58
	2) Obtención de los parámetros cinéticos	61
	b. Reactor de tanque agitado con enzima inmovilizada	62
	1) Modelo de la perla catalítica	62
	2) Método de discretización	67
	3) Obtención de los parámetros de ajuste	68
	c. Reactor de lecho empacado con enzima inmovilizada	69
	1) Método de discretización	69
	2) Obtención de los parámetros $k_L$ y $D_z$	69
	6. Diseño de experimentos	70
VII	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	72
	A. CINÉTICA DE ENZIMA LIBRE	72
	B. CINÉTICA CON ENZIMA INMOVILIZADA	80
	1. Ajuste del modelo	80
	2. Efecto de los parámetros de operación sobre las PACs	92
	C. ESTUDIO DE REACTOR LECHO EMPACADO	100
	1. Ajuste del modelo	100
	2. Efecto de los parámetros de operación en lecho empacado	105
VIII	CONCLUSIONES	113
IX	BIBLIOGRAFÍA	116
	NOMENCLATURA	128
	ANEXOS	131



## ÍNDICE DE FIGURAS

Fig	Descripción	Pág.
1	Estructuras químicas de glucosa y fructosa	10
2	Diferentes configuraciones de reactor con enzimas inmovilizadas	22
3	Tablero de Butcher para el MRK de cuarto orden	33
4	Aproximación de la pendiente de la tangente en P, por: la pendiente de la curva AB, la pendiente de la curva AP o la pendiente de la curva PB	37
5	Subdivisión del dominio en subdominios o elementos finitos	43
6	Diagrama general de trabajo	51
7	Comparación entre (a) enzima inmovilizada con respecto a (b) enzima en forma libre utilizada en el presente estudio	54
8	Descripción fenomenológica utilizada en el modelo matemático	66
9	Comparación entre las conversiones de glucosa a fructosa utilizando glucosa isomerasa libre e inmovilizada en un RTA	73
10	Efecto de la temperatura en la cinética de bioconversión de glucosa/fructosa y fructosa/glucosa utilizando enzima libre en un RTA	74
11	Estado físico de las PACs con la enzima atrapada en su interior después de 5 reutilizaciones	75
12	Efecto de la glucosa y la concentración de enzima en la cinética de bioconversión de glucosa/fructosa utilizando enzima libre en un RTA	77
13	Liberación de calcio en las PACs	83
14	Efecto de la concentración de sustrato y enzima en la bioconversión de glucosa a fructosa usando enzima inmovilizada en un RTA	84
15	Efecto de la concentración inicial sobre el mecanismo cinético reversible de	87

	Briggs-Haldane, utilizando el modelo matemático de enzima libre en su forma integrada y linealizada	
16	Comportamiento de datos cinéticos experimentales con enzima inmovilizada con respecto al modelo linealizado con enzima libre	88
17	Perfiles de concentración de glucosa y fructosa intrapartícula obtenidos de la bioconversión de glucosa a fructosa utilizando PACs con un radio de 1.5 mm en un RTA	93
18	Perfiles de concentración de glucosa intrapartícula obtenidos en la bioconversión de glucosa a fructosa utilizando PACs con un radio de 1.5 mm en un RTA	94
19	Efecto de (a) FAER, (b) radio de la perla biocatalítica, (c) CDE y (d) fracción volumétrica de las perlas biocatalíticas, en la historia de concentración de fructosa en la fase líquida, resultante de la bioconversión de glucosa a fructosa en un RTA	96
20	Efecto de (a) FAER, (b) radio de la perla biocatalítica, (c) CDE y (d) fracción volumétrica de las perlas biocatalíticas sobre los perfiles de concentración de glucosa intrapartícula, resultantes de la bioconversión de glucosa a fructosa en un RTA	97
21	Efecto del flujo y la concentración de enzima en la cinética de bioconversión de glucosa/fructosa utilizando enzima inmovilizada en PACs en un reactor de lecho empacado	102
22	Efecto de la concentración de enzima en la conversión de glucosa a fructosa en un reactor de lecho empacado	107
23	Efecto del diámetro de partícula sobre la conversión de glucosa a fructosa en	108

	un reactor de lecho empacado	
24	Efecto de la longitud del reactor sobre la conversión de glucosa a fructosa en un reactor de lecho empacado	110
25	Efecto de la concentración de glucosa inicial sobre la conversión de glucosa a fructosa en un reactor de lecho empacado	111

## **ÍNDICE DE CUADROS**

Cuadro	Descripción	Pág.
1	Dulzura relativa de edulcorantes a base de hidratos de carbono	11
2	Consumo de jarabe de maíz alto en fructosa en México	13
3	Exportación de Jarabe de maíz alto en fructosa de Estados unidos al mundo y específicamente a México	15
4	Aproximación de resultados a través de diferentes métodos numéricos	35
5	Funciones de interpolación basadas en los polinomios de Hermite	40
6	Primeras y segundas derivadas de los polinomios de Hermite	42
7	Parámetros cinéticos de Arrhenius	78
8	Parámetros cinéticos del mecanismo de Briggs-Haldane	79
9	Parámetros de operación para el ajuste de la cinética con enzima inmovilizada en perlas de alginato de calcio	82
10	Parámetros ajustados del modelo linealizado de enzima libre usado para describir datos cinéticos experimentales de enzima inmovilizada	89
11	Parámetros de operación para el ajuste de la cinética con enzima inmovilizada en PACs en un reactor de lecho empacado	101
12	Fracción de conversión máxima alcanzada en la isomerización de glucosa a fructosa en diferentes sistemas de reacción	104

## I. RESUMEN

En la actualidad, las enzimas en forma inmovilizada son ampliamente utilizadas debido a su mayor estabilidad y capacidad de reutilización; sin embargo, el comportamiento cinético está generalmente controlado por los efectos de difusión de masa. Por lo tanto, se requiere un claro discernimiento de los mecanismos cinéticos y difusivos que controlan la producción del metabolito de interés. En la práctica, es habitual establecer parámetros cinéticos aparentes para las operaciones con enzimas inmovilizadas, cuya validez se limita a los casos estudiados. El objetivo del presente trabajo fue determinar los parámetros hidrodinámicos y cinéticos de la conversión enzimática de glucosa a fructosa utilizando glucosa isomerasa inmovilizada en un sistema de biorreacción de lecho empacado (RLE). Se probaron cuatro temperaturas en un reactor de tanque agitado (RTA) y se eligió la temperatura óptima de trabajo (TOT). Los parámetros cinéticos se determinaron a partir del ajuste de las constantes de velocidad ( $k_1$ ,  $k_2$ ,  $k_{-1}$  y  $k_{-2}$ ), para ello se utilizó un RTA con glucosa isomerasa (GI) en forma libre. Los efectos difusionales se estudiaron en un RTA con GI en forma inmovilizada en perlas de alginato de calcio (PACs). Se estableció un nuevo enfoque para describir la mecánica cinética y difusiva en una PAC. Se incluyó la fracción de actividad enzimática residual (FAER,  $\eta$ ), definida como una medida de la enzima activa y disponible dentro de la red porosa. Los mecanismos difusivos y cinéticos fueron descritos por el coeficiente de difusión efectivo (CDE,  $D_{eff}$ ) y los parámetros de la cinética enzimática libre, ya que se asume que la red porosa de las perlas es el volumen de reacción biológica. Se realizaron ensayos en un reactor de lecho empacado, cuyos resultados se compararon con un modelo matemático basado el modelo de partícula establecido previamente, en el cual el coeficiente de dispersión axial

(CDA,  $D_z$ ) y coeficiente convectivo de transferencia de masa (CCTM,  $k_L$ ), fueron obtenidos a través de correlaciones de números adimensionales. Se llevaron a cabo simulaciones variando los principales parámetros de operación en un RTA y un RLE para conocer su efecto sobre la conversión. Para la TOT se empleó un diseño unifactorial completamente al azar, con el factor temperatura (T) (55, 60, 65 y 70 °C). Para la conversión en un RTA con enzima libre se utilizó un diseño bifactorial: [E] (5, 7.5 y 10 g/L) y [S] (100, 150 y 200 g/L). Para la conversión en un RTA con GI inmovilizada en PACs se tuvo como factores la [E] (3.213, 4.784 y 6.292 g/L) y [S] (100 g/L, 150 g/L y 200 g/L). Por último, para analizar la conversión en un RLE se empleó un diseño bifactorial con los factores flujo volumétrico (0.5, 1, 2 y 4 mL/min) y [E] (5.482 y 10.618 g/L). La temperatura óptima de trabajo fue de 65 °C. Se determinaron los parámetros cinéticos. Al comparar el modelo obtenido contra los datos experimentales se obtuvo  $R^2 = 0.9974$ , lo que indica un ajuste adecuado. La FAER ( $\eta = 0.553$ ) indica que solo un poco más de la mitad de la enzima que se encuentra en la perla está activa y disponible. El CDE ( $D_{eff} = 8.356 \times 10^{-12} \text{ m}^2/\text{s}$ ) es menor a lo reportado en literatura, lo que indica la restricción al movimiento del sustrato en el interior de la PAC. El CCTM y CDA utilizados fueron  $k_L = 5.973 \times 10^{-6} \text{ m/s}$  y  $D_z = 6.658 \times 10^{-7} \text{ m/s}$ , y al comparar el modelo con datos obtenidos experimentalmente se obtuvo  $R^2 = 0.907$  que indica un ajuste satisfactorio. Al estudiar el efecto de los parámetros de operación se concluyó que tanto en un RTA como en un RLE el factor que tiene mayor impacto es el tamaño de partícula. Al reducir el tamaño de la PAC se incrementa el área de contacto y con ello la conversión. Para incrementar la FAER se recomienda probar nuevos agentes inmovilizantes o disminuir el tamaño de la perla, cuidando que el agente inmovilizante mantenga su estabilidad y

funcionalidad. **Palabras clave:** enzima inmovilizada, glucosa-isomerasa, efectos difusionales, actividad enzimática residual, simulación.

## ABSTRACT

Nowadays, immobilized enzyme has been widely used in industrial processes due to its outstanding advantages, such as higher stability and recyclability; however, the kinetic behaviour is generally controlled by mass diffusion effects. Thus, the improvement of these enzymatic processes requires a clear discernment of the kinetic and diffusion mechanisms that control the production of the metabolite of interest. In practice, it is usual to establish apparent kinetics for immobilized enzyme operations, whose validity is restricted to the studied cases. The aim of this work was to determine the hydrodynamic and kinetic parameters of the enzymatic conversion of glucose to fructose using immobilized glucose isomerase in a packed bed reactor (PBR). Four different temperatures were tested in a stirred tank reactor (STR) and the optimum working temperature (OWT) was chosen. The kinetic parameters were determined from the adjustment of the specific rate constants ( $k_1$ ,  $k_2$ ,  $k_{-1}$  and  $k_{-2}$ ), for which an STR with glucose isomerase (GI) in free form was used. The diffusional effects were studied in an STR with GI in immobilized form in calcium alginate beads (CABs). A new approach was established to describe the kinetic and diffusive mechanics in a single CAB. The fraction of residual enzymatic activity (FREA,  $\eta$ ), defined as a measure of the active and available enzyme within the porous network, was included. The diffusive and kinetic mechanisms were described by the effective diffusion coefficient (EDC,  $D_{eff}$ ) and the parameters of free enzymatic kinetics, since it is assumed that the porous network of the beads is the biological reaction volume. Tests were carried out in a packed-bed reactor, whose

experimental results were compared with a mathematical model based on the previously established particle model, in which the axial dispersion coefficient (ADC,  $D_z$ ) and the convective mass transfer coefficient (CMTC,  $k_L$ ), were obtained through correlations of dimensionless numbers. Simulations were carried out by varying the main operating parameters in an STR and PBR to know their effect on the conversion. For the OWT, a completely random unifactorial design was used, with temperature as factor ( $T$ ) (55, 60, 65, and 70 °C). For the conversion into an STR with free enzyme, a two-factor design was used:  $[E]$  (5, 7.5, and 10 g/L) and  $[S]$  (100, 150, and 200 g/L). For the conversion in an STR with immobilized GI in CABs, the factors were  $[E]$  (3.213, 4.784, and 6.292 g/L) and  $[S]$  (100 g/L, 150 g/L, and 200 g/L). Finally, to analyze the conversion in PBR system, a two-factor design was used, volumetric flow (0.5, 1, 2, and 4 mL/min) and  $[E]$  (5.482 and 10.618 g/L). The OWT was 65 °C. The kinetic parameters were determined. When comparing the obtained model with experimental data, a  $R^2 = 0.9974$  was found what indicates an adequate adjustment. The FREA ( $\eta = 0.553$ ) indicates that only a little more than half of the enzyme found in the bead is active and available. The EDC ( $D_{eff} = 8.356 \times 10^{-12}$  m<sup>2</sup>/s) is lower than that reported in the literature, which indicates the restriction to the movement of the substrate inside the CAB. The CMTC and the ADC used were  $k_L = 5.973 \times 10^{-6}$  m/s and  $D_z = 6.658 \times 10^{-7}$  m/s, and when comparing the model with experimentally obtained data, a satisfactory adjustment ( $R^2 = 0.907$ ) was obtained. When studying the effect of the operation parameters, it was concluded that both, STR and PBR, the factor that had the highest impact is the particle size. By reducing the size of the CAB, the contact area is increased and thus the conversion. To increase the FREA, it is recommended to test new immobilizing agents or to



decrease the size of the beads, taking care that the immobilizing agent maintains its stability and functionality.

**Keywords:** immobilized enzyme, glucose-isomerase, diffusional effects, residual enzymatic activity, simulation.

## II. INTRODUCCIÓN

En respuesta a la creciente demanda por el consumo de alimentos naturales, saludables y bajos en calorías, un gran número de los llamados azúcares alternativos ha surgido desde principios de los años 80, entre ellos la fructosa. Este azúcar es una cetohehexosa, conocida como *D*-fructosa o levulosa, y es considerada el azúcar más dulce en la naturaleza (Lima y col 2011). La fructosa está presente en muchos alimentos, lo que permite un consumo regular de este hidrato de carbono (White y Osberger 2001).

La isomerización de glucosa a fructosa es uno de los procesos más ampliamente utilizados en la industria alimentaria, y el producto obtenido puede ser utilizado como ingrediente en la producción de alimentos y bebidas, ya que mejora el poder edulcorante, el color, y las características higroscópicas, además de reducir la viscosidad. Por otra parte, la fructosa es aproximadamente 75 a 80% más dulce que la sacarosa, se absorbe más lentamente que la glucosa y es metabolizada sin la intervención de insulina (Dehkordi y col 2009). La fructosa y jarabe de fructosa son ampliamente utilizados, por ejemplo, en la producción de refrescos, bebidas de frutas, helados y como excipiente en formulaciones farmacéuticas (comprimidos, jarabes y soluciones), dado su aroma y sabor dulce (Lima y col 2011).

Las enzimas son macromoléculas producidas por células vivas que catalizan una gran cantidad de reacciones fisiológicas (Aehle 2007). Con el avance de la ciencia, una gran variedad de enzimas se emplea en procesos industriales, lo que lleva a su uso mejorado en los

sustratos de interés. Las enzimas se utilizan a menudo en la industria en una forma inmovilizada (Mateo y col 2007). La enzima glucosa isomerasa (GI) se usa ampliamente en la industria en forma inmovilizada para catalizar la reacción reversible de  $\alpha$ -D-glucosa a  $\beta$ -D-fructosa, que forma parte del proceso de producción de jarabe de maíz alto en fructosa (JMAF) a partir de almidón de maíz (Abdel-Rassol y col 2012).

Entre las investigaciones que utilizan GI inmovilizada destacan las siguientes: Camacho-Rubio y col (1995) estudiaron la cinética de isomerización de fructosa a glucosa usando Sweetzyme T® en un reactor de lecho empacado con recirculación; Converti y Del Borghi (1997) probaron la actividad de GI inmovilizada en un reactor discontinuo (Sweetzyme T® comercial) con el fin de obtener los parámetros cinéticos necesarios para optimizar un reactor de columna continua; Bravo y col (1998) estudiaron la isomerización enzimática de fructosa a glucosa utilizando Sweetzyme A® inmovilizada, considerando los efectos del transporte interno y externo; Tükel y Alagöz (2008) utilizaron GI inmovilizada en Eupergit C 250 L para determinar la actividad de la enzima usando la cinética clásica de Michaelis-Menten; Abdel-Rassol y col (2012) establecieron un modelo de reactor, que es análogo a los modelos heterogéneos de reactor catalítico, teniendo en cuenta los efectos de la transferencia de masa de líquido/partícula y el transporte intrapartícula; Zhao y col (2016) incrementaron la actividad de la GI mediante la inmovilización en microesferas híbridas de sílice/quitosano; Zhang y col (2018) describieron un método inmovilizado que utiliza tris (hidroximetil) fosfina como agente reticulante para mejorar la termoestabilidad de GI recombinante.

Para cinéticas con enzimas inmovilizadas, es necesario evaluar las resistencias a la transferencia de masa por difusión y convección. Sin embargo, hay una gran cantidad de reportes en los que un modelo cinético enzimático libre se ajusta a las concentraciones

experimentales de sustrato, medido en la fase fluida de un reactor de tanque agitado (RTA) o en un reactor de lecho empacado (RLE) a altas velocidades de flujo; por lo tanto, los efectos convectivos son despreciables y los efectos difusivos se incluyen en los parámetros cinéticos (Özdural y col 2003). Estos modelos cinéticos se denominan "aparentes", cuya validez está restringida solo a los casos estudiados. Algunos trabajos representativos que utilizan el enfoque de parámetros cinéticos aparentes son los siguientes: Özdural y col (2003) establecieron un método numérico para calcular los parámetros cinéticos aparentes en un RLE con enzima inmovilizada; Silva y col (2013) reportaron los parámetros cinéticos de  $\alpha$ -amilasa inmovilizada en glioxil agarosa para la hidrólisis de almidón; Das y col (2015) presentaron un estudio cinético utilizando  $\beta$ -glucosidasa atrapada en perlas de alginato para la hidrólisis de celobiosa, y a partir de los parámetros cinéticos aparentes obtenidos, establecieron que estas perlas carecían de limitaciones internas a la transferencia de masa; Rakmai y Cheirsilp (2016) realizaron la síntesis enzimática de  $\beta$ -ciclodextrina a partir de almidón empleando ciclodextrina glucosiltransferasa inmovilizada en un RTA continuo y un RLE, realizando una comparación de ambos sistemas de reacción mediante el uso de parámetros cinéticos aparentes.

Es común que en estos trabajos se utilicen estos parámetros denominados "aparentes", los cuales son válidos solo para las condiciones de proceso establecidas en dicha investigación. Debido a esto, en el presente trabajo de investigación se realizó un análisis cinético de la conversión enzimática de glucosa a fructosa para un RLE, donde se revisó y evaluó experimentalmente cada uno de los fenómenos que conforman dicho bioproceso (con experimentos previos primero se evaluaron los parámetros del modelo cinético de enzima libre, y posteriormente, los parámetros del modelo cinético de enzima inmovilizada con

resistencia a la transferencia masa convectiva despreciable), logrando establecer un modelo general para el RLE, cuya validez se extiende a diferentes condiciones de proceso. Se desarrolló un modelo matemático para la producción enzimática de fructosa, donde se describe rigurosamente y de manera independiente cada uno de los fenómenos involucrados: mecanismo cinético, transporte intra-partícula y transporte extra-partícula. Además, se integró el concepto de fracción de actividad enzimática residual, que representa la fracción de enzima dentro de la perla que se encuentra disponible para reaccionar. La adición de este concepto en conjunto con la determinación del coeficiente de difusión efectivo y el coeficiente de dispersión axial permite brindar una descripción más realista de la bioconversión de glucosa a fructosa en un RLE.

### III. REVISIÓN DE LA LITERATURA

#### A. FRUCTOSA

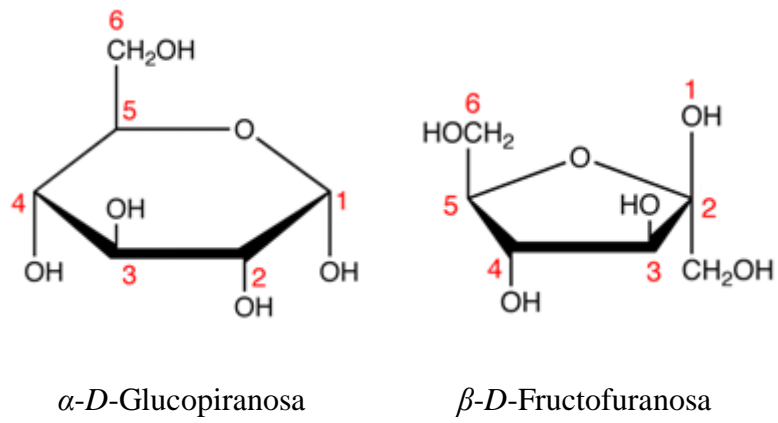
##### 1. Generalidades

La fructosa es un monosacárido identificado comúnmente como el azúcar de las frutas, su fórmula química es idéntica a la de la glucosa ( $C_6H_{12}O_6$ ), pero difiere en su conformación espacial (McKee y McKee 2003). La fructosa es un azúcar reductor y, dado que es altamente levorrotatorio, se le designa con el nombre de levulosa. Se puede encontrar principalmente en jugos de diversas frutas y en mieles (Badui 2006).

La unión de una  $\alpha$ -D-glucosa y una  $\beta$ -D-fructosa forman la sacarosa o azúcar de mesa (**Figura 1**), y esta disposición ( $\alpha$ - $\beta$ ) no puede modificarse sin hidrolizar la sacarosa (Barrow 1975).

La fructosa es considerada como el azúcar natural más dulce, su poder edulcorante, sin embargo, cambia de acuerdo con su formulación, una característica común en todos los edulcorantes, pero puede llegar a ser hasta 1.8 veces más dulce que la sacarosa (**Cuadro 1**) (Godshall 2007, Khalilpour y Roostaazad 2008, Lima y col 2011). Además de su dulzura, la fructosa muestra considerable sinergia con varios edulcorantes artificiales de alta intensidad y edulcorantes a granel. Algunas de estas propiedades que contribuyen al éxito de las aplicaciones industriales de la fructosa son la alta solubilidad en agua, aproximadamente 4 g de fructosa por gramo de agua a 25 °C; la tendencia a la cristalización, lo que minimiza el endurecimiento en barras nutritivas; alta humectación, lo que contribuye a la mejora de la vida útil de productos de panadería y similares; alta presión osmótica; un poder considerable de

mejora al sabor; y la alta



**Figura 1.** Estructuras químicas de glucosa y fructosa. Fuente: Badui 2006.

**Cuadro 1.** Dulzura relativa (DR) de edulcorantes a base de hidratos de carbono.

<b>Edulcorante</b>	<b>DR</b>
Fructosa Cristalina	180
Fructosa (solución 5-15%)	115-125
Jarabe de maíz alto en fructosa	100-130
Jarabe invertido	105
Sacarosa	100
Sacarosa (solución al 10%)	100
Glucosa cristalina	74-82
Glucosa (solución al 10%)	65
Glucosa (solución al 50%)	90-100
Xylitol (solución al 10%)	100
Maltosa	50
Lactosa	15-30

Fuente: Godshall 2007

capacidad de depresión del punto de congelación, lo que ayuda a formular helados adecuados para su consumo en invierno. La incorporación de fructosa en los alimentos también disminuye la actividad de agua, reduciendo así el riesgo de contaminación microbiana sin la eliminación de agua, que podría resultar en la alteración de textura del producto (Bravo y col 1998, Calik y col 2009). Es por esto que, en muchas aplicaciones, se desea convertir la glucosa en su forma isomérica fructosa (Khalilpour y Roostaazad 2008, Chanitnun y Pinphanichakarn 2012).

## **2. Producción y consumo de fructosa**

Aunque la fructosa se encuentra en muchas frutas y verduras, así como en azúcares primarios, su uso como ingrediente alimentario es bastante reciente. La fructosa cristalina se encontraba disponible y se usaba principalmente en aplicaciones farmacéuticas antes de 1987. La compañía *AE Staley Manufacturing* notó por primera vez una oportunidad sin aprovechar para la fructosa en la industria de alimentos y bebidas debido a su dulzor único, propiedades físicas y funcionales. Por estas razones, esta empresa adquirió licencia para el uso de tecnología de cristalización de la compañía europea *Finnsugar* (productora de azúcar de remolacha) y comenzó a comercializar fructosa a empresas de alimentos y bebidas a finales de los años ochenta en forma de jarabe de maíz alto en fructosa (JMAF) (White 2014).

La importancia del JMAF, desde su aparición en el mercado hasta la fecha, resulta trascendente, ya que representa un producto sustituto del azúcar para el consumo de los hogares y principalmente para consumo industrial en la elaboración de alimentos y bebidas



(SE 2012). Además, el JMAF tiene la ventaja de ser 10 a 20 % más barato que la sacarosa (Tukel y Alagoz 2008). En el **Cuadro 2** se muestra el consumo de JMAF en México en los últimos años, donde se puede apreciar un incremento de prácticamente un 260 % en el periodo comprendido de 2006

**Cuadro 2.** Consumo de jarabe de maíz alto en fructosa en México.

<b>Año</b>	<b>Consumo (miles de ton)</b>
2006	667
2007	698
2008	782
2009	653
2010	1,418
2011	1,635
2012	1,721
2013	1,565
2014	1,372
2015	1,444
2016	1482
2017	1522

Fuente: USDA 2018.

a 2012 (667 – 1721 miles de ton), mientras que en los últimos 5 años su uso se ha mantenido estable, en alrededor de 1,500,000 toneladas anuales.

Por otra parte, en el **Cuadro 3** se presenta la exportación de JMAF por parte de Estados Unidos (principal país productor de JMAF) para el periodo comprendido de 2006 a 2015. Es posible observar como México es el principal destino de exportación, recibiendo en todos los años más del 50 % del total exportado. Este porcentaje se ha incrementado con el paso de los años, llegando a ser México el destino de casi el 80 % del total de JMAF exportado por Estados Unidos.

## **B. GLUCOSA ISOMERASA**

### **1. Generalidades**

La enzima glucosa isomerasa (GI) es una enzima ampliamente distribuida; se utiliza en la industria para catalizar la conversión reversible de  $\alpha$ -D-glucosa a  $\beta$ -D-fructosa *in vivo*, que a su vez entra en el proceso de producción del JMAF a partir de almidón de maíz (Abdel-rassol y col 2012, Habeeb y col 2016). La enzima puede ser caracterizada de diferentes fuentes microbianas, que varían en masa molecular de 80 a 195 kDa y están compuestas por dos o cuatro subunidades idénticas. La enzima glucosa isomerasa proveniente de *Streptomyces* es un tetrámero compuesto por cuatro cadenas polipeptídicas idénticas de 43,000 daltons cada una (Bhasin y Modi 2012).

### **2. Aplicación industrial**

La isomerización de glucosa a fructosa es un proceso industrial a gran escala en la producción de JMAF y etanol (Souza y col 2012, Yaman y Calik 2017). El rápido crecimiento en la demanda de fructosa se atribuye principalmente a dos factores: tiene una dulzura mayor

**Cuadro 3.** Exportación de jarabe de maíz alto en fructosa de Estados Unidos al mundo y específicamente a México.

<b>Año</b>	<b>Total mundial (miles de ton)</b>	<b>México (miles de ton)</b>	<b>%</b>
2006	560	293	52.3
2007	741	422	56.9
2008	793	552	69.6
2009	791	550	69.5
2010	1597	1256	78.6
2011	1652	1247	75.5
2012	1902	1514	79.6
2013	1489	1156	77.6
2014	1480	1085	73.3
2015	1404	1104	78.6

Fuente: USDA 2018.

a la ofrecida por la sacarosa y puede ser producida a partir de almidón a un costo menor (Gaily y col 2010).

La isomerización de glucosa a fructosa es una reacción reversible catalizada por la enzima glucosa isomerasa. Aunque en literatura se presentan diferentes formas para la conversión de estos isómeros, por ejemplo, la aplicación de soluciones ácidas (Mawhinney y col 1980) o resinas de intercambio iónico fuertemente alcalinas (Moreau y col 2000), el uso de la tecnología de enzimas ha sido la aplicación industrial más importante en la producción de fructosa. El almidón, un polímero de glucosa, es calentado y procesado con enzimas que hidrolizan el almidón en 98-100% de jarabe de glucosa. Con el fin de transformar este producto en jarabe de fructosa, la glucosa se procesa adicionalmente en presencia de la enzima glucosa isomerasa, que convierte la glucosa en su isómero, fructosa. La conversión es de equilibrio limitado y con la tecnología de isomerización enzimática actual, la conversión de glucosa a fructosa es limitada económicamente de 42% a 55% de fructosa (Zhang y col 2004, Gaily y col 2010, Lima y col 2011). La concentración de fructosa en el jarabe puede ser mejorada mediante la eliminación selectiva de glucosa o mediante la aplicación de métodos de separación cromatográfica de varias etapas (Hultin 1983, Ricca y col 2007).

A pesar de ser uno de los procesos biocatalíticos más grandes y exitosos, presenta algunas desventajas, como los altos costos operativos debido a la desactivación irreversible de las enzimas y su reemplazo periódico, la necesidad de una materia prima de glucosa

extremadamente pura que implica el uso de varios pasos de purificación previos a la reacción y el control riguroso de las condiciones de reacción (temperatura, pH, etc.) para maximizar la vida útil de las enzimas (Graca y col 2017). Durante su vida útil (que, según las condiciones de uso, puede ser de hasta un año) 1 kg de glucosa isomerasa inmovilizada puede convertir al menos 18000 kg de JMAF (masa seca). La enzima inmovilizada se usa generalmente en el intervalo de 55 a 60 °C y un pH de 7.5 a 7.8. La enzima se debe almacenar a una temperatura entre 2 y 8 °C. A esta temperatura, la enzima es capaz de mantener su actividad declarada durante 6 meses. En cambio, a temperatura ambiente (25 °C), la enzima mantendrá su actividad declarada por solo 1 mes (NCBE 2018).

### **3. Inmovilización de enzimas**

La estabilidad operativa de las enzimas aplicadas en procesos industriales se ha mejorado constantemente a lo largo de los años mediante el uso de la Ingeniería Genética, la inmovilización o las alteraciones del proceso. La inmovilización enzimática es la estrategia más utilizada para impartir las características deseables a los catalizadores (Won y col 2005).

La inmovilización de enzimas consiste en la fijación de sus cadenas proteínicas en diferentes soportes mediante el uso de diversos vehículos y técnicas de acoplamiento (Simionescu y col 1984). Las ventajas que ofrecen los sistemas de enzimas inmovilizadas pueden resumirse de la siguiente manera (Kilara y col 1979, Won y col 2005): (1) uso múltiple o repetitivo de un solo lote de enzima en una variedad de reactores, (2) mejor control del proceso - la enzima se puede separar de los reactivos, (3) estabilidad mejorada - contribuye a la estabilización de la estructura terciaria y los factores anti-turbulencia, (4) los productos están libres de enzima, (5) vidas medias largas y velocidades de decaimiento predecibles y (6) buen modelo para estudiar cinéticas *in vivo* de enzimas.

