



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

Escalado de hidrólisis enzimática de materiales amiláceos a partir de la simulación del proceso aplicando teoría de control

Juan Camilo Acosta Pavas

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Minas, Departamento de Procesos y Energía
Medellín, Colombia
2019

Escalado de hidrólisis enzimática de materiales amiláceos a partir de la simulación del proceso aplicando teoría de control

Juan Camilo Acosta Pavas

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:
Magister en Ingeniería-Ingeniería Química

Director(a):
Ph.D. Ángela Adriana Ruíz Colorado

Línea de Investigación:
Escalado, Modelado y Simulación de Bioprocesos
Grupo de Investigación:
Bioprocesos y Flujos Reactivos (BIOFRUN)

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Minas, Departamento de Procesos y Energía
Medellín, Colombia
2019

Scale up of enzymatic hydrolysis of amylaceous materials from the processes simulation applying control theory

Juan Camilo Acosta Pavas

Thesis work presented as partial requirement for the degree of:
Master of Engineering-Chemical Engineering

Advisor:
Ph.D. ángela Adriana Ruíz Colorado

Investigation line:
Scale Up, Bioprocesses model and simulation
Research Group:
Bioprosos y Flujos Reactivos (BIOFRUN)

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Minas, Departamento de Procesos y Energía
Medellín, Colombia
2019

Agradecimientos

A todo el grupo de investigación, Bioprocesos y Flujos Reactivos, a Laura Alzate, Kelly Betancur, Natally Ospina y al resto de compañeros por su apoyo y conocimiento.

A la docente Ángela Adriana Ruíz Colorado, por todo su apoyo y esfuerzo en la dirección en este trabajo.

A la Universidad Nacional de Colombia por su apoyo a través de la Convocatoria nacional para el apoyo al desarrollo de tesis de posgrado o de trabajos finales de especialidades en el área de la salud, de la universidad nacional de Colombia 2017-2018 y por la beca de exención de derechos académicos otorgada entre los periodos 2016-II y 2018-I.

A la Agencia de Educación Superior de Medellín, Sapiencia, a través del programa Extendiendo Fronteras Educativas.

Productos obtenidos

Presentaciones y Ponencias:

Evento: VI Jornada Técnica- Internacional de ingeniería Química e Ingeniería Biológica (PROCESA)

Título: Aplicación de Herramientas de Teoría de Control al Escaldo de procesos de Hidrólisis Enzimática

Institución: Universidad del Atlántico

Categoría: Ponencia

Reconocimiento: 2° Puesto

Año: 2018

Evento: Curso Internacional Biología Cuantitativa Aplicada al Modelado, Optimización y Escalado de Bioprocesos

Título: Aplicación de Herramientas de Teoría de Control al Escaldo de procesos de Hidrólisis Enzimática

Institución: Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín

Categoría: Ponencia

Año: 2018

Trabajos y Proyectos:

Trabajo: Práctica Académica Especial (PAE)

Título: Hidrólisis enzimática de materiales amiláceos

Estudiante: Laura Alzate Blandón

Director: Ángela Adriana Ruíz Colorado

Año: 2018-I

Trabajo: Práctica Académica Especial (PAE)

Título: Adecuación e implementación de un sistema de control en un reactor por lotes para el proceso de hidrólisis enzimática de materiales amiláceos

Estudiante: Daniel Padierna Vanegas

Director: Juan Camilo Acosta Pavas

Año: 2018-III

Proyecto: Convocatoria nacional para el apoyo al desarrollo de tesis de posgrado o de trabajos finales de especialidades en el área de la salud, de la universidad nacional de Colombia 2017-2018

Título: Escalado de hidrólisis enzimática de materiales amiláceos a partir de la simulación del proceso aplicando teoría de control

Estudiante MSc: Juan Camilo Acosta Pavas

Director: Ángela Adriana Ruíz Colorado

Año: 2018

Artículos Propuestos:

