

UNIVERSIDAD DE GRANADA
FACULTAD DE CIENCIAS



Departamento de Ingeniería Química

**ESTUDIO CINETICO COMPARADO DE LA
UTILIZACION DE ENZIMAS LIBRES E
INMOVILIZADAS: ISOMERIZACION
FRUCTOSA-GLUCOSA**

TESIS DOCTORAL

Germán Luzón González
Granada, 1993

Prof.
T-14/117

T
12
111

UNIVERSIDAD DE GRANADA

Departamento de Ingeniería Química

Tesis Doctoral

ESTUDIO CINETICO COMPARADO DE LA UTILIZACION DE ENZIMAS LIBRES
E INMOVILIZADAS: ISOMERIZACION FRUCTOSA-GLUCOSA

BIBLIOTECA	UNIVERSIDAD
GRANADA	
Nº Documento	519662087
Nº Copia	2/210172

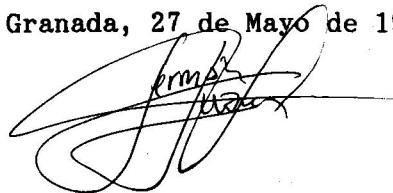
GERMAN LUZON GONZALEZ

MAYO, 1993

ESTUDIO CINETICO COMPARADO DE LA UTILIZACION DE ENZIMAS LIBRES E
INMOVILIZADAS: ISOMERIZACION FRUCTOSA-GLUCOSA

Trabajo presentado para aspirar al grado de Doctor en Ciencias (Sección Químicas), dentro del Programa de Doctorado del Departamento de Ingeniería Química "Tecnología Bioquímica y Agroalimentaria" (Bienio 1989-91).

Granada, 27 de Mayo de 1993



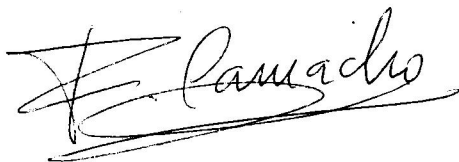
Fdo.: Germán Luzón González

VICENTE BRAVO RODRIGUEZ, Catedrático de Ingeniería Química y Director del Departamento del mismo nombre.

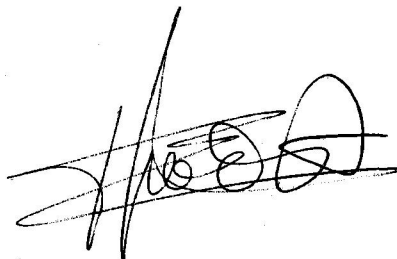
CERTIFICA: Que el presente trabajo sobre "Estudio cinético comparado de la utilización de enzimas libres e inmovilizadas: isomerización fructosa-glucosa" ha sido realizado en los laboratorios de este Departamento bajo la dirección del Dr. D. Fernando Camacho Rubio y la Dra. D^a. Encarnación Jurado Alameda, por el Licenciado D. Germán Luzón González.



LOS DIRECTORES DE LA TESIS



Dr. D. Fernando Camacho Rubio
Catedrático de Ingeniería
Química



Dra. D^a. Encarnación Jurado Alameda
Profesora Titular de Ingeniería
Química

Mi más sincero agradecimiento

A D. Fernando Camacho Rubio y D^a. Encarnación Jurado Alameda por su estímulo, enseñanzas, gran dedicación y acertada dirección en la realización de esta Memoria.

A D. Pedro González Tello por sus consejos y colaboración en el desarrollo de este trabajo.

A los miembros de los Departamentos de Química Inorgánica, Biología Vegetal y del Servicio de Análisis de Imágenes por su colaboración en las técnicas de porosimetría y análisis de imágenes.

A D^a. Emilia María Guadix Escobar por su apoyo, consejos y paciencia durante estos años de experimentación.

A todos los miembros del Departamento de Ingeniería Química, y en definitiva a todos aquellos que me han ayudado y aconsejado durante la preparación de la presente Memoria, y que han contribuido de alguna manera, siempre desinteresadamente, a la realización de la misma.

1. Resumen	1
2. Antecedentes Bibliográficos	7
2.1 Producción de jarabes de glucosa-fructosa	9
Estructura de glucosa, fructosa y almidón	11
Enzimas utilizadas en la hidrólisis enzimática del almidón	13
Producción de jarabes de fructosa	21
2.2 Glucosa isomerasa	26
Producción de glucosa isomerasa	26
Condiciones de operación	29
Mecanismo de reacción	33
2.3 Inmovilización de enzimas	35
Métodos de inmovilización de enzimas	36
Efecto de la inmovilización sobre la cinética y las propiedades enzimáticas	45
Reactor de fibra hueca	47
2.4 Estudios cinéticos de la isomerización enzimática de glucosa a fructosa	50
2.5 Objeto de la presente investigación y grado de cumplimiento de la misma	64
3. Técnica experimental	67
3.1 Productos utilizados	69
3.2 Procedimiento experimental	71
Reactor homogéneo	71
Reactor de lecho fijo de recirculación	73
Reactor de fibra hueca de recirculación	75
3.3 Métodos de análisis	81
Análisis de glucosa	81
Valoración de H_2O_2	82
3.4 Medida de la actividad enzimática	84
Glucosa-oxidasa	84

Glucosa-isomerasa libre	85
Glucosa-isomerasa inmovilizada	88
3.5 Estabilidad de la glucosa-isomerasa	88
Glucosa-isomerasa libre	88
Glucosa-isomerasa inmovilizada	92
3.6 Características de las partículas de glucosa-isomerasa inmovilizada	93
Penetración de Mercurio	93
Tratamiento de imágenes	96
3.7 Estimación de las propiedades físico-químicas	99
4. Resultados experimentales	103
4.1 Determinación de la composición de equilibrio	105
4.2 Reactor de lecho fijo	113
Influencia del caudal de circulación	113
Influencia de la masa de enzima en el lecho	119
Influencia de la temperatura y de la concentración total de hexosas	124
4.3 Reactor homogéneo	140
4.4 Reactor de fibra hueca de recirculación	155
5. Discusión de los resultados	161
5.1 Equilibrio de isomerización	163
5.2 Modelo cinético	164
Sistema homogéneo	168
Sistemas heterogéneos	169
5.3 Glucosa-isomerasa inmovilizada	185
Aplicación del método diferencial	206
Aplicación del método integral	208
5.4 Glucosa-isomerasa libre	217
5.5 Comparación de los resultados obtenidos con glucosa-isomerasa libre e inmovilizada	225
5.6 Interacción transporte interno-reacción en enzimas inmovilizadas en la matriz de un gel	231
5.7 Reactor de fibra hueca	235
6. Conclusiones	241

7. Nomenclatura	247
8. Apéndices	253
8.1 Penetración de Mercurio	256
8.2 Tratamiento de imágenes	264
8.3 Ajuste mediante funciones spline cúbicas de los resultados experimentales	261
Fundamento	261
Programa	264
8.4 Cálculo del factor de efectividad	273
9. Bibliografía	281

1. RESUMEN

La isomerización enzimática de glucosa a fructosa es uno de los procesos con enzimas inmovilizadas más ampliamente utilizado en la industria alimentaria para la preparación de edulcorantes. No obstante, existen discrepancias importantes entre los trabajos de investigación publicados sobre la cinética de este proceso.

En esta Memoria se da cuenta de los resultados obtenidos en el estudio cinético de la isomerización de glucosa a fructosa en tres dispositivos experimentales:

- a) Con enzima inmovilizada dispuesta en el lecho fijo en un reactor de recirculación.
- b) En fase homogénea con enzima en disolución.
- c) Con la enzima disuelta retenida en la carcasa de un módulo de fibra hueca, también en un reactor de recirculación.

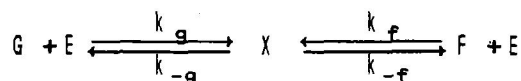
En primer lugar se estudió el equilibrio de isomerización en el reactor de lecho fijo, encontrándose que la constante de equilibrio puede expresarse en función de la temperatura mediante la ecuación

$$k_e = 24.3 \exp \left(- \frac{1022}{T} \right)$$

que indica un calor de reacción para esta isomerización de 8500 kJ/mol, la comparación de estos resultados con los publicados en la Bibliografía indica que esta ecuación es válida en el intervalo de 30 a 80°C, pH de 6.5 a 8.5 y concentración total de hexosas desde dilución infinita hasta 3.4 M.

El análisis del comportamiento del reactor de lecho fijo de recirculación mediante la influencia del caudal y de la masa de enzima dispuesta en el lecho puso de manifiesto que en los intervalos utilizados se comportaba como un reactor diferencial.

Los resultados cinéticos son consistentes con el siguiente modelo cinético



aunque en el intervalo investigado: temperatura de 30 a 60°C, concentración total de hexosas de 0.5 a 2.0 M y pH 7.5, la ecuación cinética corresponde a una ecuación de pseudoprimer orden, lo que indica que las constantes cinéticas elementales, k_f y k_g son prácticamente iguales.

La comparación de los resultados obtenidos en fase homogénea y con la enzima inmovilizada en lecho fijo pone de manifiesto una influencia apreciable del transporte interno sobre la velocidad global de reacción en este último caso.

Por integración numérica de la ecuación de continuidad del sustrato en las partículas de enzima inmovilizada se propone un método para el cálculo del factor de efectividad incluyendo la desviación de la cinética de pseudoprimer orden, mediante las ecuaciones

$$m = \frac{\Phi \beta}{(1 + \beta) \sqrt{2(\beta - \ln(1 + \beta))}}$$

$$\eta_1 = \frac{1}{m} \left(\frac{1}{\operatorname{tgh}(3m)} - \frac{1}{3m} \right)$$

$$\eta_0 = \begin{cases} 1 & m \leq \frac{1}{\sqrt{3}} \\ 1 - z_c^3 & m > \frac{1}{\sqrt{3}} \end{cases}$$

donde z_c es la solución de

$$z_c^3 - \frac{3}{2} z_c^2 + \frac{1}{6 m^2} - \frac{1}{2} = 0$$

comprendida entre 0 y 1

$$eFUNC\eta' = \frac{\beta \eta_0 + 2.614 \eta_1}{(\beta + 2.614)(\beta + 1)}$$

a partir de los valores de m_1 y β , con un error relativo medio inferior al 0.11%. Por tanto, la velocidad de reacción por unidad de masa de enzima inmovilizada vendrá dada por

$$r_{FG} = \eta' s_0 k_a (x_e - x), \quad \frac{\text{mol}}{\text{h} \cdot \text{g}}$$

que permite estimar éste con un error relativo medio inferior al 0.11%.

Se ha desarrollado un método para comparar los resultados obtenidos con la enzima libre en disolución y la enzima inmovilizada en un soporte sólido que permite determinar la actividad relativa de una a otra y la difusividad efectiva en la enzima inmovilizada o el factor de tortuosidad si se utiliza el modelo de poros al azar. La aplicación de este método indica que la actividad relativa de las dos enzimas comerciales utilizadas: spezyme GI y sweetzyme T es 0.500 y el factor de tortuosidad en esta última es 1.53. Se explica este bajo valor del factor de tortuosidad teniendo en cuenta la estructura real de un catalizador formado por una enzima retenida en la matriz de un gel.

La interpretación conjunta de los resultados obtenidos en ambos sistemas ha permitido determinar las expresiones en función de la temperatura de las constantes cinéticas del mecanismo anteriormente citado

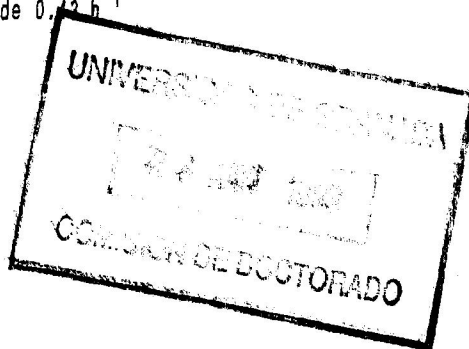
$$k_f e_T = k_g e_T = 2.08 \cdot 10^{13} \exp \left(-\frac{87930}{R T} \right), \quad \text{L/g} \cdot \text{h}$$

$$k_{-f} e_T = 5.12 \cdot 10^{11} \exp \left(-\frac{83840}{R T} \right), \quad \text{mol/g} \cdot \text{h}$$

$$k_{-g} e_T = 2.10 \cdot 10^{10} \exp \left(-\frac{75340}{R T} \right), \quad \text{mol/g} \cdot \text{h}$$

En la utilización del módulo de fibra hueca con la finalidad de retener la enzima, los resultados obtenidos pusieron de manifiesto una apreciable menor eficacia de la enzima en este dispositivo, al mismo tiempo que parecía desviarse de la cinética de pseudoprimer orden.

Aunque en esta Memoria sólo se da cuenta de los primeros resultados obtenidos con este sistema, la interpretación de los mismos sugiere que se produce una polarización de la membrana, con un valor para la constante cinética de desnaturalización de primer orden de 0.12 h^{-1}



2. ANTECEDENTES BIBLIOGRAFICOS

2.1 Producción de jarabes de glucosa-fructosa.

Hay pocas áreas en la industria de alimentos que hallan progresado más rápidamente que la industria de los jarabes de glucosa y fructosa. El conocimiento de que el almidón se podía convertir en azúcares por calentamiento con ácidos diluidos se tenía desde hace más de 165 años, pero no se había aplicado desde el punto de vista industrial. Fue el descubrimiento y aplicación de la enzima glucosa isomerasa en 1950 lo que ha permitido el desarrollo de la industria de los edulcorantes a gran velocidad, produciéndose actualmente jarabes de glucosa-fructosa a partir de almidón de maíz con distintos porcentajes de estos azúcares, que son destinados a uso industrial principalmente.

En la Tabla 2.1 se muestra la evolución del consumo de edulcorantes en distintos países hasta 1985, observándose un notable incremento del consumo de los jarabes de fructosa y glucosa en función del tiempo; en la Comunidad Económica Europea sin embargo, la facilidad para producir jarabes de glucosa y fructosa está limitada en cuanto que Europa es un importador de cereales y un exportador de azúcar, obtenida de caña de azúcar y remolacha fundamentalmente, así el mercado de edulcorantes líquidos en Europa (1980), comprendía sólo el 15% del uso industrial, y entre el 5-6% del mercado total de edulcorantes producidos, en contraste con el obtenido por Estados Unidos, en ese mismo año, que comprendió el 47% del uso industrial, y cerca del 33% respecto al mercado total. Sin embargo, las tendencias del mercado actual para la fabricación de productos dietéticos y bebidas "light" va a hacer que se incremente notablemente la producción de estos jarabes, dadas sus características indicadas en la Tabla 2.2, y aunque estos jarabes en algunas aplicaciones comerciales pueden competir favorablemente con la producción de azúcar por otras vías, es necesario desarrollar y mejorar los procesos de obtención de estos jarabes e intentar encontrar otras fuentes de producción, especialmente en aquellos países donde la producción de maíz es limitada.

TABLA 2.1
 CONSUMO DE EDULCORANTES (Millones de toneladas de materia prima en base seca)

País	Edulcorante	1970	1975	1980	1985
EE.UU.	Sacarosa	10.13	9.30	9.98	10.44
	Jarabes de fructosa y glucosa	-	0.45	1.80	2.40
	Jarabe glucosa+glucosa(cristalina)	1.73	2.30	2.13	2.16
Canadá	Sacarosa	1.05	1.05	1.16	1.21
	Jarabes de fructosa y glucosa	-	-	0.05	0.12
	Jarabe glucosa+glucosa(cristalina)	0.18	0.20	0.21	0.24
CEE	Sacarosa	10.50	10.00	10.96	11.47
	Jarabes de fructosa y glucosa	-	-	0.30	0.40
	Jarabe glucosa+glucosa(cristalina)	0.80	1.10	1.14	1.24
Japón	Sacarosa	3.00	2.80	3.04	3.33
	Jarabes de fructosa y glucosa	-	0.05	0.33	0.45
	Jarabe glucosa+glucosa(cristalina)	0.80	1.10	1.14	1.24
Total	Sacarosa	24.68	23.15	25.14	26.44
	Jarabes de fructosa y glucosa	-	0.50	2.48	3.37
	Jarabe glucosa+glucosa(cristalina)	3.06	4.15	3.99	4.21

TABLA 2.2
 CARACTERISTICAS Y APLICACIONES DE LOS JARABES RICOS EN FRUCTOSA

Característica	Aplicación
Poder edulcorante de la fructosa más elevado que glucosa y sacarosa	Fabricación de alimentos dietéticos
La fructosa se absorbe más lentamente que la glucosa y se metaboliza sin intervención de la insulina	Fabricación de alimentos para diabéticos
Jarabes con gran poder higroscópico	Panadería y bollería
Color claro y viscosidad baja	Bebidas refrescantes

Estructura de glucosa, fructosa y almidón.

La glucosa y fructosa se encuentran de forma abundante en la naturaleza como azúcares libres (Tabla 2.3), combinadas juntas en la sacarosa y polimerizadas en sustancias de reserva como almidón, glucógeno e inulina. También, y de forma más abundante se encuentra en la celulosa, de las plantas superiores, pero en este caso es menos accesible porque está asociada con la lignina.

TABLA 2.3
AZUCARES LIBRES EN FRUTAS Y VEGETALES COMO PORCENTAJE EN BASE FRESCA

Fruta	Sólidos totales, %	Glucosa, %	Fructosa, %	Sacarosa, %	Maltosa, %
Manzana	15.96	1.17	6.04	3.78	trazas
Albaricoque	14.44	1.73	1.28	5.84	
Zarzamora	15.28	2.48	2.15	0.59	0.66
Arándano	15.89	3.76	3.82	0.19	0.08
Pasa	15.68	3.33	3.68	0.95	0.64
Grosella	14.81	3.29	3.90	1.21	
Uva (<i>Vitis labruscana</i>)	19.13	6.86	7.84	2.25	1.58
Uva (<i>Vitis vinifera</i>)	17.97	5.35	5.33	1.32	2.19
Melocotón	12.79	0.91	1.18	6.92	0.12
Pera	13.58	0.95	6.77	1.61	0.31
Ciruela	17.97	3.49	1.53	4.94	0.15
Frambuesa (roja)	20.67	2.40	1.58	3.68	
Frambuesa (negra)	28.22	4.56	4.84	1.90	
Cereza (agria)	15.05	4.30	3.28	0.40	
Cereza (dulce)	22.39	6.49	7.38	0.22	
Fresa	9.45	2.09	2.40	1.03	0.07
Remolacha	11.19	0.18	0.16	6.11	
Zanahoria	12.00	0.85	0.85	4.24	
Pepino	3.46	0.86	0.86	0.06	
Lechuga	4.97	0.25	0.46	0.10	
Melón	12.74	2.56	2.62	5.86	
Ruibarbo	6.20	0.42	0.39	0.09	
Tomate	5.23	1.12	1.34	0.01	

La glucosa puede existir en cualquiera de las tres formas cristalinas en las que está presente como anillo de piranosa: α -D glucosa anhidra; α -D glucosa monohidrato y β -D glucosa anhidra. Las propiedades físicas de esas tres formas son diferentes y se muestran en la Tabla 2.4. En disolución, la mutarrotación ocurre para dar una mezcla de equilibrio que a 25°C contiene cerca del 62% de la forma β .

TABLA 2.4
PROPIEDADES FISICAS DE D-GLUCOSA Y D-FRUCTOSA

Propiedad	α -D-Glucosa	α -D-Glucosa monohidrato	β -D-Glucosa	β -D-Fructosa
Peso molecular	180.16	198.16	180.16	180.16
Punto de fusión, °C	146	83	150	104
Solubilidad a 25°C ^a (% en peso)	62(51.2)	30.2(51.2)	72(51.2)	(80)
Rotación específica ^a (α_D^{20})	112.2*(52.70)	112.2*(52.70)	18.7*(52.70)	-135*(-92)
Calor de disolución a 25°C (cal/g)	-14.2	25.2	-6.2	

^a Los valores entre paréntesis son después de la mutarrotación.

La fructosa cristaliza como la forma primera piranosa de β -D fructosa pero en solución mutarota y la mezcla de equilibrio contiene también el 30% de la forma furanosa a 25°C.

El almidón, después de la celulosa, es la principal sustancia de tipo glucídico sintetizada por los vegetales superiores a partir de la energía solar, y es el constituyente fundamental de los cereales, pero también se encuentra en algunos tubérculos y leguminosas. En la Tabla 2.5 se indican las composiciones en almidón de algunas de estas especies, (Mercier (1982) y Vian (1976)). El almidón está presente en cereales, tubérculos y leguminosas en forma de pequeños gránulos dispersos en la matriz proteica de la célula. Estos gránulos cuando se extraen de la planta tienen el aspecto de un polvo blanco, insoluble en agua fría y poseen una estructura física organizada en zonas amorfas y cristalinas, debido a la asociación intermolecular de los dos principales constituyentes del almidón, amilosa y amilopectina.

TABLA 2.5
 CONTENIDO EN ALMIDÓN DE ALGUNOS CEREALES, TUBERCULOS Y LEGUMINOSAS,
 MERCIER (1982) Y VIAN (1976).

Tubérculos	Almidón % M.S.	Leguminosas	Almidón % M.S.	Cereales	Almidón % M.S.
Patata	65-85	Judías	30-35	Avena	63-67
Ñame	68-83	Lentejas	55-68	Trigo	67-69
Mandioca	85-87	Guisantes	38-43	Maíz	71-74
Boniato	69-72	Habas	30-43	Arroz	75-88
				Cebada	65-68

La amilosa está constituida por una cadena lineal formada por unidades de glucosa anhidra unidas por enlaces $\alpha(1-4)$; representa entre el 15% y el 25% de los hidratos de carbono totales en los cereales y en los tubérculos y su grado de polimerización está comprendido entre 200 y 6000. En cambio, la amilopectina es una macromolécula ramificada en la que las unidades de glucosa anhidra están ligadas por enlaces $\alpha(1,4)$ cuando forman parte de cadenas lineales y por $\alpha(1,6)$ si actúan como nexo de unión entre dos cadenas para formar ramificaciones (los enlaces $\alpha(1,6)$ representan entre el 5% y el 10% de los enlaces totales, aproximadamente una ramificación $\alpha(1,6)$ cada 20-30 unidades de monómero en el polímero principal). Esta sustancia tiene un peso molecular mucho más alto que la amilosa, ya que su grado de polimerización está comprendido entre 10^5 y 10^9 . En la Figura 2.1 se indica la estructura de estas macromoléculas.

Enzimas utilizadas en la hidrólisis enzimática del almidón.

Si tenemos en cuenta la estructura del almidón, para realizar la hidrólisis enzimática de éste, se comprende que es necesario utilizar enzimas específicas para los enlaces $\alpha(1-4)$, $\alpha(1-6)$ y/o $\alpha(1-4)$ y $\alpha(1-6)$. Dentro de las enzimas específicas del enlace $\alpha(1-4)$, las más importantes son las amilasas (α -amilasas y

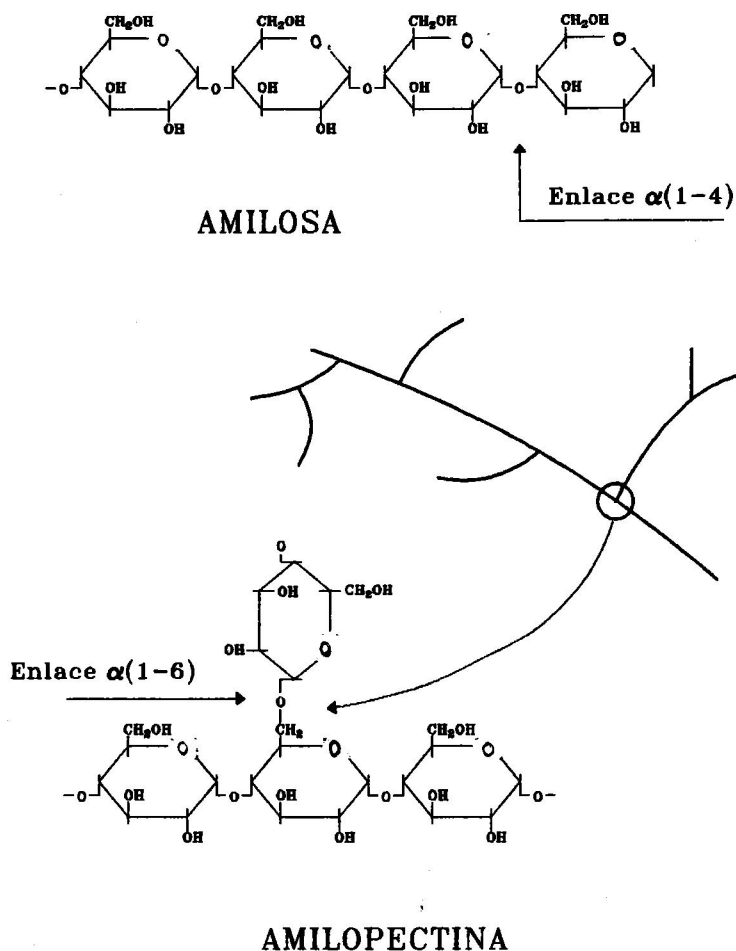


Figura 2.1. Estructura de amilosa y amilopectina.

β -amilasas). La α -amilasa se caracteriza por hidrolizar al azar las cadenas de amilosa y amilopectina, produciendo en el primer caso maltosa y glucosa y en el segundo, además de las sustancias anteriores, cadenas más o menos ramificadas (dextrinas), ya que estas enzimas no hidrolizan los enlaces $\alpha(1-6)$. Las α -amilasas atacan las cadenas de almidón al azar y pueden clasificarse, por tanto, como endoenzimas.

Estas endoenzimas, que producen dextrinas, son las más utilizadas en la Industria Alimentaria y conducen a unos oligosacáridos (2 a 7 unidades de glucosa) ramificados o lineales, conocidos comercialmente como maltodextrinas o jarabes de glucosa. El grado de dextrinificación o hidrólisis se suele expresar

mediante el concepto de dextrosa equivalente (D.E.) que corresponde al número de grupos reductores liberados/100 g de materia seca. Así, en la práctica, el término jarabe de dextrinas se aplica a los productos con D.E. comprendida entre 3 y 20 y jarabe de glucosa cuando D.E. > 20.

Las β -amilasas son exoenzimas que atacan a las cadenas de almidón por sus extremos no reductores liberando maltosa; la acción de esta enzima se bloquea cuando encuentra un enlace $\alpha(1-6)$ y son bastante menos utilizadas que las α -amilasas. Se obtienen a partir de *B. polymixa*, *B. megaterium*, *B. cereus* y ciertas especies de *Streptomyces* y *Pseudomonas*, Mercier (1982).

En el grupo de las enzimas específicas del enlace $\alpha(1-6)$ se encuentran la pullulanasa y la isoamilasa. La primera de ellas, descubierta en 1961 en cultivos de *Enterobacter aerogenes*, *Echeriquia intermedia*, *Streptococcus mitis* y ciertas especies de *Streptomyces*, hidroliza fácilmente la amilopectina del almidón, pero sin embargo no puede romper un enlace $\alpha(1-6)$ que una un solo residuo anhidro-glucosado en una cadena de residuos unidos por enlaces $\alpha(1-4)$, lo que explica que su sustrato más pequeño sea la 6-maltosil-maltosa.

La isoamilasa es una enzima complementaria de la pululanasa que se obtiene de cultivos de *Pseudomonas* y *Cytophaga*. Es específica para los enlaces $\alpha(1-6)$, y su sustrato más pequeño es la 6-d-D-maltotriosil-maltosa. Tanto la pululanasa como la isoamilasa, o ambas, completan la acción de las α y β -amilasas cuando actúan sobre el almidón solubilizado; este hecho hace que se haya intentado utilizarlas para la producción industrial de maltosa y/o jarabes ricos en maltosa, ya que liberan como mínimo maltosa y maltotriosa, respectivamente, Mercier (1982) y Ducroo (1982).

Las enzimas que atacan tanto a los enlaces $\alpha(1-4)$ como los $\alpha(1-6)$ son las amiloglucosidasas o glucoamilasas. Proviene de microorganismos del género *Rhizopus* y *Aspegillus*, y se caracterizan por hidrolizar la amilosa y la amilopectina liberando D-glucosa, Mercier (1982) y Ducroo (1982). Estas enzimas se unen más fácilmente a las cadenas largas que a las cortas e hidrolizan antes los enlaces $\alpha(1-4)$ que los enlaces $\alpha(1-6)$. Sin embargo, industrialmente es aconsejable un tratamiento previo con α -amilasas para solubilizar el almidón a dextrinas y, por tanto, que las glucoamilasas puedan catalizar la hidrólisis posterior en fase homogénea o inmovilizadas. En la Tabla 2.6 se indica el origen y algunas de las condiciones de operación óptimas para las enzimas utilizadas en la hidrólisis enzimática del almidón.

TABLA 2.6
 CARACTERISTICAS MAS IMPORTANTES DE LAS ENZIMAS UTILIZADAS EN LA
 HIDROLISIS DEL ALMIDON, MERCIER (1982)

Enzima	Origen	pH	Tipo de enlace	Tipo de ataque	Productos terminales	
					Amilosa	Amilopectina
α -amilasa E.C.3.2.1.1	A. oryzae B. subtilis B. licheniformis	6.0 6.5	$\alpha(1-4)$	endo	glucosa maltosa	dextrinas
β -amilasa E.C.3.2.1.2	Microbiano	5.0 7.5	$\alpha(1-4)$	exo	maltosa glucosa	maltosa dextrinas
Pululanasa E.C.3.2.1.41	Microbiano	6.0	$\alpha(1-6)$	endo	ninguno	cadena lineales
Isoamilasa E.C.3.2.1.68	Microbiano	3.5	$\alpha(1-6)$	endo	ninguno	cadena lineales
Amiloglucosidasa E.C.3.2.1.3	Microbiano (Rhizopus y Aspergillus)	4.5	$\alpha(1-4)$ $\alpha(1-6)$	exo	glucosa	glucosa
Isomerasa E.C.3.5.1.5	B. coagulans S. violaceo niger	8.2	isomerización		glucosa y	fructosa

La glucosa comercial es producida, generalmente por la hidrólisis del almidón utilizando ácidos, enzimas o ambos; la fructosa se obtiene a partir de la hidrólisis de sacarosa; a partir de la glucosa, por isomerización alcalina o enzimática y también por hidrólisis de la inulina. Los jarabes de glucosa, maltosa, fructosa y oligosacáridos de mayor peso molecular se obtienen por hidrólisis del almidón y son ampliamente utilizados en la industria de alimentos. A continuación se desarrollan los principales procesos industriales para la obtención de estos edulcorantes.

2.1.1 Producción de jarabes de glucosa.

En teoría es posible hidrolizar completamente el almidón para producir sólo glucosa, pero en la práctica debido a las propiedades y estructura de la amilosa y amilopectina del almidón, las altas temperaturas que requiere el proceso y la reactividad de la glucosa producida, el máximo DE conseguido en los procesos industriales no alcanza a DE = 97, y aun más bajo cuando se utilizan ácidos para iniciar la hidrólisis.

El proceso convencional para la obtención de monohidrato de glucosa es el esquematizado en la Figura 2.2, Bucke (1979). Un "slurry" de almidón obtenido por molturación húmeda y que contiene un 30-40% de sólidos se acidifica en un reactor a presión hasta un pH = 1.8 y se mantiene a 160°C, siendo el tiempo de residencia lo que determina la conversión. El hidrolizado de almidón obtenido del reactor es un líquido turbio amarillento que es neutralizado hasta pH = 4.5 (punto isoelectrico del conjunto de proteínas presentes). Las proteínas precipitadas son filtradas y/o centrifugadas para quitarlas del medio, así como los granos contenidos en el almidón; las trazas de color se eliminan con carbón activo o resinas de intercambio iónico. El jarabe se concentra hasta un 80% en sólidos siendo el producto final un jarabe muy viscoso y sin color; a partir de este jarabe, una vez enfriado a 40-45°C y por cristalización durante 4-5 días se obtiene el monohidrato de glucosa, Figura 2.2.

Los jarabes obtenidos por hidrólisis ácida no superan el contenido de DE de 55, presentan un color elevado y sabor picante. Por otra parte, la acción catalítica no específica del ataque ácido produce además hidrolizados de un amplio rango de pesos moleculares, Tabla 2.7, existen pérdidas de glucosa y como consecuencia de la neutralización posterior el jarabe queda con un gran contenido en sales que hay que eliminar.

TABLA 2.7
AZUCARES PRODUCIDOS EN HIDROLISIS ACIDA

Componente	Dextrosa equivalente			
	Muy bajo (25)	Bajo (35)	Regular (42)	Alta (55)
Glucosa	7	14	21	32
Maltosa	8	12	15	19
Maltotriosa	11	11	10	13
Azúcares pesados y dextrinas	74	63	54	36

Para obtener jarabes con un contenido más elevado en DE de 93-94, es preciso añadir la enzima amiloglicosidasa después de haber conseguido un contenido en DE de 15 con el ataque ácido, Figura 2.2.

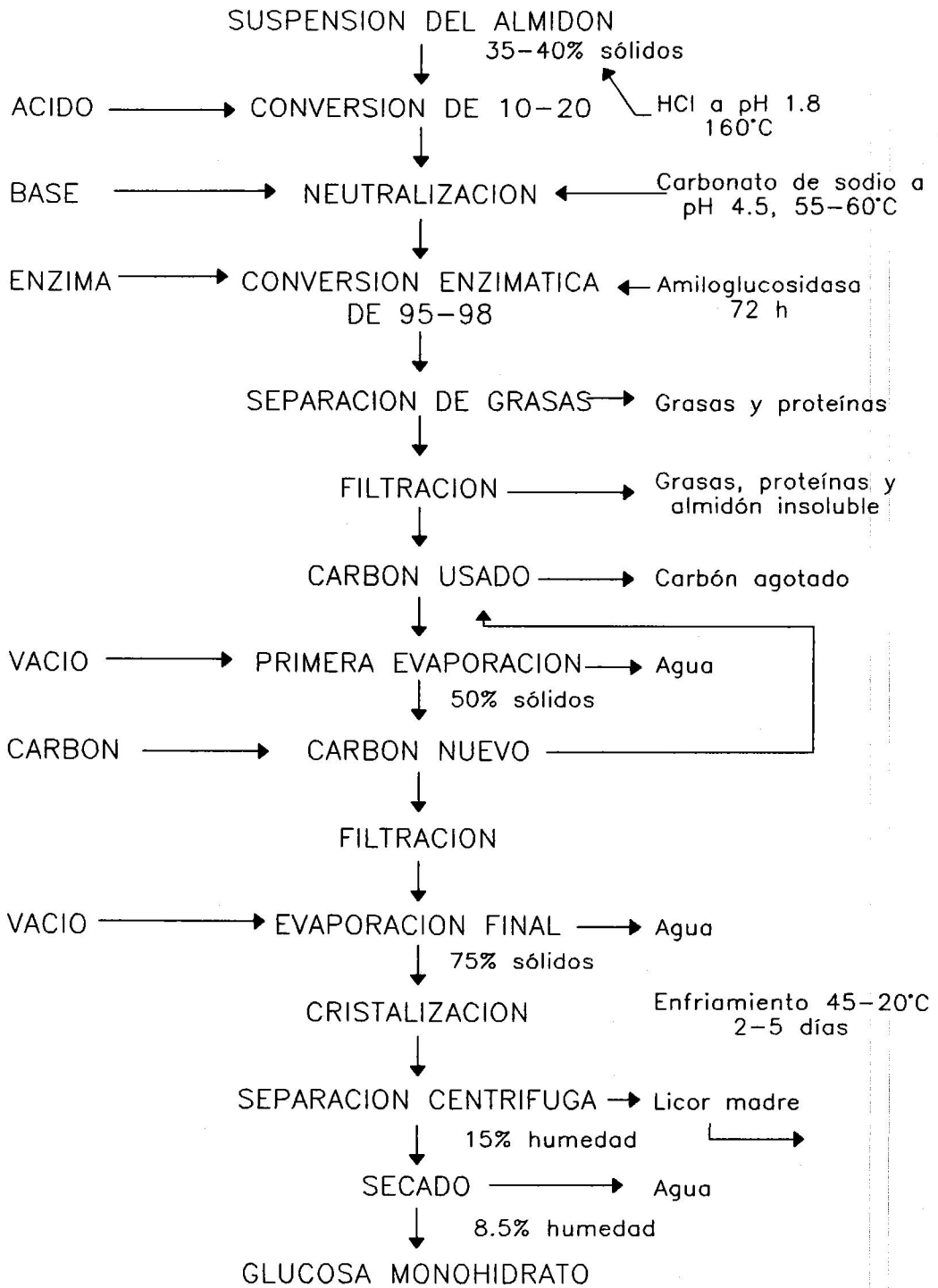


Figura 2.2. Obtención de glucosa.

Otro proceso industrial ampliamente utilizado para la obtención de jarabes de glucosa se esquematiza en la Figura 2.3, Joglekar et al. (1979), Bucke (1979), Reilly (1985), Slott (1974), la hidrólisis del almidón para obtener jarabe de glucosa, D.E. > 20, se lleva a cabo en dos etapas; en la primera de ellas se realiza la solubilización parcial del almidón por efecto combinado de la temperatura (gelatinización a 85 - 140 °C) y de la α -amilasa termoestable del *B. licheniformis*, que conduce a la formación de maltodextrinas (licuación). La segunda etapa es la llamada sacarificación, en la cual, las amiloglicosidasas (por ejemplo el *Aspergillus niger*) transforman dextrinas y maltosa en glucosa.

La primera etapa puede realizarse sobre una suspensión de almidón (30 - 45% en peso) en tanques agitados a pH 6-7. El efecto combinado de la temperatura y la enzima admite varias alternativas. La temperatura necesaria para una gelatinización total depende de la fuente de almidón, aunque se suelen utilizar técnicas de alta temperatura y poco tiempo (HTST, high temperature short time); así, por ejemplo, para el almidón procedente de grano la temperatura empleada es de 105-110°C. La viscosidad del almidón gelatinizado es muy alta, por lo que es necesario añadir un agente de aclarado que hidrolice parcialmente el almidón, reduzca la velocidad y prevenga la precipitación (retrogradación) del almidón después del enfriamiento.

La utilización de una α -amilasa como agente de aclarado reduce la formación de productos indeseables y el nivel de sales se puede mantener bajo; sin embargo, presenta el inconveniente de su estabilidad limitada frente a la temperatura, ya que son estables hasta 85°C y a más de 95°C durante tiempos cortos de reacción y en presencia de Ca^{2+} como agente estabilizador; estas temperaturas y estos tiempos de reacción no permiten la gelatinización completa de los tipos de almidón comúnmente utilizados. Este problema puede resolverse con un tratamiento de calor subsiguiente a 120-140°C y, posiblemente, una adición posterior de α -amilasa para hidrolizar el almidón gelatinizado en este último tratamiento calorífico. Los procesos de este tipo son los más habitualmente utilizados en la licuación enzimática del almidón.

La segunda etapa, sacarificación, se puede realizar en fase homogénea o, lo que es más frecuente, mediante glucoamilasa inmovilizada y en continuo, ya que mediante esta técnica se consiguen disminuir las reacciones de reversión de la glucosa a di y oligosacáridos, permite tratar grandes cantidades de sustrato con la misma enzima y se disminuye el volumen de la instalación, Vallat et al. (1986).

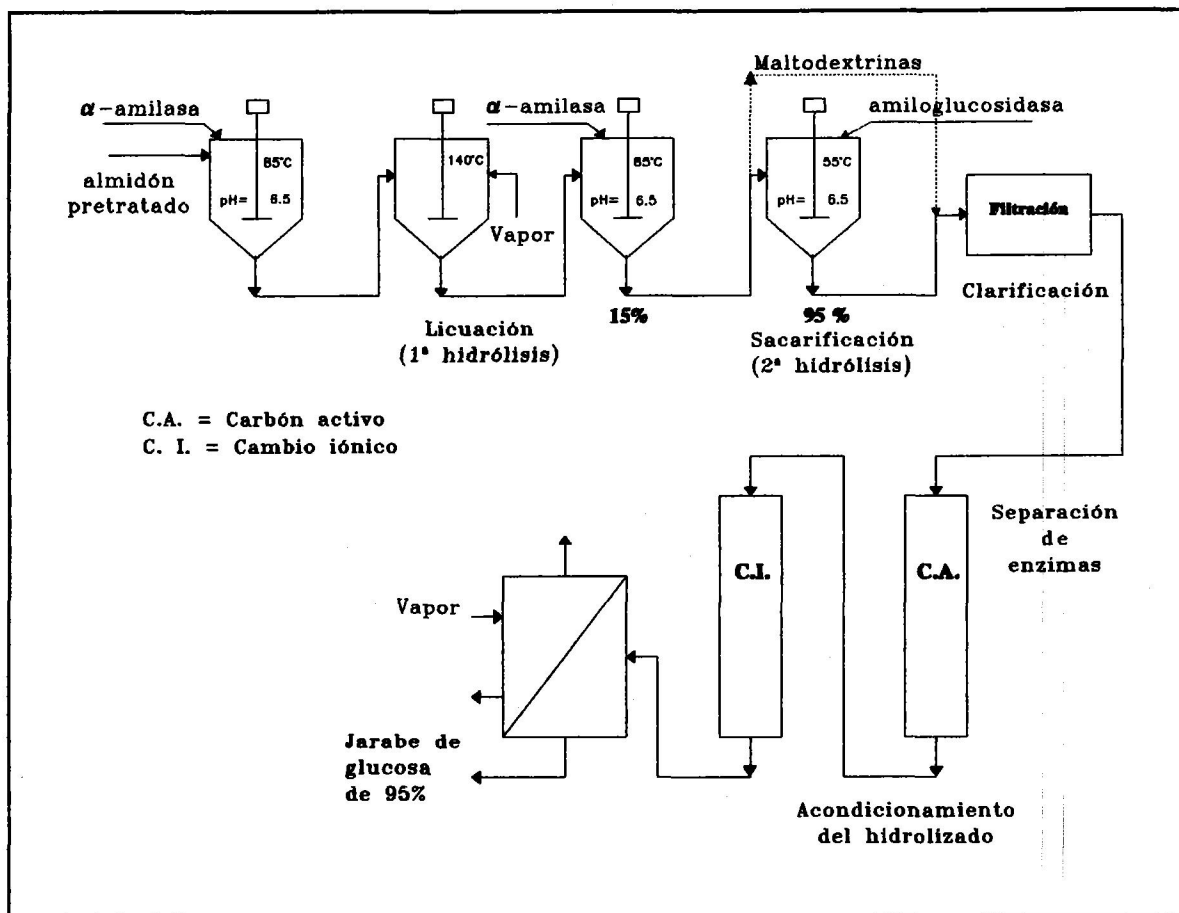


Figura 2.3. Producción de jarabe de glucosa.

Un tercer tipo de jarabes puede ser producido, los jarabes de maltosa donde éste azúcar es el principal componente. Estos jarabes son obtenidos sustituyendo la α -amilasa bacteriana por la α -amilasa fúngica en combinación con la β -amilasa y amiloglicosidasa, también se utiliza la enzima pullulanasa (enzima desramificadora) para acelerar el proceso. Estos jarabes intermedios tienen viscosidades intermedias y combinando esas enzimas puede obtenerse hidrolizados de muy diferentes composiciones, Tabla 2.8.

TABLA 2.8
ACCION DESRAMIFICADORA DE LA PULLULANASA

Pullulanasa	B-Amilasa	Glucosa	G-2	G-3	G-4+	DE
0	25	0.6	60.0	11.8	27.6	42.3
0	50	2.7	61.5	11.9	23.9	45.5
0	100	3.2	63.5	12.8	21.0	47.3
0	200	3.6	66.5	12.0	17.9	49.4
50	25	0.9	70.0	13.7	15.4	48.6
50	50	2.9	70.4	13.6	13.1	49.9
50	100	3.5	71.9	14.6	10.0	51.7
50	200	2.7	73.1	14.2	9.7	52.5
100	25	1.7	71.5	15.5	11.3	49.7
100	50	1.4	72.8	16.3	9.5	51.4
100	100	2.5	72.2	16.6	8.7	52.2
100	200	4.2	73.4	15.0	7.4	53.4
200	25	0.5	74.0	15.9	9.6	50.5
200	50	2.3	72.4	16.4	8.9	51.8
200	100	1.6	76.0	15.3	7.1	52.8
200	200	1.6	76.4	16.4	5.6	53.6

2.1.2 Producción de jarabes de fructosa.

La obtención de jarabes de alto contenido en fructosa, HFCS, se obtiene fundamentalmente por isomerización de glucosa a fructosa mediante la enzima glucosa isomerasa E.C.5.3.1.5.

Este proceso es interesante en cuanto que la fructosa tiene un poder edulcorante más elevado que la glucosa y sacarosa, Tabla 2.9. Este hecho hace que para un mismo poder edulcorante el contenido energético sea más pequeño, propiedad que es aprovechable en la preparación de alimentos dietéticos con bajo contenido en calorías. Además, la fructosa se absorbe en el intestino más lentamente que la glucosa y es metabolizada sin intervención de la insulina, por lo que se utiliza en la preparación de alimentos para diabéticos. Por otra parte, el elevado poder higroscópico de la mezcla glucosa-fructosa hace que sea útil en panadería y confitería para prevenir posibles procesos no deseados de cristalización o desecación.

TABLA 2.9
PODER EDULCORANTE RELATIVO DE ALGUNOS AZUCARES

Azúcar	Poder edulcorante
Sacarosa	1.0
Glucosa (dextrosa)	0.7
Fructosa	1.5
Maltosa	0.3
Jarabe de glucosa(D.E.=60%)	0.6
Jarabe de glucosa(D.E.=37%)	0.4

Los jarabes de glucosa y fructosa son de color blanco claro y de viscosidad relativamente baja, y se utilizan, además de en las industrias ya mencionadas, en la fabricación de bebidas refrescantes; en este sentido, se estima que en 1985 hubo una demanda del orden de los 3.9 MM de toneladas de las cuales gran parte fueron consumidas por las multinacionales del sector.

La isomerización de glucosa a fructosa se realiza en continuo, ya que se trata de un sustrato líquido (jarabe de glucosa) y la enzima se puede inmovilizar, Grueger *et al.* (1984) y Havewala *et al.* (1974), sobre un soporte y utilizar a éste como relleno en una columna por la que se hace circular la fase líquida.

El proceso de isomerización consta de las etapas esquematizadas en la Figura 2.4

- Preparación de la alimentación.
- Isomerización.
- Filtración.
- Acondicionamiento del producto.
- Evaporación.

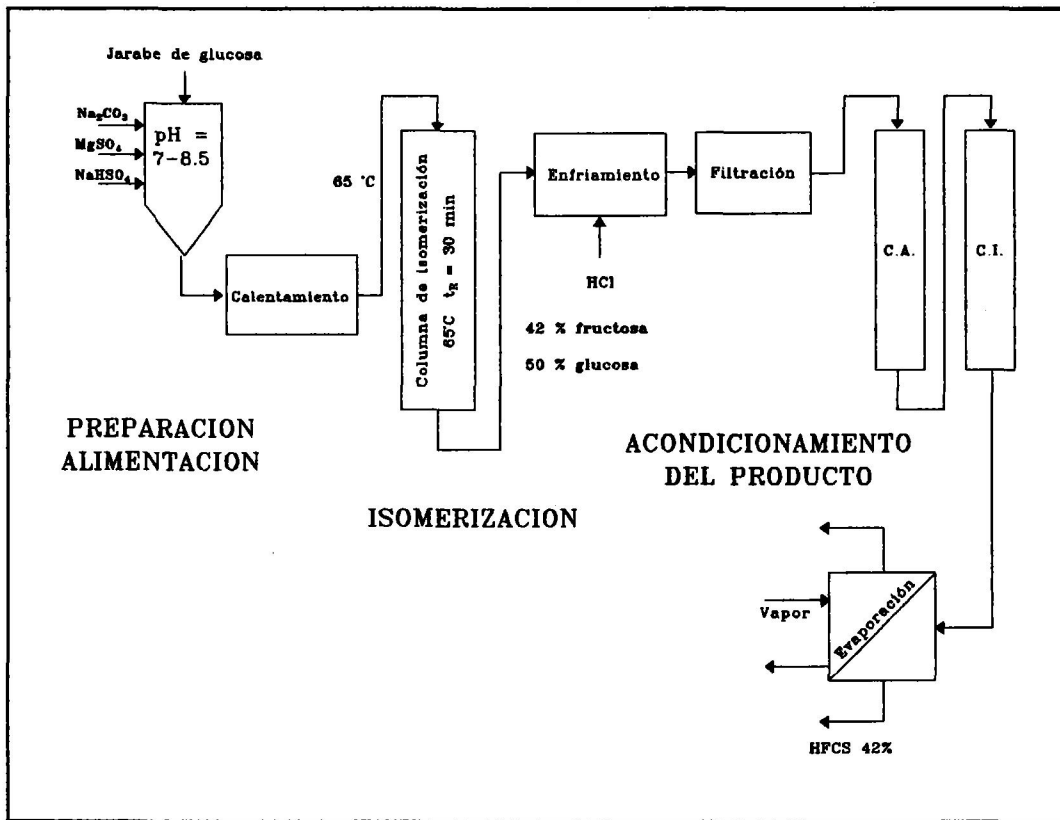


Figura 2.4. Producción de jarabe de fructosa.

E 1

jarabe de glucosa obtenido en las etapas de licuación y sacarificación se acondiciona ajustando su pH con Na_2CO_3 entre 7 y 8,5 y añadiendo sulfato de magnesio y bisulfito sódico necesarios para estabilizar la enzima glucosa isomerasa inmovilizada. La reacción de isomerización se realiza a 65°C y el tiempo de residencia es de 30 minutos. El producto obtenido, 42% fructosa y 50% glucosa, conocido como HFCS (high fructose corn syrup, debido a su contenido en fructosa y a la utilización del maíz como materia prima) se acondiciona mediante filtración y la utilización de dos columnas una de carbón activo y otra de intercambio iónico para eliminar las enzimas y sales indeseables. Finalmente el jarabe obtenido se concentra hasta el 71% en sólidos obteniéndose jarabes con un 42% en fructosa.

Por otra parte el jarabe de fructosa 42%, antes de la evaporación puede separarse en 2 corrientes tal como se muestra en la Figura 2.4, una de ellas se pasa a través de una columna revestida de gel de ácido bórico donde se adsorben las moléculas de glucosa y la fructosa pasa a su través. Mezclando la corriente inicial de HFCS del 42% con la de un contenido aproximado del 90% en HFCS y con evaporación se consiguen obtener jarabes de distintas proporciones de HFCS.

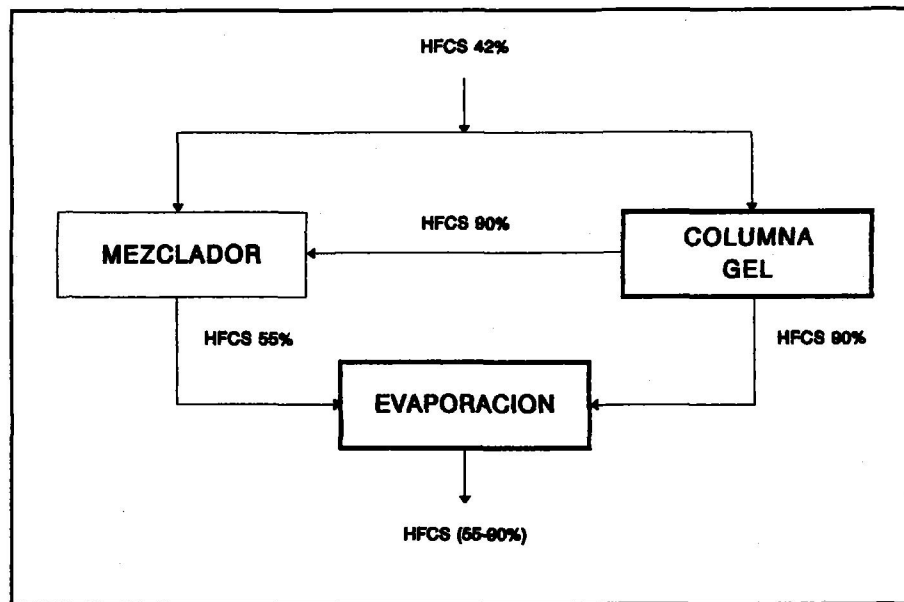
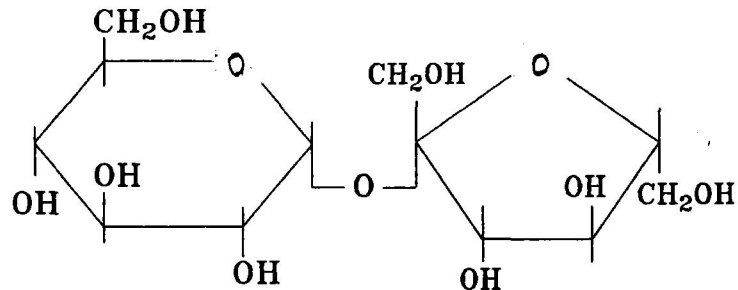


Figura 2.5. Almacenamiento de fructosa.

Las técnicas de concentración de HFCS son caras, ya que usualmente es una separación por cromatografía. Por ello se están ensayando métodos alternativos para llevar a cabo la isomerización; entre los más utilizados está elevar la temperatura de reacción a 100°C (con lo que se disminuye considerablemente la vida media de la enzima) y utilizar medios no acuosos, por ejemplo etanol, Visuri y Klivanov (1987).

También se pueden obtener jarabes de glucosa-fructosa mediante la inversión de la sacarosa en glucosa y fructosa, Figura 2.5, se lleva a cabo mediante una enzima llamada invertasa, E.C. 3.2.1.26, obtenida por fermentación de *Saccharomices*, *Aspergillus*, etc. El proceso se realiza en continuo, ya que estas enzimas se utilizan inmovilizadas en reactores de lecho fijo o fluidizado, a pH = 5.0 y temperaturas de 50-55°C. Las etapas del proceso son análogas a las indicadas en la isomerización de glucosa, aunque como es lógico cambian las condiciones de operación, Predhome (1984), Thibanet (1984), Mousan et al. (1984) y López (1982).

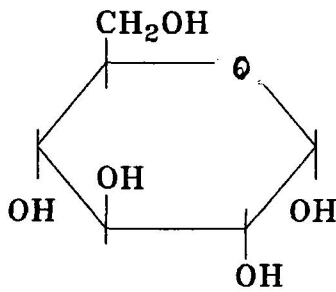
Todas las plantas de la familia compuestas producen y almacenan fructosa en forma de inulina. Los tubérculos de aguaturma (Breen 1964) y achicoria (Chubey y Dorrel 1977) han sido utilizados para la producción de fructosa y son probablemente las fuentes alternativas para la producción de fructosa y jarabes con alto contenido en fructosa en áreas templadas. En la Figura 2.6 se muestra un diagrama



SACAROSA

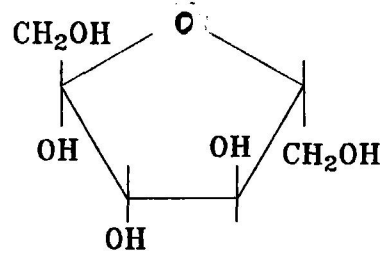


Invertasa
(E.C.3.2.1.26)



GLUCOSA

+



FRUCTOSA

Figura 2.6. Inversión de la sacarosa.

de flujo para la obtención de fructosa a partir de raíces de aguaturma propuesto por Breen (1964). El producto final obtenido puede contener un 10-20% de glucosa.

2.2 Glucosa isomerasa.

La enzima glucosa isomerasa, EC 5.3.1.5, es la D-xylosa ketol-isomerasa ó xylosa isomerasa, puede producirse a partir de varios microorganismos que están indicados en la Tabla 2.10

La estructura de ésta enzima ha sido estudiada por Berman et al. (1974) que realizaron un estudio cristalográfico con Rayos X determinando que la D-xylosa isomerasa presentaba dos formas cristalizadas como prismas hexagonales: una forma A de densidad 1.21 g/cm^3 y unas dimensiones $a= 93.9$; $b= 99.4$ y $c= 102.7 \text{ \AA}$, mientras que la forma B tenía una densidad de 1.27 g/cm^3 y sus dimensiones características $a= 94.5$; $b= 98.9$ y $c= 87,0$. Proponen una estructura formada por dos moléculas tetraméricas con cuatro subunidades idénticas cada una. Este resultado está de acuerdo con lo obtenido por electroforesis de esta enzima.

Hogue Angeletti (1975) analiza la composición de aminoácidos de la enzima determinando su peso molecular 165.000. En una solución de guanidina clorhídrica 6 M la enzima se disocia en dos subunidades de 43.000 y 40.000 de peso molecular, lo que sugiere también una estructura tetramérica para la proteína, compuesta de cuatro cadenas de polipéptidos de casi igual peso molecular.

2.2.1 Producción de glucosa isomerasa.

La producción de glucosa isomerasa a partir de distintos microorganismos requiere, generalmente la presencia de xylosa o xylano, así Kent y Emery (1973) obtienen glucosa isomerasa a partir de *Lactobacillus brevis* encontrando que se incrementa el rendimiento obtenido en la producción de ésta enzima utilizando una estirpe modificada NCDO-474 de este bacilo y un medio de cultivo conteniendo 2% de xylosa; 0.5% de glucosa; 5% de peptona bacteriológica; 3% de extracto de levaduras; 1% de acetato sódico; 0.04% de $\text{MnSO}_4 \cdot 4 \text{ H}_2\text{O}$; 0.01% de $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O}$ y 0.01% de $\text{Cl}_2\text{Co} \cdot 6 \text{ H}_2\text{O}$, el crecimiento era efectuado a 30°C y una agitación suave. Sin

TABLA 2.10
MICROORGANISMOS PRODUCTORES DE GLUCOSA ISOMERASA

Microorganismo	Referencia
<i>Pseudomonas hydrophila</i>	Marshall y Kooi (1957)
<i>Aerobacter aerogenes</i>	Natake y Yoshimura (1963)
<i>Aerobacter cloacae</i>	Tsumira y Sato (1965)
<i>Bacillus coagulans</i>	Danno (1971)
<i>Bacillus megaterium</i>	Takasaki y Tanabe (1964)
<i>Escherichia intermedia</i>	Natake (1966)
<i>Brevibacterium pentoaminoacidum</i>	Ichimura et al. (1965)
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	Yamanaka (1963)
<i>Micrococcus sp.</i>	Yamanaka (1965)
<i>Paracolobacterium aerogenoides</i>	Takasaki y Tanabe (1967)
<i>Lactobacillus brevis</i>	Kent y Emery (1973)
<i>Streptomyces albus</i>	Takasaki et al. (1969)
<i>Streptomyces phaeochromogenus</i>	Tsumira y Sato (1965)
<i>Streptomyces bambengiensis</i>	Vasic-Racki et al. (1991)
<i>Streptomyces olivochromogenes</i>	Volkin y Klibanov (1988)
<i>Streptomyces rubiginosus</i>	Visuri y Klibanov (1986)
<i>Streptomyces wedmorensis</i>	Shing y Ho (1984)
<i>Actinophaes missouriensis</i>	Visuri y Klibanov (1986)

embargo la utilización de xylosa o xylano para la producción industrial de la enzima puede ser económicamente inviable.

Especies de *Streptomyces* producen la enzima en medios conteniendo xylano o materiales que lo contengan tal como el salvado de trigo, cortezas de cereales etc. Buki et al. (1976) con distintas especies de *Streptomyces*: *albus*, *gracilis*, *matensis*, *niveus*, y *platensis* obtienen glucosa isomerasa en un medio conteniendo en (g/l): salvado de trigo 30; cereales macerados líquidos 40; $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$ 1; $Cl_2Co \cdot 6 H_2O$ 0.24. Después de la inoculación con 1 ml de una suspensión de esporas, el crecimiento se continua 48 horas a 28°C con aireación. Posteriormente otro medio (100 mL) conteniendo 40 g/L de líquido de cereales macerado, 4 g/L de $(NH_4)_2HPO_4$; 4 g/L de sorbitol; 8 g/L de glucosa y 0.24 g de Cl_2Co se inoculaba con 5 mL del cultivo anterior y 1 g de xylosa, agitando durante 40 horas a 28°C se obtiene un filtrado que tiene una actividad de glucosa isomerasa de 40 unidades/mL .

Takasaki (1975) utilizando *Streptomyces albus* indican que el contenido en el medio de cultivo de Cl_2Co incrementa el rendimiento en la producción de glucosa isomerasa pasando a 27.8 unidades/mL en lugar de 20 unidades/mL sin la presencia de este ión. La importancia de la xylosa en el medio de cultivo ha sido también puesta de manifiesto por Takasaki (1976) utilizando el mismo microorganismo anterior en un medio de cultivo conteniendo (w/v) 3% de salvado de trigo; 2% de líquido de cereales macerados; 0.024% de $Cl_2Co \cdot 6 H_2O$ y 0.1% de $MgSO_4$, la adición de 0.5% de xylosa incrementa la actividad de glucosa isomerasa obtenida de 20.8 a 40.5 unidades de glucosa isomerasa/mL.

Lee et al. (1972) descubrieron que microorganismos del género *Arthrobacter* eran capaz de producir glucosa isomerasa en ausencia de xylosa y xylano, en un medio conteniendo 2% de glucosa; 0.01% de $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$, 0.2% KH_2PO_4 ; 0.6% de $(NH_4)_2HPO_4$; 0.15% de extracto de levaduras y 0.5% de proteínas. La patente es propiedad de la compañía R.J Reynolds Tobacco y se comercializa como RJR.

Actualmente la enzima glucosa isomerasa se obtiene industrialmente a partir de distintos microorganismos, en la Tabla 2.11 se recogen distintas enzimas comerciales utilizadas en la obtención de jarabes de fructosa y las compañías que las producen.

TABLA 2.11
ENZIMAS COMERCIALES UTILIZADAS EN
LA PRODUCCION DE JARABES DE FRUCTOSA

Enzima	Microorganismo	Compañía productora
Maxazyme GI	<i>Actinoplanes missouriensis</i>	Gist-Brocade
Sweetzyme A, Q, S	<i>Bacillus coagulans</i>	Novo Industrias
Sweetzyme T	<i>Streptomyces murinus</i>	Novo Industrias
Spezyme IGI	<i>Streptomyces rubiginosus</i>	Finish Sugar
Sweetasa	<i>Streptomyces wedmorensis</i>	Nagasa Biochemical
RJR	<i>Arthrobacter</i>	R.J. Reynolds Tobacco
ICI	<i>Arthrobacter</i>	Imperial Chemical Industries
Spezyme GI	<i>Streptomyces rubiginosus</i>	Genencor International

2.2.2 Condiciones de operación.

El mecanismo de reacción de aldosa a cetosa en la reacción de isomerización puede ser catalizado utilizando tampones borato de pH 8.7, ya que éstos se acomplejan con las cetosas cambiando la posición de equilibrio (Horecker 1974). La presencia de Arsenato también favorece la interconversión de D-glucosa a D-fructosa (Marxhall y Koi 1957).

Muchos autores han puesto de manifiesto que la enzima glucosa isomerasa requiere la presencia de iones Mn^{2+} , Mg^{2+} , y Co^{2+} para su actuación y estabilización, así Lee et al. (1976) utilizando una enzima inmovilizada en vidrio poroso analizan la influencia de la concentración de iones Mg^{2+} , y Co^{2+} sobre la actividad de la enzima Figura 2.7 y Figura 2.8. Estos autores encuentran que el ión Mg causa un considerable incremento de la actividad de la enzima, siendo su concentración óptima 0.1 M. La presencia de Co incrementa la actividad de la enzima por debajo de pH = 6, a pH mayores es despreciable el efecto de este ión. El pH óptimo de actuación de la enzima es 7 y por debajo de 5 no presenta actividad enzimática.