En general, la razón principal para el uso de sistemas inmovilizados está relacionada con la reducción económica de los costos operativos, causada por el uso de enzimas de alto costo, o por la obtención de productos de bajo valor económico. Sin embargo, este tipo de procesos con enzima inmovilizada tiene una serie de desventajas que deben mejorarse, como: (1) baja carga de enzima, (2) la difusión del sustrato a la enzima está restringida, (3) bajas eficiencias, liberación por rafaga, inestabilidad de la enzima encapsulada, (4) solo un pequeño aumento en la constante de afinidad del sustrato (Homaei y col 2013).

#### **a. Inmovilización de glucosa isomerasa a nivel comercial**

La enzima glucosa isomerasa inmovilizada se distribuye a nivel comercial con el nombre Sweetzyme® por Novozymes. Hoy en día, la enzima domina el mercado más grande de la industria alimentaria (Zittan y col 1975, Bhosale y col 1996, Dekhordi y col 2009). El procedimiento de inmovilización utilizado se describe a continuación: (1) se produce un concentrado celular por centrifugación del caldo de cultivo y posteriormente se rompe a través de un homogeneizador, después se reticula con glutaraldehído, se diluye y se flocula con un floculante catiónico; (2) la mezcla se filtra y el agregado húmedo reticulado se extruye por medio de un extrusor axial; (3) finalmente, las partículas se secan en un secador de lecho fluido y se tamizan, por lo que la fracción de partículas (300-1000  $\mu\text{m}$ ) se puede utilizar para la operación en lecho empacado (Jørgensen y col 1988).

#### **b. Otros métodos de inmovilización**

Debido a que las enzimas son un grupo muy diverso de entidades biológicas, no existe ningún método universal para la inmovilización. Los procedimientos para la inmovilización de enzimas tienen que ser desarrollados con cautela, cuidando que cada enzima en particular mantenga sus niveles de actividad en valores razonables, y para fines prácticos, que conserve

la estabilidad y las propiedades físicas deseadas a largo plazo, lo cual podría facilitar la operación a gran escala (Tumturk y col 2008).

Varias técnicas han sido desarrolladas para la inmovilización de enzimas, incluyendo la adsorción en materiales insolubles, atrapamiento en geles poliméricos, encapsulación en membranas, la reticulación con reactivos bifuncionales o uniones covalentes sobre soportes insolubles. Por lo tanto, la inmovilización puede lograrse de muchas maneras, pero el proceso siempre afecta en cierta medida a la actividad de la enzima. De las técnicas mencionadas, el atrapamiento en geles poliméricos es uno de los métodos más simples de inmovilización y bajo condiciones más suaves, que da lugar a una mínima desnaturalización del biocatalizador durante el proceso. Esta técnica puede ser definida como la restricción física de la enzima dentro de un espacio confinado o red. La gelificación de los polímeros polianiónicos o policatiónicos por la adición de contraiones multivalentes es un método simple y común de atrapamiento de la enzima. Los alginatos son uno de los polímeros utilizados con más frecuencia debido a sus propiedades gelificantes y su no toxicidad. Las enzimas son atrapadas por la adición gota a gota de una solución acuosa que contiene alginato de sodio y el biocatalizador, a una solución de cloruro de calcio. El catión actúa como un agente de reticulación hacia el alginato, y las gotas precipitan en forma de perlas con los biocatalizadores atrapados dentro de la red (Martinsen y col 1989, Tumturk y col 2008).

### **C. REACTORES ENZIMÁTICOS**

Más de 80% del valor comercial de las enzimas está vinculado a sus aplicaciones como catalizadores de un proceso. La forma tradicional del uso de enzimas ha sido mediante reacciones hidrolíticas realizadas con la enzima disuelta en un medio acuoso. Esta tecnología sigue representando una parte importante de los procesos enzimáticos, sin embargo, en las

últimas décadas el uso de enzimas en la síntesis orgánica ha ampliado su ámbito de aplicación a niveles sin precedentes (Illanes y Altamirano 2008).

Los reactores enzimáticos pueden operar por lotes o de forma continua, también se ha propuesto la operación de alimentación por lotes (fed-batch) (Kumar y col 1996). Los procesos por lotes con enzimas (por lo general hidrolasas) disueltas en un medio de reacción acuoso, a pesar de su amplia aplicación tienen varios inconvenientes, ya que las enzimas son poco estables y difíciles de recuperar en tales sistemas, lo que lleva a una baja productividad (Ballesteros y Plou 1999).

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

El funcionamiento continuo de los reactores enzimáticos está ligado en gran medida a enzimas inmovilizadas, ya que la estabilidad debe ser alta para justificar una operación continua. La excepción notable es el caso de la licuefacción de almidón con  $\alpha$ -amilasa bacteriana, donde se utiliza la enzima soluble en la licuefacción continua de almidón de maíz para la elaboración de JMAF; la enzima se dosifica de forma continua a un reactor tubular en

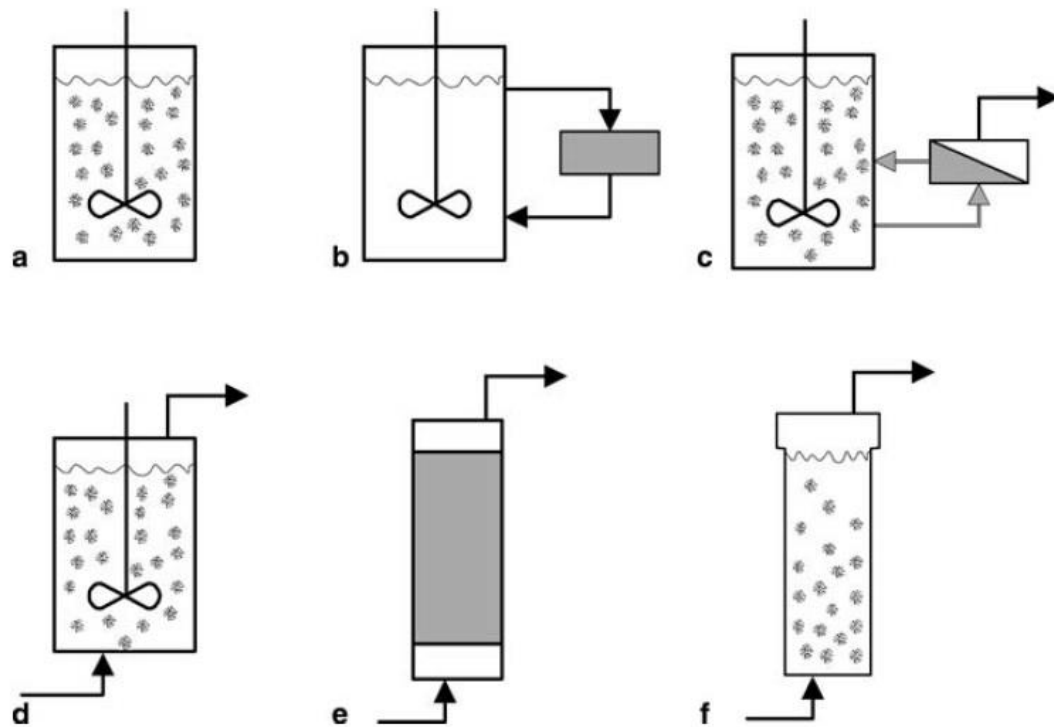


donde se produce la hidrólisis y la gelatinización del almidón de manera simultánea (Linko y col 1975).

En este caso, el precio bajo de la enzima, y en consecuencia, su poca importancia en el costo de operación, permite un uso ineficiente del biocatalizador. Pero en la mayoría de los casos, los procesos continuos se realizan con enzimas inmovilizadas (D'Souza 1999).

Se han propuesto y usado varias configuraciones de reactor para la realización de procesos catalizados por enzimas, como se muestra en la **Figura 2**. Las operaciones por lotes con enzimas solubles se llevan a cabo principalmente en reactores de tanque agitado, equipados con dispositivos para el mezclado, control de temperatura y pH. Las operaciones por lotes con enzimas inmovilizadas también se llevan a cabo en reactores de tanque agitado, pero en este caso, se incluye un dispositivo para permitir la retención del biocatalizador después de la recuperación del producto al final de cada lote. El sistema más utilizado posee una malla de acero inoxidable, pero existen otras alternativas como los reactores de tipo canasta y también retención de biocatalizadores in-situ y ex-situ en módulos de ultrafiltración. En ocasiones, se han empleado reactores por lotes con recirculación, la enzima es empacada en la forma de un lecho estrecho a través del cual el medio de reacción se hace circular hasta el punto en que la conversión deseada se alcanza. Esta configuración permite un funcionamiento suave cuando la reacción implica la producción o el consumo de protones y la enzima es sensible a la variación de pH. Dado que la conversión por paso es baja (y controlable a voluntad), lo es también el cambio de pH, el cual es controlado en la cámara de recirculación. De esta manera, la enzima no está nunca en contacto directo con el ácido o base utilizado para el control del pH (Illanes y Altamirano 2008).

Las opciones existentes para la operación continua con enzimas inmovilizadas son muchas. Los reactores más utilizados son los de columna de lecho empacado (Marrazzo y col



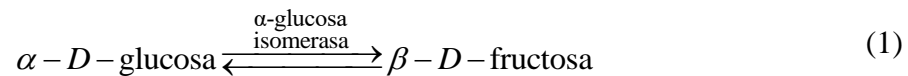
**Figura 2.** Diferentes configuraciones de reactor con enzimas inmovilizadas: (a) por lotes; (b) por lotes con recirculación; (c) tanque agitado-ultrafiltración; (d) tanque agitado continuo; (e) lecho empacado; (f) lecho fluidificado. Fuente: Illanes y Altamirano 2008.

1975), donde la enzima inmovilizada se fija dentro del reactor mientras que la corriente de sustrato pasa a través del mismo, y el reactor de tanque agitado donde la enzima se mantiene en el reactor mediante una malla apropiada (Vásquez-Bahena y col 2004). Una alternativa es el reactor de lecho fluidificado o expandido donde las partículas de enzima son retenidas por un equilibrio hidrodinámico entre la gravedad y las fuerzas de arrastre promovidas por la corriente de sustrato de flujo ascendente (Ching y Chu 1988).

## D. DESARROLLO MATEMÁTICO

### 1. Mecanismo cinético

La transformación enzimática de  $\alpha$ -D-glucosa a  $\beta$ -D-fructosa es típicamente representada por la siguiente ecuación química:



Diversos estudios enfocados en establecer el comportamiento cinético de la isomerización de  $\alpha$ -D-glucosa a  $\beta$ -D-fructosa han sido realizados; siendo el mecanismo Briggs-Haldane el más ampliamente utilizado (Roels 1983, Chen and Wu 1987):



donde  $E$  es la enzima libre activa,  $G$  es glucosa,  $F$  es fructosa y  $X$  es el complejo intermediario entre la enzima y la glucosa ( $GE$ ) o fructosa ( $EF$ ), respectivamente. Aquí,  $k_1$ ,  $k_{-1}$ ,  $k_2$  y  $k_{-2}$  corresponden a las constantes de velocidad de las reacciones intermediarias. Aplicando el método cuasi estacionario, es posible obtener una expresión general para las velocidades de

reacción de consumo de sustrato ( $-\mathbf{r}_1$ ) y generación de producto ( $\mathbf{r}_2$ ) por unidad másica de enzima, en términos de concentraciones de sustrato y de producto ( $c_1$  y  $c_2$ ), esto puede ser representado mediante la siguiente ecuación:

$$-\mathbf{r}_1 = \mathbf{r}_2 = \frac{\frac{V_{mf}}{K_{mf}} c_1 - \frac{V_{mr}}{K_{mr}} c_2}{1 + \frac{c_1}{K_{mf}} + \frac{c_2}{K_{mr}}} \quad (3)$$

donde los parámetros cinéticos  $V_{mf}$  y  $K_{mf}$  corresponden a la velocidad máxima de reacción y la constante de afinidad de Michaelis-Menten para la conversión de sustrato a producto, respectivamente, mientras que  $V_{mr}$  y  $K_{mr}$  son parámetros análogos para la reacción inversa. Estos parámetros se pueden obtener a partir de las velocidades de reacción específicas ( $k_1$ ,  $k_2$ ,  $k_{-1}$  y  $k_{-2}$ ) y la concentración total de enzima  $[E]$  mediante las siguientes expresiones:

$$V_{mf} = k_2[E] \quad (4)$$

$$K_{mf} = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} \quad (5)$$

$$V_{mr} = k_{-1}[E] \quad (6)$$

$$K_{mr} = \frac{k_{-1} + k_2}{k_{-2}} \quad (7)$$

$$K_{eq} = \frac{V_{mf} K_{mr}}{V_{mr} K_{mf}} \quad (8)$$

donde  $K_{eq}$  es la constante de equilibrio de la reacción (Camacho-Rubio y col 1995, Bravo y col 1998, Palazzi y Converti 1999, Dekhordi y col 2009), y las constantes de velocidad de reacción específicas se obtienen mediante:

$$k_m = A_m \exp\left(-\frac{E_{a,m}}{RT}\right) \quad m = 1, 2, -1, -2 \quad (9)$$

En este sentido, el ajuste de la ecuación (3) con datos experimentales obtenidos en un reactor de tanque agitado por lotes utilizando enzima libre permite obtener la constante de equilibrio  $K_{eq}$  y los parámetros cinéticos  $V_{mf}$ ,  $V_{mr}$ ,  $K_{mf}$  y  $K_{mr}$ , los cuales son función de la concentración inicial de sustrato y la concentración de enzima utilizada  $[E]$ .

## 2. Cinética con Enzima Inmovilizada

La transferencia de masa de una especie química  $i$  en una perla biocatalítica se puede expresar a través de la siguiente ecuación diferencial (Giordano y col 2000, Palazzi y Converti 2001):

$$\varepsilon_p \frac{\partial c_i}{\partial t} = D_{eff,i} \left( \frac{\partial^2 c_i}{\partial r^2} + \frac{2}{r} \frac{\partial c_i}{\partial r} \right) + \varepsilon_p \hat{r}_i \quad (10)$$

con condiciones frontera:

$$t > 0 \quad r = 0 \quad \frac{\partial c_i}{\partial r} = 0; \quad (11)$$

$$t > 0 \quad r = r_p \quad -D_{eff,i} \frac{\partial c_i}{\partial r} = k_{L,i} (c_i - C_i) \quad (12)$$

y condición inicial:

$$t = 0 \quad 0 \leq r \leq r_p \quad c_i = c_{i,0} \quad (13)$$

donde  $\hat{r}_i$  es la velocidad de reacción volumétrica basada en el volumen total de los poros en las perlas,  $D_{eff,i}$  es el coeficiente de difusión efectivo (CDE) dentro de la partícula,  $\varepsilon_p$  es la porosidad de la perla biocatalítica,  $C_i$  es la concentración de la fase líquida,  $k_{L,i}$  es el coeficiente convectivo de transferencia de masa de la fase fluida y  $r_p$  es el radio de la perla biocatalítica. En este caso, el subíndice  $i$  denota la especie química: glucosa ( $i=1$ ) y fructosa ( $i=2$ ), mientras que el subíndice "0" representa una condición inicial. Por otro lado,  $\hat{r}_i$  se puede definir a partir de la velocidad de reacción de la enzima libre ( $r_i$ ), obteniéndose esta última mediante pruebas cinéticas en un sistema de reacción con enzima libre (SREL). Las unidades dimensionales de  $r_i$  se definen por  $V_{mf} = k_2[E]$ , donde la concentración de enzima está dada por  $[E] = m_{E,t}/V_t$ , la cual es una relación entre la masa total de enzima ( $m_{E,t}$ ) y el volumen total de reacción ( $V_t$ , fase líquida). Al realizar pruebas en un reactor de tanque agitado utilizando enzima inmovilizada en PACs es posible estimar el CDE de la partícula catalítica.

### 3. Reactor de lecho empacado

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

$$\varepsilon_b \frac{\partial C_i}{\partial t} = D_z \frac{\partial^2 C_i}{\partial z^2} - U_s \frac{\partial C_i}{\partial z} + (1 - \varepsilon_b) k_L \hat{a}_p (c_{s,i} - C_i) \quad (14)$$

sujeta a las siguientes condiciones de frontera:

$$z = 0 \quad t > 0 \quad -D_z \frac{\partial C_i}{\partial z} + C_i U_s = C_{feed,i} U_s \quad (15)$$

$$z = L \quad t > 0 \quad \frac{dC_i}{dz} = 0 \quad (16)$$

y a la condición inicial:

$$0 \leq z \leq L \quad t = 0 \quad C_i = C_{i,0} \quad (17)$$

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

La condición de frontera expresada por la ecuación (16) representa la ausencia de un gradiente de concentración de sustrato a la salida del reactor debido a la escasez de la fuerza motriz de reacción, aun cuando la concentración de sustrato a la salida del reactor es diferente de cero (Asif y Abasaheed 1998).

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

$$\varepsilon_p \frac{\partial c_i}{\partial t} = D_{eff} \left( \frac{\partial^2 c_i}{\partial r^2} + \frac{2}{r} \frac{\partial c_i}{\partial r} \right) + \frac{\eta}{1 - \varepsilon_b} \mathbf{r}_i \quad (18)$$

sujeta a las siguientes condiciones de frontera:

$$r = 0 \quad t > 0 \quad \frac{\partial c_i}{\partial r} = 0; \quad (19)$$

$$r = r_p \quad t > 0 \quad -D_{eff} \frac{dc_i}{dr} = k_L (c_i - C_i) \quad (20)$$

y a la condición inicial:

$$0 \leq r \leq r_p \quad t = 0 \quad c_i = c_{i,0} \quad ; \quad t = 0 \quad C_i = C_{i,0} \quad (21)$$

### **a. Propiedades físicas de lecho empacado y fluidificado**

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

#### **1) Porosidad**

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

$$\varepsilon = 0.373 + 0.917 \exp\left(-0.824 \frac{d_t}{d_p}\right) \quad 2 \leq d_t/d_p \leq 19 \quad (22)$$

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

#### **2) Coeficiente de transferencia de masa**

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



$$j_m = \frac{1.09}{\varepsilon_b} \text{Re}^{-2/3} \quad (23)$$

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

$$j_m = \frac{\text{Sh}}{\text{Re Sc}^{1/3}} \quad (24)$$

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

$$\text{Re} = \frac{\rho U_s d_p}{\mu} \quad (25)$$

$$\text{Sc} = \frac{\mu / \rho}{D_{AB}} \quad (26)$$

$$\text{Sh} = \frac{k_L d_p}{D_{AB}} \quad (27)$$

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

### 3) Coeficiente de dispersión axial

Es necesario indicar que los sistemas continuos con enzimas inmovilizadas operan a regímenes de flujos bajos y, por tanto, la transferencia de masa por el mecanismo de dispersión (en reactores heterogéneos típicamente es denominada de esta manera a la difusión) y convección en la fase fluida deben ser considerados con la misma importancia. La relación

de ambos mecanismos de transporte se expresa a través del número de Peclet. El coeficiente de dispersión axial en la bioconversión de glucosa a fructosa ya fue abordado y reportado por Chung y Wen (1968), quienes bajo las condiciones de estudios elegidas en su investigación, establecieron la siguiente correlación basada en el número de Peclet:

$$\frac{1}{\text{Pe}_z} = \frac{\varepsilon_b \text{Re}}{0.2 + 0.011 \text{Re}^{0.48}} \quad (28)$$

donde  $\text{Pe}_z$  es el número de Peclet y está definido por la siguiente ecuación:

$$\text{Pe}_z = \frac{U_s d_p}{D_z} \quad (29)$$

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

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

- a. El mecanismo cinético con parámetros independientes a los fenómenos convectivos y/o difusionales para la conversión de sustrato.
- b. La transferencia de masa intra-partícula considerando la reacción química y difusión del sustrato.
- c. La transferencia de masa extra-partícula considerando la dispersión del sustrato y la transferencia de masa convectiva partícula-fase fluida.

## **E. MÉTODOS NUMÉRICOS**

Durante las últimas décadas ha habido mucha actividad en el área de la solución numérica de problemas de valor inicial que involucran ecuaciones diferenciales ordinarias o sistemas de

ecuaciones diferenciales ordinarias. Este tipo de métodos pueden aplicarse a muchos problemas en mecánica cuántica, física nuclear, física teórica, química teórica, astrofísica, química cuántica y electrónica. Las características más importantes de un método eficiente para la solución de este tipo de problemas son la precisión y la eficiencia computacional. El desarrollo de métodos con las características antes mencionadas es un campo abierto de estudio (Simos 1998).

Los métodos de Taylor de orden superior proporcionan una convergencia rápida, pero su implementación es complicada, ya que es preciso calcular los valores aproximados de las derivadas sucesivas de la solución. El método de Euler en cambio es muy sencillo de aplicar, sin embargo su convergencia es lenta. Es interesante entonces estudiar y obtener métodos numéricos más sencillos que los de Taylor, pero cuya convergencia sea más rápida (Molero y col 2007).

### **1. Método de Runge-Kutta de cuarto orden**

Los métodos explícitos de Runge-Kutta (MRK) se encuentran entre los métodos más populares para la integración numérica de problemas de valor inicial no rígido. El MRK deriva del método de Taylor y converge de forma más rápida en la solución que el método de Euler, ya que extiende la idea geométrica de utilizar varias derivadas para aproximarse a la solución de la función. Debido a su naturaleza de un solo paso, los MRK son de inicio automático y pueden cambiar el tamaño del paso de la integración tan a menudo y según sea necesario. Los MRK también tienen la ventaja de que la teoría que respalda la interpolación en otros métodos de pasos variables está menos desarrollada que para los MRK (Cash y Karp 1990).

Uno de los métodos más utilizados para resolver numéricamente problemas de ecuaciones diferenciales ordinarias con condiciones iniciales es el MRK de cuarto orden, el cual

proporciona un pequeño margen de error con respecto a la solución real del problema y es fácilmente programable en un software para realizar las iteraciones necesarias. La expresión general de los MRK de cuatro etapas es (Molero y col 2007, Chapra y Canale 2007, Mora 2016):

$$z_{n+1} = z_n + h(b_1k_1 + b_2k_2 + b_3k_3 + b_4k_4) \quad (30)$$

donde:

$$k_1 = f(x_n, z_n) \quad (31)$$

$$k_2 = f(x_n + c_2h, z_n + a_{21}hk_1) \quad (32)$$

$$k_3 = f(x_n + c_3h, z_n + a_{31}hk_1 + a_{32}hk_2) \quad (33)$$

$$k_4 = f(x_n + c_4h, z_n + a_{41}hk_1 + a_{42}hk_2 + a_{43}hk_3) \quad (34)$$

Al plantear en general un MRK de cuarto orden se tienen 13 incógnitas:  $b_1, b_2, b_3, b_4, c_2, c_3, c_4, a_{21}, a_{31}, a_{32}, a_{41}, a_{42}$  y  $a_{43}$ ; y al imponer que el orden de consistencia sea  $p = 4$  se tienen 11 ecuaciones. Se tiene entonces una familia biparamétrica de MRK de cuatro etapas, con un orden de consistencia 4. La ecuación se calcula tomando valores de la función en cuatro puntos diferentes y calculando un valor intermedio. La ecuación que más se utiliza, a la que se le denomina *Runge-Kutta clásico*, o simplemente *método de Runge-Kutta*, que es uno de los métodos más utilizados y el de más éxito entre los métodos de un paso, está definida por el tablero de Butcher mostrado en la **Figura 3** y está establecido por la siguiente expresión:

$$z_{n+1} = z_n + \frac{h}{6}(k_1 + 2k_2 + 2k_3 + k_4) \quad (35)$$

donde:

$$k_1 = f(x_n, z_n) \quad (36)$$

$$k_2 = f\left(x_n + \frac{h}{2}, z_n + \frac{h}{2}k_1\right) \quad (37)$$

$$k_3 = f\left(x_n + \frac{h}{2}, z_n + \frac{h}{2}k_2\right) \quad (38)$$

$$k_4 = f(x_n + h, z_n + hk_3) \quad (39)$$

1					
1/2	1/2				
1/2	0	1/2			
1	0	0	1		
		1/6	1/3	1/3	1/6

**Figura 3.** Tablero de Butcher para el MRK de cuarto orden. Fuente: Molero y col 2007.

En el **Cuadro 4** se muestra un ejemplo de los resultados obtenidos al aplicar el método de Euler, el método de Euler mejorado, Taylor de orden dos y Runge-Kutta de orden cuatro con distintos tamaños de paso ( $h$ ) para la expresión:  $y' = 1 - x + 4y$ ,  $y(0) = 1$ , con el fin de aproximar la solución en  $x = 1$ . En este cuadro se muestra la precisión del MRK de orden cuatro con respecto al resto de los métodos comparados (Molero y col 2007).

## 2. Método de diferencias finitas

Este método es de carácter general y permite la resolución aproximada de ecuaciones diferenciales en derivadas parciales definidas en un dominio finito. Es de una gran sencillez conceptual y constituye un procedimiento muy adecuado para la resolución de una ecuación en una, dos o tres dimensiones. El método consiste en una aproximación de las derivadas parciales por expresiones algebraicas con los valores de la variable dependiente en un número finito de puntos seleccionados en el dominio (Zhang 2005). Como resultado de la aproximación, la ecuación diferencial parcial que describe el problema es reemplazada por un número finito de ecuaciones algebraicas, en términos de los valores de la variable dependiente en los puntos seleccionados. Los valores de los puntos seleccionados se convierten en las incógnitas. La solución del sistema de ecuaciones algebraico permite obtener la solución aproximada en cada punto seleccionado de la malla (Carrillo y col 2018).

Sea  $F$  una función tal que ésta y sus derivadas sean finitas y continuas con respecto a cualquier variable  $x$ , entonces a partir del teorema de Taylor se tienen las siguientes aproximaciones (Valdez 2009):

$$F(x+h) = F(x) + hF'(x) + \frac{1}{2}h^2F''(x) + \frac{1}{6}h^3F'''(x) + \dots \quad (40)$$

**Cuadro 4.** Aproximación de resultados a través de diferentes métodos numéricos.

<i>h</i>	<b>Euler</b>	<b>Euler mejorado</b>	<b>Taylor 2</b>	<b>Runge-Kutta 4</b>	<b>Resultado exacto</b>
<b>0.1</b>	34.411490	59.938223	59.938223	64.858107	64.897803
<b>0.05</b>	45.588400	63.424698	63.424698	64.894875	64.897803
<b>0.025</b>	53.807866	64.497931	64.497931	64.897604	64.897803
<b>0.01</b>	60.037126	64.830722	64.830722	64.897798	64.897803

Fuente: Molero y col 2007



$$F(x-h) = F(x) - hF'(x) + \frac{1}{2}h^2F''(x) - \frac{1}{6}h^3F'''(x) + \dots \quad (41)$$

Al sumar ambas ecuaciones se obtiene:

$$F(x+h) + F(x-h) = 2F(x) + h^2F''(x) + O(h^4) \quad (42)$$

Donde  $O(h^4)$  representa los términos que contienen cuartas potencias y superiores de  $h$ .

Considerando que dichos términos son insignificantes comparados con los términos que tienen potencias de  $h$  inferiores, se puede llegar a la siguiente expresión:

$$F''(x) = \left( \frac{d^2F}{dx^2} \right)_{x=x} \simeq \frac{1}{h^2} [F(x+h) - 2F(x) + F(x-h)] \quad (43)$$

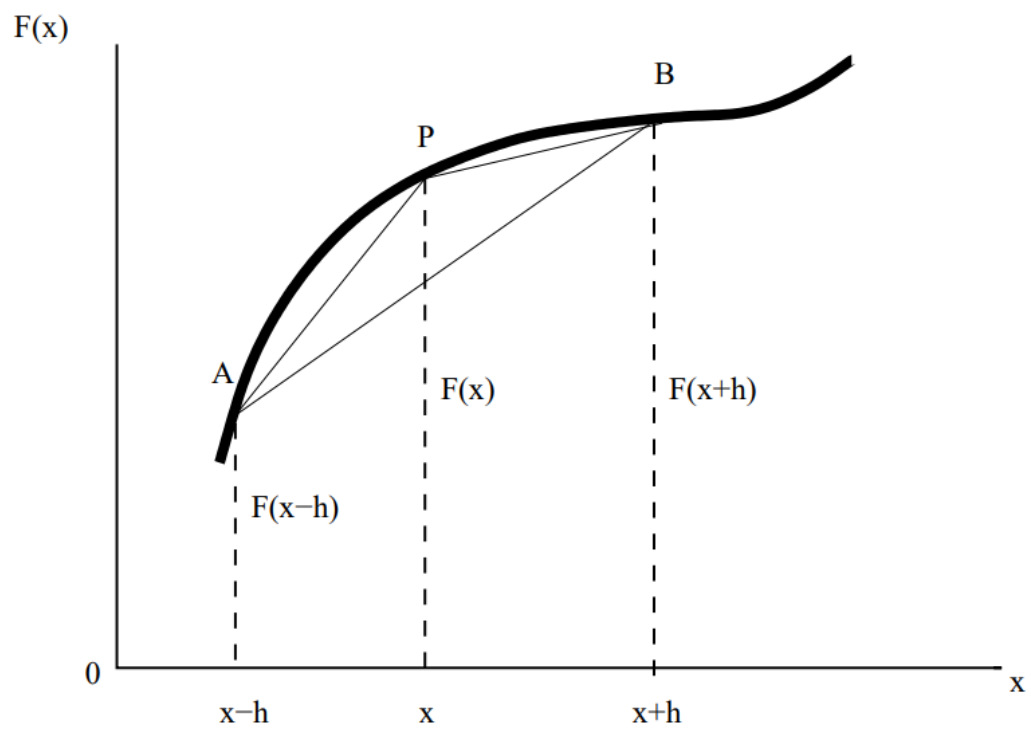
con un error de orden  $h^2$ . Al restar las ecuaciones (40) y (41), despreciando los términos de orden  $h^3$  da como resultado una expresión para  $F'(x)$ :

$$F'(x) = \left( \frac{dF}{dx} \right)_{x=x} \simeq \frac{1}{2h} [F(x+h) - F(x-h)] \quad (44)$$

con un error de orden  $h^2$ . Se puede observar en la **Figura 4** que la ecuación (44) aproxima la pendiente de la tangente en P por la pendiente de la curva AB, esta ecuación es llamada aproximación en diferencias centrales. También es posible aproximar la pendiente de la tangente P, ya sea por la pendiente de la curva PB, dada por la siguiente ecuación (diferencias hacia delante):

$$F'(x) \simeq \frac{1}{h} [F(x+h) - F(x)] \quad (45)$$

o por la pendiente de la curva AP, dada por la siguiente ecuación (diferencia hacia atrás):



**Figura 4.** Aproximación de la pendiente de la tangente en P, por: la pendiente de la curva AB, la pendiente de la curva AP o la pendiente de la curva PB. Fuente: Valdez 2009.

$$F'(x) \approx \frac{1}{h} [F(x) - F(x-h)] \quad (46)$$

### 3. Método de colocación ortogonal usando splines cúbicos de Hermite (MCO-SCH)

El método de colocación es un procedimiento para la solución de ecuaciones diferenciales parciales con valores de frontera, que se basa en la aproximación de una función general por una clase de funciones más simples. Este procedimiento es muy eficiente y aproxima a la solución analítica con un error de discretización pequeño (Finlayson 1971, Raghavan y Ruthven 1983, Contreras 2006).