Título: Hidrólisis Enzimática de Almidón de Trigo para la Producción de Jarabes Glucosados

Autores: Acosta Pavas Juan Camilo, Alzate Blandón Laura, Ruiz-Colorado Ángela Adriana

Año: 2019

Título: Aplicación de herramientas de teoría de control al escalado de procesos de hidrólisis enzimática de almidón de trigo

Autores: Acosta Pavas Juan Camilo, Ruiz-Colorado Ángela Adriana

Año: 2019

Resumen

En el presente trabajo se realizó la aplicación de una metodología de escalado fundamentado en el modelado y simulación de procesos, junto con el uso de herramientas de teoría de control, sobre un proceso de hidrólisis enzimática de almidón de trigo, desde un volumen de 3L hasta 4L, centrándose en las etapas de licuefacción y sacarificación. Se caracterizó el material amiláceo, se evaluaron dos métodos de desactivación enzimática mediante temperatura, pH y efectos inhibitorios por producto (glucosa) a condiciones estándar de hidrólisis obtenidas de experimentos previos. Se determinó la actividad enzimática de las enzimas comerciales α -amilasa producida por *Bacillus licheniformis* y amiloglucosidasa comercial producida por *Aspergillus niger*. Luego, se realizó la hidrólisis enzimática a 3L. La etapa de gelatinización del almidón se realizó térmicamente usando rampas de calentamiento a temperaturas entre los 90°C y 95°C durante 15min. La etapa de licuefacción se realizó a una temperatura de 60°C y pH 5,8 en *buffer* de ácido fumárico por un periodo de 2,0h usando la enzima α -amilasa con una relación enzima-sustrato de 0,036 %p/p. La etapa de sacarificación se realizó a una temperatura de 60°C y un pH de 4,3 en *buffer* de ácido fumárico durante un periodo de 6,5h, usando la enzima amiloglucosidasa con una relación enzima-sustrato de 0,18 %p/p. Finalmente se aplicó la metodología de escalado basada en el modelado del proceso, tomando como variables de estado la concentración de glucosa, concentración de maltopentosa, la temperatura del sistema, y como variables de diseño el volumen del reactor, la concentración inicial de enzima y concentración inicial de sustrato. En ambas etapas la dinámica dominante fue la concentración de glucosa, seguida de la concentración de maltopentosa y luego temperatura del sistema, lo que llevó al cambio de las variables de diseño desde la baja escala hasta la alta escala, concentración inicial de sustrato desde 161g/L hasta 180g/L, concentración inicial de enzima en licuefacción desde 0,05mL/L hasta 15,10mL/L y una concentración inicial de enzima en sacarificación desde 0,26mL/L hasta 0,76mL/L. Esto permitió mantener la jerarquía de las dinámicas en la etapa de sacarificación pero no en la etapa de licuefacción, concluyendo para la etapa de licuefacción, proponer otros valores para las variables de diseño o un nuevo conjunto de estas.

Palabras clave: materiales amiláceos, hidrólisis enzimática, escalado de proceso, índice de estado impactable.