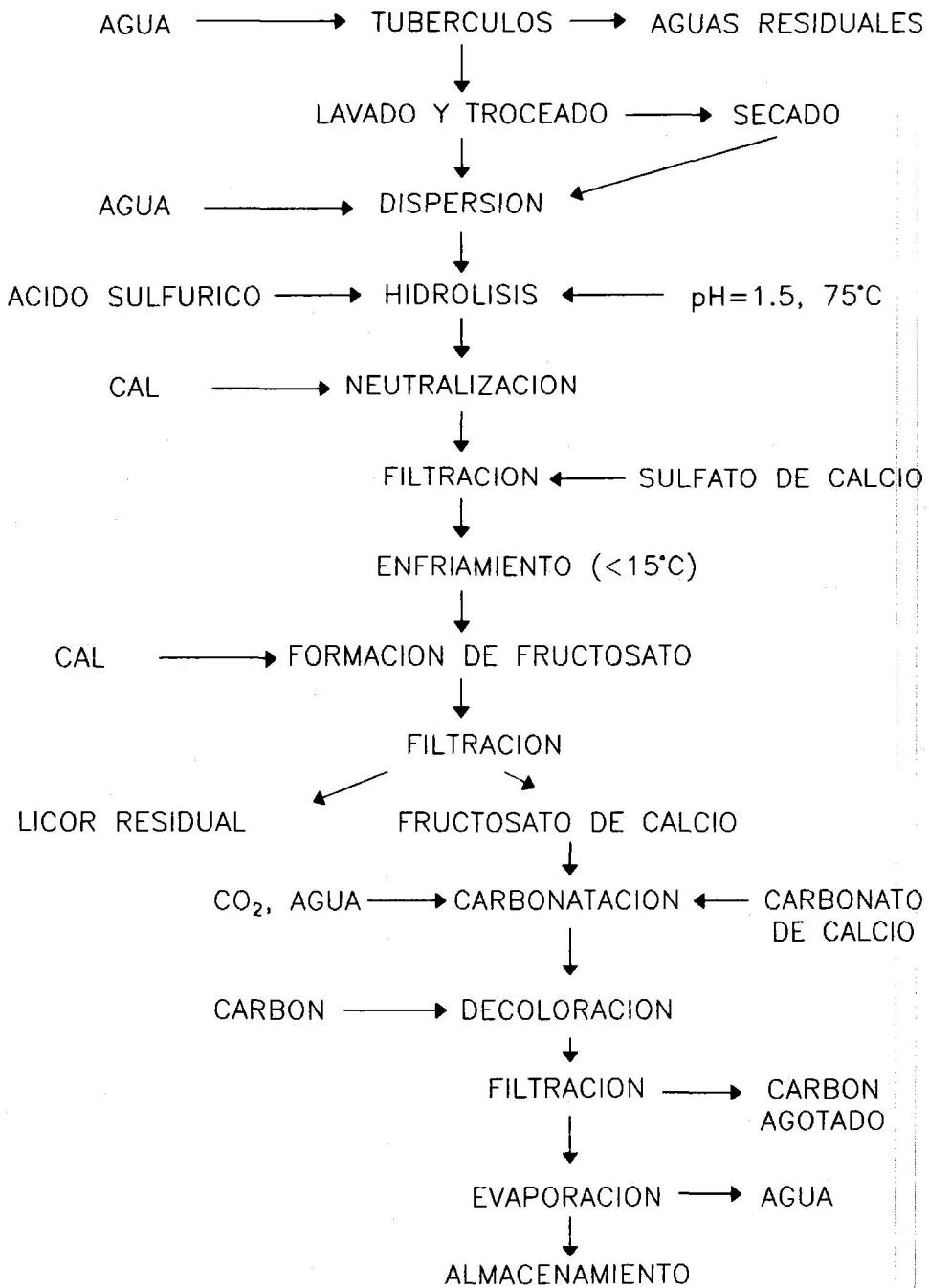


Figura 2.7. Obtención de fructosa a partir de aguaturma.

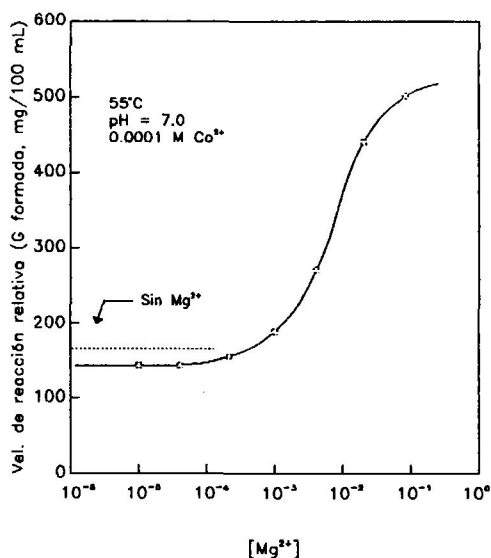


Figura 2.8. Efecto del ion Mg^{2+} sobre la actividad de la glucosa isomerasa. Lee et al. (1976).

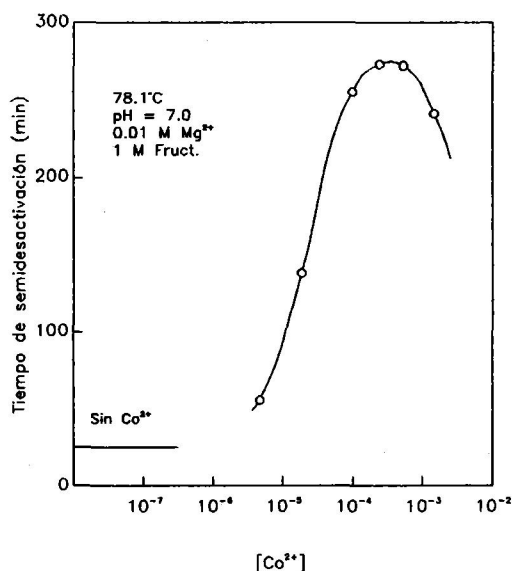


Figura 2.9. Efecto del ión Co^{2+} sobre la estabilidad de glucosa isomerasa, Lee et al. (1976).

La influencia del ión Co^{2+} sobre la estabilidad de la enzima sin embargo, si tiene un efecto acusado tal como se puede observar en la Figura 2.8 ya que incrementa el tiempo de vida media de ésta, estando su concentración óptima comprendida entre $2.5 \cdot 10^{-4}$ y $5 \cdot 10^{-4}$ M.

Por otra parte ésta enzima es inhibida por la presencia de xylitol y metales pesados como Ag^+ , Hg^{2+} y Cu^{2+} . La temperatura óptima de reacción encontrada por Takasaki et al. (1969) para la enzima en forma soluble era de $80^{\circ}C$ y el valor de pH entre 8 y 8.5, aunque era estable en un rango comprendido entre 4.5 y 11.

Zittan et al.. (1975) realizaron un estudio de las condiciones de estabilidad de la enzima sweetzyme de Novo, demostraron que la enzima tenía actividad hasta temperaturas de $90^{\circ}C$, pero en estas condiciones su estabilidad era baja, la temperatura óptima para su utilización industrial era de $65^{\circ}C$ no debiendo ser bajada de $60^{\circ}C$, para evitar la contaminación microbiana. El pH óptimo estaba comprendido entre 8 y 8.5, pero conserva el 70% de su actividad a pH 6. Cuando se utiliza a pH mayores de 8, puede omitirse

la presencia de iones Co, en estas condiciones mantiene el 52% de su actividad después de 450 horas de actuación en funcionamiento continuo. Si el pH de la reacción es 7.6, retiene el 41% de la actividad en presencia de Co, sin éste ión la actividad era del 28%. Respecto a los iones magnesio encuentran un comportamiento análogo al del Co. Los iones Ca y la presencia de oxígeno inhibían la actuación de la enzima.

La enzima maxazyme suministrada por Gist Brocades de Holanda, enzima proveniente de *Actinoplanes missouriensis*, presenta una vida media de 500 horas de actuación a 65°C pH 7.7 y una concentración de 3 mM de Mg²⁺. La enzima es inhibida fuertemente por la presencia de iones níquel, zinc y cobre.

Volkin y Klivanov (1988) realizaron un estudio de la estabilidad de la enzima glucosa isomerasa libre e inmovilizada a un pH de 8 y distintas condiciones de operación, demostraron que la estabilidad de la enzima inmovilizada aumentaba de forma considerable con respecto a la enzima libre. La temperatura de reacción óptima para la enzima inmovilizada era de 88°C aproximadamente, siendo la velocidad de reacción nula a la temperatura de 100°C, Figura 2.10.

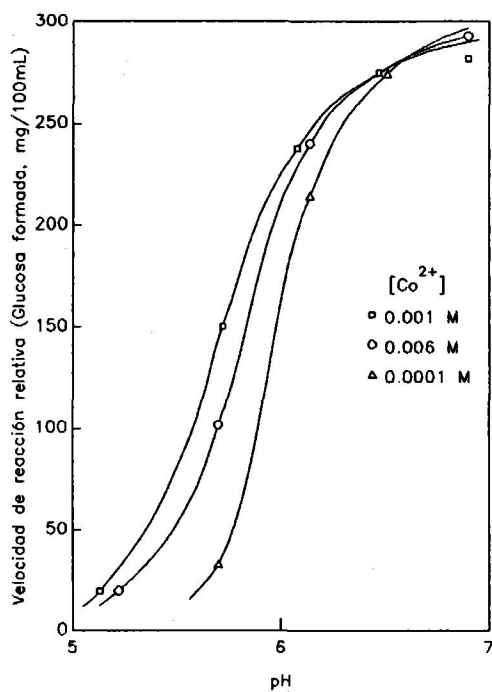


Figura 2.10. Efecto del ion cobalto sobre la actividad, Lee et al. (1976)

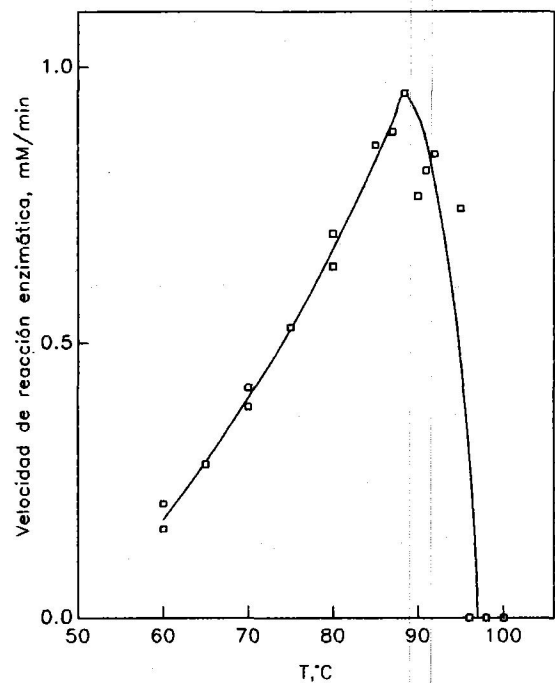


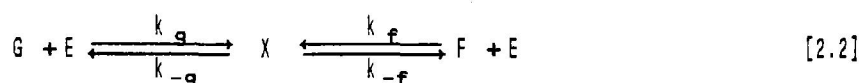
Figura 2.11. Influencia de la temperatura sobre la velocidad de reacción, Volkin y Klivanov (1988).

2.2.3 Mecanismo de reacción.

La isomerización enzimática glucosa-fructosa



es una reacción reversible que, de acuerdo con los conocimientos actuales, transcurre por el siguiente mecanismo



Dado que su constante de equilibrio es próxima a la unidad en el intervalo utilizado generalmente, los estudios cinéticos se realizan frecuentemente en ambos sentidos por lo que para uniformizar la nomenclatura se han designado las constantes cinéticas con un subíndice que indica la hexosa que se une a la enzima para formar el complejo intermedio y con el mismo subíndice precedido del signo menos para la etapa inversa, de esta manera la nomenclatura es independiente del sentido en que se escriba la reacción de isomerización.

Aplicando la aproximación de estado estacionario al intermedio X

$$[X] = \left(\frac{[F]}{K_{mf}} + \frac{[G]}{K_{mg}} \right) [E] \quad [2.3]$$

donde los parámetros cinéticos K_{mf} y K_{mg} representan las constantes de Michaelis-Menten para la transformación fructosa \rightarrow glucosa y glucosa \rightarrow fructosa respectivamente

$$K_{mf} = \frac{k_{-f} + k_{-g}}{k_f}, \text{ M} \quad [2.4]$$

$$K_{mg} = \frac{k_{-f} + k_{-g}}{k_g}, \text{ M} \quad [2.5]$$

Realizando un balance de enzima y despejando la concentración de enzima libre

$$[E] = \frac{e_t c_e}{1 + \frac{[F]}{K_{mf}} + \frac{[G]}{K_{mg}}} \quad [2.6]$$

donde e_t representa los moles de enzima activa por gramo del complejo enzimático utilizado, y c_e los gramos de complejo enzimático por litro.

De acuerdo con el mecanismo [2] y las ecuaciones [3] y [6], la velocidad neta para la transformación fructosa→glucosa vendrá dada por

$$r_{FG} = \frac{V_{mf} / K_{mf} \left([F] - K_e [G] \right)}{1 + \frac{[F]}{K_{mf}} + \frac{[G]}{K_{mg}}}, \quad \frac{\text{mol}}{\text{g}_{enz} \text{ min}} \quad [2.7]$$

y para la velocidad neta de transformación glucosa→fructosa

$$r_{GF} = \frac{V_{mg} / K_{mg} \left([G] - \frac{1}{K_e} [F] \right)}{1 + \frac{[F]}{K_{mf}} + \frac{[G]}{K_{mg}}}, \quad \frac{\text{mol}}{\text{g}_{enz} \text{ min}} \quad [2.8]$$

donde las velocidades máximas V_{mf} y V_{mg} vienen dadas por

$$V_{mf} = k_{-g} \cdot e_t, \quad \frac{\text{mol}}{\text{h g}} \quad [2.9]$$

$$V_{mg} = k_{-f} \cdot e_t, \quad \frac{\text{mol}}{\text{h g}} \quad [2.10]$$

Siguiendo también la expresión de los parámetros cinéticos de Michaelis-Menten para una reacción irreversible. La constante de equilibrio que aparece en las ecuaciones [7] y [8] es

$$K_e = \frac{k_{-f} \cdot k_g}{k_f \cdot k_{-g}} = \left(\frac{[F]}{[G]} \right)_{\text{en el equilibrio}} \quad [2.11]$$

Las ecuaciones [7] y [8] cuando se parte de fructosa y glucosa puras para medir velocidades iniciales de reacción y estudiar independientemente ambas transformaciones se reducen a

$$(r_{FG})_0 = \frac{V_{mf} [F]}{K_{mf} + [F]} \quad [2.12]$$

$$(r_{GF})_0 = \frac{v_{mg} [G]}{k_{mg} + [G]} \quad [2.13]$$

Obsérvese que tal como se ha definido e_T la velocidad de reacción está referida a 1 g de complejo enzimático, tanto si éste es un líquido que contiene la enzima en disolución como si es un catalizador sólido con la enzima inmovilizada.

2.3 Inmovilización de enzimas.

Las enzimas inmovilizadas se definen como enzimas confinadas físicamente o localizadas en una determinada región del espacio con retención de su actividad catalítica, que pueden ser utilizadas repetidamente y de forma continua.

Estas enzimas inmovilizadas presentan ventajas con respecto a las enzimas en disolución entre las que podemos destacar:

- Pueden ser añadidas o extraídas de la mezcla reaccionante sin dificultad, lo que permite un mejor control de la reacción.
- Se pueden volver a utilizar, aspecto muy importante desde el punto de vista económico.
- En muchos casos la enzima se estabiliza al ser inmovilizada.
- Los productos de la reacción no están contaminados por la presencia de las enzimas.

Las aplicaciones comerciales con enzimas inmovilizadas están limitadas a unos pocos procesos que se resumen en la Tabla 2.12.

TABLA 2.12

PRINCIPALES APLICACIONES INDUSTRIALES DE ENZIMAS INMOVILIZADAS. HENK J. *et al.* (1990).

Catalizador	Soporte	Producto
Aspartasa	poliacrilamida carraginina	ácido L-aspártico
Aminoacilasa	sephadex DEAE	L-valina L-fenilalanina L-metionina L-alanina L-triptofano
Fumarasa	poliacrilamina carraginina	ácido L-málico
Glucosa isomerasa	gelatina esferas de vidrio	jarabe de fructosa de alta concentración
Penicilin acilasa	sephadex activado	ácido 6-aminopenicilánico
Lactasa	gel cerámica porosa	lactosa libre de leche o lactosuero

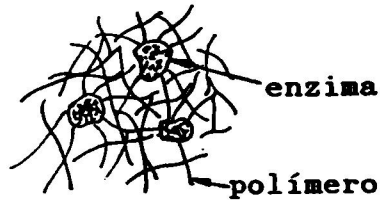
2.3.1 Métodos de inmovilización de enzimas.

Existen diferentes métodos para inmovilizar enzimas, la mayoría de ellos se muestran en la Figura 2.12. Las técnicas más utilizadas y sus características más importantes son las siguientes:

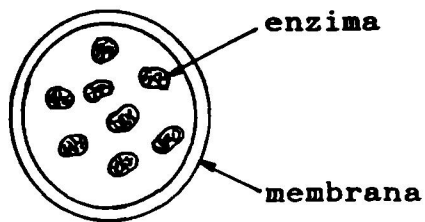
ADSORCION



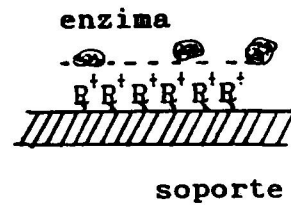
ATRAPAMIENTO



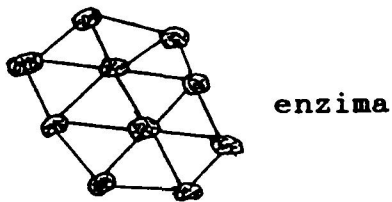
MICROENCAPSULACION



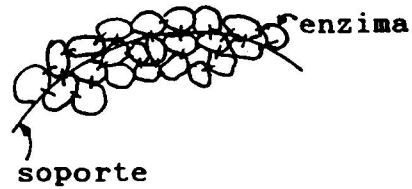
INTERCAMBIO IONICO



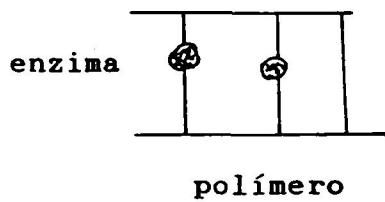
ENTRECRUZAMIENTO



ADSORCION Y ENTRECRUZAMIENTO



COPOLIMERIZACION



UNION COVALENTE

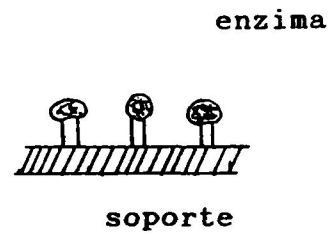


Figura 2.12. Métodos de inmovilización.

Adsorción física

La adsorción física fue el primer método artificial empleado para inmovilizar enzimas (Nelson y Griffin 1916). Es una técnica sencilla que está basada en la adsorción física de las moléculas de enzima sobre la superficie de la matriz sólida empleada como soporte.

La principal ventaja de esta técnica reside en que al no existir reacción química, los cambios conformacionales observados en la enzima tras el proceso de inmovilización son prácticamente nulos, obteniéndose una especie inmovilizada que conserva gran parte de la actividad de la disolución enzimática empleada para la inmovilización.

Entre las principales desventajas de este tipo de inmovilización destaca la desorción de la proteína durante su utilización, debido a las débiles fuerzas que unen enzima y soporte (enlaces de hidrógeno, fuerzas de Van der Waals, interacciones hidrófobas, etc.). Esta desorción provoca una importante pérdida de actividad catalítica y contaminación de los productos.

Atrapamiento

Consiste en la oclusión de la enzima en el interior de una membrana o matriz de polímero con el fin de impedir la pérdida de proteína y permitiendo la entrada de sustrato y salida de producto. Este método puede aplicarse a cualquier tipo de enzima pero su uso está restringido a reacciones que impliquen moléculas de sustrato y producto muy pequeñas.

Según la forma de atrapamiento se clasifican:

- a) Atrapamiento en un gel.
- b) Atrapamiento en fibras sintéticas.
- c) Microencapsulación.

Este último método se realiza confinando las enzimas en membranas semipermeables de polímero con forma esférica y diámetros en el intervalo de 1-100 μm .

Intercambio iónico

Esta técnica se basa en la unión de moléculas de enzima a soportes sólidos que contengan residuos de intercambio iónico. Este tipo de enlace es más fuerte que la adsorción física, y puesto que se realiza en condiciones suaves de pH y temperatura, los cambios conformacionales producidos en la proteína son escasos, obteniéndose altas actividades inmovilizadas.

Entrecruzamiento

Este método se basa en la formación de enlaces covalentes entre las moléculas de enzima, mediante el empleo de agentes bi o multifuncionales que conducen a agregados entrecruzados de tres dimensiones totalmente insolubles en agua, por lo que no es necesario el empleo de soportes insolubles. El proceso de entrecruzamiento consiste en adicionar una cantidad adecuada de agente de entrecruzamiento a una disolución de enzima en condiciones que produzcan el mayor número de enlaces covalentes múltiples.

El agente utilizado debe poseer dos grupos funcionales idénticos (agente homobifuncional) o dos o más grupos funcionales diferentes (agente heteromultifuncional).

Las principales desventajas del método son: las dificultades para controlar la reacción, la necesidad de grandes cantidades de enzima, (gran parte de la cual pierde su actividad por reacciones que tienen lugar en su centro activo) y la naturaleza gelatinosa del producto final.

Enlace covalente

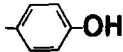
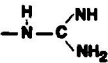

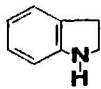
La unión covalente entre una enzima y un soporte es, en teoría, el método más estable de inmovilización, y es la técnica más utilizada aunque se realiza en condiciones de pH y temperatura menos suaves y el proceso de inmovilización es más complicado.

La amplia variedad de reacciones de unión y de portadores con grupo funcional capaces de llevar a cabo una unión covalente, o de ser activados para dar alguno de estos grupos, lo convierte en un método de inmovilización aplicable de forma general. Sin embargo, la complejidad de la composición y la estructura de

las proteínas no permite, salvo en casos especiales, la aplicación de recetas generales o la posibilidad de seleccionar previamente el método más adecuado en cada caso.

Las enzimas son heteropolímeros constituidas por más de veinte aminoácidos diferentes, la mayor parte de los cuales poseen grupos funcionales que pueden ser utilizados para su unión con la matriz soporte (Tabla 2.13).

TABLA 2.13
RESIDUOS REACTIVOS DE LAS PROTEÍNAS, RODRÍGUEZ, L. (1990).

Residuo	Aminoácido original
-NH ₂	ε-Amino de la L-lisina y N-terminal del grupo amino
-SH	Tiol de la L-cisteína
-COOH	Carboxilo del ácido aspártico y del ácido glutámico y grupo carboxilo del C-terminal
	Grupo fenólico de la L-tirosina
	Grupo guanidino de la L-arginina
	Grupo imidazol de la L-histidina
-S-S-	Disulfuro de la L-cistina
	Grupo indol del L-triptófano
CH ₃ -S-	Grupo tioéter de la L-metionina
-CH ₂ OH	Hidroxilo de la L-serina y L-treonina

Los grupos funcionales de los portadores que pueden reaccionar directamente con la enzima aparecen en la Tabla 2.14, junto con el grupo de la enzima con el que pueden reaccionar. Sin embargo, la mayor parte de los soportes utilizados no poseen estos grupos reactivos, aunque tienen grupos hidroxilo, amino, amida o carboxilo que requieren una activación tras la cual pueden ser utilizados en la inmovilización.

En la Tabla 2.14 se muestra un resumen de las técnicas de inmovilización más usuales y sus ventajas e inconvenientes. Rodríguez (1991).

Soportes empleados en inmovilización

Existen una gran variedad de soportes utilizados en la inmovilización enzimática, tanto orgánicos como inorgánicos, Tabla 2.15, pero se suelen clasificar en:

- Soportes no porosos y
- Soportes porosos.

Estos últimos a su vez se clasifican en:

- a) De poro controlado
- b) Distribución aleatoria de poro
- c) Estructuras de gel

Los soportes no porosos tienen el inconveniente de que su área superficial es pequeña, por tanto la superficie susceptible para el ataque de la enzima es baja. Esto se puede solventar empleando partículas pequeñas o fibras pero se originan problemas adicionales, es difícil retirarlas si están en disolución u originan elevadas pérdidas de carga si se utilizan en reactores continuos.

Dentro de las ventajas de estos soportes no porosos está el hecho de que la enzima ataca al soporte en su superficie externa y por tanto se pone rápidamente en contacto con el medio reaccionante y los efectos difusionales son mínimos.

TABLA 2.14

GRUPOS FUNCIONALES DE LOS PORTADORES QUE PUEDEN REACCIONAR DIRECTAMENTE CON LA ENZIMA Y GRUPO DE ESTA CON EL QUE REACCIONAN.

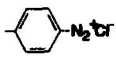
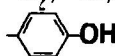

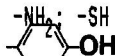
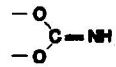
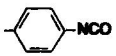
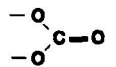

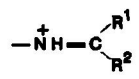

Grupo reactivo del portador		Grupo reactivo de la enzima	Reacción de unión
	Sal de diazonio	$-\text{NH}_2$; $-\text{SH}$; 	Unión diazo
	Anhídrido ácido	$-\text{NH}_2$	Formación de un enlace amida
$-\text{CH}_2\text{CON}_3$ Azida		$-\text{NH}_2$; $-\text{SH}$; 	Formación de un enlace amida
	Imidocarbonato	$-\text{NH}_2$	Formación de un enlace amida
$-\text{R}-\text{NCS}$	Isocianato	$-\text{NH}_2$	Formación de un enlace amida
	Isocianato	$-\text{NH}_2$	Formación de un enlace amida
$-\text{CH}_2\text{COC}l$	Cloruro de acilo	$-\text{NH}_2$	Formación de un enlace amida
	Carbonato cíclico	$-\text{NH}_2$	Formación de un enlace amida
$-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{SO}_2-\text{CH}=\text{CH}_2$ Vinilsulfonilo		$-\text{NH}_2$; $-\text{SH}$; $-\text{OH}$	Alquilación
	Vinilcetona	$-\text{NH}_2$; $-\text{SH}$; $-\text{OH}$	Arlación
$-\text{CHO}$	Aldehido	$-\text{NH}_2$	Formación de una base de Schiff
		$-\text{CO}_2\text{H}$; $-\text{NH}_2$	Reacción de Ugi
	Imido éster	$-\text{NH}_2$	Reacción de amidinación
$-\text{CN}$	Cianuro	$-\text{NH}_2$	Reacción de amidinación

TABLA 2.14 (Continuación)

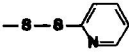
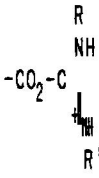
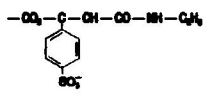
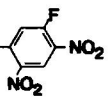
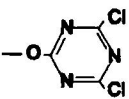

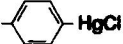
Grupo reactivo del portador	Grupo reactivo de la enzima	Reacción de unión	
	Residuo disulfuro	-SH	Intercambio tiol-disulfuro
	O-acylisourea	-NH ₂	Formación de un enlace amida
	Derivado k del reactivo de Woodward	-NH ₂	Formación de un enlace amida
	5-fluor-2,4-dinitroanilina	-NH ₂	Arilación
	Triazinilo	-NH ₂	Arilación
	X= >NH ₂ , >O, >S	-NH ₂ -OH -SH	Alquilación
	Derivado de mercurio	-SH	Interacción enzima mercurio
M [†]	Radical-matriz	E [*] Radical-enzima	Inducción al enlace por radiación
-NH ₂ Amina		-NH ₂ -CO ₂ H	Formación de un enlace amida (en presencia de agentes de condensación)
-CONHNH ₂ Acil hidracina		-NH ₂ -CO ₂ H	

TABLA 2.15
SOPORTES UTILIZADOS EN LA INMOVILIZACION DE ENZIMAS

Soportes inorgánicos:	Soportes orgánicos:
Caolinita	Celulosa
Sílice coloidal	Agarosa
Partículas de vidrio	Colodión
Vidrio de poro controlado	Almidón
Alúmina	Poliacrilamidas
Alúmina de poro controlado	Dextrano
Titanio de poro controlado	Nylon
Oxido de níquel	Colágeno
Zirconia de poro controlado	Copolímeros orgánicos (anhídrido maleico, etileno)
Zirconia recubierta de vidrio de poro controlado	Celulosa DEAE
Carbón (carbón vegetal)	
Hidroxiapatito	
Oxido de hierro	

Los soportes porosos presentan dos ventajas fundamentales: su alta área superficial para la inmovilización y el hecho de que los enlaces internos protegen la enzima de las turbulencias externas. Su principal inconveniente reside en que la mayor superficie de contacto se encuentre en la estructura interna y dependiendo del tamaño de poro los sustratos pueden o no acceder a la enzima.

El tercer tipo de soportes es una estructura en forma de gel que se utiliza para atrapar o encapsular la enzima mediante enlaces covalentes o adsorción, los geles más utilizados son colágeno y poliacrilamidas. Estos geles presentan la ventaja de que se pueden realizar una gran cantidad de enlaces sin necesidad de atacar previamente la superficie pero las enzimas atrapadas en el gel o encapsuladas están limitadas por los efectos difusionales por lo que este método es válido para sustratos pequeños no para grandes moléculas. Por otra parte las partículas de geles son difíciles de utilizar en reactores de lecho fijo ya que se compactan y originan grandes pérdidas de carga.

A la hora de seleccionar un soporte para la inmovilización hay que tener en cuenta una serie de aspectos fundamentales como son:

- a) Estabilidad química con respecto al medio en el que va a ser utilizado.
- b) Area superficial elevada para inmovilizar a la enzima.
- c) Resistencia microbiana.
- d) La carga de la superficie o poro con respecto al sustrato.
- e) Estabilidad térmica.
- f) Forma o tamaño de las partículas.
- g) Posible regeneración para su posterior utilización.

2.3.2 Efecto de la inmovilización sobre la cinética y las propiedades enzimáticas.

El proceso de inmovilización puede modificar tanto la cinética como diferentes propiedades de las enzimas, pudiendo provocar una disminución de la actividad específica de las mismas (Rodríguez 1991).

Los cambios provocados en la actividad enzimática pueden ser debidos a varios factores:

- **Efectos configuracionales:** debidos a modificaciones de los aminoácidos que constituyen el centro activo de la misma ya sean cambios en la estructura proteica de la enzima y/o cambios en su carga.

- **Efectos estéricos:** cuando el tamaño del sustrato y la enzima afectan a la interacción entre ellos.

- **Efectos particionales:** que están relacionados con la naturaleza química del soporte empleado como matriz y especies de bajo peso molecular presentes en el medio.

- **Efectos difusionales:** relacionados con la resistencia al transporte del sustrato desde el seno de la disolución hasta los centros activos y con la difusión de los productos de reacción hasta la disolución. Estas resistencias se clasifican en efectos de transferencia de materia externa cuando se producen entre el seno de la disolución y la superficie externa de la partícula y los efectos de transferencia de materia interna cuando lo hacen entre la superficie externa de la partícula y los centros activos de la enzima inmovilizada en una matriz porosa.

Los cambios que se han observado en las propiedades de la enzima inmovilizada pueden ser los siguientes:

- **Modificación de los parámetros cinéticos:** constante de Michaelis y velocidad máxima de reacción que pueden aumentar o disminuir dependiendo del método empleado en la inmovilización.

- **Cambios de actividad frente a pH,** que dependen de la carga eléctrica de la proteína que constituye la enzima y/o de la carga del soporte.

- **Variación del perfil de velocidad frente a la temperatura:** la temperatura óptima de las enzimas inmovilizadas por atrapamiento en geles y sobre soportes porosos puede verse aumentada debido a efectos difusionales en el caso de soportes porosos, que protegen a la enzima contra la desnaturalización, ya que la temperatura en el microentorno de la enzima es menor que en el seno de la disolución. Sin embargo se ha observado disminución de la temperatura (Mori, 1973) y con bastante frecuencia ningún cambio en la misma (Chibata, 1979).

- **Estabilidad frente a la temperatura:** la influencia de la inmovilización sobre la estabilidad térmica ha sido motivo de abundantes estudios, existen todo tipo de resultados (aumento, disminución, no modificación) pero el aumento es el efecto más frecuente, observándose que cuando el método de inmovilización empleado es el enlace covalente y atrapamiento se produce un importante aumento en la

estabilidad térmica, mientras que si la inmovilización se produce por adsorción física la estabilidad térmica disminuye.

2.3.3 Reactor de fibra hueca.

Otra forma de inmovilizar enzimas es utilizar membranas semipermeables en forma de módulos de fibra hueca, "hollow fiber", que se utilizan como reactores. Estas membranas permiten el paso a su través de los reactivos y productos de reacción mientras que son impermeables para la enzima.

Esta forma de inmovilización puede presentar considerables ventajas respecto a otros métodos entre los que podemos destacar: la inmovilización puede realizarse fácil y rápidamente si se dispone de la membrana adecuada; no se alteran las propiedades químicas de la enzima, lo que permite su utilización para el estudio cinético de enzimas solubles; por otra parte, puede inmovilizarse varias enzimas conjuntamente; existe una gran relación área superficial/volumen; no existen pérdidas de enzima; y también permite su utilización en operaciones continuas a bajas presiones.

Sin embargo hay que considerar las posibles limitaciones en la velocidad de reacción, como resultado de la resistencia a la transferencia de materia en la membrana y su geometría poco flexible entre los inconvenientes de su utilización.

Existen en el mercado reactores de fibra hueca con distintas características para ser utilizados a escala de laboratorio que son suministrados por diferentes compañías; en la Tabla 2.16 se muestran algunos de ellos. La geometría empleada es generalmente tubular, provista de dos compartimentos uno en el interior de las fibras y otro que ocupa el espacio anular entre las fibras y la pared exterior del reactor, carcasa, pudiendo existir dos tipos de circulación, una por el interior de las fibras y otra por la carcasa.

La elección de una membrana adecuada para realizar la reacción enzimática prevista se hace en base a una serie de factores como son: el peso molecular de corte de la membrana, permeabilidad de los sustratos y productos, anisotropía de la membrana y compatibilidad de ésta con la enzima y la disolución del sustrato.

TABLA 2.16
REACTORES DE FIBRA HUECA

Casa comercial	Tipo	Corte de membrana, Da	Area superficial, cm ²	Material
Amicon	P ₅	5000	560	Polisulfona
	X ₅₀	50000	930	Copolimeroacrilico
	P ₁₀₀	100000	740	
BioRad	B20	200	50	AcetatoCelulosa
	B50	5000	50	Celulosa
	B80	30000	1000	Celulosa
Cordis	CDAK	5000	10000	Celulosa
Romicon	20-PM10	10000	1700	Polimeroaromático
	45-XM50	50000	1000	Poliolefina
SORIN	NT0908	5000	8400	Cuprophan
Biomédica	NT1808-S	5000	18000	Cuprophan
	NT1465H	5000	13200	Hemophan
	NT1808H	5000	17200	Hemophan
	HFT02	17000	2400	Polisulfona
	HFT14	17000	13500	Polisulfona

El peso molecular de corte es un parámetro empírico que se obtiene mediante experimentos de ultrafiltración. Una disolución conteniendo un soluto determinado se circula a través de las fibras del reactor bajo presión; la fracción retenida se determina por

$$F = \frac{c_{int} - c_{ext}}{c_{int}} \quad [2.14]$$

donde c_{int} y c_{ext} son las concentraciones de sustrato en el interior y exterior de las fibras. Este parámetro es una medida relativa del tamaño de poro de la membrana; ya que la fracción retenida depende de muchos factores: la velocidad de permeación, las condiciones de operación, la caída de presión a través de las fibras, la velocidad de flujo y la concentración del soluto.

La permeabilidad hidráulica "ultrafiltración" es una característica importante de las membranas de los reactores de fibra hueca, ya que suministra un transporte de soluto a través de la membrana mucho más rápido que el determinado por la difusión molecular exclusivamente a través de la membrana y película líquida formada y surge como consecuencia de la aplicación de una presión diferencial. La ultrafiltración puede producirse por cualquier factor que cree fuerzas de presión en la conducción. Diferencias de presión entre la carcasa y las fibras; caída de presión causada por la circulación del fluido a través de las fibras y diferencias de presión osmótica entre la conducción de las fibras y la carcasa.

Como resultado de la ultrafiltración, ocurre la concentración por polarización: como el fluido es forzado por la acción de diferencias de presión a través de la membrana, los solutos con suficiente peso molecular son retenidos parcial o totalmente; esto causa un incremento en su concentración local, lo que puede provocar una reducción de la capacidad de ultrafiltración, llegando a hacerse independiente de la diferencia de presión, y un cambio en el comportamiento de la membrana que puede reducir su peso molecular de corte ofreciendo mayor resistencia a la transferencia de materia.

Este efecto puede reducirse considerablemente incrementando la velocidad de flujo y la concentración del soluto que provoca ese efecto. Tal como puede observarse en la Figura 2.13 la reducción del flujo de ultrafiltración para concentraciones crecientes de "bovine serum albumina" para una concentración del 3.9% de esta proteína se forma una película permaneciendo constante el flujo de ultrafiltración con la diferencia de presión provocada. El efecto de la velocidad de agitación en el compartimento donde se ha formado la película de proteína puede observarse para la concentración al 6.5%.

Las enzimas inmovilizadas en reactores de fibra hueca en su forma soluble han sido estudiadas por autores como Rony (1972), Fink y Rodwell (1975). Los resultados obtenidos indican que las características cinéticas de la enzima permanecen inalteradas en el interior del reactor de fibra hueca aunque a veces las propiedades de permeación de la membrana varían y los resultados obtenidos difieren de los correspondientes a la enzima soluble.

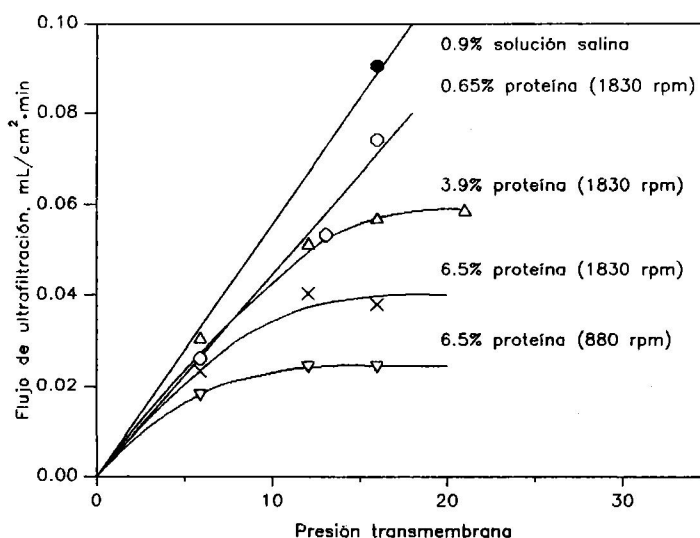


Figura 2.13

2.4 Estudios cinéticos de la isomerización enzimática de glucosa a fructosa.

Desde que en 1957 fue descubierta la enzima glucosa isomerasa por Marshall y Kooi, se han llevado a cabo una serie de trabajos relacionados con esta enzima, que ya en 1966 en Japón se producía en cantidades suficientes para ser utilizada en operaciones industriales, en primer lugar en reactores discontinuos en forma soluble y posteriormente inmovilizada. Sin embargo, estos estudios se han encaminado fundamentalmente a conseguir métodos adecuados que estabilicen la enzima, lo que ha sido el aspecto más importante para que la obtención de jarabes de fructosa sea económicamente viable; o al modo de operación de los reactores que utilizan enzimas inmovilizadas y todos aquellos aspectos que afectan al diseño del reactor.

Son pocos por tanto los trabajos cuantitativos realizados sobre el comportamiento cinético de la reacción, siendo Takasaki (1967) el que realiza un primer estudio cinético y del equilibrio de esta isomerización, utilizando enzima en forma soluble. La mayoría de los autores se limitan a obtener los parámetros cinéticos a partir de las velocidades iniciales, lo que proporciona un conocimiento limitado de la reacción, y los utilizan para el diseño y optimización del reactor. Tampoco es frecuente, en los

estudios cinéticos realizados, la consideración del transporte interno o externo cuando se utilizan enzimas inmovilizadas. Estos efectos de transferencia de materia pueden reducir, de forma considerable, la velocidad de reacción y si no son tenidos en cuenta, el valor de los parámetros cinéticos aportados pueden venir afectados de errores importantes.

Otro factor importante en el estudio de enzimas inmovilizadas son los aspectos relacionados con la desnaturalización de la enzima en las condiciones de operación: desactivación térmica, cambios de pH, envenenamiento de la enzima o cambios producidos en el soporte utilizado.

Por simplicidad los aspectos relacionados con la cinética, transporte interno y externo, estabilidad de la enzima, etc., suelen ser considerados de forma independiente; pero sería deseable para el diseño eficiente de un reactor que utilice enzimas inmovilizadas el desarrollo de un modelo que tenga en cuenta simultáneamente estos aspectos, lo que permitiría optimizar las variables de operación del proceso de isomerización glucosa-fructosa.

Entre los estudios cinéticos realizados se pueden destacar los efectuados por Sproull *et al.* (1976), Kikkert *et al.* (1981), Van Keulen *et al.* (1981), Havewala y Pitcher (1974) y Chen y Wu (1986). Sproull *et al.*, utilizando un conjunto de células, WC, sin inmovilizar, suministradas por Novo Industry y un reactor tipo tanque agitado, estudian el equilibrio de isomerización con una concentración total de hexosas, preparando muestras de concentraciones próximas al equilibrio y a las temperaturas 30, 45, 60 y 80°C; obtienen los siguientes datos para K_e

TABLA 2.17
CONSTANTES DE EQUILIBRIO. SPROULL *et al.* (1976)

T, °C	30	45	60	70	80
K_e	0.828	0.957	1.141	1.283	1.381

También realizan estudios de desactivación a pH = 7 en ausencia de sustrato a las temperaturas de 40, 60 y 80°C proponiendo el siguiente modelo para la desnaturalización de la enzima



La enzima E se desactiva de forma irreversible por desnaturalización y por la acción de las proteasas presentes en el conjunto de células, P. Estas proteasas también se desactivan térmicamente, dando lugar a P', proteasa desactivada.

Las constantes de desactivación y sus respectivas energías de activación son las indicadas en la Tabla 2.18, donde P son los moles de proteasas por unidad de masa del conjunto de células.

TABLA 2.18
CONSTANTES DE DESACTIVACION ENZIMATICA, SPROULL et al. (1976).

Temperatura, °C	k_4 , g WC/L	k_3 , min ⁻¹	k_5 , min ⁻¹
40	$1.667 \cdot 10^{-5}$	$2.140 \cdot 10^{-4}$	$5.706 \cdot 10^{-3}$
60	$8.473 \cdot 10^{-5}$	$5.883 \cdot 10^{-4}$	$1.578 \cdot 10^{-2}$
80	$2.549 \cdot 10^{-4}$	$1.396 \cdot 10^{-3}$	$3.625 \cdot 10^{-2}$
Energía de activación, cal/g mol	4900	10300	10100

Estos autores no tienen en cuenta los posibles efectos de transferencia de materia y suponen que el mecanismo de reacción es el indicado en el apartado 2.2.3, ecuación [2.2], cinética reversible de Michaelis-Menten. Las constantes cinéticas propuestas para la reacción de isomerización glucosa-fructosa son las indicadas en la Tabla 2.19.

Kikkert et al. (1981) y Van Keulen et al. (1981) utilizan un reactor tanque agitado para sus experimentos, dos catalizadores industriales, ICI y RJR, y células de *Arthrobacter* inmovilizadas y libres para la isomerización de glucosa a fructosa y viceversa. Eliminan los efectos de transferencia de materia interna utilizando partículas de catalizador de diámetro inferior a 140 µm.

TABLA 2.19
PARAMETROS CINETICOS, SPROULL *et al.* (1976)

Temperatura, °C	40	60	80
$V_{mg} \cdot 10^4, \text{ mol}/(\text{min} \cdot \text{g}_{\text{WC}})$	0.166	1.549	11.823
$V_{mf} \cdot 10^4, \text{ mol}/(\text{min} \cdot \text{g}_{\text{WC}})$	0.217	1.320	6.531
K_{mg}, M	0.572	0.498	0.722
K_{mf}, M	0.691	0.472	0.553
$k_g, L/(\text{min} \cdot \text{g}_{\text{WC}})$	$6.695 \cdot 10^{-5}$	$3.248 \cdot 10^{-4}$	$1.3178 \cdot 10^{-3}$
$k_f, \text{ mol}/(\text{min} \cdot \text{g}_{\text{WC}})$	$1.6726 \cdot 10^{-5}$	$1.1041 \cdot 10^{-4}$	$5.8858 \cdot 10^{-4}$
$k_{-g}, \text{ mol}/(\text{min} \cdot \text{g}_{\text{WC}})$	$1.5983 \cdot 10^{-5}$	$1.3338 \cdot 10^{-4}$	$8.7536 \cdot 10^{-4}$
$k_{-f}, L/(\text{min} \cdot \text{g}_{\text{WC}})$	$7.6316 \cdot 10^{-5}$	$4.0863 \cdot 10^{-4}$	$1.8093 \cdot 10^{-3}$

$$E_g = 16400 \text{ cal/mol}$$

$$E_g = 22000 \text{ cal/mol}$$

$$E_f = 19600 \text{ cal/mol}$$

$$E_f = 17400 \text{ cal/mol}$$

Estiman los parámetros cinéticos de la reacción a partir de las velocidades iniciales de reacción y a partir de éstos la constante de equilibrio de la reacción de isomerización, indicada en la Tabla 2.20, mediante la ecuación

$$K_e = \frac{[F]_e}{[G]_e} = \frac{V_{mg} K_{mf}}{V_{mf} K_{mg}} \quad [2.18]$$

Los valores de K_{mg} y K_{mf} obtenidos, excepto K_{mf} para las células libres, son prácticamente iguales. Las constantes cinéticas del modelo de reacción reversible, ecuación [2.2] multiplicadas por la concentración de enzima en el microorganismo, obtenidas a partir de los parámetros anteriores son las indicadas en la Tabla 2.21.

Utilizando mezclas de fructosa-glucosa a una concentración total de hexosas 3.4 kmol/m^3 comprueban que la velocidad de reacción se ajusta a una cinética de primer orden para las temperaturas de 60 a 65°C en la forma

TABLA 2.20
VALORES DE K_m y V_m , KIKKERT *et al.* (1981) y VAN KEULEN *et al.* (1981).

Catalizador	T, °C	pH	$10^{-3} \frac{V_{mg}}{\text{mol/s} \cdot \text{Kg}_{\text{cat}}}$	$10^{-3} \frac{V_{mf}}{\text{mol/s} \cdot \text{Kg}_{\text{cat}}}$	$K_{mg} \text{ mol/m}^3$	$K_{mf} \text{ mol/m}^3$
ICI	50	8.2	4.9	4.1	300	200
ICI	60	8.2	9.4	7.6	350	270
ICI	60	7.1	7.3	8.5	390	530
ICI	65	8.2	12.2	10.5	390	320
RJR	60	8.0	12.3	10.8	340	310
Células li- bres	60	7.9	3.21	41	300	380
Células in- mov.	60	7.9	2.91	2.21	340	300

TABLA 2.21
CONSTANTES CINÉTICAS Y ENERGÍAS DE ACTIVACION
KIKKERT *et al.* (1981), VAN KEULEN *et al.* (1981).

Catalizador	T, °C	pH	$10^{-5} \text{ m}^3/(\text{s} \cdot \text{kg}_{\text{cat}})$		$10^{-3} \text{ m}^3/(\text{s} \cdot \text{kg}_{\text{cat}})$	
			$k_g e_t$	$k_f e_t$	k_g	k_f
ICI	50	8.2	3.0	3.6	4.1	5.0
ICI	60	8.2	4.7	6.3	7.6	9.4
ICI	65	8.2	5.8	7.2	10.5	12.2
ICI	60	7.1	4.0	2.3	8.5	7.3
RJR	60	8.0	6.8	7.5	10.8	12.3
EA (KJ/mol)		8.2	40	35	55	55

$$r_G = k_a E (G - G_e) = k_a E \left(G - \frac{G_0}{K_e + 1} \right) \quad [2.19]$$

Para la temperatura de 50°C, pH = 8.2 y $[G] < [G]_e$ no se ajustan a la cinética de pseudoprimer orden. Los valores de k_a y K obtenidos se muestran en la Tabla 2.22.

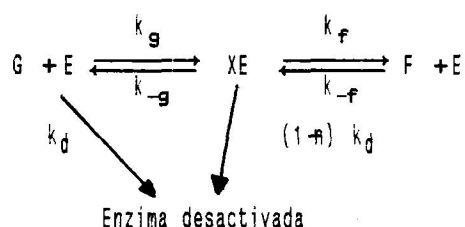
TABLA 2.22
CONSTANTE CINÉTICA DE PSEUDOPRIMER ORDEN, KIKKERT *et al.* (1981).

Catalizador	T, °C	pH	k_a $m^3/(s \cdot kg_{cat}) \cdot 10^{-6}$	K_e
ICI	50	8.2	2.5	0.93
ICI	60	8.2	4.7	1.07
ICI	60	7.5	4.4	1.06
ICI	60	7.1	3.9	1.06
ICI	60	6.5	3.1	1.04
ICI	65	8.2	6.3	1.12
RJR	60	8.0	6.3	1.06

Havewala y Pitcher (1974) utilizan glucosa isomerasa de *Streptomyces* libre e inmovilizada en vidrio de poro controlado. La conversión de glucosa a fructosa se llevaba a cabo a distintas temperaturas y una concentración de glucosa 2 M en dos tipos de reactores, uno de lecho fijo y otro discontinuo tanque agitado. Consideran cinética de pseudoprimer orden y determinan las energías de activación para las enzimas libre e inmovilizada, resultando ser 14.5 y 15.7 kcal/mol respectivamente.

No obtienen diferencias en la velocidad de reacción para los dos sistemas utilizados cuando emplean la enzima inmovilizada. Las concentraciones de fructosa en el equilibrio son 50.4%, 51.4% y 52.3% a las temperaturas de 60, 70 y 79.5°C respectivamente.

Chen y Wu (1986) proponen el mecanismo reversible de Briggs-Haldane para la reacción de isomerización fructosa-glucosa



[2.20]

Cuando $0 < n < 1$ la desactivación del complejo enzima-sustrato es más pequeña que el de la enzima libre, por tanto la enzima está protegida por el sustrato. Cuando $n < 0$, la enzima está envenenada por el sustrato; si $n=0$ no existe ni protección ni desactivación y si $n > 1$ la actividad de la enzima aumenta con el tiempo.

Emplean una enzima comercial, Swetasa, con un tamaño de partícula $< 100 \mu\text{m}$ para eliminar los efectos de difusión interna y un reactor tipo tanque agitado. Determinan los parámetros cinéticos K_{mg} , K_{mf} , V_{mg} y V_{mf} a partir de velocidades iniciales de reacción a las temperaturas de 60, 65, 70, 75 y 80°C y pH = 8.25. Los resultados obtenidos, así como las constantes de equilibrio a estas temperaturas son los indicados en la Tabla 2.23.

TABLA 2.23
CONSTANTES CINÉTICAS Y DE EQUILIBRIO, CHEN Y WU (1986)

T, °C	V_{mg} $\mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{g}_{\text{cat}}$	V_{mf} $\mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{g}_{\text{cat}}$	K_{mg} , M	K_{mf} , M	K_e
60	$2.92 \cdot 10^2$	$1.87 \cdot 10^2$	0.70	0.45	0.99
65	$3.99 \cdot 10^2$	$3.02 \cdot 10^2$	0.78	0.60	1.02
70	$5.40 \cdot 10^2$	$4.72 \cdot 10^2$	0.84	0.83	1.13
75	$7.41 \cdot 10^2$	$7.35 \cdot 10^2$	0.93	1.13	1.23
80	$9.83 \cdot 10^2$	$1.11 \cdot 10^3$	1.01	1.57	1.38

También realizan experimentos de desactivación a pH = 7 y a las temperaturas de 70, 75 y 80°C utilizando varias concentraciones de sustrato. Teniendo en cuenta el modelo anteriormente expuesto, y que la desactivación total de la enzima viene dada por

$$\frac{dE_t}{dt} = -k_d (E + (1 - n) XE) \quad [2.21]$$

donde E y XE son las concentraciones de enzima activa, libre y del complejo enzima-sustrato respectivamente. Obtienen que el valor de n que ajusta los experimentos de desactivación es 0.5, lo que indica protección de la enzima por parte del sustrato.

Entre los trabajos que consideran el efecto de la transferencia de materia interna o externa sobre la velocidad de isomerización se pueden citar los propuestos por Lee et al. (1976), Chen et al. (1980), Straatsma et al. (1983) y Nakamura et al. (1984).

Lee et al. (1976) utilizan un reactor de lecho fijo con recirculación donde la enzima proveniente de *Streptomyces* e inmovilizada por enlace covalente con glutaraldehído, está confinada.

Analizan la influencia de la transferencia de materia interna y externa de forma experimental variando el tamaño de partícula del catalizador, entre 20 y 120 μm , la velocidad de flujo en el reactor y la temperatura, 50-75°C. Determinan que para velocidades de flujo superiores a 0.1 cm/s la influencia de la transferencia de materia externa sobre la velocidad de reacción puede despreciarse. Los efectos de difusión interna se eliminan para tamaño de partículas de 20 μm y por debajo de 60°C, siendo apreciables para temperaturas superiores.

Estudian la cinética de la reacción a 50°C y pH = 7, determinando los parámetros cinéticos a partir de las velocidades iniciales de reacción siendo su valor

$$\begin{aligned} K_{mg} &= 0.21 \text{ M} & V_{mg} &= 15.8 \text{ mg/min}\cdot\text{ml}_{\text{cat}} \\ K_{mf} &= 0.40 \text{ M} & V_{mf} &= 30.5 \text{ mg/min}\cdot\text{ml}_{\text{cat}} \\ K_e &= 1.03 \end{aligned}$$

Utilizando estos parámetros simulan la conversión con el curso del tiempo, considerando cinética reversible de Michaelis-Menten, no ajustando los experimentos para concentraciones de sustrato superiores a 0.5 M.

Chen et al. (1980) desarrollan un modelo que tiene en cuenta la influencia de la resistencia difusional en el poro y película del catalizador sobre la velocidad global de la isomerización de glucosa incluyendo también la desactivación de las células inmovilizadas dentro de un reactor diferencial de lecho fijo.

La enzima utilizada en los experimentos cinéticos son células de *Streptomyces phaeochromogenes* inmovilizadas por agregación en queratina y con diámetros de partícula 0.125 cm, 0.046 cm y 0.018 cm, el pH = 8.3, las concentraciones de sustrato comprendidas entre 0.5 y 5.10 M de glucosa y las temperaturas en el rango de 60-80°C.

Consideran cinética reversible de Michaelis-Menten modificada con una desactivación de la enzima de primer orden. Realizan un tratamiento teórico en el que evalúan dos factores de efectividad: η_D que tiene en cuenta los efectos de difusión en los poros y la desactivación y η_{Df} que además incluye los efectos de transferencia de materia en la película, en función del módulo de Thiele, el módulo de película y los parámetros cinéticos. Para la evaluación de η_D y η_{Df} aplican un procedimiento iterativo suponiendo la concentración en la superficie de la partícula y aplicando una correlación empírica propuesta por Kobayashi et al. (1976) para la integración de la ecuación de continuidad en coordenadas esféricas.

A partir de las velocidades iniciales obtienen los siguientes parámetros cinéticos para la isomerización glucosa fructosa:

TABLA 2.24
VALORES DE K_{mg} , K_{mf} y K_e , CHEN et al. (1980)

T, °C	K_{mg} mol/mL	K_{mf} mol/mL	K_e
60	$1.73 \cdot 10^{-3}$	$1.80 \cdot 10^{-3}$	1.15
65	$1.61 \cdot 10^{-3}$	$1.70 \cdot 10^{-3}$	1.22
70	$1.50 \cdot 10^{-3}$	$1.62 \cdot 10^{-3}$	1.29
	$\cdot 10^{-3}$	$\cdot 10^{-3}$	
80	$1.33 \cdot 10^{-3}$	$1.45 \cdot 10^{-3}$	1.43

Evaluando los coeficientes η_D y η_{Df} a partir de los datos experimentales y comparándolos con los calculados determinan que existe una fuerte resistencia al transporte en la película.

Straatsma et al. (1983) analizan la estabilidad de un conjunto de células de *Arthrobacter* inmovilizadas, estudiando posibles causas de desactivación enzimática: cambios de pH, temperatura y presencia de oxígeno en los experimentos de isomerización glucosa a fructosa. Utilizan un reactor continuo sólido-líquido en el que el fluido es recirculado sobre el lecho catalítico a una velocidad mucho mayor que la de alimentación y diferentes formas de partículas: esféricas de $d_p = 0.9 \cdot 10^{-3}$ m y cilíndricas con $d_p = 5 \cdot 10^{-3}$ m y una longitud de $1.7 \cdot 10^{-3}$ m. Demuestran que la velocidad de reacción es de pseudoprimer orden y evalúan la constante cinética para esta reacción corrigiéndola con los efectos de transferencia de materia interna, que son apreciables en sus experimentos. Los valores de esta constante en función del pH y la temperatura se indican en la Tabla 2.25.

TABLA 2.25
CONSTANTE CINETICA DE PSEUDOPRIMER ORDEN, STRAATSMA et al. (1983).

T, °C	55	60	60	60	60	60	55
pH	7.5	6.5	7.0	7.5	8.0	8.2	6.5
$k_{a0} \cdot 10^{-6} \text{ m}^3/\text{s} \cdot \text{kg}_{\text{cat}}$	2.8	2.9	3.3	4.7	5.0	5.5	5.6

La estabilidad de la enzima puede expresarse en función del tiempo, pH y temperatura por

$$k_{a,t} = k_{a,0} \exp(-k'_a t) \quad [2.22]$$

$$k'_a = 2.5 \cdot 10^3 (\text{pH})^2 - 3.66 \cdot 10^2 \text{ pH} - 2.93 \cdot 10^2 \cdot \exp\left(\frac{130000}{R} \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{333}\right)\right) \quad [2.23]$$

Nakamura et al. (1984) utilizan un reactor de lecho fluidizado para el estudio cinético de la isomerización glucosa-fructosa y glucosa isomerasa de *Streptomyces phaeochrogenes* inmovilizada por atrapamiento. Desarrollan un modelo de dispersión axial considerando partículas esféricas, el efecto de la difusión interna y cinética de pseudoprimer orden. Este modelo reproduce los resultados experimentales de conversión obtenidos en el reactor de lecho fluidizado sólo para las velocidades de flujo intermedias empleadas de 0.5 cm/min.

Miden con experimentos de impulso-respuesta el coeficiente de difusión efectivo mediante análisis de momentos y el incremento de volumen experimentado por las partículas de catalizador cuando se humedecen, y deducen que la difusividad efectiva es el 60% de la difusividad molecular.

Son más numerosos sin embargo, los estudios realizados sobre los factores que afectan al diseño óptimo de distintos reactores donde poder llevar a cabo la reacción de isomerización fructosa-glucosa con enzimas inmovilizadas. En este sentido, Park et al. (1981) realizaron un estudio sobre la optimización de la temperatura de operación para un sistema de reactores de lecho fijo en funcionamiento continuo. La optimización la realizan para obtener la máxima productividad de fructosa, consiguen un incremento del 8% de conversión si lo comparan con el reactor de funcionamiento a temperatura constante.

En la optimización de la temperatura consideran cinética enzimática reversible de Michaelis-Menten con desactivación enzimática de 1^{er} orden sin influencia de la concentración del sustrato:

$$r_{GF} = \frac{V_m (G_0 - G_e) e^{-k_d t}}{K_m + (G_0 - G_e)} \quad [2.24]$$

donde G_0 y G_e son las concentraciones de sustrato inicial y de equilibrio; k_d , la constante de desactivación enzimática y K_m , V_m la constante de Michaelis-Menten y velocidad máxima de reacción reducida

$$V_m = \frac{K_{mg} V_{mf} + K_{mf} V_{mg}}{K_{mf} - K_{mg}} \quad [2.25]$$

$$K_m = \frac{K_{mg} (K_{mf} + G_0)}{K_{mf} - K_{mg}} \quad [2.26]$$

Los parámetros cinéticos de la velocidad de reacción utilizados en el modelo son evaluados experimentalmente en función de la temperatura resultando

$$V_m = -48.8 \exp \left(-\frac{4510}{T} \right) \quad [2.27]$$

$$K_m = -10.8 \exp \left(-\frac{1280}{T} \right) \quad [2.28]$$

$$K_e = 4350 \exp \left(- \frac{2725}{T} \right) \quad [2.29]$$

La velocidad de desactivación enzimática decrece con la concentración de sustrato, lo que parece indicar que el sustrato protege la desactivación de la enzima. La constante de desactivación en función de la temperatura a $[G]_0 = 0.1 \text{ M}$ viene dada por

$$k_d = 1.95 \cdot 10^{12} \exp \left(- \frac{10960}{T} \right) \quad [2.30]$$

Gram y Bang (1990) desarrollan un sistema de reactores de lecho fijo en continuo con la enzima glucosa isomerasa (Sweetzyme Q) inmovilizada, automatizado con un sistema de toma de muestras y tres analizadores de inyección de flujo para la medida y control de pH, concentración de glucosa y fructosa.

Los resultados cinéticos obtenidos al variar la velocidad de alimentación del jarabe de glucosa indicaban que no existían limitaciones a la transferencia de materia externa y que la cinética era bien descrita como una reacción reversible de pseudoprimer orden, siendo $K_a = 17 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ para $s_0 = 3 \cdot 10^{-3} \text{ mol/cm}^3$, $T = 60^\circ\text{C}$ y 9 gramos de enzima en el lecho. Encuentran también que la actividad enzimática hasta los 9 días de actuación decrece siguiendo una cinética de primer orden; sin embargo, esta actividad no se ve modificada en el rango de pH entre 7.5 a 8.5. La transferencia de materia interna no puede despreciarse para este tipo de catalizador.

Chen y Weng (1983) emplean cinco tipos de reactores y glucosa isomerasa inmovilizada en queratina con glutaraldehído para la isomerización de glucosa. Determinan experimentalmente las constantes cinéticas y de Michaelis-Menten a partir de las velocidades iniciales de reacción, siendo su valor a $\text{pH} = 7.5$ y 70°C

$$\begin{array}{ll} K_{mg} = 1.79 \text{ M} & V_{mg} = 1.08 \cdot 10^{-1} \text{ mol/min} \cdot \text{g}_{\text{cat}} \\ K_{mf} = 2.47 \text{ M} & V_{mf} = 1.5 \cdot 10^{-4} \text{ mol/min} \cdot \text{g}_{\text{cat}} \end{array}$$

y la difusividad efectiva de glucosa en la enzima inmovilizada a 70°C y $G_0 = 1.8 \text{ M}$ es $3 \cdot 10^{-4} \text{ cm}^2/\text{s}$, y la usan para la aplicación de un modelo teórico de flujo de dispersión radial.

La conversión obtenida con distintos tipos de reactores (flujo radial, lecho fluidizado, lecho fijo), eran prácticamente coincidentes al mismo tiempo de residencia y al compararlos con el modelo teórico desarrollado concluyen que los reactores de flujo radial y lecho fluidizado pueden ser útiles para llevar a cabo esta reacción.

Beck *et al.* (1986) proponen un modelo de reactor para catálisis heterogéneo que tiene en cuenta los efectos del transporte interno y externo; los parámetros hidrodinámicos que gobiernan a un reactor a gran escala: dispersión axial de fluido, expansión de lecho y retromezcla; y la cinética reversible de la isomerización fructosa-glucosa.

Los parámetros cinéticos eran evaluados experimentalmente utilizando un reactor tipo tanque agitado. Las conversiones predichas por el modelo, son superiores a los valores experimentales de conversión obtenidos utilizando dos tipos de reactores: de lecho fijo y fluidizado. Justifican sus resultados concluyendo que las correlaciones de Bibliografía utilizadas para la transferencia de materia y dispersión no son adecuadas.

Vasic-Racki *et al.* (1991) utilizan un reactor de lecho fijo a pH = 7 y un conjunto de células inmovilizadas en alginato cálcico de *Streptomyces bombergiensis* como catalizador para obtener los parámetros cinéticos que resultaron ser

$$\begin{array}{ll} K_{mg} = 0.38 \text{ M} & V_{mg} = 1.23 \cdot 10^{-5} \text{ mol/s} \cdot g_{cat} \\ K_{mf} = 0.44 \text{ M} & V_{mf} = 1.34 \cdot 10^{-5} \text{ mol/s} \cdot g_{cat} \\ K_e = 0.94 & \end{array}$$

No encuentran resistencia a la transferencia de materia interna y el coeficiente de difusión efectiva determinado experimentalmente era igual a la difusividad molecular.

Simulan modelos de reactor considerando cinética reversible de Michaelis-Menten y que tiene en cuenta el efecto de transferencia de materia externa para tres reactores: flujo en pistón, tanque agitado continuo y modelo de dispersión axial, siendo este último el que reproduce sus resultados experimentales.

Ching y Ho (1984) emplean dos tipos de enzima inmovilizada, sweetase y el complejo PG-GI. Determinan los parámetros cinéticos de las reacciones directa e inversa a 60 y 70°C para los dos catalizadores utilizados, que resultaron ser

TABLA 2.26
VALORES DE K_m y V_m CHING y HO (1984)

ENZIMA	K_{mg} , M	K_{mf} , M	V_{mg} , mol/h·g _{cat}	V_{mf} , mol/h·g _{cat}
sweetase	1.07	1.28	$1.5 \cdot 10^{-2}$	$1.7 \cdot 10^{-2}$
PG-GI comp.	0.211	0.205	$4.43 \cdot 10^{-2}$	$4.76 \cdot 10^{-2}$

Eligen condiciones experimentales que eliminen los efectos de transferencia de materia, consideran cinética de pseudoprimer orden y proponen un modelo de flujo en pistón con dispersión axial que reproduce los resultados experimentales obtenidos con un reactor de lecho fijo y con el reactor de lecho fluidizado sólo cuando las partículas empleadas eran regulares.

El reactor de lecho fluidizado ha sido ampliamente estudiado por Henk et al. (1990). Estos autores desarrollan un modelo teórico de reactor con transporte continuo del biocatalizador en contracorriente con la solución de sustrato. Utilizan glucosa isomerasa inmovilizada (Maxazyme) obtenida a partir de *Actinoplanes missouriensis*, consideran la cinética de la reacción como de pseudoprimer orden y desactivación de la enzima de primer orden. El flujo del fluido sigue un modelo de dispersión axial y transferencia de materia interna y externa. Simulan el comportamiento para este reactor y el de lecho fijo indicando que se necesita menor cantidad de catalizador para el reactor de lecho fluidizado con transporte continuo y puede ser útil para la utilización de enzimas con pérdida de actividad.