Hay dos formas de ver las aplicaciones del método de colocación ortogonal. En la primera de ellas, es un método numérico para el cual la convergencia a la respuesta exacta se puede ver a medida que la aproximación se refina en cálculos sucesivos mediante el uso de más puntos de colocación, que son similares a los puntos de la cuadrícula en un método de diferencias finitas. Otro punto de vista considera solo la primera aproximación, que a menudo se puede encontrar de forma analítica, y que proporciona información valiosa sobre el comportamiento cualitativo de la solución. Sin embargo, las respuestas son de una precisión incierta, por lo que el cálculo debe refinarse para obtener números útiles. Aun así, con la experiencia y la precaución adecuada, la primera aproximación suele ser suficiente y es fácil de obtener. Por lo tanto, es muy a menudo útil en trabajos de ingeniería, donde se aceptan aproximaciones válidas (Finlayson 1974).

La clase de funciones de aproximación más común es la de los polinomios, aunque también se pueden utilizar funciones trigonométricas, exponenciales y racionales. De todas estas, la interpolación polinomial es la más utilizada a través de los polinomios de Lagrange y

la

interpolación con polinomios de más alto grado como lo son los polinomios de Hermite. La función general que se quiere aproximar es expresada como la suma de aquellas funciones más simples multiplicadas por un coeficiente, que en principio es una incógnita (Contreras 2006). En este método numérico la función prueba de cada elemento finito se selecciona de forma tal que se garantice su continuidad inter-elemental, así como la continuidad de su primera derivada. Así, la función prueba es considerada como la suma de funciones interpolantes por subdominio  $y = \sum_{k=1}^N s_k$ , donde (Villadsen y Stewart 1972, Carey y Finlayson 1975, Cheng y col 2003):

$$s_k(x) = \begin{cases} 0 & x \notin [x_{k-1}, x_k] \\ y_{k-1} \hat{H}_1^k(x) + y'_{k-1} \hat{H}_2^k(x) + y_k \hat{H}_3^k(x) + y'_k \hat{H}_4^k(x) & x \in [x_{k-1}, x_k] \end{cases} \quad (47)$$

aquí  $y_j = y(x_j)$  y  $y'_j = (dy/dx)_{x=x_j}$ , y las funciones  $\hat{H}_l^k(x)$  son elegidas de manera tal que se cumple con las siguientes condiciones:

$$s_{k-1}(x_{k-1}) = s_k(x_{k-1}) = y_{k-1} \quad (48)$$

$$s'_{k-1}(x_{k-1}) = s'_k(x_{k-1}) = y'_{k-1} \quad (49)$$

que corresponden a las condiciones de continuidad inter-elemental, mientras que las funciones  $\hat{H}_l^k(x)$  son polinomios cúbicos utilizados para satisfacer las ecuaciones (48) y (49); estas funciones se enlistan en el **Cuadro 5**.

Realizando el siguiente cambio de variable para el elemento finito con el subdominio  $[x_{k-1}, x_k]$ :  $x = h_k u + x_{k-1}$ , los polinomios cúbicos  $\hat{H}_i^k(x)$  se transforman a  $H_i^k(u)$ , los cuales se muestran en el **Cuadro 5**. Así, la función prueba se redefine en términos de la variable  $u$  para

**Cuadro 5.** Funciones de interpolación basadas en los polinomios de Hermite para el  $k$ -ésimo subdominio real  $x \in [x_{k-1}, x_k]$  y el dominio de referencia  $u \in [0,1]$ . Nota:  $h_k = x_k - x_{k-1}$

Dominio real	Dominio de referencia
$\hat{H}_1^k(x) = \frac{-1}{h_k^3}(x-x_k)^3 + \frac{3}{h_k^3}(x-x_{k-1})(x-x_k)^2$	$H_1^k(u) = (1+2u)(1-u)^2$
$\hat{H}_2^k(x) = \frac{1}{h_k^2}(x-x_{k-1})(x-x_k)^2$	$H_2^k(u) = u(1-u)^2 h_k$
$\hat{H}_3^k(x) = \frac{1}{h_k^3}(x-x_{k-1})^3 - \frac{3}{h_k^3}(x-x_{k-1})^2(x-x_k)$	$H_3^k(u) = u^2(3-2u)$
$\hat{H}_4^k(x) = \frac{1}{h_k^2}(x-x_{k-1})^2(x-x_k)$	$H_4^k(u) = u^2(u-1)h_k$

Fuente: Contreras 2006.

cada subdominio de los tramos que conforman el dominio. Esto es, la función puede ser interpolada en el  $k$ -ésimo subdominio,  $x \in [x_{k-1}, x_k]$ , a través de la siguiente expresión:

$$y = y_{k-1}H_1^k + y'_{k-1}H_2^k + y_kH_3^k + y'_kH_4^k \quad (50)$$

donde  $u = (x - x_{k-1})/h_k$ . Así, la primera y segunda derivada de la función ( $y$ ) puede ser interpolada en el  $k$ -ésimo subdominio,  $x \in [x_{k-1}, x_k]$ :

$$\frac{dy}{dx} = \frac{1}{h_k} \left\{ y_{k-1} \frac{dH_1^k}{du} + y'_{k-1} \frac{dH_2^k}{du} + y_k \frac{dH_3^k}{du} + y'_k \frac{dH_4^k}{du} \right\} \quad (51)$$

$$\frac{d^2y}{dx^2} = \frac{1}{h_k^2} \left\{ y_{k-1} \frac{d^2H_1^k}{du^2} + y'_{k-1} \frac{d^2H_2^k}{du^2} + y_k \frac{d^2H_3^k}{du^2} + y'_k \frac{d^2H_4^k}{du^2} \right\} \quad (52)$$

Para lo anterior se requieren las primeras y segundas derivadas de los polinomios  $H_l^k(u)$ , las cuales se enlistan en el **Cuadro 6**.

Establecidas las funciones de interpolación y sus primeras y segundas derivadas para cada subdominio, nótese que existen  $2(N+1)$  variables desconocidas:  $\vec{y} = (y_0, y_1, \dots, y_{N-1}, y_N)$  y  $\vec{y}' = (y'_0, y'_1, \dots, y'_{N-1}, y'_N)$ , por tanto, mediante dos puntos de colocación por subdominio, en adición con las dos condiciones de frontera, es posible establecer un sistema de  $2(N+1)$  ecuaciones algebraicas. Eligiendo puntos de colocación a las raíces del polinomio ortogonal

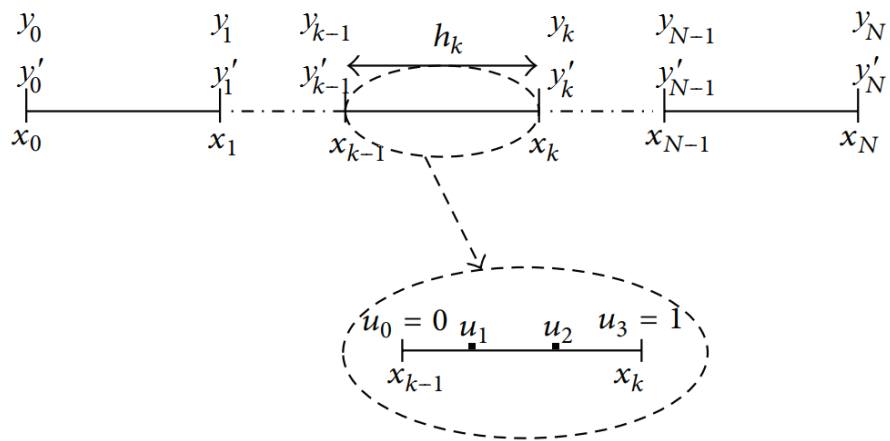
de Legendre desplazado ( $\tilde{P}_2(u) = 6u^2 - 6u + 1$ ), los puntos de colocación son:  $u_1 = 0.2113248654$  y  $u_2 = 0.7886751346$  (**Figura 5**).

Con todo esto, una ecuación diferencial ordinaria, dependiente únicamente de la coordenada espacial, puede ser representada como:

**Cuadro 6.** Primeras y segundas derivadas de los polinomios de Hermite

Primera derivada	Segunda derivada
$\frac{dH_1^k}{du} = 6u^2 - 6u$	$\frac{d^2H_1^k}{du^2} = 12u - 6$
$\frac{dH_2^k}{du} = (1 - 4u + 3u^2)h_k$	$\frac{d^2H_2^k}{du^2} = (6u - 4)h_k$
$\frac{dH_3^k}{du} = 6u - 6u^2$	$\frac{d^2H_3^k}{du^2} = 6 - 12u$
$\frac{dH_4^k}{du} = (3u^2 - 2u)h_k$	$\frac{d^2H_4^k}{du^2} = (6u - 2)h_k$

Fuente: Contreras 2006



**Figura 5.** Subdivisión del dominio en subdominios o elementos finitos. Los cuatro coeficientes, en cada elemento, se estiman utilizando los dos puntos de colocación internos.



$$g_2(x) \frac{d^2 y}{dx^2} + g_1(x) \frac{dy}{dx} + g_0(x) y = b(x) \quad (53)$$

y sujeta a las condiciones de frontera:

$$x = x_0 \quad \alpha_0 \frac{dy}{dx} + \beta_0 y = 0 \quad (54)$$

$$x = x_N \quad \alpha_N \frac{dy}{dx} + \beta_N y = 0 \quad (55)$$

y puede ser discretizada de la siguiente manera:

$$g_2(\xi_{k,j}) \frac{1}{h_k^2} \sum_{l=1}^4 B_{l,j}^k a_{2(k-1)+l} + g_1(\xi_{k,j}) \frac{1}{h_k} \sum_{l=1}^4 A_{l,j}^k a_{2(k-1)+l} + g_0(\xi_{k,j}) \sum_{l=1}^4 H_{l,j}^k a_{2(k-1)+l} = b(\xi_{k,j}) \quad (56)$$

$$\alpha_0 a_2 + \beta_0 a_1 = 0 \quad (57)$$

$$\alpha_N a_{2N+2} + \beta_N a_{2N+1} = 0 \quad (58)$$

donde  $\xi_{k,j} = h_k u_j + x_{k-1}$  con  $j = 1, 2$  y  $k = 1, 2, 3, \dots, N$ . Además,  $H_l^k = H_l^k(u_j)$ ,

$A_{l,j}^k = (dH_l^k / du)_{u=u_j}$ ,  $B_{l,j}^k = (d^2 H_l^k / du^2)_{u=u_j}$  y  $\vec{a} = (y_0, y'_0, y_1, y'_1, \dots, y_{N-1}, y'_{N-1}, y_N, y'_N)$ , siendo

los elementos pares de esta última expresión la solución aproximada para la ecuación (53), mismas que son parte de un sistema lineal de ecuaciones algebraicas (ecuación (56)), que puede ser expresado mediante

$$\mathbf{M} \cdot \vec{a} = \vec{b} \quad (59)$$

En caso de que los coeficientes  $g_k$  de la ecuación (53) sean también dependientes de  $y$ , es decir,  $g_k = g_k(x, y)$ , entonces se obtiene un sistema de ecuaciones algebraicas no lineal, que puede representarse mediante la siguiente expresión:

$$\mathbf{M}(\vec{a}) \cdot \vec{a} = \vec{b} \quad (60)$$

que debe ser resuelta mediante algún método numérico de resolución de sistemas de ecuaciones algebraicas no lineales. Este método puede ser extendido a ecuaciones diferenciales parciales de la forma:

$$\frac{\partial y}{\partial t} = g_2(t, x, y) \frac{\partial^2 y}{\partial x^2} + g_1(t, x, y) \frac{\partial y}{\partial x} + g_0(t, x, y) y + b(t, x, y) \quad (61)$$

sujeta a las condiciones de frontera e inicial:

$$x = x_0 \quad \alpha_0 \frac{dy}{dx} + \beta_0 y = \gamma_0(t) \quad (62)$$

$$x = x_N \quad \alpha_N \frac{dy}{dx} + \beta_N y = \gamma_N(t) \quad (63)$$

$$t = 0 \quad y = f(x) \quad (64)$$

La discretización se realiza por tramos o subdominios, utilizando dos puntos de colocación interna ( $u_1$  y  $u_2$ ) en cada elemento finito, a través de las funciones de interpolación expresadas por las ecuaciones (50), (51) y (52), las cuales son válidas en el subdominio  $[x_{k-1}, x_k]$ . Con esto es posible discretizar la ecuación (61) en  $2N$  ecuaciones diferenciales ordinarias con respecto al tiempo:

$$\sum_{l=1}^4 H_{l,j}^k \frac{da_{2(k-1)+l}}{dt} = g_2(t, \xi_{k,j}, \psi_{k,j}) \frac{1}{h_k^2} \sum_{l=1}^4 B_{l,j}^k a_{2(k-1)+l} + g_1(t, \xi_{k,j}, \psi_{k,j}) \frac{1}{h_k} \sum_{l=1}^4 A_{l,j}^k a_{2(k-1)+l} + g_0(t, \xi_{k,j}, \psi_{k,j}) \sum_{l=1}^4 H_{l,j}^k a_{2(k-1)+l} + b(t, \xi_{k,j}, \psi_{k,j}) \quad (65)$$

donde:

$$\psi_{k,j} = y_{k-1} H_{1,j}^k + y'_{k-1} H_{2,j}^k + y_k H_{3,j}^k + y'_k H_{4,j}^k \quad (66)$$

con  $j=1,2$  y  $k=1,2,3,\dots, N$ . Debido a que son  $2(N+1)$  variables dependientes ( $\vec{a}$ ), las dos ecuaciones diferenciales ordinarias faltantes se obtienen al derivar las condiciones de frontera, esto es:

$$\alpha_0 \frac{da_2}{dt} + \beta_0 \frac{da_1}{dt} = \gamma'_0(t) \quad (67)$$

$$\alpha_N \frac{da_{2N+2}}{dt} + \beta_N \frac{da_{2N+1}}{dt} = \gamma'_N(t) \quad (68)$$

Las ecuaciones (65), (67) y (68) se pueden expresar en notación vectorial mediante la siguiente expresión:

$$\mathbf{M} \cdot \frac{d\vec{a}}{dt} = \vec{f}(t, \vec{a}) \quad (69)$$

o bien:

$$\frac{d\vec{a}}{dt} = \mathbf{M}^{-1} \cdot \vec{f}(t, \vec{a}) \quad (70)$$

Esto representa un sistema de ecuaciones ordinarias con respecto al tiempo, que puede ser integrado con algún método numérico de integración, tal como Runge-Kutta. Sin embargo, es necesario conocer las condiciones iniciales de los elementos del vector  $\vec{a} = (y_0, y'_0, y_1, y'_1, \dots, y_{N-1}, y'_{N-1}, y_N, y'_N)$ . Los elementos impares pueden ser evaluados

mediante la condición inicial dada por la ecuación (64) y los elementos pares por su primer derivada, evaluadas en las coordenadas  $\vec{x} = (x_0, x_1, \dots, x_{N-1}, x_N)$ ; esto es:

$$t = 0 \quad \vec{a} = (f(x_0), f'(x_0), f(x_1), f'(x_1), \dots, f(x_{N-1}), f'(x_{N-1}), f(x_N), f'(x_N)) \quad (71)$$

#### IV. JUSTIFICACIÓN

La isomerización de glucosa a fructosa es uno de los procesos más ampliamente utilizados para producir alimentos y bebidas. Debido a ello, este proceso ha sido extensamente estudiado utilizando enzimas libres e inmovilizadas en diferentes sistemas de reacción por lotes y continuos, destacando estos últimos.

La glucosa isomerasa inmovilizada (Sweetzyme®) no se usa generalmente en reactores de tanque agitado, debido a su pobre resistencia al esfuerzo de corte. Por otro lado, el uso de GI Sweetzyme® en un reactor de lecho empacado conduce a una baja conversión, que es causada por la alta resistencia a la transferencia de masa por convección. Además, existe una alta resistencia a la transferencia de masa difusiva en las perlas de biocatalizador inmovilizado, lo cual es resultado del material y el procedimiento utilizados en el proceso de inmovilización. En este sentido, es esencial sintetizar nuevos materiales que posean mejores características mecánicas y de difusión posteriores al proceso de inmovilización. De hecho, el atrapamiento en perlas de alginato de calcio (PACs) es una de las técnicas más utilizadas para inmovilizar enzimas, debido a la alta resistencia del gel, la baja contracción y la alta permeabilidad de los alginatos.

Para una apropiada descripción de la bioconversión de glucosa a fructosa, mediante sistemas de reacción enzimática continuos e inmovilizados, es necesario considerar en su representación fenomenológica la inclusión de un mecanismo cinético, la transferencia de

masa del sustrato intrapartícula (difusión del sustrato dentro de la perla biocatalítica) y la transferencia de masa del sustrato extra-partícula (dispersión del sustrato a lo largo del reactor).

En la actualidad, existen diversas investigaciones abordando cada uno de estos aspectos, sin embargo existen errores frecuentes en su conceptualización, y los resultados reportados únicamente son válidos bajo las condiciones de operación establecidas, debido a que generalmente no es posible disminuir el efecto de las resistencias de transferencia de masa interna y/o externa en los ensayos cinéticos. Este estudio tiene como objetivo aplicar un nuevo enfoque para modelar el comportamiento fenomenológico de un reactor de tanque agitado y un reactor de lecho empacado utilizando perlas con enzima inmovilizada. Para ello se plantean diferentes esquemas de experimentación para evaluar cada uno de los parámetros que representan de manera integral la conversión de glucosa a fructosa utilizando enzima inmovilizada en un reactor de lecho empacado, garantizando así, la independencia en la representación matemática de cada uno de los fenómenos que ocurren durante la bioconversión.

## **V. OBJETIVOS**

### **A. Objetivo general**

Establecer y validar un modelo general para la conversión enzimática de glucosa a fructosa utilizando glucosa isomerasa inmovilizada en un sistema de biorreacción de lecho empacado.

### **B. Objetivos específicos**

1. Estudiar la cinética de producción de fructosa en función de la temperatura, la concentración de sustrato y la concentración de enzima libre, utilizando un sistema de reacción agitado y por lotes.

2. Evaluar el efecto difusional que ejerce la concentración de enzima y la concentración de sustrato sobre la isomerización de glucosa a fructosa utilizando un sistema inmovilizado de reacción agitado y por lotes.

3. Determinar el impacto que ejerce el régimen de flujo y la concentración de enzima sobre el coeficiente de dispersión en un reactor de lecho empacado.

4. Desarrollar un modelo matemático de la conversión enzimática de glucosa a fructosa utilizando glucosa isomerasa inmovilizada en un sistema de biorreacción de lecho empacado.

## VI. MATERIALES Y MÉTODOS

### A. MATERIALES

Se utilizó glucosa isomerasa inmovilizada (GII), Sweetzyme IT<sup>®</sup>, producida a partir de una cepa de *Streptomyces murinus* y distribuida por Novozymes (Dinamarca). Las partículas de GII se encuentran inmovilizadas en un soporte a base de glutaraldehído, de forma cilíndrica, con un diámetro de aproximadamente 0.6 a 0.8 mm y una longitud de 1.4 a 1.8 mm. La actividad específica en seco de la GII, de acuerdo con el fabricante, es superior a 350 U/g. Se obtuvieron los reactivos glucosa (C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub>), fructosa (C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub>), sulfato de magnesio heptahidratado (MgSO<sub>4</sub> • 7H<sub>2</sub>O), sulfito de sodio (Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>), ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), alginato de sodio (C<sub>6</sub>H<sub>7</sub>O<sub>6</sub>Na) y cloruro de calcio (CaCl<sub>2</sub>) de la empresa Sigma-Aldrich.

### B. MÉTODOS

#### 1. Estrategia general de trabajo

El trabajo se realizó en tres etapas: (1) el estudio del mecanismo cinético, (2) la evaluación de la transferencia de masa intrapartícula y (3) la determinación de los efectos extrapartícula. Para ello, se evaluaron diversos parámetros, que de manera conjunta permiten explicar el

proceso global de conversión de glucosa a fructosa en sistemas enzimáticos inmovilizados. En la **Figura 6** se muestra la estrategia general para la realización de este proyecto.

## **2. Método de análisis de las muestras**

Para la medición de las concentraciones de glucosa y fructosa se utilizó un refractómetro + polarímetro (ATAGO, RePo-2, Japón). Este equipo permite conocer el porcentaje de fructosa que hay en una muestra que puede contener glucosa, fructosa y sacarosa. La determinación se



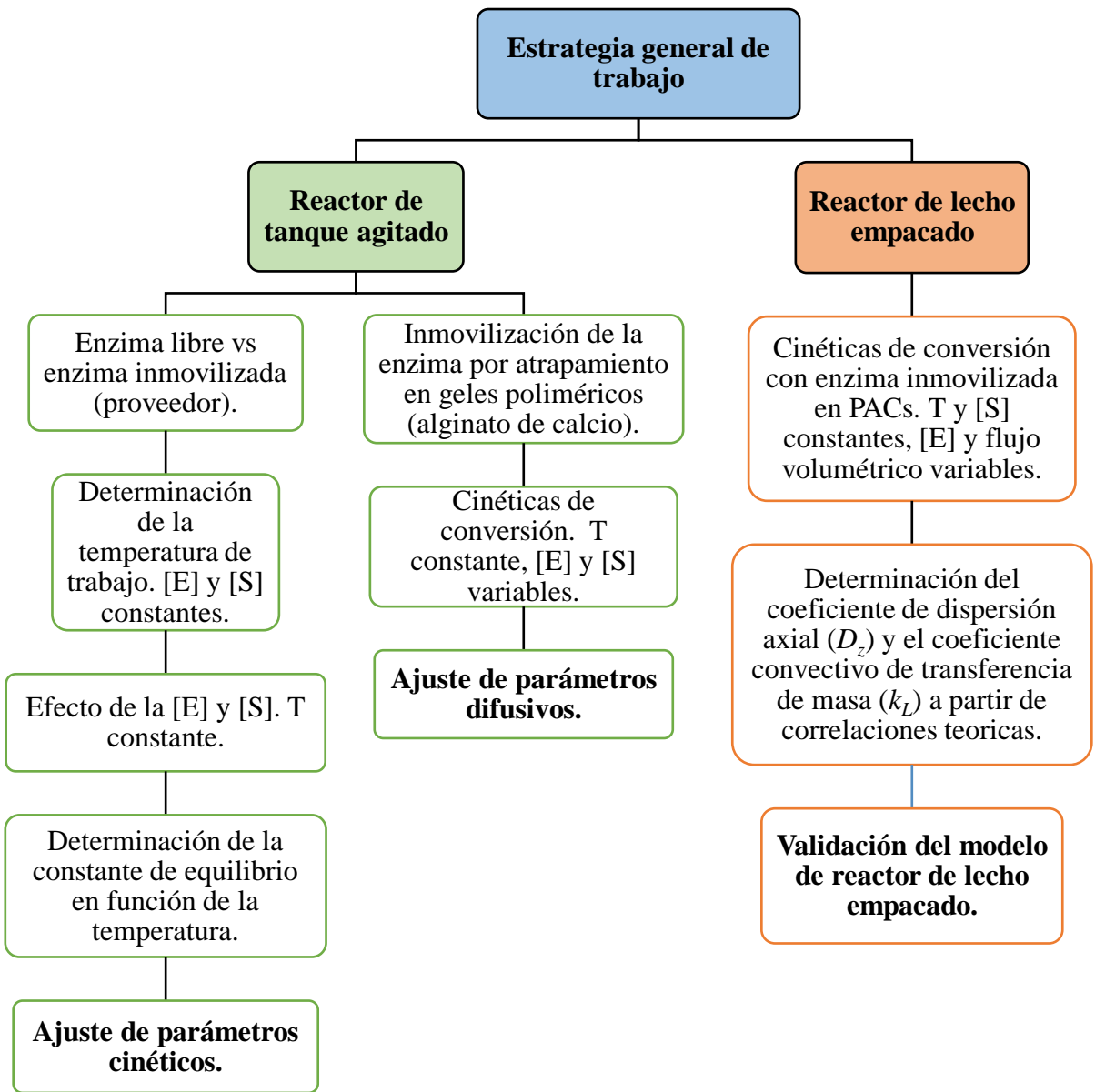


Figura 6. Diagrama general de trabajo.

basa en asociar el contenido en °Brix de la muestra con el ángulo de rotación, el cual es específico para cada uno de estos azúcares. En este caso, al emplear glucosa pura como sustrato, se puede determinar su concentración a través del tiempo por diferencia con respecto a la concentración de fructosa presente en la solución.

### **3. Sistemas de biorreacción**

#### **a. Reactor de tanque agitado**

Se utilizó un reactor de tanque agitado por lotes (RTA), con volumen de 500 mL y chaqueta de calentamiento. El sistema de calentamiento (ThermoPrecision, 51221081, USA) fue capaz de ajustar la temperatura del reactor con una precisión de  $\pm 1$  °C. Se utilizó agua caliente para mantener la temperatura del reactor. El reactor se selló con papel de aluminio durante los experimentos para evitar la pérdida de agua por evaporación. Para disminuir los efectos convectivos, se utilizó una placa de calentamiento con agitador magnético (Barnstead, SP131015, USA) y la velocidad de rotación se ajustó a 880 rpm ( $D_{st} = 0.029$  m,  $D_{ir} = 0.073$  m,  $h_L = 0.060$  m).

#### **b. Reactor de lecho empacado**

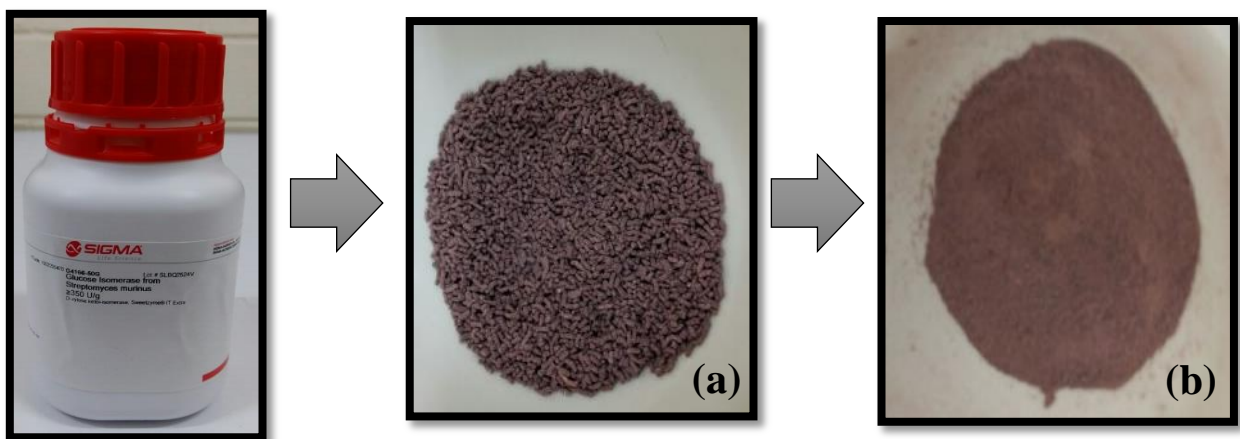
Se utilizó una columna (1.7×75 cm) con chaqueta de calentamiento. Al igual que en el caso anterior, la temperatura se ajustó con agua caliente mediante un baño María (ThermoPrecision, 51221081, USA) conectado al reactor a través de una bomba centrífuga. El reactor es empacado con PACs y la corriente de sustrato fluye a través del reactor por efecto de la gravedad, empleando una válvula de aguja para controlar el flujo. La parte inferior del reactor fue sellada con algodón, que permite la toma de muestra del producto pero evita la pérdida de catalizador.

## 4. Procedimientos experimentales

### a. Reactor de tanque agitado con enzima libre

Para la cinética enzimática libre, se utilizaron mortero y pistilo para la pulverización de la GII antes de cada ensayo experimental. Las dimensiones de las partículas de enzima se redujeron tanto como fue posible y su tamaño se determinó mediante un estereomicroscopio (Motic, DM143, China), obteniendo un tamaño aproximado de 60 a 90  $\mu\text{m}$  de diámetro, lo que se consideró en el presente trabajo como enzima libre (**Figura 7**). Con el fin de validar que el proceso de pulverización no elimina o disminuye la actividad catalítica reportada por la enzima a nivel comercial, se realizaron previamente pruebas bajo las mismas condiciones ( $T = 65\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $\text{pH} = 7.5$ ,  $[\text{E}] = 5\text{ g/L}$  y  $[\text{S}] = 100\text{ g/L}$  ó  $0.556\text{ M}$ ), variando únicamente el tipo de enzima utilizada, enzima libre y enzima inmovilizada (Sweetzyme IT®). Para elegir la temperatura óptima de trabajo, se realizaron varias pruebas a diferentes temperaturas (55, 60, 65 y  $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), con concentraciones de sustrato (100 g/L, 0.556 M) y enzima (5 g/L) constantes. En este conjunto de experimentos se estudió la bioconversión de ambos sistemas, glucosa a fructosa y fructosa a glucosa. Una vez que se determinó la temperatura óptima, se probaron diferentes concentraciones iniciales de glucosa [100 g/L (0.556 M), 150 g/L (0.833 M) y 200 g/L (1.111 M)] y concentración de enzima (5, 7.5 y 10 g/L). Todos los experimentos se llevaron a cabo a un pH constante (7.5) durante un período de 210 minutos. La solución de glucosa inicial (250 mL) se preparó según lo reportado por Dehkordi y col (2009), disolviendo la cantidad requerida de glucosa en agua desionizada, para después agregar 0.7 g de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  con el fin de estabilizar la enzima y 0.7 g de  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  para eliminar el oxígeno disuelto, debido a que el oxígeno presente en el jarabe inactiva la enzima y es responsable de

la formación de productos secundarios durante la isomerización. Posteriormente, el pH se ajustó a 7.5 con  $\text{H}_2\text{SO}_4$  1 N.



**Figura 7.** Comparación entre (a) enzima inmovilizada (Sweetzyme IT®) con respecto a (b) enzima en forma libre utilizada en el presente estudio.