Abstract

In the present work, the application of a scale-up methodology based on the modeling and simulation of processes was carried out together with the use of control theory tools on enzymatic hydrolysis of wheat starch scaled from a volume of 3L to 4L, focused in liquefaction and saccharification stages. The amylaceous material was characterized. Two methods of enzymatic deactivation were evaluated, temperature and pH and inhibitory effects by product (glucose). The enzymatic activity of the commercial enzymes α -amylase produced by *Bacillus licheniformis* and amyloglucosidase produced by *Aspergillus niger* were determined. Then, the enzymatic hydrolysis was carried out at 3L. The gelatinization stage of starch was performed thermally using temperature ramps at temperatures between 90°C and 95°C for 15min. The liquefaction stage was carried out at a temperature of 60°C and pH 5,8 in a fumaric acid buffer for a period of 2,0h using the enzyme α -amylase with a substrate enzyme ratio of 0,036 %w/w. The saccharification stage was carried out at a temperature of 60°C and pH 4,3 in a fumaric acid buffer for a period of 6,5h using the enzyme amyloglucosidase with an enzyme-substrate ratio of 0,18 %w/w. Finally, the scale-up methodology was applied, taking as state variables the glucose concentration, maltopentose concentration, the temperature of the system. As design variables the reactor volume, the initial enzyme concentration, and the initial substrate concentration. In both stages the dominant dynamic was the concentration of glucose, followed by the concentration of maltopentose and then the temperature of the system, which led to the change of the design variables from the current scale to the new scale, initial concentration of substrate from 161g/L up to 180g/L, initial concentration of enzyme in liquefaction from 0,05mL/L to 15,10mL/L and an initial concentration of enzyme in saccharification from 0,26mL/L to 0,76mL/L, which allowed to maintain the hierarchy of the dynamics in the saccharification stage but not in the liquefaction stage, concluding for the liquefaction stage the selection of another set of design variables.

Keywords: amylaceous materials, enzymatic hydrolysis, scale up methodology, state impactability index.

Contenido

Agradecimientos	IV
Productos obtenidos	V
Resumen	VII
Lista de tablas	XI
Lista de figuras	XII
1. Introducción	2
1.1. Objetivos	3
1.2. Aportes de la investigación	4
1.3. Esquema de tesis	4
2. Generalidades de los materiales amiláceos	7
2.1. Composición del almidón	7
2.2. Caracterización de materias primas amiláceas	10
2.3. Conclusiones	15
3. Hidrólisis enzimática de materiales amiláceos	16
3.1. Hidrólisis enzimática de almidón	16
3.2. Enzimas implicadas en la hidrólisis de almidón	18
3.2.1. α -amilasa	19
3.2.2. Amiloglucosidasa	21
3.2.3. Otras enzimas	24
3.3. Relaciones enzima-sustrato	25
3.4. Conclusiones	26
4. Modelado, simulación y escalado del proceso de hidrólisis enzimática	28
4.1. Definición de modelo	28
4.2. Modelos de hidrolisis enzimática	30
4.3. Simulación de procesos	34
4.4. Escalado de procesos químicos y bioquímicos	34
4.4.1. Definición de escalado	34

4.4.2.	Problemas del escalado	35
4.4.3.	Principio de similitud	36
4.4.4.	Métodos de escalado de procesos químicos	36
4.4.5.	Métodos de escalado de procesos bioquímicos	42
4.5.	Conclusiones	43
5.	Análisis dinámico de procesos	45
5.1.	Análisis de sistemas de control en el espacio de estados	45
5.1.1.	Controlabilidad de estado	45
5.1.2.	Observabilidad de estado	47
5.2.	Matriz de Hankel	48
5.2.1.	Obtención de la matriz de observabilidad	49
5.2.2.	Obtención de la matriz de controlabilidad	50
5.2.3.	Definición de la matriz de Hankel	51
5.3.	Descomposición en valores singulares (DVS)	52
5.3.1.	DVS en la matriz de Hankel	53
5.3.2.	Efecto dinámico de entradas y salidas	55
5.4.	Punto de operación y régimen de operación	56
5.5.	Conclusiones	58
6.	Metodología de escalado de procesos de hidrólisis enzimática	60
6.1.	Especificar el proceso y la tarea de escalado	60
6.2.	Planteamiento del MSBF del proceso	61
6.3.	Ajuste de parámetros a los datos experimentales	61
6.4.	Formulación de la Matriz de Hankel y DVS	62
6.5.	Construcción de la curva de Jerarquía de las dinámicas	62
6.6.	Ajuste de ecuación para calcular el <i>IEI</i> real	63
6.7.	Determinación de la nueva matriz de Hankel	64
6.8.	Escalado de valores entre BE y AE y Factores de escala	64
6.9.	Conclusiones	65
7.	Escalado del proceso de hidrólisis enzimática de almidón de trigo	66
7.1.	Caracterización de almidón de trigo	66
7.2.	Determinación del contenido de proteína en α -amilasa y amiloglucosidasa	68
7.3.	Determinación de la actividad enzimática de α -amilasa y amiloglucosidasa	69
7.3.1.	Medición de la actividad enzimática de α -amilasa	69
7.3.2.	Medición de la actividad enzimática de amiloglucosidasa	72
7.4.	Cinética de hidrólisis enzimática de almidón de trigo	75
7.4.1.	Condiciones de operación del proceso	76
7.4.2.	Aspectos a tener en cuenta sobre el proceso	77
7.4.3.	Resultados cinética de hidrólisis enzimática de almidón de trigo	79