2.5 Objeto de la presente investigación y grado de cumplimiento de la misma.

Los objetivos fundamentales de la investigación que se describe en esta Memoria fueron:

- a) La puesta a punto de los dispositivos experimentales de laboratorio que permitan el estudio cinético comparado de las reacciones enzimáticas con enzimas en disolución y enzimas inmovilizadas.
- b) El desarrollo de modelos para la interacción entre los procesos de transferencia de sustratos y productos y la cinética enzimática en los diferentes métodos de inmovilización enzimática.

Para llevar a cabo estos objetivos se seleccionó como sistema de estudio la isomerización enzimática glucosa-fructosa, proceso de un gran interés industrial como se ha puesto de manifiesto en el apartado 2.1.2 y que, sin embargo, los estudios cinéticos publicados sobre el mismo son contradictorios en muchos aspectos, como se ha puesto de manifiesto en el apartado 2.4, en nuestra opinión debido fundamentalmente a la influencia sobre la cinética de los procesos de transporte interno en las partículas de enzima inmovilizada.

Con respecto al primer objetivo se han puesto a punto y utilizado experimentalmente con el sistema indicado:

- Un reactor diferencial de lecho fijo y recirculación que permite eliminar los efectos del transporte externo y cuya comparación con un tanque agitado, mezcla perfecta, con enzimas en disolución permite el estudio independiente de la influencia del transporte interno.
- Un método para la determinación simultánea de la difusividad efectiva en la enzima inmovilizada sobre un soporte sólido y de la actividad relativa de la enzima inmovilizada a la enzima libre cuando se comparan experimentos realizados en las mismas condiciones en los dos dispositivos anteriormente comentados.
- Un reactor diferencial de recirculación equipado con un módulo de fibra hueca que permite el estudio experimental de este sistema de inmovilización de la enzima.

Con respecto al segundo objetivo se han desarrollado:

- Un método numérico para la determinación del factor de efectividad, incluyendo la desviación de la cinética lineal, basado en la interacción difusión-reacción a través de partículas porosas, que aplicado a ecuaciones cinéticas tipo Michaelis-Menten ha permitido proponer una correlación basada en la de Kobayashi et al. (1976) pero más precisa y válida en un intervalo más amplio de los parámetros cinéticos.

- Un modelo para la interacción transporte interno-reacción para enzimas inmovilizadas en la matriz de un gel que permite explicar los bajos valores del factor de tortuosidad, de 1 a 2, encontrados generalmente con estos sistemas y que se basa en la estructura real de estos catalizadores enzimáticos.

Simultáneamente, la aplicación de ambos objetivos al sistema seleccionado ha permitido desarrollar un modelo cinético para la isomerización glucosa-fructosa y determinar sus parámetros cinéticos, así como la influencia sobre los mismos de la concentración total de hexosas y de la temperatura.

3. TECNICA EXPERIMENTAL

3.1 Productos utilizados.

El sustrato empleado ha sido D-(-) Fructosa de la marca Merck y la enzima utilizada en los ensayos de isomerización, D-xilosa-ketol-isomerasa [E.C.5.3.1.5] en dos formas: una soluble, Spezyme GI, y otra inmovilizada, Sweetzyme T.

La enzima Spezyme GI ha sido suministrada por Genencor International y es un concentrado de glucosa isomerasa derivado a partir de una cepa seleccionada de *Streptomyces rubiginosus*, se presenta en forma de un líquido marrón de densidad media 1.26 g/mL y una actividad media declarada de 3500 GIU/g, presentando sus máximas condiciones de estabilidad entre pH 6.0 y 7.5. Una unidad de actividad (GIU) se define como la cantidad de enzima que convierte glucosa a fructosa a una velocidad inicial de 1 $\mu\text{mol}/\text{min}$ bajo las siguientes condiciones: concentración de glucosa 2.0 mol/L; pH = 7.0 y 60°C.

La enzima Sweetzyme Tipo T, es una enzima inmovilizada suministrada por Industrias Novo, obtenida a partir de una cepa seleccionada de *Streptomyces murinus* y cuyas características se muestran en la Figura 3.1. Como puede observarse, la estabilidad relativa de la enzima disminuye a medida que aumenta la temperatura, mientras que la actividad aumenta con ésta, presentando la máxima estabilidad entre pH 7.2 y 7.5. La actividad enzimática declarada por el fabricante es de 300 IGIU/g, siendo una IGIU la cantidad de enzima que convierte glucosa en fructosa a una velocidad inicial de 1 $\mu\text{mol}/\text{min}$ utilizando una concentración de glucosa inicial de 3.0 M, 60°C y pH = 7.5.

Las características de los restantes productos utilizados son:

- Sodio carbonato anhidro, purísimo, Merck > 99.5%.
- Magnesio sulfato 7-hidrato, reactivo puro Carlo Erba > 99.5%.
- D (+) glucosa anhidra, purísima, Panreac.
- Glucosa-oxidasa, de *Aspergillus niger*, cruda, Sigma.
- Acido cítrico, anhidro para análisis, Panreac, 99.5%.

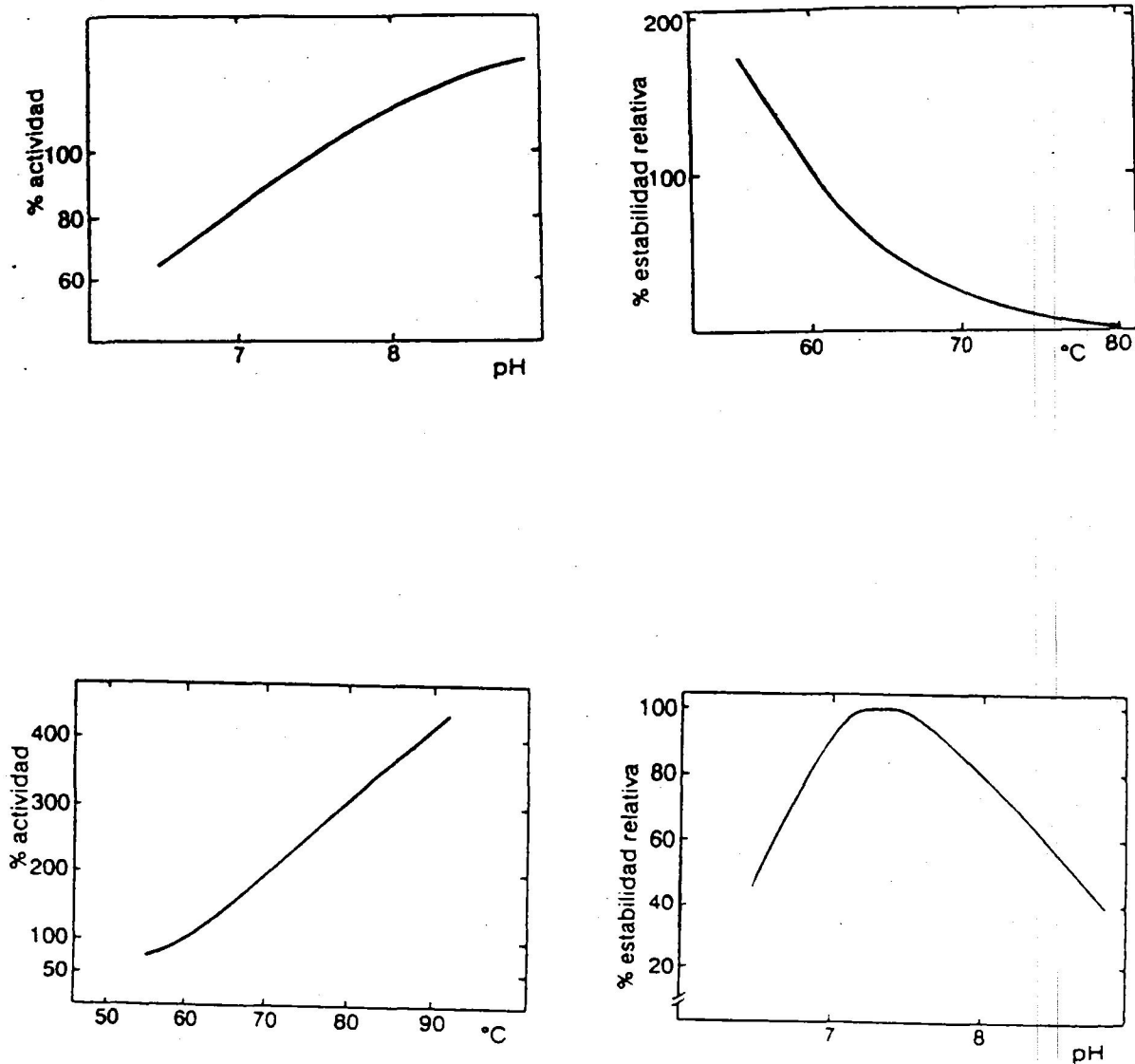


Figura 3.1. Características de la enzima sweetzyme T.

- Oxígeno, Oxhídrica Malageña, envasado en balas de acero a 50 atm, 99%.
- Titanio bióxido, químicamente puro, Probus.
- Agua oxigenada, neutra estabilizada, 3%.
- Sodio tiosulfato 5-hidrato purísimo, Panreac.
- Almidón, pro-análisis, Merck.
- Potasio ioduro, para análisis, Panreac.
- Potasio dicromato, pro-análisis, Merck > 99.5%.
- Amónico molibdato, para análisis, Panreac.
- Acido sulfúrico, 66 °Bé, Probus, 95-97%.

3.2 Procedimiento experimental.

La reacción de isomerización siempre se ha realizado partiendo de disoluciones de fructosa, salvo en los experimentos realizados para la determinación de la composición de equilibrio en que se partía de disoluciones de glucosa y fructosa. La cinética del proceso se ha seguido analizando la concentración de glucosa en función del tiempo hasta un máximo de 3 horas. Teniendo en cuenta las condiciones óptimas de estabilidad recomendadas por los fabricantes de las enzimas utilizadas, se ha elegido como pH de operación 7.5, para todos los experimentos realizados.

La disolución de fructosa se preparaba disolviendo la cantidad necesaria en una disolución de $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ de 0.55 g/L, ya que los iones Mg^{2+} están recomendados para conseguir la estabilidad de la enzima. El pH se ajustaba posteriormente a 7.5 con una disolución de Na_2CO_3 0.1 M. Las variables ensayadas en la isomerización fructosa-glucosa se muestran en la Tabla 3.1.

3.2.1 Reactor homogéneo.

El dispositivo experimental utilizado para la realización de los experimentos de isomerización se esquematiza en la Figura 3.2 y consta de: un reactor encamisado de 250 mL de capacidad, con tapa separable provista de cinco bocas esmeriladas por las que se introduce el agitador, un termómetro, un electrodo de pH y se realiza la toma de muestras. El agitador es una varilla acabada en ancla, accionada por un motor eléctrico a una velocidad suficiente para que exista una

TABLA 3.1
VARIABLES ENSAYADAS EN LOS EXPERIMENTOS DE ISOMERIZACION

	Enzima	Caudal, L/h	s_0 , M	Temperatura, °C
Reactor homogéneo	0.2 g/L		0.5	40
	2.0 g/L		1.0	50
	6.3 g/L		2.0	60
Reactor de lecho fijo de recirculación	3.5 g	6.6	0.5	30
	5.0 g	11.4	1.0	40
	7.0 g	21.0	1.5	50
	14.0 g	35.0	2.0	60
Reactor de fibra hueca de recirculación	1.26 g	35.0	1.0	60
	2.52 g			

buena mezcla en todos los experimentos. El sistema está termostatzado por la conexión de la camisa del reactor a un baño a temperatura constante.

El procedimiento operatorio ha sido el siguiente: una vez preparada la disolución de fructosa, tal como se ha descrito en el apartado anterior, se introduce en el reactor hasta que alcance la temperatura deseada. En ese momento se añade la enzima y se empieza a contar el tiempo de reacción. A intervalos regulares se toman muestras de 1 mL de la mezcla reaccionante en tubos de ensayo roscados. La reacción se detiene introduciendo dichos tubos en un baño de agua hirviendo durante 10 min. para desnaturizar la enzima. Transcurrido este tiempo, se enfriaban los tubos y se centrifugaban las muestras a 6000 rpm durante 5 min. Terminada la centrifugación, se tomaban alícuotas del sobrenadante y se diluían convenientemente para poder realizar el análisis de glucosa.

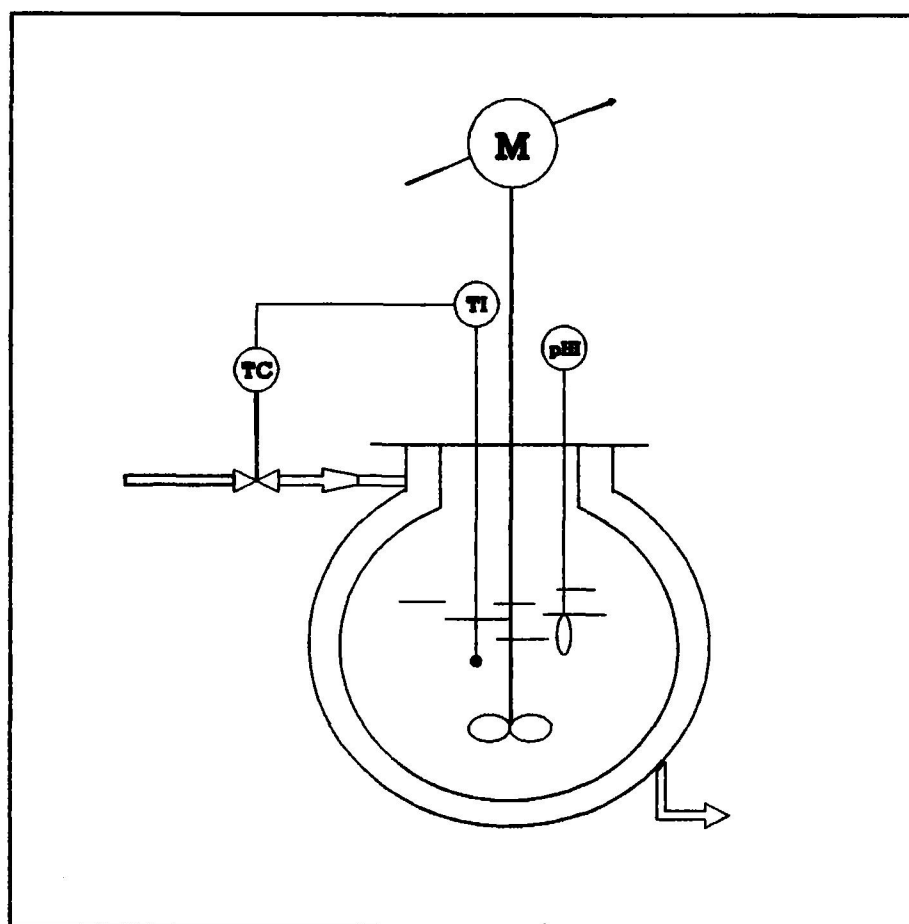


Figura 3.2. Dispositivo experimental para el reactor homogéneo.

3.2.2 Reactor de lecho fijo de recirculación.

El dispositivo experimental utilizado en este trabajo está esquematizado en la Figura 3.3, y consta de las siguientes partes:

- Un tanque encamisado de 250 mL de capacidad, con tapa separable provista de cinco bocas esmeriladas por las cuales se introduce un agitador, un termómetro, el retorno del reactor de lecho fijo y se realiza la toma de muestras. Este tanque actúa como depósito de alimentación del reactor de lecho fijo. El agitador es una varilla acabada en ancla, accionada por un motor eléctrico a una velocidad suficiente para que exista una buena mezcla en todos los experimentos. En la parte inferior del tanque se dispone de una salida por donde se alimenta el reactor de lecho fijo.

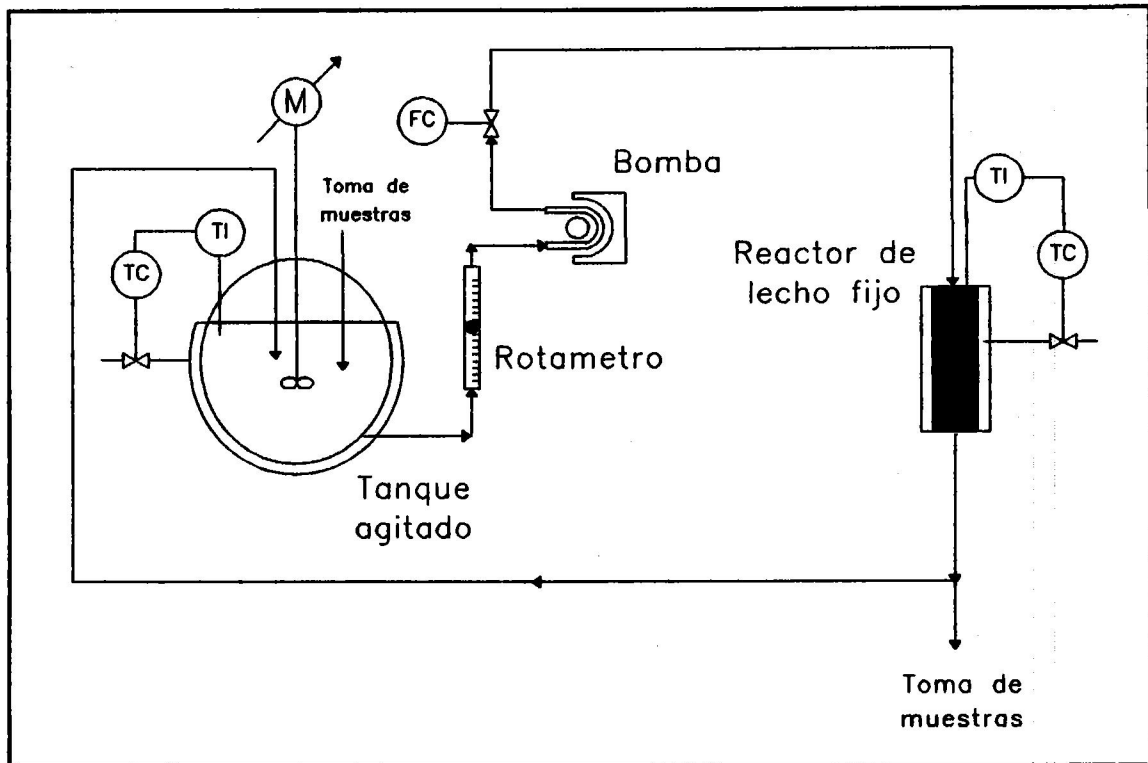


Figura 3.3 Dispositivo experimental para el reactor de lecho fijo.

- Una bomba peristáltica que hace que circule el líquido a través del circuito.
- Un rotámetro que permite controlar la velocidad de flujo, y que ha sido calibrado experimentalmente dando caudales comprendidos entre 5 y 60 L/h.
- Reactor de lecho fijo encamisado, con forma cilíndrica, de 2.5 cm de diámetro interno y 9 cm de altura, en el que está confinada la enzima inmovilizada. Para que no exista arrastre dispone a la entrada y salida de placas de vidrio poroso.
- Sistema de termostatación que bombea agua a la temperatura deseada a través de la camisa del reactor y del tanque.

El procedimiento experimental seguido para éste dispositivo experimental es el siguiente:

Antes de comenzar la reacción se introduce la enzima en el reactor de recirculación, se conecta la bomba y se hace circular por el lecho la disolución de $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ durante 30 minutos para estabilizar la enzima y arrastrar la posible enzima adsorbida en el soporte, posteriormente se retira la disolución y se introduce en el tanque la disolución de fructosa a la concentración deseada, previamente preparada.

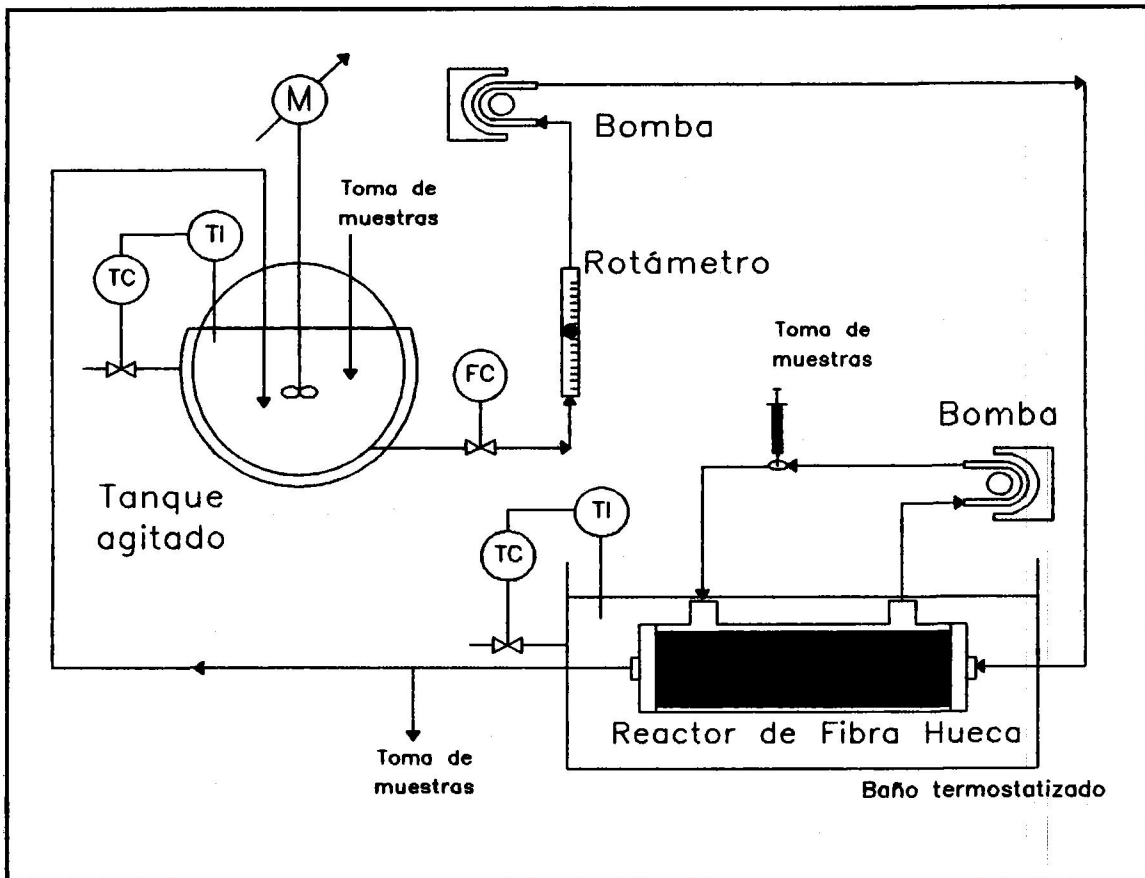
Una vez estabilizada la enzima y conseguida la temperatura deseada en el tanque de alimentación, se empieza a pasar la disolución de fructosa por el reactor, comenzando el tiempo de isomerización.

La cinética del proceso se sigue por medidas de la concentración de glucosa a la entrada y salida del reactor. Como entrada se toman muestras en el tanque agitado y para la salida se sacan por una T dispuesta al efecto entre el reactor y el tanque. En ambos casos el volumen de muestra tomado es de 1 mL. Para comprobar que no existe arrastre de enzima a través de las placas de vidrio poroso hasta el tanque, en varios experimentos, a las temperaturas de 30 y 40 °C, después de terminada la reacción de isomerización se desconecta la bomba manteniendo la temperatura y agitación en el interior del tanque; después de 3 horas la concentración de glucosa permanece constante, por lo que se deduce que la reacción tiene lugar solo en el reactor de lecho fijo.

3.2.3 Reactor de fibra hueca de recirculación.

La instalación experimental que se ha utilizado para la realización de los experimentos con el reactor de fibra hueca se esquematiza en la Figura 3.4, y está formado por los siguientes elementos:

- Un tanque de almacenamiento igual al utilizado en el reactor de lecho fijo.
- Un rotámetro.



- Un módulo de fibra hueca modelo NT-1808-S, de Sorin Biomedica, de 228 mm de longitud, 39.5 mm de diámetro y 165 g de peso. El módulo está provisto de dos compartimentos: un compartimento en el interior de las fibras y una carcasa que ocupa el espacio anular entre las fibras y el exterior de la pared. Ambos compartimentos están separados por membranas de Cuprophan de corte molecular 5 kDa, a través de la cual pueden pasar el sustrato y los productos de la reacción, pero no la enzima cuyo peso molecular es de 165 kDa. El reactor de fibra hueca está sumergido en un baño termostático. Las características de fracción retenida y permeabilidad hidráulica del módulo se muestran en las Figura 3.5.
- Dos bombas peristálticas: una que permite la circulación del líquido por el interior de las fibras del módulo y otra que recircula la disolución contenida en la carcasa, en contracorriente con la circulación de las fibras.

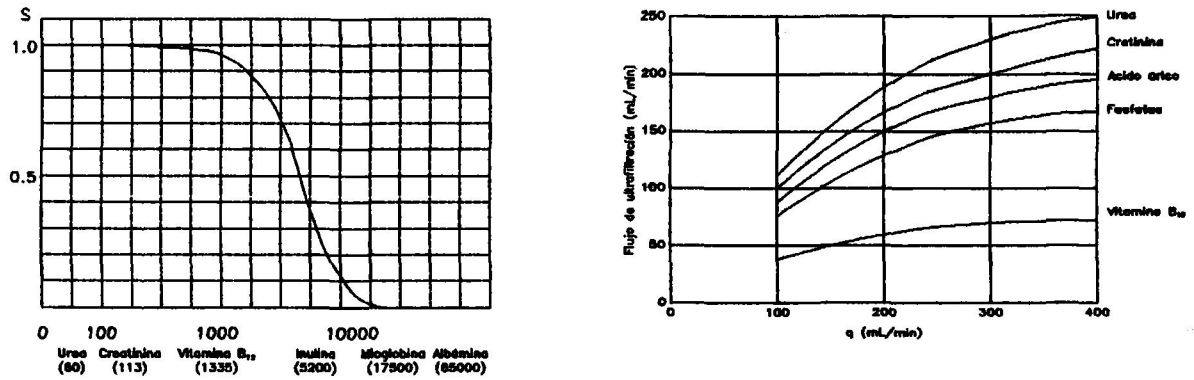
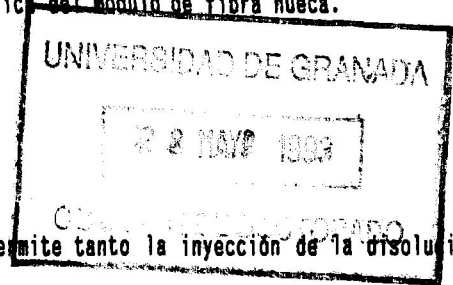


Figura 3.5. Fracción retenida y permeabilidad hidráulica del módulo de fibra hueca.



- Un sistema instalado en el circuito de la carcasa y que permite tanto la inyección de la disolución de enzima como la toma de muestras.
- Dos baños que mantienen y controlan la temperatura de experimentación tanto en el tanque agitado como en el reactor de fibra hueca.

Determinación del volumen de la carcasa.

Para estimar el volumen de la carcasa y las conducciones que conectan a la bomba peristáltica, donde está confinada la enzima cuando el sistema está en funcionamiento, se realizaron ensayos de actividad enzimática utilizando la enzima glucosa-oxidasa, ya que su medida de actividad, al realizarse en concentraciones mucho más bajas, era más precisa.

Para realizar esta medida se llenaba el sistema con tampón cítrico-citrato de pH = 5.6, y se ponía en funcionamiento hasta alcanzar la temperatura de 25°C. En ese momento se inyectaban 5 mL de una disolución enzimática de 7.5 g/L, transcurridos 15 y 30 min. se tomaron muestras de 1 mL de la carcasa, y 0.5 mL de éste se utiliza para el ensayo de actividad, realizado a 90 s descrito en el apartado 3.4.1 de

esta memoria. A partir de las ecuaciones [3.7] a [3.9] se obtienen los resultados que se indican en la Tabla 3.2, determinada la concentración enzimática en cada momento y sabiendo la cantidad de enzima puesta inicialmente en el circuito se puede estimar el volumen de la carcasa, que ha resultado ser de 200 mL, como se observa en la Tabla 3.2.

TABLA 3.2

t, min	V_{enz} , mL	A	U.E.	$[GO]_{carcasa}$, mg/L	Volumen carcasa, mL
15	0.5	0.116	0.675	0.188	199
30	0.5	0.114	0.663	0.185	202

Determinación del transporte de glucosa y fructosa a través de la membrana.

Como ya se ha comentado en la parte 2.3.3 de esta memoria, la creación de diferencias de presión efectiva entre el circuito de las fibras y la carcasa hace que se produzca transporte másico a través de las fibras, lo que puede favorecer la transferencia del sustrato y producto de la reacción a través de ellas.

Cuando el fluido circula a través de las fibras, la presión decrece continuamente; si la caída de presión es importante cerca de la entrada del fluido en las fibras, la presión es más alta que en el lado de la carcasa, causando ultrafiltración de soluto y disolvente hacia la carcasa. A la salida de las fibras la presión es más alta en el lado de la carcasa, lo que provoca una entrada de líquido de la carcasa a las fibras. Este efecto estará intensificado a caudales altos de circulación y funcionamiento en contracorriente de ambos circuitos.

Para comprobar la resistencia a la transferencia de materia que oponía la membrana del reactor de fibra hueca, se realizaron dos experimentos de circulación con glucosa y fructosa en las mismas condiciones hidrodinámicas en que se realizaron los ensayos cinéticos: funcionamiento del sistema en contracorriente y caudal de circulación $q = 35$ L/h.

Los experimentos se realizaron de la forma siguiente: se llenaba el circuito con 500 mL de agua destilada y se ponía el sistema en funcionamiento, alcanzada la temperatura de operación 60°C, se paraban las bombas, aunque no la agitación del tanque, y se añadían 100 mL de la disolución de glucosa o fructosa preparada para conseguir una concentración total de 17 g/L de glucosa y 180 g/L de fructosa. Transcurridos 5 minutos las bombas peristálticas eran puestas en funcionamiento y se comenzaba a contar el tiempo, a intervalos regulares de tiempo se tomaban muestras de la carcasa y del tanque de almacenamiento analizándose el contenido en glucosa en ambos experimentos por el método de la glucosa oxidasa.

Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 3.3. Como se puede observar al minuto de funcionamiento la mezcla era perfecta, indicando una resistencia a la transferencia de materia prácticamente nula por parte de la membrana y las películas de ambos fluidos en las condiciones ensayadas.

Procedimiento operatorio.

Una vez preparada la disolución de fructosa a pH = 7.5 y una concentración de $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ de 0.55 g/L, se llena el circuito con 600 mL de ésta y se ponen en funcionamiento las bombas hasta que se alcance la temperatura de operación. En ese instante se inyecta la enzima en el circuito de la carcasa y se empieza a contar el tiempo de reacción. A intervalos regulares se tomaban muestras del tanque de alimentación, de la salida del reactor y de la carcasa, analizándose su contenido en glucosa. Las muestras extraídas de la carcasa se filtraban con centrifugación utilizando unidades ultrafree de Millipore de 30 kDa de corte, antes de proceder al ensayo de glucosa.

Los experimentos cinéticos se llevaban a cabo hasta un máximo de 3 horas. Para comprobar que la enzima no pasaba a través de las fibras, se realizaron varios ensayos en los que una vez finalizado el experimento cinético se mantuvo el sistema hasta 2 horas con agitación en el tanque y sin circulación a través de la carcasa, observándose que la concentración de glucosa en el tanque permanecía constante en función del tiempo.

Una vez finalizados los experimentos se limpiaba el circuito con abundantes cantidades de agua destilada y las fibras eran esterilizadas con una disolución de formaldehído al 1%.

TABLA 3.3
PRUEBAS DE CIRCULACION A TRAVES DE LA MEMBRANA

Experimento con glucosa

t, min	[G] _{tanque} , g/L	[G] _{carcasa} , g/L
5	17.08	16.96
10	16.99	17.02
15	16.96	16.99

Experimento con fructosa

t, min	[G] _{tanque} , g/L	[G] _{carcasa} , g/L
1.00	0.389	0.333
1.75	0.386	0.371
2.00	0.385	0.375
2.50	0.385	0.378
3.00	0.383	0.381
3.50	0.383	0.382
4.50	0.384	0.381
10.00	0.386	0.386

3.3 Métodos de análisis.

Análisis de glucosa.

El análisis de glucosa se ha realizado por el método de la glucosa-oxidasa, método GOD-Perid, propuesto por Werner y col (1970), basado en las reacciones



donde GOD es la enzima glucosa-oxidasa, POD la enzima peroxidasa y ABTS es el 2,2'-azimo-di-[3-etil-benzotiazolina-ácido sulfónico-(6)]-sal diamónica. Esta última sustancia es incolora mientras que su forma oxidada, producida por la reacción [3.2] es de color verde.

La determinación de glucosa se realiza en un tubo de ensayo añadiendo 0.1 mL de disolución problema, a 5 mL de reactivo; esta disolución se incuba durante 15 minutos a 37°C y se mide su absorbancia a 610 nm frente a un blanco compuesto por 5 mL de reactivo y 0.1 mL de una disolución de la misma composición que la problema pero exenta de glucosa.

Se ha obtenido la recta patrón realizando el ensayo descrito previamente a una serie de disoluciones de glucosa de concentración comprendidas entre 50 y 500 mg/L. En la Figura 3.6 se muestra a título de ejemplo, una de estas rectas cuya ecuación es

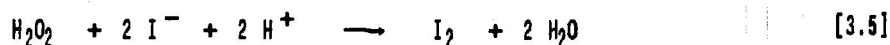
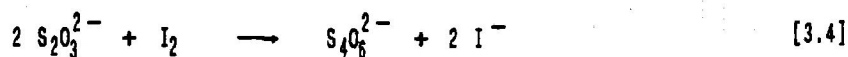
$$G = -0.0018 + 0.6120 \cdot A_{610\text{nm}} \quad r^2 = 0.99996 \quad [3.3]$$

El reactivo utilizado es un preparado comercial (Boehringer Mannheim GmbH, No 124036) que contiene, en proporciones definidas las enzimas GOD y POD, el compuesto ABTS y un tampón de fosfato, siendo necesario tan solo diluirlo con agua destilada a un volumen definido. Para cada nuevo preparado de reactivo se obtuvo una recta patrón.

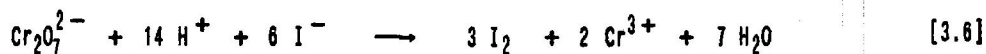
Valoración de H_2O_2 .

Se parte de una disolución de H_2O_2 comercial, reactivo de análisis, que se valora por el método iodométrico.

La valoración del H_2O_2 se basa en las dos reacciones siguientes



Debido a que el tiosulfato sódico no es una sustancia patrón, una vez preparada la disolución del mismo, se debe proceder a su valoración con una sustancia que si lo sea, utilizándose en este caso dicromato potásico. La ecuación ahora implicada, será la siguiente, Kolthoff (1972):



Como concentración del H_2O_2 siempre se ha tomado el valor medio del al menos tres determinaciones y que en ningún caso diferían en más de un 1% de dicho valor medio.

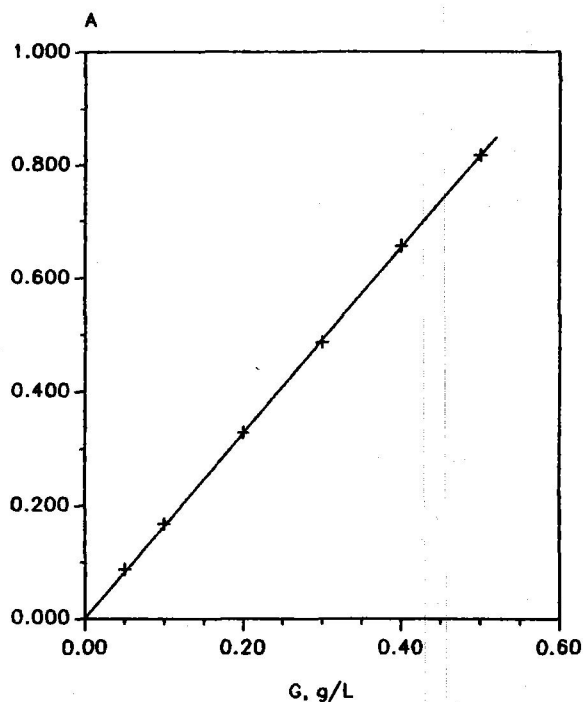


Figura 3.6. Recta patrón para el reactivo de glucosa.

Preparación de los patrones. Obtención de la recta de calibrado.

Se prepara una disolución madre de H_2O_2 0.1 M en tampón cítrico-citrato, pH = 5.6, mediante la dilución apropiada de la disolución de H_2O_2 comercial utilizada, y que había sido valorada previamente. Las concentraciones de los patrones utilizados son 0.5; 1.0; 1.5; 2.0; 2.5 y 3.0 mM de H_2O_2 .

La recta patrón se obtenía añadiendo 2.0 mL de glucosa 0.1 M a 2.0 mL del patrón elegido a 25°C. A continuación se añaden 2.0 mL de $\text{Ti}(\text{SO}_4)_2$ y se mide la absorbancia a 415 nm frente al blanco (preparado de la misma manera pero sustituyendo los 2.0 mL del patrón por la misma cantidad del tampón cítrico-citrato), en un espectrofotómetro con cubetas de 1 cm de paso. Para hacer la medida de la absorbancia es necesario esperar 20 minutos para que se estabilice el color. La concentración final de H_2O_2 será la tercera parte de la concentración de los patrones utilizados, ya que el volumen total es de 6.0 mL.

En la Tabla 3.4 se muestran los resultados obtenidos, y por regresión lineal:

$$A = -0.0018 + 7.564 \cdot 10^{-3} [\text{H}_2\text{O}_2], \quad r^2 = 0.9999 \quad [3.7]$$

TABLA 3.4

$[\text{H}_2\text{O}_2]_{\text{patrón}}, \text{ mM}$	$[\text{H}_2\text{O}_2], \text{ mM}$	A
0.5	0.1667	0.123
1.0	0.3333	0.248
1.5	0.5000	0.378
2.0	0.6667	0.500
2.5	0.8333	0.634
3.0	1.0000	0.752

3.4 Medida de la actividad enzimática.

3.4.1 Glucosa oxidasa.

Para poder determinar el volumen del circuito de la carcasa del reactor de fibra hueca se realizaron ensayos de actividad enzimática para la enzima glucosa oxidasa a diferentes concentraciones de enzima.

Para la realización de este ensayo se utilizó una concentración de glucosa oxidasa, [GO], de 7.5 g/L en tampón cítrico-citrato de pH = 5.6.

El procedimiento de trabajo era el siguiente:

Se añaden x mL de enzima a 4.0 mL de glucosa 0.1 M, en el mismo tampón, saturados de O_2 (para ello se introducían en un baño a $25^\circ C$ y se hacía pasar por ellos una corriente gaseosa de O_2 puro durante 15 min), al cabo de 1 minuto se añaden 2.0 mL de $Ti(SO_4)_2$. Durante el tiempo de reacción se siguió burbujeando O_2 . La absorbancia se mide a 415 nm frente a un blanco preparado de igual modo pero añadiendo antes el sulfato de titanio y después la enzima. La lectura se realiza también transcurridos 20 minutos.

Con la absorbancia obtenida del ensayo de actividad se evalúa la concentración de H_2O_2 generada a partir de la ecuación [3.7].

Si una unidad enzimática se define como los $\mu moles$ de H_2O_2 producidos por minuto, se pueden calcular las UE correspondientes a cada ensayo realizado por

$$UE = \frac{[H_2O_2] (6 + x)}{t}, \quad \mu moles_{H_2O_2}/min \quad [3.8]$$

Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 3.5. Las unidades enzimáticas están relacionadas con los gramos de enzima añadidos para realizar el ensayo de actividad mediante la ecuación

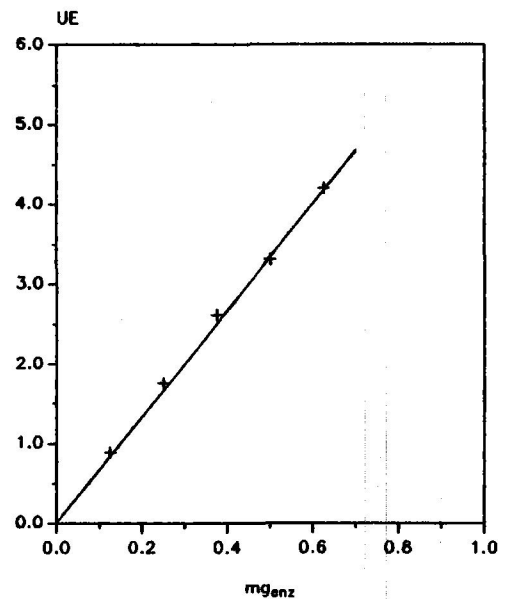


Figura 3.7. Medida de actividad de glucosa oxidasa

TABLA 3.5

$[GO]_F$, g/L	A	$[H_2O_2]$, mM	UE	S_{enzima}
0.0207	0.109	0.1465	0.886	$1.25 \cdot 10^{-4}$
0.0410	0.217	0.2892	1.764	$2.50 \cdot 10^{-4}$
0.0610	0.320	0.4254	2.616	$3.75 \cdot 10^{-4}$
0.0806	0.402	0.5338	3.309	$5.00 \cdot 10^{-4}$
0.1000	0.507	0.6726	4.203	$6.25 \cdot 10^{-4}$

$$UE = 0.0485 + 6660 \cdot S_{enz} \quad r^2 = 0.9988 \quad [3.9]$$

que se representa en la Figura 3.7. Las ecuaciones [3.7] a [3.9] nos permiten evaluar las concentraciones de glucosa oxidasa añadida para realizar un ensayo de actividad.

3.4.2 Glucosa isomerasa libre.

El ensayo de actividad para la enzima libre se realizaba en tubos roscados de 20 mL de la siguiente forma: a 5 mL de una disolución de fructosa 1 M y pH = 7.5, obtenido ajustando con carbonato sódico 0.1 M y una concentración de 0.55 g/L en $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$ se añadían 0.2 mL de disolución de enzima, spezyme GI, manteniendo la reacción a 50°C durante 10 minutos. Transcurrido este tiempo se desactivaba térmicamente la enzima introduciendo el tubo en agua hirviendo durante 10 minutos. Las muestras eran centrifugadas durante 5 minutos a 6000 rpm y su contenido en glucosa era determinado mediante el método de la glucosa oxidasa, mencionado anteriormente.

Los experimentos se realizaron a distintas concentraciones de enzima, 10, 20 y 40 g/L; los resultados obtenidos se representan en la Figura 3.8. Como se observa, la actividad enzimática es proporcional a la concentración de enzima, evaluándose la actividad a partir de la pendiente, en Unidades Internacionales, UI, como μmol de glucosa producidas por minuto y gramo de enzima, resultando un valor de 1110 UI. El valor de la ordenada en el origen obtenido de 0.629 g/L de glucosa es superior a la concentración inicial de glucosa contenida en la fructosa 0.421 g/L. Esta diferencia puede ser debida al efecto del incremento de temperatura provocado en la muestra antes de la desactivación total de la enzima contenida en la misma.

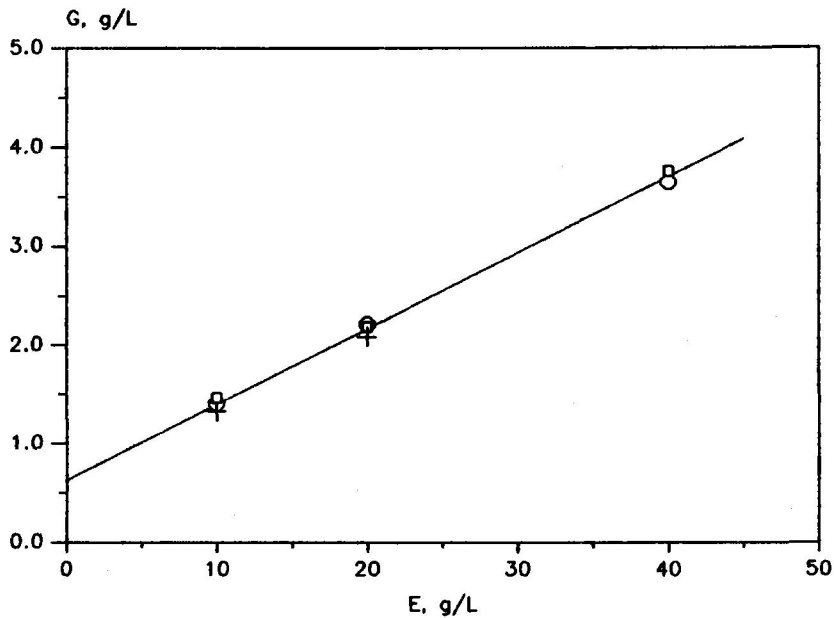


Figura 3.8. Medida de actividad de la enzima spezyme.

Para comprobar este hecho se realizaron ensayos de actividad congelando la reacción de diferentes formas, y utilizando como blanco para el ensayo de glucosa una disolución de fructosa 1 M disuelta en una disolución de 0.55 g/L de $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ y pH = 7.5.

En unos ensayos la enzima era retirada del medio mediante filtración con centrifugación, utilizando unidades ultrafree de Millipore con un paso de membrana del 30 kDa, y en otros se desactivaba la enzima con ácido acético 0.1 N. Los resultados obtenidos se indican en la Tabla 3.6. Como se puede observar, la forma de congelar la reacción enzimática repercute en las medidas de actividad realizadas.

Sin embargo en los experimentos cinéticos, en los que se utilizan concentraciones de enzima mucho menores, esta diferencia es prácticamente despreciable, tal como se pone de manifiesto en la Figura 3.9, donde se ha representado la conversión obtenida frente al tiempo de reacción para un experimento realizado en el reactor homogéneo con una concentración de enzima de 6.3 g/L a la temperatura de 60°C y una concentración de fructosa 1 M.

En consecuencia se eligió la desactivación térmica por su facilidad operatoria en los experimentos de isomerización en fase homogénea.

TABLA 3.6
 INFLUENCIA DE LA FORMA DE CONGELACION DE LA REACCION SOBRE LA
 VELOCIDAD ENZIMATICA. G, g/L

Desactivación térmica, g/L	Filtración de enzima, g/L	Desactivación ácida
1.111	0.718	0.589
1.034	0.724	0.565
1.104	0.767	0.595
1.154	0.865	0.614

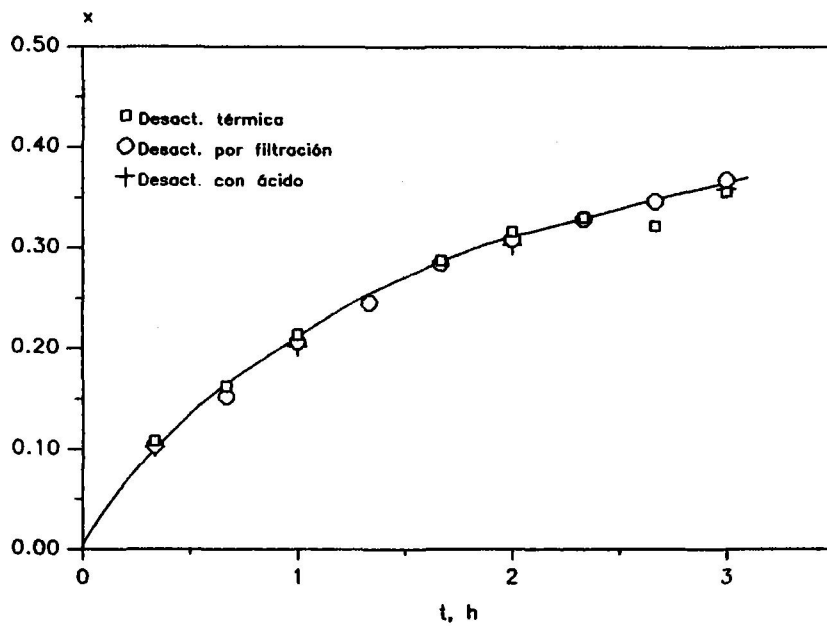


Figura 3.9. Comparación de los distintos de desactivación enzimática.

3.4.3 Glucosa isomerasa inmovilizada.

Para la medida de la actividad enzimática se han realizado experimentos de isomerización de fructosa-glucosa hasta conversiones del 10% de glucosa, manteniendo constante la concentración de sustrato 1 M, la temperatura, 50°C, y variándose la cantidad de enzima utilizada, 3.5; 5.0; 7.0 y 14.0 g. Figura 3.10.

La actividad enzimática se define como la velocidad de reacción a tiempo cero expresada como μmoles de glucosa producidos por minuto y gramos de enzima. En la Tabla 3.7 se muestra la actividad enzimática obtenida para las distintas masas de enzima ensayadas, como se puede observar, ésta permanece constante y se ha tomado el valor medio de 109 μmoles de glucosa/minuto y enzima, en las condiciones anteriormente expuestas.

TABLA 3.7
MEDIDAS DE ACTIVIDAD DE SWEETZYME

m_{enz} , g	Actividad, $\mu\text{mol/g}\cdot\text{min}$
3.5	112.5
5.0	111.2
7.0	114.5
14.0	98.0
Actividad media	109.1

3.5 Estabilidad de la glucosa isomerasa.

3.5.1 Glucosa isomerasa libre.

Para analizar la estabilidad de la enzima spezyme GI en las condiciones de operación se realizaron ensayos de actividad después de mantener a la enzima a las temperaturas de 50 y 60°C, pH = 7.5 y disolución de $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ 0.55 g/L durante 180 minutos, condiciones extremas de operación en esta investigación.

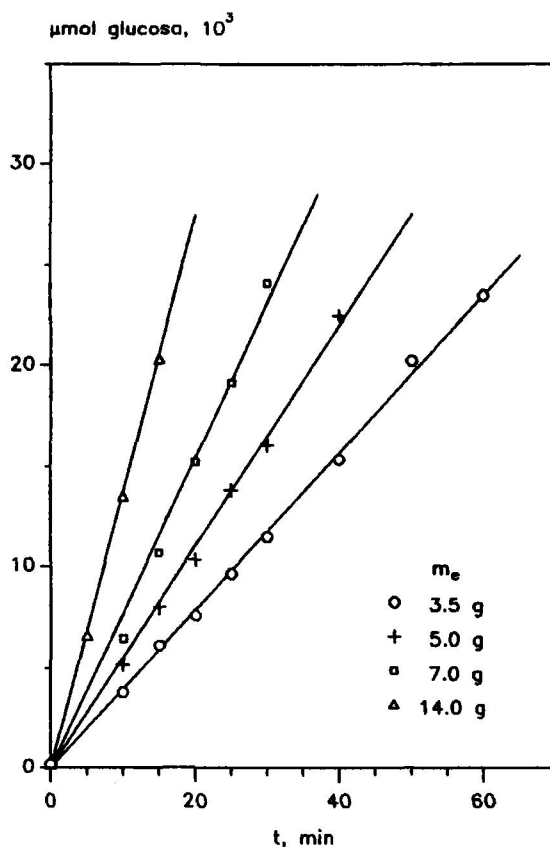


Figura 3.10. Actividad sweetzyme T.

Para la temperatura de 50°C la enzima, a concentración de 20 g/L se mantenía a esta temperatura en tubos de ensayo roscados dentro de un baño termostatzado. A diferentes tiempos eran enfriados y se tomaban muestras de la enzima para realizar el ensayo de actividad enzimática mencionado anteriormente. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 3.11 observándose que la actividad permanecía constante hasta las tres horas, tiempo máximo utilizado en los experimentos de isomerización.

Los ensayos realizados a la temperatura de 60°C se hicieron en el reactor de fibra hueca, introduciendo 3.78 g de la enzima en la carcasa del reactor (200 mL) manteniendo éste en funcionamiento. A intervalos regulares de tiempo se tomaban muestras de la enzima y se realizaban ensayos de actividad enzimática; los resultados obtenidos en estas condiciones se presentan en

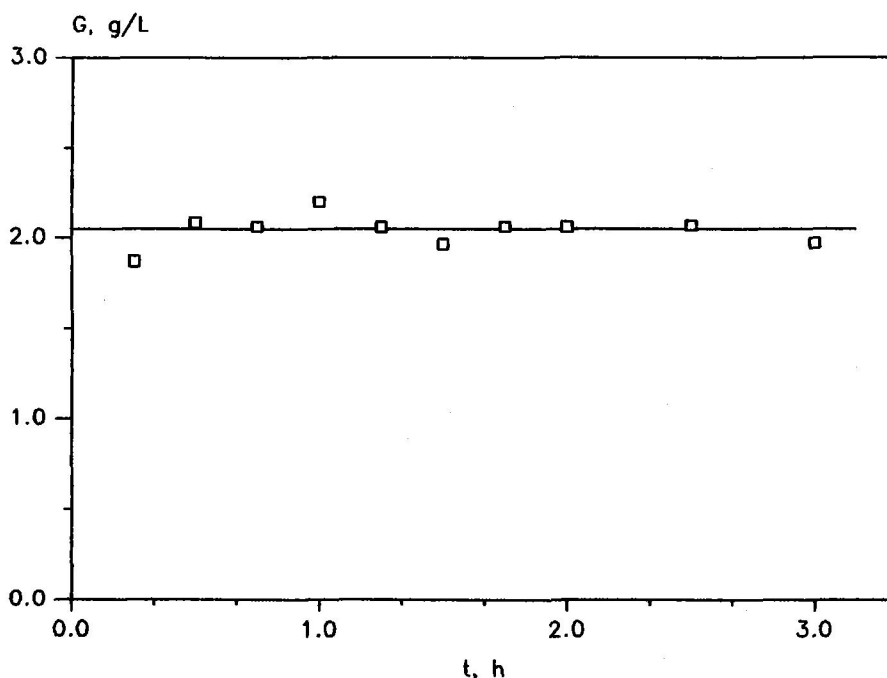


Figura 3.11. Estabilidad de spezyme. $T = 50^{\circ}\text{C}$.

la Figura 3.12. Estos resultados ponen de manifiesto que la enzima no se desactiva hasta un tiempo de 180 minutos a la temperatura de 60°C ni tampoco parecen existir fenómenos de polarización debidos a la ultracentrifugación, ya que la actividad enzimática permanece constante con el tiempo e igual a la actividad de la disolución enzimática antes de ser introducida en la carcasa.

Sin embargo la actividad de esta enzima, aunque era mantenida a la temperatura de 4°C , disminuía con tiempos prolongados de almacenamiento, este hecho puede observarse en la Tabla 3.8, donde se muestran los valores de actividad obtenidos de la enzima spezyme en distintas fechas.

La actividad enzimática era medida antes y después de la realización de series de experimentos, comprobándose que en ese intervalo la pérdida de actividad sufrida por la enzima era despreciable.

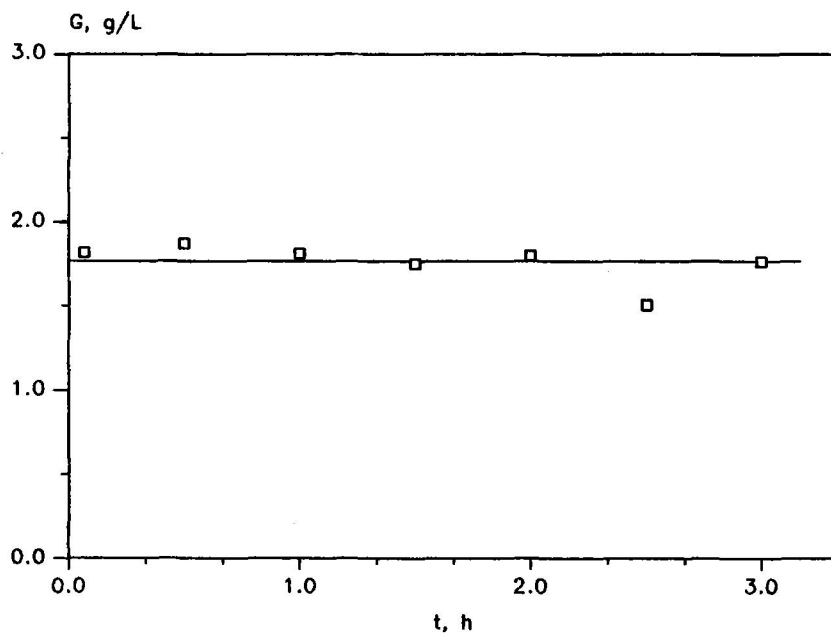


Figura 3.12. Estabilidad de spezyme en el reactor de fibra hueca. $T=60^{\circ}\text{C}$.

TABLA 3.8

VARIACION DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA CON EL TIEMPO DE ALMACENAMIENTO

Fecha	Actividad, $\mu\text{moles}_{\text{glucosa}}/\text{min} \cdot \text{g}_{\text{enzima}}$
6/11/92	1142
6/11/92	1094
16/12/92	1110
26/ 4/92	909
27/ 4/93	920

3.5.2 Glucosa isomerasa inmovilizada.

La enzima sweetzyme T, en las condiciones de operación utilizadas en esta investigación debe conservar su actividad al menos durante 200 horas de funcionamiento según las indicaciones de NOVO Industrias. Para comprobar este hecho se realizaron varios experimentos de isomerización en el reactor de lecho fijo con la misma enzima, para ello era sacada del reactor, lavada y mantenida a 4°C. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 3.13. Como se puede observar, la actividad de la enzima disminuye con el tiempo de operación en funcionamiento discontinuo, quizás debido a las pérdidas de enzima tras la manipulación. Sin embargo, puede considerarse constante en el tiempo máximo de experimentación utilizado, 3 horas. De todas formas, los experimentos cinéticos se realizaron con enzima nueva y se comprobaba periódicamente su actividad, Figura 3.14, que como puede observarse permanecía constante con el tiempo de almacenamiento.

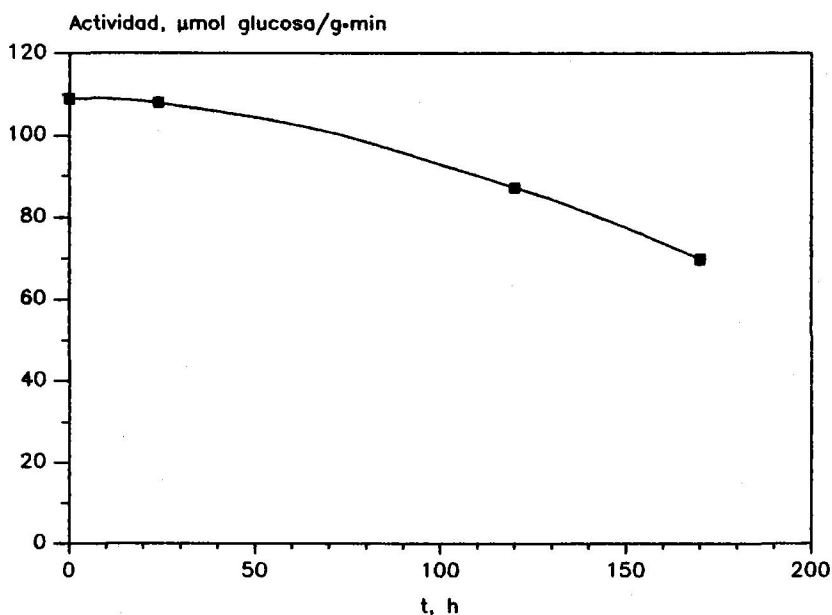


Figura 3.13.

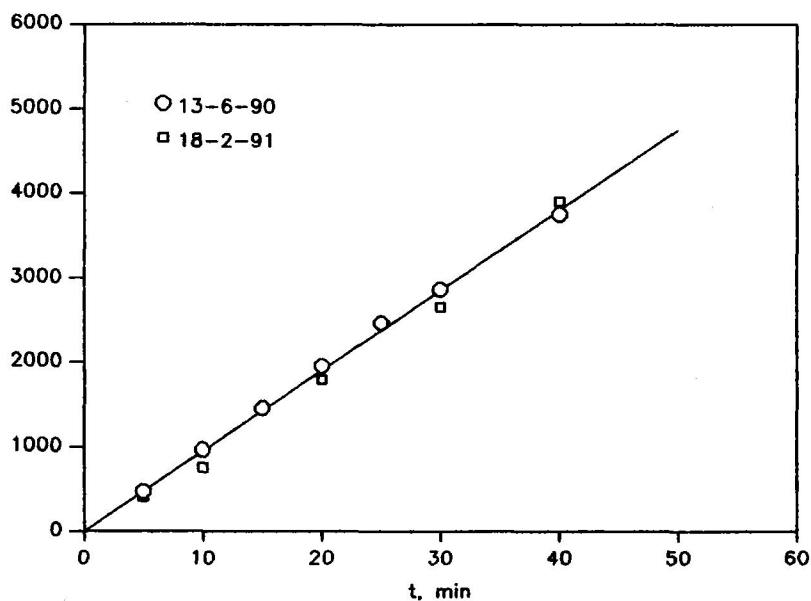


Figura 3.14. Comprobación de la actividad de sweetzyme durante el tiempo de operación.

3.6 Características de las partículas de glucosa isomerasa inmovilizada.

Para la determinación de las características físicas de las partículas de enzima inmovilizada, sweetzyme T, tanto secas como húmedas que son necesarias para la interpretación cinética de los resultados obtenidos, se recurrió a la técnica de penetración de mercurio y también se realizó un tratamiento de imágenes sobre las fotografías realizadas a dichas partículas; estos procedimientos se describen a continuación.

3.6.1 Penetración de mercurio.

La técnica de porosimetría de mercurio permite la determinación del volumen de mercurio introducido en los poros y espacios entre partículas, bajo presiones determinadas. Esta presión externa ejercida se relaciona con el tamaño de poro, mediante la ecuación desarrollada por Washburn

$$P = \frac{2 \sigma \cos \theta}{r} \quad [3.10]$$

donde P es la presión total aplicada al mercurio,
 σ es la tensión superficial del mercurio en el poro = 480 erg/cm^2 ,
 θ es el ángulo de contacto mercurio en las paredes del sólido = 140° ,
 r es el radio del poro, supuesto cilíndrico.

Según esta ecuación, el radio del poro que se ha llenado de mercurio es inversamente proporcional a la presión ejercida.

Para esta medida se ha utilizado un porosímetro de mercurio Quantachrome Autoscan 60, que alcanza una presión de 4200 kg/cm^2 , lo que permite conocer el volumen de mercurio penetrado en los poros cuyo diámetro sea superior a 3.7 nm . El equipo se completa con un ordenador, que mediante un programa apropiado, convierte, calcula y almacena los datos obtenidos.

La determinación experimental se realiza colocando alrededor de 0.3 g de muestra en el dilatómetro, el cual se introduce en un sistema de vacío, que está provisto de una bomba rotatoria que permite alcanzar un vacío cercano a 10^{-3} Torr . Una vez alcanzada esta presión se invierte el sistema, de forma que la entrada al dilatómetro queda sumergida en el mercurio; posteriormente, se deja entrar aire para que empuje al mercurio hasta llenar el dilatómetro.

Una vez lleno, se extrae el dilatómetro y se llena el nivel de mercurio hasta un enrase concreto, por diferencia entre las pasadas del dilatómetro vacío, lleno de mercurio y lleno de mercurio más muestra, en los dos últimos casos llevados al mismo enrase, se podrá calcular el volumen de mercurio desplazado por la muestra y, así, su densidad de partícula. Después de realizar dichas operaciones, el dilatómetro se introduce en la cámara de presión donde, tras ajustar las condiciones experimentales, tanto en el porosímetro como en el ordenador, se comienza a aumentar la presión hasta 3750 kg/cm^2 y se mide el volumen de mercurio introducido en los poros de la partícula.

Los resultados obtenidos han sido, para una muestra de 0.375 g , los siguientes:

Volumen de mercurio desplazado: 0.2859 cm^3
Densidad de las partículas secas: 1.3116 g/cm^3
Volumen introducido en los poros: $0.0547 \text{ cm}^3/\text{g}$

por lo que la porosidad de la partícula seca será:

$$\epsilon_p = \frac{\text{Volumen de huecos}}{\text{Volumen total}} = 0.0547 \cdot 1.3116 = 0.0717 \quad [3.11]$$

también se obtiene la distribución de tamaño de poros dentro de la partícula que se ha recogido en su totalidad en el Apéndice, apartado 8.1 de esta Memoria, siendo los valores medios obtenidos los indicados en la Tabla 3.9

TABLA 3.9
DATOS MEDIOS DE DISTRIBUCION DE POROS EN LAS PARTICULAS DE SWEETZYNE

Presión, kg/cm ²	Radio de poro, nm	% Volumen de mercurio en el intervalo
7757.2	2.5 - 25	65.37
2844.3	25 - 50	6.34
1422.1	50 - 100	4.39
21.1	100 - 10000	14.63
Volumen en poros mayores de 10000 nm:		0.0000 cm ³ /g
Volumen en poros con radio entre 2.5 y 10000 nm:		0.0496 cm ³ /g
Volumen en poros con radio menor de 2.5 nm:		0.0051 cm ³ /g
Volumen total:		0.0547 cm ³ /g

Como puede observarse más del 65% de los poros presentan un diámetro comprendido entre 2.5 y 25 nm.

3.6.2 Tratamiento de imágenes.

Para caracterizar a las partículas húmedas y evaluar la diferencia existente entre éstas y las partículas secas se realizó un tratamiento de imágenes utilizando dos programas, ADOBE PHOTOSHOP y VISILOG 4.11.