En cada experimento, la solución de alimentación con el volumen, concentración, temperatura y pH deseados se alimentó al reactor. Luego, la velocidad de rotación se ajustó a 880 rpm y la temperatura del reactor se mantuvo en el valor deseado. Después, la cantidad requerida de catalizador se añadió repentinamente al reactor. Este instante fue considerado como el tiempo de inicio de la reacción. Durante el curso de la reacción, se tomaron muestras a los 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 80, 100, 120, 150, 180 y 210 min. El progreso de la reacción dentro de las muestras se detuvo mediante la adición de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1 N. El análisis de las muestras se realizó mediante el método mencionado anteriormente para las concentraciones de glucosa-fructosa. La constante de equilibrio ( $K_{eq}$ ) de la reacción se determinó experimentalmente en función de la temperatura, al seguir el progreso de la reacción hasta que no se presentaron cambios en la

concentración de fructosa con el tiempo,  $K_{eq} = \frac{[P]_{eq}}{[S]_{eq}}$ .

#### **b. Reactor de tanque agitado con enzima inmovilizada**

Para evaluar los efectos difusionales sobre la conversión de glucosa a fructosa, se utilizó un sistema (RTA) similar al descrito anteriormente; sin embargo, en este caso la enzima libre fue inmovilizada en PACs. Para ello se utilizó la metodología reportada por Tunturk y col (2008) con algunas modificaciones. Un sistema que consistió en un embudo, una válvula de aguja y una punta de pipeta de 1 ml se montó sobre un soporte universal, conectado entre sí a través de pequeños trozos de manguera de látex. La cantidad deseada de enzima libre (1.25, 1.875 o 2.5 g) se añadió a una solución de alginato de sodio (175 mL, 2% p/v). Posteriormente, se agregaron 7.0 mL de solución de glutaraldehído (5.0 %) como reactivo bifuncional, para mejorar la estabilidad de las perlas de gel. Las cantidades de alginato de

sodio y glutaraldehído añadidos se determinaron mediante la realización de pruebas preliminares, tomando como referencia la capacidad de reutilización de las perlas, así como el nivel de interacción entre el sustrato y la enzima (% de conversión). La solución preparada previamente se agitó suavemente y se añadió gota a gota a una solución de  $\text{CaCl}_2$  (0.3 M). Las PACs esféricas resultantes fueron removidas y mantenidas en una solución diluida de  $\text{CaCl}_2$  (0.03 M) durante 1 día a 4 °C. Posteriormente, las PACs se lavaron con agua desionizada y se almacenaron a 4 °C para su posterior uso. El tamaño de las perlas (3 mm de diámetro) se controló abriendo o cerrando la válvula. El diámetro de las perlas se midió utilizando un calibrador. El peso de las PACs antes de cada ensayo es variable, debido a que son capaces de absorber o liberar humedad. Por esta razón, antes de cada corrida experimental se realizó un lavado y escurrido de las mismas, procurando siempre alimentar al reactor la misma masa de PACs. Además, se determinó también la densidad aparente de las perlas mediante la metodología de desplazamiento de volumen (Tocci y Mascheroni 2008) y la porosidad a través del contenido de humedad de las perlas. Dichos parámetros son necesarios para la realización de cálculos posteriores. Una vez hecho esto, las condiciones iniciales de temperatura (65 °C), pH (7.5), velocidad de rotación (880 rpm), concentración de enzima (3.213, 4.784 y 6.292 g/L) y concentración de sustrato (0.556, 0.833, y 1.111 M) fueron establecidas. El inicio de la reacción se consideró al agregar las PACs al reactor y se tomaron muestras cada 30 minutos durante un período total de 210 minutos. Cabe señalar que la concentración de enzima está expresada en g de enzima/volumen total de reacción y aunque la masa de enzima utilizada es igual a la empleada en el reactor de tanque agitado con enzima libre, su concentración cambia en función del volumen ocupado por el agente inmovilizador (PACs).

### **c. Reactor de lecho empacado con enzima inmovilizada**

En cada corrida experimental, el reactor fue empacado con PACs y se establecieron las condiciones de entrada requeridas. La solución de alimentación a la temperatura (65 °C), concentración de glucosa (100 g/L) y pH (7.5) deseados se alimentó al reactor variando en cada corrida el caudal volumétrico utilizado. La temperatura del reactor se mantuvo mediante el uso de agua caliente a través de la chaqueta de calentamiento. Las muestras se tomaron a través de la conexión de muestreo de efluente del reactor situada en la parte inferior del mismo.

Los ensayos experimentales se realizaron a cuatro velocidades de flujo diferentes (0.5, 1, 2 y 4 mL/min) (diferentes regímenes de flujo, o números de Re) y dos concentraciones de enzima en las PACs (5.482 y 10.618 g/L). Se tomaron muestras cada 30 minutos hasta que el porcentaje de conversión no cambió con el tiempo (estado estacionario). El procedimiento para el análisis de las muestras fue el mismo que el utilizado en el RTA con enzima libre e inmovilizada.

## **5. Método de ajuste del modelo**

### **a. Reactor de tanque agitado con enzima libre**

Un aspecto clave en los procesos con enzima libre es la búsqueda de mecanismos cinéticos cuya representación matemática sea adecuada para describir los datos experimentales obtenidos en el laboratorio, que en el caso de mecanismos de reacción complejos, generalmente conduce a la optimización de los parámetros cinéticos minimizando el error

entre los datos experimentales y numéricos, siendo necesaria, en cada iteración de esta técnica numérica, la solución del sistema de ecuaciones diferenciales para el mecanismo de reacción estudiado. En el caso del mecanismo reversible de Briggs-Haldane, en cada intervalo de tiempo, la relación sustrato/producto establece el efecto que los parámetros cinéticos ejercen sobre el comportamiento cinético de la reacción. Por lo tanto, el ajuste individual de los parámetros cinéticos a partir de datos experimentales solo garantiza ser preciso en la dirección de la reacción, para el experimento estudiado. En este sentido, el proceso numérico posterior que permite establecer la dependencia de estos parámetros en función de la temperatura puede no garantizar el mejor ajuste. Por consiguiente, es esencial establecer una metodología numérica que permita el ajuste simultáneo de diferentes cinéticas en las que se considera la bioconversión en ambas direcciones de reacción y bajo diferentes condiciones de temperatura.

### 1) Estrategia de linealización

En el caso de un SREL e isotérmico, es posible obtener una solución linealizada para la ecuación (3), en términos de las concentraciones de sustrato y enzima iniciales. Mientras que las concentraciones de sustrato y producto iniciales son  $c_{1,0}$  y  $c_{2,0}$ , respectivamente, en el equilibrio se obtiene que  $c_{1,0} + c_{2,0} = c_{1,eq} + c_{2,eq} = c_0$  (conservación de la materia) y  $K_{eq} = c_{2,eq}/c_{1,eq}$  (equilibrio termodinámico), esto puede llevar a la siguiente ecuación:

$$c_{2,eq} = \frac{K_{eq}c_0}{K_{eq} + 1} \quad (72)$$

Por otro lado, en cualquier momento, se tiene que  $c_1 + c_2 = (K_{eq} + 1)c_{2,eq}/K_{eq} = c_0$ , por lo tanto, la ecuación (3) se puede establecer solo en función de la concentración de producto. De



las definiciones establecidas en las ecuaciones (4)-(8), es posible integrar la ecuación (3) y obtener la siguiente expresión:

$$t = B_1 \frac{c_2 - c_{2,0}}{[E]} - (B_{21} + B_{22}c_0) \frac{c_2 - c_{2,0}}{[E]\Delta c_{2,m}} \quad (73)$$

donde los coeficientes  $B_1$ ,  $B_{21}$  y  $B_{22}$  se definen como sigue:

$$B_1 = \frac{K_{eq}}{K_{eq} + 1} \frac{1}{\bar{V}_{mf}} \left( 1 - \frac{K_{mf}}{K_{mr}} \right) \quad (74)$$

$$B_{21} = \frac{K_{eq}}{K_{eq} + 1} \frac{K_{mf}}{\bar{V}_{mf}} \quad (75)$$

$$B_{22} = \frac{K_{eq}}{(K_{eq} + 1)^2} \left( \frac{1}{\bar{V}_{mf}} + \frac{1}{\bar{V}_{mr}} \right) \quad (76)$$

aquí,  $\bar{V}_{mf} = V_{mf}/[E] = k_2$  y  $\bar{V}_{mr} = V_{mr}/[E] = k_{-1}$ , por lo tanto, los coeficientes  $B_1$ ,  $B_{21}$  y  $B_{22}$ , dependen solo de la temperatura. Es necesario tener en cuenta que la ecuación (73) es una expresión linealizada del tiempo con respecto a las concentraciones de producto, en la cual,  $\Delta c_{2,m}$  es la media logarítmica de las diferencias entre las concentraciones finales e iniciales con respecto a la concentración en equilibrio, y se define mediante la siguiente ecuación:

$$\Delta c_{2,m} = \frac{c_2 - c_{2,0}}{\ln \frac{c_2 - c_{2,eq}}{c_{2,0} - c_{2,eq}}} \quad (77)$$

Después de multiplicar la ecuación (73) por el factor  $(c_2 - c_{2,eq}) / [t(c_{2,0} - c_{2,eq})]$ , es posible reescribir la ecuación (73) de tal manera que permita estimar la fracción de producto no alcanzada con respecto a las condiciones de equilibrio ( $\theta$ ):

$$\theta = \alpha B_1 + \beta B_{21} + \gamma B_{22} \quad (78)$$

donde estos parámetros están definidos por las siguientes expresiones:

$$\theta = \frac{c_2 - c_{2,eq}}{c_{2,0} - c_{2,eq}} \quad (79)$$

$$\alpha = \frac{(c_2 - c_{2,0})(c_2 - c_{2,eq})}{[E]t(c_{2,0} - c_{2,eq})} \quad (80)$$

$$\beta = -\frac{\alpha}{\Delta c_{2,m}} \quad (81)$$

$$\gamma = -\frac{\alpha c_0}{\Delta c_{2,m}} \quad (82)$$

Para evaluar los parámetros  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ , es necesario proporcionar cierta información, como la concentración de enzima ( $[E]$ ), las concentraciones de sustrato y producto iniciales ( $c_{1,0}$  y  $c_{2,0}$ ), la constante de equilibrio ( $K_{eq}$ ), así como la concentración de producto ( $c_2$ ) alcanzada a través del tiempo ( $t$ ). Los parámetros  $B_1$ ,  $B_{21}$  y  $B_{22}$  pueden evaluarse en términos de tres velocidades de reacción específicas y la constante de equilibrio mediante:

$$B_1 = \frac{1}{K_{eq} + 1} \left( \frac{K_{eq}}{k_2} - \frac{1}{k_{-1}} \right) \quad (83)$$

$$B_{21} = \frac{K_{eq}}{K_{eq} + 1} \left( \frac{k_{-1}}{k_1 k_2} + \frac{1}{k_1} \right) \quad (84)$$

$$B_{22} = \frac{K_{eq}}{(K_{eq} + 1)^2} \left( \frac{1}{k_2} + \frac{1}{k_{-1}} \right) \quad (85)$$

donde la constante de equilibrio se conoce *a priori*, y  $k_1$ ,  $k_2$  y  $k_{-1}$  están en función de la temperatura y los parámetros de Arrhenius: factor pre-exponencial ( $A_m$ ) y energía de activación ( $E_{a,m}$ ); de acuerdo con la ecuación (9).

## 2) Obtención de los parámetros cinéticos

Aunque, es factible determinar las velocidades de reacción específicas ( $k_m$ ) a través del ajuste del modelo cinético linealizado (ecuación (78)), usando datos experimentales, por regresión lineal múltiple; el error experimental, en conjunto con los datos cinéticos cercanos al equilibrio, dificulta el proceso numérico posterior de ajuste de los parámetros de Arrhenius ( $A_m$  y  $E_{a,m}$ ), ya que existen varios escenarios de ajuste, en los cuales las desviaciones entre los datos experimentales y numéricos son similares, incluso si se obtienen valores muy diferentes de  $A_m$  y  $E_{a,m}$ . En este sentido, debido a la relativa simplicidad del modelo cinético linealizado (ecuación (78)), es posible aplicar el algoritmo multivariable de Gauss-Newton para determinar los parámetros de Arrhenius, permitiendo el ajuste simultáneo de diferentes cinéticas isotérmicas, independientemente de la dirección de reacción utilizada o la temperatura de operación.

El ajuste del modelo se propuso al minimizar la suma de cuadrados de los errores entre la fracción de producto no alcanzada con respecto a la condición de equilibrio ( $\theta$ ). Considerando  $N$  cinéticas experimentales con  $M$  número de pruebas realizadas a diferentes tiempos para cada experimento cinético y buscando una notación simplista para referirse a cada prueba, el  $j$ -ésimo ensayo de la  $k$ -ésima cinética fue denotado por  $i = j + (k - 1)M$ . Por lo tanto, el método

para obtener los parámetros cinéticos de Arrhenius consiste en minimizar la siguiente suma de cuadrados residual:  $SSE = \sum_{i=1}^{MN} r_i^2$ , donde  $r_i = (\alpha B_1 + \beta B_{21} + \gamma B_{22})_i - \theta_{\text{exp},i}$ . Aquí, el subíndice  $i$  indica que la expresión entre paréntesis se evalúa en las  $i$ -ésimas condiciones del ensayo experimental. Los parámetros de Arrhenius desconocidos de las velocidades de reacción específicas están representados por  $a_m$  y  $b_m$ , con  $m = 1, -1, 2$ , que se muestran en la siguiente expresión:

$$k_m = a_m^2 \exp\left(-\frac{b_m^2}{RT}\right) \quad (86)$$

Se eligió elevar al cuadrado a los parámetros desconocidos con el fin de evitar asignar valores negativos durante el proceso de optimización. Por lo tanto, en general, si los componentes del vector  $\vec{p}$  representan los parámetros que minimizan el error de los residuos,  $p = (a_1, b_1, a_2, b_2, a_{-1}, b_{-1})$ , estos pueden obtenerse por medio del método de Gauss-Newton a través del siguiente proceso iterativo:

$$\vec{p}_{n+1} = \omega \left\{ \vec{p}_n - \left[ J_{\vec{r}, \vec{p}}(\vec{p}_n)' J_{\vec{r}, \vec{p}}(\vec{p}_n) + \sum_{i=1}^m r_i(\vec{p}_n) H_{r_i, \vec{p}}(\vec{p}_n) \right]^{-1} J_{\vec{r}, \vec{p}}(\vec{p}_n)' \vec{r}(\vec{p}_n) \right\} + (1 - \omega) \vec{p}_n \quad (87)$$

donde  $\omega$  es un factor de sub-relajación ( $0 < \omega < 1$ );  $\vec{r}(\vec{p}_n)$  es el vector de los residuos en función del vector de los parámetros de ajuste obtenidos en iteración  $n$ ;  $J_{\vec{r}, \vec{p}}$  es el Jacobiano del vector residual  $\vec{r}$  con respecto a los parámetros de ajuste, que se define como  $J_{ij} = \partial r_i / \partial p_j$  y  $H_{r_i, \vec{p}}$  es el Hessiano de  $r_i$  con respecto a los parámetros de ajuste  $\vec{p}$ , definido por  $H_{jk} = \partial^2 r_i / \partial p_j \partial p_k$ .

## **b. Reactor de tanque agitado con enzima inmovilizada**

### **1) Modelo de la perla catalítica**

La metodología aplicada para describir el comportamiento cinético en términos matemáticos es uno de los principales problemas en el estudio de los sistemas de reacción con enzima inmovilizada (SREI), ya que los datos experimentales de las concentraciones de producto y sustrato obtenidos en la fase fluida de biorreacción se ajustan directamente con el mecanismo cinético de la enzima libre, estableciendo, con esto, parámetros cinéticos aparentes, que solo son válidos para las condiciones reportadas. Por lo tanto, las limitaciones asociadas con la transferencia de masa por difusión son desconocidas, y es imposible predecir cualquier variación en la geometría de la matriz inmovilizadora. Además, en estos sistemas biocatalíticos, es confuso establecer la concentración de enzima utilizada, ya que hay diferentes volúmenes de referencia (volumen total de biorreacción, volumen de perlas o volumen de líquido intrapartícula); o aspectos más complejos, como la evaluación de FAER después de someter la enzima a un proceso de inmovilización.

Por lo tanto, es de suma importancia que la descripción matemática permita discernir claramente el efecto de los factores que tienen una gran influencia en los mecanismos de reacción y de transporte de masa, y así establecer cuantitativamente la importancia de estos factores en la productividad del proceso de bioconversión.

En un SREI, la enzima se encuentra dentro de las perlas; de hecho, considerando que solo una fracción de la enzima está activa y disponible en la fase líquida (poros) de la perla después del proceso de inmovilización, la concentración efectiva de enzima (CEE) en los poros de la perla se puede estimar aproximadamente como  $[E]_{imm} = \eta m_{E,t} / (\varepsilon_p V_{p,t})$ , siendo  $\eta$ ,  $m_{E,t}$  y  $V_{p,t}$ ,

la fracción de actividad enzimática residual, la masa total de enzima inmovilizada y el volumen total de las perlas, respectivamente. Utilizando el volumen total de reacción ( $V_t$ ) como referencia, la CEE se puede expresar como  $[E]_{imm} = \eta m_{E,t} / [\varepsilon_p (1 - \varepsilon) V_t]$ , donde  $\varepsilon$  es la fracción volumétrica de la fase líquida en el sistema de reacción; por lo tanto, para un SREI que usa la misma proporción de enzima total con respecto al volumen de reacción ( $m_{E,t} / V_t$ ) como en un SREL, se cumple la siguiente relación:

$$\frac{[E]_{imm}}{[E]} = \frac{\eta}{(1 - \varepsilon) \varepsilon_p} \quad (88)$$

Los SREI tienen mayores concentraciones de masa de enzima/volumen de reacción que los SREL. En general, establecer el diseño de un reactor basado en la relación  $m_{E,t} / V_t$  es una tarea muy simple, independientemente de la geometría del reactor o de la perla, con base en el conocimiento del proceso de síntesis de la perla. Por lo tanto, es posible establecer que para un SREI que cumple con la proporción  $m_{E,t} / V_t$ , la velocidad de reacción se define de la siguiente manera:

$$-\hat{r}_1 = \hat{r}_2 = \frac{\frac{\eta}{(1 - \varepsilon) \varepsilon_p} V_{mf} \left( c_1 - \frac{c_2}{K_{eq}} \right)}{K_{mf} + c_1 + \frac{K_{mf}}{K_{mr}} c_2} \quad (89)$$

Note que  $V_{mf}$  es obtenido en un SREL, utilizando  $m_{E,t} / V_t$ . Por lo tanto, es posible expresar la velocidad de reacción en una perla ( $\hat{r}_i$ ) en términos de la velocidad de reacción obtenida con enzima libre ( $r_i$ ), que resulta ser una representación más práctica para propósitos de análisis y diseño, este término puede ser expresado de la siguiente manera:

$$\hat{\mathbf{r}}_i = \frac{\eta}{(1-\varepsilon)\varepsilon_p} \mathbf{r}_i \quad (90)$$

Naturalmente, el establecimiento de la velocidad de reacción expresada por la ecuación (90) requiere la evaluación del factor  $\eta$ , que es una medida de la eficiencia biocatalítica del proceso de inmovilización con respecto a la velocidad de reacción; esto se debe a que durante el proceso de inmovilización, una fracción de masa de la enzima se ve afectada por el proceso en sí y por el agente de inmovilización seleccionado durante la síntesis de las perlas biocatalíticas; es decir, el agente inmovilizador desactiva y/o bloquea una cantidad de sitios activos de la enzima inmovilizada total, reduciendo así su capacidad biocatalítica (**Figura 8**).

Las unidades dimensionales de  $\hat{\mathbf{r}}_i$  (a partir de la definición de  $[E]_{imm}$ ) corresponden a las de velocidad de reacción volumétrica basada en el volumen de poros en las perlas. Con respecto a la FAER ( $\eta$ ), para su evaluación experimental, es necesario eliminar el efecto ejercido por la transferencia de masa por convección sobre el proceso de bioconversión, esto es posible a través de ensayos cinéticos con enzima libre e inmovilizada en un RTA bajo un régimen hidrodinámico alto. A partir de ensayos cinéticos con enzima libre, se puede determinar la expresión cinética de  $\mathbf{r}_i$ ; y a partir de ensayos cinéticos con enzima inmovilizada, la FAER ( $\eta$ ) es evaluada mediante el siguiente sistema de ecuaciones diferenciales cuya solución se ajusta a los datos experimentales obtenidos:

$$\varepsilon_p \frac{\partial c_i}{\partial t} = D_{eff,i} \left( \frac{\partial^2 c_i}{\partial r^2} + \frac{2}{r} \frac{\partial c_i}{\partial r} \right) + \frac{\eta}{1-\varepsilon} \mathbf{r}_i \quad (91)$$

$$V_\infty \frac{dC_i}{dt} = -V_p \hat{a}_p D_{eff,i} \left. \frac{\partial c_i}{\partial r} \right|_{r=r_p} \quad (92)$$

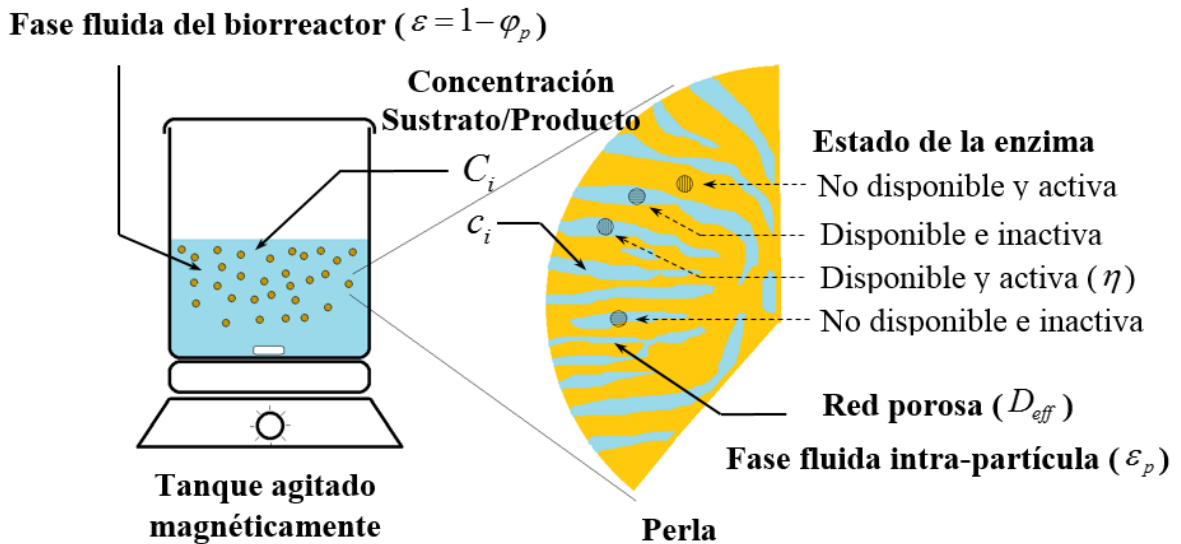
con condiciones de frontera:

$$r = 0 \quad t > 0 \quad \frac{\partial c_i}{\partial r} = 0 \quad (93)$$

$$r = r_p \quad t > 0 \quad c_i = C_i \quad (94)$$

y condiciones iniciales

$$0 \leq r \leq r_p \quad t = 0 \quad c_i = c_{i,0} \quad ; \quad t = 0 \quad C_i = C_{i,0} \quad (95)$$



**Figura 8.** Descripción fenomenológica utilizada en el modelo matemático.





donde  $r_i$  se obtiene a través de la cinética con enzima libre expresada en las ecuaciones (3)-(8), que cumple con la relación  $[E] = m_{E,t}/V_t$ , que también es igual a la relación entre la masa total de perlas con respecto al volumen total de reacción para un SREI en un RTA. Además,  $V_\infty$  y  $V_p$  son el volumen de las fases líquida (sobrenadante) y sólida (perla) del biorreactor, respectivamente, que en términos de la fracción volumétrica de partícula ( $\varphi_p = V_p/(V_\infty + V_p)$ ), la ecuación (92) se puede reescribir de la siguiente manera:

$$\frac{dC_i}{dt} = -\frac{\varphi_p}{1-\varphi_p} \hat{a}_p D_{eff,i} \left. \frac{\partial C_i}{\partial r} \right|_{r=r_p} \quad (96)$$

donde  $\hat{a}_p$  representa el área específica de la partícula (para una partícula esférica de radio  $r_p$ ,  $\hat{a}_p = 3/r_p$ ).

## 2) Método de discretización

Uno de los problemas fundamentales para obtener una solución numérica de ecuaciones diferenciales parciales, como la expresada en la ecuación (89), corresponde al proceso de discretización aplicado para obtener el sistema de ecuaciones ordinarias en cada coordenada espacial de interpolación. La solución puede variar bruscamente en una pequeña región del dominio espacial, como resultado de las condiciones de frontera utilizadas. Esto lleva a grandes errores numéricos en la solución obtenida si no se utiliza un proceso de discretización apropiado. Por lo tanto, es necesario que los métodos numéricos implementados consideren los diferentes comportamientos de una familia de soluciones asociadas a un sistema de ecuaciones diferenciales. Debido a ello, se espera que para los perfiles de concentración de una especie química, en una perla biocatalítica sometida a una alta resistencia a la transferencia de masa, estén presentes grandes gradientes de concentración en la superficie de

la perla. Consecuentemente, un procedimiento de discretización apropiado para ecuaciones diferenciales corresponde al uso del MCO-SCH, ya que esta metodología garantiza la continuidad de la función de solución, así como de su primera derivada.

### 3) Obtención de los parámetros de ajuste

El modelo matemático expresado por las ecuaciones (91) y (96) con sus respectivos límites y condiciones iniciales (93)-(95) tiene como parámetros desconocidos, el CDE de la especie  $i$  dentro de la partícula ( $D_{eff}$ ) y la FAER ( $\eta$ ), que se ajustaron mediante el Método de Búsqueda Simplex de Lagarias y col (1998). Por lo tanto, el método de optimización para los parámetros  $D_{eff}$  y  $\eta$  se llevó a cabo de la siguiente manera: (1) se aplicó un cambio de variable para  $D_{eff} = a^2$  y  $\eta = [\text{erf}(b)]^2$ , lo que garantiza que la búsqueda del valor  $D_{eff}$  solo esté en el intervalo  $[0, \infty)$ , y para el valor  $\eta$ , en el intervalo  $[0, 1]$ ; (2) el sistema de ecuaciones diferenciales expresado por las ecuaciones (91) y (93)-(96) fue codificado, en donde las ecuaciones (93)-(95) fueron discretizadas previamente por el MCO-SCH. Estas ecuaciones discretizadas describen el transporte difusivo y la reacción intrapartícula de glucosa y fructosa; (3) el sistema de ecuaciones diferenciales ordinarias generado en el paso anterior, en conjunto con la ecuación (96), que describe el balance de glucosa y fructosa en la fase líquida de un RTA, se integró simultáneamente por el método de Dormand y Prince (1980), el cual es miembro de la familia de MRKs; (4) se evaluó la suma de cuadrados de los residuos ponderados (SSWR) entre los datos experimentales y simulados, y se utilizó como criterio para el ajuste de los parámetros  $D_{eff}$  y  $\eta$ , a través del Método de Búsqueda Simplex (Lagarias

y col 1998). El criterio de minimización utilizado es el siguiente: 
$$SSWR = \sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^m (d_{ij}/W_j)^2,$$

donde  $SSWR$  representa, por sus siglas en inglés, la suma de los cuadrados de los residuos ponderados,  $i$  y  $j$  representan el número de puntos de datos experimentales y el número de variables, respectivamente,  $W_j$  representa el peso de cada variable (valor máximo de cada variable) y  $d_{ij}$  denota la diferencia entre el modelo y el valor experimental.

### **c. Reactor de lecho empacado con enzima inmovilizada**

#### **1) Método de discretización**

La distribución de concentración del sustrato en la fase fluida para un reactor de lecho empacado y sus condiciones de frontera e inicial establecidas en las ecuaciones (14)-(17) representan a un sistema heterogéneo compuesto de una fase sólida (PACs) y una fase fluida (sustrato) que se desplaza a través de ella en la dirección  $z$ . Por otra parte, dentro del mismo sistema se debe hacer consideración de la velocidad de reacción generada a partir de la penetración del sustrato hacia el interior de la partícula catalítica en dirección  $r$ , misma que está representada en las ecuaciones (18)-(21). Es decir, el problema se vuelve más complejo al existir dos sistemas de ecuaciones diferenciales parciales que dependen de  $r$ ,  $z$  y  $t$ .

Se utilizó la metodología de diferencias finitas (ecuaciones (43)-(46)) para discretizar el sistema de ecuaciones diferenciales parciales y transformarlas en ecuaciones diferenciales ordinarias o totales, de tal manera que se logró obtener un conjunto de cientos de ecuaciones que solamente dependen de la derivada del tiempo. Este conjunto de ecuaciones discretizadas se integraron con el método Runge-Kutta de cuarto orden para su resolución numérica.

#### **2) Obtención de los parámetros $k_L$ y $D_z$**

Para la determinación de  $k_L$  se utilizó la correlación propuesta por Wilson y Geankoplis (1966) mostrada en la ecuación (23). El número adimensional de Colburn tiene embebido en

su definición al número de Sherwood, el cual a su vez contiene a  $k_L$  como parte de su definición. Al utilizar el conjunto de ecuaciones (23)-(27) es posible conocer  $k_L$ .

Por otra parte, para determinar  $D_z$  se empleó la correlación propuesta por Chung y Wen (1968). Esta correlación está representada por la ecuación (28). El parámetro  $D_z$  se encuentra integrado en el número de Peclet y es definido a partir de la ecuación (29).

## **6. Diseño de experimentos**

El diseño experimental se dividió en cuatro partes, la primera parte corresponde a la determinación de la temperatura óptima de trabajo en un RTA con enzima libre. Para ello se empleó un diseño unifactorial completamente al azar, en donde el factor fue la temperatura del reactor con cuatro niveles (55, 60, 65 y 70 °C) y la variable de respuesta fue la conversión de glucosa a fructosa expresada en moles por litro (M) de producto.

Para la segunda parte, se utilizó un diseño de dos factores completamente aleatorio, donde, al utilizar un RTA con enzima libre, se estudiaron los factores concentración de sustrato [100 g/L (0.556 M), 150 g/L (0.833 M) y 200 g/L (1.111 M)] y concentración de enzima (5, 7.5 y 10 g/L), mientras que la variable de respuesta fue la conversión de glucosa a fructosa expresada en moles por litro (M) de producto.

En la tercera parte se utilizó un RTA con enzima inmovilizada en PACs. Se empleó un diseño bifactorial, donde los factores fueron la concentración de sustrato [100 g/L (0.556 M), 150 g/L (0.833 M) y 200 g/L (1.111 M)] y la concentración de enzima (3.213, 4.784 y 6.292 g/L).

Por último, en la cuarta etapa, se aplicó un diseño bifactorial en un reactor de lecho empacado con enzima inmovilizada en PACs. Los factores fueron el flujo volumétrico (0.5, 1, 2 y 4 mL/min) y la concentración de enzima (5.482 y 10.618 g/L).