7.5. Desactivación enzimática	82
7.6. Efectos inhibitorios por producto (glucosa)	84
7.7. Metodología de escalado en la hidrólisis enzimática de almidón de trigo . . .	86
7.7.1. Especificar el proceso y la tarea de escalado	86
7.7.2. Planteamiento del MSBF para el proceso de hidrólisis enzimática . .	87
7.7.3. Ajuste de parámetros a los datos experimentales	96
7.7.4. Formulación de la matriz de Hankel y DVS	108
7.7.5. Construcción de la curva de jerarquía de las dinámicas	112
7.7.6. Ajuste de ecuación para calcular el <i>IEI</i> real	116
7.7.7. Determinación de la nueva matriz de Hankel	123
7.7.8. Escalado con valores entre BE y AE y Factores de escala	125
7.8. Conclusiones	136
8. Conclusiones y recomendaciones	137
A. Anexo: Herramienta para el escalado de procesos aplicando teoría de control	141
B. Anexo: Componentes de la matriz de Hankel	145
Bibliografía	149

Lista de Tablas

2-1. Características de gránulos en materiales amiláceos.	10
2-2. Contenido de almidón en materias primas amiláceas.	11
2-3. Contenido de amilosa y amilopectina en materias primas amiláceas.	12
2-4. Caracterización fisicoquímica de almidones no convencionales.	13
2-5. Composición química de materiales amiláceos en base seca.	14
3-1. Condiciones de operación etapa de licuefacción.	17
3-2. Condiciones de operación etapa de sacarificación.	18
3-3. Relaciones enzima sustrato para α -amilasa.	26
3-4. Relaciones enzima sustrato para AMG.	26
7-1. Comparación de caracterizaciones para almidones.	67
7-2. Cantidad de proteína α -amilasa y AMG.	68
7-3. Cantidad de maltosa liberada respecto al factor de dilución.	71
7-4. Cantidad de glucosa liberada respecto al factor de dilución.	74
7-5. Condiciones para la hidrólisis enzimática de almidón de trigo.	76
7-6. Variables del balance de energía.	89
7-7. Parámetros para el proceso de licuefacción	92
7-8. Parámetros para el proceso de sacarificación	96
7-9. Parámetros estimados para la etapa de licuefacción.	97
7-10. Parámetros estimados etapa de sacarificación.	102
7-11. Determinación de IEI_{real} para la etapa de licuefacción.	117
7-12. Determinación de IEI_{real} para la etapa de sacarificación.	121
7-13. Valores de la variable de diseño S_0 en la AE, etapa de licuefacción.	125
7-14. Valores de la variable de diseño E_{01} en la AE, etapa de licuefacción.	126
7-15. Valores de la variable de diseño E_{02} en la AE, etapa de sacarificación.	127
7-16. Resultados comparativos del escalado de procesos.	130
7-17. Parámetros ajustados en la BE, AE y factores de escala, etapa de licuefacción.	130
7-18. Parámetros ajustados en la BE, AE y factores de escala, etapa de sacarificación.	132