En primer lugar, utilizando una lupa que llevaba acoplada una cámara fotográfica se realizaron fotografías sobre las partículas del catalizador, sweetzyme T, secas y otras que habían estado inmersas en una disolución de pH = 7.5 y una concentración de $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ de 0.55 g/L durante 24 h. A título de ejemplo se muestran tres fotografías realizadas sobre partículas secas y húmedas en la Figura 3.15, en las que también puede observarse el papel milimetrado que ha servido de escala.

Las fotografías se digitalizaron mediante un scanner SHARP, modelo COLORSCANNER JX-450 con una resolución de 1200 ppi. Los ficheros de imágenes obtenidos se llevaron a un ordenador Macintosh IIFX con procesador Motorola 68030, y mediante el programa ADOBE PHOTOSHOP se seleccionaron en cada fotografía las partículas, una a una, y se pintaron para poder aplicar después el programa VISILOG, en estaciones de trabajo SUN IPX, que permite diferenciar las partículas y calcular la superficie, S_p , y el perímetro, P , de cada partícula. Los resultados obtenidos para un número de partículas, n , de 298 para las secas y 261 para las húmedas se incluyen también en el Apéndice apartado 8.2 de esta Memoria.

A partir de la superficie y el perímetro de cada una de las partículas se puede determinar la esfericidad Ψ mediante

$$\Psi = \frac{\text{Superficie esfera igual volumen}}{\text{Superficie partícula}} = \frac{\text{Perímetro círculo igual área}}{\text{Perímetro de partícula}} \quad [3.12]$$

el diámetro medio basado en la superficie de partícula, suponiéndola esférica

$$\bar{d}_p = \sqrt{\frac{4 \sum S_{pi}}{\pi n}} \quad [3.13]$$

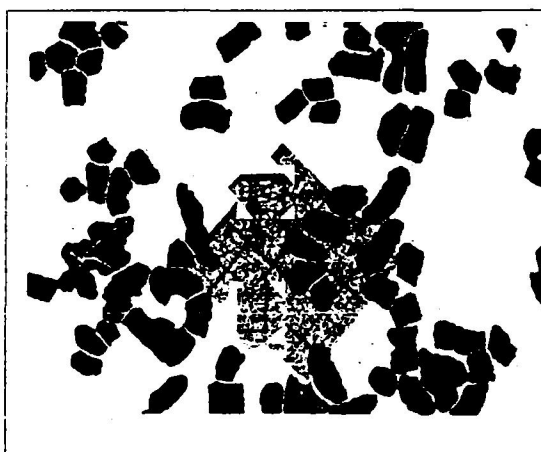
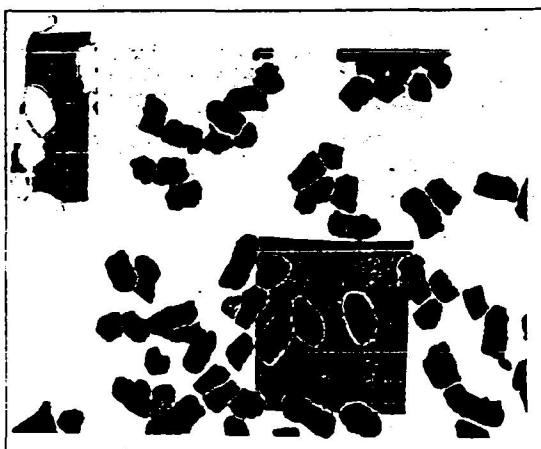
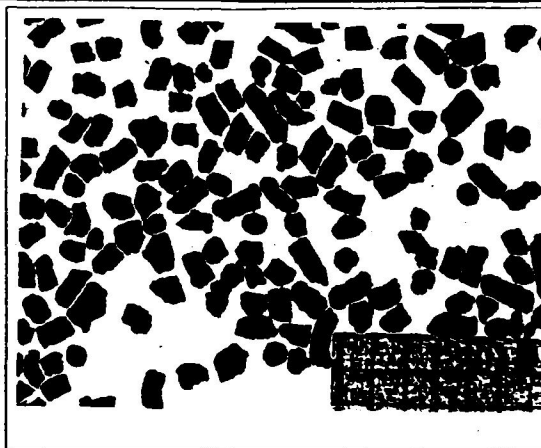


Figura 3.15. Fotografías de las partículas de sweetzyme.

a) Secas

b y c) Húmedas

el perímetro medio

$$\bar{P} = \frac{\sum P_i}{n} \quad [3.14]$$

y la esfericidad media

$$\bar{\Psi} = \frac{\pi \bar{d}_p}{\bar{P}} = \frac{\sqrt{4 \pi n \sum S_{pi}}}{\sum P_i} \quad [3.15]$$

Con los valores medios de diámetro de partícula y esfericidad el volumen de partícula medio y la superficie media de partícula serán:

$$\bar{V}_p = \frac{\pi}{6} \bar{d}_p^3 \quad [3.16]$$

$$\bar{S}_p = \frac{\pi \bar{d}_p^2}{\bar{\Psi}} \quad [3.17]$$

Los resultados obtenidos para partículas secas y húmedas son los indicados en la Tabla 3.10.

TABLA 3.10
CARACTERIZACION DE PARTICULAS. TRATAMIENTO DE IMAGENES

Partículas secas	Partículas húmedas
$\sum S_i = 178.931 \pm 0.234 \text{ mm}^2$	$\sum S_{ih} = 215.038 \pm 0.318 \text{ mm}^2$
$\sum P_i = 922.909 \pm 0.779 \text{ mm}$	$\sum P_{ih} = 947.278 \pm 0.823 \text{ mm}$
$n = 298$	$n = 261$
$\bar{d}_p = 0.874 \pm 0.032 \text{ mm}$	$\bar{d}_{ph} = 1.024 \pm 0.094 \text{ mm}$
$\bar{\Psi} = 0.887$	$\bar{\Psi} = 0.887$
$\bar{V}_p = 0.3500 \text{ mm}^3$	$\bar{V}_{ph} = 0.5626 \text{ mm}^3$
$\bar{S}_p = 0.4675 \text{ mm}^2$	$\bar{S}_{ph} = 0.6006 \text{ mm}^2$

Una vez determinadas las características de las partículas secas y húmedas se puede definir un factor de hinchamiento, f , a partir de la expresión

$$f = \frac{d_{ph}}{d_p} = \frac{1.024 \text{ mm}}{0.874 \text{ mm}} = 1.17 \quad [3.18]$$

y evaluar la porosidad de las partículas húmedas, que tomando como base 1 cm^3 de partícula seca, resulta ser:

$$\epsilon_{ph} = \frac{\text{Volumen de huecos}}{\text{Volumen total}} = \frac{(1.17)^3 - 0.928}{(1.17)^3} = 0.421 \quad [3.19]$$

donde el valor de 0.928 corresponde a los cm^3 de sólidos que existen en 1 cm^3 de partícula seca. La densidad de la partícula húmeda será

$$\rho_{ph} = \frac{\rho_{ps}}{(1.17)^3} = 0.819 \quad [3.20]$$

3.7 Estimación de las propiedades fisicoquímicas.

Las viscosidades de las disoluciones de fructosa y glucosa a las diferentes temperaturas ensayadas se han estimado a partir de los datos encontrados en bibliografía, Weast (1980) y que se recogen en la Tablas 3.11 y 3.12. Determinada la concentración de fructosa y suponiendo constante la relación de viscosidad de la disolución y la del agua a la misma temperatura, se estiman las viscosidades de las disoluciones de fructosa a diferentes concentraciones y temperaturas, Tabla 3.13.

Una vez conocidas las viscosidades de las disoluciones de fructosa, la difusividad molecular, D_H , de éstas ha sido estimada suponiendo que el cociente $D \cdot \mu / T$ permanece constante con la temperatura, Wilke et al. (1955), y conociendo la difusividad molecular de la disolución de fructosa a 50°C para una concentración 0.5 M , $6.9 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$, Lee y Fratzke (1976). Los resultados obtenidos también se recogen en la Tabla 3.13.

TABLA 3.11
PROPIEDADES FISICAS DE DISOLUCIONES DE GLUCOSA

M, mol/L	C _s , g/L	ρ_4^{20}	μ/μ_0
0.428	77.1	1.0274	1.230
0.457	82.4	1.0294	1.248
0.487	87.7	1.0314	1.267
0.516	93.0	1.0334	1.286
0.546	98.4	1.0354	1.306
0.576	103.7	1.0375	1.327
0.636	114.6	1.0416	1.369
0.697	125.5	1.0457	1.413
0.758	136.5	1.0498	1.459
0.819	147.6	1.0540	1.509
0.881	158.7	1.0582	1.563
0.944	170.0	1.0624	1.622
1.007	181.3	1.0667	1.685
1.070	192.8	1.0710	1.753
1.134	204.3	1.0753	1.825
1.199	215.9	1.0797	1.900
1.329	239.5	1.0884	2.059
1.462	263.4	1.0973	2.238
1.597	287.6	1.1063	2.453
1.734	312.3	1.1154	2.702
1.873	337.4	1.1246	2.992
2.014	362.9	1.1340	3.317
2.158	388.8	1.1434	3.697
2.304	415.1	1.1529	4.185
2.452	441.8	1.1626	4.776
2.603	469.0	1.1724	5.482
2.756	496.6	1.1823	6.275
2.912	524.7	1.1924	7.221
3.071	553.2	1.2026	8.437
3.232	582.2	1.2130	9.863
3.396	611.7	1.2235	11.86
3.562	641.8	1.2342	14.46
3.372	672.4	1.2451	17.88
3.905	703.5	1.2562	22.84
4.081	735.2	1.2676	29.33
4.261	767.6	1.2793	37.37

TABLA 3.12
PROPIEDADES FISICAS DE DISOLUCIONES DE FRUCTOSA

M, mol/L	C _s , g/L	ρ_4^{20}	μ/μ_0
0.428	77.1	1.0282	1.213
0.457	82.4	1.0303	1.230
0.487	87.7	1.0323	1.249
0.517	93.1	1.0344	1.267
0.547	98.5	1.0365	1.286
0.576	103.9	1.0385	1.306
0.637	114.7	1.0427	1.346
0.697	125.6	1.0469	1.388
0.758	136.7	1.0512	1.432
0.820	147.8	1.0554	1.480
0.882	159.0	1.0597	1.530
0.945	170.2	1.0640	1.584
1.008	181.6	1.0684	1.640
1.072	193.1	1.0728	1.700
1.136	204.7	1.0772	1.764
1.201	216.3	1.0816	1.833
1.332	239.9	1.0906	1.982
1.465	263.9	1.0996	2.150
1.600	288.3	1.1089	2.343
1.738	313.1	1.1182	2.557
1.878	338.3	1.1276	2.811
2.020	363.9	1.1372	3.106
2.165	390.0	1.1469	3.455
2.312	416.4	1.1568	3.891
2.461	443.4	1.1668	4.409
2.613	470.8	1.1769	5.036
2.767	498.6	1.1871	5.761
2.925	526.9	1.1975	6.631
3.084	555.7	1.2080	7.738
3.247	585.0	1.2187	9.042
3.412	614.7	1.2295	10.80
3.580	645.0	1.2402	12.99
3.751	675.8	1.2514	15.84
3.925	707.1	1.2626	20.05
4.101	738.9	1.2739	25.60
4.281	771.2	1.2854	32.47

TABLA 3.13
PROPIEDADES FISICAS DE LAS DISOLUCIONES DE FRUCTOSA

T, °C	s_0 , M	μ , cp	D, 10^{-6} cm ² /s
30	0.5	1.002	4.44
	1.0	1.302	3.42
	2.0	2.444	1.82
40	0.5	0.821	5.60
	1.0	1.066	4.31
	2.0	2.000	2.30
50	0.5	0.687	6.90
	1.0	0.893	5.31
	1.5	1.203	3.94
	2.0	1.675	2.83
60	0.5	0.586	8.34
	1.0	0.762	6.41
	2.0	1.429	3.42

4. RESULTADOS EXPERIMENTALES.

En esta parte de la Memoria se indican los resultados primarios obtenidos. En primer lugar los correspondientes a la determinación del equilibrio de isomerización y a continuación los resultados cinéticos obtenidos en los tres tipos de reactores que se han utilizado en esta investigación.

4.1 Determinación de la composición de equilibrio.

Puesto que la composición de equilibrio debe ser únicamente función de la temperatura y no del dispositivo experimental utilizado, los experimentos para determinar la constante de equilibrio se llevaron a cabo en el primer reactor utilizado: reactor de lecho fijo de recirculación con glucosa isomerasa inmovilizada.

No obstante lo indicado anteriormente, la constante de equilibrio puede depender ligeramente de la composición a través de los coeficientes de actividad dado que generalmente se maneja la constante de equilibrio expresada en concentraciones molares, K_e

$$K_e = \left(\frac{[F]}{[G]} \right)_{\text{en el equilibrio}}$$

por esta razón, con objeto de obtener valores de K_e próximos a los correspondientes a dilución infinita, constante termodinámica de equilibrio, en todos los experimentos realizados se utilizó una concentración total de hexosas muy pequeña, 0.002 M.

El equilibrio de isomerización se estudió en el intervalo de 30 a 60°C a pH = 7.5 y partiendo en la mayor parte de los casos de composiciones iniciales a uno y otro lado del equilibrio con objeto de confirmar mejor la posición de éste. Los resultados obtenidos se muestran en las Tablas 4.1 a 4.4, en las que se indica, en función del tiempo, la concentración de glucosa determinada por análisis y la conversión; también se indica en dichas tablas la masa de enzima utilizada en cada experimento m , el caudal utilizado, q , y el volumen total de fase líquida, V_0 .

En las Figuras 4.1 a 4.4 se ha representado para cada uno de estos experimentos la conversión frente al tiempo. Se observa en estas figuras que para tiempos altos, la velocidad de cambio de la concentración de glucosa se anula prácticamente y las dos curvas correspondientes a la misma temperatura desde una y otra zona del equilibrio llegan a juntarse prácticamente, lo que permite una determinación muy precisa de la concentración de equilibrio.

TABLA 4.1

EQUILIBRIO DE ISOMERIZACION

 $T = 30^{\circ}\text{C}; m = 10.00 \text{ g}; q = 40 \text{ L/h}; V_0 = 0.400 \text{ L}$
 $[\text{Hexosas}] = 0.002 \text{ M}$
 $[\text{F}]_0 = 0.1703 \text{ g/L}$
 $[\text{F}]_0 = 0.1603 \text{ g/L}$
 $[\text{G}]_0 = 0.1900 \text{ g/L}$
 $[\text{G}]_0 = 0.2000 \text{ g/L}$

t, h	G, g/L	x	G, g/L	x
0.0000	0.1804	0.5006	0.2000	0.5551
0.5000	0.1813	0.5032	0.1943	0.5393
1.0000	0.1851	0.5138	0.1905	0.5401
1.1667			0.1946	0.5288
1.3333	0.1867	0.5182	0.1918	0.5323
1.5000	0.1883	0.5208	0.1934	0.5367
1.6667	0.1877	0.5226	0.1946	0.5401
2.0000	0.1905	0.5261		
2.1667			0.1931	0.5358
2.2500	0.1896	0.5287		
2.3333			0.1927	0.5349
2.5000	0.1908	0.5296	0.1912	0.5306
2.7500	0.1902	0.5278	0.1934	0.5367

TABLA 4.2

EQUILIBRIO DE ISOMERIZACION

 $T = 40^{\circ}\text{C}; m = 7.00 \text{ g}; q = 40 \text{ L/h}; V_0 = 0.400 \text{ L}$
 $[\text{Hexosas}] = 0.002 \text{ M}$
 $[\text{F}]_0 = 0.1803 \text{ g/L}$
 $[\text{G}]_0 = 0.1800 \text{ g/L}$

$t, \text{ h}$	$G, \text{ g/L}$	x
0.0000	0.1807	0.5015
0.2500	0.1822	0.5059
0.5000	0.1791	0.4971
0.6667	0.1801	0.4997
0.8333	0.1791	0.4971
1.0000	0.1778	0.4938
1.1667	0.1769	0.4910
1.3333	0.1797	0.4989
1.5000	0.1791	0.4971

TABLA 4.3

EQUILIBRIO DE ISOMERIZACION

T = 50°C; m = 7.00 g; q = 40 L/h; V₀ = 0.400 L

[Hexosas] = 0.002 M

[F]₀ = 0.1903 g/L[G]₀ = 0.1700 g/L[F]₀ = 0.1653 g/L[G]₀ = 0.1950 g/L

t, h	G, g/L	x	G, g/L	x
0.0000	0.1702	0.4722	0.1952	0.5418
0.2500	0.1695	0.4705	0.1908	0.5296
0.5000	0.1702	0.4722	0.1864	0.5174
0.6667	0.1723	0.4783	0.1855	0.5148
0.8333	0.1720	0.4774	0.1849	0.5131
1.0000	0.1705	0.4731	0.1817	0.5044
1.1667			0.1821	0.5052
1.3333			0.1811	0.5026
1.5000	0.1708	0.4739	0.1796	0.4983
1.6667			0.1777	0.4931
1.8333			0.1770	0.4913
2.0000	0.1705	0.4731	0.1780	0.4939
2.1667			0.1770	0.4913
2.3333			0.1770	0.4913
2.5000	0.1730	0.4800	0.1777	0.4931
2.6667			0.1764	0.4896
2.8333			0.1761	0.4887
3.0000			0.1761	0.4887

TABLA 4.4

EQUILIBRIO DE ISOMERIZACION

T = 60°C; m = 5.00 g; q = 40 L/h; V₀ = 0.400 L

[Hexosas] = 0.002 M

[F]₀ = 0.2003 g/L[F]₀ = 0.1603 g/L[G]₀ = 0.1600 g/L[G]₀ = 0.2000 g/L

t, h	G, g/L	x	G, g/L	x
0.0000	0.1595	0.4427	0.2000	0.5551
0.2500	0.1617	0.4488	0.1899	0.5270
0.5000	0.1646	0.4568	0.1880	0.5218
0.6667	0.1668	0.4629	0.1861	0.5165
0.8333	0.1690	0.4690	0.1835	0.5093
1.0000	0.1684	0.4674	0.1823	0.5059
1.1667	0.1703	0.4726	0.1804	0.5007
1.3333	0.1696	0.4707	0.1772	0.4807
1.5000	0.1699	0.4735	0.1732	0.4918
1.6667			0.1741	0.4832
1.7500	0.1709	0.4743		
1.8333			0.1731	0.4857
2.0000	0.1728	0.4882	0.1722	0.4779
2.1667			0.1715	0.4804
2.3333			0.1725	0.4787
2.5000	0.1715	0.4832	0.1709	0.4743

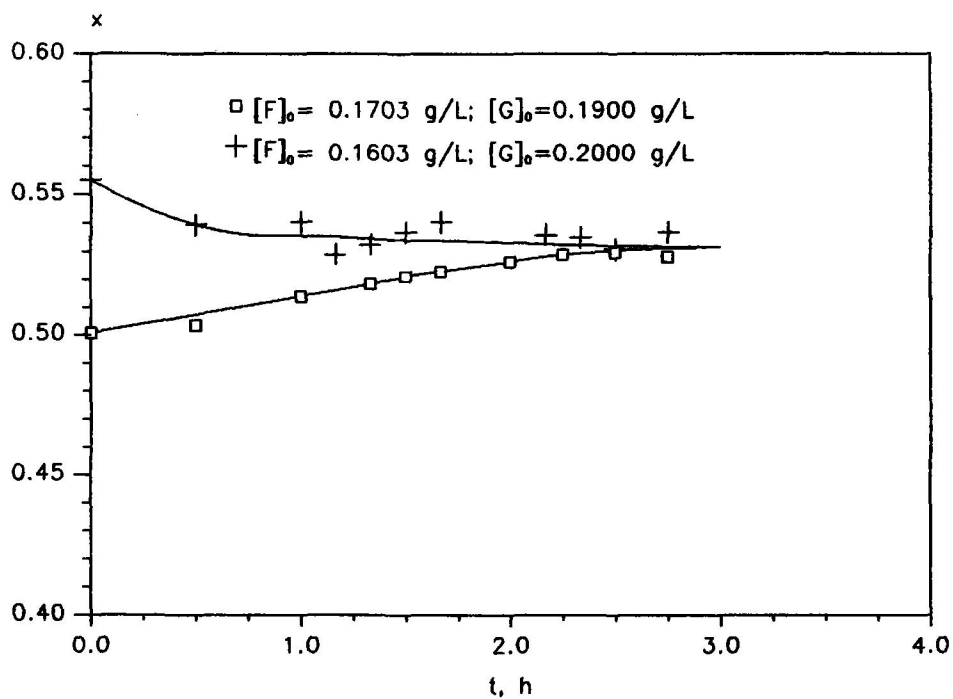


Figura 4.1. Equilibrio de isomerización. T = 30°C.

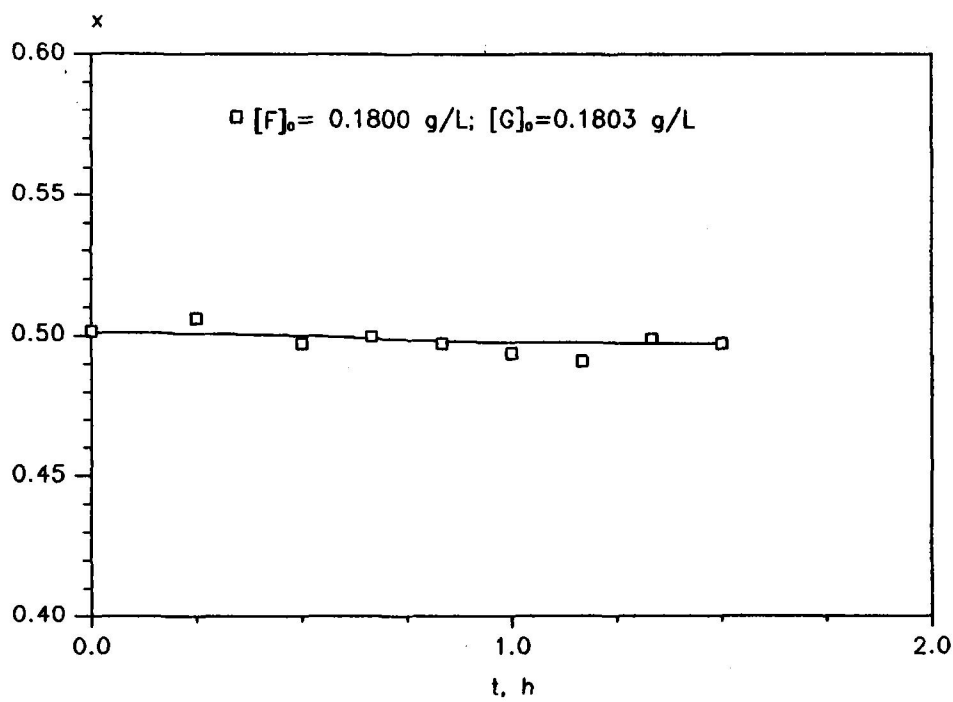
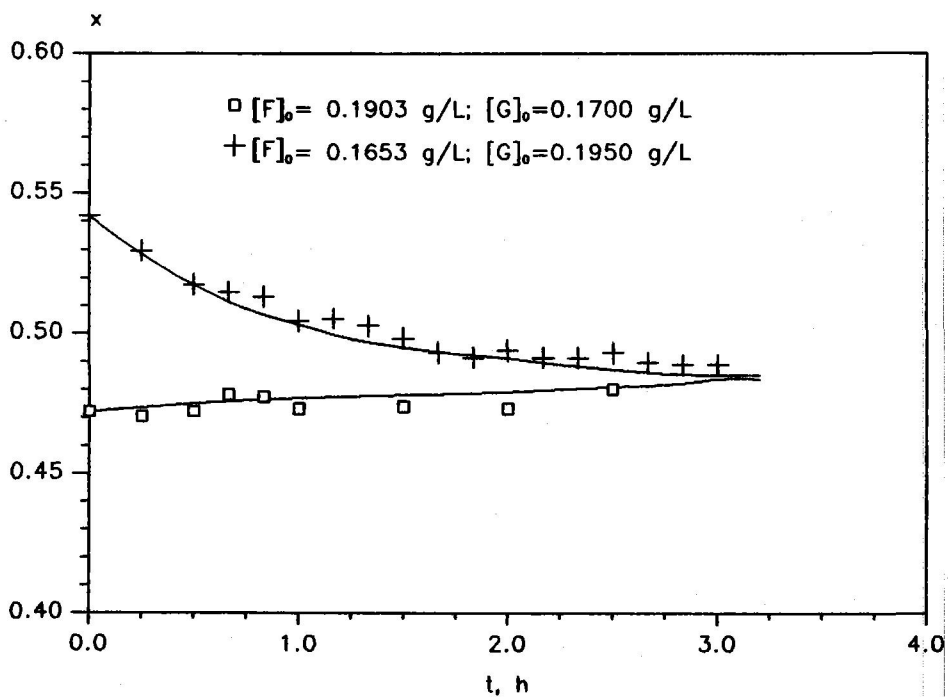
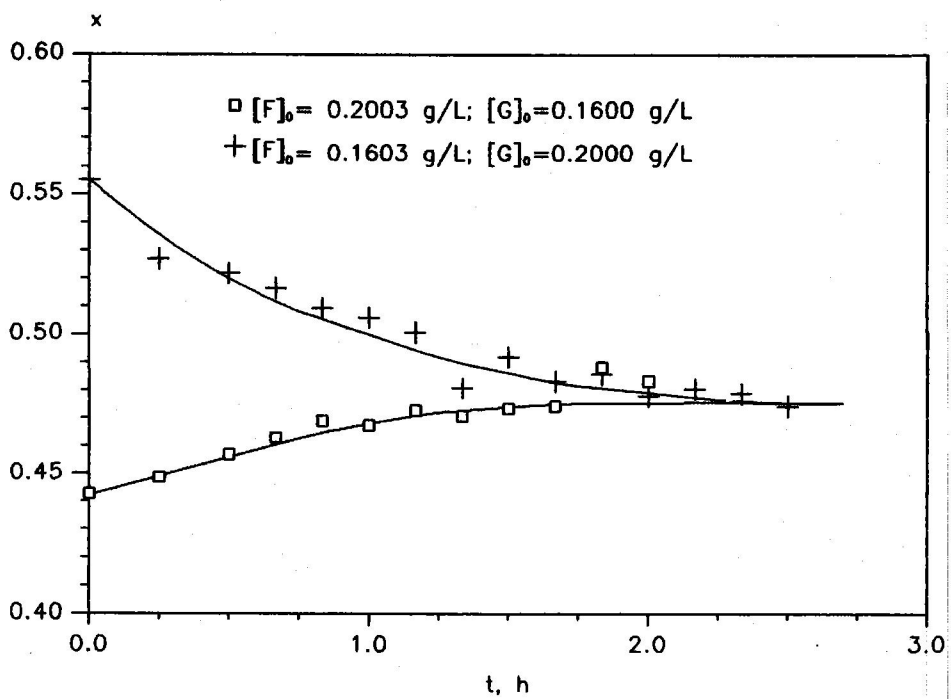


Figura 4.2. Equilibrio de Isomerización. T = 40°C.

Figura 4.3. Equilibrio de isomerización. $T = 50^\circ\text{C}$.Figura 4.4. Equilibrio de isomerización. $T = 60^\circ\text{C}$.

4.2 Reactor de lecho fijo.

Con este dispositivo experimental se estudió la cinética de la transformación fructosa-glucosa analizando la influencia del caudal de circulación, de la masa de enzima dispuesta en el lecho fijo, de la temperatura y de la concentración total de hexosas.

4.2.1 Influencia del caudal de circulación.

El caudal de circulación puede influir sobre la resistencia opuesta por el transporte externo y sobre el grado de mezcla en el reactor. Para analizar esta influencia se realizaron cuatro experimentos con 5.0 g de complejo enzimático dispuestos en el lecho fijo a 50°C y pH = 7.5, y partiendo en todos los casos de una disolución de fructosa, $s_0 = 1$ M.

Estos experimentos fueron realizados a caudales crecientes de 6.6; 11.4; 21.0 y 35.0 L/h respectivamente. En cada experimento se medía la concentración de glucosa, en g/L, en muestras extraídas del tanque agitado, G_i , y a la salida del reactor de lecho fijo, G_f , salvo en el experimento de 35 L/h, en el que sólo se tomaron muestras del tanque. Los resultados obtenidos en estos experimentos se encuentran en las Tablas 4.5 a 4.8, en las que también se indica el volumen total de fase líquida existente en cada intervalo de tiempo teniendo en cuenta las muestras extraídas para análisis.

En la Figura 4.5 se ha representado la concentración de glucosa en el tanque en función del tiempo para los cuatro caudales de circulación utilizados. Se observa en esta figura que los puntos experimentales correspondientes a los cuatro experimentos comentados coinciden prácticamente en una sola línea, lo que indica que el caudal más pequeño utilizado es suficiente para eliminar la influencia de esta variable. No obstante, de forma conservativa en todos los experimentos posteriores se utilizó el caudal de 11.4 L/h, para asegurar más la no influencia de esta variable.

TABLA 4.5
 REACTOR DE LECHO FIJO
 INFLUENCIA DEL CAUDAL DE CIRCULACIÓN.
 $m = 5.0 \text{ g}$ $T = 50^\circ\text{C}$ $\text{pH} = 7.5$ $s_0 = 1.0 \text{ M}$
 $q = 6.6 \text{ L/h}$

$t, \text{ h}$	$V_i, \text{ L}$	$G_i, \text{ g/L}$	$G_f, \text{ g/L}$
0.0000	0.250	0.14	0.14
0.1667	0.250	3.66	4.96
0.2500	0.248	5.18	7.97
0.3333	0.246	7.01	7.94
0.4167	0.244	9.05	9.86
0.5000	0.242	11.28	12.12
0.6667	0.240	15.25	16.12
0.8333	0.238	19.19	20.03
1.0000	0.236	22.32	23.02
1.1667	0.234	25.58	26.89
1.3333	0.232	29.06	31.78
1.5000	0.230	32.40	33.33
1.7500	0.228	36.19	38.29
2.0000	0.226	43.94	44.56
2.2500	0.224	43.71	46.50
2.5000	0.222	48.36	50.38
2.8333	0.220	52.08	54.25
3.0000	0.218	56.73	57.51

TABLA 4.6
 REACTOR DE LECHO FIJO
 INFLUENCIA DEL CAUDAL DE CIRCULACIÓN.

$m = 5.0 \text{ g}$ $T = 50^\circ\text{C}$ $\text{pH} = 7.5$ $s_0 = 1.0 \text{ M}$
 $q = 11.4 \text{ L/h}$

$t, \text{ h}$	$V_f, \text{ L}$	$G_f, \text{ g/L}$	$G_f, \text{ g/L}$
0.0000	0.250	0.14	0.14
0.1667	0.250	3.72	3.81
0.2500	0.248	5.74	6.17
0.3333	0.246	7.44	8.43
0.4167	0.244	9.95	10.26
0.5000	0.242	11.56	12.12
0.6667	0.240	16.20	16.59
0.8333	0.238	19.53	20.46
1.0000	0.236	24.34	24.96
1.1667	0.234	26.97	27.44
1.3333	0.232	29.99	30.69
1.5000	0.230	34.18	35.50
1.6667	0.228	38.76	40.61
1.8333	0.226	41.54	41.54
2.0000	0.224	44.80	47.12
2.2500	0.222	48.52	49.29
2.5000	0.220	50.69	53.01
2.6667	0.218	51.46	53.32
2.8333	0.216	56.42	56.73

TABLA 4.7
 REACTOR DE LECHO FIJO
 INFLUENCIA DEL CAUDAL DE CIRCULACIÓN.
 $m = 5.0 \text{ g}$ $T = 50^\circ\text{C}$ $\text{pH} = 7.5$ $s_0 = 1.0 \text{ M}$
 $q = 21.0 \text{ L/h}$

$t, \text{ h}$	$V_j, \text{ L}$	$G_j, \text{ g/L}$	$G_f, \text{ g/L}$
0.0000	0.250	0.14	0.14
0.1667	0.250	4.12	4.31
0.2500	0.248	6.23	6.64
0.3333	0.246	8.74	9.11
0.4167	0.244	11.13	11.25
0.5000	0.242	13.42	13.64
0.6667	0.240	17.70	18.38
0.8333	0.238	22.09	22.32
1.0000	0.236	26.20	26.74
1.1667	0.234	29.22	30.54
1.3333	0.232	34.41	34.95
1.5000	0.230	36.74	37.59

TABLA 4.8
 REACTOR DE LECHO FIJO
 INFLUENCIA DEL CAUDAL DE CIRCULACIÓN.

$m = 5.0 \text{ g}$ $T = 50^\circ\text{C}$ $\text{pH} = 7.5$ $s_0 = 1.0 \text{ M}$
 $q = 35.0 \text{ L/h}$

$t, \text{ h}$	$V_i, \text{ L}$	$G_i, \text{ g/L}$
0.0000	0.250	0.14
0.1667	0.250	3.85
0.3333	0.249	8.29
0.5000	0.248	13.07
0.6667	0.247	16.86
0.8333	0.246	20.75
1.0000	0.245	24.97
1.1667	0.244	27.76
1.3333	0.243	31.24
1.5000	0.242	34.60
1.6667	0.241	38.26
1.8333	0.240	40.50
2.0000	0.239	42.98
2.2500	0.238	45.22
2.5000	0.237	49.94
2.7500	0.236	52.05
3.0000	0.235	57.02

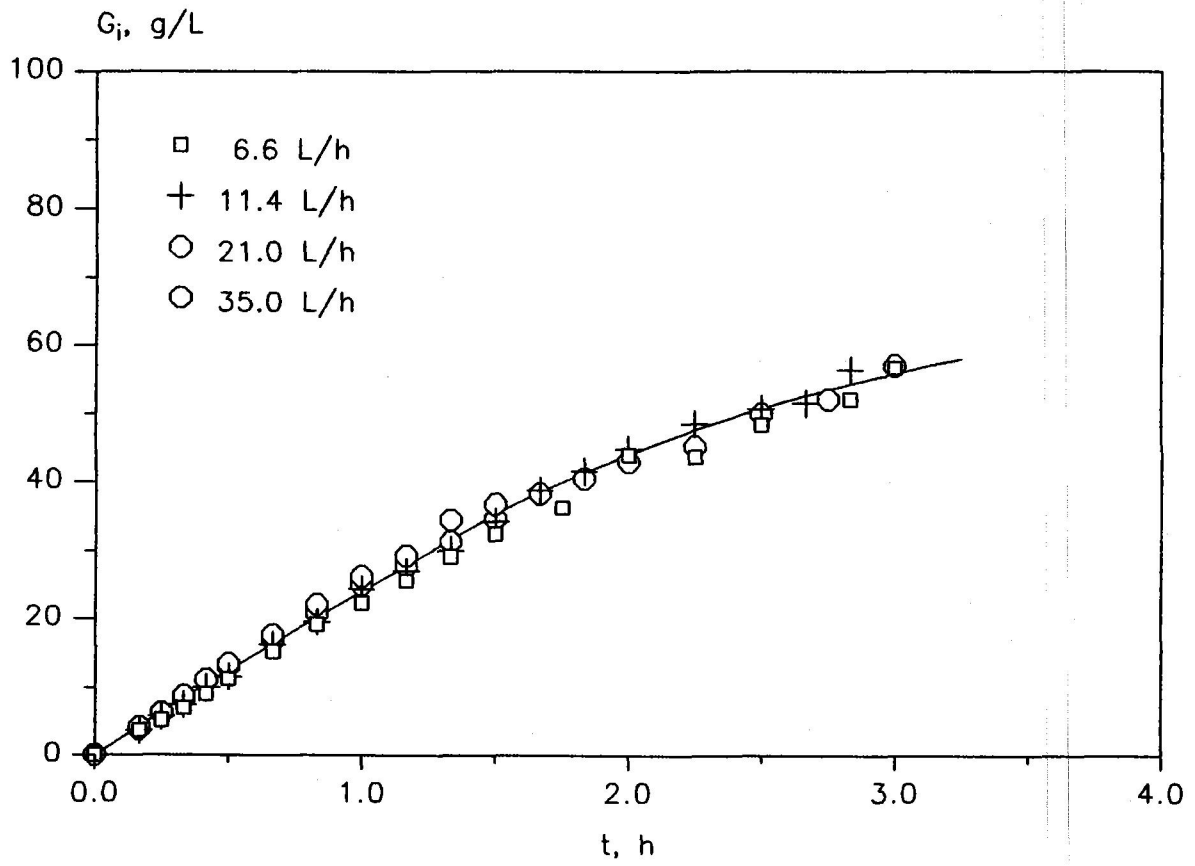


Figura 4.5. Influencia del caudal de circulación. Reactor de lecho fijo.

4.2.2 Influencia de la masa de enzima en el lecho.

En función de la masa de enzima contenida en el lecho y del grado de mezcla que pueda admitirse para el fluido en el mismo, se determina la conversión conseguida por paso. Para analizar la influencia de esta variable se realizaron cuatro experimentos con un caudal de circulación de 11.4 L/h a 50°C, pH = 7.5 y partiendo de una disolución de fructosa 1 M.

Las masas de enzima utilizadas fueron 3.5; 5.0; 7.0 y 14.0 g, y los resultados, obtenidos en la misma forma que los comentados en el apartado anterior, se indican en las Tablas 4.9, 4.6, 4.10 y 4.11. En la Figura 4.6, se representa la concentración de glucosa en el tanque frente al tiempo para las cuatro masas de enzima utilizadas, observándose la fuerte influencia de esta variable en la transformación global.

TABLA 4.9
 REACTOR DE LECHO FIJO
 INFLUENCIA DE LA MASA DE ENZIMA
 $q = 11.4 \text{ L/h}$ $T = 50^\circ\text{C}$ $\text{pH} = 7.5$ $s_0 = 1.0 \text{ M}$
 $m = 3.5 \text{ g}$

$t, \text{ h}$	$V_1, \text{ L}$	$G_1, \text{ g/L}$	$G_f, \text{ g/L}$
0.0000	0.250	0.14	0.14
0.1667	0.250	2.73	3.13
0.2500	0.248	4.40	4.40
0.3333	0.246	5.46	5.83
0.4167	0.244	6.95	7.01
0.5000	0.242	8.28	8.56
0.6667	0.240	11.07	11.35
0.8333	0.238	14.57	14.79
1.0000	0.236	16.93	17.79
1.2500	0.234	21.39	22.32
1.5000	0.232	25.50	26.27
1.8333	0.230	29.45	30.38
2.0000	0.228	31.00	32.24
2.2500	0.226	34.88	35.34
2.5000	0.224	38.91	39.91
2.7500	0.222	42.32	43.17
3.0000	0.220	45.34	45.57
3.1667	0.218	48.83	48.90

TABLA 4.10
REACTOR DE LECHO FIJO
INFLUENCIA DE LA MASA DE ENZIMA
 $q = 11.4 \text{ L/h}$ $T = 50^\circ\text{C}$ $\text{pH} = 7.5$ $s_0 = 1.0 \text{ M}$
 $m = 7.0 \text{ g}$

$t, \text{ h}$	$V_f, \text{ L}$	$G_f, \text{ g/L}$	$G_f, \text{ g/L}$
0.0000	0.250	0.14	0.14
0.1667	0.250	4.65	5.12
0.2500	0.248	7.69	8.15
0.3333	0.246	10.97	11.28
0.4167	0.244	13.80	14.32
0.5000	0.242	17.36	17.60
0.6667	0.240	22.32	23.10
0.8333	0.238	28.37	31.23
1.0000	0.236	32.71	33.79
1.2500	0.234	39.45	41.23
1.5000	0.232	47.28	48.21
2.0000	0.230	57.04	58.28
2.3333	0.228	62.16	62.62
2.5000	0.226	64.02	67.12
2.6667	0.224	64.79	55.80

TABLA 4.11
 REACTOR DE LECHO FIJO
 INFLUENCIA DE LA MASA DE ENZIMA
 $q = 11.4 \text{ L/h}$ $T = 50^\circ\text{C}$ $\text{pH} = 7.5$ $s_0 = 1.0 \text{ M}$
 $m = 14.0 \text{ g}$

$t, \text{ h}$	$V_f, \text{ L}$	$G, \text{ g/L}$	$G_f, \text{ g/L}$
0.0000	0.250	0.14	0.14
0.0833	0.250	4.74	5.89
0.1667	0.248	9.73	10.97
0.2500	0.246	14.63	15.87
0.3333	0.244	19.69	21.47
0.4167	0.242	24.88	26.04
0.5000	0.240	28.91	30.30
0.6667	0.238	37.82	38.52
0.8333	0.236	44.56	45.57
1.0000	0.234	50.76	51.69
1.1667	0.232	57.20	58.75
1.3333	0.230	61.07	61.69
1.5000	0.228	66.65	67.12
1.7500	0.226	69.60	70.37
2.0000	0.224	74.87	75.49
2.2500	0.222	77.50	79.67
2.5000	0.220	81.22	81.22
2.9167	0.218	82.15	85.56
3.0000	0.216	84.94	85.87
3.0833	0.214	83.70	85.56

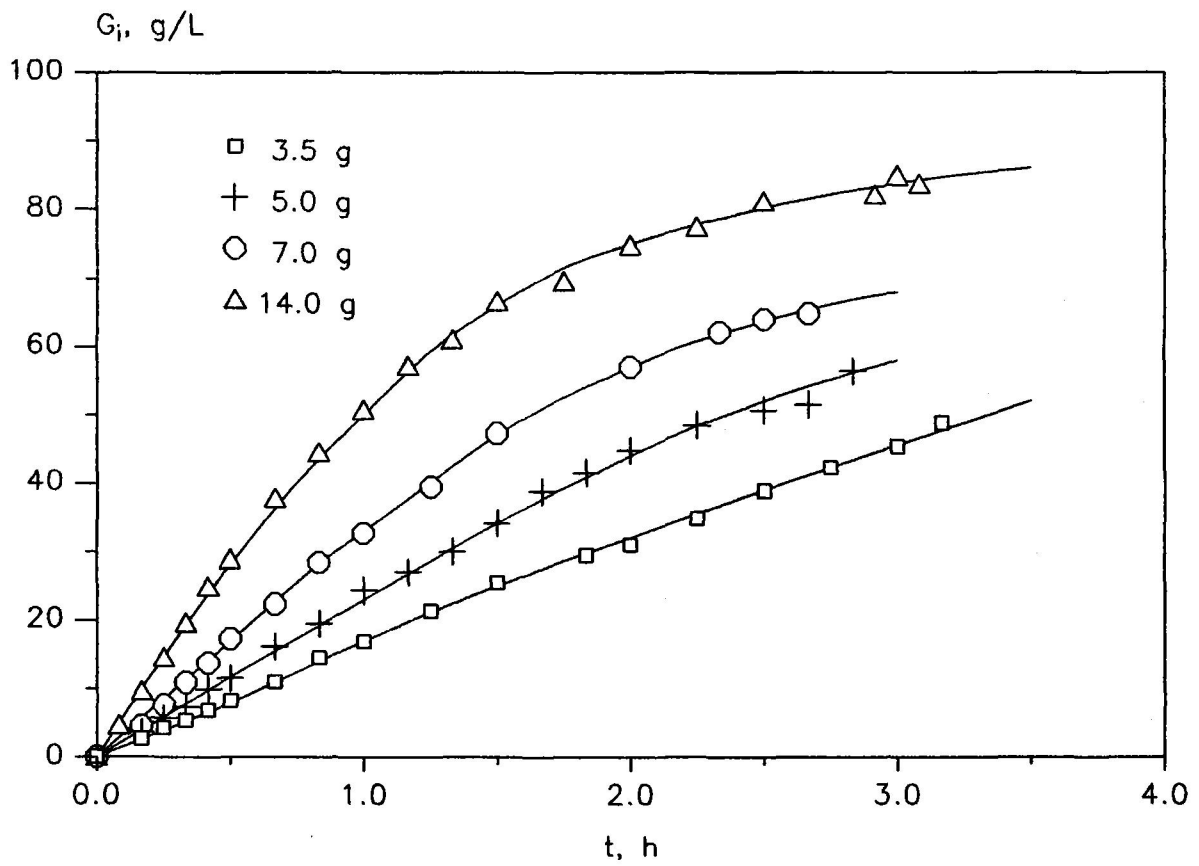


Figura 4.6. Influencia de la masa de enzima. Reactor de lecho fijo.

4.2.3 Influencia de la temperatura y de la concentración total de hexosas.

Seleccionado el pH de experimentación, pH = 7.5, por la máxima actividad del complejo enzimático utilizado, los experimentos comentados en los dos apartados anteriores sirvieron para fijar el caudal de circulación, 11.4 L/h, y la masa de enzima en el lecho, 5 g. Para llevar a cabo el estudio cinético en estas condiciones, se analizó primero la influencia de la concentración total de hexosas a 4 niveles: 0.5; 1.0; 1.5 y 2.0 M a la temperatura de 50°C y posteriormente se repitió este estudio a tres niveles de la concentración total de hexosas, 0.5; 1.0 y 2.0 M, a las temperaturas de 30, 40 y 60°C. Para la temperatura de 50°C se medía también la concentración de glucosa a la salida del lecho.

Los resultados obtenidos en estos experimentos se indican en las Tablas 4.6 y 4.12 a 4.23 respectivamente. En las Figuras 4.7 a 4.10 se representa la concentración de glucosa en el tanque en función del tiempo para las cuatro temperaturas ensayadas en función de la concentración total de hexosas como parámetro, y en la Figura 4.11, a título de ejemplo, se representan las mismas variables para la concentración total de hexosas de 1.0 M a las cuatro temperaturas investigadas.

Se observa en las Figuras 4.7 a 4.10 que la velocidad de generación de glucosa aumenta con la concentración total de hexosas, y en la Figura 4.11 la apreciable influencia de la temperatura sobre la glucosa formada.

TABLA 4.12
 REACTOR DE LECHO FIJO
 INFLUENCIA DE LA CONCENTRACION TOTAL DE HEXOSAS

$q = 11.4 \text{ L/h}$ $\text{pH} = 7.5$ $m = 5.0 \text{ g}$
 $T = 50^\circ\text{C}$ $s_0 = 0.5 \text{ M}$

$t, \text{ h}$	$V_i, \text{ L}$	$G_i, \text{ g/L}$	$G_f, \text{ g/L}$
0.0000	0.250	0.08	0.08
0.1667	0.250	2.78	2.93
0.2500	0.248	4.06	4.09
0.3333	0.246	5.07	5.30
0.5000	0.244	7.55	7.86
0.5833	0.242	8.88	8.94
0.6667	0.240	10.08	10.29
0.8333	0.238	13.37	13.64
1.0000	0.236	15.69	15.69
1.1667	0.234	17.45	18.26
1.3333	0.232	20.85	22.17
1.5000	0.230	22.94	23.17
1.7500	0.228	25.89	26.20
2.0000	0.226	28.06	28.99
2.2500	0.224	30.77	31.23
2.5000	0.222	32.86	33.87
2.8333	0.220	34.18	34.88
3.0000	0.218	36.43	36.81

TABLA 4.13
 REACTOR DE LECHO FIJO
 INFLUENCIA DE LA CONCENTRACION TOTAL DE HEXOSAS

$q = 11.4 \text{ L/h}$ $\text{pH} = 7.5$ $m = 5.0 \text{ g}$
 $T = 50^\circ\text{C}$ $s_0 = 1.5 \text{ M}$

$t, \text{ h}$	$V_i, \text{ L}$	$G_i, \text{ g/L}$	$G_f, \text{ g/L}$
0.0000	0.250	0.21	0.21
0.1667	0.250	4.06	4.59
0.2500	0.248	6.48	7.04
0.3333	0.246	8.84	9.52
0.4167	0.244	11.10	12.12
0.5000	0.242	13.67	14.54
0.6667	0.240	18.69	19.56
0.8333	0.238	24.10	24.80
1.0000	0.236	28.52	28.91
1.1667	0.234	33.02	33.40
1.3333	0.232	37.36	37.82
1.5000	0.230	41.85	42.01
1.8333	0.228	50.45	52.93
2.1667	0.226	58.59	59.06
2.6667	0.224	68.98	70.37
2.9167	0.222	75.33	75.95
3.0833	0.220	78.74	79.05

TABLA 4.14
REACTOR DE LECHO FIJO
INFLUENCIA DE LA CONCENTRACION TOTAL DE HEXOSAS

$q = 11.4 \text{ L/h}$ $\text{pH} = 7.5$ $m = 5.0 \text{ g}$
 $T = 50^\circ\text{C}$ $s_0 = 2.0 \text{ M}$

t, h	V_j, L	$G_j, \text{g/L}$	$G_f, \text{g/L}$
0.0000	0.250	0.29	0.29
0.1667	0.250	5.02	5.58
0.2500	0.248	6.95	7.26
0.3333	0.246	9.58	10.23
0.4167	0.244	12.28	12.65
0.5000	0.242	14.17	14.60
0.6667	0.240	18.91	19.00
0.8333	0.238	22.94	24.72
1.0000	0.236	28.44	29.84
1.1667	0.234	33.56	34.64
1.3333	0.232	39.37	39.91
1.5000	0.230	43.94	43.94
1.7500	0.228	51.83	52.33
2.0000	0.226	56.92	58.03
2.2500	0.224	63.71	66.96
2.5000	0.222	68.05	71.46
2.8333	0.220	77.04	77.19
3.0000	0.218	79.98	79.98

TABLA 4.15
 REACTOR DE LECHO FIJO
 INFLUENCIA DE LA CONCENTRACION TOTAL DE HEXOSAS

$q = 11.4 \text{ L/h}$ $\text{pH} = 7.5$ $m = 5.0 \text{ g}$
 $T = 30^\circ\text{C}$ $s_0 = 0.5 \text{ M}$

$t, \text{ h}$	$V_i, \text{ L}$	$G_i, \text{ g/L}$
0.0000	0.250	0.07
0.1667	0.250	0.62
0.2500	0.249	0.96
0.3333	0.248	1.28
0.4167	0.247	1.68
0.5000	0.246	2.06
0.6667	0.245	2.81
0.8333	0.244	3.35
1.0000	0.243	4.16
1.1667	0.242	4.90
1.3333	0.241	5.67
1.5000	0.240	6.52
1.7500	0.239	7.57
2.0000	0.238	7.97
2.2500	0.237	9.49
2.5000	0.236	10.50
2.6667	0.235	11.11
2.7500	0.234	11.37

TABLA 4.16
REACTOR DE LECHO FIJO
INFLUENCIA DE LA CONCENTRACION TOTAL DE HEXOSAS

$q = 11.4 \text{ L/h}$ $\text{pH} = 7.5$ $m = 5.0 \text{ g}$
 $T = 30^\circ\text{C}$ $s_0 = 1.0 \text{ M}$

$t, \text{ h}$	$V_i, \text{ L}$	$G_i, \text{ g/L}$
0.0000	0.250	0.14
0.1667	0.250	0.77
0.2500	0.249	1.21
0.3333	0.248	1.65
0.4167	0.247	2.10
0.5000	0.246	2.51
0.6667	0.245	3.36
0.8333	0.244	4.26
1.0000	0.243	5.21
1.1667	0.242	6.25
1.3333	0.241	7.01
1.5000	0.240	8.03
1.7500	0.239	9.25
2.0000	0.238	10.91
2.2500	0.237	12.59
2.5000	0.236	14.35
2.7500	0.235	15.47
2.9167	0.234	16.06
3.0833	0.233	17.14

TABLA 4.17
 REACTOR DE LECHO FIJO
 INFLUENCIA DE LA CONCENTRACION TOTAL DE HEXOSAS

$q = 11.4 \text{ L/h}$ $\text{pH} = 7.5$ $m = 5.0 \text{ g}$
 $T = 30^\circ\text{C}$ $s_0 = 2.0 \text{ M}$

$t, \text{ h}$	$V_i, \text{ L}$	$G_i, \text{ g/L}$
0.0000	0.250	0.34
0.1667	0.250	0.99
0.2500	0.249	1.40
0.3333	0.248	1.79
0.4167	0.247	2.22
0.5000	0.246	2.67
0.6667	0.245	3.43
0.8333	0.244	4.41
1.0000	0.243	5.38
1.1667	0.242	6.46
1.3333	0.241	7.22
1.5000	0.240	7.95
1.7500	0.239	9.84
2.0000	0.238	11.35
2.2500	0.237	13.18
2.5000	0.236	14.57
2.7500	0.235	16.59
2.9167	0.234	17.11
3.0833	0.233	18.38

TABLA 4.18
REACTOR DE LECHO FIJO
INFLUENCIA DE LA CONCENTRACION TOTAL DE HEXOSAS

$q = 11.4 \text{ L/h}$ $\text{pH} = 7.5$ $m = 5.0 \text{ g}$
 $T = 40^\circ\text{C}$ $s_0 = 0.5 \text{ M}$

$t, \text{ h}$	$V_j, \text{ L}$	$G_j, \text{ g/L}$
0.0000	0.250	0.09
0.1667	0.250	1.47
0.2500	0.249	2.17
0.3333	0.248	2.89
0.4167	0.247	3.58
0.5000	0.246	4.34
0.6667	0.245	5.77
0.8333	0.244	7.27
1.0000	0.243	8.49
1.1667	0.242	9.70
1.3333	0.241	11.84
1.5000	0.240	13.83
1.7500	0.239	16.12
2.0000	0.238	17.36
2.2500	0.237	15.58
2.5000	0.236	22.40
2.7500	0.235	23.56
2.9167	0.234	23.87
3.0833	0.233	25.81

TABLA 4.19
 REACTOR DE LECHO FIJO
 INFLUENCIA DE LA CONCENTRACION TOTAL DE HEXOSAS

$q = 11.4 \text{ L/h}$ $\text{pH} = 7.5$ $m = 5.0 \text{ g}$
 $T = 40^\circ\text{C}$ $s_0 = 1.0 \text{ M}$

$t, \text{ h}$	$V_j, \text{ L}$	$G_j, \text{ g/L}$
0.0000	0.250	0.14
0.1667	0.250	1.79
0.2500	0.249	2.47
0.3333	0.248	2.88
0.4167	0.247	4.04
0.5000	0.246	4.41
0.6667	0.245	6.84
0.8333	0.244	9.11
1.0000	0.243	10.37
1.1667	0.242	10.90
1.3333	0.241	14.54
1.5000	0.240	17.79
1.7500	0.239	20.28
2.0000	0.238	25.06
2.2500	0.237	27.90
2.5000	0.236	29.14
2.7500	0.235	29.76
2.9167	0.234	32.18
3.0833	0.233	33.79

TABLA 4.20
REACTOR DE LECHO FIJO
INFLUENCIA DE LA CONCENTRACION TOTAL DE HEXOSAS

$q = 11.4 \text{ L/h}$ $\text{pH} = 7.5$ $m = 5.0 \text{ g}$
 $T = 40^\circ\text{C}$ $s_0 = 2.0 \text{ M}$

$t, \text{ h}$	$V_f, \text{ L}$	$G_f, \text{ g/L}$
0.0000	0.250	0.34
0.1667	0.250	1.53
0.2500	0.249	2.50
0.3333	0.248	3.16
0.4167	0.247	4.43
0.5000	0.246	5.59
0.6667	0.245	7.50
0.8333	0.244	10.15
1.0000	0.243	12.65
1.1667	0.242	14.42
1.3333	0.241	16.90
1.5000	0.240	18.45
1.7500	0.239	21.30
2.0000	0.238	25.20
2.2500	0.237	29.39
2.5000	0.236	33.98
2.7500	0.235	38.57
2.9167	0.234	41.11
3.0833	0.233	43.21

TABLA 4.21
 REACTOR DE LECHO FIJO
 INFLUENCIA DE LA CONCENTRACION TOTAL DE HEXOSAS

$q = 11.4 \text{ L/h}$ $\text{pH} = 7.5$ $m = 5.0 \text{ g}$
 $T = 60^\circ\text{C}$ $s_0 = 0.5 \text{ M}$

$t, \text{ h}$	$V_f, \text{ L}$	$G_f, \text{ g/L}$
0.0000	0.250	0.09
0.0833	0.250	2.64
0.1667	0.249	5.39
0.2500	0.248	7.95
0.3333	0.247	10.36
0.4167	0.246	12.80
0.5000	0.245	13.89
0.6667	0.244	19.22
0.8333	0.243	21.78
1.0000	0.242	25.27
1.1667	0.241	27.83
1.5000	0.240	30.46
1.6667	0.239	33.56
1.8333	0.238	33.40
2.0000	0.237	36.12
2.1667	0.236	39.07
2.3333	0.235	39.53
2.5000	0.234	41.39
2.6667	0.233	40.62
2.8333	0.232	42.94
3.0000	0.231	42.79
3.1667	0.230	42.32

TABLA 4.22
REACTOR DE LECHO FIJO
INFLUENCIA DE LA CONCENTRACION TOTAL DE HEXOSAS

$q = 11.4 \text{ L/h}$ $\text{pH} = 7.5$ $m = 5.0 \text{ g}$
 $T = 60^\circ\text{C}$ $s_0 = 1.0 \text{ M}$

$t, \text{ h}$	$V_j, \text{ L}$	$G_j, \text{ g/L}$
0.0000	0.250	0.14
0.1667	0.250	7.04
0.2500	0.249	10.06
0.3333	0.248	13.38
0.4167	0.247	16.59
0.5000	0.246	19.47
0.6667	0.245	24.11
0.8333	0.244	31.85
1.0000	0.243	35.50
1.1667	0.242	41.62
1.3333	0.241	47.75
1.5000	0.240	48.83
1.7500	0.239	54.56
2.0000	0.238	61.54
2.2500	0.237	70.22
2.5000	0.236	68.82
2.7500	0.235	68.82
2.9167	0.234	70.37
3.0833	0.233	72.85

TABLA 4.23
 REACTOR DE LECHO FIJO
 INFLUENCIA DE LA CONCENTRACION TOTAL DE HEXOSAS

$q = 11.4 \text{ L/h}$ $\text{pH} = 7.5$ $m = 5.0 \text{ g}$
 $T = 60^\circ\text{C}$ $s_0 = 2.0 \text{ M}$

$t, \text{ h}$	$V_i, \text{ L}$	$G_i, \text{ g/L}$
0.0000	0.250	0.34
0.0833	0.250	3.40
0.1667	0.249	5.97
0.2500	0.248	8.14
0.3333	0.247	13.13
0.4167	0.246	14.48
0.5000	0.245	21.86
0.6667	0.244	32.24
0.8333	0.243	39.22
1.0000	0.242	47.97
1.1667	0.241	53.40
1.3333	0.240	62.62
1.5000	0.239	69.44
1.7500	0.238	76.88
2.0000	0.237	84.48
2.2500	0.236	98.90
2.5000	0.235	103.86
2.7500	0.234	107.89
2.9167	0.233	114.09
3.0833	0.232	118.12

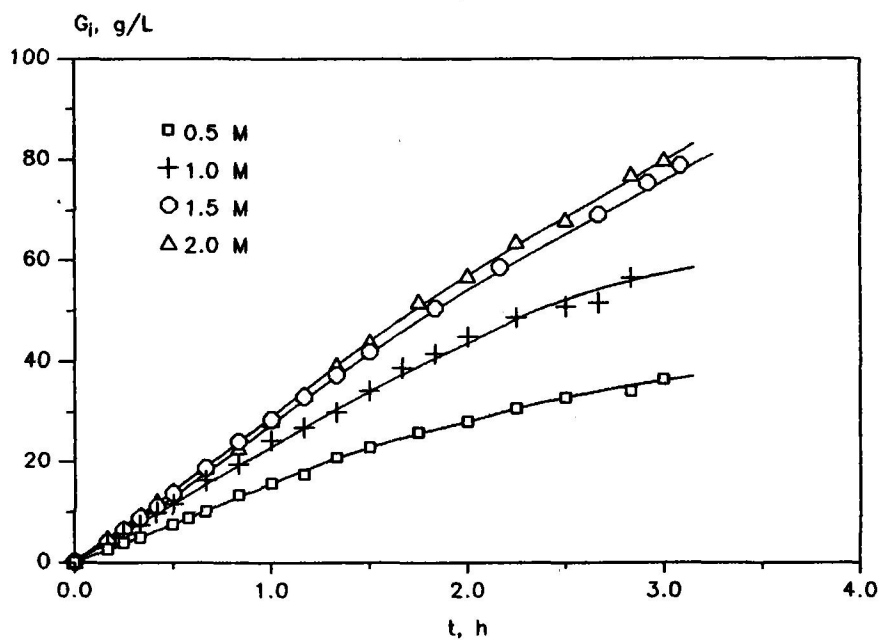


Figura 4.7. Influencia de la concentración total de hexosas. T = 50°C.
Reactor de lecho fijo.

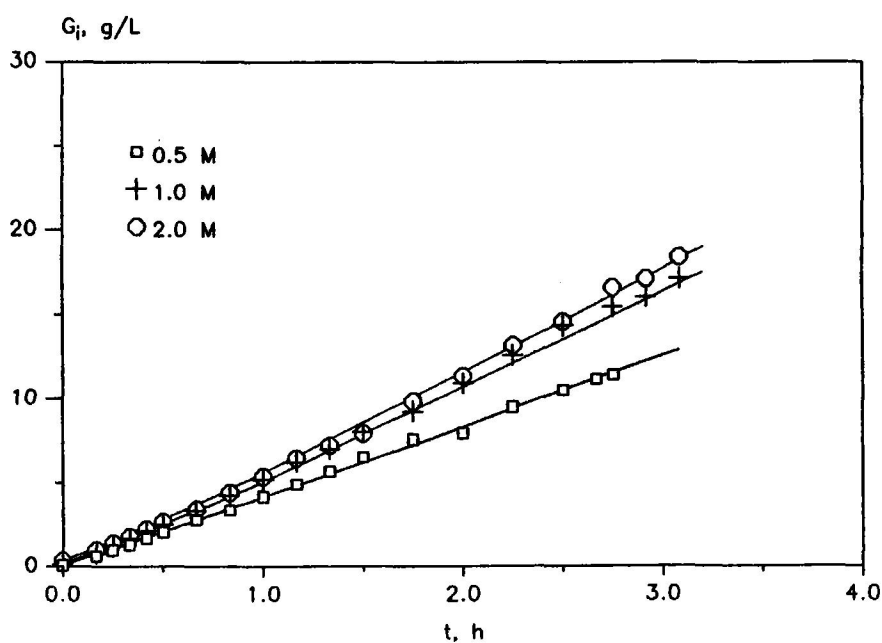


Figura 4.8. Influencia de la concentración total de hexosas. T = 30°C.
Reactor de lecho fijo.

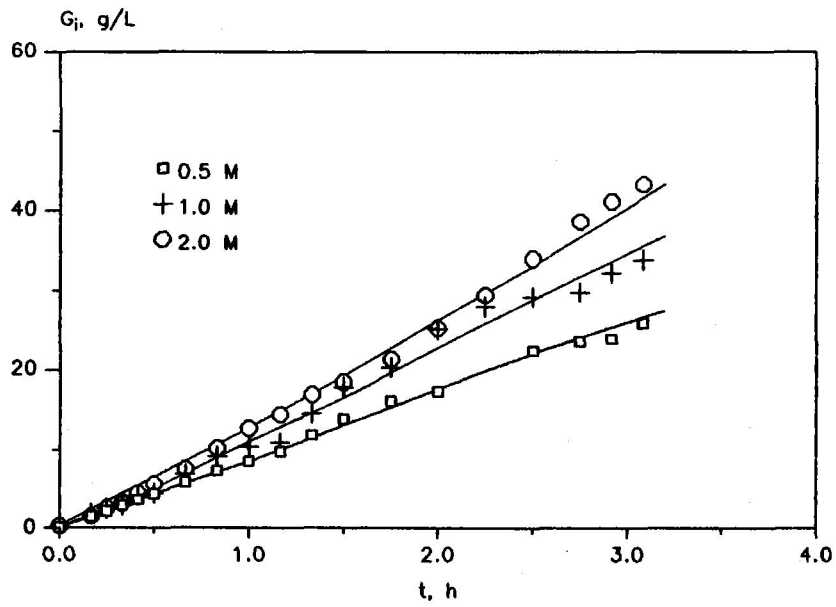


Figura 4.9. Influencia de la concentración total de hexosas. $T = 40^\circ\text{C}$. Reactor de lecho fijo.

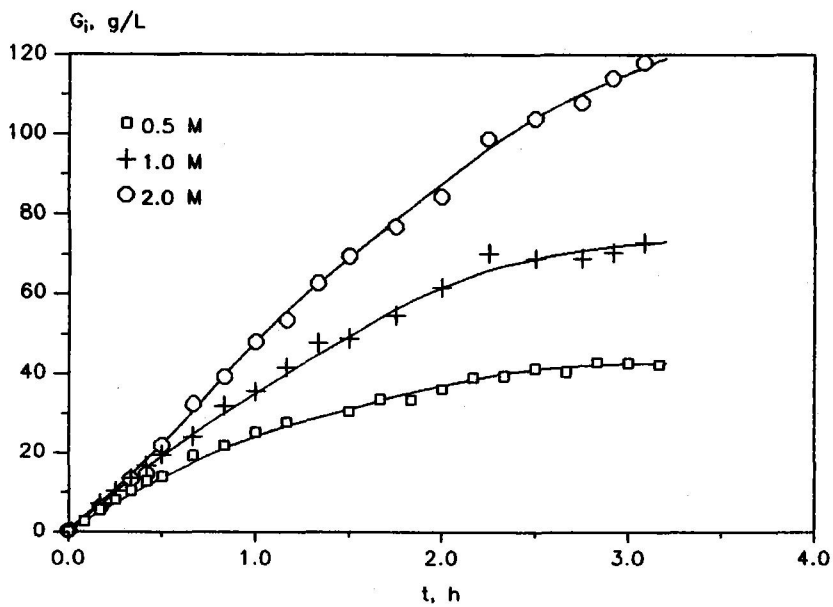


Figura 4.10. Influencia de la concentración de hexosas. $T = 60^\circ\text{C}$. Reactor de lecho fijo.