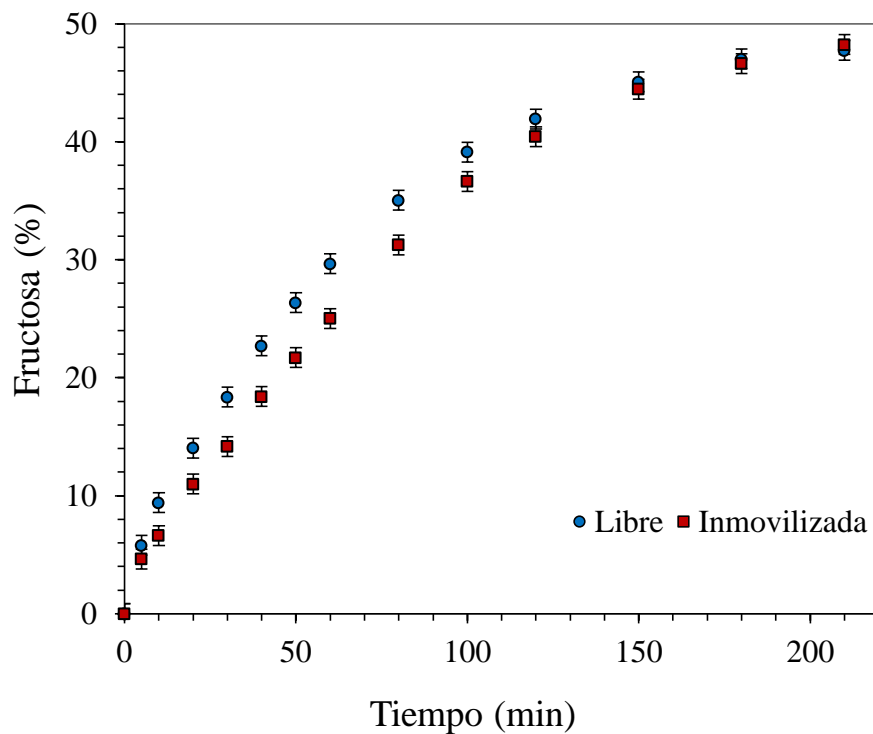
Para la comparación de medias, en todos los casos se implementó la prueba de Fisher con  $\alpha=0.05$  (Montgomery 1991). Todas las pruebas se realizaron por triplicado.

## VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### A. CINÉTICA DE ENZIMA LIBRE

En la **Figura 9** se muestra la comparación entre la conversión de glucosa a fructosa usando la enzima glucosa isomerasa libre con respecto a la enzima en forma inmovilizada (Sweetzyme). El porcentaje de conversión aumenta a mayor velocidad al utilizar enzima en forma libre. La conversión tiende a igualarse conforme se incrementa la escala temporal, esto principalmente debido a dos factores: (1) la reacción se aproxima al equilibrio (aproximadamente 50 % de conversión) y (2) el soporte que contiene a la enzima inmovilizada es altamente susceptible al daño mecánico provocado por el sistema de agitación, de tal forma que conforme transcurre la reacción, la enzima se libera gradualmente y se aproxima a su estado en forma libre. De esta forma, se validó el uso de la enzima en forma libre para etapas posteriores del presente trabajo y se comprobó que el soporte utilizado a nivel comercial para inmovilizar la enzima no es apto para ser usado en sistemas de reacción de tanque agitado, puesto que el daño mecánico sufrido impide la recuperación del catalizador al final del proceso, y con ello, su reutilización.

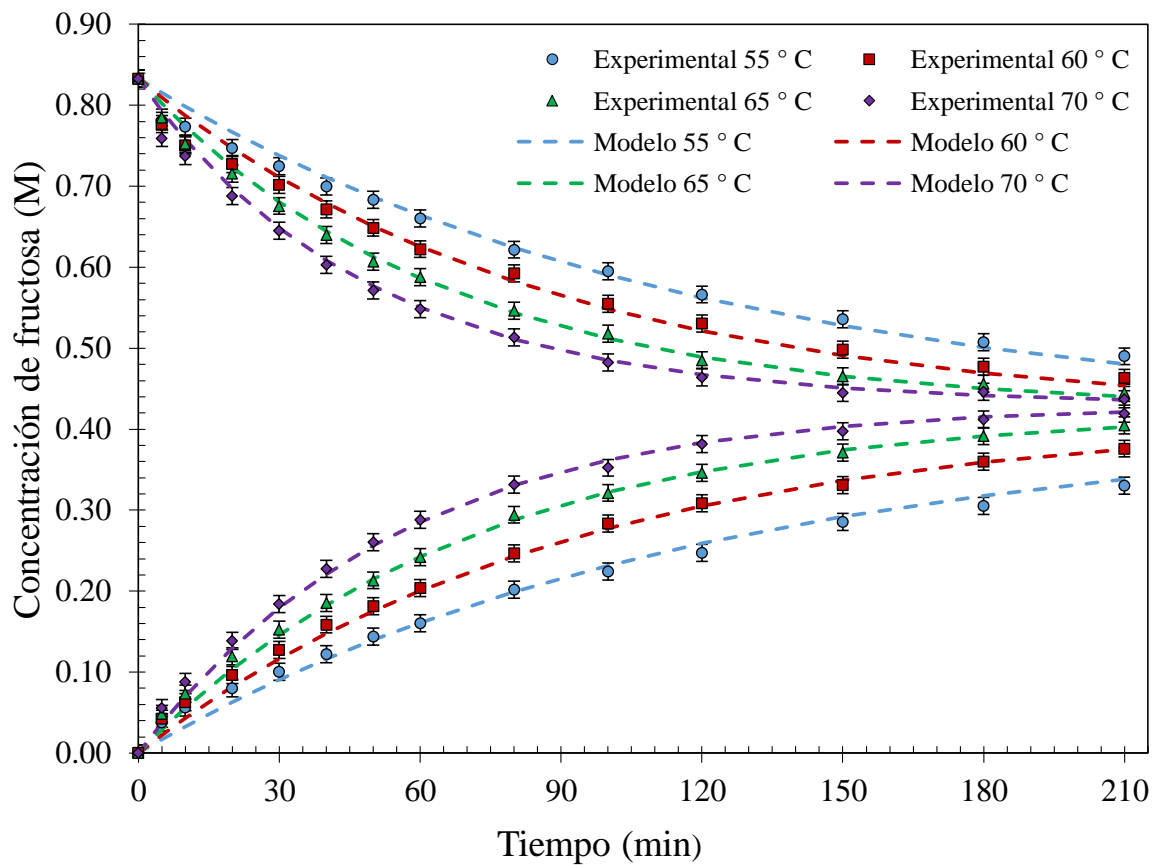
La **Figura 10** muestra los datos experimentales para la conversión de glucosa a fructosa y fructosa a glucosa, utilizando solo una concentración de 0.833 M de glucosa o fructosa como sustrato, respectivamente, y 5 g/L de enzima libre a diferentes temperaturas de proceso (55, 60, 65 y 70 °C). La temperatura óptima seleccionada fue de 65 °C. Para seleccionar dicha temperatura se tomaron en cuenta dos factores: (1) mayor conversión de sustrato a producto y (2) capacidad para reutilizar la enzima un mayor número de ocasiones al ser inmovilizada en PACs. Aunque la conversión a 70 °C fue ligeramente mayor, el daño mecánico sufrido por las perlas fue mucho mayor en comparación con 65 °C después del quinto día de uso (**Figura 11**).



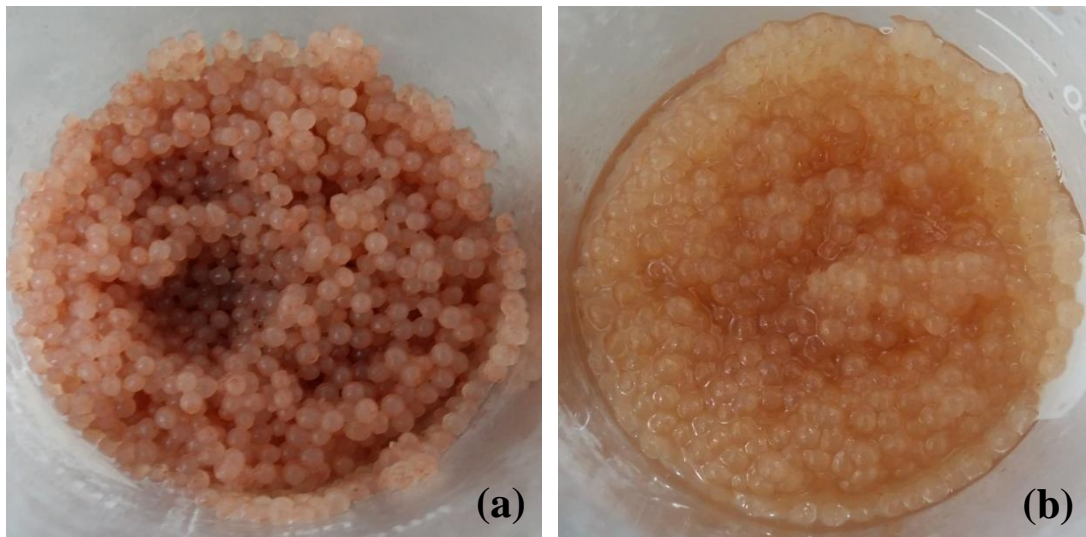
**Figura 9.** Comparación entre las conversiones de glucosa a fructosa utilizando glucosa isomerasa libre e inmovilizada en un RTA ( $T = 65\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $\text{pH} = 7.5$ ,  $[\text{E}] = 5\text{ g/L}$  y  $[\text{S}] = 150\text{ g/L}$ ).

LSD = 1.67 %.



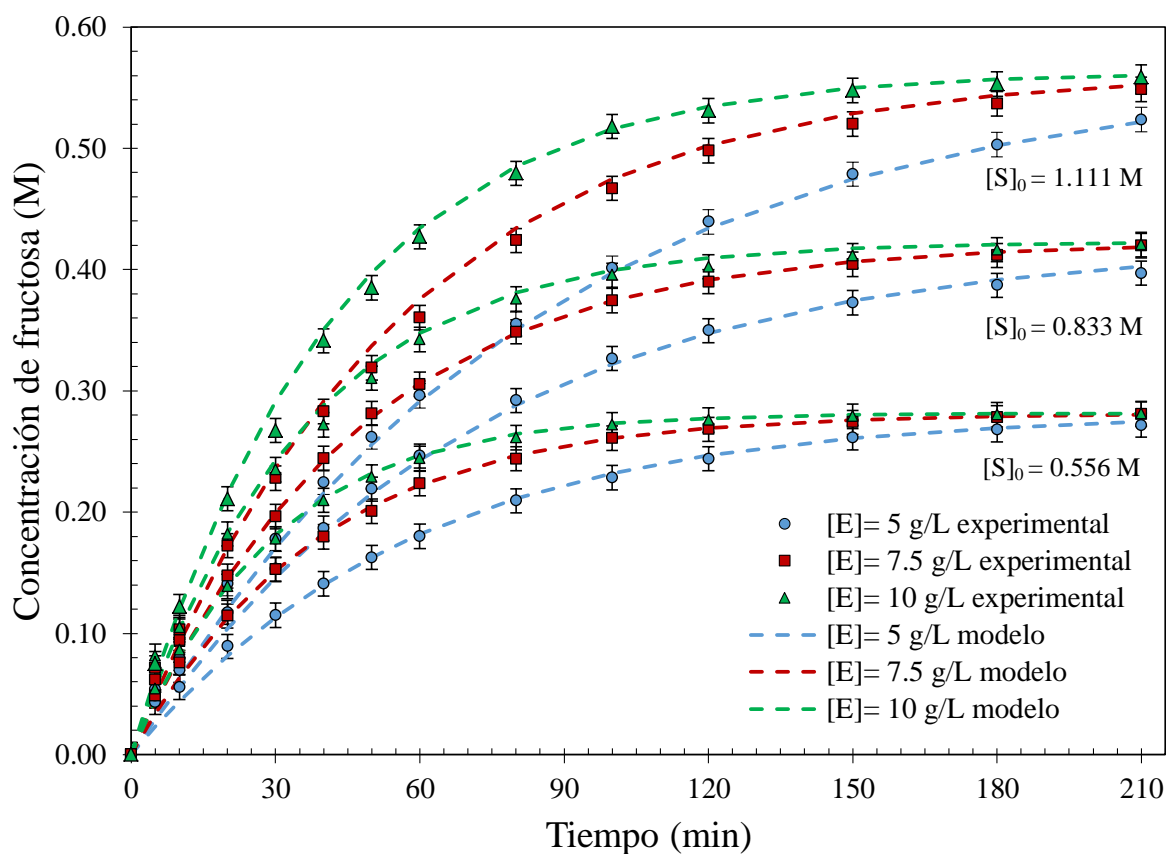


**Figura 10.** Efecto de la temperatura en la cinética de bioconversión de glucosa/fructosa y fructosa/glucosa utilizando enzima libre en un RTA con 5 g/L de enzima libre y 0.833 M de sustrato. LSD = 0.0210 M.



**Figura 11.** Estado físico de las PACs con la enzima atrapada en su interior después de 5 reutilizaciones, (a) pruebas a 65 °C y (b) pruebas a 70 °C.

Esto es debido a que la elasticidad del alginato de calcio disminuye con el aumento de la temperatura (Andresen y Smidsørod 1977), favoreciendo la ruptura de las perlas, y con esto, la pérdida de pequeñas fracciones de perlas. Por otro lado, la **Figura 12** muestra los datos experimentales para la conversión de glucosa a fructosa utilizando diferentes concentraciones iniciales de glucosa (0.556, 0.833 y 1.111 M), así como diferentes concentraciones de enzima libre (5, 7.5 y 10 g/L) a 65 °C. Resulta lógico que al incrementar la [E] y la [S] la conversión aumenta significativamente. El modelo cinético expresado por la ecuación se ajustó simultáneamente a todos los datos experimentales mostrados en las **Figuras 10 y 12**; y los resultados obtenidos del ajuste se presentan mediante líneas continuas y semicontinuas. Se observa un ajuste adecuado entre los datos experimentales y simulados, con un coeficiente de determinación de  $R^2 = 0.9974$ . Los parámetros obtenidos del ajuste se muestran en el **Cuadro 7**. A través de ellos es posible conocer cómo varían las constantes de velocidad de las reacciones intermediarias ( $k_1$ ,  $k_2$ ,  $k_{-1}$  y  $k_{-2}$ ) en función de la temperatura. Además, el **Cuadro 8** muestra los parámetros cinéticos reversibles del mecanismo de Briggs-Haldane dados por las ecuaciones (4)-(8); así como las constantes de equilibrio obtenidas experimentalmente (55-70 °C, 0.995-1.062) utilizando enzima libre. Estas constantes están en el intervalo (55-65 °C, 0.850-1.170) reportado por Dehkordi y col (2009) utilizando enzima inmovilizada (Sweetzyme IT®). Se puede observar que a medida que se incrementa la temperatura, la proporción de concentración de fructosa/glucosa también aumenta; más en detalle, la relación entre la velocidad máxima de producción de fructosa con respecto a la producción de glucosa ( $V_{mf}/V_{mr}$ ) disminuye, al igual que la relación entre las constantes de afinidad de Michaelis-Menten ( $K_{mf}/K_{mr}$ ) también disminuye. Esta combinación de comportamientos provoca un



**Figura 12.** Efecto de la glucosa y la concentración de enzima en la cinética de bioconversión de glucosa/fructosa utilizando enzima libre en un RTA a 65 °C. LSD = 0.0200 M.

**Cuadro 7.** Parámetros cinéticos de Arrhenius (55-70 °C).

$m$	$A_m$	$E_{a,m}$
1	$6.507 \times 10^6$ 1/(M·s)	69676 J/mol
2	8.162 mol/(g·s)	34532 J/mol
-1	$5.932 \times 10^2$ mol/(g·s)	45966 J/mol
-2	$8.646 \times 10^3$ 1/(M·s)	51753 J/mol

**Cuadro 8.** Parámetros cinéticos del mecanismo de Briggs-Haldane.

$T$ °C	$k_1$ 1/(M·s)	$k_2$ mol/(g·s)	$k_{-1}$ mol/(g·s)	$k_{-2}$ 1/(M·s)	$K_{eq}$	$\frac{V_{mf}}{V_{mr}}$	$\frac{K_{mf}}{K_{mr}}$
55	$5.272 \times 10^{-5}$	$2.599 \times 10^{-5}$	$2.859 \times 10^{-5}$	$4.994 \times 10^{-5}$	0.953	0.909	0.947
60	$7.735 \times 10^{-5}$	$3.143 \times 10^{-5}$	$3.681 \times 10^{-5}$	$6.639 \times 10^{-5}$	1.002	0.854	0.858
65	$1.122 \times 10^{-4}$	$3.779 \times 10^{-5}$	$4.705 \times 10^{-5}$	$8.752 \times 10^{-5}$	1.030	0.803	0.780
70	$8.752 \times 10^{-5}$	$4.520 \times 10^{-5}$	$5.971 \times 10^{-5}$	$1.144 \times 10^{-4}$	1.062	0.757	0.711

en la producción de fructosa, donde la proporción de velocidades máximas predomina sobre la relación de constantes de afinidad; esta diferencia se acentúa a medida que aumenta la temperatura.

Refiriéndose a la constante de equilibrio, los datos experimentales se utilizaron para ajustar los parámetros de la ecuación de Arrhenius, obteniendo el siguiente resultado:

$$K_{eq} = 10.356 \exp\left(-\frac{6489 \text{ J/mol}}{RT}\right) \quad (97)$$

Con respecto a la metodología numérica implementada para obtener el ajuste de los parámetros cinéticos de Arrhenius, ésta se llevó a cabo en dos etapas: (1) se obtuvo una primera aproximación a partir del método multivariable de Gauss-Newton utilizando solamente el Jacobiano del sistema algebraico no lineal, y (2) esta solución se refinó incorporando el Hessiano a la metodología numérica. Aunque no se incluyó en este trabajo, también se utilizó el algoritmo de Levenberg-Marquardt, que permitió obtener un ajuste de parámetros aceptable pero no equilibrado, debido a que la cinética de conversión de glucosa a fructosa fue favorecida.

## **B. CINÉTICA CON ENZIMA INMOVILIZADA**

### **1. Ajuste del modelo**

Para el trabajo experimental de bioconversión de glucosa a fructosa con enzima glucosa isomerasa inmovilizada en un RTA, el coeficiente convectivo de transferencia de masa se consideró insignificante, debido al régimen de agitación utilizado. Además, se consideró el mismo CDE para la glucosa y la fructosa, debido a la gran similitud de ambas especies químicas. Los parámetros de operación empleados en la determinación del CDE ( $D_{eff}$ ) y

FAER ( $\eta$ ) se enumeran en el **Cuadro 9**, los cuales se evaluaron experimentalmente. Las concentraciones de glucosa y fructosa dentro de la perla catalítica se consideraron insignificantes.

Es importante señalar que incluso después de realizar un lavado posterior a la elaboración de las PACs, éstas mantuvieron un excedente de calcio, el cual es liberado durante las primeras corridas experimentales, afectando el nivel de interacción entre el sustrato y la enzima, y con ello, la conversión máxima alcanzada. Para cada lote nuevo de perlas, se repitieron las mismas condiciones hasta que el valor de conversión final no varió (Ejemplo Prueba 1 = 15 % de conversión, Prueba 2 = 25 %, Prueba 3 = 29 %, Prueba 4 = 29 %, Prueba 5 = 29 %). Se puede distinguir visualmente la liberación de calcio durante la reacción, así como el cambio de color de las PACs cuando el excedente de calcio es liberado (**Figura 13**).

La **Figura 14** muestra los datos experimentales para la conversión de glucosa a fructosa, utilizando enzima inmovilizada en PACs. Se varió la concentración de glucosa (0.556, 0.833 y 1.111 M) y la concentración de enzima (3.213, 4.784 y 6.292 g/L), siendo esta última establecida como la relación de enzima total/volumen total de reacción ( $m_{E,t}/V_t$ ), similar a un sistema de reacción con enzima libre.

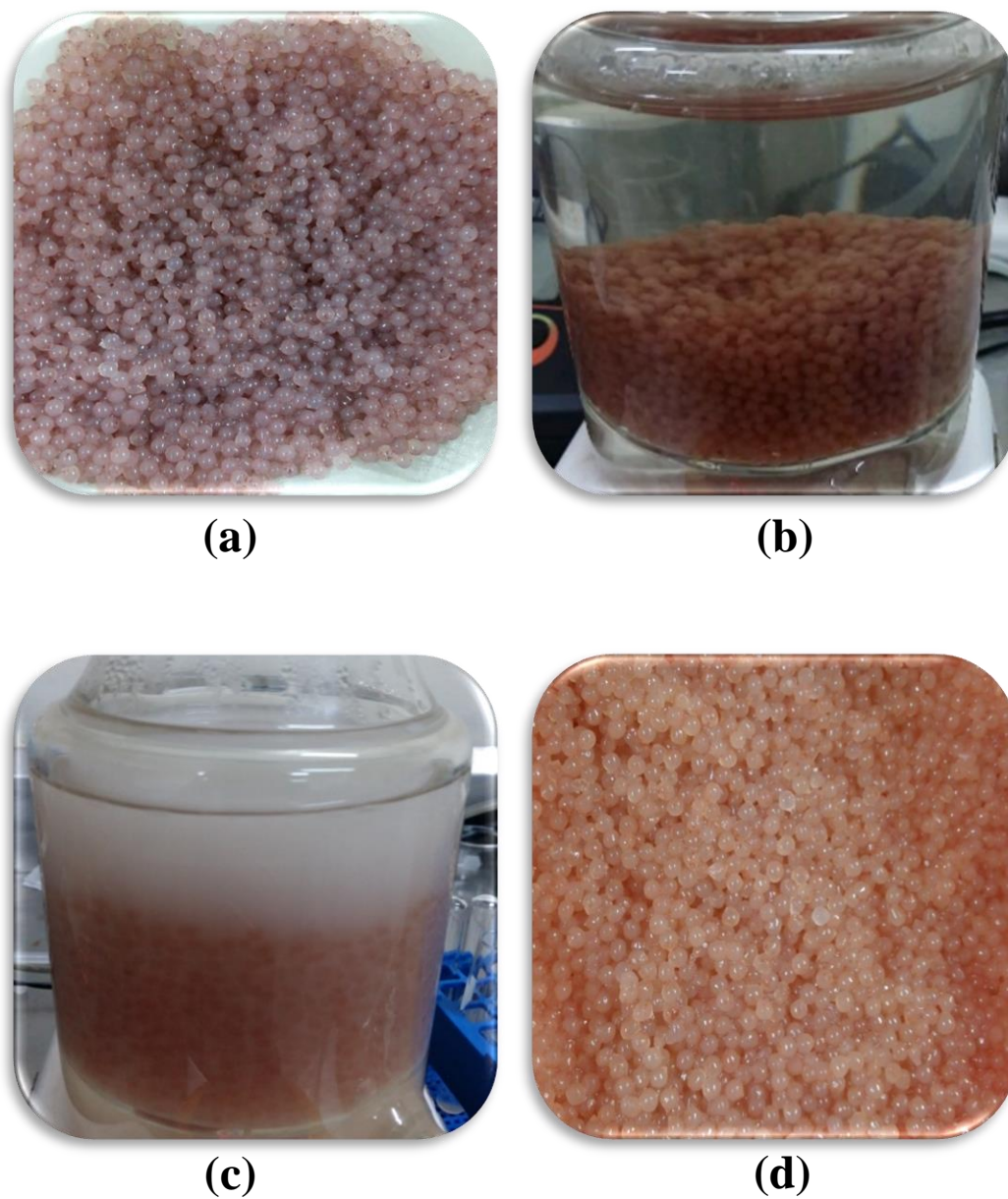
Por otro lado, el modelo matemático (ecuaciones (91) y (93)-(96)) se ajustó simultáneamente utilizando todos los datos experimentales mostrados en la **Figura 14**, se obtuvo un ajuste satisfactorio con  $R^2 = 0.9910$ . Los datos simulados se muestran en la **Figura 14** mediante líneas continuas y semicontinuas. Al tomar en consideración que la reacción tiene una  $K_{eq} \approx 1$ , la conversión para alcanzar el equilibrio es de alrededor del 50 %. Al comparar la



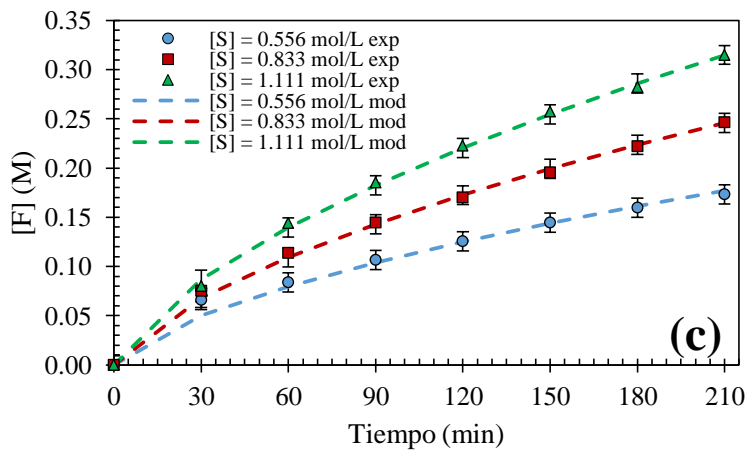
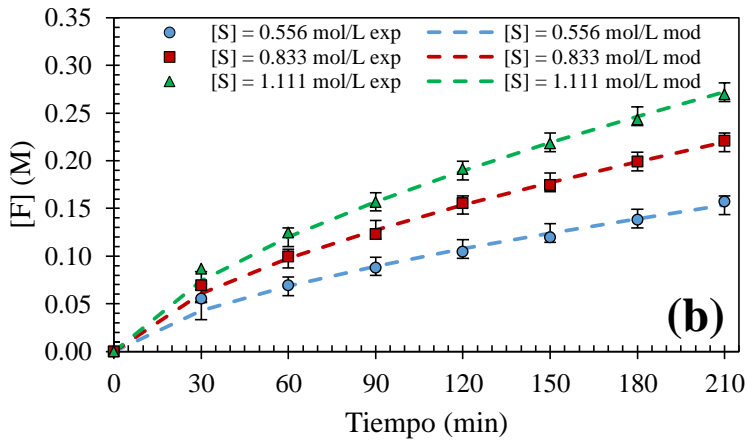
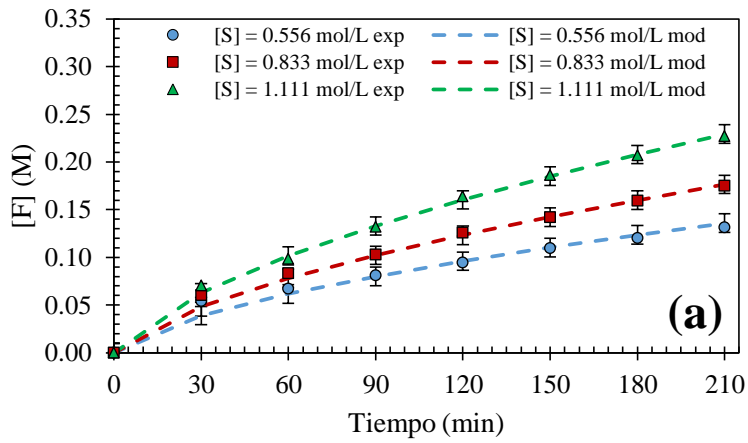
conversión de glucosa a fructosa en un RTA a 65 °C utilizando enzima libre e

**Cuadro 9.** Parámetros de operación para el ajuste de la cinética con enzima inmovilizada en PACs en un RTA.

<b>Parámetro de operación</b>	<b>Valor</b>		
$r_p$ (m)	$1.5 \times 10^{-3}$		
$T$ (°C)	65		
$\varepsilon_p$ (L/L)	0.919		
$[E]_t$ (g/L)	3.213	4.784	6.292
$\varphi_p$ (L/L)	0.363		
$C_{1,0}$ (M)	0.556	0.833	1.111
$C_{2,0}$ (M)	0		



**Figura 13.** Liberación de calcio en las PACs. (a) PACs en su estado inicial, (b) PACs al inicio de la reacción, (c) liberación del excedente de calcio y (d) estado final de las PACs.



**Figura 14.** Efecto de la concentración de sustrato y enzima en la bioconversión de glucosa a fructosa usando enzima inmovilizada en un RTA a 65 °C: (a) 3.213, (b) 4.784 y (c) 6.292 g/L de enzima. LSD = 0.0194 M.

inmovilizada en PACs, se puede observar que, a los 210 minutos de reacción, el sistema con enzima libre se ha posicionado cerca del equilibrio, con una conversión para todas las condiciones de  $[S]$  y  $[E]$  superior al 48 %. Por otro lado, la máxima conversión alcanzada al utilizar la enzima inmovilizada, correspondiente a la condición de  $[S] = 0.556$  M y  $[E] = 6.292$  g/L en PACs, fue del 31.2 %, notablemente menor a las conversiones obtenidas al utilizar enzima libre, pero con la gran ventaja que ofrece la posibilidad de reutilizar la enzima al menos en 5 ocasiones, manteniendo los niveles de conversión invariables.

Por otra parte, el mejor ajuste arrojó los siguientes parámetros:  $D_{eff} = 8.356 \times 10^{-12}$  m<sup>2</sup>/s y  $\eta = 0.553$ . Curiosamente, estos parámetros son adecuados para las tres diferentes concentraciones de enzima, lo que sugiere que el soporte inmovilizador (matriz de alginato de calcio) es el principal responsable de establecer el comportamiento fenomenológico del CDE y la FAER. En trabajos anteriores para la difusión de glucosa en gel de alginato de calcio, el CDE reportado ha variado entre  $6.230 \times 10^{-10}$  m<sup>2</sup>/s (Axelsson y Persson 1988),  $8.350 \times 10^{-10}$  m<sup>2</sup>/s (Grunwald 1989) y  $4.974 \times 10^{-11}$  m<sup>2</sup>/s (Palazzi y Converti 2001). En este trabajo, el CDE fue menor, lo que indica una mayor restricción al movimiento del sustrato dentro de la PAC. Es necesario buscar mejores condiciones de inmovilización que permitan obtener mejores CDE y, por lo tanto, una mayor interacción entre el sustrato y la enzima. Por otro lado, el valor de  $\eta = 0.553$  indica que únicamente el 55.3 % de la enzima se encuentra disponible y activa para reaccionar (Ver **Figura 8**). En este sentido, es necesario probar otros

soportes para el proceso de inmovilización, que permitan aumentar la cantidad de enzima disponible para reaccionar y con ello, incrementar la productividad del proceso.