Lista de Figuras

2-1. Estructura de la amilosa.	7
2-2. Estructura de la amilopectina.	8
2-3. Empaquetamiento de las dobles hélices en los gránulos de almidón.	9
3-1. Estructura de la enzima α -amilasa.	20
3-2. Cavidades de la α -amilasa.	20
3-3. Estructura de la amiloglucosidasa.	22
3-4. Cavidades de la Amiloglucosidasa.	23
3-5. Acción de enzimas sobre la amilosa y amilopectina.	25
4-1. Tipos de modelos y su interpretación física	29
4-2. Mecanismos de hidrólisis enzimática de almidones.	32
4-3. Métodos de escalado de procesos químicos.	37
4-4. Métodos de escalado de procesos bioquímicos.	42
5-1. Interpretación de α_{yj} y α_{uk} en un proceso.	56
5-2. Interpretación secuencial de análisis dinámico aplicado al escalado de procesos.	59
6-1. Metodología de escalado de procesos aplicando teoría de control.	63
7-1. Curva de calibración estándar de maltosa.	71
7-2. Concentración de enzima en escala logarítmica respecto a miligramos de maltosa liberados.	72
7-3. Concentración de enzima en escala logarítmica respecto a miligramos de glucosa liberada.	75
7-4. Gelatinización mediante métodos térmicos	77
7-5. Cinética del proceso de hidrólisis enzimática para almidón de trigo, etapa de licuefacción para la BE.	80
7-6. Cinética del proceso de hidrólisis enzimática para almidón de trigo, etapa de sacarificación para la BE.	81
7-7. Desactivación del proceso de hidrólisis enzimática de almidón de trigo.	83
7-8. Análisis de efectos inhibitorios por glucosa.	85
7-9. Diagrama de flujo del proceso de hidrólisis enzimática de almidón de trigo.	87
7-10. Simulación de la etapa de licuefacción en la BE.	97
7-11. Simulación de la etapa de licuefacción en la BE con balance de energía.	98

7-12.Relación de variables de estado en la etapa de licuefacción.	99
7-13.Relación de variables de estado con la temperatura en la etapa de licuefacción.	100
7-14.Interacciones de variables de estado, glucosa, maltosa y maltopentosa en la etapa de licuefacción.	101
7-15.Interacciones de variables de estado, glucosa, maltopentosa y temperatura del reactor en la etapa de licuefacción.	101
7-16.Simulación de la etapa de sacarificación en la BE.	103
7-17.Simulación de la etapa de sacarificación en la BE con balance de energía. . .	104
7-18.Relación de variables de estado en la etapa de sacarificación.	105
7-19.Relación de variables de estado con la temperatura en la etapa de sacarificación.	106
7-20.Interacciones de variables de estado, glucosa, maltosa, maltopentosa en la etapa de sacarificación.	107
7-21.Interacciones de variables de estado, glucosa, maltopentosa y temperatura del reactor en la etapa de sacaificación.	107
7-22. <i>IEI</i> para las variables de estado glucosa, maltopentosa y $T_{reactor}$, etapa de licuefacción en la BE.	112
7-23. <i>IEI</i> diferenciados para las variables de estado glucosa, maltopentosa y $T_{reactor}$ etapa de licuefacción en la BE.	113
7-24. <i>IEI</i> para las variables de estado glucosa, maltopentosa y $T_{reactor}$ etapa de sacarificación en la BE.	114
7-25. <i>IEI</i> diferenciados para las variables de estado glucosa, maltopentosa y $T_{reactor}$ etapa de sacarificación en la BE.	115
7-26. <i>IEI</i> para cada valor de la VdeC para 2h de proceso, etapa de licuefacción en la BE.	116
7-27. <i>IEI</i> para cada valor de la VdeC para 7h de proceso etapa de licuefacción en la BE.	117
7-28. <i>IEI</i> _{Max} para las variables de estado de interés respecto a la VdeC etapa de licuefacción en la BE.	118
7-29.Concentraciones de salida respecto a la VdeC etapa de licuefacción en la BE.	119
7-30. <i>IEI</i> para cada valor de la VdeC para 6.5h de proceso etapa de sacarificación en la BE.	120
7-31. <i>IEI</i> _{Max} para las variables de estado de interés respecto a la VdeC etapa de sacarificación en la BE.	122
7-32.Concentraciones de salida respecto a la VdeC etapa de sacarificación en la BE.	123
7-33.Cinética del proceso de hidrólisis enzimática para almidón de trigo, etapa de licuefacción en la AE.	128
7-34.Cinética del proceso de hidrólisis enzimática para almidón de trigo, etapa de sacarificación en la AE.	129
7-35.Simulación del modelo de hidrólisis enzimática para VdeC 4L con factores de escala, etapa de licuefacción con balance de energía en la AE.	131