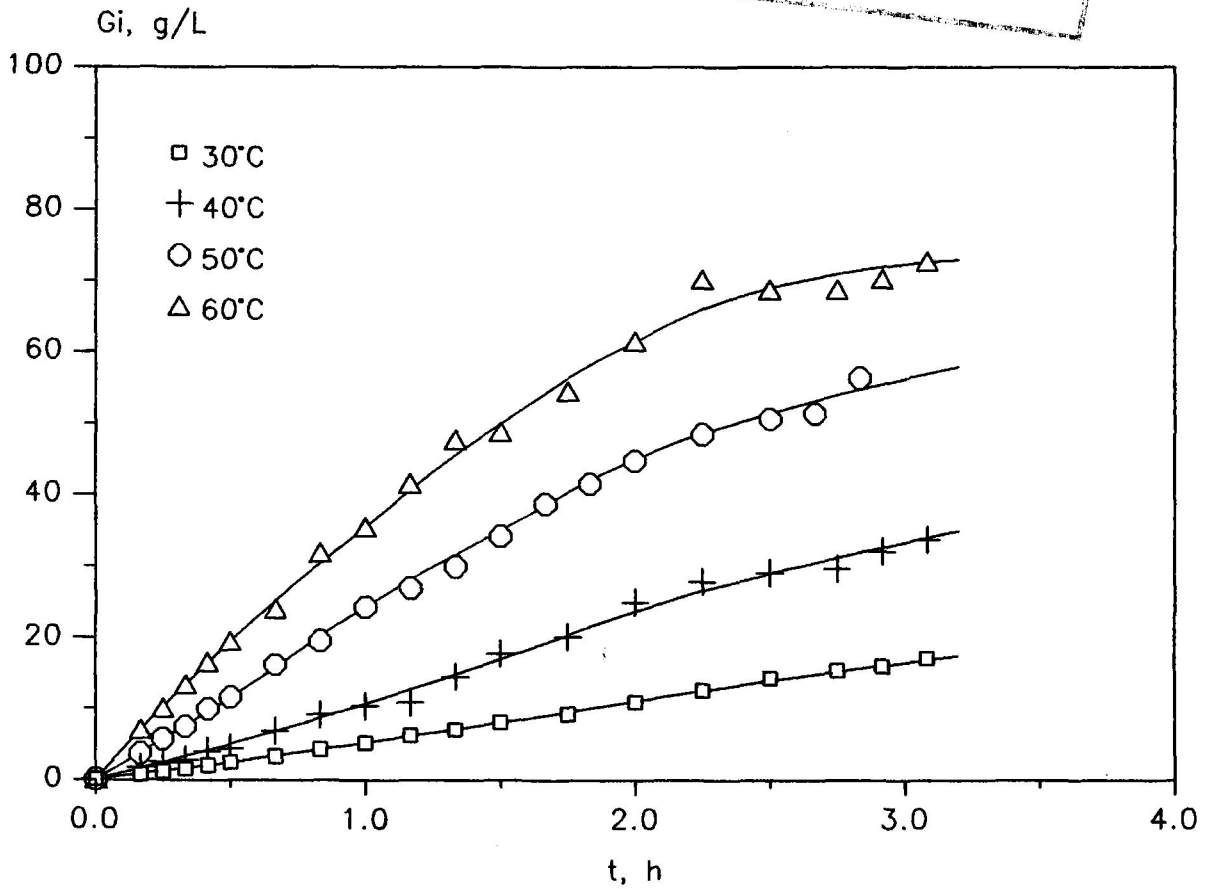
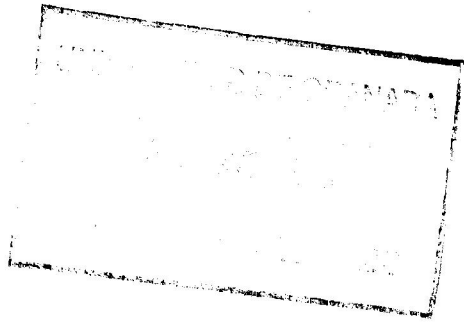


Figura 4.11. Influencia de la temperatura. $s_0 = 1 M$.

4.3 Reactor homogéneo.

Con este dispositivo experimental en el que la enzima se encontraba disuelta en la fase reaccionante, se estudió la cinética de la transformación fructosa-glucosa analizando la influencia de la concentración de enzima a 50°C y con una concentración total de hexosas 1 M, empleando 0.2; 2.0 y 6.3 g/L de enzima respectivamente. Los resultados se indican en las Tablas 4.24 a 4.26, y se representan en la Figura 4.12. en la que se observa que la velocidad de generación de glucosa aumenta apreciablemente con la concentración de enzima. También se analizó la influencia de la temperatura a tres niveles, 40; 50 y 60°C y en cada una de ellos la influencia de la concentración total de hexosas a 0.5; 1.0 y 2.0 M respectivamente.

Los resultados primarios de estos experimentos se indican en las Tablas 4.26 a 4.34 y se representan en las Figuras 4.13 a 4.15 para las tres temperaturas investigadas con la concentración total de hexosas como parámetro y en la Figura 4.16 para la concentración total de hexosas 1 M y a las tres temperaturas a título de ejemplo.

TABLA 4.24

REACTOR HOMOGENEO. INFLUENCIA DE LA CONCENTRACION ENZIMA

 $T = 50^{\circ}\text{C}$ $c_E = 0.2 \text{ g/L}$ $s_0 = 1.0 \text{ M}$

<u>t, h</u>	<u>V_f, L</u>	<u>G, g/L</u>
0.0000	0.201	0.18
0.1667	0.201	0.68
0.3333	0.200	0.89
0.5000	0.199	1.00
0.6667	0.198	1.17
0.8333	0.197	1.38
1.0000	0.196	1.56
1.1667	0.195	1.67
1.3333	0.194	1.93
1.5000	0.193	2.08
1.6667	0.192	2.35
1.8333	0.191	2.41
2.0000	0.190	2.64
2.1667	0.189	2.90
2.3333	0.188	2.92
2.5000	0.187	3.09
2.6667	0.186	3.43
2.8333	0.185	3.37
3.0000	0.184	3.68

TABLA 4.25

REACTOR HOMOGENEO. INFLUENCIA DE LA CONCENTRACION ENZIMA

 $T = 50^{\circ}\text{C}$ $c_E = 2.0 \text{ g/L}$ $s_0 = 1.0 \text{ M}$

<u>t, h</u>	<u>V_j, L</u>	<u>G, g/L</u>
0.0000	0.201	0.18
0.1667	0.201	4.10
0.3333	0.200	5.93
0.5000	0.199	7.60
0.6667	0.198	8.42
0.8333	0.197	10.13
1.0000	0.196	10.18
1.1667	0.195	12.97
1.3333	0.194	14.01
1.5000	0.193	15.75
1.6667	0.192	17.49
1.8333	0.191	18.53
2.0000	0.190	19.96
2.1667	0.189	20.31
2.3333	0.188	21.89
2.5000	0.187	22.93
2.6667	0.186	24.75
2.8333	0.185	26.80
3.0000	0.184	27.84

TABLA 4.26

REACTOR HOMOGENEO. INFLUENCIA DE LA CONCENTRACION ENZIMA

 $T = 50^{\circ}\text{C}$ $c_E = 6.3 \text{ g/L}$ $s_0 = 1.0 \text{ M}$

<u>t, h</u>	<u>V_j, L</u>	<u>G, g/L</u>
0.0000	0.201	0.18
0.1667	0.201	11.54
0.3333	0.200	16.40
0.5000	0.199	21.97
0.6667	0.198	22.46
0.8333	0.197	27.12
1.0000	0.196	30.97
1.1667	0.195	32.81
1.3333	0.194	35.50
1.5000	0.193	38.99
1.6667	0.192	42.70
1.8333	0.191	45.15
2.0000	0.190	45.61
2.1667	0.189	46.84
2.3333	0.188	48.37
2.5000	0.187	50.20
2.6667	0.186	50.97
2.8333	0.185	55.25
3.0000	0.184	56.47

TABLA 4.27

REACTOR HOMOGENEO. INFLUENCIA DE LA CONCENTRACION DE SUSTRATO

 $T = 50^{\circ}\text{C}$ $s_0 = 0.5 \text{ M}$ $c_E = 6.3 \text{ g/L}$

<u>t, h</u>	<u>V_j, L</u>	<u>G, g/L</u>
0.0000	0.201	0.09
0.1667	0.201	6.92
0.3333	0.200	9.70
0.5000	0.199	13.41
0.6667	0.198	14.57
0.8333	0.197	15.88
1.0000	0.196	16.41
1.1667	0.195	19.41
1.3333	0.194	20.63
1.5000	0.193	22.77
1.6667	0.192	23.87
1.8333	0.191	24.73
2.0000	0.190	26.75
2.1667	0.189	28.04
2.3333	0.188	27.30
2.5000	0.187	29.51
2.6667	0.186	30.85
2.8333	0.185	31.95
3.0000	0.184	34.22

TABLA 4.28

REACTOR HOMOGENEO. INFLUENCIA DE LA CONCENTRACION DE SUSTRATO

 $T = 50^{\circ}\text{C}$ $s_0 = 2.0 \text{ M}$ $c_E = 6.3 \text{ g/L}$

<u>t, h</u>	<u>V_j, L</u>	<u>G, g/L</u>
0.0000	0.201	0.84
0.0167	0.201	16.75
0.1667	0.200	21.59
0.3333	0.199	24.90
0.5000	0.198	29.44
0.6667	0.197	32.69
0.8333	0.196	39.41
1.1667	0.195	43.09
1.3333	0.194	49.99
1.5000	0.193	51.07
1.6667	0.192	56.28
1.8333	0.191	57.96
2.0000	0.190	60.26
2.1667	0.189	65.17
2.3333	0.188	70.23
2.5000	0.187	68.08
2.6667	0.186	69.77
2.8333	0.185	72.22

TABLA 4.29

REACTOR HOMOGENEO. INFLUENCIA DE LA CONCENTRACION DE SUSTRATO

 $T = 40^{\circ}\text{C}$ $s_0 = 0.5 \text{ M}$ $c_E = 6.3 \text{ g/L}$

$t, \text{ h}$	$V_i, \text{ L}$	$G, \text{ g/L}$
0.0000	0.201	0.09
0.1667	0.201	5.04
0.3333	0.200	5.84
0.5000	0.199	7.47
0.6667	0.198	7.81
0.8333	0.197	8.60
1.0000	0.196	8.73
1.1667	0.195	10.69
1.3333	0.194	11.37
1.5000	0.193	12.02
1.6667	0.192	12.48
1.8333	0.191	13.67
2.0000	0.190	14.44
2.1667	0.189	15.33
2.3333	0.188	16.56
2.5000	0.187	17.21
2.6667	0.186	18.74
2.8333	0.185	19.33
3.0000	0.184	19.45

TABLA 4.30

REACTOR HOMOGENEO. INFLUENCIA DE LA CONCENTRACION DE SUSTRATO

 $T = 40^{\circ}\text{C}$ $s_0 = 1.0 \text{ M}$ $c_E = 6.3 \text{ g/L}$

<u>t, h</u>	<u>V_l, L</u>	<u>G, g/L</u>
0.0000	0.201	0.41
0.1667	0.201	8.88
0.3333	0.200	11.34
0.5000	0.199	13.89
0.6667	0.198	14.75
0.8333	0.197	16.62
1.0000	0.196	16.90
1.1667	0.195	18.44
1.3500	0.194	19.79
1.5000	0.193	19.91
1.6667	0.192	22.56
1.8333	0.191	23.29
2.0000	0.190	24.28
2.1667	0.189	26.18
2.3333	0.188	26.73
2.5000	0.187	27.53
2.6667	0.186	29.56
2.8333	0.185	30.30
3.0000	0.184	31.22

TABLA 4.31

REACTOR HOMOGENEO. INFLUENCIA DE LA CONCENTRACION DE SUSTRATO

 $T = 40^{\circ}\text{C}$ $s_0 = 2.0 \text{ M}$ $c_E = 6.3 \text{ g/L}$

$t, \text{ h}$	$V_i, \text{ L}$	$G, \text{ g/L}$
0.0000	0.201	0.86
0.0333	0.201	12.70
0.1667	0.200	15.52
0.3333	0.199	16.56
0.5000	0.198	19.32
0.6667	0.197	19.81
0.8333	0.196	22.82
1.0000	0.195	24.35
1.1667	0.194	25.45
1.3333	0.193	27.36
1.5000	0.192	29.69
1.6667	0.191	32.26
1.8333	0.190	34.29
2.0000	0.189	35.88
2.1667	0.188	37.12
2.3333	0.187	37.88
2.5000	0.186	39.41
2.6667	0.185	41.25
2.8333	0.184	42.63
3.0000	0.183	44.63

TABLA 4.32

REACTOR HOMOGENEO. INFLUENCIA DE LA CONCENTRACION DE SUSTRATO

 $T = 60^{\circ}\text{C}$ $s_0 = 0.5 \text{ M}$ $c_E = 6.3 \text{ g/L}$

<u>t, h</u>	<u>V_f, L</u>	<u>G, g/L</u>
0.0000	0.201	0.09
0.1667	0.201	9.86
0.3333	0.200	14.84
0.5000	0.199	19.50
0.6667	0.198	23.32
0.8333	0.197	26.51
1.0000	0.196	28.16
1.1667	0.195	30.79
1.3333	0.194	33.18
1.5000	0.193	34.40
1.6667	0.192	36.18
1.8333	0.191	37.71
2.0000	0.190	38.20
2.1667	0.189	39.67
2.3333	0.188	40.28
2.5000	0.187	41.51
2.6667	0.186	42.00
2.8333	0.185	42.12
3.0000	0.184	42.73

TABLA 4.33

REACTOR HOMOGENEO. INFLUENCIA DE LA CONCENTRACION DE SUSTRATO

 $T = 60^{\circ}\text{C}$ $s_0 = 1.0 \text{ M}$ $c_E = 6.3 \text{ g/L}$

<u>t, h</u>	<u>V_j, L</u>	<u>G, g/L</u>
0.0000	0.201	0.18
0.1667	0.201	17.69
0.3333	0.200	22.37
0.5000	0.199	29.38
0.6667	0.198	36.60
0.8333	0.197	41.13
1.0000	0.196	48.52
1.1667	0.195	50.81
1.3333	0.194	54.33
1.5000	0.193	57.24
1.6667	0.192	61.68
1.8333	0.191	65.96
2.0000	0.190	67.49
2.1667	0.189	67.80
2.3333	0.188	70.09
2.5000	0.187	71.16
2.6667	0.186	76.36
2.8333	0.185	74.53
3.0000	0.184	76.82

TABLA 4.34

REACTOR HOMOGENEO. INFLUENCIA DE LA CONCENTRACION DE SUSTRATO

 $T = 60^{\circ}\text{C}$ $s_0 = 2.0 \text{ M}$ $c_E = 6.3 \text{ g/L}$

<u>t, h</u>	<u>V_j, L</u>	<u>G, g/L</u>
0.0000	0.201	0.37
0.1667	0.201	24.30
0.3333	0.200	34.40
0.5000	0.199	48.06
0.6667	0.198	52.34
0.8333	0.197	62.14
1.0000	0.196	69.17
1.1667	0.195	71.16
1.3333	0.194	74.83
1.5000	0.193	82.48
1.6667	0.192	88.30
1.8333	0.191	95.64
2.0000	0.190	95.95
2.1667	0.189	105.61
2.3333	0.188	107.14
2.5000	0.187	110.50
2.6667	0.186	108.22
2.8333	0.185	116.32
3.0000	0.184	112.03

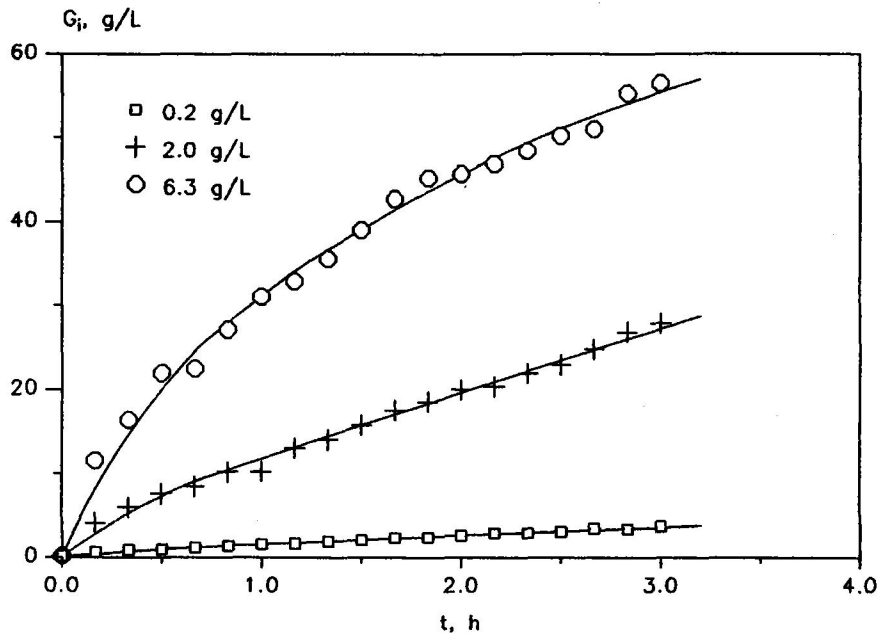


Figura 4.12. Influencia de la concentración de enzima. $T = 50^\circ\text{C}$.
Reactor homogéneo.

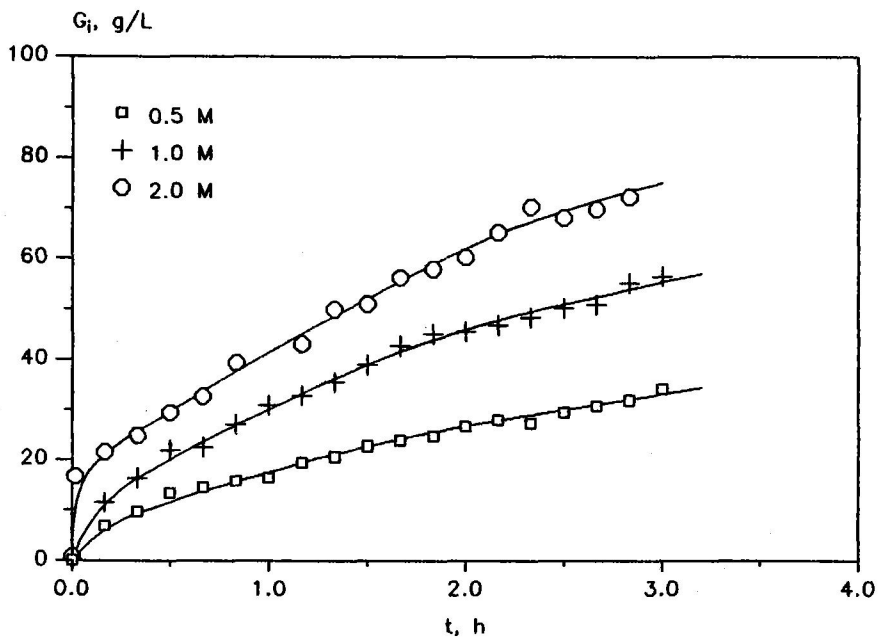


Figura 4.13. Influencia de la concentración de hexosas. $T = 50^\circ\text{C}$.
Reactor homogéneo.

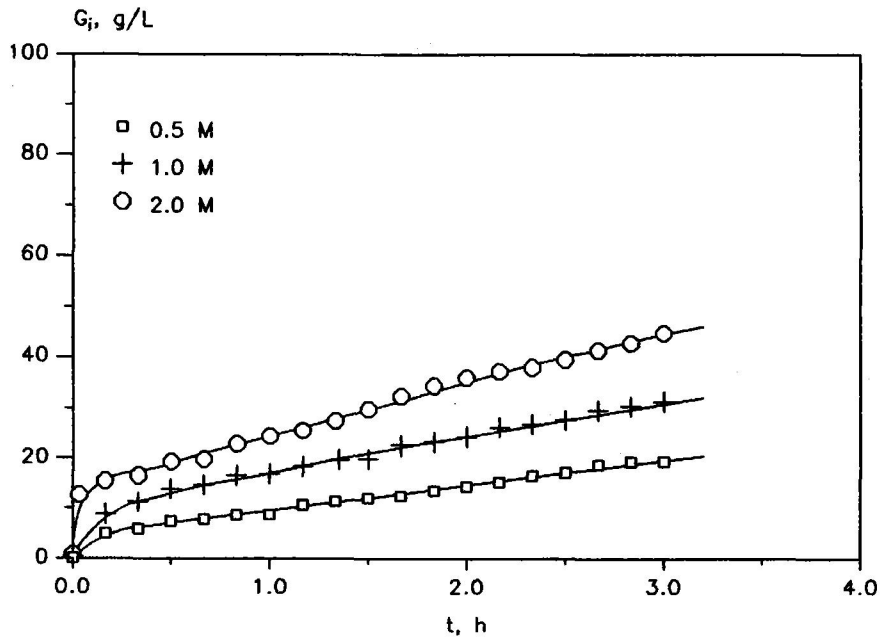


Figura 4.14. Influencia de la concentración de hexosas. $T = 40^{\circ}\text{C}$.
Reactor homogéneo.

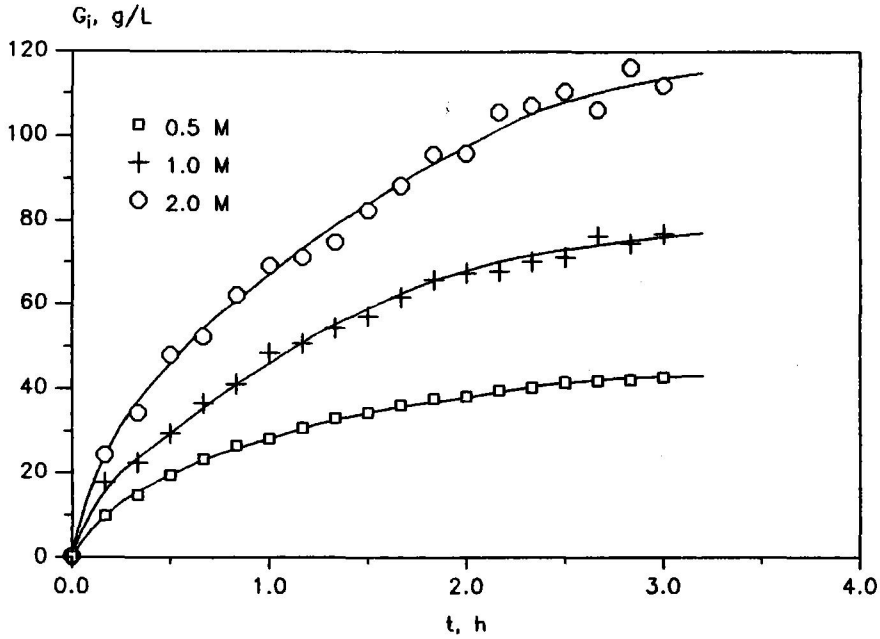


Figura 4.15. Influencia de la concentración de hexosas. $T = 60^{\circ}\text{C}$.
Reactor homogéneo.

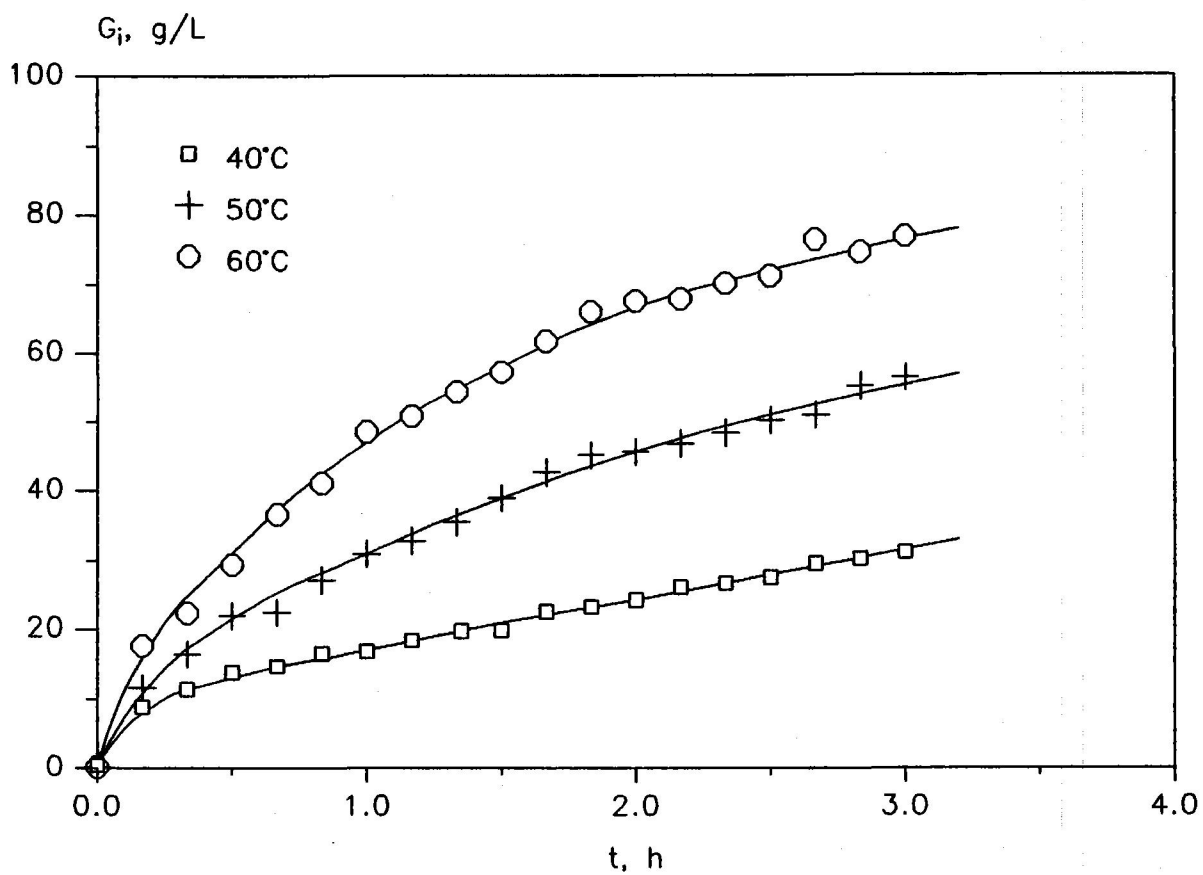


Figura 4.16. Influencia de la temperatura. $s_0 = 1 M$.

4.4 Reactor de fibra hueca de recirculación.

En este dispositivo experimental la enzima se encuentra disuelta en la mezcla reaccionante retenida en la carcasa de un módulo de fibra hueca y agitada por recirculación mediante una bomba peristáltica, tal como se ha explicado en la parte 3 de esta Memoria. Por el interior de las fibras circula la disolución de sustrato y producto que se recircula también a un tanque bien agitado.

Con este dispositivo únicamente se realizaron algunos experimentos exploratorios para analizar su aplicabilidad al proceso. Se seleccionaron las condiciones de operación siguientes

$$T = 60^{\circ}\text{C}$$

$$s_0 = 1.0 \text{ M}$$

$$q = 35 \text{ L/h}$$

$$\text{pH} = 7.5$$

y se utilizaron dos masas de complejo enzimático en la carcasa de 1.26 y 2.52 g respectivamente. Los resultados obtenidos en estos experimentos se indican en las Tablas 4.35 y 4.36.

En estas tablas c_c representa la concentración de enzima en la carcasa, obtenida teniendo en cuenta la masa de enzima introducida y el volumen de líquido en la carcasa, determinado en la parte 3 de esta Memoria. Se indican las concentraciones de glucosa medidas a la entrada y la salida del módulo de fibra hueca, observándose que ambos valores son muy próximos, siendo como era de esperar, G_c ligeramente superior a G_i . Este resultado significa que este dispositivo experimental se comporta también como un reactor diferencial, por lo que el desarrollo de la reacción puede seguirse por la variación de la concentración de glucosa en el tanque agitado.

En la Tabla 4.37 se indican los resultados obtenidos en un experimento a la misma concentración de enzima del indicado en la Tabla 4.36, pero tomando ahora muestras de la carcasa. Se planificó este experimento a la vista de que las conversiones obtenidas en este dispositivo eran apreciablemente inferiores a las que cabría esperar a partir de los resultados del reactor homogéneo.

TABLA 4.35
 REACTOR DE FIBRA HUECA

$T = 60^{\circ}\text{C}$ $s_0 = 1.0 \text{ M}$ $c_E = 6.3 \text{ g/L}$

$t, \text{ h}$	$V_j, \text{ L}$	$G_j, \text{ g/L}$	$G_f, \text{ g/L}$
0.0000	0.6010	0.42	
0.0833	0.6010	1.47	
0.2500	0.6000	3.44	
0.5000	0.5990	6.07	6.10
0.7500	0.5970	8.22	
1.0000	0.5960	10.09	
1.2500	0.5945	11.62	
1.5000	0.5935	13.16	13.25
1.7500	0.5915	14.41	
2.0000	0.5905	15.61	
2.2500	0.5890	16.50	
2.5000	0.5880	18.03	18.19
2.7500	0.5860	18.74	
3.0000	0.5850	19.63	

TABLA 4.36
REACTOR DE FIBRA HUECA
 $T = 60^{\circ}\text{C}$ $s_0 = 1.0 \text{ M}$ $c_F = 12.6 \text{ g/L}$

$t, \text{ h}$	$V_i, \text{ L}$	$G_j, \text{ g/L}$	$G_f, \text{ g/L}$
0.0000	0.6020	0.41	
0.2500	0.6020	5.75	
0.5000	0.6010	9.87	9.91
0.7500	0.6000	13.43	
1.0000	0.5990	16.35	
1.2500	0.5980	19.38	
1.5000	0.5970	21.50	
1.7500	0.5960	23.74	23.92
2.0000	0.5940	25.52	
2.2500	0.5925	27.05	27.42
2.5000	0.5905	28.28	
2.7500	0.5890	29.75	
3.0000	0.5880	30.79	31.16

TABLA 4.37
REACTOR DE FIBRA HUECA

$T = 60^{\circ}\text{C}$ $s_0 = 1.0 \text{ M}$ $c_E = 12.6 \text{ g/L}$

$t, \text{ h}$	$V_1, \text{ L}$	$G_1, \text{ g/L}$	$G_c, \text{ L}$
0.0000	0.6020	0.4183	
0.0833	0.6020	3.3451	2.2413
0.2500	0.6005	7.0858	
0.5000	0.5995	11.1667	
0.7500	0.5980	14.1102	
1.0000	0.5970	17.1150	16.93106
1.2500	0.5955	19.2000	
1.5000	0.5945	21.5303	21.26653
1.7500	0.5930	23.4926	23.47415
2.0000	0.5915	25.2710	25.20964
2.2500	0.5900	26.9880	
2.5000	0.5890	28.5824	29.01165
2.7500	0.5875	30.3608	
3.0000	0.5865	31.5872	31.40324

Los valores de G_c indicados en esta última tabla, que coinciden prácticamente con los de G_i correspondiente al tanque agitado, ponen de manifiesto que no existe un gradiente de concentración apreciable entre ambos lados de la membrana, como ya se demostró en la parte 3 de esta Memoria y era de esperar dado pequeño tamaño molecular de las hexosas.

Este resultado demuestra también que la recirculación en la carcasa es suficiente para asegurar una mezcla prácticamente perfecta en ésta.

En este mismo sentido, por la diferencia encontrada entre el comportamiento del reactor homogéneo y el reactor de fibra hueca, se repitió el experimento en las mismas condiciones en fase homogénea, cuyos resultados se indican en la Tabla 4.38.

Como se ha indicado ya en la parte 3 de esta Memoria este experimento puso de manifiesto una ligera disminución para períodos de tiempo prolongados, aunque no lo suficiente para explicar la diferencia ya comentada.

TABLA 4.38

REACTOR HOMOGENEO

 $T = 60^{\circ}\text{C}$ $s_0 = 1.0 \text{ M}$ $c_E = 6.3 \text{ g/L}$

$t, \text{ h}$	$V_j, \text{ L}$	$G, \text{ g/L}$
0.0000	0.201	0.41
0.3333	0.201	18.73
0.6667	0.199	27.36
1.0000	0.197	37.20
1.3333	0.195	44.23
1.6667	0.193	51.27
2.0000	0.191	55.56
2.3333	0.189	59.23
2.6667	0.187	62.44
3.0000	0.185	66.27

5. DISCUSION DE LOS RESULTADOS.

En esta parte de la Memoria se procede a la discusión de los resultados experimentales en el mismo orden en que están indicados en la parte 4 desarrollando también los modelos teóricos utilizados para la interpretación de los mismos.

5.1 Equilibrio de isomerización.

A partir de las Figuras 4.1 a 4.4 se determinó la conversión de equilibrio a cada temperatura promediando los valores finales en los que la conversión era prácticamente constante, oscilando en uno y otro sentido, estando ya mezclados los puntos experimentales correspondientes a los dos experimentos. Los valores obtenidos así se indican en la Tabla 5.1.

TABLA 5.1
EQUILIBRIO DE ISOMERIZACION
[Hexosas] = 0.002 M pH = 7.5

T, °C	x_e	K_e
30	0.5313	0.882
40	0.4980	1.008
50	0.4836	1.068
60	0.4755	1.103

A partir de estos resultados, teniendo en cuenta que

$$K_e = \left(\frac{[F]}{[G]} \right)_{\text{en el equilibrio}} = \frac{s_0 (1 - x_e)}{s_0 x_e} = \frac{1 - x_e}{x_e} \quad [5.1]$$

se han determinado los valores de la constante de equilibrio que se indican también en la Tabla 5.1.

En la Tabla 5.2 se indican los valores de K_e encontrados en la bibliografía junto con la temperatura a la que corresponden y el pH y la concentración total de hexosas cuando éstos datos son indicados en la publicación, así como la referencia correspondiente.

Aunque los valores de pH varían en el intervalo de 6.5 a 8.5 y la concentración total de hexosas desde dilución infinita hasta 3.4 M no se observa ninguna tendencia al variar la concentración total de hexosas o el pH, lo que parece lógico dado que los coeficientes de actividad de la glucosa y la fructosa deben ser muy semejantes.

En la Figura 5.1 se representan los valores de $\ln K_e$ indicados en las Tablas 5.1 y 5.2 frente a la inversa de la temperatura absoluta. Se ha representado también en trazo discontinuo la línea prevista por la ecuación de Roels y Van Tilburg (tomados de Vos et al. (1990)). Se observa en esta figura que aunque con cierta dispersión, la mayor parte de los resultados obtenidos se ajustan aceptablemente a la ecuación de Van't Hoff, por regresión lineal, excluyendo únicamente aquellos datos que se apartan más del 5% de la ecuación resultante (8 de 36), se obtiene

$$K_e = 24.3 \exp \left(- \frac{1022}{T} \right) \quad [5.2]$$

que también se ha representado en la Figura 5.1 en forma de línea continua. Esta ecuación indica un calor de reacción para la isomerización de 8494 KJ/mol y se ha utilizado en la interpretación cinética para el cálculo de la conversión de equilibrio a cada temperatura.

5.2 Modelo cinético.

Teniendo en cuenta el mecanismo establecido en la bibliografía para la isomerización fructosa-glucosa que se ha descrito en la parte 2 de esta Memoria, ecuaciones [2.1] a [2.13] y despreciando la concentración de intermedio frente a la de productos estables

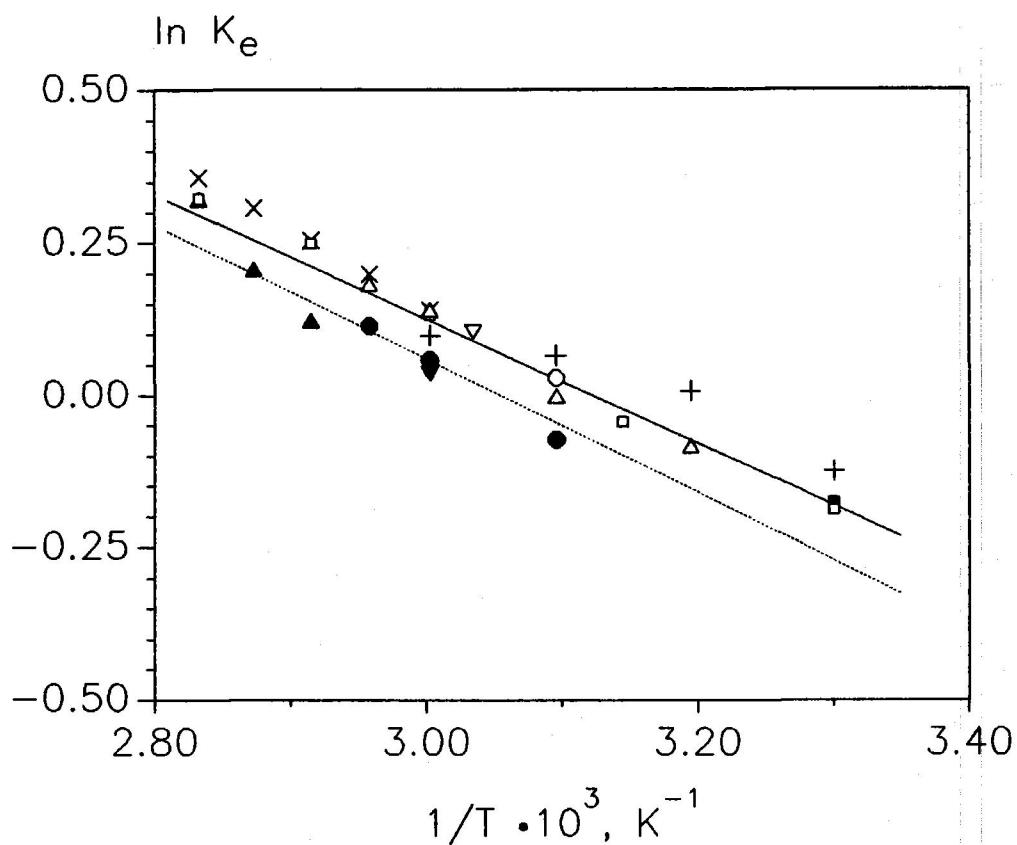
$$[F] + [G] = s_0 \quad [5.3]$$

e introduciendo la conversión

$$[F] = s_0 \cdot (1 - x) \quad [5.4]$$

TABLA 5.2
 CONSTANTES DEL EQUILIBRIO DE ISOMERIZACION FRUCTOSA-GLUCOSA

T, °C	pH	s_0 , M	K_e	Referencia
40 50 60 65			0.92 1.00 1.15 1.20	Takasaki <i>et al.</i> (1969)
50	7.0	0.0183-1.80	1.03	Lee <i>et al.</i> (1976)
30 45 60 70 80	7.0	0.02, 0.16, 1.6	0.828 0.957 1.141 1.283 1.381	Sprouil <i>et al.</i> (1976)
50 60 65			0.88 1.00 1.04	Lloid y Kheeluddin (1976)
60 65 70 75 80	8.3		1.15 1.22 1.29 1.36 1.43	Chen <i>et al.</i> (1980)
56.5 66.5 71.5	8.5	0.1, 0.2	1.11 1.43 1.60	Park <i>et al.</i> (1981)
50 60 65	6.5, 8.0, 8.2	3.4	0.93 1.06 1.12	Kikkert <i>et al.</i> (1981)
60	8.2	1.0	0.763	Benaiges <i>et al.</i> (1986)
30	7.0	0.7	0.838	Visuri y Klivanov (1987)
60 65 70 75 80	8.25	2.0	0.99 1.02 1.13 1.23 1.38	Chen y Wu (1987)
60	7.5	3.0	1.037	Gram y Bang (1990)
30 40 50 60	7.5	0.002	0.882 1.008 1.068 1.103	Esta investigación



- | | | |
|----------------------|-----------------------|-----------------------|
| ○ Lee et al. | △ Takasaki et al. | □ Sproull et al. |
| ▽ Park et al. | ● Kikkert et al. | ▲ Chen et al. (1987) |
| ■ Visuri et al. | ▼ Gram et al. | + Esta investigación. |
| × Chen et al. (1980) | — Roels y Van Tilburg | |

Figura 5.1. Constantes de equilibrio.

$$[G] = s_0 \cdot x \quad [5.5]$$

y sustituyendo en la ecuación [2.7]

$$r_{FG} = \frac{\frac{V_{mf}}{K_{mf}} \left(1 - \frac{x}{x_e} \right)}{\left(\frac{1}{s_0} + \frac{1}{K_{mf}} \right) + \left(\frac{1}{K_{mg}} - \frac{1}{K_{mf}} \right) x} \quad [5.6]$$

donde la conversión de equilibrio viene dada por

$$x_e = \frac{1}{1 + K_e} \quad [5.7]$$

Obsérvese que aunque las constantes de Michaelis sean pequeñas con respecto a s_0 , concentración total de hexosas, si ambas son iguales o muy parecidas la cinética se ajustará a una ecuación reversible de pseudoprimer orden.

La ecuación [5.6] puede ponerse en la forma

$$r_{FG} = \frac{k_r e_T (x_e - x)}{K_0 \left(K_1 + \frac{1}{s_0} \right) + (x_e - x)} \quad [5.8]$$

donde e_T representa los moles de enzima activa por gramo de complejo enzimático utilizado y los parámetros cinéticos k_r , K_0 , K_1 vienen dados por

$$k_r = \frac{k_f k_{-g} + k_{-f} k_g}{k_f - k_g} \quad [5.9]$$

$$K_0 = \frac{k_{-f} + k_{-g}}{k_f - k_g} \quad [5.10]$$

$$K_1 = \frac{k_f - k_g}{k_f k_{-g} + k_{-f} k_g} \quad [5.11]$$

Por determinación experimental de la constante de equilibrio y de estos parámetros sería posible determinar las cuatro constantes cinéticas del mecanismo propuesto [2.2]

$$k_f = \frac{k_r}{K_0 - \frac{K_e}{K_1 (1 + K_e)}} \quad [5.12]$$

$$k_g = \frac{k_r K_1 k_f}{k_r K_1 + k_f} \quad [5.13]$$

$$k_{-f} = \frac{K_e k_f}{K_1 (1 + K_e)} \quad [5.14]$$

$$k_{-g} = \frac{k_g}{K_1 (1 + K_e)} \quad [5.15]$$

5.2.1 Sistema homogéneo

Si la reacción se verifica con enzima en disolución, la velocidad de reacción observada vendrá dada por

$$r_{ob} = c_e \cdot r_{FG} \quad [5.16]$$

donde r_{ob} es la velocidad de reacción referida a la unidad de volumen, ya que r_{FG} está referida a un gramo de complejo y c_e representa la concentración de complejo enzimático en g/L. En estas condiciones

$$r_{ob} = \frac{d[G]}{dt} = s_0 \frac{dx}{dt} = c_e \frac{k_r e_T (x_e - x)}{K_0 \left(K_1 + \frac{1}{s_0} \right) + (x_e - x)} \quad [5.17]$$

que puede expresarse en la forma

$$\frac{dx}{dt} = \frac{k_a c_e (x_e - x)}{1 + K_b (x_e - x)} \quad [5.18]$$

siendo

$$k_a = \frac{k_r e_T}{K_0 (K_1 s_0 + 1)} \quad [5.19]$$

$$K_b = \frac{s_0}{K_0 (K_1 s_0 + 1)} \quad [5.20]$$

Separando variables e integrando en la ecuación [5.18]

$$\ln \left(\frac{x_e - x_0}{x_e - x} \right) + K_b (x - x_0) = k_a c_e t \quad [5.21]$$

que permite comprobar su aplicabilidad y si es así determinar las constantes k_a y K_b para un experimento cinético.

Teniendo en cuenta las ecuaciones [5.20] y [5.21] y realizando experimentos a diferentes concentraciones totales de hexosas, s_0 , es posible la determinación independiente de K_0 , K_1 y $k_r \cdot e_T$.

5.2.2 Sistemas heterogéneos

Cuando se utiliza la enzima inmovilizada en un soporte sólido, la ecuación [5.8] debe seguir siendo válida, aunque en este caso la velocidad de reacción observada dependerá además del grado de mezcla en el reactor y de la influencia del transporte interno y externo. Evidentemente, la influencia del grado de mezcla y del transporte externo están muy relacionadas puesto que ambas dependen de la turbulencia relativa líquido-sólido, por el contrario, el transporte interno, es independiente del reactor utilizado, y sólo depende de la forma y tamaño de las partículas y de las velocidades relativas de la reacción química y de la difusión en el interior de las partículas.

Reactor de dispersión

Si las partículas de catalizador sólido se encuentran dispersas en un tanque bien agitado de manera que pueda considerarse mezcla perfecta y sin influencia del transporte externo, el fenómeno sería el

mismo que en el sistema homogéneo salvo por la influencia del transporte interno en las partículas. La ecuación [5.16] es aplicable en este caso siendo c_e los gramos de catalizador sólido dispersos en el seno del líquido por unidad de volumen, e introduciendo el factor de efectividad, η , en la misma para tener en cuenta el transporte interno:

$$r_{ob} = c_e \eta (r_{FG})_s \quad [5.22]$$

Aunque la mezcla sea perfecta, si la velocidad de reacción es apreciable puede determinar gradientes de concentración de sustrato y producto en la película de contacto sólido-líquido. Teniendo en cuenta que ambos tienen la misma magnitud molecular y que de acuerdo con la estequiometría de la reacción, la concentración total de hexosas permanece constante, de producirse estos gradientes tendría lugar en esta película de contacto una contradifusión equimolar, de manera que

$$k_1 ([G]_s - [G]_\ell) = k_1 ([F]_\ell - [F]_s) \quad [5.23]$$

indicando con el subíndice ℓ las concentraciones en el seno del líquido y con el subíndice s las concentraciones en la superficie externa de las partículas. En estas condiciones, la velocidad de reacción observada sería

$$r_{ob} = k_1 a_s s_0 (x_s - x_\ell) = c_e \eta (r_{FG})_s \quad [5.24]$$

siendo a_s la superficie externa de las partículas por unidad de volumen de dispersión y debiendo aplicarse r_{FG} con la conversión correspondiente a la superficie externa de las partículas, x_s .

En ocasiones se incluyen en el factor de efectividad la influencia del transporte interno y del transporte externo expresándose la ecuación [5.24] en la forma

$$r_{ob} = c_e \eta (r_{FG})_\ell \quad [5.25]$$

Reactor de lecho fijo

Si las partículas de catalizador sólido se disponen en un lecho fijo por el que circula la fase líquida y la velocidad de circulación es suficiente para que ésta se aproxime a flujo de pistón y para anular la influencia del transporte externo, la variación de la conversión al circular a través del lecho vendría dada por

$$\frac{m_e}{q} = s_0 \int_{x_i}^{x_f} \frac{dx}{\eta (r_{FG})_s} \quad [5.26]$$

En el caso de que el transporte externo influya, debería utilizarse en la ecuación [5.26] el factor de efectividad η_T que tiene en cuenta la influencia de ambos transportes y evaluar r_{FG} en las condiciones existentes en el seno del fluido, y si el comportamiento del reactor se aparta de flujo de pistón, debería utilizarse un modelo que tuviera en cuenta la dispersión axial y radial del sustrato y producto.

Transporte interno

Los aspectos de grado de mezcla en el reactor y de transporte externo mencionados anteriormente pueden eliminarse o atenuarse de manera importante aumentando la turbulencia sólido-fluido y en cualquier caso deben eliminarse en un reactor de laboratorio para investigaciones cinéticas. Sin embargo, el transporte interno sólo puede atenuarse disminuyendo el tamaño de partícula lo que en ocasiones no es posible para la utilización práctica de estos catalizadores sólidos. Por esta razón, el transporte interno se analizará a continuación en profundidad.

La difusión de una hexosa hacia el interior de las partículas y de la otra en sentido contrario supone una contradifusión equimolar en fase líquida (difusión de Knudsen despreciable) en la que la difusividad total se corresponderá con la difusividad molecular y sólo será necesario tener en cuenta la porosidad y el factor de tortuosidad para determinar la difusividad efectiva

$$D_e = D_m \frac{\epsilon}{\tau} \quad [5.27]$$

Supuesta la partícula esférica la ecuación de continuidad de la fructosa (para la transformación fructosa \rightarrow glucosa) sería

$$\frac{1}{r^2} \frac{d}{dr} \left(D_e r^2 \frac{d[F]}{dr} \right) - \rho_p r_{FG} = 0 \quad [5.28]$$

con las condiciones límites

$$r=R \quad [F] = [F]_s \quad [5.29]$$

$$r=0 \quad \frac{d[F]}{dr} = 0 \quad [5.30]$$

Admitiendo D_e constante e introduciendo la conversión

$$\frac{1}{r^2} \frac{d}{dr} \left(r^2 \frac{dx}{dr} \right) + \frac{k_a \rho_p}{D_e} \frac{(x_e - x)}{1 + K_b (x_e - x)} = 0 \quad [5.31]$$

$$r=R \quad x = x_s \quad [5.32]$$

$$r=0 \quad \frac{dx}{dr} = 0 \quad [5.33]$$

Este sistema puede resolverse de forma analítica para las dos situaciones límites de reacción de primer orden y reacción de orden cero y de forma numérica para las restantes soluciones. Su solución suministra el perfil de la conversión en el interior de la partícula

$$x = f(r) \quad [5.34]$$

A partir de este perfil es posible determinar los moles transformados en la partícula por unidad de tiempo, R_{FG} , bien evaluando los que penetran por su superficie externa

$$R_{FG} = 4 \pi R^2 \left(-D_e s_0 \left(\frac{dx}{dr} \right)_R \right) \quad [5.35]$$

o evaluando los que se consumen en el interior de la partícula

$$R_{FG} = \int_0^R \left(\rho_p \frac{k_a s_0 (x_e - x)}{1 + K_b (x_e - x)} \right) 4 \pi r^2 dr \quad [5.36]$$

Si todo el interior de la partícula estuviera sometido a las concentraciones existentes en la superficie externa los moles transformados por unidad de tiempo, R_{FG}^* , en la misma vendrían dados por

$$R_{FG}^* = \frac{\rho_p k_a s_0 (x_e - x_s)}{1 + K_b (x_e - x_s)} \frac{4}{3} \pi R^3 \quad [5.37]$$

La relación entre las expresiones R_{FG} y R_{FG}^* se conoce con el nombre de factor de efectividad

$$\eta = \frac{R_{FG}}{R_{FG}^*} \quad [5.38]$$

Cuando la cinética se reduce a pseudoprimer orden, $K_b=0$, el sistema [5.31]-[5.33] se reduce a

$$\frac{1}{r^2} \frac{d}{dr} \left(r^2 \frac{dx}{dr} \right) + \frac{k_a P_p}{D_e} (x_e - x) = 0 \quad [5.39]$$

$$r = R \quad x = x_s \quad [5.40]$$

$$r = 0 \quad \frac{dx}{dr} = 0 \quad [5.41]$$

que puede ponerse en forma adimensional mediante las nuevas variables

$$z = \frac{r}{R} \quad [5.42]$$

$$A = \frac{x_e - x}{x_e - x_s} \quad [5.43]$$

con lo que se transforma en

$$\frac{1}{z^2} \frac{d}{dz} \left(z^2 \frac{dA}{dz} \right) - \frac{R^2 k_a P_p}{D_e} A = 0 \quad [5.44]$$

$$z = 1 \quad A = 1 \quad [5.45]$$

$$z = 0 \quad \frac{dA}{dz} = 0 \quad [5.46]$$

La ecuación diferencial [55] puede resolverse analíticamente mediante el cambio de variable

$$a = A z \quad [5.47]$$

con lo que queda en la forma

$$\frac{d^2 a}{dz^2} - 9 \phi_1^2 a = 0 \quad [5.48]$$

siendo ϕ_1 el módulo de Thiele que viene dado por

$$\phi_1 = \frac{R}{3} \sqrt{\frac{k_a \rho_p}{D_e}} \quad [5.49]$$

La solución general de [5.48] es

$$a = cte_1 \exp(3 \phi_1 z) + cte_2 \exp(-3 \phi_1 z) \quad [5.50]$$

Deshaciendo el cambio de variable y aplicando las condiciones límite [5.45] y [5.46]

$$A = \frac{1}{z} \frac{\sinh(3 \phi_1 z)}{\sinh(3 \phi_1)} \quad [5.51]$$

Teniendo en cuenta la ecuación [62] la ecuación [46] queda de la forma

$$R_{FG} = 4 \pi R D_e s_0 (x_e - x_s) \left[\frac{3 \phi_1}{\operatorname{tgh}(3 \phi_1)} - 1 \right] \quad [5.52]$$

y la ecuación [5.37] para la cinética de pseudoprimer orden

$$R_{FG}^* = \frac{4}{3} \pi R^3 k_a \rho_p s_0 (x_e - x_s) \quad [5.53]$$

Siendo el factor de efectividad por tanto

$$\eta = \frac{R_{FG}}{R_{FG}^*} = \frac{1}{\phi_1} \left(\frac{1}{\operatorname{tgh}(3 \phi_1)} - \frac{1}{3 \phi_1} \right) \quad [5.54]$$

En el caso de una cinética de orden cero, $K_b \gg 1$, la ecuación de continuidad [5.28] queda en la forma:

$$\frac{1}{r^2} \frac{d}{dr} \left(r^2 \frac{dx}{dr} \right) + \frac{k_r e_t \rho_p}{s_0 D_e} = 0 \quad [5.55]$$

y utilizando las variables adimensionales dadas por las ecuaciones [53] y [54] se transforma en

$$\frac{1}{z^2} \frac{d}{dz} \left(z^2 \frac{dA}{dz} \right) - 18 \phi_0^2 = 0 \quad [5.56]$$

siendo ϕ_0 el módulo de Thiele para orden cero que viene dado por

$$\phi_0 = \frac{R}{3} \sqrt{\frac{k_r e_t p_p}{2 D_e (x_e - x_s) s_0}} \quad [5.57]$$

Integrando la ecuación [67] y teniendo en cuenta las condiciones límite [56] y [57]

$$A = 1 - 3 \phi_0^2 (1 - z^2) \quad [5.58]$$

ecuación aplicable hasta $x = x_e$ en cuyo caso $A = 0$, que se produce en

$$z_c = \sqrt{1 - \frac{1}{3 \phi_0^2}} \quad [5.59]$$

si

$$\frac{1}{3 \phi_0^2} \geq 1 \quad \text{es decir} \quad \phi_0 \leq \frac{1}{\sqrt{3}} \quad [5.60]$$

no se alcanza el equilibrio en la partícula puesto que no hay soluciones reales de [5.59], por tanto

$$\eta = 1 \quad [5.61]$$

Se tendrán valores reales de z_c cuando

$$\frac{1}{3 \phi_0^2} \leq 1 \quad \text{es decir} \quad \phi_0 > \frac{1}{\sqrt{3}} \quad [5.62]$$

En este último caso el perfil evaluado anteriormente, ecuación [5.58], daría valores negativos de A para $z < z_c$ lo que no es posible; por lo que es necesario volver a resolver el sistema cambiando las condiciones límites para tener en cuenta que tanto el gradiente de A como su valor en z_c deben ser nulos.

Es decir, debe resolverse la ecuación [5.56] aplicando las condiciones límites

$$z = 1 \quad A = 1 \quad [5.63]$$

$$z = z_c \quad A = 0 \quad [5.64]$$

$$z = z_c \quad \frac{dA}{dz} = 0 \quad [5.65]$$

La solución obtenida es:

$$z_c^3 - \frac{3}{2} z_c^2 + \frac{1}{6} - \frac{1}{2} = 0 \quad [5.66]$$

cuya solución comprendida entre 0 y 1 es la única que tiene sentido físico y el valor del factor de efectividad sería:

$$\eta = 1 - z_c^3 \quad [5.67]$$

En el caso general será precisa la integración numérica del sistema [5.31]-[5.33] que puesto en forma adimensional al igual que anteriormente y preparado para su integración numérica se reduce a:

$$\frac{dA}{dz} = B \quad [5.68]$$

$$\frac{dB}{dz} = 9 \frac{A}{1 + \beta A} - \frac{2}{z} B \quad [5.69]$$

$$z = 0 \quad B = 0 \quad [5.70]$$

$$z = 1 \quad A = 1 \quad [5.71]$$

donde

$$\beta = K_b (x_e - x_s) \quad [5.72]$$

Sistema que puede resolverse mediante el algoritmo de Runge-Kutta de 4º orden aunque se trata de un problema de valor límite, es decir, en $z = 0$ se conoce el valor de B, que es 0, pero no el valor de A,

por lo que es necesario suponer $A(0)$ hasta conseguir que $A(1) = 1$, el valor de $B(1)$ determinado cuando esto se cumple es el gradiente adimensional en la interfase de manera que R_{FG} es:

$$R_{FG} = 4 \pi R D_e s_0 (x_e - x_s) B(1) \quad [5.73]$$

por lo que el cociente entre el valor obtenido por esta ecuación y el obtenido por la ecuación [5.37] daría el factor de efectividad en este caso

$$\eta = \frac{1 + B}{3 \phi_1^2} B(1) \quad [5.74]$$

Dado que las ecuaciones cinéticas de la forma [5.18] son muy frecuentes en cinética enzimática puede ser interesante introducir un factor de efectividad que tuviera en cuenta conjuntamente la influencia del transporte interno y la desviación de la cinética de primer orden, es decir,

$$\eta' = \frac{B(1)}{3 \phi_1^2} \quad [5.75]$$

donde η' será función de los dos módulos adimensionales que aparecen en el sistema de ecuaciones diferenciales que se integran, ϕ_1 y B .

En el Apéndice I se desarrolla el algoritmo utilizado para esta integración numérica junto con el programa en Pascal.

Los resultados obtenidos por la aplicación de este programa en los intervalos de ϕ_1 y B de 0.01 a 100, se indican en la Tabla 5.3 y se han representado en las Figuras 5.2 y 5.3.

De acuerdo con Bischoff (1965) puede definirse un módulo de Thiele generalizado para tener en cuenta diferentes expresiones cinéticas, su expresión es

$$m = \frac{L_0 P_p (r_{FG})_s}{\sqrt{2 \int_{x_s}^{x_e} D_e P_p (r_{FG})_s dx}} \quad [5.76]$$

TABLA 5.3
FACTORES DE EFECTIVIDAD

η_1	B	η'	m	η_1	η_0
0.01	0.01	0.990039	0.009934	0.999941	1.000000
0.01	0.05	0.952323	0.009681	0.999944	1.000000
0.01	0.1	0.909046	0.009387	0.999947	1.000000
0.01	0.5	0.666649	0.007666	0.999965	1.000000
0.01	1	0.499993	0.006382	0.999976	1.000000
0.01	2	0.333331	0.004965	0.999985	1.000000
0.01	5	0.166666	0.003290	0.999994	1.000000
0.01	10	0.090909	0.002331	0.999997	1.000000
0.01	50	0.019608	0.001021	0.999999	1.000000
0.01	100	0.009901	0.000717	1.000000	1.000000
0.05	0.01	0.988646	0.049670	0.998523	1.000000
0.05	0.05	0.951088	0.048403	0.998597	1.000000
0.05	0.1	0.907966	0.046934	0.998681	1.000000
0.05	0.5	0.666222	0.038330	0.999120	1.000000
0.05	1	0.499813	0.031912	0.999389	1.000000
0.05	2	0.333278	0.024826	0.999630	1.000000
0.05	5	0.166660	0.016449	0.999838	1.000000
0.05	10	0.090908	0.011657	0.999918	1.000000
0.05	50	0.019608	0.005107	0.999984	1.000000
0.05	100	0.009901	0.003584	0.999992	1.000000
0.1	0.01	0.984323	0.099339	0.994129	1.000000
0.1	0.05	0.947236	0.096806	0.994422	1.000000
0.1	0.1	0.904612	0.093867	0.994753	1.000000
0.1	0.5	0.664892	0.076660	0.996492	1.000000
0.1	1	0.499250	0.063825	0.997564	1.000000
0.1	2	0.333111	0.049652	0.998524	1.000000
0.1	5	0.166639	0.032898	0.999351	1.000000
0.1	10	0.090905	0.023314	0.999674	1.000000
0.1	50	0.019608	0.010214	0.999937	1.000000
0.1	100	0.009901	0.007168	0.999969	1.000000
0.5	0.01	0.869411	0.496696	0.877600	1.000000
0.5	0.05	0.843018	0.484030	0.882750	1.000000
0.5	0.1	0.812037	0.469336	0.888666	1.000000
0.5	0.5	0.624430	0.383299	0.921655	1.000000
0.5	1	0.481307	0.319124	0.943782	1.000000
0.5	2	0.327649	0.248261	0.964871	1.000000
0.5	5	0.165955	0.164490	0.984133	1.000000
0.5	10	0.090795	0.116572	0.991940	1.000000
0.5	50	0.019607	0.051069	0.998439	1.000000
0.5	100	0.009901	0.035842	0.999230	1.000000

TABLA 5.3 (continuación)
FACTORES DE EFECTIVIDAD

ϕ_1	B	ϕ_1'	η	ϕ_1	ϕ_0
1	0.01	0.667898	0.993391	0.674075	0.773114
1	0.05	0.653367	0.968060	0.683523	0.786754
1	0.1	0.636076	0.938673	0.694680	0.803008
1	0.5	0.524612	0.766598	0.763757	0.905758
1	1	0.428431	0.638249	0.818088	0.979872
1	2	0.309289	0.496521	0.877671	1.000000
1	5	0.163602	0.328981	0.940553	1.000000
1	10	0.090428	0.233145	0.968835	1.000000
1	50	0.019603	0.102137	0.993796	1.000000
1	100	0.009900	0.071684	0.996930	1.000000
2	0.01	0.414911	1.986782	0.418887	0.446138
2	0.05	0.408064	1.936121	0.427583	0.456249
2	0.1	0.399913	1.877346	0.438103	0.468551
2	0.5	0.347215	1.533196	0.510562	0.555675
2	1	0.301023	1.276497	0.579565	0.643367
2	2	0.240576	0.993043	0.674204	0.773299
2	5	0.150157	0.657961	0.809682	0.969915
2	10	0.088483	0.466289	0.889884	1.000000
2	50	0.019589	0.204275	0.975826	1.000000
2	100	0.009899	0.143369	0.987881	1.000000
5	0.01	0.185988	4.966956	0.187819	0.192270
5	0.05	0.183353	4.840302	0.192371	0.197056
5	0.1	0.180216	4.693364	0.197934	0.202916
5	0.5	0.159974	3.832990	0.238205	0.245651
5	1	0.142296	3.191244	0.280627	0.291332
5	2	0.119303	2.482607	0.348719	0.366302
5	5	0.085433	1.644903	0.484805	0.524191
5	10	0.061341	1.165723	0.614117	0.689401
5	50	0.019406	0.510686	0.871862	1.000000
5	100	0.009882	0.358421	0.930529	1.000000
10	0.01	0.096332	9.933911	0.097287	0.098407
10	0.05	0.095029	9.680605	0.099742	0.100921
10	0.1	0.093479	9.386728	0.102750	0.104004
10	0.5	0.083480	7.665980	0.124774	0.126651
10	1	0.074752	6.382487	0.148496	0.151199
10	2	0.063408	4.965213	0.187880	0.192335
10	5	0.046723	3.289806	0.273170	0.283250
10	10	0.034893	2.331446	0.367595	0.387496
10	50	0.014763	1.021373	0.663824	0.758449
10	100	0.009206	0.716843	0.784662	0.936227

TABLA 5.3 (continuación II)

FACTORES DE EFECTIVIDAD

ϕ_1	B	η'	m	η_1	η_0
50	0.01	0.019800	49.869557	0.019998	0.020043
50	0.05	0.019542	48.403023	0.020518	0.020565
50	0.1	0.019235	46.933639	0.021155	0.021206
50	0.5	0.017254	38.329900	0.025862	0.025938
50	1	0.015525	31.912436	0.031008	0.031117
50	2	0.013278	24.826067	0.039739	0.039919
50	5	0.009976	16.449030	0.059562	0.059971
50	10	0.007636	11.657231	0.083331	0.084144
50	50	0.003667	5.106864	0.183034	0.187246
50	100	0.002587	3.584213	0.253054	0.261560
100	0.01	0.009933	99.339113	0.010033	0.010044
100	0.05	0.009805	96.806047	0.010294	0.010306
100	0.1	0.009651	93.867277	0.010616	0.010628
100	0.5	0.008662	76.659800	0.012988	0.013007
100	1	0.007798	63.824871	0.015586	0.015613
100	2	0.006676	49.652135	0.020005	0.020050
100	5	0.005027	32.898061	0.030089	0.030191
100	10	0.003859	23.314462	0.042279	0.042483
100	50	0.001877	10.213729	0.094712	0.095771
100	100	0.001338	7.168427	0.133014	0.135159

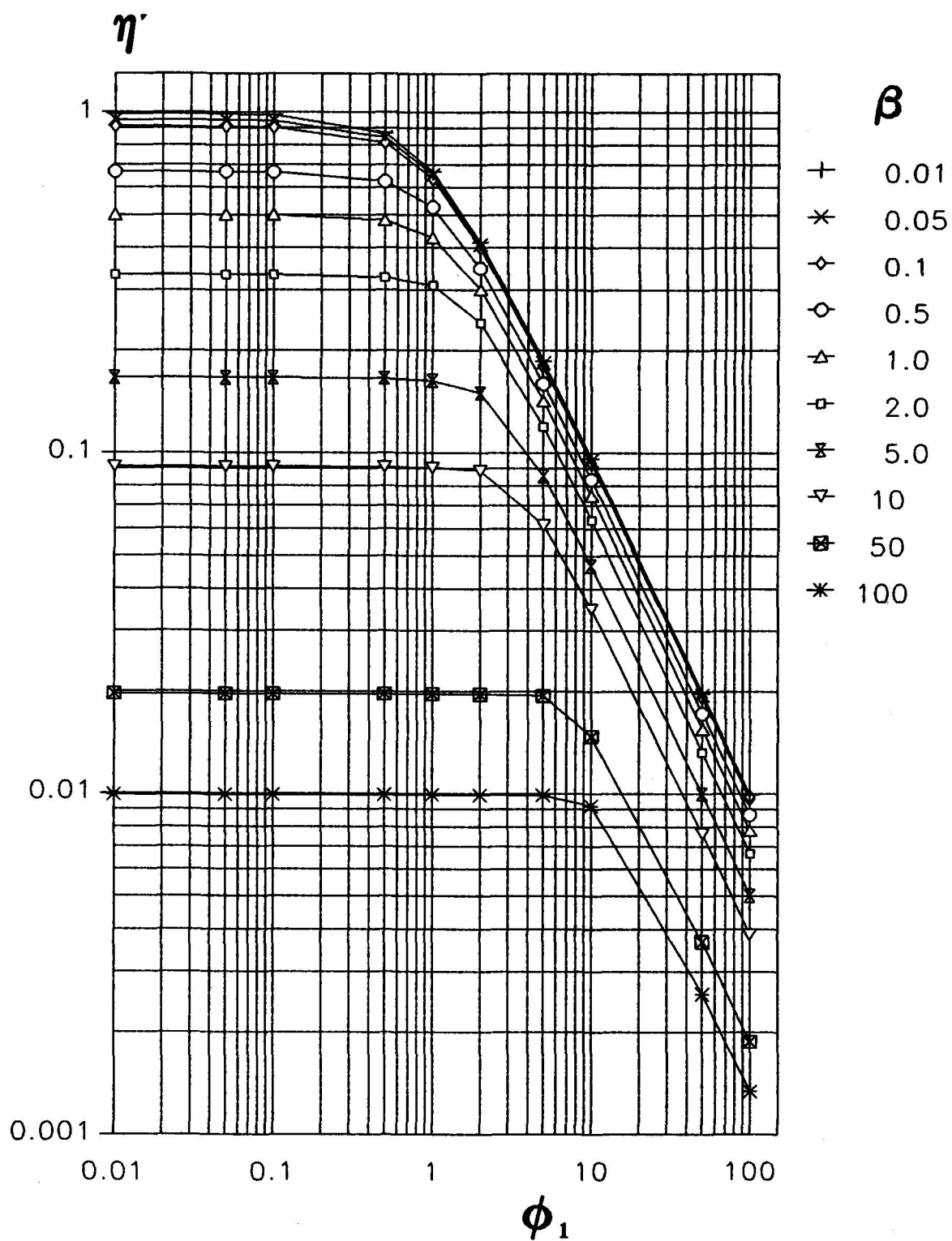


Figura 5.2. Factor de efectividad frente al módulo de Thiele de primer orden.