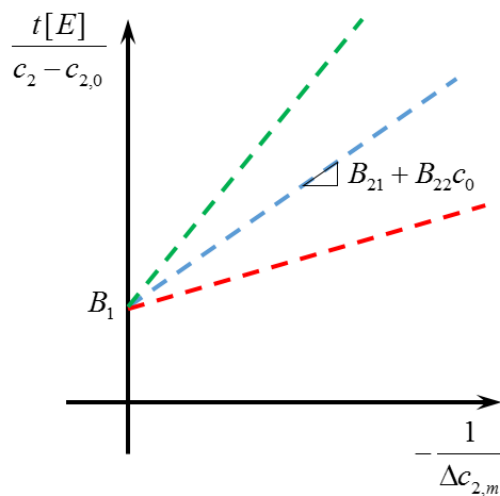
Además, el modelo matemático convencional (es decir, el modelo cinético de la enzima libre) se aplicó a los datos experimentales de la enzima inmovilizada, para obtener los parámetros cinéticos aparentes. En todos los casos de estudio, el ajuste fue muy pobre, porque la resistencia de transferencia difusional es muy significativa. Para lograr este propósito, la Ecuación (73) se reorganizó a la siguiente forma linealizada:

$$\frac{t[E]}{c_2 - c_{2,0}} = B_1 + (B_{21} + B_{22}c_0) \left( -\frac{1}{\Delta c_{2,m}} \right) \quad (98)$$

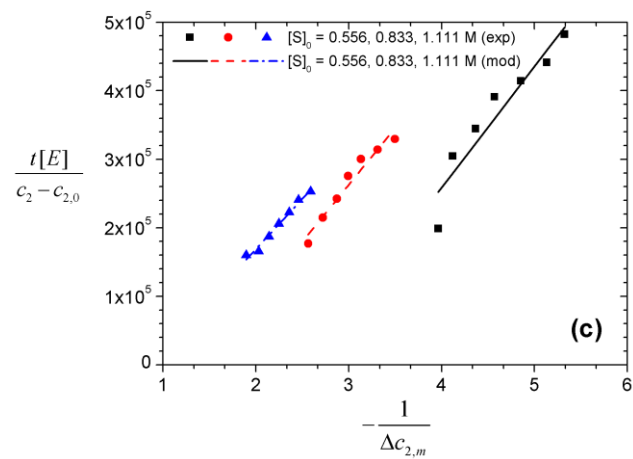
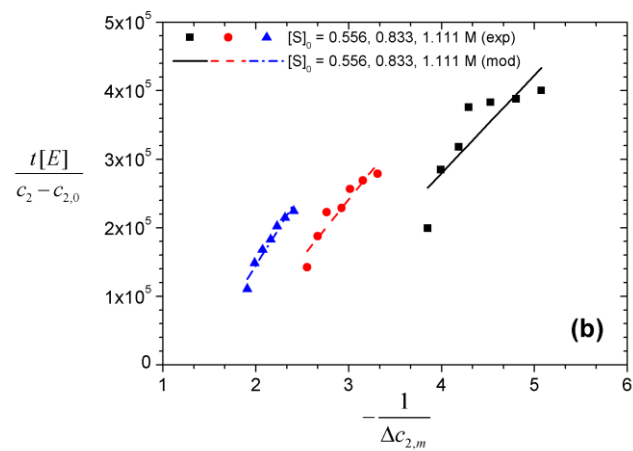
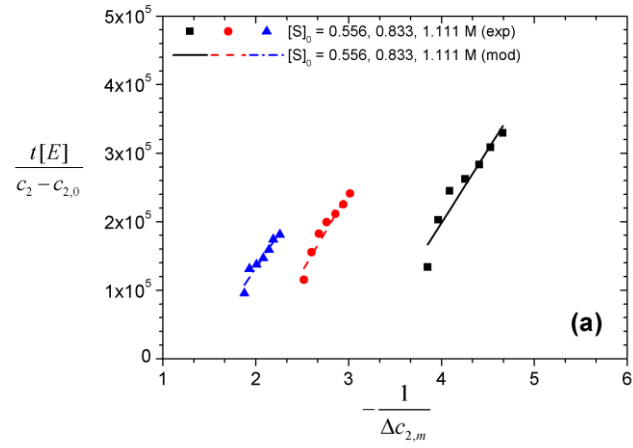
Por lo tanto, según esta expresión matemática, para cinéticas experimentales con la misma concentración de enzima y a la misma temperatura de operación, se espera que estas cinéticas, en su forma linealizada, tengan el mismo intercepto ( $B_1$ ) y una pendiente lineal ( $B_{21} + B_{22}c_0$ ) con respecto a la concentración inicial total de sustrato y producto (en este caso,  $c_0 = c_{1,0}$ ). En la **Figura 15**, lo anterior se muestra en detalle.

Por otro lado, la **Figura 16** muestra el comportamiento de los datos cinéticos experimentales obtenidos bajo la forma linealizada de la Ecuación (98). Los datos experimentales no se comportan de acuerdo con el modelo cinético de enzima libre, porque no tienen el mismo valor de intercepto para cinéticas que solo difieren en la concentración inicial de sustrato. Además, la cinética mostrada en las **Figuras 16a y 16c** (ver **Cuadro 10**) tienen pendientes muy similares (líneas rectas paralelas); por lo tanto, cualquier esfuerzo por expresar datos experimentales a través de un modelo general de enzima libre no tendrá éxito. Los parámetros de ajuste del modelo cinético linealizado de enzima libre se muestran en el

**Cuadro 10.** En la mayoría de los casos, se obtuvo un grado adecuado de ajuste para cada cinética ( $R^2 > 0.9$ ). Al menos, cada cinética individual muestra un comportamiento lineal, pero es evidente que una generalización en los parámetros de ajuste no es factible.



**Figura 15.** Efecto de la concentración inicial sobre el mecanismo cinético reversible de Briggs-Haldane, utilizando el modelo matemático de enzima libre en su forma integrada y linealizada.



**Figura 16.** Comportamiento de datos cinéticos experimentales con enzima inmovilizada con respecto al modelo linealizado con enzima libre. (a) 3.213, (b) 4.784 y (c) 6.292 g/L de enzima.

**Cuadro 10.** Parámetros ajustados del modelo linealizado de enzima libre usado para describir datos cinéticos experimentales de enzima inmovilizada.

$c_{1,0}$ (M)	$[E]$ (g/L)	$B_1$ (g s/mol)	$B_{21} + B_{22}c_0$ (g s/L)	$R^2$
0.556		-6.576E+05	2.141E+05	0.9186
0.833	3.213	-4.532E+05	2.324E+05	0.9445
1.111		-2.708E+05	2.017E+05	0.9300
0.556		-2.938E+05	1.434E+05	0.7363
0.833	4.784	-2.656E+05	1.690E+05	0.8983
1.111		-2.944E+05	2.197E+05	0.9525
0.556		-4.501E+05	1.771E+05	0.9009
0.833	6.292	-2.361E+05	1.662E+05	0.9538
1.111		-1.250E+05	1.469E+05	0.9831



Aunque Dehkordi y col (2009) reportaron un buen ajuste para el modelo cinético de enzima libre, aun utilizando enzima inmovilizada en un STR, en la presente investigación, no fue posible lograr los mismos resultados. En este caso, los efectos difusionales son más significativos en los ensayos experimentales desarrollados, lo que dificulta la obtención de un modelo cinético general de parámetros aparentes, incluso en los ensayos experimentales en los que solo difiere la concentración inicial del sustrato. En este sentido, estos resultados resaltan la fortaleza del nuevo enfoque de modelado matemático para el mecanismo cinético reversible de Briggs-Haldane que usa enzima inmovilizada, en comparación con el uso de modelos cinéticos con parámetros aparentes. Se reconoce ciertamente que la resolución numérica del modelo es compleja; sin embargo, la información obtenida mediante el ajuste del modelo representa una herramienta muy valiosa para la mejora de este tipo de bioprocesos.

Bidabehere y col (2018) obtuvieron los parámetros cinéticos, de equilibrio y de transporte a través de un modelo matemáticos pseudo-homogéneo. El método se basó en el uso de datos observados en experimentos con dos tamaños de partículas de catalizador. Para las pruebas experimentales, se usó un reactor discontinuo bien agitado, donde se produce una reacción química de primer orden, controlada por el transporte de masa difusional. Se encontró que el modelo propuesto describía adecuadamente los datos experimentales obtenidos. Aunque los balances microscópicos establecidos para la fase fluida y la partícula catalítica son muy similares a los reportados en este trabajo, no fue estudiado el efecto de la concentración de catalizador dentro de la red porosa del soporte catalítico. Además, este efecto no se estableció explícitamente en el modelo matemático; en cambio, solo se determinó la constante de la

velocidad de reacción. Los autores concluyeron que el modelo matemático propuesto fue exitoso y consideraron que la metodología establecida por ellos es más general que la resultante de los modelos convencionales. Estos modelos consideran que los perfiles de concentración dentro de la partícula están en un estado completamente estacionario. Barona y col (2018) presentaron un modelo matemático para un RTA utilizando enzima inmovilizada. Tres regiones participaron en el modelo: (1) una serie de microrreactores (MRs) porosos cargados con enzima, donde se produce tanto la reacción enzimática como la transferencia de masa por difusión; (2) una región limitante de difusión que rodea las partículas; y (3) una región convectiva donde el sustrato tenía una concentración uniforme. Los MRs se modelaron matemáticamente utilizando un modelo de dos compartimentos, basado en ecuaciones de reacción-difusión que contienen un término no lineal relacionado con la cinética enzimática de Michaelis-Menten. Aunque la investigación de Barona y col (2018) presenta ideas muy similares a las propuestas en esta investigación, no introduce el análisis de datos experimentales para establecer la viabilidad del modelo propuesto, y tampoco el concepto de eficiencia enzimática asociado al proceso de inmovilización. Por otro lado, se introduce la porosidad para describir la especificidad en la distribución de la concentración del sustrato entre dos regiones vecinas: la concentración del sustrato en los MRs y la concentración de bulto en la solución. Adicionalmente, no presentan un análisis de los parámetros de diseño sobre la concentración de sustrato intrapartícula, como si ocurre en este trabajo. En su lugar, enfocan su atención en la evaluación del factor efectividad.

Con respecto a los aspectos numéricos en la resolución del sistema de ecuaciones matemáticas, se aseguró la independencia de la malla en la discretización de la ecuación (91), y se utilizaron 25 elementos finitos para los resultados, obteniendo un  $SSWR = 3.253 \times 10^{-3}$

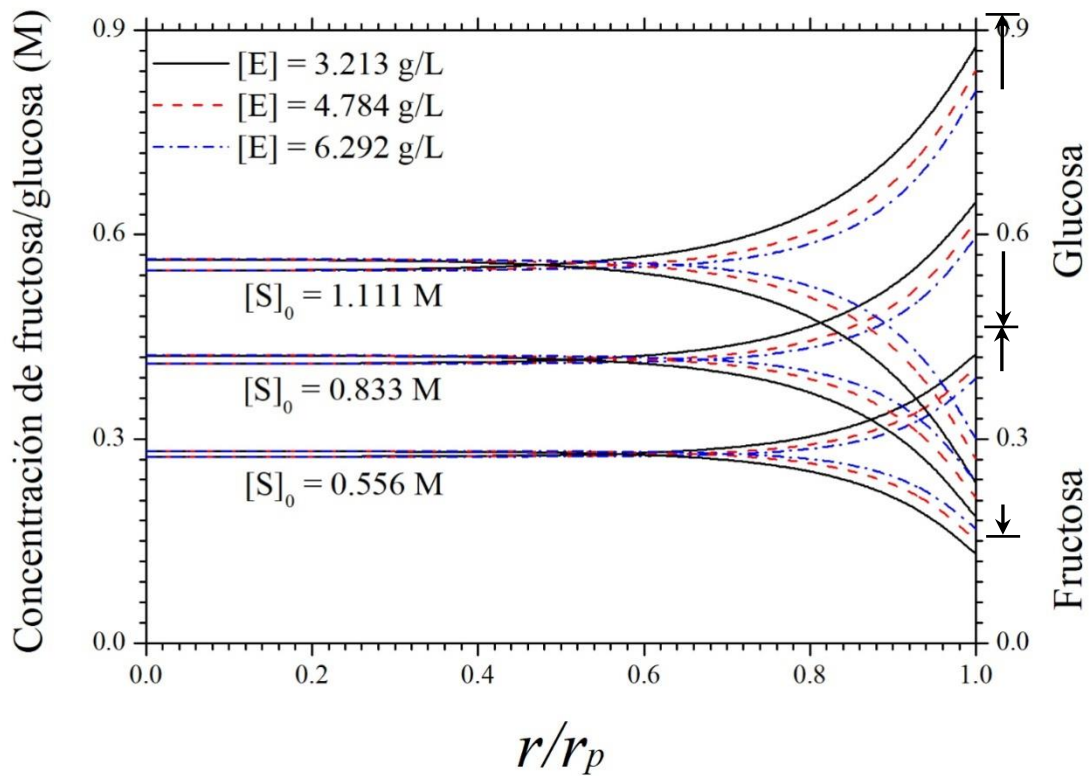
con  $W_j = 1$ :  $j = 1$ ,  $D_{eff}$ ;  $j = 2$ ,  $\eta$ . Por otro lado, la selección del MCO-SCH se debe a que este método proporciona aproximaciones muy precisas de la primera derivada para la función desconocida, en este caso, el componente radial del gradiente de concentración ( $\partial c_i / \partial r$ ); que se requiere en el balance de las especies químicas obtenidas del principio de conservación de la materia en la fase fluida (ecuación (96)). Además, la **Figura 17** muestra los perfiles de concentración intrapartícula de glucosa y fructosa simulados en todos los tratamientos estudiados experimentalmente ( $t = 210$  min) y se observa que la conversión de glucosa ocurre solo en la región radial  $0.5 \leq r/r_p \leq 1$ ; es decir, hasta un tiempo de 210 min la resistencia a la transferencia de masa intrapartícula sigue siendo significativa. En este sentido, una mejora en la producción de fructosa establece la necesidad de reducir el tamaño de la perla biocatalítica, lo que permitirá el uso de cualquier enzima disponible activamente.

Al examinar la dinámica de los perfiles de concentración de glucosa intrapartícula en diferentes tiempos de reacción (**Figura 18**), la región radial donde se produce la conversión de glucosa es similar a la obtenida a los 210 minutos, es decir  $0.5 \leq r/r_p \leq 1$ . Es importante mencionar que, en procesos de reacción irreversible con enzima inmovilizada, el efecto de la penetración en la transferencia de masa intrapartícula se acentúa a medida que la reacción se desarrolla con el tiempo, lo que contrasta con lo que se observó en esta investigación, ya que la reacción reversible promueve una amortiguación en la penetración de la transferencia de masa intrapartícula.

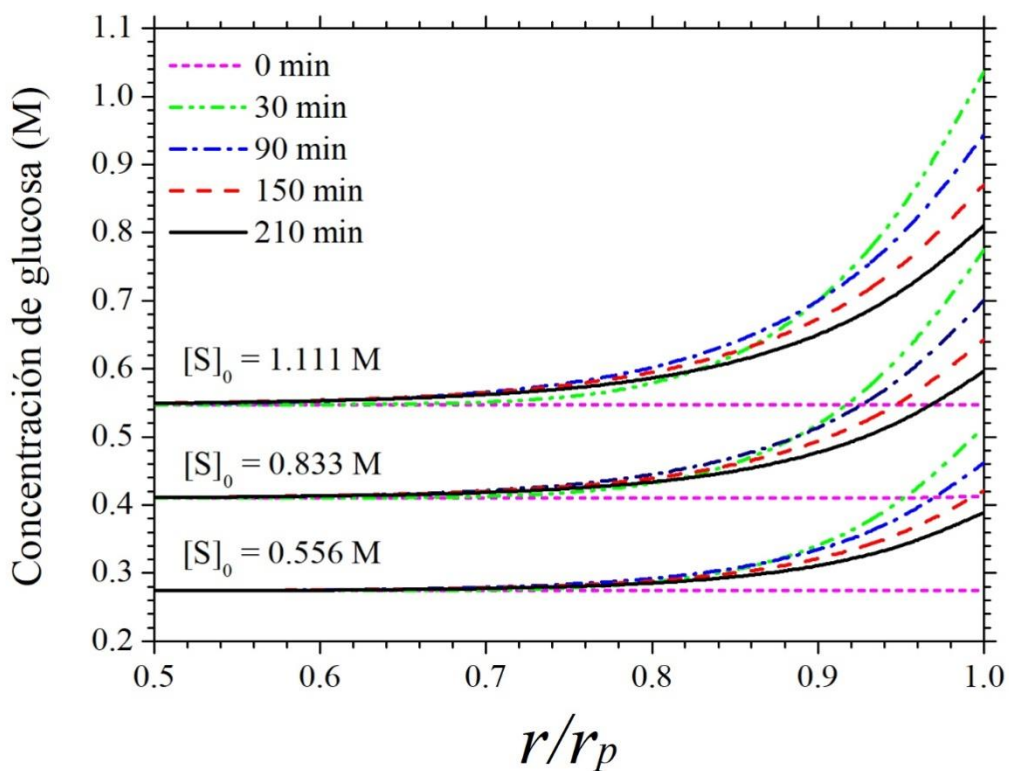
## 2. Efecto de los parámetros de operación sobre las PACs

Uno de los aspectos fundamentales en la mejora de los SREI es la comprensión del efecto ejercido por el proceso de síntesis de perlas en la productividad del metabolito. Entre los

principales factores que afectan el proceso de inmovilización están la porosidad, el CDE, la FAER, el tamaño de partícula, la proporción de masa de enzima/masa de perla biocatalítica, entre otros. Algunos de estos factores son fáciles de manipular (por ejemplo, el tamaño de partícula), mientras que otros no lo son (por ejemplo, la FAER). Esta última es el resultado de



**Figura 17.** Perfiles de concentración de glucosa y fructosa intrapartícula obtenidos de la bioconversión de glucosa a fructosa utilizando PACs con un radio de 1.5 mm en un RTA, alcanzados a los 210 minutos de reacción, 65 °C y diferentes concentraciones de sustrato.



**Figura 18.** Perfiles de concentración de glucosa intrapartícula obtenidos en la bioconversión de glucosa a fructosa utilizando PACs con un radio de 1.5 mm en un RTA, alcanzado a 0, 30, 90, 150 y 210 min de reacción, 65 °C, 6.292 g/L de enzima inmovilizada y diferentes concentraciones de sustrato.

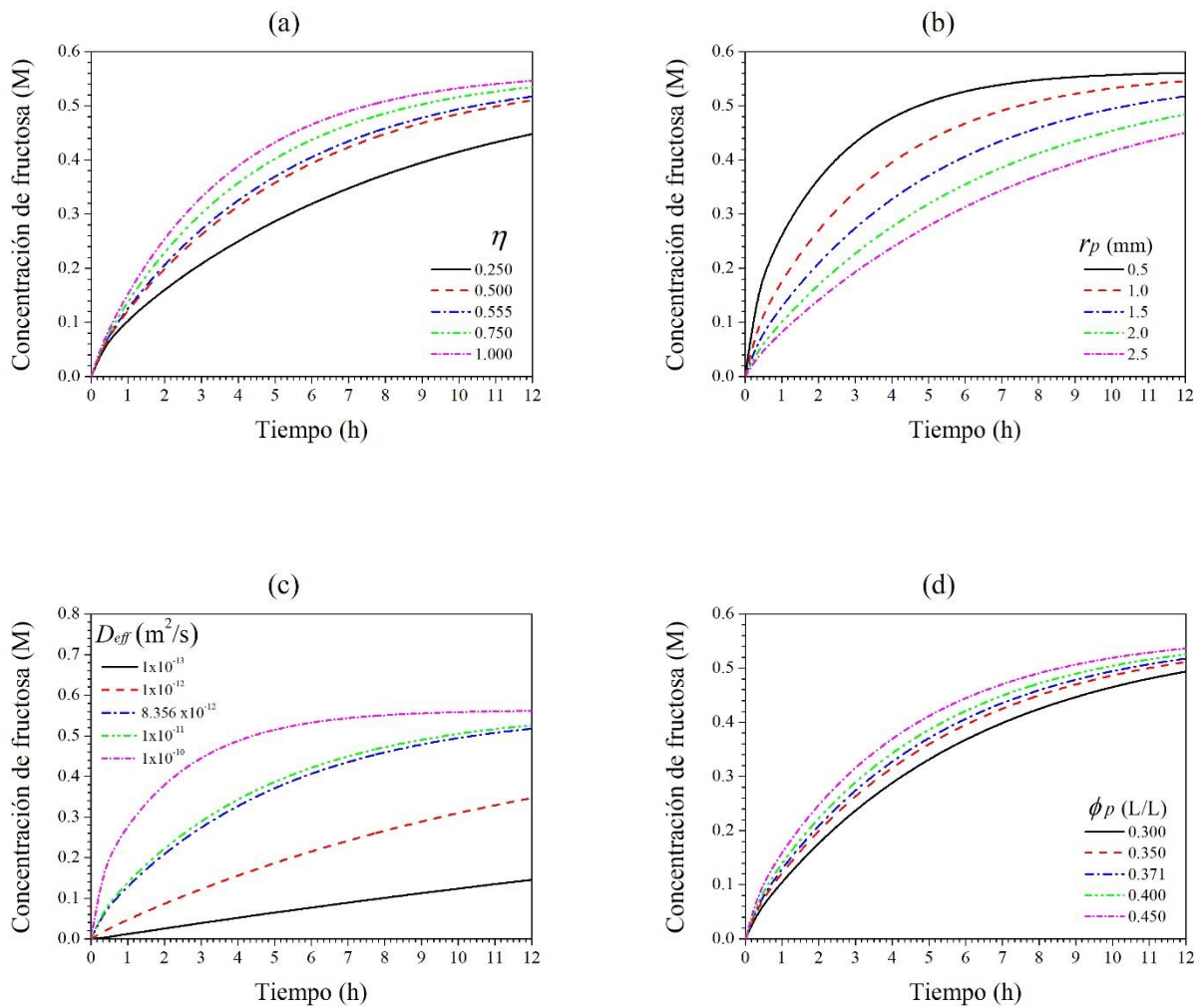
decisiones complejas sobre la selección de compuestos precursores y el proceso de síntesis de perlas catalíticas, que podrían comprometer otros atributos deseables, como su resistencia térmica y mecánica. En este sentido, es muy importante realizar, *a priori*, una evaluación teórica; para establecer el impacto de los factores mencionados en la productividad y posteriormente, explorar nuevos materiales y procedimientos que permitan mejorar las características de la estructura de la matriz inmovilizadora. De esta manera, la **Figura 19** muestra el efecto ejercido por la FAER, el tamaño de partícula, el CDE y la fracción volumétrica de perlas biocatalíticas sobre la cinética de producción de fructosa en un RTA usando enzima inmovilizada; mientras que la **Figura 20** muestra los perfiles de concentración de glucosa intrapartícula logrados en la perla biocatalítica a las 12 h para las simulaciones realizadas.

En la **Figura 19a**, se observa que en cada paso del tiempo, la variación de la producción de fructosa aumenta a medida que aumenta la FAER. De hecho, en la **Figura 20a**, la variación de este factor ejerce un efecto muy pronunciado sobre la profundidad radial a la cual la velocidad de reacción es significativa, hasta tal punto que para una eficiencia de 0.25, el mecanismo de difusión es más rápido que el mecanismo de reacción, ya que en el centro de la partícula, la concentración de glucosa se ha desplazado del equilibrio. Por lo tanto, para propósitos prácticos, asegurar eficiencias superiores a 0.5 podría ser adecuado para lograr productividades aceptables.

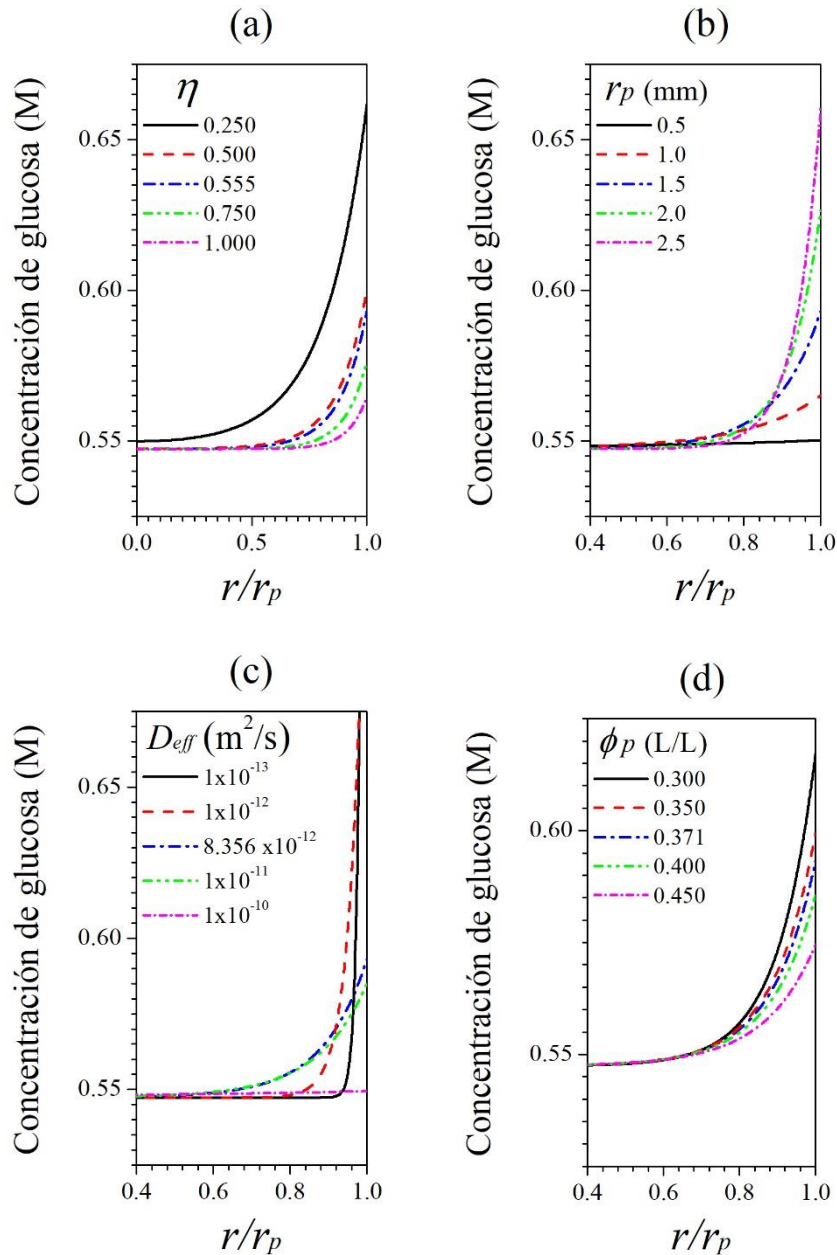
Es necesario tener en cuenta que la eficiencia se ve afectada por las condiciones de inmovilización (principalmente temperatura y pH), así como por la estructura de la matriz de inmovilización, que puede atrapar u obstruir los sitios activos de la enzima. Por lo tanto, establecer condiciones de síntesis de perlas biocatalíticas que mejoren el valor de este factor a

nivel experimental representa un verdadero desafío, ya que la manipulación del proceso de síntesis también podría afectar significativamente la resistencia mecánica y térmica del soporte





**Figura 19.** Efecto de (a) FAER, (b) radio de la perla biocatalítica, (c) CDE y (d) fracción volumétrica de las perlas biocatalíticas, en la historia de concentración de fructosa en la fase líquida, resultante de la bioconversión de glucosa a fructosa en un RTA a 65 °C, 6.292 g/L de enzima inmovilizada en PACs y 1.111 M de glucosa.



**Figura 20.** Efecto de (a) FAER, (b) radio de la perla biocatalítica, (c) CDE y (d) fracción volumétrica de las perlas biocatalíticas sobre los perfiles de concentración de glucosa intrapartícula, resultantes de la bioconversión de glucosa a fructosa en un RTA a 65 °C, 12 h, 6.292 g/L de enzima inmovilizada en PACs y 1.111 M de glucosa.

biocatalítico. En general, se espera que los procesos de inmovilización disminuyan la actividad enzimática, y es habitual que los estudios sobre SREI se establezcan en términos de parámetros aparentes (en los que no es posible distinguir entre el mecanismo de difusión y de reacción) con el propósito de proporcionar la información técnica necesaria para el diseño de biorreactores, pero inevitablemente restringida a las condiciones de operación y de síntesis de las perlas biocatalíticas consideradas en dicho estudio.

Con respecto a la selección del radio de las PACs, la **Figura 19b** muestra el efecto ejercido por este factor (que varía de 0.5 a 2.5 mm) en la cinética de producción de fructosa, el cual es muy acentuado, ya que a un radio de perla menor, la relación entre el área de contacto y el volumen de la perla se incrementa. Por lo tanto, según la **Figura 20b**, ya que la región radial relativa donde ocurre la conversión de glucosa a fructosa ( $0.6 \leq r/r_p \leq 1$ ) es similar para casi todos los tamaños de partícula estudiados (excepto para  $r_p = 0.5$  mm, porque la condición de equilibrio ya se había alcanzado), el mecanismo de reacción podría considerarse a un nivel más superficial que volumétrico, que es el resultado de una alta resistencia a la transferencia de masa por difusión en la perla biocatalítica. Por lo tanto, se recomienda el uso de PACs con un radio de 0.5 mm, ya que permite obtener mayores bioconversiones en un tiempo de operación menor, además de que la manipulación del tamaño de la perla es relativamente fácil de obtener experimentalmente. Con respecto a el CDE obtenido para las perlas biocatalíticas, se encontró que es aproximadamente 80 veces más pequeño que el de la glucosa en solución acuosa ( $7 \times 10^{-10}$  m<sup>2</sup>/s, Axelsson y Persson 1988), lo que podría considerarse una diferencia muy discrepante, porque el componente principal de las perlas es agua, con una composición superior al 90%. Por lo tanto, se puede inferir que la matriz polimérica de alginato de calcio

restringe significativamente la movilidad de las moléculas de agua, lo que hace que la capacidad de difusión de un soluto disminuya considerablemente.