7-36. Simulación del modelo de hidrólisis enzimática para VdeC 4L con factores de escala, etapa de sacarificación con balance de energía en la AE.	133
7-37. <i>IEI</i> diferenciados para las variables de estado glucosa, maltopentosa y $T_{reactor}$ etapa de licuefacción en la AE.	134
7-38. <i>IEI</i> diferenciados para las variables de estado glucosa, maltopentosa y $T_{reactor}$ etapa de sacarificación en la AE.	135
A-1. Secuencia de subrutinas para el escalado de procesos usando herramientas de teoría de control.	142
B-1. Submatriz de 1x9 (primer fila de la matriz de Hankel).	145
B-2. Definición de variables sigma para la submatriz de Hankel.	148

1. Introducción

El aprovechamiento de residuos agroindustriales ha sido ampliamente investigado dado su potencial en industrias alimenticias para producción de jarabes glucosados, edulcorantes, aditivos, alcoholes, ácidos orgánicos; en industrias energéticas para la producción de biocombustibles (Kong et al., 2018; Pino et al., 2018) y muchas otras industrias como la cosmética, textilera y papelera (Morales et al., 2008). Se espera que para 2030 la economía con base biológica crezca sustancialmente (Martínez et al., 2019).

Dentro de estos residuos agroindustriales se encuentran los asociados a materiales amiláceos, que hacen parte los cereales como arroz, maíz, trigo, cebada y avena; leguminosas como garbanzos, lentejas, soya, frijol y tubérculos como papa, yuca y ñame (Tovar Benítez, 2008). Todos estos materiales están conformados por almidón, dependiendo de la fuente botánica presenta determinadas cantidades de amilosa y amilopectina. La amilosa se caracteriza por ser un polímero de glucosas unidas por enlaces α -1,4 de manera lineal y la amilopectina por ser un polímero ramificado conformado por glucosas unidas mediante enlaces α -1,4 y α -1,6 (Pandey et al., 2017). Esto lleva al análisis de procesos enzimáticos realizados a escala industrial (Presečki et al., 2012). Este proceso consiste en tres etapas; Etapa de gelatinización, donde se da la hinchazón y la retención de agua por parte del gránulo de almidón hasta la liberación de la amilosa y amilopectina en el seno del fluido (Ruiz Cruz, 2012); Etapa de licuefacción, consiste en el rompimiento de los enlaces α -1,4 de la amilosa y amilopectina mediante la endo-enzima α -amilasa para la formación de oligosacáridos de alto peso molecular (Li et al., 2007). Posteriormente, los oligosacáridos son hidrolizados en la etapa de sacarificación mediante la exo-enzima amiloglucosidasa, la cual ataca tanto enlaces α -1,4 como α -1,6 para la formación de oligosacáridos de menor peso molecular hasta llevarlos finalmente a glucosa (Ruiz Cruz, 2012) como principal producto de valor agregado.