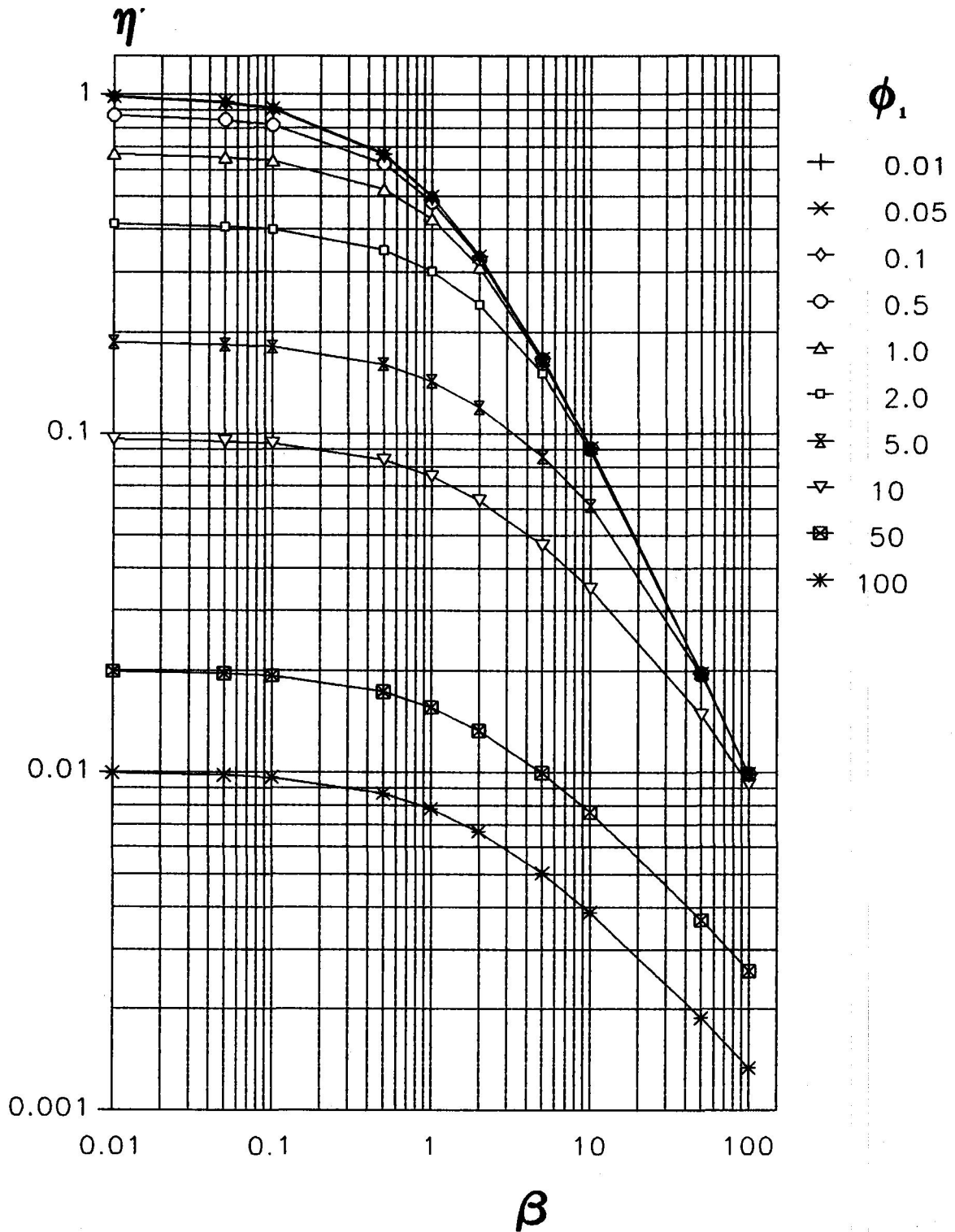


Figura 5.3. Factor de efectividad frente a beta.

donde L_0 es la longitud característica de la partícula definida como la relación entre su volumen y su área superficial externa, que para una esfera es $R/3$. Introduciendo en la ecuación anterior la expresión de r_{FG} utilizada anteriormente

$$r_{FG} = \frac{s_0 k_a (x_e - x)}{1 + K_b (x_e - x)} \quad [5.77]$$

se obtiene finalmente

$$m = \frac{\phi \beta}{(1 + \beta) \sqrt{2 (\beta - \ln(1 + \beta))}} \quad [5.78]$$

También se indican en la Tabla 5.3 los factores de efectividad para órdenes 1 y 0, η_1 y η_0 , calculados con el módulo de Thiele generalizado, m , ecuaciones [5.54], [5.61] y [5.67], ya que generalmente se trata de relacionar el factor de efectividad con estos dos valores límites.

En este sentido se ha deducido la expresión

$$\eta' = \frac{\beta \eta_0 + a \eta_1}{(\beta + a) (\beta + 1)} \quad [5.79]$$

para evaluar η' a partir de estos valores límites. El cálculo se ha realizado mediante regresión no lineal utilizando el algoritmo de Marquardt con el paquete integrado Statgraphics, obteniéndose un valor para a de 2.614.

Expresiones semejantes a la ecuación anterior han sido publicadas en la bibliografía para el cálculo del factor de efectividad, aunque sin incluir la desviación de la cinética de primer orden, es decir, sin que aparezca el binomio $(1 + \beta)$ en el denominador. Así, Kobayashi y Moo-Young (1972), proponen para a el valor 1, Gondo et al. (1974) proponen un valor de 5 y Kobayashi et al. (1976) dan para a la expresión

$$a = 2.6 \beta^{0.2} \quad [5.80]$$

Los resultados obtenidos con las ecuaciones propuestas por estos autores, adaptadas para incluir la desviación de la cinética de primer orden se comparan con los de la ecuación

TABLA 5.4
COMPARACION ECUACIONES PROPUESTAS PARA EL CALCULO DE η'

a	SSR	ERROR RELATIVO %	Referencia
1	$1.08 \cdot 10^{-3}$	0.368	Kobayashi y Moo-Young (1972)
5	$2.90 \cdot 10^{-4}$	0.298	Gondo et al. (1974)
$2.6 B^{0.2}$	$4.31 \cdot 10^{-5}$	0.147	Kobayashi et al. (1976)
2.614	$3.68 \cdot 10^{-5}$	0.107	Esta investigación

propuesta en este trabajo en la Tabla 5.4, en la que se representa por SSR el sumatorio de los cuadrados residuales.

Se observa en esta tabla que la ecuación propuesta en esta investigación reproduce mejor los resultados obtenidos por integración numérica que los propuestos anteriormente. En particular si se compara con la ecuación propuesta por Kobayashi et al. (1976) la ecuación [5.86] se ha deducido para un intervalo mucho más amplio de B (los autores citados utilizan un intervalo de B de 0.05 a 20) y con un parámetro ajustable menos.

En resumen, el factor de efectividad, incluyendo la desviación de la cinética de primer orden, puede calcularse mediante las ecuaciones

$$m = \frac{\Phi B}{(1+B) \sqrt{2(B - \ln(1+B))}} \quad [5.81]$$

$$\eta = \frac{1}{m} \left(\frac{1}{\operatorname{tgh}(3m)} - \frac{1}{3m} \right) \quad [5.82]$$

$$\eta = \begin{cases} 1 & m \leq \frac{1}{\sqrt{3}} \\ 1 - z_c^3 & m > \frac{1}{\sqrt{3}} \end{cases} \quad [5.83]$$

$$m > \frac{1}{\sqrt{3}} \quad [5.84]$$

donde z_c es la solución de

$$z_c^3 - \frac{3}{2} z_c^2 + \frac{1}{6 m^2} - \frac{1}{2} = 0 \quad [5.85]$$

comprendida entre 0 y 1

$$eFUNC\eta' = \frac{\beta \eta_0 + 2.614 \eta_1}{(\beta + 2.614)(\beta + 1)} \quad [5.86]$$

a partir de los valores de m_1 y β , con un error relativo medio inferior al 0.11%. Por tanto, la velocidad de reacción por unidad de masa de enzima inmovilizada vendrá dada por

$$r_{FG} = \eta' s_0 k_a (x_e - x), \quad \frac{\text{mol}}{\text{h g}} \quad [5.87]$$

5.3 Glucosa isomerasa inmovilizada.

Para interpretar los experimentos realizados con glucosa isomerasa inmovilizada es necesario desarrollar un modelo del dispositivo experimental utilizado: reactor de lecho fijo de recirculación, Figura 5.4.

Un balance de glucosa en el reactor de lecho fijo admitiendo flujo de pistón, conduce a

$$q s_0 x + r_{FG} dm = q s_0 (x + dx) \quad [5.88]$$

estando aplicado este balance a un elemento diferencial de volumen en dirección axial que contiene una masa diferencial de enzima, dm . La ecuación [5.88] puede reagruparse en la forma

$$\frac{s_0 dx}{r_{FG}} = \frac{dm}{q} \quad [5.89]$$

y por integración se obtiene

$$\frac{m}{q} = \int_{x_i}^{x_f} \frac{s_0 dx}{r_{FG}} \quad [5.90]$$

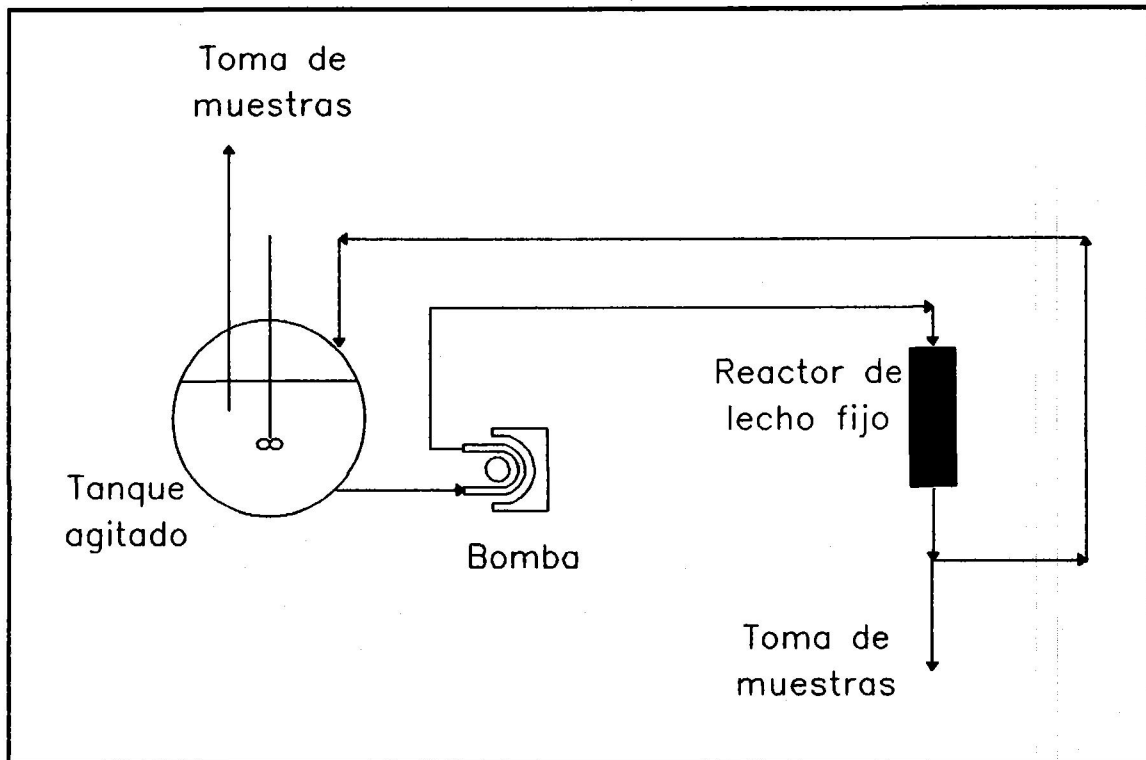


Figura 5.4. Esquema del dispositivo empleado con el reactor de lecho fijo.

que coincide con la ecuación [5.26] si se tiene en cuenta que r_{FG} debe contener el factor de efectividad. En la ecuación [5.90] x_i y x_f representan las conversiones de entrada y salida en el reactor en cada instante.

Considerando despreciable la fracción de fase líquida contenida en las conducciones y en el reactor de lecho fijo respecto a la contenida en el tanque, y admitiendo que la mezcla en este último es perfecta, un balance de glucosa conduce a

$$q s_0 x_f dt = q s_0 x dt + V s_0 dx \quad [5.91]$$

que puede reagruparse en la forma

$$V \frac{dx}{dt} = q (x_f - x) \quad [5.92]$$

por tanto, las ecuaciones [5.90] y [5.92], teniendo en cuenta que $x = x_f$, gobiernan la evolución del sistema con el tiempo junto con la condición inicial

$$t = 0 \qquad x = x_0 \qquad [5.93]$$

Es evidente, que la toma de muestras a la entrada y salida del reactor proporcionan la medida experimental de la variación con el tiempo de x y x_f . Por otra parte, r_{FG} en la ecuación [5.90] representa la velocidad de reacción por unidad de masa de enzima en el lecho e incluye la influencia de las etapas de transporte interno y externo.

Si el reactor de lecho fijo puede considerarse diferencial, la ecuación [5.90] se aproxima a

$$\frac{m_e}{q} = \frac{s_0}{(r_{FG})_m} (x_f - x) \qquad [5.94]$$

ecuación que permitiría obtener la velocidad de reacción, para la conversión media entre la entrada y la salida del reactor.

$$(r_{FG})_m = \frac{q s_0 (x_f - x)}{m_e} \qquad [5.95]$$

En la Tabla 5.5 se muestran a título de ejemplo los resultados obtenidos para el experimento cuyos datos primarios se indican en la Tabla 4.11, que por haber sido realizado con la mayor masa de enzima utilizada debe ser el que más se aleje del comportamiento como diferencial. Los valores de $(r_{FG})_m$ obtenidos se han representado frente al tiempo en la Figura 5.5.

Se observa tanto en la Tabla 5.5 como en la Figura 5.5 que al ser las conversiones de entrada y salida muy próximas, los errores experimentales en la determinación de x y x_f hacen que la estimación de la velocidad de reacción a partir de [5.95] presente importantes desviaciones. Este resultado no permite utilizar la citada ecuación, pero confirma que el comportamiento del reactor se aproxima a diferencial.

Por otra parte, de las ecuaciones [5.92] y [5.94] se obtiene

TABLA 5.5
ESTIMACION DE LA VELOCIDAD MEDIA DE REACCION

$q = 11.4 \text{ L/h}$ $T = 50^\circ\text{C}$ $s_0 = 1 \text{ M}$ $m = 14.0 \text{ g}$

$t, \text{ h}$	x	x_f	$r_{FG}, \text{ mol/g}\cdot\text{h}$
			0.000000
0.0000	0.000777	0.000777	
0.0833	0.026310	0.032693	0.005198
0.1667	0.054008	0.060890	0.005605
0.2500	0.081206	0.088088	0.005605
0.3333	0.109292	0.119172	0.008045
0.4167	0.138099	0.144538	0.005243
0.5000	0.160468	0.168184	0.006283
0.6667	0.209925	0.213810	0.003164
0.8333	0.247336	0.252942	0.004565
1.0000	0.281750	0.286912	0.004203
1.1667	0.317496	0.326099	0.007006
1.3333	0.338976	0.342418	0.002802
1.5000	0.369949	0.372558	0.002124
1.7500	0.386323	0.390597	0.003480
2.0000	0.415575	0.419016	0.002802
2.2500	0.430173	0.442218	0.009808
2.5000	0.450821	0.450821	0.000000
2.9167	0.455984	0.474911	0.015412
3.0000	0.471470	0.476632	0.004203
3.0833	0.464587	0.474911	0.008407

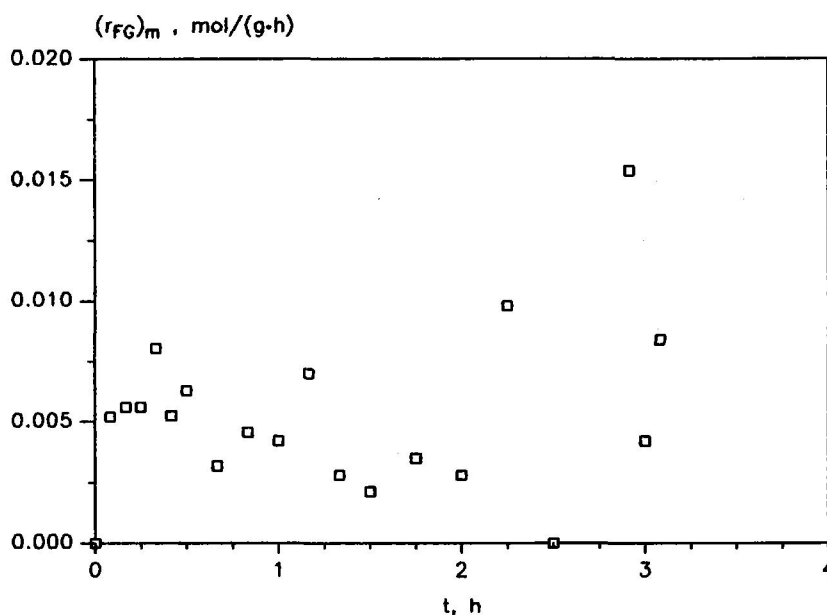


Figura 5.5. Velocidad de reacción, ecuación [5.95]

$$\frac{dx}{dt} = \frac{r_{FG}}{V s_0} m \quad [5.96]$$

$$t = 0 \quad x = x_0$$

Ecuación que gobierna el comportamiento del dispositivo experimental cuando el reactor de lecho fijo se comporta como diferencial y que pone de manifiesto que la variación de la conversión con el tiempo se hace independiente del caudal de circulación, como han puesto de manifiesto los experimentos comentados en el apartado 4.2.1, Figura 4.5.

Es decir, los resultados obtenidos analizando la influencia del caudal de circulación y con el experimento de 14 g de enzima en el lecho fijo ponen de manifiesto que en las condiciones experimentales utilizadas el reactor de lecho fijo y recirculación se comporta como un reactor diferencial, y además que la influencia del transporte externo sobre la cinética de la isomerización en el lecho es despreciable.

Es evidente que este resultado debe confirmarse para los experimentos realizados en las mismas condiciones y con diferentes masas de enzima, ya que el sistema [5.96] puede reagruparse en la forma

$$\frac{dx}{d(mt)} = \frac{r_{FG}}{V s_0} \quad [5.97]$$

$$mt = 0 \quad x = x_0$$

que sugiere que las conversiones obtenidas en los experimentos descritos en el apartado 4.2.2 deben ser una función única del producto de la masa de enzima por el tiempo de operación. Para comprobar esta hipótesis se han calculado las conversiones correspondientes a los diferentes tiempos de los experimentos realizados cambiando la masa de enzima en el lecho fijo que se indican en la Tabla 5.6 y que se representan en la Figura 5.6 frente al producto mt como sugiere la ecuación [5.97]. Se observa en esta figura que los puntos experimentales correspondientes a las cuatro masas de enzima coinciden prácticamente en una sola línea, lo que confirma las hipótesis implicadas en las ecuaciones [5.96] o [5.97].

Despejando la velocidad de reacción de la ecuación [5.96] se obtiene

$$r_{FG} = \frac{V}{m} s_0 \frac{dx}{dt} \quad [5.98]$$

Con el objeto de tener en cuenta la variación del volumen de fase líquida provocada por la extracción de muestras a lo largo de cada experimento, es conveniente sustituir el tiempo como variable intensiva de tratamiento por

$$y = n \sum_i \frac{t_i}{V_i} \quad [5.99]$$

de manera que en cada período de tiempo comprendido entre dos tomas de muestras se utiliza el volumen de fase líquida que realmente hay en el sistema.

En las Tablas 5.7 a 5.19 se indican los valores de y y los de la conversión para los experimentos cinéticos realizados a 50, 30, 40 y 60°C.

TABLA 5.6
 INFLUENCIA DE LA MASA DE ENZIMA

$q = 11.4 \text{ L/h}$ $T = 50^\circ\text{C}$ $s_0 = 1 \text{ M}$

$t, \text{ h}$	$m = 3.5 \text{ g}$ x	$m = 5.0 \text{ g}$ x	$m = 7.0 \text{ g}$ x	$m = 14.0 \text{ g}$ x
0.0000	0.000777	0.000777	0.000777	0.000777
0.0833				0.026310
0.1667	0.015153	0.020648	0.025810	0.054008
0.2500	0.024423	0.031861	0.042684	0.081206
0.3333	0.030306	0.041297	0.060890	0.109292
0.4167	0.038577	0.055229	0.076599	0.138099
0.5000	0.045959	0.064165	0.096359	0.160468
0.6667	0.061445	0.089920	0.123890	0.209925
0.8333	0.080873	0.108404	0.157471	0.247336
1.0000	0.093972	0.135102	0.181561	0.281750
1.1667		0.149700		0.317496
1.2500	0.118728		0.218972	
1.3333		0.166463		0.338976
1.5000	0.141541	0.189720	0.262433	0.369949
1.7500				0.386323
1.8333	0.163466	0.230573		
2.0000		0.248668	0.316607	0.415575
2.2500	0.193606	0.269316		0.430173
2.3333			0.345027	
2.5000	0.215975	0.281361	0.355351	0.450821
2.6667		0.285635	0.359625	
2.7500	0.234902			
2.8333		0.313166		
2.9167				0.455984
3.0000				0.471470
3.0833				0.464587
3.1667	0.271037			

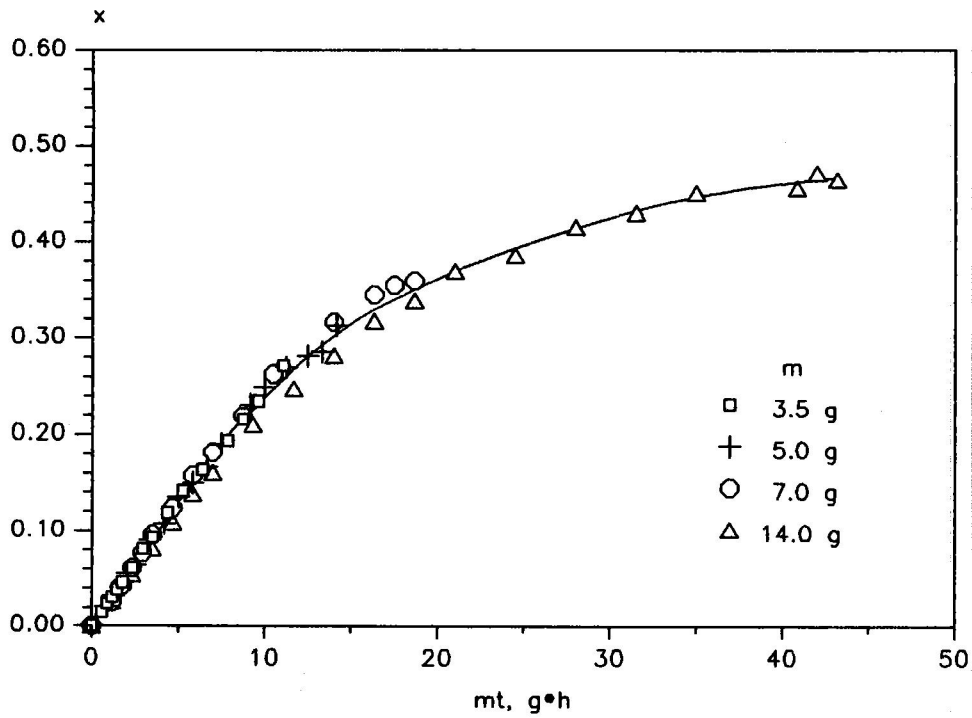


Figura 5.6. Conversión frente al producto $m \cdot t$. $T = 50^\circ\text{C}$, $s_0 = 1 \text{ M}$.

Sustituyendo [5.99] en [5.98]

$$r_{FG} = s_0 \frac{dx}{dy} \quad [5.100]$$

ecuación que permite determinar la velocidad de reacción en cada instante de los experimentos cinéticos aplicando cualquiera de los dos métodos posibles de interpretación de datos cinéticos: diferencial e integral.

Así, puesto que en cada experimento los valores de T y s_0 permanecen constantes, es posible ajustar los valores de la conversión frente a y a ecuaciones del tipo

$$x = f(y) \quad [5.101]$$

$$r_{FG} = s_0 f'(y) \quad [5.102]$$

que corresponde al método diferencial.

TABLA 5.7
INFLUENCIA DE LA CONCENTRACION TOTAL DE HEXOSAS
T = 50°C $s_0 = 0.5$

t, h	y	x
0.0000	0.000	0.0009
0.1667	3.333	0.0309
0.2500	5.013	0.0451
0.3333	6.707	0.0563
0.5000	10.123	0.0838
0.5833	11.844	0.0986
0.6667	13.580	0.1119
0.8333	17.082	0.1484
1.0000	20.613	0.1742
1.1667	24.174	0.1937
1.3333	27.766	0.2315
1.5000	31.389	0.2547
1.7500	36.872	0.2874
2.0000	42.403	0.3115
2.2500	47.983	0.3416
2.5000	53.614	0.3648
2.8333	61.189	0.3794
3.0000	65.012	0.4044

TABLA 5.8
INFLUENCIA DE LA CONCENTRACION TOTAL DE HEXOSAS
T = 50°C $s_0 = 1.0 \text{ M}$

t, h	y	x
0.0000	0.000	0.0008
0.1667	3.333	0.0206
0.2500	5.013	0.0319
0.3333	6.707	0.0413
0.4167	8.415	0.0552
0.5000	10.137	0.0642
0.6667	13.609	0.0899
0.8333	17.110	0.1084
1.0000	20.641	0.1351
1.3333	27.795	0.1665
1.5000	31.418	0.1897
1.6667	35.073	0.2151
1.8333	38.760	0.2306
2.0000	42.480	0.2487
2.2500	48.111	0.2693
2.5000	53.793	0.2814
2.6667	57.615	0.2856
2.8333	61.473	0.3132

TABLA 5.9
INFLUENCIA DE LA CONCENTRACION TOTAL DE HEXOSAS
T = 50°C $s_0 = 1.5 \text{ M}$

t, h	y	x
0.0000	0.000	0.0008
0.1667	3.333	0.0150
0.2500	5.013	0.0240
0.3333	6.707	0.0327
0.4167	8.415	0.0411
0.5000	10.137	0.0506
0.6667	13.609	0.0692
0.8333	17.110	0.0892
1.0000	20.641	0.1055
1.1667	24.203	0.1222
1.3333	27.795	0.1382
1.5000	31.418	0.1549
1.8333	38.664	0.1867
2.1667	45.974	0.2168
2.6667	57.036	0.2553
2.9167	62.616	0.2788
3.0833	66.370	0.2914

TABLA 5.10
INFLUENCIA DE LA CONCENTRACION TOTAL DE HEXOSAS
T = 50°C $s_0 = 2.0 \text{ M}$

t, h	y	x
0.0000	0.000	0.0008
0.1667	3.333	0.0139
0.2500	5.013	0.0193
0.3333	6.707	0.0266
0.4167	8.415	0.0341
0.5000	10.137	0.0393
0.6667	13.609	0.0525
0.8333	17.110	0.0637
1.0000	20.641	0.0789
1.1667	24.203	0.0931
1.3333	27.795	0.1093
1.5000	31.418	0.1219
1.7500	36.900	0.1438
2.0000	42.431	0.1580
2.2500	48.012	0.1768
2.5000	53.642	0.1889
2.8333	61.218	0.2138
3.0000	65.041	0.2220

TABLA 5.11
INFLUENCIA DE LA CONCENTRACION TOTAL DE HEXOSAS
T = 30°C $s_0 = 0.5 \text{ M}$

t, h	y	x
0.0000	0.000	0.0008
0.1667	3.333	0.0069
0.2500	5.007	0.0107
0.3333	6.687	0.0142
0.4167	8.374	0.0186
0.5000	10.067	0.0229
0.6667	13.469	0.0312
0.8333	16.884	0.0371
1.0000	20.313	0.0462
1.1667	23.757	0.0544
1.3333	27.215	0.0630
1.5000	30.687	0.0724
1.7500	35.917	0.0840
2.0000	41.169	0.0885
2.2500	46.444	0.1053
2.5000	51.740	0.1165
2.6667	55.286	0.1234
2.7500	57.067	0.1262

TABLA 5.12
INFLUENCIA DE LA CONCENTRACION TOTAL DE HEXOSAS
T = 30°C $s_0 = 1.0 \text{ M}$

t, h	y	x
0.0000	0.000	0.0008
0.1667	3.333	0.0043
0.2500	5.007	0.0067
0.3333	6.687	0.0092
0.4167	8.374	0.0117
0.5000	10.067	0.0139
0.6667	13.469	0.0187
0.8333	16.884	0.0237
1.0000	20.313	0.0289
1.1667	23.757	0.0347
1.3333	27.215	0.0389
1.5000	30.687	0.0446
1.7500	35.917	0.0514
2.0000	41.169	0.0606
2.2500	46.444	0.0699
2.5000	51.740	0.0797
2.7500	57.059	0.0859
2.9167	60.621	0.0891
3.0833	64.197	0.0952

TABLA 5.13
INFLUENCIA DE LA CONCENTRACION TOTAL DE HEXOSAS
T = 30°C $s_0 = 2.0 \text{ M}$

t, h	y	x
0.0000	0.000	0.0009
0.1667	3.333	0.0027
0.2500	5.007	0.0039
0.3333	6.687	0.0050
0.4167	8.374	0.0062
0.5000	10.067	0.0074
0.6667	13.469	0.0095
0.8333	16.884	0.0122
1.0000	20.313	0.0149
1.1667	23.757	0.0179
1.3333	27.215	0.0200
1.5000	30.687	0.0221
1.7500	35.917	0.0273
2.0000	41.169	0.0315
2.2500	46.444	0.0366
2.5000	51.740	0.0404
2.7500	57.059	0.0460
2.9167	60.621	0.0475
3.0833	64.197	0.0510

TABLA 5.14
INFLUENCIA DE LA CONCENTRACION TOTAL DE HEXOSAS
T = 40°C $s_0 = 0.5 \text{ M}$

t, h	y	x
0.0000	0.000	0.0010
0.1667	3.333	0.0163
0.2500	5.007	0.0241
0.3333	6.687	0.0321
0.4167	8.374	0.0398
0.5000	10.067	0.0482
0.6667	13.469	0.0640
0.8333	16.884	0.0807
1.0000	20.313	0.0943
1.1667	23.757	0.1077
1.3333	27.215	0.1315
1.5000	30.687	0.1535
1.7500	35.917	0.1790
2.0000	41.169	0.1927
2.5000	51.740	0.2487
2.7500	57.059	0.2616
2.9167	60.621	0.2650
3.0833	64.197	0.2865

TABLA 5.15
INFLUENCIA DE LA CONCENTRACION TOTAL DE HEXOSAS
T = 40°C $s_0 = 1.0 \text{ M}$

t, h	y	x
0.0000	0.000	0.0008
0.1667	3.333	0.0099
0.2500	5.007	0.0137
0.3333	6.687	0.0160
0.4167	8.374	0.0224
0.5000	10.067	0.0245
0.6667	13.469	0.0379
0.8333	16.884	0.0506
1.0000	20.313	0.0576
1.1667	23.757	0.0605
1.3333	27.215	0.0807
1.5000	30.687	0.0988
1.7500	35.917	0.1125
2.0000	41.169	0.1391
2.2500	46.444	0.1549
2.5000	51.740	0.1618
2.7500	57.059	0.1652
2.9167	60.621	0.1786
3.0833	64.197	0.1876

TABLA 5.16
INFLUENCIA DE LA CONCENTRACION TOTAL DE HEXOSAS
T = 40°C s₀ = 2.0 M

t, h	y	x
0.0000	0.000	0.0009
0.1667	3.333	0.0042
0.2500	5.007	0.0069
0.3333	6.687	0.0088
0.4167	8.374	0.0123
0.5000	10.067	0.0155
0.6667	13.469	0.0208
0.8333	16.884	0.0282
1.0000	20.313	0.0351
1.1667	23.757	0.0400
1.3333	27.215	0.0469
1.5000	30.687	0.0512
1.7500	35.917	0.0591
2.0000	41.169	0.0699
2.2500	46.444	0.0816
2.5000	51.740	0.0943
2.7500	57.059	0.1070
2.9167	60.621	0.1141
3.0833	64.197	0.1199

TABLA 5.17
INFLUENCIA DE LA CONCENTRACION TOTAL DE HEXOSAS
T = 60°C s₀ = 0.5 M

t, h	y	x
0.0000	0.000	0.0010
0.0833	1.867	0.0293
0.1667	3.340	0.0599
0.2500	5.020	0.0883
0.3333	6.707	0.1150
0.4167	8.401	0.1421
0.5000	10.101	0.1542
0.6667	13.517	0.2134
0.8333	16.946	0.2418
1.0000	20.390	0.2805
1.1667	23.847	0.3089
1.5000	30.792	0.3381
1.6667	34.279	0.3725
1.8333	37.780	0.3708
2.0000	41.296	0.4009
2.1667	44.827	0.4337
2.3333	48.373	0.4388
2.5000	51.935	0.4595
2.6667	55.511	0.4509
2.8333	59.103	0.4767
3.0000	62.711	0.4750
3.1667	66.334	0.4698

TABLA 5.18
INFLUENCIA DE LA CONCENTRACION TOTAL DE HEXOSAS
T = 60°C s₀ = 1.0 M

t, h	y	x
0.0000	0.000	0.0008
0.1667	3.333	0.0391
0.2500	5.007	0.0558
0.3333	6.687	0.0742
0.4167	8.374	0.0921
0.5000	10.067	0.1081
0.6667	13.469	0.1338
0.8333	16.884	0.1768
1.0000	20.313	0.1970
1.1667	23.757	0.2310
1.3333	27.215	0.2650
1.5000	30.687	0.2710
1.7500	35.917	0.3029
2.0000	41.169	0.3416
2.2500	46.444	0.3898
2.5000	51.740	0.3820
2.7500	57.059	0.3820
2.9167	60.621	0.3906
3.0833	64.197	0.4044

TABLA 5.19
INFLUENCIA DE LA CONCENTRACION TOTAL DE HEXOSAS
 $T = 60^{\circ}\text{C}$ $s_0 = 2.0 \text{ M}$

t, h	y	x
0.0000	0.000	0.0009
0.1667	3.340	0.0166
0.3333	6.707	0.0364
0.4167	8.401	0.0402
0.5000	10.101	0.0607
0.6667	13.517	0.0895
0.8333	16.946	0.1088
1.0000	20.390	0.1331
1.1667	23.847	0.1482
1.3333	27.320	0.1738
1.5000	30.806	0.1927
1.7500	36.059	0.2134
2.0000	41.333	0.2344
2.2500	46.629	0.2745
2.5000	51.949	0.2882
2.7500	57.290	0.2994
2.9167	60.867	0.3166
3.0833	64.459	0.3278

O considerando la ecuación [5.77], desarrollada en el modelo cinético

$$\frac{dx}{dy} = \frac{k_a (x_e - x)}{1 + K_b (x_e - x)} \quad [5.103]$$

que por integración permitiría la comparación con los resultados experimentales, método integral.

5.3.1 Aplicación del método diferencial.

Para la aplicación del método diferencial se han ajustado mediante funciones spline cúbicas los resultados indicados en las Tablas 5.7 a 5.10 correspondientes a la influencia de la concentración total de hexosas a 50°C. El fundamento del método, el programa utilizado y los resultados obtenidos: conversiones calculadas y las derivadas de la conversión con respecto a la variable y se indican en el Apéndice II de esta memoria. Puesto que la variable y contiene la influencia de la masa de enzima en el lecho, en el caso del experimento realizado con $s_0 = 1 \text{ M}$ se han utilizado para el ajuste por splines cúbicas los resultados correspondientes a todos los experimentos realizados con diferentes masas de enzima que se describen en el apartado 4.2.2.

La ecuación [5.103], si la derivada que aparece en la misma se determina de forma independiente, puede reordenarse a

$$\frac{x_e - x}{dx/dy} = \frac{1}{k_a} + \frac{K_b}{k_a} (x_e - x) \quad [5.104]$$

con lo que representando el primer miembro frente a la fuerza impulsora, $(x_e - x)$, deberían obtenerse rectas si el modelo cinético es consistente con los resultados experimentales. Esta representación se ha realizado en la Figura 5.7 para los experimentos comentados anteriormente.

Se observa en esta figura que los resultados experimentales parecen ajustarse a líneas horizontales, lo que implica que el parámetro K_b es prácticamente cero. Los valores de K_a disminuyen al hacerlo la concentración total de hexosas y se obtienen los resultados que se indican en la Tabla 5.20.

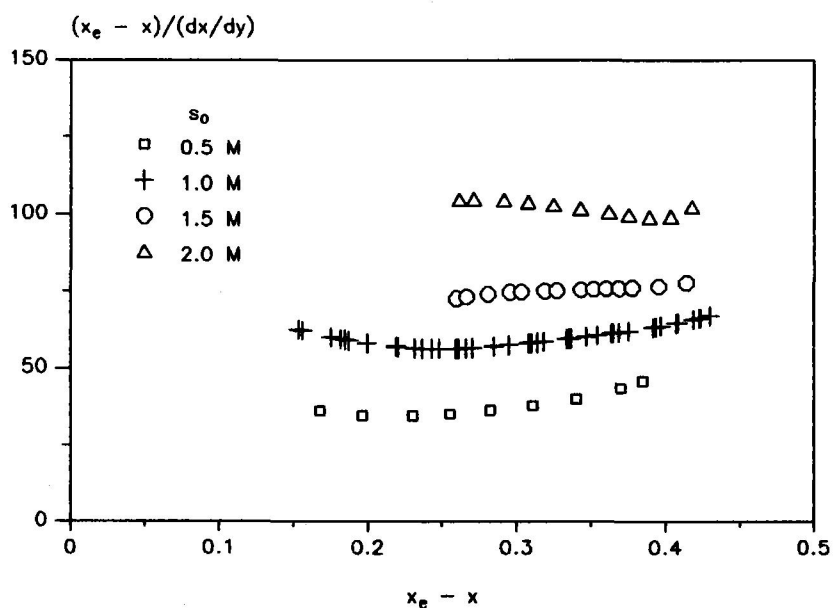


Figura 5.7. Representación de la ecuación [5.104]. T = 50°C

TABLA 5.20

s_0, M	$k_d, L/g \cdot h$
0.5	0.0268
1.0	0.0164
1.5	0.0133
2.0	0.0098

Estos resultados se representan en la Figura 5.8 en la forma que sugiere la ecuación [5.19] que expresa la influencia de s_0 sobre k_d . Se observa en esta figura que los resultados se ajustan aceptablemente a la ecuación citada, por lo que la aplicación del método diferencial realizada sugiere que la cinética es de pseudoprimer orden.

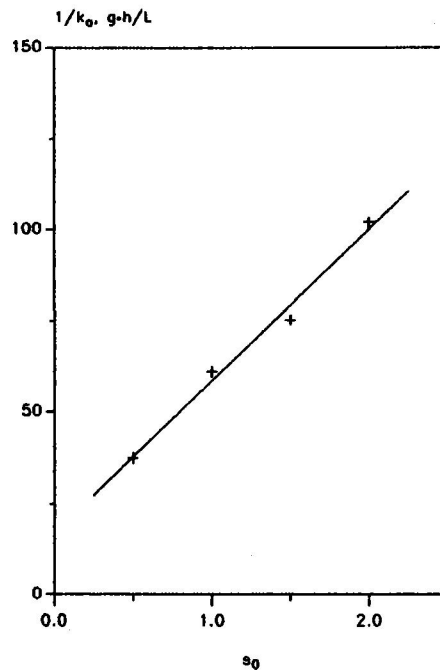


Figura 5.8

5.3.2 Aplicación del método integral.

Con objeto de eliminar los errores inherentes al cálculo numérico de las derivadas se ha aplicado también el método integral, reordenando la ecuación [5.103] en la forma

$$\int_{x_0}^x \frac{1 + K_b (x_e - x)}{x_e - x} dx = \int_0^y k_a dy \quad [5.105]$$

$$\ln \left(\frac{x_e - x_0}{x_e - x} \right) + K_b (x - x_0) = k_a y \quad [5.106]$$

ecuación que puede linealizarse en la forma

$$\frac{y}{x - x_0} = \frac{1}{k_a} \frac{\ln \left(\frac{x_e - x_0}{x_e - x} \right)}{x - x_0} + \frac{K_b}{k_a} \quad [5.107]$$

En la Figura 5.9 se han representado los resultados obtenidos en los experimentos realizados con diferentes masas de enzima en la forma que sugiere la ecuación [5.107]. Se observa en esta figura que los puntos experimentales parecen indicar que se cumple la ecuación anterior con una ordenada en el origen prácticamente cero, lo que corresponde al comportamiento de pseudoprimer orden. No obstante, la linealización conseguida al dividir por $x - x_0$ aumenta apreciablemente la dispersión de los datos y reduce considerablemente el intervalo de abscisas, lo que dificulta la determinación de los parámetros cinéticos.

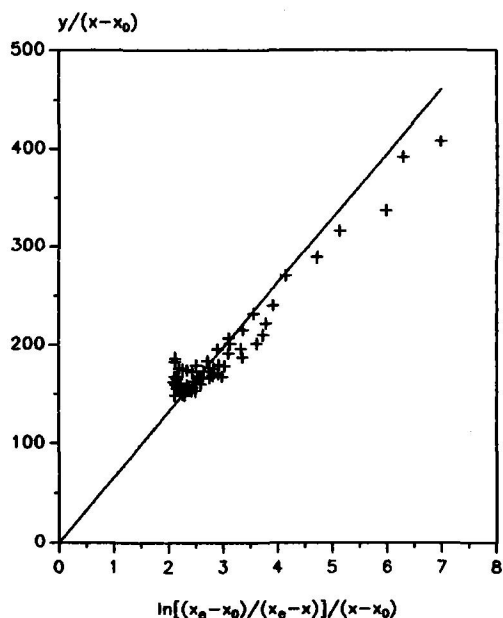
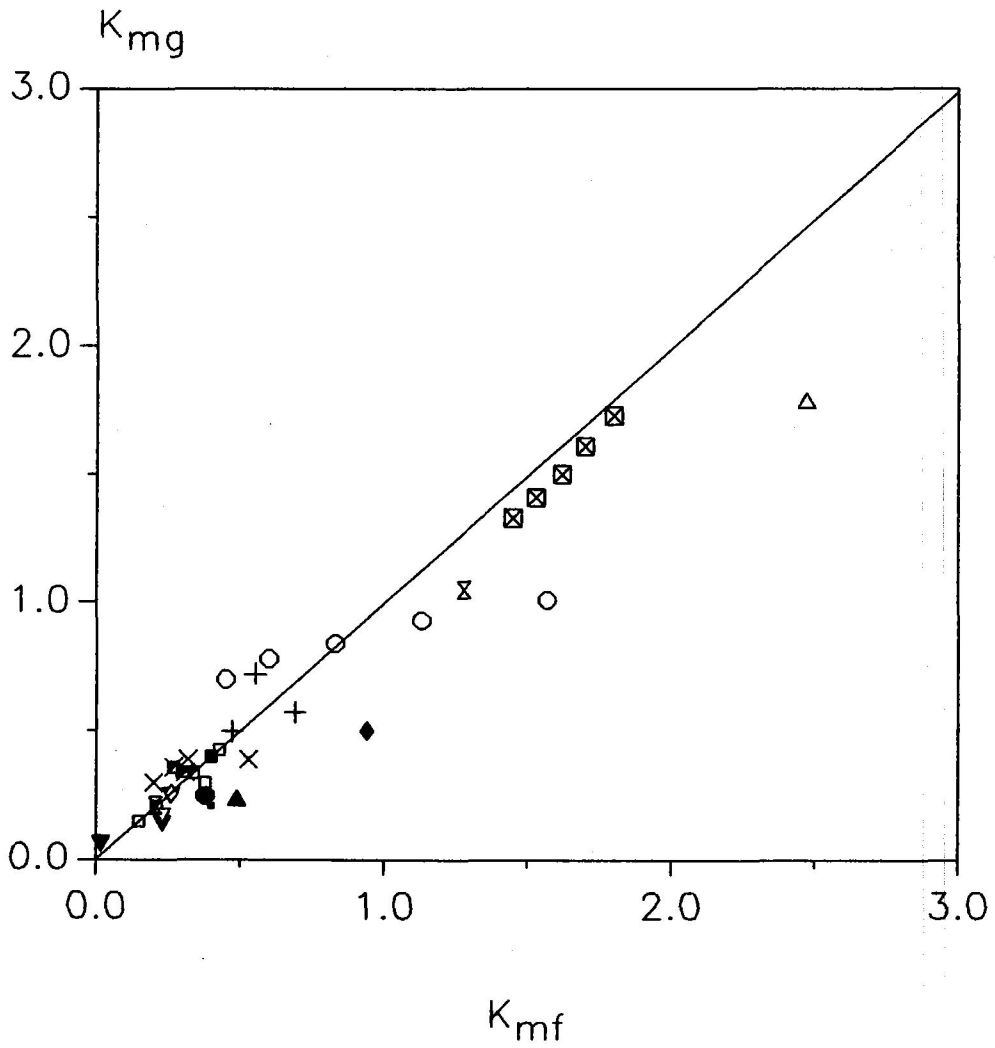


Figura 5.9

Estos resultados confirman lo deducido anteriormente por el método integral e indican que la constante K_D es prácticamente cero, es decir, que K_{mf} y K_{mg} son prácticamente iguales, lo que indica que la afinidad de ambos isómeros por la enzima es muy próxima.

En efecto, en la Tabla 5.21 se indican los valores de estas constantes que se han encontrado en la bibliografía, se observa en ella que los valores de K_{mf} y K_{mg} publicados son siempre muy próximos y no varían lógicamente con las condiciones de operación en que han sido determinados, temperatura y pH, ni con el complejo enzimático utilizado, siendo unas veces mayor K_{mf} y otras K_{mg} sin relación con otras variables, Figura 5.10, con bastantes resultados experimentales correspondientes a valores iguales o próximos de ambas constantes.



- | | | | |
|------------------|------------------|---------------------|----------------------|
| ▪ Lee et al. | + Sproull et al. | ⊠ Chen et al.(1980) | ■ Van Keulen et al. |
| × Kikkert et al. | ◇ Adachi et al. | △ Chen et al.(1983) | ⊗ Chin y Ho |
| ○ Chen y Wu | ▽ Lloid et al. | ▼ Takasaki et al. | ■ Krasnobajew y B. |
| ◆ Dutch pat. | ▲ Rye et al. | ● Saini y Vieth | □ Esta investigación |

Figura 5.10.

TABLA 5.21
VALORES DE K_{mf} Y K_{ng}

T, °C	pH	K_{mf}, M	K_{ng}, M	Tipo de sistema*	Referencia
25 60		0.016 0.23	0.062 0.14	1	Takasaki et al. (1969)
70		0.94	0.50	3	Dutch pat.
60		0.40	0.40	1	Krasnobajew y Böniger (1975)
70		0.25	0.38	4	Saini y Vieth (1975)
65 65		0.25 0.17	0.26 0.23	1 2	Lloid y Khaleeluddin (1976)
50	7.0	0.40	0.21	2	Lee et al. (1976)
40 60 80	7.0	0.691 0.472 0.553	0.572 0.498 0.722	3	Sproull et al. (1976)
70		0.24	0.49	3	Rye et al. (1977)
60 65 70 75 80	8.3	1.80 1.70 1.62 1.53 1.45	1.73 1.61 1.50 1.41 1.33	2	Chen et al. (1983)
50 60 60 60 65	8.2 8.2 7.1 8.0 8.2	0.20 0.27 0.53 0.31 0.32	0.30 0.36 0.39 0.34 0.39	2	Kikkert et al. (1981)
60 60 60 60	7.9 7.9	0.380 0.300 0.270 0.310	0.300 0.340 0.360 0.340	3 4 2 2	Van Keulen et al. (1981)
50	8.0	0.262	0.259	2	Adachi et al. (1981)
70	7.5	2.47	1.79	2	Chen et al. (1980)
60 70	7.0 8.5	1.28 0.205	1.05 0.211	2 2	Ching y Ho (1984)
60	8.2	3.643	0.466	2	Benaiges et al. (1986)
60 65 70 75 80	7.0	0.45 0.60 0.83 1.13 1.57	0.70 0.78 0.84 0.93 1.01	2	Chen y Wu (1987)
30 40 50 60	7.5	0.137 0.190 0.423 0.313	0.137 0.190 0.423 0.313	2	Esta investigación

* 1) Glucosa isomerasa aislada, no inmovilizada; 2) glucosa isomerasa aislada, no inmovilizada; 3) conjunto de células no inmovilizadas; 4) conjunto de células inmovilizadas.

Es también conveniente destacar que generalmente estos valores han sido determinados a partir de velocidades iniciales de reacción, desde disoluciones de fructosa pura y glucosa pura respectivamente y que en general, siempre que se ha aplicado el método integral a experimentos de isomerización prolongados, se encuentra que la cinética se ajusta a una cinética de pseudoprimer orden, Havewala y Pitcher (1974), Tsmura e Ishikawa (1967), Straatsma et al. (1983), Vos et al. (1990).

Este resultado no indica que la cinética de la isomerización no esté influida por la concentración total de hexosas, ecuación [5.19], sino que como ya se ha indicado anteriormente, la afinidad por la enzima de ambas hexosas es prácticamente equivalente.

Por tanto, de acuerdo con la ecuación [5.106] considerando $K_b = 0$ debe cumplirse

$$y = \frac{1}{k_a} \ln \frac{x_e - x_0}{x_e - x} \quad [5.108]$$

ecuación que ha resultado consistente con los resultados obtenidos en los experimentos cinéticos como se observa en las Figuras 5.11 a 5.14 para las cuatro temperaturas investigadas. Tal como indica la ecuación [5.108] los resultados experimentales se ajustan a rectas que pasan por el origen y cuya pendiente disminuye al aumentar la concentración total de hexosas.

Para eliminar los errores de la linealización se han determinado los valores de k_a por regresión no lineal mediante el algoritmo de Marquardt, que se indican en la Tabla 5.22. Los resultados correspondientes a 50°C son consistentes por los obtenidos anteriormente por el método diferencial, Tabla 5.20, aunque evidentemente los indicados en la Tabla 5.22 son más precisos al no incluir el error inherente en el cálculo numérico de las derivadas.

Es evidente que si el transporte interno en las partículas de enzima inmovilizada influye en la cinética del proceso los valores de k_a obtenidos incluirán el factor de efectividad. De acuerdo con el modelo cinético desarrollado en el apartado 5.2 y teniendo en cuenta la conclusión ya obtenida de que la cinética se reduce a una ecuación de pseudoprimer orden, y por tanto $k_f = k_g$, la expresión para esta constante cinética sería

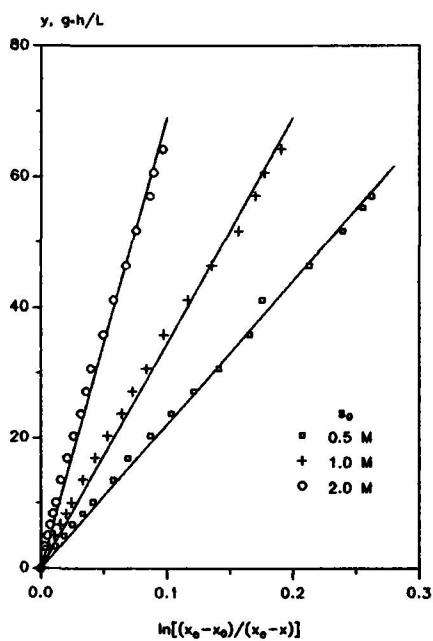


Figura 5.11. Representación de la ecuación [5.108]. $T = 30^\circ\text{C}$.

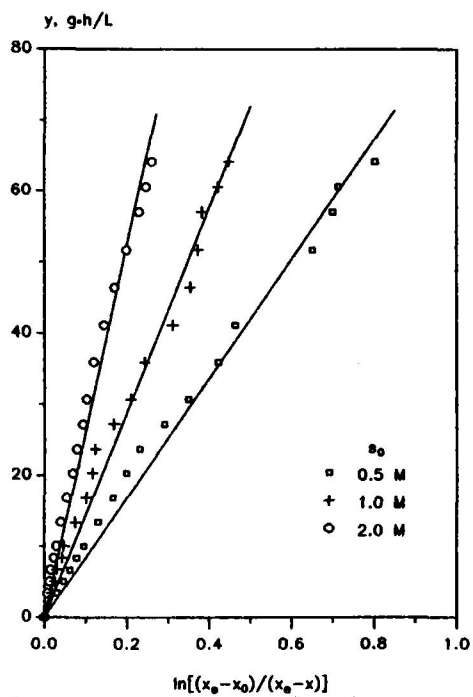


Figura 5.12. Representación de la ecuación [5.108]. $T = 40^\circ\text{C}$.

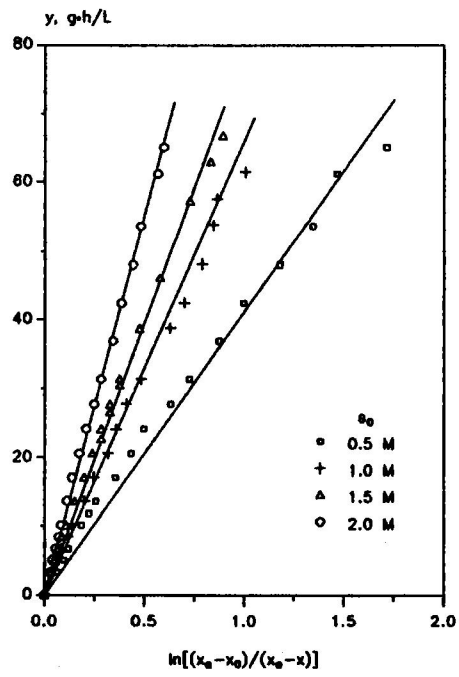


Figura 5.13. Representación de la ecuación [5.108]. $T = 50^\circ\text{C}$.

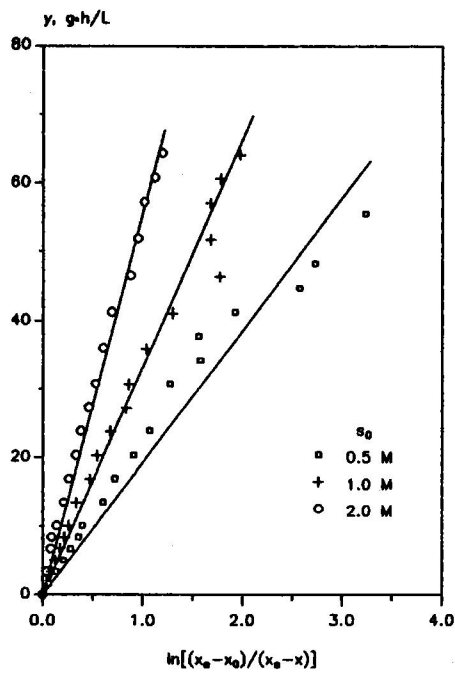


Figura 5.14. Representación de la ecuación [5.108]. $T = 60^\circ\text{C}$.

TABLA 5.22

T, °C	s ₀ , M	k _a , L/g·h
30	0.5	0.0454
	1.0	0.0290
	2.0	0.0145
40	0.5	0.1190
	1.0	0.0694
	2.0	0.0381
50	0.5	0.2433
	1.0	0.1515
	1.5	0.1223
	2.0	0.0908
60	0.5	0.5186
	1.0	0.3010
	2.0	0.1799

$$k_a = \frac{k_f e_T}{K_1 s_0 + 1} \quad [5.109]$$

donde K₁ se reduce a

$$K_1 = \frac{k_f}{k_g + k_f} \quad [5.110]$$

La ecuación [5.109] puede linealizarse en la forma

$$\frac{1}{k_a} = \frac{1}{k_f e_T} + \frac{K_1}{k_f e_T} s_0 \quad [5.111]$$

que ha sido ya utilizada en la Figura 5.8 para analizar la influencia de s₀ sobre los valores experimentales de k_a estimados por el método diferencial. Puesto que los valores indicados en la Tabla 5.22 incluyen el factor de efectividad, la ecuación [5.111] debe expresarse en la forma

$$\frac{1}{(k_a)_{exp}} = \frac{1}{\eta k_f e_T} + \frac{K_1}{\eta k_f e_T} s_0 \quad [5.112]$$

para su empleo con los valores experimentales obtenidos. Esta representación se muestra en la Figura 5.15, en la que puede apreciarse que los resultados experimentales son consistentes con la ecuación [5.112], aunque realmente, la concentración total de hexosas, al influir sobre la viscosidad de la fase líquida también lo hará sobre la difusividad efectiva de la fructosa en las partículas de enzima inmovilizada y por consiguiente influirá ligeramente en el módulo de Thiele y con el factor de efectividad.

Puesto que la velocidad de reacción se ha ajustado a una ecuación de pseudoprimer orden, el factor de efectividad, η , dependerá exclusivamente del módulo de Thiele ϕ_1 que para partículas esféricas vienen dados por las expresiones

$$\phi_1 = \frac{V_p}{S_p} \sqrt{\frac{\rho_p k_a}{D_e}} \tag{5.113}$$

$$\eta = \frac{1}{\phi_1} \left(\frac{1}{\text{tgh}(3 \phi_1)} - \frac{1}{3 \phi_1} \right) \tag{5.114}$$

siendo la constante cinética determinada anteriormente

$$(k_a)_{\text{exp}} = \eta k_a \tag{5.115}$$

mediante estas tres últimas ecuaciones podría calcularse la constante cinética k_a siempre que se disponga del tamaño de las partículas, su densidad aparente y la difusividad efectiva. Las características de las partículas se han determinado por los métodos de penetración de mercurio y tratamiento de imágenes descritos en la parte 3 de esta memoria, y la difusividad efectiva generalmente se relaciona con la difusividad molecular mediante la expresión

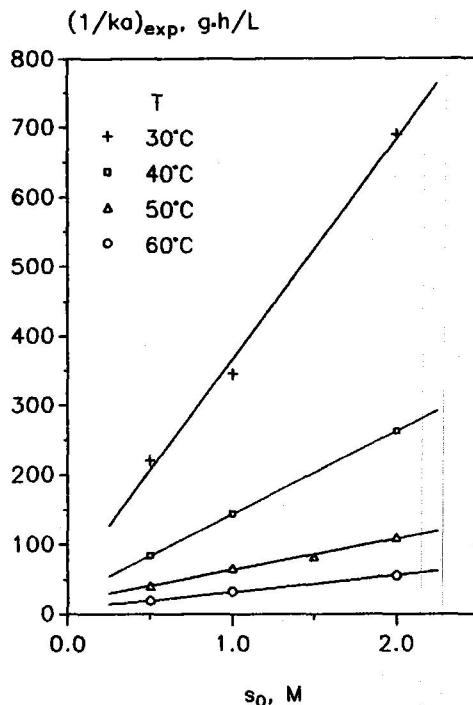


Figura 5.15. Representación de la ecuación [5.112].

$$D_e = D_M \frac{\epsilon_p}{\tau} \quad [5.116]$$

puesto que las dos hexosas son muy semejantes y se trata de un sistema de contradifusión equimolar en fase líquida en el que la influencia de la difusión de Knudsen es despreciable. Sin embargo no se dispone del factor de tortuosidad de las partículas de enzima inmovilizada.

5.4 Glucosa isomerasa libre.

En el apartado 4.3 de esta memoria se describen los experimentos realizados y se dan sus resultados primarios con glucosa isomerasa en disolución, en un reactor bien mezclado.

Para el análisis de la influencia de la concentración de enzima se han calculado las conversiones que se indican en la Tabla 5.23 y que se representan en la Figura 5.16 frente al producto $c_E t$.

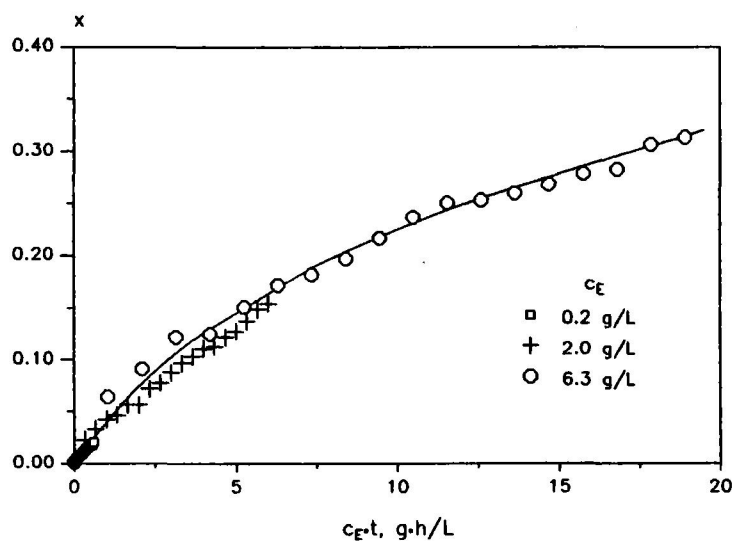


Figura 5.16. Conversión frente al producto $c_E t$. $T = 50^\circ\text{C}$, $s_0 = 1 \text{ M}$.