La **Figura 19c** muestra el efecto que ejerce el CDE sobre la producción de fructosa, y se observa que cuando la resistencia a la transferencia de masa intrapartícula es alta, el sistema de reacción se comporta como una cinética de pseudo-cero orden, porque solo la región de la superficie de la perla biocatalítica participa en la bioconversión (**Figura 20c**), y esto aumenta la escala de tiempo del proceso. En contraste, bajo un CDE más alto, incluso con un valor cercano al coeficiente de difusión en solución acuosa ( $1 \times 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$ ), el tiempo característico requerido para la bioconversión máxima se alcanza a las 6 h, lo que contrasta con el tiempo requerido bajo el CDE obtenido por ajuste a los datos experimentales, que es superior a 12 h. En este sentido, la manipulación experimental para mejorar el CDE de la matriz de inmovilización no es tan significativa como la mejora proporcionada por la reducción del tamaño de perla, ya que con  $r_p = 0.5 \text{ mm}$  se logra un comportamiento cinético similar al obtenido con  $D_{eff} = 1 \times 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$ . Finalmente, se analiza el efecto de la fracción volumétrica de perlas sobre la productividad, que bajo una relación constante de  $m_{E,t}/V_t$ , puede interpretarse como el efecto de la concentración de enzima dentro de la perla. Por lo tanto, de acuerdo con el intervalo seleccionado (0.30-0.45 L/L), en la **Figura 19d** se puede observar que fue el efecto menos significativo en la productividad, con un comportamiento muy similar entre las diferentes cinéticas simuladas. Esto se debe a que la resistencia de la perla a la transferencia de masa por difusión que regula el proceso de bioconversión a través de la región de reacción volumétrica efectiva, que es similar en todos los casos para la fracción volumétrica de perlas seleccionada (**Figura 20d**). Además, es relevante observar que una alta fracción volumétrica de perlas (bajas concentraciones de enzima dentro de la perla) promueve

la mejor productividad; esto se debe a que el mecanismo de reacción en la perla se comporta como una reacción en la superficie y por lo tanto, el aumento en la superficie de contacto fluido-sólido (que ocurre cuando la fracción volumétrica de las perlas es alta) es más importante que el aumento en la concentración de enzima en la perla. De hecho, el grado de profundidad en la perla a la que se produce la bioconversión es prácticamente el mismo para las diferentes fracciones volumétricas de las perlas y, por consiguiente, el flujo de glucosa está regulado por la concentración de glucosa en la fase líquida, que, en este caso, es mayor para bajas fracciones volumétricas de perlas, debido a que la velocidad de bioconversión es más lenta a medida que se aleja de las condiciones de equilibrio.

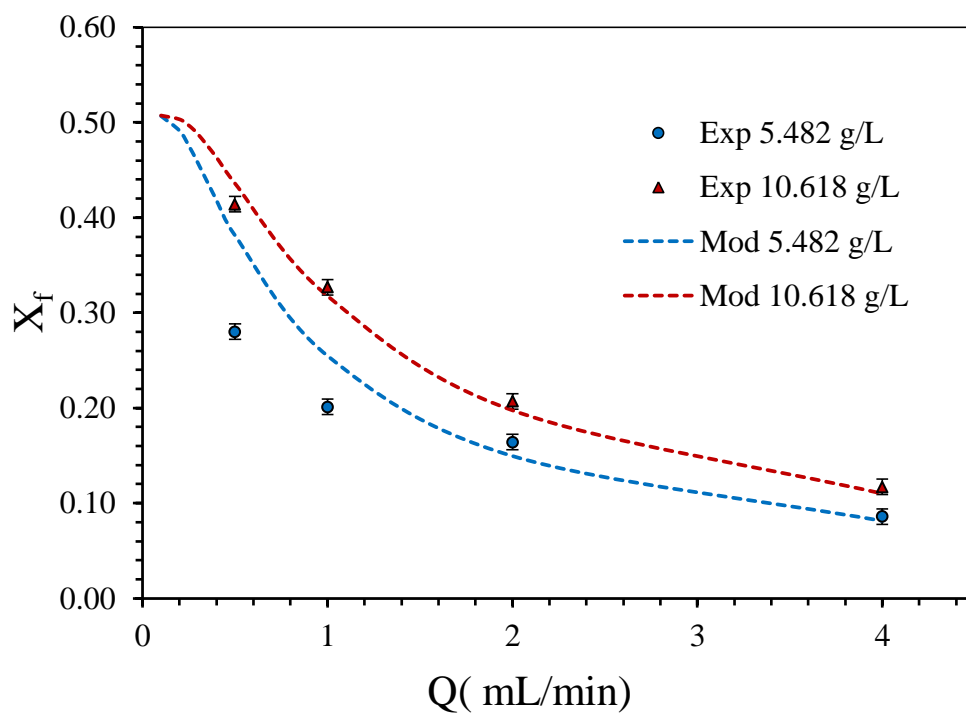
## C. ESTUDIO DE REACTOR LECHO EMPACADO

### 1. Ajuste del modelo

A diferencia de los ensayos en un RTA, para el trabajo experimental de bioconversión de glucosa a fructosa con enzima inmovilizada en un reactor de lecho empacado, el coeficiente convectivo de transferencia de masa ( $k_L$ ) no se consideró insignificante y fue calculado junto al coeficiente de dispersión axial ( $D_z$ ) a través de las correlaciones teóricas descritas en las ecuaciones (23)-(29). Los parámetros de operación empleados en la determinación de ( $k_L$ ) y ( $D_z$ ) se muestran en el **Cuadro 11**, algunos de los cuales se evaluaron experimentalmente. Las concentraciones de glucosa y fructosa dentro de la perla catalítica se consideraron insignificantes. La **Figura 21** muestra los datos experimentales para la conversión de glucosa a cada 30 minutos hasta que el sistema alcanzó el estado estacionario, es decir, la concentración de fructosa a la salida del reactor no cambió con el tiempo.

**Cuadro 11.** Parámetros de operación para el ajuste de la cinética con enzima inmovilizada en PACs en un reactor de lecho empacado.

<b>Parámetro de operación</b>	<b>Valor</b>
$h$ (m)	0.75
$D$ (m)	0.017
$r_p$ (m)	$1.5 \times 10^{-3}$
$T$ (°C)	65
$\varepsilon_p$ (L/L)	0.919
$\rho_p$ (kg/m <sup>3</sup> )	1018
$[E]_t$ (g/L)	5.482, 10.618
$Q$ (mL/min)	0.5, 1, 2, 4
$\phi_p$ (L/L)	0.343
$V$ (L)	0.170
$C_{1,0}$ (M)	0.556
$C_{2,0}$ (M)	0



**Figura 21.** Efecto del flujo y la concentración de enzima en la cinética de bioconversión de glucosa/fructosa utilizando enzima inmovilizada en PACs en un reactor de lecho empacado a

T= 65 °C, [S]= 100 g/L y pH= 7.5. LSD = 0.0162.

El modelo matemático discretizado por diferencias finitas (ecuaciones (43)-(46)) e integrado por el MRK de cuarto orden se ajustó a los datos experimentales mostrados en la fructosa, utilizando enzima inmovilizada en PACs. Se varió el caudal de entrada utilizado (0.5, 1, 2 y 4 mL/min) y la concentración de enzima (5.482 y 10.618 g/L). Al igual que en el RTA con enzima inmovilizada, la  $[E]$  fue establecida como  $m_{E,t}/V_t$ . La conversión fue monitoreada cada 30 minutos hasta que el sistema alcanzó el estado estacionario, es decir, hasta que la concentración de fructosa a la salida del reactor no cambió con el tiempo.

El modelo matemático discretizado por diferencias finitas (ecuaciones (43)-(46)) e integrado por el MRK de cuarto orden se ajustó a los datos experimentales mostrados en la **Figura 21**, obteniendo un ajuste adecuado con  $R^2 = 0.907$ . Los datos simulados se muestran en la **Figura 21** mediante líneas semicontinuas. Se puede observar que a valores de caudal bajo (0.5 y 1 mL/min) para la condición de 5.482 g/L de enzima hay una desviación considerable de los datos del modelo con respecto a los obtenidos experimentalmente, esto puede deberse a la dificultad que implica a nivel experimental el establecer flujos tan pequeños. Conforme se incrementa el caudal resulta más sencillo estabilizar el flujo, y con ello, se disminuye en gran medida el error experimental.

En el **Cuadro 12** se muestra una comparación de la fracción de conversión de glucosa a fructosa en los tres sistemas de reacción estudiados. En los sistemas de RTA con enzima libre e inmovilizada, la duración del experimento se acotó a 210 minutos. Sin embargo, para el caso del reactor de lecho empacado, la medición se realizó hasta que el sistema alcanzó el estado



estacionario y el tiempo requerido para ello varió según el flujo de entrada utilizado (alrededor de 2 horas para 4 mL/min hasta 10 horas para 0.5 mL/min).

**Cuadro 12.** Fracción de conversión máxima alcanzada en la isomerización de glucosa a fructosa en diferentes sistemas de reacción a 65 °C y [S]= 100 g/L.

<b>Sistema de reacción</b>	<b>Tiempo de reacción (min)</b>	<b>[E] (g/L)</b>	<b>Fracción de conversión</b>
RTA con enzima libre	210	10	0.508
RTA con enzima inmovilizada (PACs)	210	6.292	0.312
Lecho empacado (PACs)	600	10.618	0.414

Nota: se empleó la misma masa de enzima en todos los casos (2.5 g), sin embargo su concentración cambia en función del volumen total de reacción (volumen de sobrenadante + volumen de PACs).

En el **Cuadro 12** se observa que la conversión alcanzada en el reactor de lecho empacado es mayor que en el RTA con enzima inmovilizada en PACs, sin embargo, el tiempo necesario para ello es casi tres veces más. La ventaja del lecho empacado radica en la posibilidad de reutilizar en mayor número de ocasiones la enzima glucosa isomerasa, debido a que ante la ausencia de agitación y los flujos tan pequeños que se manejan, el daño mecánico en las perlas es casi insignificante.

Por otra parte, los valores obtenidos para el coeficiente convectivo de transferencia de masa y la dispersión axial a través de correlaciones fueron:  $k_L = 5.973 \times 10^{-6}$  m/s y  $D_z = 6.658 \times 10^{-7}$  m/s . Estos parámetros resultaron adecuados para predecir el comportamiento de la reacción, principalmente en flujos de entrada elevados y están en conformidad con lo reportado en literatura. Dekhordi y col (2008) realizaron un estudio en un reactor de lecho empacado para la isomerización de glucosa a fructosa, en donde reportaron  $k_L = 5.491 \times 10^{-5}$  m/s y  $D_z = 8.502 \times 10^{-6}$  m<sup>2</sup>/s. Los valores de  $k_L$  y  $D_z$  tienden a incrementar conforme se aumenta el flujo de alimentación. La diferencia en el intervalo de flujos de alimentación utilizados en el presente trabajo (0.5-4 mL/min) con respecto a lo reportado por Dekhordi y col (2008) (40-275 mL/min) podría ser la principal causa para explicar la diferencia en el orden de los coeficientes reportados en ambas investigaciones.

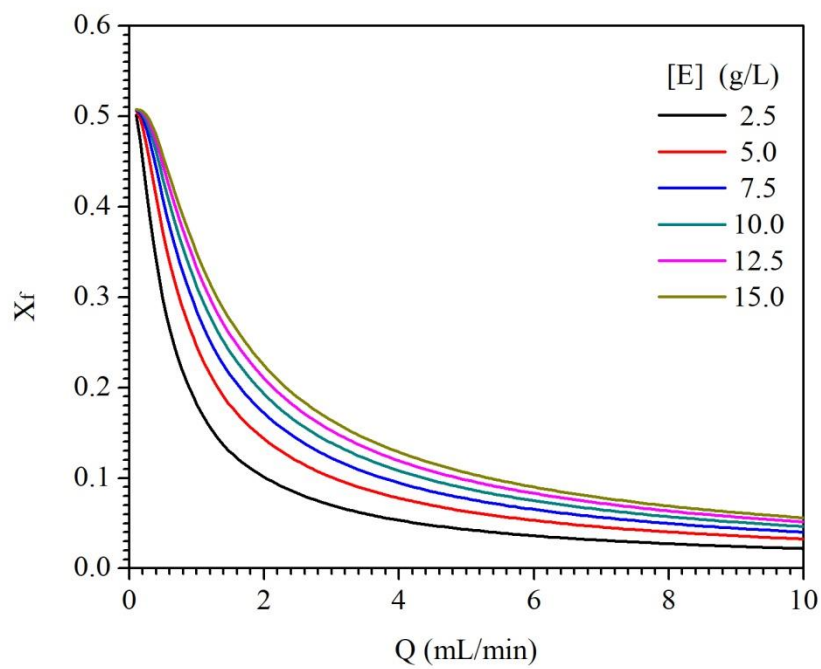
## **2. Efecto de los parámetros de operación en lecho empacado**

A través de simulaciones en estado estacionario se analizó el efecto de los cuatro parámetros de operación más importantes: concentración de enzima ( $[E]$ , enzima

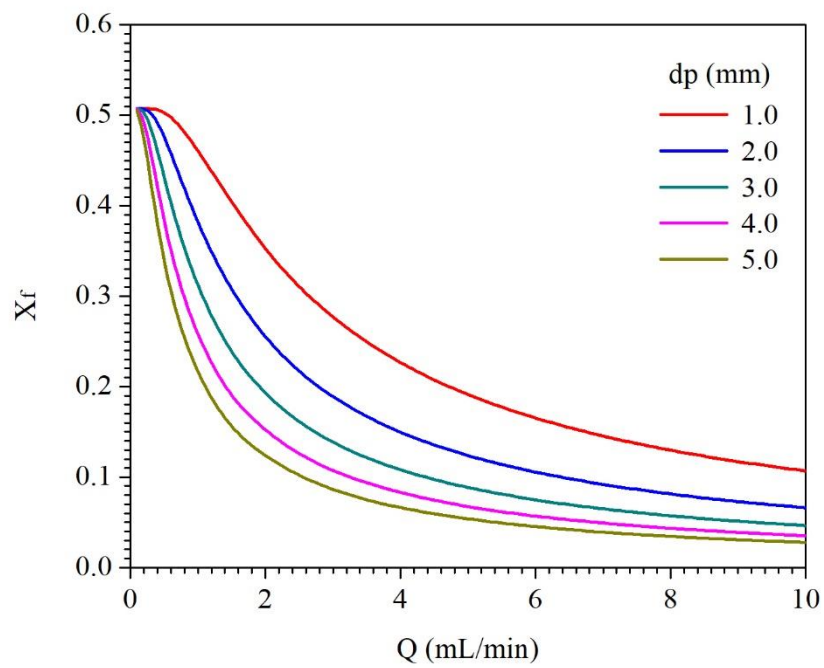
total/volumen del reactor de operación), longitud del reactor ( $L$ ), diámetro de la perla biocatalítica ( $d_p$ ) y concentración inicial de glucosa en el flujo de alimentación ( $c_{1,0}$ ). Los parámetros de operación base fueron:  $[E] = 10 \text{ g/L}$ ,  $L = 0.75 \text{ m}$ ,  $d_p = 3 \text{ mm}$  y  $c_{1,0} = 100 \text{ g/L}$ .

Primero, se analizó el efecto del flujo volumétrico sobre la conversión de glucosa y se encontró, en todos los casos, que la conversión de glucosa disminuye conforme el flujo volumétrico se incrementa, debido a que se disminuye el tiempo de residencia. Por otro lado, en la **Figura 22** se presenta el efecto de la concentración de la enzima glucosa isomerasa, donde se encontró que a mayores concentraciones de enzima se logran mayores conversiones de glucosa, siendo la diferencia de conversión (entre diferentes concentraciones de enzima utilizadas) más acentuada cuando se utilizó un flujo volumétrico de  $7 \text{ mL/min}$ , esto debido a que conforme se incrementa el flujo volumétrico se disminuye la resistencia a la transferencia de masa convectiva perla-fase fluida en el lecho empacado y esto predomina por encima de la reducción de la disminución del tiempo de residencia. También, se analizó el efecto del tamaño de la perla biocatalítica (**Figura 23**) y se encontró una variación significativa en la conversión de glucosa, siendo mayor ésta cuando el diámetro de partícula es menor. Esto debido a que la disminución del diámetro de partícula incrementa la relación área/volumen de la perla y por tanto, considerando que la biorreacción ocurre en la superficie de la perla debido a la alta resistencia de transferencia de masa difusional, el efecto del tamaño de la perla resulta muy importante sobre la conversión de la glucosa. Ciertamente, bajo este análisis, la selección del menor diámetro de perla podría resultar ser la más adecuada para efectos de mejorar la conversión de glucosa: sin embargo, a menor tamaño de perla, se requiere de mayores gradientes de presión para inducir un flujo a través del lecho empacado, lo que propicia que

las perlas biocatalíticas sean sometidas a altos esfuerzos de corte, y por lado, éstas podrían presentar daño mecánico, ocasionando que sean



**Figura 22.** Efecto de la concentración de enzima en la conversión de glucosa a fructosa en un reactor de lecho empacado a 65 °C, [S]= 100 g/L y pH= 7.5.



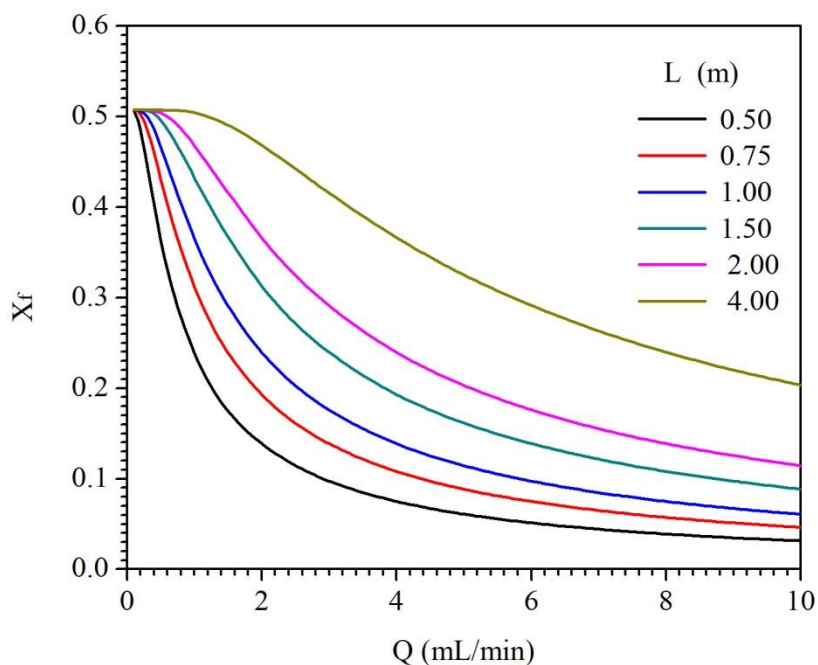
**Figura 23.** Efecto del diámetro de partícula sobre la conversión de glucosa a fructosa en un reactor de lecho empacado a 65 °C,  $[S]= 100$  g/L,  $[E]= 10.618$  y  $\text{pH}= 7.5$ .

reducidas de tamaño a un nivel en el que podrían ser arrastradas en el flujo de salida del reactor. Por tanto, debe ser estudiada la resistencia mecánica de las perlas para seleccionar el menor diámetro de perlas posible en el que conserven su funcionalidad. La mayor diferencia de conversión de glucosa, cuando son utilizados diferentes tamaños de perla, se logra a un flujo volumétrico en el intervalo de 1-2 mL/min.

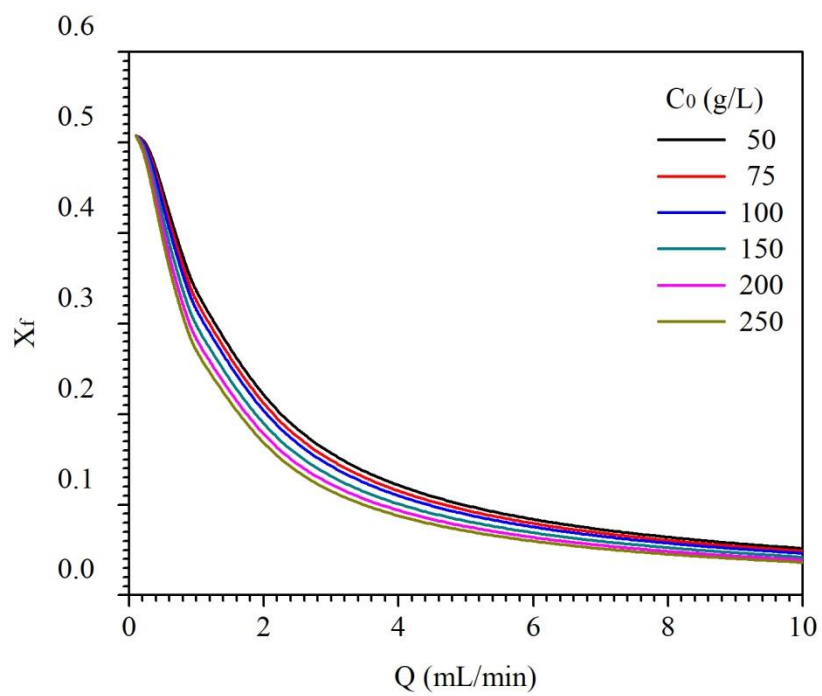
Similar al parámetro de operación anterior, la **Figura 24** muestra el efecto de la longitud del tamaño del reactor, la cual ejerce un efecto significativo sobre la conversión de glucosa, esto debido a que se incrementa el tiempo de residencia. Sin embargo, el incremento del valor de la longitud del reactor conlleva a un mayor incremento en el uso de enzima, por lo que este incremento sería de mayor beneficio cuando se pretende lograr mayores conversiones de glucosa a altos flujos volumétricos de alimentación. La mayor diferencia de conversión glucosa, cuando se utilizan diferentes longitudes de reactores, se alcanza a un flujo volumétrico de 2 mL/min.

Por último, también se analizó el efecto de la concentración de glucosa en la alimentación del reactor (**Figura 25**) y se encontró que ejerce el efecto menos significativo sobre la conversión a fructosa. Específicamente, se encontró que a menor concentración de glucosa en la alimentación del reactor se logran mejores conversiones de la misma; esto posiblemente debido a la naturaleza de la cinética de isomerización pues, a mayor concentración de sustrato, se reduce la velocidad de reacción, propiciando que se logre una menor conversión de glucosa en la salida del reactor.

En general, el hallazgo más significativo en la revisión de las simulaciones reportadas anteriormente fue que la reducción del tamaño de perla debe ser estudiada a nivel experimental,



**Figura 24.** Efecto de la longitud del reactor sobre la conversión de glucosa a fructosa en un reactor de lecho empacado a 65 °C, [S]= 100 g/L, [E]= 10.618 y pH= 7.5.



**Figura 25.** Efecto de la concentración de glucosa inicial sobre la conversión de glucosa a fructosa en un reactor de lecho empacado a 65 °C,  $[E]= 10.618$  g/L y pH= 7.5.



así, también debe ser evaluada su resistencia mecánica, para establecer el menor tamaño de perla posible. Esto debido a que este parámetro de operación no produce un mayor uso de enzima durante el proceso de biorreacción, pero si trae un beneficio significativo en el mejoramiento de la conversión de glucosa que, en conjunto con una apropiada selección de la longitud del reactor, puede lograr el establecimiento de políticas óptimas de operación para la producción de fructosa.

## VIII. CONCLUSIONES

En esta investigación se presentó un nuevo enfoque para el análisis de los efectos cinéticos, difusionales y de dispersión en un sistema de reacción enzimático inmovilizado. Se estableció un modelo matemático en el que se incorporó el concepto de fracción de actividad enzimática residual (FAER) y se describió matemáticamente la velocidad de reacción volumétrica dentro de una perla biocatalítica en términos de la concentración de enzima, similar a lo que ocurre en los procesos enzimáticos libres, es decir, a través de la relación de la masa total de enzima/volumen total de biorreacción. Por lo tanto, fue factible determinar por separado los efectos cinéticos (FAER), los efectos difusionales (coeficiente de difusión efectivo, CDE) y los efectos de dispersión (coeficiente de dispersión axial, CDA).

En el caso de los experimentos con enzima libre, se evaluó el efecto del tipo de sustrato, la concentración de sustrato, la temperatura y la concentración de enzima en la formación del producto, generando un conjunto de datos experimentales que se utilizaron en el ajuste simultáneo de los parámetros de Arrhenius en relación con el mecanismo reversible de Briggs-Haldane.

Se estableció una estrategia numérica en la que primeramente se obtuvo una forma algebraica linealizada con respecto a los parámetros cinéticos de Michaelis-Menten para reacción directa/inversa y posteriormente, los parámetros de Arrhenius se ajustaron aplicando el Método de Gauss-Newton, ya que el modelo cinético no es lineal con respecto a la

temperatura. Esto condujo a una estrategia de solución numérica en la que se utilizaron descripciones explícitas del Jacobiano y Hessiano.

Se estableció un modelo en el que los mecanismos cinético y de difusión se describen a partir de los parámetros cinéticos obtenidos en un sistema de reacción con enzima libre (SREL). Además, con respecto a la parte numérica, la ecuación diferencial parcial asociada con las concentraciones intrapartícula de sustrato/producto se discretizó mediante el método de colocación ortogonal, garantizando soluciones numéricas precisas, incluso en el caso de tener gradientes de concentración altos, como ocurre a bajos coeficientes de difusión efectivo.

Se estudió el efecto de las concentraciones de sustrato y enzima en la producción de fructosa con enzimas inmovilizadas en un RTA, donde los datos experimentales generados permitieron la evaluación del CDE y la FAER.

A través de la simulación, fue posible analizar el efecto ejercido por la FAER, el tamaño de la perla, el CDE y la fracción volumétrica de perlas biocatalíticas sobre la cinética de producción de fructosa, lo que permitió comprender que la FAER evaluada a partir de la cinética experimental es adecuada; y que el factor más fácil de manipular, con un efecto muy favorable en la producción de fructosa, es el tamaño de la perla, que debe ser disminuido. En general, tanto las estrategias numéricas como el modelo conceptual de la perla biocatalítica establecida en este trabajo facilitan significativamente el análisis de los efectos cinéticos y difusionales, cuyos resultados podrían guiar la mejora de los procesos de síntesis de las perlas biocatalíticas.

Se evaluó el efecto del flujo volumétrico y la concentración de enzima sobre la conversión de glucosa a fructosa en reactor de lecho empacado. Los parámetros coeficiente de

transferencia de masa ( $k_L$ ) y coeficiente de dispersión axial ( $D_z$ ) fueron determinados a partir de correlaciones teóricas. Se utilizaron los métodos de diferencias finitas y Runge-Kutta para la discretización del sistema de ecuaciones diferenciales parciales y su integración numérica, respectivamente. Se compararon los resultados experimentales contra el modelo obtenido y se obtuvo una  $R^2 = 0.907$ , lo que indica un ajuste adecuado de los datos.

Se realizó una comparación entre la conversión máxima alcanzada al utilizar los tres sistemas de reacción. Como era de esperarse, el reactor de tanque agitado con enzima libre fue el que presentó mayor conversión, sin embargo, no ofrece la posibilidad de reutilizar la enzima. Se obtuvo una mayor conversión en el reactor de lecho empacado con respecto al RTA con enzima inmovilizada en PACs, no obstante, el tiempo necesario para alcanzar el estado estacionario fue aproximadamente tres veces más que el requerido en el RTA con PACs.

Se realizó un estudio del efecto que ejercen el tamaño de partícula, la longitud del reactor, la concentración de enzima y la concentración de sustrato en la alimentación sobre la conversión de glucosa a fructosa en un reactor de lecho empacado. El factor con el efecto más relevante fue la reducción del tamaño de la perla, que produce un incremento en el área de contacto entre la enzima y el sustrato, sin embargo, se propone realizar un estudio a detalle que permita establecer cuál es el menor tamaño posible en el que las PACs aun conserven su actividad catalítica.

## IX. BIBLIOGRAFÍA

- Abdel-rassol TMA, Shereen AB y Helmy TO. 2012. Glucose (xylose) isomerase production from thermotolerant and thermophilic bacteria. *African Journal of Biotechnology* 11 (91): 15798-15801.
- Aehle W. 2007. *Enzymes in industry production and applications*, segunda edición. Germany: John Wiley & Sons. 516 p.
- Andresen IL y Smidsørod O. 1977. Temperature dependence of the elastic properties of alginate gels. *Carbohydrate Research* 58(2): 271-279.
- Asif M y Abasaed AE. 1998. Modeling of glucose isomerization in a fluidized bed immobilized enzyme bioreactor. *Bioresource Technology* 64: 229-235.
- Axelsson A y Persson B. 1988. Determination of effective diffusion coefficients in calcium alginate gel plates with varying yeast cell content. *Applied biochemistry and biotechnology* 18(1): 231-250.
- Badui S. 2006. *Química de los alimentos*. México: Pearson Educación. 736 p.

- Ballesteros A y Plou F. 1999. Stability and stabilization of biocatalysts. *Trends in Biotechnology* 17(8): 304-306.
- Baronas R, Kulys J y Petkevičius L. 2018. Computational modeling of batch stirred tank reactor based on spherical catalyst particles. *Journal of Mathematical Chemistry*: 1-16.
- Barrow G. 1975. *Química general*. España: Editorial Reverte. pp. 665-666.
- Bhasin S y Modi HA. 2012. Optimization of fermentation medium for the production of glucose isomerase using *Streptomyces* sp. SB-P1. *Biotechnology research international* 874152: 1-10.
- Bhosale SH, Rao MB y Deshpande VV. 1996. Molecular and industrial aspects of glucose isomerase. *Microbiological reviews* 60(2): 280-300.
- Bidabehere CM, García JR y Sedran U. 2018. Transient effectiveness factor. Simultaneous determination of kinetic, diffusion and adsorption equilibrium parameters in porous catalyst particles under diffusion control conditions. *Chemical Engineering Journal* 345: 196–208.
- Bravo V, Jurado E, Luzón E y Cruz N. 1998. Kinetics of Fructose-Glucose isomerization with Sweetzyme Type A. *The Canadian Journal of Chemical Engineering* 76: 778-783.
- Çalik P, Angardi V, Haykir NI y Boyaci IH. 2009. Glucose isomerase production on a xylan-based medium by *Bacillus thermoantarcticus*. *Biochemical Engineering Journal* 43: 8-15.

- Camacho-Rubio F, Jurado-Alameda E, González-Tello P y Luzón-González G. 1995. Kinetic study of fructose-glucose isomerization in a recirculation reactor. *The Canadian Journal of Chemical Engineering* 73(6): 935-940.
- Carey GF y Finlayson BA. 1975. Orthogonal collocation on finite elements. *Chemical Engineering Science* 30(5-6): 587-596.
- Carrillo A, González K y Mendoza O. 2018. Introducción al método de diferencias finitas y su implementación computacional. México: Facultad de Geofísica, Universidad Nacional Autónoma de México. Disponible de: <http://mmc.geofisica.unam.mx/>. Consultado en septiembre de 2018.
- Cash JR y Karp AH. 1990. A variable order Runge-Kutta method for initial value problems with rapidly varying right-hand sides. *ACM Transactions on Mathematical Software (TOMS)* 16(3): 201-222.
- Chanitnun K y Pinphanichakarn P. 2012. Glucose (xylose) isomerase production by *Streptomyces* sp. CH7 grown on agricultural residues. *Brazilian Journal of Microbiology* 43(3): 1084-1093.
- Chapra SC y Canale RP. 2007. Métodos numéricos para ingenieros. Quinta edición. México: McGraw-Hill 977 p.
- Chen KC y Wu JK. 1987. Substrate protection of immobilized glucose isomerase. *Biotechnology Engineering* 30: 817-824.