TABLA 5.23
 INFLUENCIA DE LA CONCENTRACION DE ENZIMA. SISTEMA HOMOGENEO.
 $T = 50^{\circ}\text{C}$, $s_0 = 1.0 \text{ M}$, $\text{pH} = 7.5$

$t, \text{ h}$	$c_E = \text{g/L}$ x	$c_E = 2.0 \text{ g/L}$ x	$c_E = 6.3 \text{ g/L}$ x
0.0000	0.0010	0.0010	0.0010
0.1667	0.0037	0.0228	0.0641
0.3333	0.0049	0.0329	0.0911
0.5000	0.0055	0.0422	0.1220
0.6667	0.0065	0.0467	0.1247
0.8333	0.0077	0.0562	0.1505
1.0000	0.0087	0.0565	0.1719
1.1667	0.0093	0.0720	0.1821
1.3333	0.0107	0.0778	0.1971
1.5000	0.0116	0.0874	0.2164
1.6667	0.0130	0.0971	0.2370
1.8333	0.0134	0.1028	0.2506
2.0000	0.0146	0.1108	0.2532
2.1667	0.0161	0.1127	0.2600
2.3333	0.0162	0.1215	0.2685
2.5000	0.0171	0.1273	0.2787
2.6667	0.0191	0.1374	0.2829
2.8333	0.0187	0.1487	0.3067
3.0000	0.0204	0.1545	0.3135

La forma de esta figura, al coincidir todos los puntos experimentales en una sola línea, pone de manifiesto que la conversión depende del factor intensivo $c_E t$, y por tanto, que la velocidad de reacción es directamente proporcional a la concentración de enzima de acuerdo con el modelo cinético propuesto.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en el estudio cinético con glucosa isomerasa inmovilizada para estudiar la influencia de la temperatura y de la concentración total de hexosas en este sistema, experimentos realizados a concentración de enzima constante, se utilizó directamente la ecuación [5.108] adaptada a las condiciones homogéneas

$$-\ln(x_e - x) = -\ln(x_e - x_0) + k_{aL} c_E t \quad [5.117]$$

Las conversiones obtenidas se indican en las Tablas 5.24 a 5.26 y la representación correspondiente a la ecuación [5.117] se ha realizado en las Figuras 5.17 a 5.19.

Los resultados de este sistema se ajustan también a la cinética de pseudoprimer orden como se observa en las últimas figuras citadas, por regresión no lineal mediante el algoritmo de Marquardt se han obtenido los valores de k_a que se indican en la Tabla 5.27 en función de la temperatura y la concentración total de hexosas.

De igual manera que en el apartado anterior, los valores de k_a se representan frente a la concentración total de hexosas en la forma que sugiere la ecuación [5.111] en la Figura 5.20. Se observa con ella que los resultados se ajustan bien a la citada ecuación.

Es evidente que en este caso no existe interferencia del transporte interno y por tanto las ordenadas en el origen y las pendientes de las rectas indicadas en la Figura 5.20 deben estar relacionadas con las constantes cinéticas elementales del modelo cinético propuesto de acuerdo con la ecuación [5.111].

TABLA 5.24
 INFLUENCIA DE LA CONCENTRACION DE SUSTRATO. SISTEMA HOMOGENEO
 $T = 40^{\circ}\text{C}$, $c_E = 6.3 \text{ g/L}$, $\text{pH} = 7.5$

t, h	$s_0 = 0.5 \text{ M}$	$s_0 = 1.0 \text{ M}$	$s_0 = 2.0 \text{ M}$
	x	x	x
0.0000	0.0010	0.0023	0.0024
0.0333			0.0352
0.1667	0.0560	0.0493	0.0431
0.3333	0.0648	0.0629	0.0460
0.5000	0.0829	0.0771	0.0536
0.6667	0.0867	0.0819	0.0550
0.8333	0.0955	0.0923	0.0633
1.0000	0.0969	0.0938	0.0676
1.1667	0.1187	0.1023	0.0706
1.3333	0.1262		0.0759
1.3500		0.1098	
1.5000	0.1334	0.1105	0.0824
1.6667	0.1385	0.1252	0.0895
1.8333	0.1518	0.1293	0.0952
2.0000	0.1603	0.1347	0.0996
2.1667	0.1702	0.1453	0.1030
2.3333	0.1839	0.1484	0.1051
2.5000	0.1910	0.1528	0.1094
2.6667	0.2081	0.1641	0.1145
2.8333	0.2146	0.1682	0.1183
3.0000	0.2159	0.1733	0.1239

TABLA 5.25
 INFLUENCIA DE LA CONCENTRACION DE SUSTRATO. SISTEMA HOMOGENEO
 $T = 50^{\circ}\text{C}$, $c_E = 6.3 \text{ g/L}$, $\text{pH} = 7.5$

t, h	$s_0 = 0.5 \text{ M}$	$s_0 = 1.0 \text{ M}$	$s_0 = 2.0 \text{ M}$
	x	x	x
0.0000	0.0010	0.0010	0.0023
0.0167			0.0465
0.1667	0.0768	0.0641	0.0599
0.3333	0.1077	0.0911	0.0691
0.5000	0.1488	0.1220	0.0817
0.6667	0.1617	0.1247	0.0907
0.8333	0.1763	0.1505	0.1094
1.0000	0.1822	0.1719	
1.1667	0.2154	0.1821	0.1196
1.3333	0.2290	0.1971	0.1387
1.5000	0.2528	0.2164	0.1417
1.6667	0.2650	0.2370	0.1562
1.8333	0.2746	0.2506	0.1609
2.0000	0.2970	0.2532	0.1673
2.1667	0.3112	0.2600	0.1809
2.3333	0.3031	0.2685	0.1949
2.5000	0.3275	0.2787	0.1890
2.6667	0.3425	0.2829	0.1936
2.8333	0.3547	0.3067	0.2004
3.0000	0.3799	0.3135	

TABLA 5.26
 INFLUENCIA DE LA CONCENTRACION DE SUSTRATO. SISTEMA HOMOGENEO
 $T = 60^{\circ}\text{C}$, $c_E = 6.3 \text{ g/L}$, $\text{pH} = 7.5$

t, h	$s_0 = 0.5 \text{ M}$	$s_0 = 1.0 \text{ M}$	$s_0 = 2.0 \text{ M}$
	x	x	x
0.0000	0.0011	0.0010	0.0010
0.1667	0.1094	0.0982	0.0674
0.3333	0.1648	0.1242	0.0955
0.5000	0.2164	0.1631	0.1334
0.6667	0.2589	0.2032	0.1453
0.8333	0.2943	0.2283	0.1724
1.0000	0.3126	0.2693	0.1920
1.1667	0.3418	0.2820	0.1975
1.3333	0.3683	0.3016	0.2077
1.5000	0.3819	0.3177	0.2289
1.6667	0.4016	0.3423	0.2451
1.8333	0.4186	0.3661	0.2654
2.0000	0.4241	0.3746	0.2663
2.1667	0.4404	0.3763	0.2931
2.3333	0.4472	0.3890	0.2973
2.5000	0.4608	0.3950	0.3067
2.6667	0.4662	0.4239	0.2948
2.8333	0.4676	0.4137	0.3228
3.0000	0.4744	0.4264	0.3109

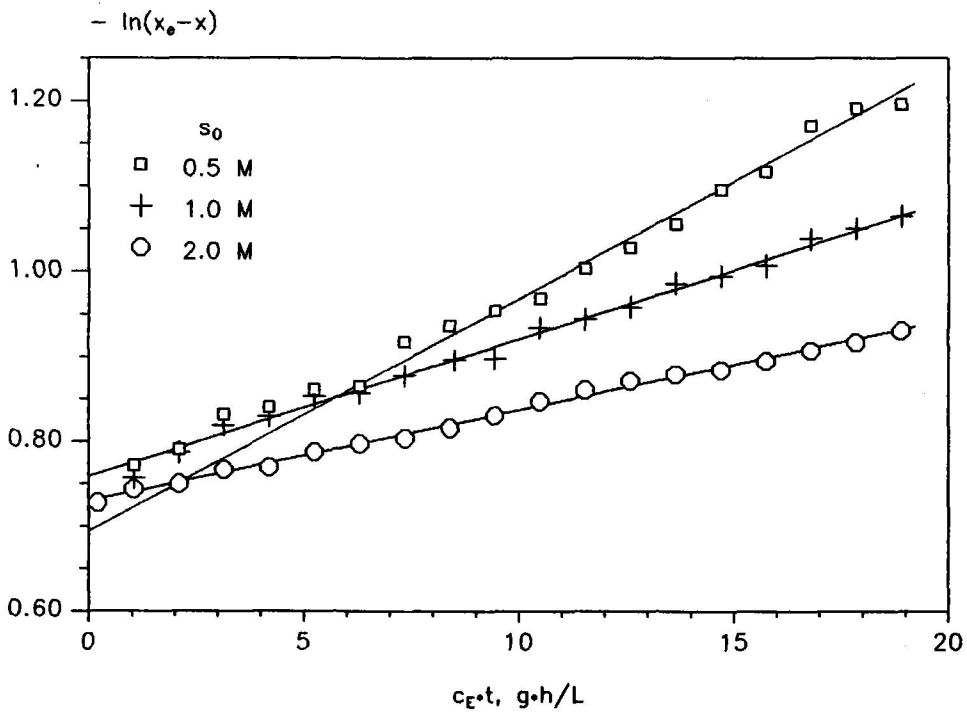


Figura 5.17. Representación de la ecuación [5.117]. $T = 40^\circ C$.

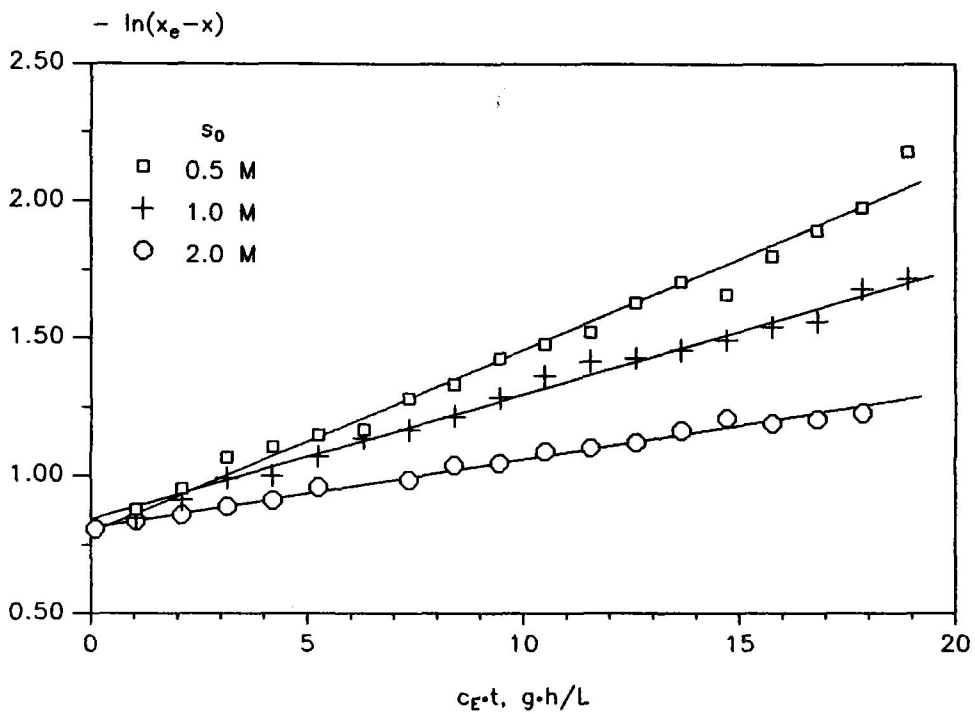


Figura 5.18. Representación de la ecuación [5.117]. $T = 50^\circ C$.

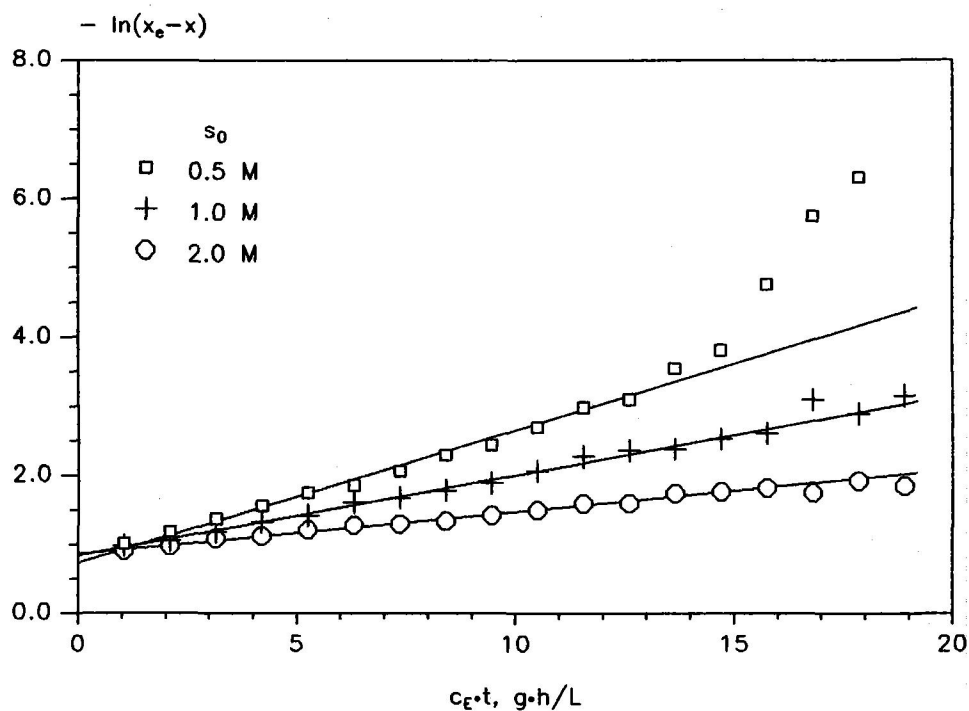


Figura 5.19. Representación de la ecuación [5.117]. $T = 60^\circ\text{C}$.

TABLA 5.27

$T, ^\circ\text{C}$	s_0, M	$k_a, \text{L/g}\cdot\text{h}$	r^2
40	0.5	0.0274	0.987
	1.0	0.0162	0.995
	2.0	0.0107	0.995
50	0.5	0.0666	0.983
	1.0	0.0455	0.983
	2.0	0.0249	0.989
60	0.5	0.1921	0.989
	1.0	0.1155	0.994
	2.0	0.0609	0.992

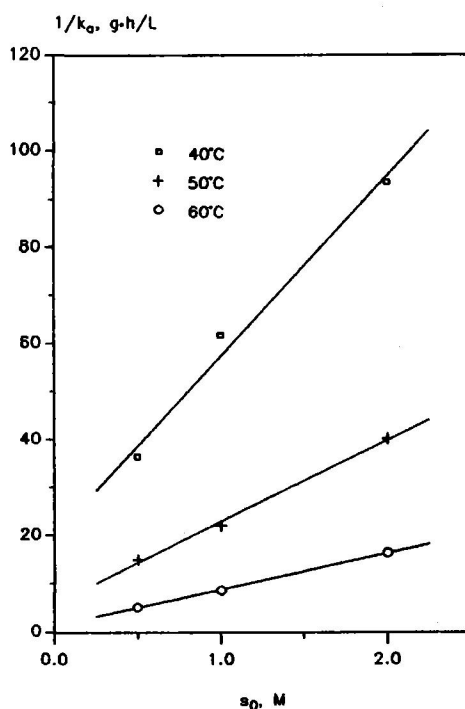


Figura 5.20.

5.5 Comparación de los resultados obtenidos con glucosa isomerasa libre e inmovilizada.

La concentración de enzima activa de los dos complejos enzimáticos utilizados, inmovilizado y en fase líquida, es diferente, y por consiguiente los valores de k_a por gramo de complejo enzimático serán también diferentes. Además, los microorganismos utilizados para la obtención de estos complejos enzimáticos son distintos, aunque del mismo género, por lo que las constantes cinéticas elementales podrían también ser diferentes si las enzimas lo son.

Sin embargo, si se admite que las enzimas son iguales o con un comportamiento cinético igual, no deben existir diferencias entre el comportamiento de la enzima en disolución acuosa y el comportamiento de la enzima retenida en la matriz de un gel, ya que en este último caso se encuentra también en disolución acuosa aunque encerrada en pequeñas bolsas dentro de la estructura del gel, por tanto, admitiendo el mismo comportamiento cinético para ambas enzimas, debería cumplirse

$$(k_a)_I = \frac{k_f (e_T)_I}{K_1 s_0 + 1} \quad [5.118]$$

$$(k_a)_L = \frac{k_f (e_T)_L}{K_1 s_0 + 1} \quad [5.119]$$

donde los subíndices I y L se refieren a la enzima inmovilizada y libre respectivamente. Dividiendo ambas ecuaciones

$$\frac{(k_a)_I}{(k_a)_L} = \frac{(e_T)_I}{(e_T)_L} = e_R \quad [5.120]$$

$$(k_a)_I = e_R$$

Admitiendo esta hipótesis, el módulo de Thiele y el factor de efectividad para la enzima inmovilizada podrían expresarse en la forma

$$\Phi = \frac{V_p}{S_p} \sqrt{\frac{\rho_p e_R (k_a)_L}{D_e}} \quad [5.121]$$

$$\eta = \frac{(k_a)_{exp}}{e_R (k_a)_L} \quad [5.122]$$

Teniendo en cuenta las características de las partículas húmedas determinadas en la parte 3 de esta memoria

$$\frac{V_p}{A_p} = 0.0151 \text{ cm}$$

$$\rho_p = 0.818 \text{ g/cm}^3$$

$$e_p = 0.421$$

y que el factor de efectividad y el módulo de Thiele están relacionados por la ecuación [5.114], para cada temperatura y cada concentración total de hexosas en las que se dispone de experimentos realizados con enzima libre y enzima inmovilizada, puede plantearse una ecuación de la forma

$$\frac{a}{e_R} = \frac{1}{b \sqrt{e_R \tau}} \left(\frac{1}{\text{tgh} \left(\frac{1}{3 b \sqrt{e_R \tau}} \right)} - \frac{1}{3 b \sqrt{e_R \tau}} \right) \quad [5.123]$$

donde

$$a = \frac{(k_a)_{exp}}{(k_a)_L} \quad [5.124]$$

$$b = \frac{V_p}{S_p} \sqrt{\frac{\rho_p (k_a)_L}{D_H e_p}} \quad [5.125]$$

Para cada experimento que se ha realizado simultáneamente con enzima inmovilizada y libre, es posible determinar los valores de a y de b y mediante la ecuación [5.123] obtener así los valores medios de e_R y τ , por regresión no lineal, mediante esta última ecuación se obtienen los valores

$$e_R = 0.500 \quad [5.126]$$

$$\tau = 1.53$$

Con este factor de tortuosidad es posible evaluar ya el módulo de Thiele y el factor de efectividad para los experimentos realizados con la enzima inmovilizada y obtener así la verdadera constante cinética $(k_a)_L$. Mediante el factor e_R se ha reducido la constante cinética obtenida en fase homogénea a la misma concentración de enzima activa correspondiente a la enzima inmovilizada. En la Tabla 5.28 se indican los valores de la constante cinética determinados para diferentes temperaturas y concentraciones totales de hexosas, haciendo referencia también a la forma en que se ha determinado, libre o inmovilizada.

Estos valores de k_a se representan en la forma que sugiere la ecuación [5.111] en función de la concentración total de hexosas, en las Figuras 5.20 y 5.21 en las que se observa que los resultados experimentales se ajustan aceptablemente. Mediante regresión no lineal a la ecuación citada se obtienen los valores de las constantes cinéticas k_f y K_1 , y teniendo en cuenta la ecuación [5.110] y la ecuación [2.0] correspondiente al equilibrio, es posible determinar a cada temperatura las tres constantes cinéticas elementales que intervienen en la reacción de isomerización enzimática. Los valores obtenidos para estas constantes se indican en la Tabla 5.29.

TABLA 5.28

T, °C	s ₀	k _a	Método
30	0.5	0.00510	Inmovilizada
	1.0	0.00319	Inmovilizada
	2.0	0.00159	Inmovilizada
40	0.5	0.01516	Inmovilizada
	0.5	0.01370	Disolución
	1.0	0.00834	Inmovilizada
	1.0	0.00810	Disolución
	2.0	0.00460	Inmovilizada
	2.0	0.00535	
50	0.5	0.03615	Inmovilizada
	0.5	0.03330	Disolución
	1.0	0.02093	Inmovilizada
	1.0	0.02275	Disolución
	1.5	0.01736	Inmovilizada
	2.0	0.01304	Inmovilizada
	2.0	0.01245	Disolución
60	0.5	0.10043	Inmovilizada
	0.5	0.09605	Disolución
	1.0	0.05046	Inmovilizada
	1.0	0.05775	Disolución
	2.0	0.03188	Inmovilizada
	2.0	0.03045	Disolución

TABLA 5.29

T, °C	k _f e _T	K ₁	K _e	k _f e _T	k _g e _T
30	0.0153	3.981	0.8342	0.00175	0.00210
40	0.0465	4.480	0.9290	0.00500	0.00539
50	0.0829	2.552	1.0278	0.01512	0.01471
60	0.4223	6.622	1.1302	0.03384	0.02994

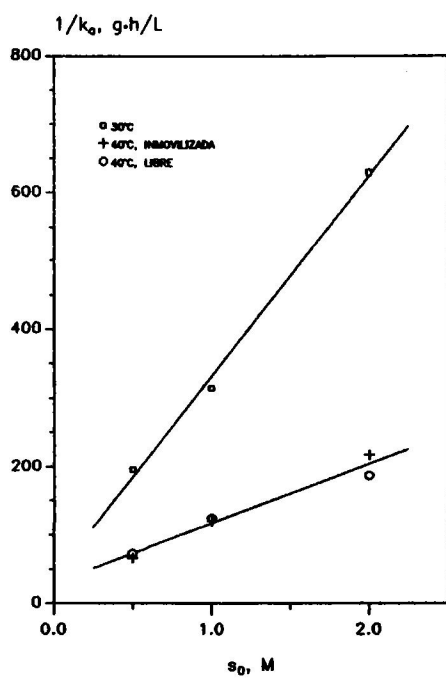


Figura 5.21.

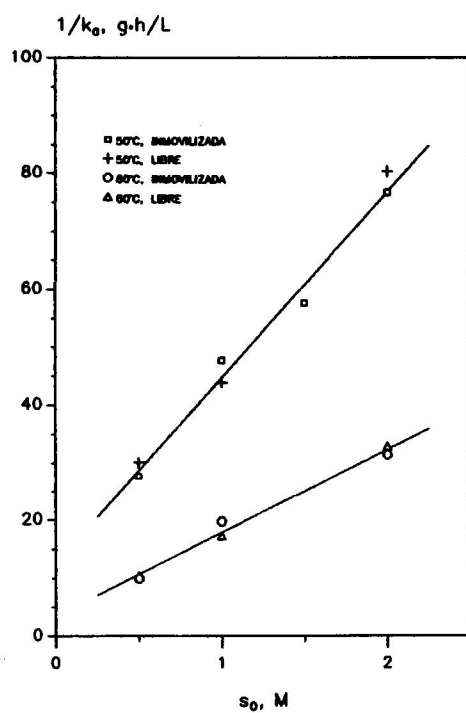


Figura 5.22

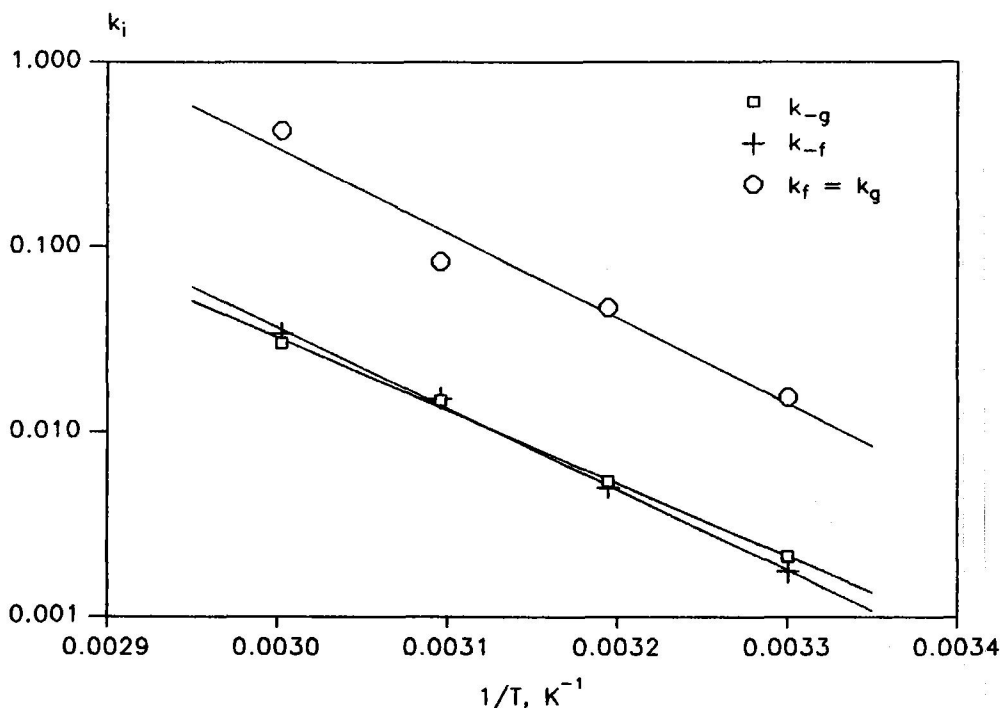


Figura 5.23. Representación de Arrhenius.

En la Figura 5.22 se representan estos resultados en la forma que sugiere la ecuación de Arrhenius, a la que se ajustan aceptablemente. Por regresión lineal se obtienen las ecuaciones

$$k_f e_T = k_g e_T = 2.08 \cdot 10^{13} \exp \left(-\frac{87930}{RT} \right), \quad \text{L/g} \cdot \text{h} \quad [5.127]$$

$$k_{-f} e_T = 5.12 \cdot 10^{11} \exp \left(-\frac{83840}{RT} \right), \quad \text{mol/g} \cdot \text{h} \quad [5.128]$$

$$k_{-g} e_T = 2.10 \cdot 10^{10} \exp \left(-\frac{75340}{RT} \right), \quad \text{mol/g} \cdot \text{h} \quad [5.129]$$

Puesto que los valores de las constantes cinéticas incluyen la concentración de enzima activa del complejo enzimático utilizado, no es posible una comparación directa con los publicados en la bibliografía, pero sí de las energías de activación resultantes, que se ha realizado en la Tabla 5.30. Los valores obtenidos en esta investigación para las energías de activación de las constantes cinéticas de descomposi-

ción del complejo intermedio coincide aceptablemente con las de Sproull et al. (1976) y son del mismo orden o superiores a los restantes valores propuestos. Por el contrario, la energía de activación de las constantes de formación del complejo intermedio son generalmente superiores a los valores publicados en la bibliografía; en este sentido es interesante señalar que la influencia del transporte interno tiende a disminuir la energía de activación aparente.

TABLA 5.30

E_{ag} KJ/mol	E_{af} KJ/mol	E_{a-g} KJ/mol	E_{a-f} KJ/mol	Refs.
68.5	72.7	81.9	92.0	Sproull et al. (1976)
67.27	64.90	49.88	58.20	Chen et al. (1980)
40.00	35.00	55.00	55.00	Kikkert et al. (1981)
11.00	54.57	59.49	86.94	Chen y Wu (1987)
87.93	87.93	75.34	83.84	Esta investigación

5.6 Interacción transporte interno-reacción en enzimas inmovilizadas en la matriz de un gel.

Considerese el catalizador formado por una matriz de celdillas que contienen disolución acuosa de la enzima libre limitadas por membranas de gel y que por simplicidad se supondrá en forma de lámina, Figura 5.24.

Admitase que la resistencia al transporte interno se produce en las membranas de gel microporosas que separan las bolsas de disolución acuosa de la enzima, mientras que en éstas, dado su pequeño tamaño y que la difusión molecular actúa libremente, la composición puede considerarse constante. En estas condiciones el transporte hacia el interior de la partícula y la reacción enzimática no se producen nunca simultáneamente sino que en las membranas que separan las celdillas hay gradiente de concentración y difusión pero no reacción, y en el interior de las celdillas reacción a composición uniforme.

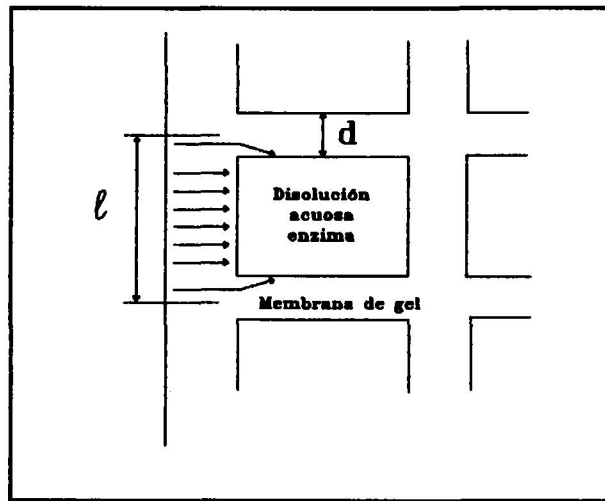


Figura 5.24

Admitase también que todo el sustrato que penetra por la superficie externa l^2 correspondiente a una celdilla alcanza la primera de éstas, de manera que el caudal de sustrato que llega a la primera celdilla es

$$l^2 N_1 = l^2 \frac{D_{eg}}{d} (c_s - c_1) \quad [5.130]$$

de fórmula semejante a la segunda celdilla

$$l^2 N_2 = l^2 \frac{D_{eg}}{d} (c_1 - c_2) \quad [5.131]$$

y así sucesivamente.

En las ecuaciones anteriores, D_{eg} es la difusividad efectiva en la membrana de gel y los flujos N_1 , N_2 ... van disminuyendo debido al consumo de sustrato en cada celdilla.

Para una reacción de pseudoprimer orden con constante k_1

$$N_1 = N_2 + k_1 c_1 (l - d)^3 \quad [5.132]$$

o en general

$$N_i = N_{i-1} + k_1 c_i (1 - d) \quad [5.133]$$

Sustituyendo la expresión del flujo en esta ecuación:

$$\frac{D_{eg}}{d} l^2 (c_{i-1} - c_i) = \frac{D_{eg}}{d} l^2 (c_i - c_{i-1}) + k_1 c_i (1 - d) \quad [5.4]$$

que puede reducirse a la forma

$$c_{i-1} + c_{i+1} - 2 c_i = \Phi^2 c_i \quad [5.136]$$

donde

$$\Phi^2 = \frac{(1 - d)^3 d}{l^2} \frac{k_1}{D_{eg}} \quad [5.136]$$

representa el cuadrado del módulo de Thiele modificado.

Si n es el número de celdillas por unidad de longitud en la dirección x , los valores de las sucesivas concentraciones en las celdillas pueden asignarse al centro de éstas, y el perfil de concentración de sustrato en la dirección x será el indicado en la Figura 5.25.

De esta forma, una aproximación de la derivada segunda en el punto i será

$$\frac{\frac{c_{i-1} - c_i}{1/n} - \frac{c_i - c_{i+1}}{1/n}}{1/n} = n^2 (c_{i-1} + c_{i+1} - 2 c_i) \approx \left(\frac{d^2 c}{dx^2} \right)_i \quad [5.137]$$

que será tanto más exacta cuanto más pequeño sea el tamaño de la celdilla.

Teniendo en cuenta las ecuaciones [5.137] y [5.135] el proceso considerado vendría regido por

$$\frac{d^2 c}{dx^2} = n^2 \Phi^2 c_i \quad [5.138]$$

es evidente que

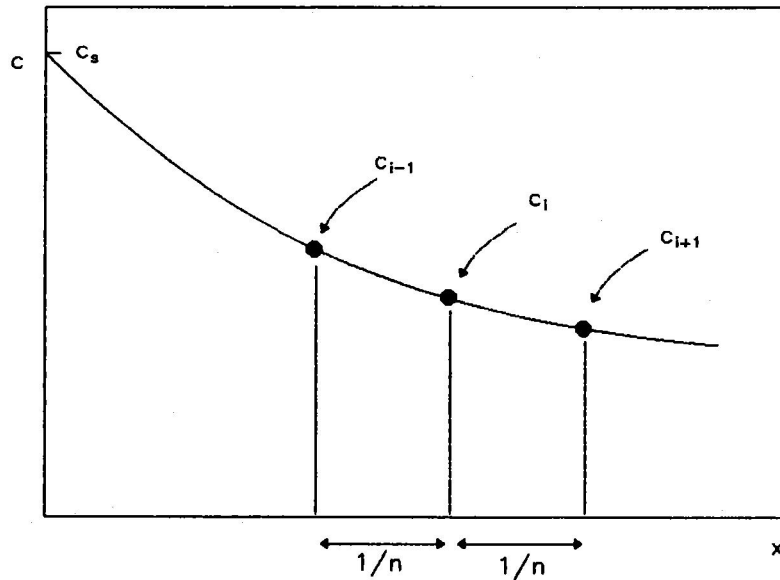


Figura 5.25

$$n = \frac{1}{\tau} \quad \longrightarrow \quad n^2 \frac{d^2}{dx^2} = \frac{(1-d)^3 d}{l^4} \frac{k_1}{D_{eg}} \quad [5.139]$$

Admitiendo que la porosidad determinada por las celdillas coincide con el hinchamiento producido por el "swelling" de las partículas, porosidad de macroporos (celdillas)

$$\epsilon_n = \left(\frac{1-d}{\tau} \right)^3 \quad \text{y} \quad \frac{d}{\tau} = 1 - \sqrt[3]{\epsilon_n} \quad [5.140]$$

la ecuación [5.138] queda en la forma

$$\frac{d^2 c}{dx^2} - \sum n \left(1 - \sqrt[3]{\sum n} \right) \frac{k_1}{D_{eg}} c = 0 \quad [5.141]$$

que comparada con la correspondiente a la difusión y reacción en una partícula porosa con cinética de primer orden

$$\frac{d^2c}{dx^2} - \frac{k_1}{D_e} c = 0 \quad [5.142]$$

pone de manifiesto que el modelo propuesto es equivalente a este último con una difusividad efectiva dada por

$$D_e = \frac{D_{eg}}{\epsilon_p (1 - \sqrt[3]{\epsilon_p})} \quad [5.143]$$

y aplicando el modelo de poros paralelos

$$\frac{D_M \epsilon_p}{\tau} = \frac{\frac{D_M \epsilon_g}{\tau_g}}{\epsilon_p (1 - \sqrt[3]{\epsilon_p})} \quad [5.144]$$

donde ϵ_g es la porosidad debida a los microporos del gel y ϵ_p la total de la partícula D_e la ecuación [5.144] se deduce

$$\tau_g = \frac{\epsilon_g}{(\epsilon_g + \epsilon_p) \epsilon_p (1 - \sqrt[3]{\epsilon_p})} \tau \quad [5.145]$$

Admitiendo que la porosidad de las membranas de gel es la determinada con las partículas secas por el método de intrusión de mercurio:

$$\tau_g = \frac{0.072}{(0.42) (0.38) (1 - \sqrt[3]{0.38})} \tau = 1.64 \tau \quad [5.146]$$

que teniendo en cuenta el factor de tortuosidad calculado anteriormente implicaría un valor de $\tau_g = 2.5$ para la membrana de gel, más próximo al teórico de 3 para poros orientados al azar.

5.7 Reactor de fibra hueca.

Puesto que los resultados experimentales han puesto de manifiesto que el módulo de fibra hueca se comporta como un reactor diferencial, que en la carcasa puede admitirse mezcla perfecta y que no se

producen gradientes de concentración apreciables para las hexosas en las membranas de las fibras, la interpretación de los experimentos realizados con este dispositivo, puede realizarse por la ecuación [5.108]

$$y = \frac{1}{k_a} \ln \left(\frac{x_e - x_0}{x_e - x} \right)$$

admitiendo la aproximación de pseudoprimer orden ya comprobada en los dos dispositivos anteriores. Sin embargo, puesto que en estos experimentos se extrayeron muestras de la carcasa, será necesario tener en cuenta la masa de enzima retirada en el factor intensivo y , que ahora, en vez de por la ecuación [5.99] vendrá dado por

$$y = \sum m_i \frac{t_i}{V_i} \quad [5.147]$$

En las Tablas 5.31 a 5.34 se indican los valores de y y de la conversión en el tanque calculados a partir de los resultados primarios indicados en las Tablas 4.35 a 4.38.

Estos resultados se han representado en la Figura 5.26 en la forma que sugiere la ecuación [5.108], y en ella se observa que el comportamiento del módulo de fibra hueca se separa de los obtenidos en fase homogénea, no sólo en que se alcanzan conversiones apreciablemente inferiores sino también en que no se cumple la ecuación [5.108], pues los puntos correspondientes a los tres experimentos realizados con este dispositivo que coinciden bien entre sí, tienen una tendencia clara a desviarse de la linealidad que indica la ecuación [5.108].

Puesto que la actividad de la enzima encerrada en la carcasa, en ausencia de sustrato pero en las mismas condiciones experimentales no cambiaba con el tiempo, apartado 3.0, y se ha comprobado repetidas veces la no existencia de gradientes transmembrana, sólo han podido explicarse estos resultados admitiendo que es este dispositivo experimental se produce desnaturalización de la enzima en presencia del sustrato.

Esta desnaturalización sólo puede ser debida a la inactivación del complejo enzima-sustrato en la capa de polarización de la membrana, ya que todas las restantes condiciones se producen también en los experimentos ya comentados de medidas de la estabilidad de la enzima aislada.

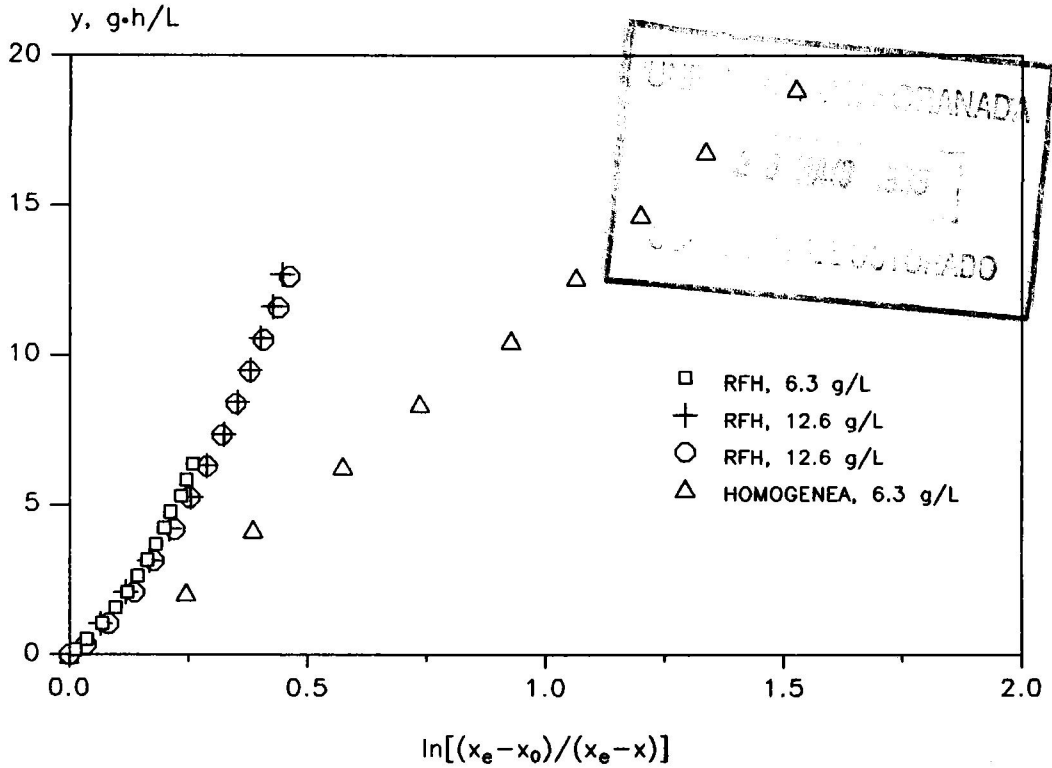


Figura 5.26. Representación de la ecuación [5.108].

Como ya se indicó en la parte 4, el estudio de este dispositivo experimental ha sido sólo a nivel exploratorio y la conclusión anterior es opuesta a lo generalmente encontrado en la bibliografía de que la presencia del sustrato aumenta la estabilidad de la enzima, Park et al. (1981), Chen y Wu (1986).

La interpretación de los experimentos realizados en el reactor de fibra hueca admitiendo desnaturalización enzimática de primer orden, y cinética de pseudoprimer orden:

$$V_c c_E r dt = V_T s_0 dx \tag{5.148}$$

$$r = k e_T s_0 (x_e - x) \tag{5.149}$$

$$-\frac{de_T}{dt} = k_d e_T \tag{5.150}$$

Porintegración de esta última ecuación

$$e_T = e_{T0} \exp(-k_d t) \quad [5.151]$$

y sustituyendo [5.149] y [5.151] en [5.148]

$$m k e_{T0} \exp(-k_d t) (x_e - x) dt = V_T dx \quad [5.152]$$

Separando variables e integrando entre dos tomas de muestra consecutivas se obtiene

$$\ln \left(\frac{x_e - x_i}{x_e - x_{i-1}} \right) = k e_{T0} \frac{m_i}{V_{Ti}} \frac{\exp(-k_d t_i) - \exp(-k_d t_{i-1})}{k_d} \quad [5.153]$$

que puede generalizarse para todo el experimento sumando las ecuaciones correspondientes a cada intervalo

$$\ln \left(\frac{x_e - x_0}{x_e - x} \right) = k e_{T0} \sum_i \frac{m_i}{V_{Ti}} \frac{\exp(-k_d t_i) - \exp(-k_d t_{i-1})}{k_d} \quad [5.154]$$

La aplicación directa de esta ecuación a los resultados experimentales se complica al no conocerse la constante de desnaturalización k_d que interviene en el sumatorio, sin embargo, utilizando valores medios de la masa de enzima y del volumen total de fase líquida, dada la pequeña variación de ambos, la ecuación [5.154] se reduce a

$$\ln \left(\frac{x_e - x_0}{x_e - x} \right) = \frac{k e_{T0} m_m}{(V_T)_m} \left(\frac{1 - \exp(-k_d t)}{k_d} \right) \quad [5.155]$$

que aplicada a los resultados de los tres experimentos realizados, por regresión no lineal, se obtiene

$$k e_{T0} = 0.0639 \text{ L/g-h} \quad k_d = 0.433 \text{ h}^{-1} \quad r^2 = 0.992 \quad [5.156]$$

Mediante el valor de k_d estimado así se ha calculado el sumatorio de la ecuación [5.154] que permite la linealización de los resultados obtenidos con el módulo de fibra hueca. La representación correspondiente se realiza en la Figura 5.27 junto con los resultados obtenidos en el experimento en fase homogénea realizado en las mismas condiciones y con enzima de la misma edad. Se aprecia en esta figura que

los resultados experimentales realizados con el módulo de fibra hueca se ajustan bien a la ecuación [5.154] y coinciden prácticamente con el valor de $k_{e_{T0}}$ obtenido para el experimento homogéneo de referencia, Tabla 5.35.

TABLA 5.35
INTERPRETACION DE LOS EXPERIMENTOS DE FIBRA HUECA

Experimento	$k_{e_{T0}}, L/g \cdot h$	r^2
Homogéneo	0.0758	0.998
Hollow fiber		
m = 1.26 g	0.0716	0.999
m = 2.52 g	0.0629	0.999
m = 2.52 g	0.0614	0.996

Por tanto, a falta de una mejor comprobación experimental los resultados obtenidos en este dispositivo experimental parecen sugerir que se produce la desnaturalización del complejo enzima-sustrato probablemente en la capa de polarización de la membrana.

6. CONCLUSIONES

Como resultado de la presente investigación se ha llegado a las siguientes conclusiones:

1.- Se ha determinado la constante del equilibrio de isomerización glucosa \rightleftharpoons fructosa, a pH = 7.5 y una concentración total de hexosas de 0.002 M, en el intervalo de 30 a 60°C, su comparación con los resultados publicados en la Bibliografía pone de manifiesto que los valores de K_e son consistentes en un intervalo de pH de 6.5 a 8.5 y hasta concentración total de hexosas de 3.4 M, su variación con la temperatura viene dada por

$$K_e = 24.3 \exp \left(- \frac{8494}{RT} \right)$$

que reproduce también aceptablemente la mayor parte de los valores publicados en el intervalo de 30 a 80°C.

2.- Se ha desarrollado un modelo cinético para el proceso considerado a partir del mecanismo de la reacción establecido en la Bibliografía que se aplica a los diferentes tipos de reactores deduciéndose las ecuaciones que se aplican posteriormente a la interpretación de los resultados experimentales.

3.- Se ha desarrollado un modelo para tener en cuenta la influencia del transporte interno en sistemas con enzimas inmovilizadas sobre un soporte sólido que introduce un factor de efectividad modificado para tener en cuenta además del transporte interno la desviación de la cinética de $\frac{1}{2}$ orden. Para cualquier ecuación cinética la integración de la ecuación de continuidad del sustrato en el interior de la partícula se realiza por el algoritmo de Runge-Kutta de 4º orden y aunque se trata de un problema de valor límite se han resuelto las dificultades de convergencia por elección del valor inicial supuesto teniendo en cuenta el límite al que tiende la ecuación de continuidad en el centro de la partícula.

4.- La aplicación del programa de cálculo del modelo anterior ha permitido desarrollar una correlación para el cálculo del factor de efectividad modificado para ecuaciones cinéticas tipo Michaelis-Menten semejante a la propuesta por Kobayashi *et al.* (1976), pero que reproduce ligeramente mejor los resultados obtenidos por integración numérica, es válida en un intervalo más amplio de los parámetros cinéticos y tiene un parámetro ajustable menos.

5.- Los resultados obtenidos en el reactor de lecho fijo y recirculación, variando el caudal de circulación y la masa de enzima inmovilizada en el lecho ponen de manifiesto que este dispositivo experimental se comporta como un reactor diferencial, lo que facilita la interpretación de los resultados experimentales obtenidos.

6.- La interpretación de los experimentos cinéticos con el dispositivo anteriormente comentado ha puesto de manifiesto que la cinética de la reacción se ajusta a un proceso reversible de pseudoprimer orden, lo que indica que las constantes de Michaelis-Menten en ambos sentidos son prácticamente iguales y por tanto que la afinidad de ambos isómeros por la enzima es muy próxima.

7.- La conclusión anterior se ha confirmado con los resultados obtenidos en fase homogénea, en un reactor mezcla perfecta con la enzima en disolución. En ambos casos, la constante cinética aparente de pseudoprimer orden es función de la concentración total de hexosas en la forma prevista por el modelo cinético.

8.- Para la comparación de los resultados obtenidos con la enzima inmovilizada y libre se ha desarrollado un método para el cálculo simultáneo de la actividad relativa y de la difusividad efectiva en la enzima inmovilizada o el factor de tortuosidad si se admite el modelo de poros paralelos para esta difusividad. El valor resultante para el factor de tortuosidad es de 1.53, es inferior a los generalmente encontrados con partículas porosas y al teórico de 3 para una orientación al azar de la dirección de los poros.

9.- Los resultados conjuntos con enzima libre y con enzima inmovilizada, una vez evaluado el factor de efectividad para estos últimos, han permitido determinar las tres constantes cinéticas elementales independientes y su variación con la temperatura que se ajusta a la ecuación de Arrhenius.

10.- Los valores obtenidos esta investigación para las energías de activación de las constantes cinéticas de descomposición del complejo intermedio son del mismo orden que los valores encontrados en la Bibliografía. Por el contrario, la energía de activación de las constantes de formación del complejo intermedio son generalmente superiores a los valores publicados; en este sentido, es interesante señalar que la influencia del transporte interno tiende a disminuir la energía de activación aparente.

11.- Se propone un modelo para las enzimas retenidas en la matriz de un gel que permite explicar que el factor de tortuosidad para estos sistemas sea algo inferior al correspondiente a una partícula porosa.

12.- El estudio experimental de este sistema utilizando un módulo de fibra hueca para retener la enzima ha puesto de manifiesto que las conversiones obtenidas en este caso son apreciablemente inferiores. Sin embargo, medidas de la actividad de la enzima retenida en la carcasa del módulo de fibra hueca en ausencia de soluto, indican que la enzima no se desactiva en estas condiciones.

Estos resultados sólo han podido ser explicados admitiendo que en presencia del sustrato si se produce desnaturalización de la enzima, probablemente por adsorción del complejo enzima-sustrato en la capa de polarización de la membrana.

7. NOMENCLATURA

A	variable adimensional, ecuación [5.43]
a_s	superficie externa de las partículas por unidad de volumen de dispersión, m^{-1}
B	módulo adimensional, ecuación [5.68]
c_e	concentración del complejo enzimático, g/L
D_e	difusividad efectiva, cm^2/s
D_m	difusividad molecular, cm^2/s
d_p	diámetro de partícula, m
E_i	energía de activación para k_i , KJ/mol
e_R	relación de concentraciones enzimáticas entre sweetzyme T y spezyme GI
e_T	concentración de enzima activa por gramo de enzima inmovilizada
G_i	concentración de glucosa en el tanque, g/L
G_f	concentración de glucosa a la salida del reactor, g/L
k	constante cinética de la ecuación
k_a	constante cinética, ecuación [5.19], L/g-h
K_b	constante cinética, ecuación [5.20]
K_e	constante de equilibrio
k_d	constante de desactivación enzimática, h^{-1}
k_f, k_g	constantes cinéticas de isomerización, ecuación [2.2], mol/g-h
k_{-f}, k_{-g}	constantes cinéticas de isomerización, ecuación [2.2], L/g-h
k_1	coeficiente de transferencia de materia, m/h
K_{mf}	constante de Michaelis Menten para fructosa, M
K_{mg}	constante de Michaelis Menten para glucosa, M
k_r	constante cinética, ecuación [5.9]
K_D	constante cinética, ecuación [5.10]
K_1	constante cinética, ecuación [5.11]
L_D	longitud equivalente, m
m_G	módulo de Thiele globalizado
m	masa de enzima, g
q	caudal de circulación, L/min
r_{FG}	velocidad de reacción en el sentido fructosa-glucosa, mol/g-h
r_{GF}	velocidad de reacción en el sentido glucosa-fructosa, mol/g-h

r_{ob}	velocidad de reacción observada, mol/g-h
R_{FG}	velocidad de reacción volumétrica en el sentido fructosa-glucosa, mol/h
R_{FG}^*	velocidad de reacción volumétrica en el sentido fructosa-glucosa sin influencia del transporte, mol/h
s_0	concentración inicial de sustrato, mol/L
t	tiempo de reacción, h
T	temperatura, °C
V	volumen total de fase líquida
V_{mf}	velocidad máxima de reacción para fructosa, mol/h-g
V_{mg}	velocidad máxima de reacción para glucosa, mol/h-g
x	conversión
x_0	conversión inicial
x_e	conversión de equilibrio
x_s	conversión a la salida del reactor
y	variable intensiva de tratamiento, g-h/L
z	variable adimensional, ecuación [5.42]
α	variable adimensional, ecuación [5.47]
B	módulo adimensional para la desviación de la cinética de primer orden
η	factor de efectividad para el transporte interno
η_T	factor de efectividad para transporte interno y externo
η_0	factor de efectividad para una reacción de orden cero
η_1	factor de efectividad para una reacción de primer orden
ϵ	porosidad de las partículas
ϕ	módulo de Thiele
ϕ_0	módulo de Thiele de orden cero.
ϕ_1	módulo de Thiele de primer orden.
ρ_p	densidad de partícula, g/cm ³
τ	tortuosidad

8. APENDICES

8.1 Penetración de mercurio.

En este apartado se recogen los resultados obtenidos al utilizar la porosimetría de mercurio a las partículas de enzima sweetzyme T de Novo. En la Tabla 8.1 se presentan las presiones aplicadas, P, el radio de poro, R, el volumen introducido en los poros, V_m y el parámetro $dV_m/d\lg R$. En la Figura 8.1 se representa el volumen de mercurio frente al radio de poro y en la 8.2 $dV_m/d\lg R$ frente a R, observándose que la mayoría de los poros presentes en las partículas tienen un radio comprendido entre 2 y 20 nm.

TABLA 8.1

Presión, kPa	Radio, nm	Volumen, cm^3/g	$dV/d\log P$
179	4102.35	0.0000	0.0093
455	1616.08	0.0450	0.0066
765	960.91	0.0530	0.0045
1123	654.36	0.0610	0.0023
1571	467.81	0.0610	0.0011
2060	356.73	0.0640	0.0039
2570	285.95	0.0690	0.0043
3094	237.55	0.0720	0.0015
3618	203.16	0.0720	0.0000
4162	176.59	0.0720	0.0000
4707	156.17	0.0720	0.0000
5265	139.61	0.0720	0.0030
5823	126.23	0.0750	0.0059
6409	114.69	0.0770	0.0061
7001	104.98	0.0800	0.0033
7608	96.61	0.0800	0.0039
8221	89.41	0.0830	0.0079
9344	78.66	0.0880	0.0101
10619	69.22	0.0910	0.0127
11908	61.73	0.1010	0.0132
13231	55.55	0.1040	0.0028
14554	50.50	0.1040	0.0127
15905	46.21	0.1120	0.0099
17249	42.61	0.1120	0.0106
18620	39.47	0.1170	0.0110
20012	36.73	0.1200	0.0038
21390	34.36	0.1200	0.0046
22810	32.22	0.1230	0.0094

TABLA 8.1 (CONTINUACION)

Presión, kPa	Radio, nm	Volumen, cm ³ /g	dV/dlogP
24443	30.07	0.1250	0.0149
26593	27.64	0.1330	0.0177
28777	25.54	0.1390	0.0115
30990	23.72	0.1410	0.0161
33229	22.12	0.1470	0.0129
35503	20.70	0.1490	0.0140
37798	19.45	0.1550	0.0294
40120	18.32	0.1650	0.0450
42477	17.30	0.1760	0.0472
45413	16.19	0.1890	0.0345
48631	15.11	0.1970	0.0259
51890	14.16	0.2030	0.0418
55198	13.32	0.2190	0.0580
58540	12.56	0.2350	0.0346
61931	11.87	0.2370	0.0213
65542	11.21	0.2450	0.0436
69814	10.53	0.2810	0.0417
74245	9.90	0.2690	0.0386
78759	9.33	0.2800	0.0404
83328	8.82	0.2910	0.0421
87979	8.35	0.3010	0.0475
93217	7.89	0.3120	0.0402
98971	7.43	0.3230	0.0345
104828	7.01	0.3310	0.0359
110748	6.64	0.3390	0.0374
116970	6.28	0.3490	0.0313
124034	5.93	0.3550	0.0251
131359	5.60	0.3630	0.0307
138877	5.29	0.3710	0.0373
146520	5.02	0.3810	0.0269
154562	4.76	0.3840	0.0309
163665	4.49	0.3950	0.0362
172927	4.25	0.4030	0.0375
182443	4.03	0.4130	0.0323
192380	3.82	0.4190	0.0315
203517	3.61	0.4290	0.0476
214894	3.42	0.4400	0.0272
226540	3.24	0.4430	0.0164
239102	3.07	0.4480	0.0489
252471	2.91	0.4670	0.0655
266378	2.76	0.4800	0.0501
280601	2.62	0.4910	0.0500
295996	2.48	0.5010	0.0546
312397	2.35	0.5120	0.0489
329266	2.23	0.5200	0.0334
346825	2.12	0.5250	0.0388
365631	2.01	0.5390	0.0509

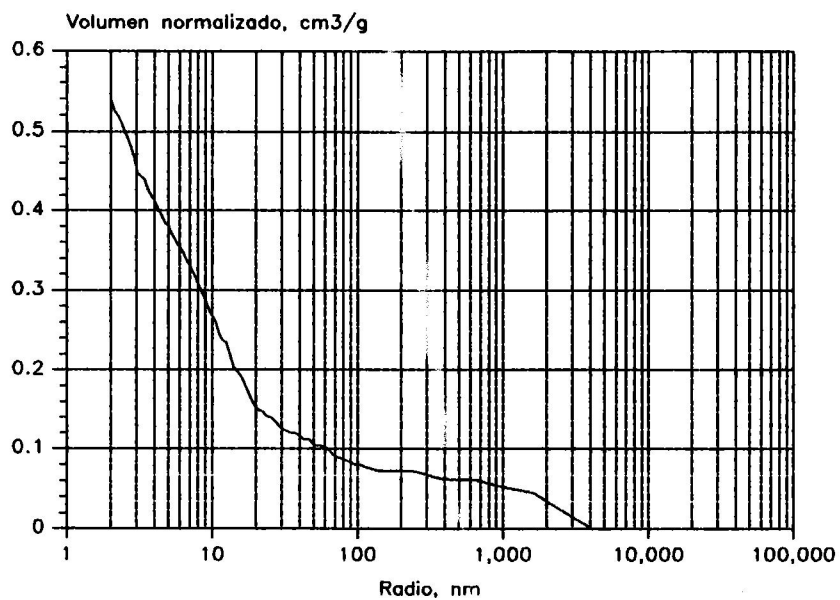
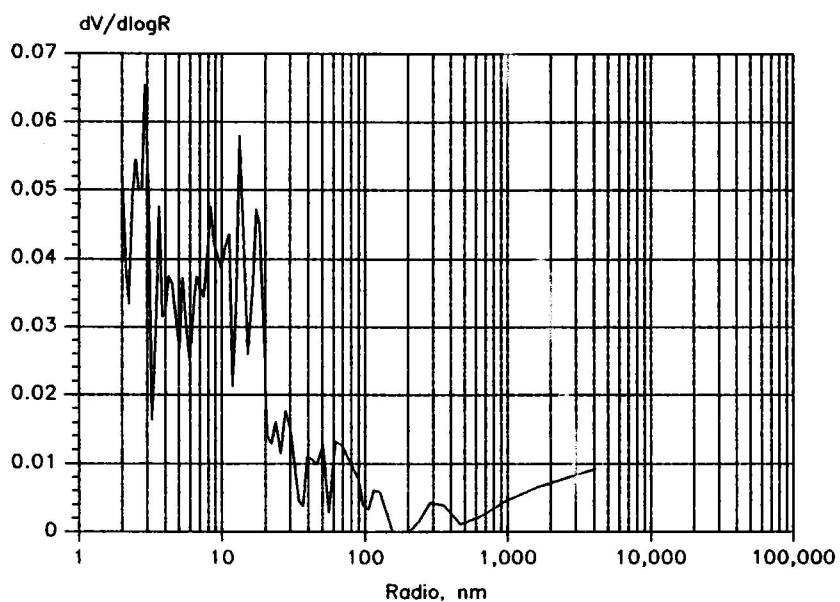


Figura 8.1



8.2 Tratamiento de imágenes.

Los valores obtenidos de superficie de partícula y perímetro para partículas secas y húmedas de la enzima sweetzyme T como consecuencia del tratamiento de imágenes, se recogen en las Tablas 8.2 y 8.3

TABLA 8.2
PARTICULAS SECAS

S_i	P_i	S_i	P_i	S_i	P_i	S_i	P_i
0.5794	3.077	0.8813	3.699	0.3584	2.249	0.6728	3.554
0.4805	2.734	0.6429	3.155	0.3725	2.244	0.6597	3.249
0.5642	2.897	0.4317	2.555	0.2992	2.011	0.4664	2.785
0.4985	2.726	0.7357	3.617	0.5131	2.778	0.3779	2.224
0.9209	3.848	0.6174	3.242	0.6782	3.140	0.7640	3.345
0.4757	2.887	0.4556	2.519	0.4230	2.519	0.2997	1.961
0.7211	3.430	0.4208	2.490	0.2731	1.953	0.3703	2.411
0.4132	2.529	0.4165	2.372	0.4621	2.581	0.5099	2.898
0.4632	2.592	0.4143	2.323	0.7395	4.020	0.3654	2.362
0.4811	2.722	0.6364	3.321	0.7591	3.396	0.5348	2.935
0.3443	2.214	0.4811	2.775	0.4317	2.440	0.5919	3.081
0.4887	2.701	0.3768	2.374	0.8726	4.039	0.4735	2.712
0.3948	2.490	0.7341	3.549	0.3969	2.352	0.7614	3.816
0.5712	2.956	0.8172	3.663	0.5528	2.847	0.9474	4.332
0.4985	2.708	0.6217	3.126	0.5180	2.767	0.5336	2.855
0.2085	1.740	0.5718	2.944	0.6690	3.442	0.5443	3.149
0.4214	2.568	0.4110	2.501	0.3882	2.292	0.8161	3.709
0.3443	2.172	0.5006	2.916	0.6652	3.226	0.4446	2.485
0.5289	2.782	0.6060	3.011	0.5272	2.900	0.9021	3.851
0.6548	3.259	0.7287	3.382	0.5012	2.704	0.6652	3.152
0.4995	2.842	0.3584	2.222	0.3122	2.240	0.5170	2.759
0.5506	2.815	0.4252	2.439	0.6690	3.369	1.1314	4.825
0.5799	3.068	0.5435	2.929	0.3996	2.445	0.3688	2.315
0.2150	1.793	0.5848	3.018	0.8275	3.814	0.6679	3.157
0.5110	2.867	0.7271	3.545	0.5647	2.959	0.8296	3.736
0.4208	2.519	0.6206	3.482	0.5745	3.034	0.7063	3.270
0.6858	3.736	0.5767	3.016	0.7113	3.344	0.6533	3.190
0.1917	1.813	0.6559	3.563	0.5799	2.991	0.5598	2.889
0.3318	2.266	0.9372	4.213	0.4713	2.659	0.8030	2.971
0.7911	3.548	0.3263	2.042	0.4040	2.400	0.5544	2.899
0.6635	3.069	0.6271	3.395	0.5348	2.675	0.5295	2.749
0.3296	2.176	0.5500	2.790	0.3453	2.416	1.1471	4.322
0.7238	3.388	0.5017	2.692	0.5175	2.764	1.0308	4.016
0.4132	2.389	0.4252	2.563	0.5327	2.870	1.1141	4.447
0.6500	3.235	0.5148	3.003	0.4892	2.678	0.4278	2.436
0.4686	2.892	0.2737	2.083	0.9855	4.493	0.6950	3.277

TABLA 8.2 (CONTINUACION)

S_i	P_i	S_i	P_i	S_i	P_i	S_i	P_i
0.5582	2.913	0.4762	2.999	0.9296	4.389	0.6901	3.397
1.3056	5.248	0.3389	2.393	0.2447	1.831	0.4558	2.638
0.7685	3.611	0.7786	3.436	0.5031	2.781	0.8135	3.526
0.4251	2.391	0.2641	2.191	0.5619	2.853	0.5796	3.015
1.4873	6.529	0.8744	4.031	0.4885	2.744	0.7805	3.852
0.8729	3.762	1.0892	4.918	0.4042	2.419	0.4480	2.508
1.0600	4.387	0.7812	3.785	0.3829	2.630	0.4924	2.632
1.2455	4.884	0.7158	3.453	0.8834	4.335	0.4504	2.607
0.7664	3.721	0.8895	4.035	0.6843	3.418	0.5862	2.822
0.5003	2.835	0.7692	3.576	0.3598	2.461	0.3601	2.260
0.7491	3.473	0.9649	3.747	0.5076	2.974	0.7997	3.711
0.8410	3.829	0.9358	5.155	0.8633	4.375	0.5316	3.101
1.3856	5.219	1.0810	4.367	0.5280	3.033	0.5019	2.863
1.2315	4.878	0.6312	3.341	0.3673	2.343	0.7049	3.799
0.7474	3.471	0.6251	3.181	0.8333	3.884	0.5514	2.907
0.5500	2.911	0.6214	3.556	0.5418	2.817	0.7019	3.455
0.8367	3.876	0.4677	2.743	0.6432	2.998	0.7694	3.703
0.6468	3.084	0.7031	3.319	0.3019	2.008	0.7712	3.787
0.3223	2.246	0.5178	2.931	0.3937	2.270	0.5136	2.915
0.5760	2.939	0.3100	2.126	0.8198	4.870	0.7361	3.295
0.6831	3.225	0.5127	2.735	0.4597	2.950	0.2891	1.919
1.0460	4.348	0.3445	2.157	0.2669	1.929	0.5199	2.986
1.2288	4.790	0.2276	1.736	0.2405	1.888	0.3895	2.419
0.6220	3.084	0.5580	2.869	0.1739	1.603	0.5553	2.876
0.4878	2.737	0.2636	1.984	0.8537	4.206	0.6516	3.533
0.5679	2.737	0.2981	2.076	1.8528	7.722	0.3739	2.415
0.8789	3.739	0.2789	2.054	0.7778	3.788	0.4546	2.559
0.7436	3.809	0.6540	3.354	1.0786	4.831	0.8966	4.078
0.6912	3.486	0.4852	3.293	0.4765	3.167	0.7079	3.680
0.3730	2.555	0.7844	3.703	0.6243	3.359	0.5697	2.982
0.3431	2.481	0.5736	3.199	0.3652	2.411	1.0168	4.053
0.3865	2.545	0.5112	2.775	0.6891	3.468	0.5835	3.072
0.9061	4.534	0.3502	2.204	0.5319	2.805	0.7202	3.487
0.2983	2.249	0.6981	3.434	0.4150	2.455	0.8231	3.478
0.3901	2.599	0.3190	2.192	0.5112	3.037	0.4336	2.427
0.6158	3.197	0.9385	4.145	0.4072	2.350	0.5823	3.245
0.5092	2.793	0.7148	3.619	0.4642	2.557	0.6291	3.043
0.6037	3.393	0.8261	3.890	0.6891	3.420	0.7874	3.474
0.5016	2.706	0.8765	3.935				

TABLA 8.3
PARTICULAS HUMEDAS

S_i	P_i	S_i	P_i	S_i	P_i	S_i	P_i
1.3804	4.600	0.8253	3.837	0.9532	4.046	1.9465	6.212
0.3950	2.380	0.7155	3.268	0.8749	3.686	0.4787	2.624
0.8811	4.161	0.8891	3.839	1.1687	4.421	0.8098	3.548
0.7271	3.259	0.7507	3.415	0.7182	3.432	0.6560	3.244
1.2120	4.946	0.6631	3.198	0.6748	3.030	0.6530	3.147
0.9194	3.754	0.4121	2.469	2.0179	5.978	0.3981	2.393
0.4235	2.414	0.4429	2.528	1.9084	5.672	0.8398	3.738
1.2953	5.044	0.8302	3.829	0.6243	2.927	0.9409	4.114
0.7063	3.632	0.6274	3.255	0.9454	4.118	0.7702	3.669
0.5819	3.129	0.7518	3.357	0.6947	3.162	0.7208	3.501
0.5462	2.997	0.6896	3.131	1.0319	4.042	0.7264	3.283
1.0195	3.928	0.7523	3.554	1.1435	4.245	1.0178	4.436
0.4018	2.365	0.4716	2.572	0.7135	3.216	1.4519	5.197
0.7274	3.388	0.5484	2.887	0.8420	3.724	0.6205	3.545
1.1163	4.893	1.0995	5.030	0.7768	3.675	0.4244	2.528
0.5403	2.934	0.6522	3.529	0.7602	3.384	0.9136	3.880
1.0357	4.706	0.5964	3.432	0.8658	3.659	1.2223	5.066
1.0552	4.227	1.0032	3.894	1.1098	4.493	0.9870	4.194
1.0119	4.327	0.8477	3.562	0.4911	2.533	0.5722	2.962
0.4256	3.084	1.0692	4.333	0.7630	3.238	0.5814	3.356
0.5024	2.689	0.6379	3.258	0.7931	3.478	0.6356	3.648
0.4938	2.632	2.2339	6.615	0.9169	3.858	0.6889	3.654
0.8918	4.032	1.8839	5.677	0.5482	2.817	0.7822	3.797
0.5706	2.893	0.6118	2.879	0.6320	3.213	0.3313	2.236
0.7777	3.658	1.3276	4.937	1.1732	4.902	1.1141	4.318
0.5354	2.889	1.0049	4.281	0.7376	3.510	0.5529	2.944
1.0746	4.426	0.9648	3.893	1.2863	4.873	0.5339	3.012
0.5381	2.797	0.7644	3.361	0.7747	3.837	0.6227	3.243
0.6977	3.515	0.7445	3.218	1.1879	4.347	0.7549	3.880
0.7664	3.321	0.8344	3.585	0.5695	3.275	0.7130	3.576
0.7409	3.628	0.7624	3.748	0.6295	3.237	0.5256	2.691
1.1763	4.530	0.7906	3.454	0.6209	3.143	0.4713	2.612
0.9735	4.164	0.8079	3.611	1.0272	4.805	0.6460	3.278

TABLA 8.3 (CONTINUACION)

S_i	P_i	S_i	P_i	S_i	P_i	S_i	P_i
1.1650	4.442	1.0237	4.520	0.9102	4.166	0.9164	3.868
0.6793	3.223	0.7061	3.145	0.5164	2.966	0.8182	3.494
0.7107	3.325	0.8034	3.475	0.8101	3.842	0.7053	3.400
1.1288	4.284	0.8187	3.710	0.8889	3.747	0.7788	3.684
0.5539	2.861	1.0683	3.831	0.5379	2.745	0.6162	3.257
0.6584	3.067	0.5252	2.758	1.3631	5.363	0.3793	2.372
1.2545	4.484	0.8615	3.908	0.6720	4.358	0.7662	3.534
0.5746	3.168	0.8293	3.493	0.5641	2.799	1.6280	5.294
0.5840	2.895	0.9471	3.855	0.6810	2.998	0.9796	4.032
0.2825	1.979	0.8164	3.644	1.0622	3.810	0.6435	3.066
0.9891	4.241	0.8706	3.823	0.6190	3.096	1.3522	4.527
0.6873	3.080	0.9628	4.267	0.3157	2.141	1.0219	3.795
0.5672	2.819	1.1784	4.722	1.2366	5.340	1.8579	5.226
1.0310	3.963	0.4256	2.441	0.3659	2.265	0.3741	2.457
1.3278	4.543	1.5869	5.068	0.7407	3.265	0.6122	2.981
0.9858	3.895	0.7973	3.788	0.4446	2.579	0.8015	3.498
0.4131	2.480	0.8796	3.522	0.9411	4.139	0.7302	3.297
0.9527	4.338	0.9785	4.113	0.3703	2.210	0.8940	3.770
0.8535	3.903	0.8160	3.460	0.4819	2.664	0.7406	3.425
0.5903	2.928	1.2029	4.511	0.4511	2.657	1.1808	4.132
1.3356	5.030	0.8926	3.577	0.6843	3.146	0.5701	2.900
0.6313	3.018	1.5681	5.716	0.4699	2.525	1.2385	5.640
1.3647	4.345	0.7202	3.162	0.7076	3.353	0.4759	2.724
0.8529	3.719	0.7052	3.119	0.6308	2.892	0.8534	3.703
0.3708	2.530	0.7990	3.587	0.5097	2.695	1.4635	5.383
1.1719	4.196	1.1221	4.898	0.9961	3.976	0.7832	3.687
0.7842	3.496	0.4274	2.408	1.0821	3.825	0.9053	3.829
0.4476	2.475	0.7691	4.629	0.5985	2.917	0.8421	3.512
0.5865	3.394	0.7199	3.384	0.2624	2.040	0.9404	3.804
0.8735	3.454	1.2165	4.120	0.7376	5.722	0.7832	3.341
0.6484	2.911	0.6897	3.072	0.4749	2.585	0.8882	3.894
1.3048	4.802	0.6673	3.089	1.1567	4.249	0.7937	3.602
0.4361	2.689						

8.3 Ajuste mediante funciones spline cúbicas de los resultados experimentales.

8.3.1 Fundamento.

Considérese una función spline de 3^{er} orden expresada en la forma:

$$B_k(x) = a_{0k} + a_{1k} \cdot \left(\frac{x - x_k}{\Delta x_k} \right) + a_{2k} \cdot \left(\frac{x - x_k}{\Delta x_k} \right)^2 + a_{3k} \cdot \left(\frac{x - x_k}{\Delta x_k} \right)^3 \quad [1]$$

para el intervalo k, entre los nodos k y k+1, de manera que

$$\Delta x_k = x_{k+1} - x_k \quad [2]$$

y tratemos de sustituir los coeficientes a_{0k} , a_{1k} , a_{2k} y a_{3k} por los valores de la función y su derivada segunda en los nodos:

$$y_k = a_{0k} \quad [3]$$

$$y_{k+1} = a_{0k} + a_{1k} + a_{2k} + a_{3k} \quad [4]$$

la segunda derivada viene dada por

$$B_k''(x) = \frac{2a_{2k}}{\Delta x_k^2} + \frac{6a_{3k}}{\Delta x_k^2} \cdot \left(\frac{x - x_k}{\Delta x_k} \right) \quad [8.5]$$

que aplicada en ambos nodos

$$c_k = \frac{2a_{2k}}{\Delta x_k^2} \quad [6]$$

$$c_{k+1} = \frac{2a_{2k}}{\Delta x_k^2} + \frac{6a_{3k}}{\Delta x_k^2} \quad [8.7]$$

De las ecuaciones [8.3], [8.4], [8.6] y [8.7] se obtiene:

$$a_{0k} = y_k \quad [8.8]$$

$$a_{2k} = \frac{c_k \cdot \Delta x_k^2}{2} \quad [8.9]$$

$$a_{3k} = (c_{k+1} - c_k) \frac{\Delta x_k^2}{6} \quad [8.10]$$

$$a_{1k} = y_{k+1} - y_k - \frac{\Delta x_k^2}{3} \cdot c_k - \frac{\Delta x_k^2}{6} \cdot c_{k+1} \quad [8.11]$$

que sustituidos en [8.1] conducen a:

$$\begin{aligned} B_k(x) = & \left(1 - \frac{x - x_k}{\Delta x_k} \right) \cdot y_k + \left(\frac{x - x_k}{\Delta x_k} \right) \cdot y_{k+1} + \\ & + \left[-\frac{\Delta x_k^2}{3} \left(\frac{x - x_k}{\Delta x_k} \right) + \frac{\Delta x_k^2}{2} \left(\frac{x - x_k}{\Delta x_k} \right)^2 - \frac{\Delta x_k^2}{6} \left(\frac{x - x_k}{\Delta x_k} \right)^3 \right] \cdot c_k + \\ & + \left[-\frac{\Delta x_k^2}{6} \left(\frac{x - x_k}{\Delta x_k} \right) + \frac{\Delta x_k^2}{6} \left(\frac{x - x_k}{\Delta x_k} \right)^3 \right] \cdot c_{k+1} \end{aligned} \quad [8.12]$$

ecuación que como puede comprobarse cumple ya las condiciones de continuidad de la función y de su segunda derivada entre los diferentes intervalos.

La continuidad de la primera derivada exigiría que en cada nodo interno

$$B'_{k+1}(x_k) = B'_k(x_k) \quad k = 2, 3, \dots, n-1 \quad [8.13]$$

siendo n el número de nodos.

Derivando [8.12] se obtiene:

$$\begin{aligned} B'_k(x) = & -\frac{y_k}{\Delta x_k} + \frac{y_{k+1}}{\Delta x_k} + \left[-\frac{\Delta x_k}{3} + \Delta x_k \left(\frac{x - x_k}{\Delta x_k} \right) - \frac{\Delta x_k}{2} \left(\frac{x - x_k}{\Delta x_k} \right)^2 \right] \cdot c_k \\ & + \left[-\frac{\Delta x_k}{6} + \frac{\Delta x_k}{2} \left(\frac{x - x_k}{\Delta x_k} \right)^2 \right] \cdot c_{k+1} \end{aligned} \quad [8.14]$$

que aplicada al nodo k en los dos polinomios que coinciden en él:

$$B_{k-1}^2(x_k) = -\frac{y_{k-1}}{\Delta x_{k-1}} + \frac{y_k}{\Delta x_{k-1}} + \frac{\Delta x_{k-1}}{6} \cdot c_{k-1} + \frac{\Delta x_{k-1}}{3} \cdot c_k \quad [8.15]$$

$$B_k'(x_k) = -\frac{y_k}{\Delta x_k} + \frac{y_{k+1}}{\Delta x_k} - \frac{\Delta x_k}{3} \cdot c_k - \frac{\Delta x_k}{6} \cdot c_{k+1} \quad [8.16]$$

y por tanto la ecuación [8.13] queda en la forma:

$$\begin{aligned} & -\frac{1}{\Delta x_{k-1}} y_{k-1} + \left(\frac{1}{\Delta x_{k-1}} + \frac{1}{\Delta x_k} \right) y_k - \frac{1}{\Delta x_k} y_{k+1} + \\ & + \frac{\Delta x_{k-1}}{6} \cdot c_{k-1} + \left(\frac{\Delta x_{k-1}}{3} + \frac{\Delta x_k}{3} \right) \cdot c_k + \frac{\Delta x_k}{6} \cdot c_{k+1} = 0 \end{aligned} \quad [8.17]$$

Se desea determinar los valores de y_k y c_k ($k=1,2 \dots n$) que hacen mínimo

$$F = \sum_{k=1}^{n-1} \sum_{j=1}^{m_k} (y_j - B_k(x_j))^2 \quad [8.18]$$

siendo m_k el número de puntos experimentales (x_j, y_j) del intervalo k

$$\sum_{k=1}^{n-1} m_k = m \quad [8.19]$$

sometidos a las restricciones de n-2 ecuaciones de la forma [8.17].

Para ello puede utilizarse el método de los multiplicadores de Lagrange y llamando v_m a las variables: $2n$ ($n y_k$ y $n c_k$)

$$\frac{\partial F}{\partial v_m} + \sum_{k=1}^{n-1} \lambda_k \frac{\partial \phi_k}{\partial v_m} = 0 \quad [8.20]$$

donde ϕ_k son las ecuaciones [8.17] y λ_k los correspondientes multiplicadores de Lagrange.

Se dispone por tanto de $2n$ ecuaciones de la forma [8.20] y $n-2$ ecuaciones de la forma [8.17] y $2n$ incógnitas más $n-2$ multiplicadores de Lagrange por lo que el sistema está determinado.

8.3.2 Programa.

El organigrama simplificado de cálculo se muestra en la Figura 8.3. y el listado del programa en Pascal se recoge a continuación.

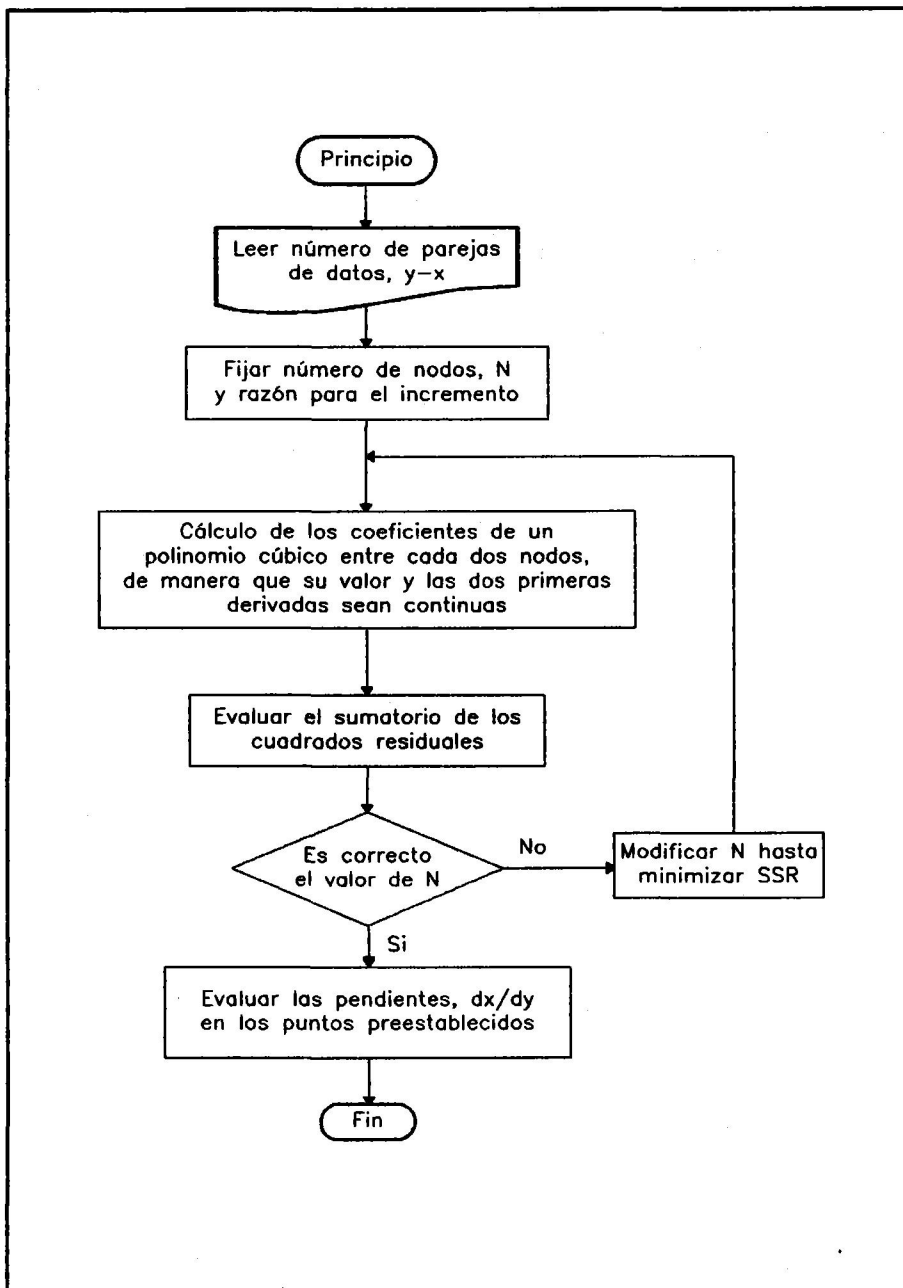


Figura 8.3. Organigrama simplificado para el programa de ajuste mediante splines cúbicas.

```
PROGRAM AJUSTE_SPLINE3;
USES CRT;
```

```
CONST
  NMAX=10;
  MMAX=100;
  PRECISION=1E-12;
```

```
TYPE
  REAL=EXTENDED;
  FICHERO=STRING[12];
  VECTORM=ARRAY[1..MMAX] OF REAL;
  VECTORN=ARRAY[1..NMAX] OF REAL;
  MATRIZSX=ARRAY[1..NMAX,0..6] OF REAL;
  MATRIZSYX=ARRAY[1..NMAX,0..3] OF REAL;
  MATRIZB=ARRAY[1..3*NMAX-2,1..3*NMAX-1] OF REAL;
  VECTORR=ARRAY[1..3*NMAX-2] OF REAL;
  VECTORB=ARRAY[1..3*NMAX-2] OF BYTE;
```

```
VAR
  DATOS,SALIDA:TEXT;
  NOMBRE_FICHERO,FICHERO_SALIDA:FICHERO;
  X,Y,Z,YCAL,ZCAL,DYCAL,DZCAL:VECTORM;
  FM,CM,E,J,M,N,NE,F,I:BYTE;
  DXT,G,XINICIAL,BMAX,SSR,SVP,SST,FACTOR,E0,S0,PM,v: REAL;
  DX,XI,C,YK,A0,A1,A2,A3:VECTORN;
  SX:MATRIZSX;
  SYX:MATRIZSYX;
  B:MATRIZB;
  JB:VECTORB;
  SOLUCION:VECTORR;
  CONT:CHAR;
```

```
PROCEDURE LEER_DATOS(NOMBRE_FICHERO:FICHERO;VAR M:BYTE;VAR E0,S0,PM,v:
REAL;VAR X,Y,Z:VECTORM);
```

```
VAR
  XAUX,XAUX2,VOL:REAL;
BEGIN
  ASSIGN(DATOS, NOMBRE_FICHERO);
  RESET(DATOS);
  READLN(DATOS,M,S0);
  FOR I:=1 TO M DO
    BEGIN
      READLN(DATOS,X[I],Y[I]);
      X[I]:=X[I]/60; {PARA PASAR LOS TIEMPOS A HORAS}
    END;
  CLOSE(DATOS);
END;
```

```
FUNCTION POT(BASE:REAL;EXPONENTE:BYTE):REAL;
```

```

BEGIN
  IF BASE=0 THEN POT:=0 ELSE POT:= EXP(EXPONENTE*LN(BASE))
END;

PROCEDURE CREAR_INTERVALOS(N:BYTE;G,DXT,XINICIAL:REAL;VAR DX,XI:VECTOR);
VAR
  DXB,DENOMINADOR:REAL;
BEGIN
  DENOMINADOR:=0;
  FOR I:=1 TO N-1 DO
    DENOMINADOR:= DENOMINADOR + POT(G,I-1);
  DXB:= DXT/DENOMINADOR;
  XI[1]:=XINICIAL;
  FOR I:=1 TO N-1 DO
    BEGIN
      DX[I]:=DXB*POT(G,I-1);
      XI[I+1]:=XI[I] + DX[I]
    END;
  XI[N]:=X[M];
END;

PROCEDURE CREAR_INTERVALOS2(N:BYTE;G,DXT,XINICIAL:REAL;VAR DX,XI:VECTOR);
VAR
  DXB1,DXB2,DENOMINADOR1,DENOMINADOR2:REAL;
  N1,N2:BYTE;
BEGIN
  IF ODD(N) THEN
    BEGIN
      N1:=(N-1) DIV 2;
      N2:=N1
    END
  ELSE
    BEGIN
      N1:=(N-2) DIV 2;
      N2:=N1+1
    END;
  DENOMINADOR1:=0;
  FOR I:=1 TO N1 DO
    DENOMINADOR1:= DENOMINADOR1 + POT(G,I-1);
  DXB1:= DXT/(2*DENOMINADOR1);
  XI[1]:=XINICIAL;
  FOR I:=1 TO N1 DO
    BEGIN
      DX[I]:=DXB1*POT(G,N1-I);
      XI[I+1]:=XI[I] + DX[I]
    END;
  DENOMINADOR2:=0;
  FOR I:=1 TO N2 DO

```

```

DENOMINADOR2:= DENOMINADOR2 + POT(G,I-1);
DXB2:= DXT/(2*DENOMINADOR2);
FOR I:=1 TO N2 DO
BEGIN
  DX[N1+I]:=DXB2*POT(G,I-1);
  XI[N1+I+1]:=XI[N1+I] + DX[N1+I]
END;
XI[N]:=X[M];
END;

```

```

PROCEDURE CALCULO_SUMATORIOS (N,M:BYTE;X,Y:VECTORN;DX,XI:VECTORN;
VAR SX:MATRIZSX;VAR SYX:MATRIZSYX);
VAR
J,P:BYTE;
U:REAL;
BEGIN
  FOR J:=1 TO N-1 DO
  BEGIN
    FOR P:=0 TO 6 DO
      SX[J,P]:=0.;
    FOR P:=0 TO 3 DO
      SYX[J,P]:=0.
    END;
    SX[1,0]:=1;
    SYX[1,0]:=Y[1];
    I:=1;
    FOR J:=1 TO N-1 DO
    BEGIN
      WHILE (I<=M) AND (X[I]<=XI[J+1]) DO
      BEGIN
        U:= (X[I]-XI[J])/DX[J];
        FOR P:=0 TO 6 DO
          SX[J,P]:= SX[J,P] + POT(U,P);
        FOR P:=0 TO 3 DO
          SYX[J,P]:=SYX[J,P] +Y[I]*POT(U,P);
        I:=I+1;
      END
    END
  END;
END;

```

```

PROCEDURE MATRIZ_COEFICIENTES(N:BYTE;DX:VECTORN;SX:MATRIZSX;SYX:MATRIZSYX;
VAR B:MATRIZB);
BEGIN
  FOR F:= 1 TO 3*N-2 DO
  FOR I:=1 TO 3*N-1 DO
    B[F,I]:= 0;
  B[1,1]:=POT(DX[1],4)*(4*SX[1,2]-12*SX[1,3]+13*SX[1,4]-6*SX[1,5]+SX[1,6])/6;
  B[1,2]:=POT(DX[1],4)*(2*SX[1,2]-3*SX[1,3]-SX[1,4]+3*SX[1,5]-SX[1,6])/6;
  B[1,N+1]:=POT(DX[1],2)*(-2*SX[1,1]+5*SX[1,2]-4*SX[1,3]+SX[1,4]);

```

```

B[1,N+2]:=POT(DX[1],2)*(-2*SX[1,2]+3*SX[1,3]-SX[1,4]);
B[1,2*N+1]:=DX[1]/2;
B[1,3*N-1]:=POT(DX[1],2)*(-2*SYX[1,1]+3*SYX[1,2]-SYX[1,3]);
FOR F:=2 TO N-1 DO
BEGIN
  B[F,F-1]:=POT(DX[F-1],4)*(2*SX[F-1,2]-3*SX[F-1,3]-SX[F-1,4]+3*SX[F-1,5]
    -SX[F-1,6])/6;
  B[F,F]:=POT(DX[F-1],4)*(SX[F-1,2]-2*SX[F-1,4]+SX[F-1,6])/6 +
    POT(DX[F],4)*(4*SX[F,2]-12*SX[F,3]+13*SX[F,4]-6*SX[F,5]+SX[F,6])/6;
  B[F,F+1]:=POT(DX[F],4)*(2*SX[F,2]-3*SX[F,3]-SX[F,4]+3*SX[F,5]-SX[F,6])/6;
  B[F,F+N-1]:=POT(DX[F-1],2)*(-SX[F-1,1]+SX[F-1,2]+SX[F-1,3]-SX[F-1,4]);
  B[F,F+N]:=POT(DX[F-1],2)*(-SX[F-1,2]+SX[F-1,4])+
    POT(DX[F],2)*(-2*SX[F,1]+5*SX[F,2]-4*SX[F,3]+SX[F,4]);
  B[F,F+N+1]:=POT(DX[F],2)*(-2*SX[F,2]+3*SX[F,3]-SX[F,4]);
  B[F,3*N-1]:=POT(DX[F-1],2)*(-SYX[F-1,1]+SYX[F-1,3])+
    POT(DX[F],2)*(-2*SYX[F,1]+3*SYX[F,2]-SYX[F,3]);
END;
B[2,2*N+1]:=DX[1]+DX[2];
B[2,2*N+2]:=DX[2]/2;
FOR F:=3 TO N-2 DO
BEGIN
  B[F,F+2*N-2]:=DX[F-1]/2;
  B[F,F+2*N-1]:=DX[F-1]+DX[F];
  B[F,F+2*N]:=DX[F]/2;
END;
B[N-1,3*N-3]:=DX[N-2]/2;
B[N-1,3*N-2]:=DX[N-2]+DX[N-1];
B[N,N-1]:=POT(DX[N-1],4)*(2*SX[N-1,2]-3*SX[N-1,3]-SX[N-1,4]+3*SX[N-1,5]
  -SX[N-1,6])/6;
B[N,N]:=POT(DX[N-1],4)*(SX[N-1,2]-2*SX[N-1,4]+SX[N-1,6])/6;
B[N,2*N-1]:=POT(DX[N-1],2)*(-SX[N-1,1]+SX[N-1,2]+SX[N-1,3]-SX[N-1,4]);
B[N,2*N]:=POT(DX[N-1],2)*(-SX[N-1,2]+SX[N-1,4]);
B[N,3*N-2]:=DX[N-1]/2;
B[N,3*N-1]:=POT(DX[N-1],2)*(-SYX[N-1,1]+SYX[N-1,3]);
B[N+1,1]:=POT(DX[1],2)*(-2*SX[1,1]+5*SX[1,2]-4*SX[1,3]+SX[1,4])/6;
B[N+1,2]:=POT(DX[1],2)*(-SX[1,1]+SX[1,2]+SX[1,3]-SX[1,4])/6;
B[N+1,N+1]:=SX[1,0]-2*SX[1,1]+SX[1,2];
B[N+1,N+2]:=SX[1,1]-SX[1,2];
B[N+1,2*N+1]:=-1/(DX[1]*2);
B[N+1,3*N-1]:=SYX[1,0]-SYX[1,1];
FOR F:=2 TO N-1 DO
BEGIN
  B[N+F,F-1]:=POT(DX[F-1],2)*(-2*SX[F-1,2]+3*SX[F-1,3]-SX[F-1,4])/6;
  B[N+F,F]:=POT(DX[F-1],2)*(-SX[F-1,2]+SX[F-1,4])/6 +
    POT(DX[F],2)*(-2*SX[F,1]+5*SX[F,2]-4*SX[F,3]+SX[F,4])/6;
  B[N+F,F+1]:=POT(DX[F],2)*(-SX[F,1]+SX[F,2]+SX[F,3]-SX[F,4])/6;
  B[N+F,F+N-1]:=SX[F-1,1]-SX[F-1,2];
  B[N+F,F+N]:=SX[F-1,2]+SX[F,0]-2*SX[F,1]+SX[F,2];
  B[N+F,F+N+1]:=SX[F,1]-SX[F,2];
  B[N+F,3*N-1]:=SYX[F-1,1]+SYX[F,0]-SYX[F,1];

```

```

END;
B[N+2,2*N+1]:=1/(2*DX[1])+1/(2*DX[2]);
B[N+2,2*N+2]:=-1/(DX[2]*2);
FOR F:=3 TO N-2 DO
BEGIN
  B[N+F,F+2*N-2]:=-1/(DX[F-1]*2);
  B[N+F,F+2*N-1]:=1/(2*DX[F-1])+1/(2*DX[F]);
  B[N+F,F+2*N]:=-1/(DX[F]*2);
END;
B[2*N-1,3*N-3]:=-1/(DX[N-2]*2);
B[2*N-1,3*N-2]:=1/(2*DX[N-2])+1/(2*DX[N-1]);
B[2*N,N-1]:=POT(DX[N-1],2)*(-2*SX[N-1,2]+3*SX[N-1,3]-SX[N-1,4])/6;
B[2*N,N]:=POT(DX[N-1],2)*(-SX[N-1,2]+SX[N-1,4])/6 ;
B[2*N,2*N-1]:=SX[N-1,1]-SX[N-1,2];
B[2*N,2*N]:=SX[N-1,2];
B[2*N,3*N-2]:=-1/(DX[N-1]*2);
B[2*N,3*N-1]:=SYX[N-1,1];
FOR F:=1 TO N-2 DO
BEGIN
  B[2*N+F,F]:=DX[F]/6;
  B[2*N+F,F+1]:=(DX[F]+DX[F+1])/3;
  B[2*N+F,F+2]:=DX[F+1]/6;
  B[2*N+F,N+F]:=-1/DX[F];
  B[2*N+F,N+F+1]:=1/DX[F]+1/DX[F+1];
  B[2*N+F,N+F+2]:=-1/DX[F+1];
END;
END;

PROCEDURE BUSCA_PIVOT_MAXIMO(B:MATRIZB;NE,E:BYTE;VAR FM,CM:BYTE;
VAR BMAX:REAL);
BEGIN
  BMAX:=ABS(B[E,E]);FM:=E;CM:=E;
  FOR F:=E TO NE DO
  FOR I:=E TO NE DO
  BEGIN
    IF ABS(B[F,I])>BMAX THEN
    BEGIN
      BMAX:=ABS(B[F,I]);FM:=F;CM:=I
    END
  END
END;

PROCEDURE CAMBIA_PIVOT_MAXIMO(NE,E,FM,CM:BYTE;VAR JB:VECTORB;VAR B:MATRIZB);
VAR
  AUXX:BYTE;
  AUXB:REAL;
BEGIN
  IF FM<>E THEN
  BEGIN

```

```

FOR I:=E TO NE+1 DO
  BEGIN
    AUXB:=B[E,I];B[E,I]:=B[FM,I];B[FM,I]:=AUXB
  END
END;
IF CM<>E THEN
  BEGIN
    AUXX:=JB[CM];JB[CM]:=JB[E];JB[E]:=AUXX;
    FOR F:=1 TO NE DO
      BEGIN
        AUXB:=B[F,E];B[F,E]:=B[F,CM];B[F,CM]:=AUXB
      END
    END
  END;

PROCEDURE REDUCCION_GAUSS_JORDAN(NE,E:BYTE;VAR B:MATRIZB);
VAR
  DIVISOR,POR:REAL;
BEGIN
  DIVISOR:=B[E,E];
  FOR I:=E TO NE+1 DO
    B[E,I]:=B[E,I]/DIVISOR;
  FOR F:=1 TO NE DO
    BEGIN
      IF F<>E THEN
        BEGIN
          POR:=B[F,E];
          FOR I:=E TO NE+1 DO
            B[F,I]:=B[F,I]-B[E,I]*POR
          END
        END
    END
  END;

PROCEDURE GAUSS_JORDAN(NE:BYTE;VAR B:MATRIZB;VAR SOLUCION:VECTORR);
BEGIN
  FOR I:=1 TO NE DO
    JB[I]:=I;
  FOR E:=1 TO NE DO
    BEGIN
      BUSCA_PIVOT_MAXIMO(B,NE,E,FM,CM,BMAX);
      IF (BMAX<PRECISION) THEN
        BEGIN
          WRITELN('SISTEMA INDETERMINADO');
          HALT;
        END;
      CAMBIA_PIVOT_MAXIMO(NE,E,FM,CM,JB,B);
      REDUCCION_GAUSS_JORDAN(NE,E,B);
    END;
  FOR I:=1 TO NE DO
    SOLUCION[JB[I]]:=B[I,NE+1];

```


END;

PROCEDURE POLINOMIOS (N:BYTE;DX,XI:VECTORN;SOLUCION:VECTORR;
VAR C,YK,A0,A1,A2,A3:VECTORN);

BEGIN

FOR I:=1 TO N DO

C[I]:=SOLUCION[I];

FOR I:=N+1 TO 2*N DO

YK[I-N]:=SOLUCION[I];

FOR I:=1 TO N-1 DO

BEGIN

A0[I]:=YK[I];

A1[I]:=YK[I+1]-YK[I]-DX[I]*DX[I]*(C[I]/3+C[I+1]/6);

A2[I]:=C[I]*DX[I]*DX[I]/2;

A3[I]:=C[I+1]-C[I]*DX[I]*DX[I]/6;

END;

END;

PROCEDURE CALIDAD_AJUSTE (M,N:BYTE;FACTOR:REAL;DX,XI,A0,A1,A2,A3:VECTORN;X,Y:VECTORM;
VAR SSR,SVP,SST:REAL;VAR CAL,DCAL:VECTORM);

VAR

INTP,U:REAL;

BEGIN

SSR:=0;

SVP:=0;

SST:=0;

I:=1;

FOR J:=1 TO N-1 DO

BEGIN

INTP:=4*(A2[J]*A2[J]+3*A2[J]*A3[J]+3*A3[J]*A3[J])/POT(DX[J],3);

SVP:=SVP+INTP;

WHILE (I<=M) AND (X[I]<=XI[J+1]) DO

BEGIN

U:=(X[I]-XI[J])/DX[J];

CAL[I]:=A0[J]+A1[J]*U+A2[J]*U*U+A3[J]*POT(U,3);

DCAL[I]:=A1[J]+2*A2[J]*U+3*A3[J]*SQR(U))/DX[J];

SSR:=SSR+SQR(Y[I]-CAL[I]);

I:=I+1;

END;

END;

SST:=SSR+FACTOR*SVP;

END;

BEGIN

CLRSCR;

WRITELN('INTRODUCIR NOMBRE DEL FICHERO DE DATOS');

READLN(NOMBRE_FICHERO);

LEER_DATOS(NOMBRE_FICHERO,M,E0,S0,PM,v,x,y,z);

WRITELN('INTRODUCIR FACTOR CALIDAD AJUSTE');

```

READLN(FACTOR);
REPEAT
  WRITELN('INTRODUCIR NUMERO DE NODOS Y RAZON SERIE GEOMETRICA');
  READLN(N,G);
  DXT:=X[M]-X[1];
  XINICIAL:=X[1];
  CREAR_INTERVALOS(N,G,DXT,XINICIAL,DX,XI);
  CALCULO_SUMATORIOS(N,M,X,Y,DX,XI, SX,SYX);
  MATRIZ_COEFICIENTES(N,DX,SX,SYX,B);
  GAUSS_JORDAN(3*N-2,B,SOLUCION);
  POLINOMIOS(N,DX,XI,SOLUCION,C,YK,A0,A1,A2,A3);
  CALIDAD_AJUSTE(M,N,FACTOR,DX,XI,A0,A1,A2,A3,X,Y,SSR,SVP,SST,YCAL,DYCAL);
  CLRSCR;
  WRITELN('      N = ',N:1,'          G = ',G:5:3,
'      FACTOR DE PESO = ',FACTOR:5:2);
  WRITELN('      SSR = ',SSR:12,'      SVP = ',SVP:12,
'      SST = ',SST:12);
  WRITELN;
  WRITELN('      XI          YK          C');
  WRITELN('      _____          _____          _____');
  FOR I:=1 TO N DO
  WRITELN(XI[I]:15:3,YK[I]:18:3,'      ',C[I]:12);
  WRITELN('      A0          A1          A2          A3');
  WRITELN('      _____          _____          _____          _____');
  FOR I:=1 TO N-1 DO
  WRITELN(A0[I]:15:4,A1[I]:18:4,A2[I]:18:4,A3[I]:18:4);
  WRITE('GUARDAR EN FICHERO (Y/N)');
  READLN(CONT);
  IF (CONT='Y') OR (CONT='y') THEN
    BEGIN
      WRITELN('INTRODUCIR NOMBRE DEL FICHERO DE SALIDA');
      READLN(FICHERO_SALIDA);
      ASSIGN(SALIDA,FICHERO_SALIDA);
      REWRITE(SALIDA);
      WRITELN(SALIDA, 'SSR = ',SSR:15,'SVP = ',SVP:15);
      WRITELN(SALIDA,
'      TIEMPO  ENTRADA CALC.  DERIVADA ENT.  ENTRADA EXP. ');
      FOR I:=1 TO M DO
        WRITELN(SALIDA,X[I]:10:2,YCAL[I]:15:10,DYCAL[I]:15:10,Y[I]:15:10);
      CLOSE(SALIDA);
    END;
  WRITE('CONTINUAR (Y/N)');
  READLN(CONT);
  UNTIL (CONT='N') OR (CONT='n');
END.

```

8.4 Cálculo del factor de efectividad.

El programa para calcular el factor de efectividad de una partícula esférica porosa, por integración numérica mediante el algoritmo de Runge-Kutta de 4º orden de la ecuación de continuidad en coordenadas esféricas, se ha planteado para una ecuación cinética de la forma:

$$v_r = \frac{v_m C}{K_m + C}, \quad \text{mol/m}^3 \text{ de partículas} \quad [8.21]$$

siendo la ecuación de continuidad:

$$\frac{1}{r^2} \left(\frac{d}{dr} \left(r^2 D_e \left(\frac{dC}{dr} \right) \right) \right) - v_r = 0 \quad [8.22]$$

sometida a las condiciones límites

$$(C)_R = C_s \quad ; \quad \left(\frac{dC}{dr} \right)_0 = 0 \quad [8.23]$$

que en coordenadas adimensionales:

$$\begin{aligned} x &= \frac{C}{C_s} \quad ; \quad z = \frac{r}{R} \\ dC &= C_s dx \quad ; \quad dr = R dz \end{aligned} \quad [8.24]$$

resulta ser

$$\frac{1}{z^2} \left(\frac{d}{dz} \left(z^2 \frac{dx}{dz} \right) \right) + \frac{(R^2/D_e) (v_m/K_m) x}{1 + (C_s/K_m) x} = 0 \quad [8.25]$$

con la condición límite

$$(x)_1 = 1 \quad ; \quad \left(\frac{dx}{dz} \right)_0 = 0 \quad [8.26]$$

Introduciendo el módulo de Thiele para primer orden

$$m_1 = \frac{R}{3} \sqrt{\frac{V_m}{K_m D_e}} \quad [8.27]$$

y llamando $BETA = C_s/K_m$ y reduciendo la ecuación diferencial de 2º orden a dos de 1º orden, el sistema queda en la forma:

$$\frac{dx}{dz} = Y$$

$$\frac{dY}{dz} = -\frac{2Y}{z} + \frac{(9m_1^2)x}{1+BETA X} \quad [8.28]$$

PARA $Z = 0$: $Y = 0$
 PARA $Z = 1$: $X = 1$

Para la resolución del sistema es necesario suponer x_0 hasta que x_1 coincida con 1, en cuyo caso se evalúa

$$(Y)_1 = \left(\frac{dx}{dz} \right)_1 \quad [8.29]$$

El programa, para valores de m_1 y BETA dados, calcula el factor de efectividad que incluye también la desviación cinética de una reacción de primer orden a partir de

$$FACTOR = \frac{R_{FG}}{R_{FG}^* \text{ (para cinética de 1º orden)}} \quad [8.30]$$

donde R_{FG} representa los moles transformados en la partícula por unidad de tiempo, evaluándolos como los que penetran por su superficie externa

$$R_{FG} = 4 \pi R^2 D_e \left(\frac{dC}{dr} \right)_1 \quad [8.31]$$

y R_{FG}^* los moles transformados si toda la partícula estuviera sometida a las concentraciones existentes en la superficie externa, siendo su valor

$$R_{FG}^* = \frac{4}{3} \pi R^3 \frac{V_m C_s}{K_m} \quad [8.32]$$

por lo que el factor de efectividad, introduciendo las coordenadas x y z y el módulo de Thiele m_1 , resulta ser

$$\text{FACTOR} = \frac{1}{3 m_1^2} \left(\frac{dx}{dz} \right)_1 = \frac{1}{3 m_1^2} Y_1 \quad [8.33]$$

también calcula el programa el módulo de Thiele para una cinética de primer orden y orden cero

$$F_1 = \frac{1}{m_1} \left(\frac{1}{\text{tgh } \frac{1}{3 m_1}} - \frac{1}{3 m_1} \right) \quad [8.34]$$

$$F_0 = 1 - \left(1 - \frac{\frac{2}{3} C_s}{K_m m_1^2} \right)^{3/2} \quad [9.5]$$

Definiendo el factor de efectividad

$$\text{FACTOR} = \frac{V_{\text{observada}}}{V_{\text{superficie}}} = \frac{\text{FACTOR} \left(\frac{V_m}{K_m} C_s \right)}{\frac{m_1^2 9 D_e}{R^2} C_s} \quad [8.36]$$

donde se ha introducido el parámetro V_m/K_m en función del módulo de Thiele

$$\frac{V_m}{K_m} = \frac{m_1^2 9 D_e}{R^2} \quad [8.37]$$

donde el parámetro $\text{FACTOR } m_1^2$ se conoce con el nombre de módulo de Thiele basado en observables:

$$\text{FACTOR } m_1^2 = M \quad [8.38]$$

Puesto que para un m_1 dado cualquier valor de BETA disminuye la velocidad de reacción como primer valor de x_0 se utiliza el correspondiente a la reacción de 1^{er} orden:

$$x_0 = \frac{3 m_1}{\sinh(3 m_1)} \quad [8.39]$$

que será más pequeño que el real. Los siguientes valores se seleccionan multiplicando el anterior por $(1 + \text{BETA})$, hasta que se dispone de dos valores almacenados uno más pequeño y otro más grande que la solución. A partir de este momento se emplea el método de la regla falsi, pero a través de los logaritmos, cuya relación es mucho más lineal y la convergencia mucho más rápida:

$$\ln x_0 = \ln x_{0\text{MIN}} + \frac{\ln x_{0\text{MAX}} - \ln x_{0\text{MIN}}}{\ln x_{f\text{MAX}} - \ln x_{f\text{MIN}}} \cdot (\ln x_s - \ln x_{f\text{MIN}}) \quad [8.40]$$

La convergencia del método se facilita y el tiempo de cálculo se reduce muy apreciablemente si en las proximidades del centro de la partícula se tiene en cuenta que para cualquier cinética, la ecuación de continuidad se puede poner como:

$$\frac{d^2C}{dr^2} + \frac{2}{r} \cdot \frac{dC}{dr} - \left(\frac{v_r}{D_e} \right) = 0 \quad [8.41]$$

Puesto que en el centro de la partícula dC/dr y r son ceros, el segundo término de la ecuación anterior queda indeterminado, aplicando la regla de L'Hôpital

$$\frac{d^2C}{dr^2} + 2 \cdot \frac{d^2C}{dr^2} - \left(\frac{v_r}{D_e} \right) = 0 \quad [8.42]$$

es decir, que en las proximidades del origen

$$\frac{d^2C}{dr^2} = \frac{v_r}{3 D_e} \quad [8.43]$$

El programa realizado en Pascal se presenta a continuación, y el organigrama del mismo en la Figura 8.4.

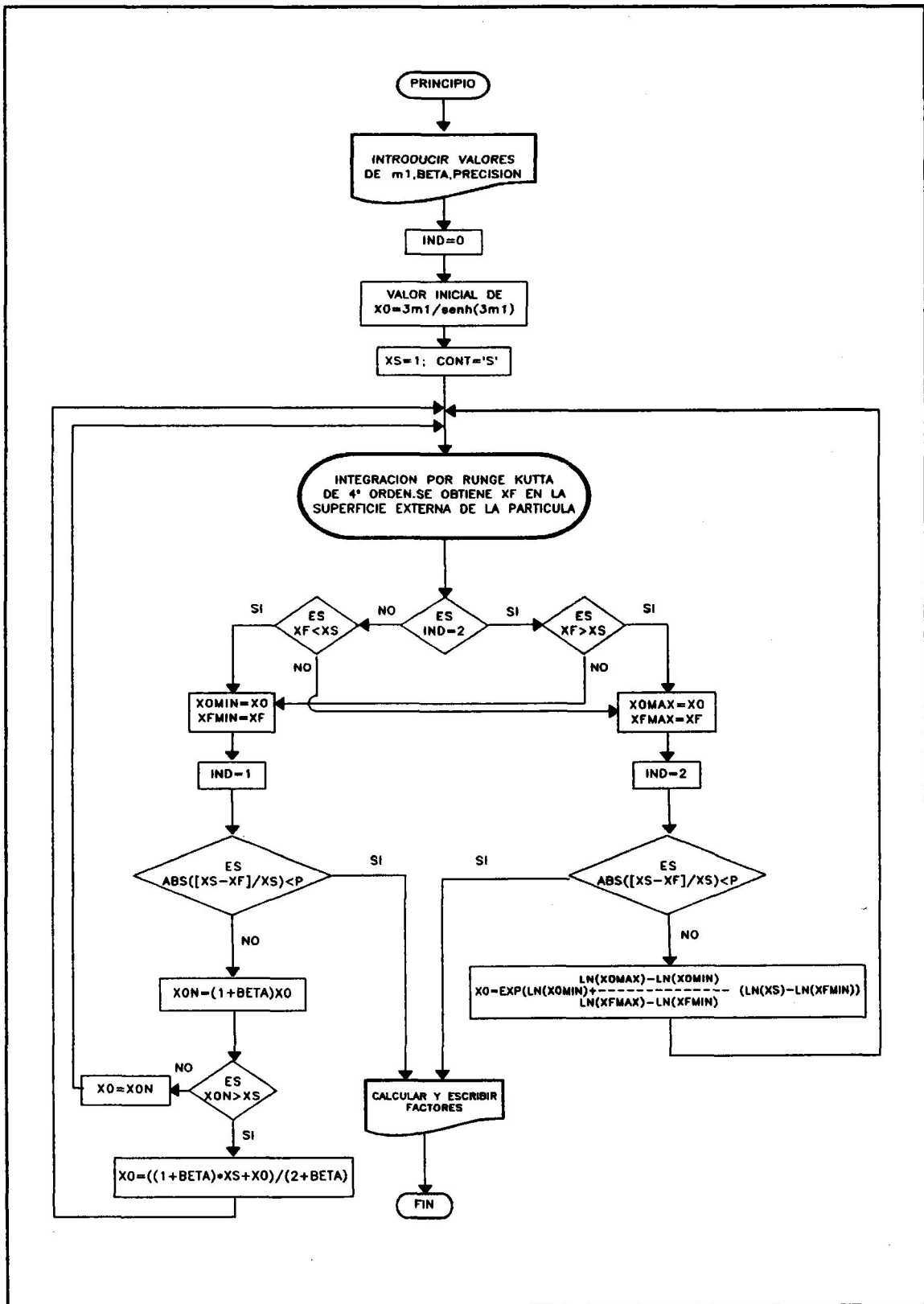


Figura 8.4. Organigrama para el cálculo del factor de efectividad.

```

PROGRAM TRANSPORTE_INTERNO_ESFERA;

USES CRT,PRINTER;

CONST
P=0.00001;

TYPE
FICHERO=STRING[12];
REAL-EXTENDED;
VECTOR=ARRAY[1..20] OF REAL;

VAR
IND,I,J:BYTE;
m1,BETA,XS,XO,XON,FACTOR,F1,F0,M,XF,YF,XOMAX,XOMIN,XFMAX,XFMIN:REAL;
CONT:CHAR;
NOMBRE_FICHERO:FICHERO;
RESULTADOS:TEXT;
BET,MET:VECTOR;

FUNCTION F12(Z,X,Y:REAL):REAL;
{SEGUNDO MIEMBRO DE LA PRIMERA ECUACION DIFERENCIAL}
BEGIN
  F12:=Y;
END;

FUNCTION F22(Z,X,Y:REAL):REAL;
{SEGUNDO MIEMBRO DE LA SEGUNDA ECUACION DIFERENCIAL}
BEGIN
  IF (Z<0.00001) THEN F22:=((3*SQR(m1)*X)/(1+BETA*X)) ELSE
  F22:=((9*SQR(m1)*X)/(1+BETA*X))-2*Y/Z;
END;

PROCEDURE RK42_ETAPA(DZ:REAL;VAR ZV,XV,YV:REAL);
VAR
Z,X,Y,LX0,LX1,LX2,LX3,LY0,LY1,LY2,LY3:REAL;
BEGIN
  Z:=ZV;X:=XV;Y:=YV;
  LX0:=DZ*F12(Z,X,Y);LY0:=DZ*F22(Z,X,Y);
  Z:=ZV+DZ/2;X:=XV+LX0/2;Y:=YV+LY0/2;
  LX1:=DZ*F12(Z,X,Y);LY1:=DZ*F22(Z,X,Y);
  Z:=ZV+DZ/2;X:=XV+LX1/2;Y:=YV+LY1/2;
  LX2:=DZ*F12(Z,X,Y);LY2:=DZ*F22(Z,X,Y);
  Z:=ZV+DZ;X:=XV+LX2;Y:=YV+LY2;
  LX3:=DZ*F12(Z,X,Y);LY3:=DZ*F22(Z,X,Y);
  ZV:=ZV+DZ;
  XV:=XV+(LX0+2*LX1+2*LX2+LX3)/6;
  YV:=YV+(LY0+2*LY1+2*LY2+LY3)/6;
END;

```



```

PROCEDURE RUNGEKUTTA42
(X0,XS:REAL;VAR XF,YF:REAL);
VAR
PRIMERO,CORRECTO:BOOLEAN;
DZ,ZV,XV,YV,XU,EX,EY:REAL;
BEGIN
DZ:=0.001;PRIMERO:=TRUE;CORRECTO:=FALSE;
WHILE CORRECTO=FALSE DO
BEGIN
ZV:=0.;XV:=X0;YV:=0.;XU:=XV;
WHILE ZV<=1 DO
BEGIN
RK42_ETAPA(DZ,ZV,XV,YV);
IF PRIMERO=TRUE THEN
BEGIN
IF (XV<XU) OR (YV<0) THEN
BEGIN
DZ:=DZ/2;ZV:=0.;XV:=X0;YV:=0.;
END
END
END;
IF PRIMERO=FALSE THEN
BEGIN
EX:=ABS((XF-XV)/XF);EY:=ABS((YF-YV)/YF);
XF:=XV;YF:=YV;
IF (EX<P) AND (EY<P)
THEN CORRECTO:=TRUE ELSE DZ:=DZ/2
END
ELSE
BEGIN
PRIMERO:=FALSE;XF:=XV;YF:=YV;
DZ:=DZ/2
END
END
END;
END;

PROCEDURE ESCRIBIR_RESULTADOS
(NOMBRE_FICHERO:FICHERO;m1,BETA,FACTOR,F1,F0,M,X0,YF:REAL);
BEGIN
ASSIGN(RESULTADOS,NOMBRE_FICHERO);
APPEND(RESULTADOS);
Writeln(RESULTADOS,m1:14:2,' ',BETA:14:2,' ',FACTOR:14,' ',F1:14,' ',F0:14,' ',M:14,' ',X0:14,' ',YF:14);
CLOSE(RESULTADOS);
END;

BEGIN
CLRSCR;

MET[1]:=0.01;MET[2]:=0.05;MET[3]:=0.10;MET[4]:=0.50;MET[5]:=1.00;

```

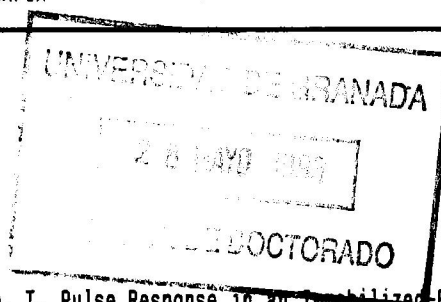
```

MET[6]:=2.00;MET[7]:=5.00;MET[8]:=10.00;MET[9]:=50.00;MET[10]:=100.00;
BET[1]:=0.01;BET[2]:=0.05;BET[3]:=0.10;BET[4]:=0.50;BET[5]:=1.00;
BET[6]:=2.00;BET[7]:=5.00;BET[8]:=10.00;BET[9]:=50.00;BET[10]:=100.00;
FOR J:=1 TO 10 DO {MODIFICAR ESTOS CICLOS PARA OTROS VALORES}
BEGIN
  m1:=MET[J];
  FOR I:=1 TO 10 DO {MODIFICAR ESTOS CICLOS PARA OTROS VALORES}
  BEGIN
    BETA:=BET[I];
    IND:=0;CONT:='S';XS:=1;
    XO:=(6*m1)/(EXP(3*m1)-EXP(-3*m1));
    WRITELN(' XO = ',XO:12);
    REPEAT
      RUNGEKUTTA42(XO,XS,XF,YF);
      IF (IND=2) THEN
        WRITELN(' XO = ',XO:14,' XOMAX = ',XOMAX:12,' XOMIN = ',XOMIN:12,' XF = ',XF:8:4)
      ELSE
        WRITELN(' XO = ',XO:12,' XF = ',XF:8:4);
      IF (IND=2) THEN
        BEGIN
          IF (XF>XS) THEN BEGIN XOMAX:=XO;XFMAX:=XF;END;
          IF (XF<XS) THEN BEGIN XOMIN:=XO;XFMIN:=XF;END;
        END;
      IF (IND=0) AND (XF<XS) THEN BEGIN IND:=1;XOMIN:=XO;XFMIN:=XF;END;
      IF (IND=1) THEN
        BEGIN
          IF (XF>XS) THEN BEGIN IND:=2;XOMAX:=XO;XFMAX:=XF;END
          ELSE BEGIN XOMIN:=XO;XFMIN:=XF;END;
        END;
      IF (ABS((XS-XF)/XS)<P) THEN CONT:='N';
      IF (IND<>2) THEN
        BEGIN
          XON:=(1+BETA)*XO;
          IF (XON>XS) THEN XO:=((1+BETA)*XS+XO)/(2+BETA) ELSE XO:=XON;
        END ELSE
          XO:=EXP(LN(XOMIN)+((LN(XOMAX)-LN(XOMIN))/(LN(XFMAX)-LN(XFMIN)))*
            (LN(XS)-LN(XFMIN)));
        UNTIL (CONT='N');
        FACTOR:=YF/(3*SQR(m1));
        F1:=(((EXP(3*m1)+EXP(-3*m1))/(EXP(3*m1)-EXP(-3*m1)))-1/(3*m1))/m1;
        IF ((1-(2/3)*BETA/SQR(m1))<=0) THEN FO:=1/BETA ELSE
          FO:=(1-EXP((3/2)*LN(1-(2/3)*BETA/SQR(m1))))/BETA;
        M:=FACTOR*SQR(m1);
        NOMBRE_FICHERO:='MODELO02.RES';
        ESCRIBIR_RESULTADOS(NOMBRE_FICHERO,m1,BETA,FACTOR,F1,FO,M,XO,YF);
        WRITELN('FACTOR = ',FACTOR:9:6,' F1 = ',F1:9:6,' FO = ',FO:9:6,' XO = ',XO:15);
      END;
    END;
  END.

```

9. BIBLIOGRAFIA





- Adachi, S.; Hashimoto, K.; Kurome, H.; Kamikubo, T. Pulse Response in an Immobilized-Enzyme Column Elution Profiles in Reversible and Consecutive Reactions. *Biotechnol. Bioeng.* 1981, 23, (1961).
- Benaiges, M.D.; Sola, C.; de Mass, C. J. Intrinsic Kinetic Constants of an Immobilized Glucose-Isomerase. *Chem. Tech. Biotechnol.*, 36, 480 (1986).
- Berman, H.W., Rubin, B. H., Carrell, H. y Glusker, J.P. *Journal of Biological Chemistry*, 249, 3983, (1974).
- Bischoff, K.B. *AIChE Journal*, 11, 351 (1965).
- Breen J.J. De Landbouwkundige en Industriële Betekenis van de Aardpeer N.U. Van Markens, Drukkerij Vennootschap, Delft.
- Bucke, C.; *Developments in Sweeteners 1*, pág 43-68. Ed. Hough, c.a.m., Parker, K.J. y VLITOS, A.J., Applied Science Publishers, L.T.D., Londres (1979).
- Buki, K., Szentirmal, A., Tolgyesi, L., Hegyaljai, K.G. y Iia, L. *Patente Húngara*, 12, 415. (1976).
- Chen, K.C.; Suga, K.; Taguchi, H. Effects of Pore and Film Diffusion Resistances and Deactivation of Enzyme on the Overall Reaction Rate of Immobilized Enzyme. *J. Ferment. Technol.* 58, 439 (1980).
- Chen, F.S.; Weng, H.S.; Lai, C.L. The Performance of Immobilized Glucose Isomerase Supported by Shrimp Chitin in Various Types of Reactors. *Biotechnol. Bioeng.* 25, 725 (1983).
- Chen, K.C. and Wu, J.Y. Substrate Protection of Immobilized Glucose Isomerase. *Biotechnol. Bioeng.*, 30, 817 (1987).

- Ching, C.B. and Ho, Y.Y. Isomerization of Glucose to Fructose in a Fluidized Bed Reactor. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 20, 303 (1984).
- Chubey B.B. y Dorrel, D.G. *Can. Inst. Food. Sci. Technol. J.* 10, 331-2 (1977).
- Danno, G. *Agricultural and Biological Chemistry* 35, 997.
- Ducroo, P.; *Ind. Aliment. Agric.*, 99, 401 (1982).
- Dutch Pat. 7,004,989 TO Standard Brands Inc.
- Fink y Rodwell. *Biotechnol. and Bioeng.* 17, 1029 (1975).
- Gondo, S.; Isayama, S.; Kusunoki, K. *J. Chem. Eng. Japan.* 7, 64 (1974).
- Gram, J. and de Bang, M. An Automated Glucose Isomerase Reactor System with Online Flow Injection Analyzers for Monitoring of pH, Glucose and Fructose Concentrations. *Chem. Eng. Sci.* 45(4), 1031 (1990).
- Grueger, A. y Grueger, W.; *Biotechnology*, 6, 423-435. Ed. K. Kieslich. Verlag Chemie (1984).
- Havewala, N.B. and Pitcher, W.H. Immobilized Glucose Isomerase for the Production of High Fructose Syrups. *Enzyme Engineering*. Ed. Pye. E.K. y Wingard, L.B., Jr. Plenum Press, New York. 2, 315 (1974).
- Hogue-Angeletti, R.A. *Journal of Biological Chemistry* 250, 7814. (1975).
- Horecker, B.L. *Methods of Enzymatic Analysis*, 1371, Elsevier Amsterdam (1974).
- Ichimura, M., Hirose, Y., Katsuyara, N. y Yamada, K. *Journal of the Agricultural Chemical Society Japan* 39, 291 (1965).
- Kent, C.A. y Emery, A.N. *Journal of Applied Chemistry and Biotechnology* 23, 689 (1973).

- Kikkert, A.; Vellenga, K.; de Wilt, H.G.J.; Joosten, G.E.H. The Isomerization of D-Glucose into D-Fructose Catalyzed by Whole-cell Immobilized Glucose Isomerase. The Dependence of the Intrinsic Rate of Reaction on Substrate Concentration, pH and Temperature. *Biotechnol. Bioeng.* 23, 1087 (1981).
- Kobayashi, T.; Moo-Young, M. *Can. J. Chem. Eng.*, 50, 162 (1972).
- Kobayashi, T.; Ohmiya, K.; Shimizu, S. Approximate Expression of Effectiveness Factor for Immobilized Enzymes with Michaelis-Menten Kinetics. *J. Ferment. Technol.*, 54, (4), 260, (1976)
- Kolthoff, I.M.; Sandell, E.B.; Meehan, E.J.; Bruckenstein, S. *Análisis Químico Cuantitativo*, Ed. Nigar, 4ª Ed. (1972)
- Krasnobaev, V. and Böeniger, R. Application Possibilities of PAG-Immobilized Enzymes in the Starch Industry. *Chimia*, 29, 123 (1975).
- Lee, Y.Y.; Fratzke, A.R.; Wun, K.; Tsao, G.T. Glucose Isomerase Immobilized on Porous Glass. *Biotechnol. Bioeng.* 18, 389 (1976).
- López Santín, J.; Solà, C. y Lema, J.M.; *Biotechnol. Bioeng.*, 24, 2741 (1982).
- Lloyd, N.E. and Khaleeluddin, K. A Kinetic Comparison of Streptomyces Glucose Isomerase in Free Solution and Adsorbed on DEAE-Cellulose. *Cereal Chem.* 53, 270 (1976).
- Marshall, R. O. y Kooi, E. R. "Enzymatic conversion of D-glucose to D-fructose". *Science* 125, 648 (1957).
- Marshall, R.O. y Kooi, E.R. *Science*, New York 125, 648.
- Mercier, C.; *Ind. Aliment. Agric.*, 99, 10 (1982).
- Mori, T; Tosa, T. y Chibata, I.; *Biochem. Biophys. Acta*, 321, 653 (1973).
- Mousan, P. y Combes, D.; *Biotechnol. Bioeng.*, 26, 347 (1984).

- Mousan, P.; Combes, D. y Alemzadeh, I.; *Biotechnol. Bioeng.*, 26, 658 (1984).
- Nakamura, K.; Kumagai, H.; Yano, T. Performance of a Zig-zag Fluidized Bed as an Immobilized Enzyme Reactor. *Agric. Biol. Chem.* 48 (5), 1131 (1984).
- Natake, M. y Yoshimura, S. *Agricultural Biological Chemistry* 27, 342 (1963).
- Natake, M. *Agricultural Biological Chemistry* 30, 887 (1966).
- P.R. Rony. *J. Am. Chem. Soc.* 94, 8247 (1972).
- Park, S.H.; Lee, S.B.; Ryu, D.Y. Optimization of Operating Temperature for Continuous Glucose Isomerase Reactor System. *Biotechnol. Bioeng.* 23, 1237 (1981).
- Predhome, J.; *Ind. Aliment. Agric.*, 101, 885 (1984).
- Rodríguez, M.L.; Tesis doctoral. Madrid (1991).
- Ryu, D.Y.; Chung, S.H.; Kato, K. Performance of the Continuous Glucose Isomerase Reactor System for the Production of Fructose Syrup. *Biotechnol. Bioeng.* 19, 159 (1977).
- Saini, T. and Vieth, W.R. Reaction Kinetics and Mass Transfer in Glucose Isomerization with Collagen-Immobilized Whole. *J. Appl. Chem. Biotechnol.* 25, 115 (1975).
- Shibata, I.; TSOA, T. y SATO, T.; *Appl. Microbiol.* 27, 878 (1979).
- Slott, S.; Madsen, G. y Norman, B.E.; *Enzyme Engineering*, II, 343-350. Ed. Pye, E.K. y Wingard, L.B., Jr. Plenum Press, New York (1974).
- Sproull, S.D.; Lim, H.C.; Schneider, D.R. A Model for Enzymatic Isomerization of D-Glucose to D-Fructose in a Batch reactor. *Biotechnol. Bioeng.* 18, 633 (1976).

- Straatsma, J.; Vellenga, K.; de Wilt, H.G.J.; Joosten, G.E.H. Isomerization of Glucose to Fructose
2. Optimization of Reaction Conditions in the Production of High Fructose Syrup by
Isomerization of Glucose Catalyzed by a Whole Cell Immobilized Glucose Isomerase Catalyst.
Ind. Eng. Chem. Process Des. Dev. 22, 356 (1983).
- Takasaki, Y. y Tanabe, O. *Agricultural and Biological Chemistry* 28, 740 (1964).
- Takasaki, Y. Kosugi, Y. y Kanbayashi, A. *Fermentation Advances*, 561, (1969).
- Takasaki, Y.; Kosugi, Y.; Kanbayashi. Kinetic and Equilibrium Studies on D-Glucose D-Fructose
Isomerization Catalized by Glucose Isomerase. *Agr. Biol. Chem.* 33, 1527 (1969).
- Thibanet, P.; *Ind. Aliment. Agric.*, 101, 885 (1984).
- Tamura, N. e Ishikawa, M. Continuous Isomerization of Glucose by a Column of Glucose Isomerase.
Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi 14, 539 (1967).
- Tsumira, N. y Sato, T. *Agricultural and Biological Chemistry* 29, 1123 (1965).
- Vallat, I.; Monsan, P. y Riba, J.P.; *Biotechnol. Bioeng.*, 28, 151 (1986).
- Van Keulen, M.A.; Vellenga, K.; Joosten, G.E.H. Kinetics of the Isomerization of D-Glucose into D-
Fructose Catalyzed by Glucose Isomerase Containing *Arthrobacter* cells in Immobilized and
Nonimmobilized Form. *Biotechnol. Bioeng.* 23 1437 (1981).
- Vian Ortuño, A.; *Curso de Introducción a la Química Industrial*, 402, Ed. Alhambra. Madrid (1976).
- Visuri, K. and Klivanov, A.M. Enzymatic Production of High Fructose Corn Syrup (HFCS) Containing
55% Fructose in Aqueous Ethanol. *Biotechnol. Bioeng.* 30, 917 (1987).
- Vos, H.J.; Zomerdijk, M.; Groen, D.J.; Luyben, K.Ch.A.M. Countercurrent Multistage Fluidized Bed
Reactor for Immobilized Biocatalysts: I Modeling and Simulation. *Biotechnol. Bioeng.* 36,
377 (1990).
- Weast, R.C. y Astle, M.J. Editores. *Handbook of Chemistry and Physics*. 61 Ed. (1980).

Werner, W.; Rey, H.G.; Wielinger, H. Properties of a New Chromogen for the Determination of Glucose in Blood According to the GOD/POD Method. *Analyt. Chem.* 252, 224 (1970).

Yamahaka, K. *Agricultural and Biological Chemistry* 27, 265 y 271. (1963).

Yamanaka, K. *Japanese Patent.* 20, 230 (1965).

Zittan, L., Poulsen, P.B. y Hemmingsen, St H. *Dië Stärke* 27, 236 (1975).