- Cheng AD, Golberg MA, Kansa EJ y Zammito G. 2003. Exponential convergence and H-c multiquadric collocation method for partial differential equations. *Numerical Methods for Partial Differential Equations: An International Journal* 19(5): 571-594.
- Ching CB y Chu KH. 1988. Modelling of a fixed-bed and a fluidized-bed immobilized enzyme reactor. *Applied Microbiology and Biotechnology* 29(4): 316–322.
- Chung SF y Wen CY. 1968. Longitudinal dispersion of liquid flowing through fixed and fluidized beds, *AIChE Journal* 14: 857–866.
- Contreras I. 2006. Métodos de colocación TH. [Tesis de Maestría]. México: Universidad Nacional Autónoma de México. 67 p.
- Converti A y Del Borghi M. 1997. Simultaneous effects of immobilization and substrate protection on the thermodynamics of glucose isomerase activity and inactivation. *Enzyme and Microbial Technology* 21(7): 511-517.
- Das A, Paul T, Ghosh P, Halder SK, Mohapatra PKD, Pati BR y Mondal KC. 2015. Kinetic study of a glucose tolerant  $\beta$ -glucosidase from *Aspergillus fumigatus* ABK9 entrapped into alginate beads. *Waste and Biomass Valorization* 6(1): 53-61.
- Dehkordi AM, Safari I y Karima MM. 2008. Experimental and modeling study of catalytic reaction of glucose isomerization: Kinetics and packed-bed dynamic modeling. *AIChE journal* 54(5): 1333-1343.
- Dehkordi AM, Tehrany MS y Safari I. 2009. Kinetics of glucose isomerization to fructose by immobilized glucose isomerase (Sweetzyme IT). *Industrial & Engineering Chemistry Research* 48(7): 3271-3278.



- Dormand JR y Prince PJ. 1980. A family of embedded Runge-Kutta formulae. *Journal of computational and applied mathematics* 6(1): 19-26.
- D'Souza S. 1999. Immobilized enzymes in bioprocess. *Current Science* 77: 69–78.
- Finlayson BA. 1971. Packed bed reactor analysis by orthogonal collocation. *Chemical Engineering Science* 26(7): 1081-1091.
- Finlayson BA. 1974. Orthogonal collocation in chemical reaction engineering. *Catalysis Reviews Science and Engineering* 10(1): 69-138.
- Fogler HS. 2005. *Elementos de ingeniería de las reacciones químicas*. Cuarta edición. USA: Prentice Hall. 1079 p.
- Gaily MH, Elhassan BM, Abasaheed AE y Al-Shrhan M. 2010. Isomerization and Kinetics of Glucose into Fructose. *International Journal of Engineering and Technology* 10(3):1-6.
- Giordano RLC, Giordano RC y Cooney CL. 2000. A study on intra-particle diffusion effects in enzymatic reactions: glucose-fructose isomerization. *Bioprocess Engineering* 23(2): 159-166.
- Godshall MA. 2007. Sugar and other sweeteners. En: *Kent and Riegel's handbook of industrial chemistry and biotechnology*. Onceava edición. USA: Springer p. 1657-1693.
- Graça I, Iruretagoyena D y Chadwick D. 2017. Glucose isomerisation into fructose over magnesium-impregnated NaY zeolite catalysts. *Applied Catalysis B: Environmental* 206: 434-443.

- Grunwald P. 1989. Determination of effective diffusion coefficients—an important parameters for the efficiency of immobilized biocatalysts. *Biochemical Education* 17(2): 99-102.
- Habeeb S, Yazaji S y Al-Amir L. 2016. Optimization of glucose isomerase production from *Streptomyces* sp. SH10 using the response surface methodology. *International Food Research Journal* 23(2): 756-761.
- Homaei AA, Sariri R, Vianello F y Stevanato R. 2013. Enzyme immobilization: an update. *Journal of chemical biology* 6(4): 185-205.
- Hultin HO. 1983. Current and potential uses of immobilized enzymes. *Food Technology* 37: 66–82.
- Illanes A y Altamirano C. 2008. Enzyme reactors. En: *Enzyme Biocatalysis, Principles and Applications*. Chile: Springer. p 205-248.
- Jørgensen OB, Karlsen LG, Nielsen NB, Pedersen S y Rugh S. 1988. A new immobilized glucose isomerase with high productivity produced by a strain of *Streptomyces murinus*. *Starch-Stärke* 40(8): 307-313.
- Katchalsky-Katzir E. 1993. Immobilized enzymes. Learning from past successes and failures. *Trends in Biotechnology* 11:471–478.
- Khalilpour R y Roostaazad R. 2008. Development and verification of a model to describe an immobilized glucose isomerase packed bed bioreactor. *Biochemical Engineering Journal* 40: 328–336.
- Kilara A, Shahani KM y Shukla TP. 1979. The use of immobilized enzymes in the food industry: a review. *Critical Reviews in Food Science & Nutrition* 12(2): 161-198.

- Kumar R, Suresh K y Shankar S. 1996. Kinetics and reaction engineering of penicillin G hydrolysis. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 66: 243–250.
- Lagarias JC, Reeds JA, Wright MH y Wright PE. 1998. Convergence properties of the Nelder-Mead simplex method in low dimensions. *SIAM Journal on optimization* 9(1): 112-147.
- Lima DM, Fernandes P, Nascimento DS, Figueiredo RC y De Assis SA. 2011. Fructose syrup: a biotechnology asset. *Food Technology and Biotechnology* 49(4): 424-434.
- Linko Y, Saarinen P y Linko M. 1975. Starch conversion by soluble and immobilized  $\alpha$ -amylase. *Biotechnology and Bioengineering* 17: 153–161.
- Martinsen A, Skjåk-Bræk G y Smidsrød O. 1989. Alginate as immobilization material: I. Correlation between chemical and physical properties of alginate gel beads. *Biotechnology and bioengineering* 33(1): 79-89.
- Marrazzo WN, Merson RL y McCoy BS. 1975. Enzyme immobilized in a packed-bed reactor: kinetic parameters and mass transfer effects. *Biotechnology and Bioengineering* 17(10): 1515–1528.
- Mateo C, Palomo JM, Fernandez-Lorente G, Guisan JM y Fernandez-Lafuente R. 2007. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. *Enzyme and microbial technology* 40(6): 1451-1463.
- Mawhinney TP, Madson MA y Feather MS. 1980. The isomerization of d-glucose in acidic solutions. *Carbohydrate Research* 86: 147–150.

- McKee T y McKee J. 2003. *Bioquímica: la base molecular de la vida*. Tercera edición. España: Editorial McGraw-Hill. 774 p.
- Molero M, Salvador A, Menarguez T y Garmendia L. 2007. *Análisis matemático para ingeniería*. España: Prentice Hall 680 p.
- Montgomery D. 1991. *Diseño y análisis de experimentos*. México: Grupo editorial Iberoamericano. 589 p.
- Mora W. 2016. Introducción a los métodos numéricos. En: *Revista digital matemática, educación e internet*. Costa Rica: Instituto Tecnológico de Costa Rica. Disponible de: <https://tecdigital.tec.ac.cr/revistamatematica/>. Consultado en Octubre de 2018.
- Moreau C, Durand R, Alies F, Cotillon M, Frutz T y Theoleyre M. 2000. Hydrolysis of sucrose in the presence of H-form zeolites. *Industrial Crops and Products* 11: 237–242.
- [NCBE] National Centre for Biotechnology Education. 2018. *Enzymes*. United Kingdom: University of Reading. Disponible de: <http://www.ncbe.reading.ac.uk/>. Consultado en Julio de 2018.
- Özdural AR, Tanyolaç D, Boyacı IH, Mutlu M y Webb C. 2003. Determination of apparent kinetic parameters for competitive product inhibition in packed-bed immobilized enzyme reactors. *Biochemical Engineering Journal* 1(14): 27-36.
- Palazzi E y Converti A. 1999. Generalized linearization of kinetics of glucose isomerization to fructose by immobilized glucose isomerase. *Biotechnology and bioengineering* 63(3): 273-284.

- Palazzi E y Converti A. 2001. Evaluation of diffusional resistances in the process of glucose isomerization to fructose by immobilized glucose isomerase. *Enzyme and microbial technology* 28(2-3): 246-252.
- Rakmai J y Cheirsilp B. 2016. Continuous production of  $\beta$ -cyclodextrin by cyclodextrin glycosyl transferase immobilized in mixed gel beads: comparative study in continuous stirred tank reactor and packed bed reactor. *Biochemical engineering journal* 105: 107-113.
- Raghavan NS y Ruthven DM. 1983. Numerical simulation of a fixed-bed adsorption column by the method of orthogonal collocation. *AIChE Journal* 29(6): 922-925.
- Ribeiro AM, Neto P y Pinho C. 2010. Mean porosity and pressure drop measurements in packed beds of monosized spheres: side wall effects. *International Review of Chemical Engineering* 2(1): 40-46.
- Ricca E, Calabrò V, Curcio S y Iorio G. 2007. The state of the art in the production of fructose from inulin enzymatic hydrolysis. *Critical reviews in biotechnology* 27(3): 129-145.
- Roels JA. 1983. *Energetics and kinetics in biotechnology*. Netherlands: Elsevier p.163-203.
- [SE] Secretaría de Economía. 2012. Análisis de la situación económica, tecnológica y de política comercial del sector edulcorantes en México. México: Secretaría de Economía. Disponible de: <https://www.gob.mx/se/>. Consultado en Septiembre de 2018.
- Silva TM, De Lima Damásio AR, Maller A, Michelin M, Squina FM, Jorge JA y De Moraes M. 2013. Purification, partial characterization, and covalent immobilization—

- stabilization of an extracellular  $\alpha$ -amylase from *Aspergillus niveus*. *Folia microbiologica* 58(6): 495-502.
- Simionescu C, Dumitriu S, Popa M, Dumitriu M y Hritcu D. 1984. Hydrolases immobilized on Biozan R. *Colloid and Polymer Science* 262(9):705-711.
- Simos TE. 1998. An exponentially-fitted Runge-Kutta method for the numerical integration of initial-value problems with periodic or oscillating solutions. *Computer Physics Communications* 115(1): 1-8.
- Souza RO, Fabiano DP, Feche C, Rataboul F, Cardoso D y Essayem N. 2012. Glucose–fructose isomerisation promoted by basic hybrid catalysts. *Catalysis today* 195(1): 114-119.
- Tocci AM y Mascheroni RH. 2008. Some thermal properties of fresh and osmotically dehydrated Kiwi fruit above and below the initial freezing temperature. *Journal of Food Engineering* 88: 20-27.
- Tükel SS y Alagöz D. 2008. Catalytic efficiency of immobilized glucose isomerase in isomerization of glucose to fructose. *Food chemistry* 111 (3): 658-662.
- Tumturk H, Demirel G, Altinok H, Aksoy S y Hasirci N. 2008. Immobilization of glucose isomerase in surface-modified alginate gel beads. *Journal of Food Biochemistry* 32: 234–246.
- [USDA] United States Department of Agriculture. 2018. Sugar and sweeteners. USA: United States Department of Agriculture. Disponible de: <https://www.ers.usda.gov/>. Consultado en Octubre de 2018.

- Valdez S. 2009. Introducción a los métodos numéricos. México: Centro de Investigación y de Estudios Avanzados, Instituto Politécnico Nacional. Disponible de: <http://pelusa.fis.cinvestav.mx/>. Consultado en septiembre de 2018.
- Vásquez-Bahena J, Montes-Horcasitas MC, Ortega-López J, Magaña-Plaza I y Flores-Cotera LB. 2004. Multiple steady-states in a continuous stirred tank reactor: an experimental case study for hydrolysis of sucrose by invertase. *Process Biochemistry* 39(12): 2179–2182.
- Villadsen JV y Stewart WE. 1967. Solution of boundary-value problems by orthogonal collocation. *Chemical Engineering Science* 22(11): 1483-1501.
- Wilson EJ y Geankoplis CJ. 1966. Liquid mass transfer at very low Reynolds numbers in packed beds. *Industrial and Engineering Chemistry Fundamentals* 5:9-14.
- White JS. 2014. Sucrose, HFCS, and fructose: history, manufacture, composition, applications, and production. En: Rippe JM editor. *Fructose, High Fructose Corn Syrup, Sucrose and Health*. USA: Humana press. p. 13-34.
- White JS y Osberger TF. 2001. Crystalline fructose. En: *Alternative sweeteners*. USA: Marcer Dekker p. 367-390.
- Won K, Sangbum K, Kwang-Je K, Hong WP y Sang-Jin M. 2005. Optimization of lipase entrapment in Ca-alginate gel beads. *Process biochemistry* 40(6):2149-2154.
- Yaman S y Çalık P. 2017. Beet molasses–based feeding strategy enhances recombinant thermostable glucose isomerase production by *Escherichia coli* BL21 (DE3). *Biotechnology and applied biochemistry* 64(6): 944-954.

- Zhang Y, Hidajat K y Ray AK. 2004. Optimal design and operation of SMB bioreactor: production of high fructose syrup by isomerization of glucose. *Biochemical Engineering Journal* 21: 111–121.
- Zhang F. 2005. *The Schur Complement and its Applications*. USA: Springer 295 p.
- Zhang JJ, Li Y, Zhou T, Xu DP, Zhang P, Li S y Li HB. 2016. Bioactivities and health benefits of mushrooms mainly from China. *Molecules* 21(7): 938.
- Zhao H, Cui Q, Shah V, Xu J y Wang T. 2016. Enhancement of glucose isomerase activity by immobilizing on silica/chitosan hybrid microspheres. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 126: 18-23.
- Zittan L, Poulsen PB y Hemmingsen SH. 1975. Sweetzyme—a new immobilized glucose isomerase. *Starch-Stärke* 27(7): 236-241.



## NOMENCLATURA

$a, b$	Raíz cuadrada de los parámetros de Arrhenius.
$\hat{a}_p$	Área específica de partícula (1/m)
$B_1, B_{21}, B_{22}$	Parámetros utilizados en la Ecuación 16
$c_1$	Concentración de sustrato (M)
$c_2$	Concentración de producto (M)
$C_i$	Concentración en la fase líquida (M)
$d_p$	Diámetro de la partícula catalítica
$d_t$	Diámetro del biorreactor
$D_{eff}$	Coefficiente de difusión efectivo (m <sup>2</sup> /s)
$D_{st}$	Diámetro del agitador (m)
$D_{ir}$	Diámetro interno del reactor (m)
$D_z$	Coefficiente de dispersión axial (m <sup>2</sup> /s)
$E$	Enzima
$[E]$	Concentración de enzima (g/L)

$[E]_{imm}$	Concentración de enzima inmovilizada (g/L)
$E_a$	Energía de activación (J/mol)
$H_{r_i, \vec{p}}$	Hessiano de $r_i$ con respecto a los parámetros de ajuste $\vec{p}$
$h_L$	Altura del fluido (m)
$j_m$	Coefficiente de transferencia de masa de Colburn
$J_{\vec{r}, \vec{p}}$	Jacobiano del vector residual $\vec{r}$ con respecto a los parámetros de ajuste $\vec{p}$
$k_1, k_{-2}$	Constantes de velocidad de las reacciones intermediarias (1/(M·s))
$k_2, k_{-1}$	Constantes de velocidad de las reacciones intermediarias (mol/(g·s))
$K_{eq}$	Constante de equilibrio
$k_L$	Coefficiente convectivo de transferencia de masa en la fase fluida (m/s)
$K_m$	Constante de afinidad de Michaelis-Menten (M)
$K_{mf}$	Constante de afinidad de Michaelis-Menten para la conversión glucosa-fructosa (M)
$K_{mr}$	Constante de afinidad de Michaelis-Menten para la conversión fructosa-glucosa (M)
$m_E$	Masa de enzima (g)
$P$	Producto
$Pe$	Numero adimensional de Peclet
$r$	Radio (m)
$-\mathbf{r}_1$	Velocidad de reacción de consumo de sustrato (M/s)
$\mathbf{r}_2$	Velocidad de reacción de generación de producto (M/s)
$\mathbf{r}_i$	Velocidad de reacción con enzima libre (M/s)
$\hat{\mathbf{r}}_i$	Velocidad de reacción volumétrica (M/s)
$r_p$	Radio de la perla biocatalítica (m)
$\vec{r}(\vec{p}_n)$	Vector de residuales en función del vector de parámetros de ajuste
$Re$	Número adimensional de Reynolds
$S$	Sustrato
$Sc$	número adimensional de Schmidt
$Sh$	número adimensional de Sherwood
SSE	Suma del cuadrado de los errores
SSWR	Suma de los cuadrados de los residuos ponderados

$U_s$	Velocidad superficial (m/s)
$t$	Tiempo (s)
$V_t$	Volumen total de reacción (L)
$V_p$	Volumen total de perlas (L)
$V_\infty$	Volumen de sobrenadante (L)
$V_m$	Velocidad máxima de reacción (M/s)
$V_{mf}$	Velocidad máxima de reacción para la conversión glucosa-fructosa (M/s)
$V_{mr}$	Velocidad máxima de reacción para la conversión fructosa-glucosa (M/s)
$\bar{V}_{mf}$	Velocidad máxima de reacción específica para la conversión glucosa-fructosa (mol/(g·s))
$\bar{V}_{mr}$	Velocidad máxima de reacción específica para la conversión fructosa-glucosa (mol/(g·s))
$X$	Complejo intermediario
$\Delta c_{2,m}$	Media logarítmica de las diferencias entre las concentraciones finales e iniciales (M)

### Alfabeto griego

$\alpha, \beta, \gamma$	Parámetros usados en la Ecuación 78
$\varepsilon$	Porosidad (L/L)
$\mu$	Viscosidad de la fase fluida (kg/m·s)
$\eta$	Fracción de actividad enzimática residual
$\rho$	Densidad de la fase fluida (kg/m <sup>3</sup> )
$\theta$	Fracción de producto no alcanzada
$\varphi$	Fracción volumétrica de la fase líquida en el biorreactor (L/L)
$\omega$	Factor de sub-relajación (Ecuación 87)

### Subíndice

exp	Condiciones experimentales
-----	----------------------------

$i$	Especies químicas (glucosa = 1, fructosa = 2)
$m$	Velocidad de reacción elemental (Ecuación 9)
$t$	Total
0	Condición inicial (Ecuación 13)

## ANEXOS

### Determinación de la Matriz Jacobiana y Hessiana

En general, los elementos Jacobianos  $J_{\bar{r},\bar{p}}$  están representados por  $\partial r_i / \partial p_j$ , que para el ajuste cinético se dan como sigue (Ecuación (78)):

$$\frac{\partial r_i}{\partial p_j} = \left( \alpha \frac{\partial B_1}{\partial p_j} + \beta \frac{\partial B_{21}}{\partial p_j} + \gamma \frac{\partial B_{22}}{\partial p_j} \right)_i \quad (S1)$$

Los coeficientes  $B_1$ ,  $B_{21}$  y  $B_{22}$  dependen de las constantes de velocidad de reacción ( $k_m$ ), donde  $m = 1, 2, -1$ ; por lo tanto, aplicando la regla de la cadena, es posible obtener la siguiente expresión:

$$\frac{\partial r_i}{\partial p_j} = \left[ \left( \alpha \frac{\partial B_1}{\partial k_m} + \beta \frac{\partial B_{21}}{\partial k_m} + \gamma \frac{\partial B_{22}}{\partial k_m} \right) \frac{\partial k_m}{\partial p_j} \right]_i \quad m = 1, 2, -1 \quad (\text{S2})$$

Derivando las ecuaciones (83)-(85) como función de las velocidades de reacción específicas, se obtiene el siguiente conjunto de ecuaciones:

$$\frac{\partial B_1}{\partial k_1} = 0; \quad \frac{\partial B_{21}}{\partial k_1} = -\frac{K_{eq}}{K_{eq}+1} \left( \frac{1}{k_1} \right)^2 \left( \frac{k_{-1}}{k_2} + 1 \right); \quad \frac{\partial B_{22}}{\partial k_1} = 0 \quad (\text{S3})$$

$$\frac{\partial B_1}{\partial k_2} = -\frac{K_{eq}}{K_{eq}+1} \left( \frac{1}{k_2} \right)^2; \quad \frac{\partial B_{21}}{\partial k_2} = -\frac{K_{eq}}{K_{eq}+1} \frac{1}{k_2} \left( \frac{k_{-1}}{k_1 k_2} \right); \quad \frac{\partial B_{22}}{\partial k_2} = -\frac{K_{eq}}{(K_{eq}+1)^2} \left( \frac{1}{k_2} \right)^2 \quad (\text{S4})$$

$$\frac{\partial B_1}{\partial k_{-1}} = \frac{1}{K_{eq}+1} \left( \frac{1}{k_{-1}} \right)^2; \quad \frac{\partial B_{21}}{\partial k_{-1}} = \frac{K_{eq}}{K_{eq}+1} \frac{1}{k_1 k_2}; \quad \frac{\partial B_{22}}{\partial k_{-1}} = -\frac{K_{eq}}{(K_{eq}+1)^2} \left( \frac{1}{k_{-1}} \right)^2 \quad (\text{S5})$$

Por otro lado, a partir de la ecuación (S2), es posible establecer esta expresión:

$$\frac{\partial k_m}{\partial p_j} = \begin{cases} 0 & p_j = a_n \quad n \neq m \\ 0 & p_j = b_n \quad n \neq m \\ \frac{2k_m}{a_m} & p_j = a_n \quad n = m \\ -\frac{2b_m k_m}{RT} & p_j = b_n \quad n = m \end{cases} \quad (\text{S6})$$

A partir de las Ecuaciones (S3)-(S6), se pueden establecer las siguientes ecuaciones:

$$\frac{\partial r_i}{\partial a_1} = -\frac{2}{a_1} \left[ \frac{K_{eq}}{K_{eq}+1} \frac{1}{k_1} \left( \frac{k_{-1}}{k_2} + 1 \right) \beta \right]_i \quad (\text{S7})$$

$$\frac{\partial r_i}{\partial b_1} = 2b_1 \left[ \frac{1}{RT} \frac{K_{eq}}{K_{eq}+1} \frac{1}{k_1} \left( \frac{k_{-1}}{k_2} + 1 \right) \beta \right]_i \quad (\text{S8})$$

$$\frac{\partial r_i}{\partial a_2} = -\frac{2}{a_2} \left[ \frac{K_{eq}}{K_{eq}+1} \frac{1}{k_2} \left( \alpha + \frac{k_{-1}}{k_1} \beta + \frac{1}{K_{eq}+1} \gamma \right) \right]_i \quad (\text{S9})$$

$$\frac{\partial r_i}{\partial b_2} = 2b_2 \left[ \frac{1}{RT} \frac{K_{eq}}{K_{eq}+1} \frac{1}{k_2} \left( \alpha + \frac{k_{-1}}{k_1} \beta + \frac{1}{K_{eq}+1} \gamma \right) \right]_i \quad (S10)$$

$$\frac{\partial r_i}{\partial a_{-1}} = \frac{2}{a_{-1}} \left[ \frac{K_{eq}}{K_{eq}+1} \left( \frac{1}{K_{eq}k_{-1}} \alpha + \frac{k_{-1}}{k_1k_2} \beta - \frac{1}{K_{eq}+1} \frac{1}{k_{-1}} \gamma \right) \right]_i \quad (S11)$$

$$\frac{\partial r_i}{\partial b_{-1}} = -2b_{-1} \left[ \frac{1}{RT} \frac{K_{eq}}{K_{eq}+1} \left( \frac{1}{K_{eq}k_{-1}} \alpha + \frac{k_{-1}}{k_1k_2} \beta - \frac{1}{K_{eq}+1} \frac{1}{k_{-1}} \gamma \right) \right]_i \quad (S12)$$

La determinación de los elementos de Hessianos, utilizando la segunda derivada de las ecuaciones (S7)-(S12), con respecto a los parámetros de Arrhenius, viene dada por el siguiente conjunto de expresiones:

$$\frac{\partial^2 r_i}{\partial a_1 \partial a_1} = \frac{4}{(a_1)^2} \left( \frac{K_{eq}}{K_{eq}+1} \frac{1}{k_1} \left( \frac{k_{-1}}{k_2} + 1 \right) \beta \right)_i \quad (S13)$$

$$\frac{\partial^2 r_i}{\partial a_1 \partial b_1} = -\frac{4b_1}{a_1} \left( \frac{1}{RT} \frac{K_{eq}}{K_{eq}+1} \frac{1}{k_1} \left( \frac{k_{-1}}{k_2} + 1 \right) \beta \right)_i \quad (S14)$$

$$\frac{\partial^2 r_i}{\partial a_1 \partial a_2} = \frac{4}{a_1 a_2} \left( \frac{K_{eq}}{K_{eq}+1} \frac{k_{-1}}{k_1 k_2} \beta \right)_i \quad (S15)$$

$$\frac{\partial^2 r_i}{\partial a_1 \partial b_2} = -\frac{4b_2}{a_1} \left( \frac{1}{RT} \frac{K_{eq}}{K_{eq}+1} \frac{k_{-1}}{k_1 k_2} \beta \right)_i \quad (S16)$$

$$\frac{\partial^2 r_i}{\partial a_1 \partial a_{-1}} = -\frac{4}{a_1 a_{-1}} \left( \frac{K_{eq}}{K_{eq}+1} \frac{k_{-1}}{k_1 k_2} \beta \right)_i \quad (S17)$$

$$\frac{\partial^2 r_i}{\partial a_1 \partial b_{-1}} = \frac{4b_{-1}}{a_1} \left[ \frac{1}{RT} \frac{K_{eq}}{K_{eq}+1} \frac{k_{-1}}{k_1 k_2} \beta \right]_i \quad (S18)$$

$$\frac{\partial^2 r_i}{\partial b_1 \partial b_1} = 2b_1 b_1 \left[ \frac{1}{(RT)^2} \frac{K_{eq}}{K_{eq}+1} \frac{1}{k_1} \left( \frac{k_{-1}}{k_2} + 1 \right) \beta \right]_i \quad (S19)$$

$$\frac{\partial^2 r_i}{\partial b_1 \partial a_2} = -\frac{4b_1}{a_2} \left[ \frac{1}{RT} \frac{K_{eq}}{K_{eq} + 1} \frac{k_{-1}}{k_1 k_2} \beta \right]_i \quad (\text{S20})$$

$$\frac{\partial^2 r_i}{\partial b_1 \partial b_2} = 4b_1 b_2 \left[ \frac{1}{(RT)^2} \frac{K_{eq}}{K_{eq} + 1} \frac{k_{-1}}{k_1 k_2} \beta \right]_i \quad (\text{S21})$$

$$\frac{\partial r_i}{\partial b_1 \partial a_{-1}} = \frac{4b_1}{a_{-1}} \left[ \frac{1}{RT} \frac{K_{eq}}{K_{eq} + 1} \frac{k_{-1}}{k_1 k_2} \beta \right]_i \quad (\text{S22})$$

$$\frac{\partial^2 r_i}{\partial b_1 \partial b_{-1}} = -4b_1 b_{-1} \left[ \frac{1}{(RT)^2} \frac{K_{eq}}{K_{eq} + 1} \frac{k_{-1}}{k_1 k_2} \beta \right]_i \quad (\text{S23})$$

$$\frac{\partial^2 r_i}{\partial a_2 \partial a_2} = \frac{4}{(a_2)^2} \left[ \frac{K_{eq}}{K_{eq} + 1} \frac{1}{k_2} \left( \alpha + \frac{k_{-1}}{k_1} \beta + \frac{1}{K_{eq} + 1} \gamma \right) \right]_i \quad (\text{S24})$$

$$\frac{\partial^2 r_i}{\partial a_2 \partial b_2} = -\frac{4b_2}{a_2} \left[ \frac{1}{RT} \frac{K_{eq}}{K_{eq} + 1} \frac{1}{k_2} \left( \alpha + \frac{k_{-1}}{k_1} \beta + \frac{1}{K_{eq} + 1} \gamma \right) \right]_i \quad (\text{S25})$$

$$\frac{\partial^2 r_i}{\partial a_2 \partial a_{-1}} = -\frac{4}{a_2 a_{-1}} \left[ \frac{K_{eq}}{K_{eq} + 1} \frac{k_{-1}}{k_2 k_1} \beta \right]_i \quad (\text{S26})$$

$$\frac{\partial^2 r_i}{\partial a_2 \partial b_{-1}} = \frac{4b_{-1}}{a_2} \left[ \frac{1}{RT} \frac{K_{eq}}{K_{eq} + 1} \frac{k_{-1}}{k_1 k_2} \beta \right]_i \quad (\text{S27})$$

$$\frac{\partial^2 r_i}{\partial b_2 \partial b_2} = 4b_2 b_2 \left[ \frac{1}{(RT)^2} \frac{K_{eq}}{K_{eq} + 1} \frac{1}{k_2} \left( \alpha + \frac{k_{-1}}{k_1} \beta + \frac{1}{K_{eq} + 1} \gamma \right) \right]_i \quad (\text{S28})$$

$$\frac{\partial^2 r_i}{\partial b_2 \partial a_{-1}} = \frac{4b_2}{a_{-1}} \left[ \frac{1}{RT} \frac{K_{eq}}{K_{eq} + 1} \frac{k_{-1}}{k_1 k_2} \beta \right]_i \quad (\text{S29})$$

$$\frac{\partial^2 r_i}{\partial b_2 \partial b_{-1}} = -4b_2 b_{-1} \left[ \frac{1}{(RT)^2} \frac{K_{eq}}{K_{eq} + 1} \frac{k_{-1}}{k_1 k_2} \beta \right]_i \quad (\text{S30})$$

$$\frac{\partial^2 r_i}{\partial a_{-1} \partial a_{-1}} = \frac{4}{a_{-1} a_{-1}} \left[ \frac{K_{eq}}{K_{eq} + 1} \left( -\frac{1}{K_{eq} k_{-1}} \alpha + \frac{k_{-1}}{k_1 k_2} \beta + \frac{1}{K_{eq} + 1} \frac{1}{k_{-1}} \gamma \right) \right]_i \quad (\text{S31})$$

$$\frac{\partial^2 r_i}{\partial a_{-1} \partial b_{-1}} = -\frac{4b_{-1}}{a_{-1}} \left[ \frac{1}{RT} \frac{K_{eq}}{K_{eq} + 1} \left( -\frac{1}{K_{eq} k_{-1}} \alpha + \frac{k_{-1}}{k_1 k_2} \beta + \frac{1}{K_{eq} + 1} \frac{1}{k_{-1}} \gamma \right) \right]_i \quad (\text{S32})$$

$$\frac{\partial^2 r_i}{\partial b_{-1} \partial b_{-1}} = 4b_{-1} b_{-1} \left[ \frac{1}{(RT)^2} \frac{K_{eq}}{K_{eq} + 1} \left( -\frac{1}{K_{eq} k_{-1}} \alpha + \frac{k_{-1}}{k_1 k_2} \beta + \frac{1}{K_{eq} + 1} \frac{1}{k_{-1}} \gamma \right) \right]_i \quad (\text{S33})$$