El interés en el trabajo de procesos de hidrólisis enzimática de materiales amiláceos a nivel industrial o su escalado, presenta grandes retos por la complejidad del comportamiento reológico de los materiales amiláceos expuestos a diferentes condiciones de pH, temperatura e interacciones con enzimas en las diferentes etapas, y en la aplicación de una metodología de escalado adecuada que permita obtener resultados satisfactorios. Las metodologías de escalado tradicionales se fundamentan en el principio de similitud (Johnstone and Thring, 1957; Casablancas and Santin, 1998). Aunque han logrado reproducir los comportamientos de una baja escala en una alta escala o viceversa, muchas de ellas no dan información del

comportamiento dinámico del proceso, su reología ni cómo efectos de transferencia de masa, calor y cantidad de movimiento empiezan a tomar mayor importancia con el aumento de escala, lo que finalmente influye sobre la cinética del proceso.

Investigaciones como las realizadas por Ruiz Colorado (2009) y Monsalve Bravo (2014) se han centrado en el uso de nuevas metodologías de escalado fundamentadas en la aplicación de herramientas de teoría de control, analizando la observabilidad y controlabilidad de los sistemas, tomándolo como principio para la construcción de sistemas matriciales (matriz de Hankel) que permiten la formulación de criterios de impacto de dicho sistema sobre las dinámicas involucradas, apoyado en el planteamiento de modelos semifísicos de base fenomenológica (MSBF). Es aquí donde el modelado y la simulación de procesos toma importancia, debido a que se han convertido en herramientas indispensables para la comprensión, representación y aplicación de este tipo de procesos, especialmente si se plantea una estructura fundamentada en su fenomenología. Esto permite adentrarse en una nueva área de interés, el análisis dinámico del proceso de hidrólisis enzimática de materiales amiláceos por medio de herramientas de teoría de control en conjunto con su escalado, buscando una respuesta a los efectos del cambio de escala en el comportamiento dinámico del proceso.

Este trabajo de investigación tiene como objetivo generar avances en la comprensión del escalado de procesos de hidrólisis enzimática de almidón de trigo. Se propone una metodología que parte desde el planteamiento del MSBF como aproximación del proceso, el uso de conceptos como observabilidad, controlabilidad y matrices de Hankel. Esto permitirá para el establecimiento de una jerarquía en las dinámicas involucradas de acuerdo al impacto del proceso sobre estas o lo que se denominará índice de estado impactable. Finalmente se llegara a la generación de factores de escala que permitirán la conversión de las condiciones de proceso entre una baja escala y alta escala.

Este primer capítulo contiene una descripción general de manera introductoria de los conceptos usados en este trabajo. Se resalta que durante todo el trabajo escrito el lector puede encontrar las palabras maltopentosa y maltodextrinas donde ambas representan la misma variable.

1.1. Objetivos

Los objetivos propuestos para esta tesis son:

Objetivo general

Plantear el escalado para la producción de jarabes de glucosa a partir de hidrólisis enzimática de materiales amiláceos aplicando la simulación del proceso y elementos de teoría de control.

Objetivos específicos

1. Proponer un modelo semifísico de base fenomenológica (MSBF) para el proceso de hidrólisis enzimática en la etapa de sacarificación.
2. Realizar el proceso de hidrólisis enzimática para un material amiláceo al volumen de la escala de laboratorio a partir del cual se va a escalar.
3. Realizar escalado de valores de baja escala a alta escala aplicando la metodología de escalado propuesta para la etapa de sacarificación.

1.2. Aportes de la investigación

El principal resultado de esta investigación es la incorporación del ajuste de los modelos propuestos mediante funciones de optimización, el planteamiento de conceptos como el régimen de operación crítico ($RdeO^*$), factores de escala (ξ_i) y máximo índice de estado impactable (IEI_{Max}) a partir de definiciones previas de régimen de operación e índice de estado impactable (IEI). Lo anterior para la generación de criterios para el establecimiento de una jerarquía entre las variables de estado de interés aplicado en procesos *batch* donde el tiempo y el volumen se convierten en criterios determinantes en este proceso.

EL planteamiento de modelos MSBF para las etapas de licuefacción y sacarificación con balances de energía asociados al sistema de reacción y la aplicación de la metodología de escalado en ambas etapas.

Otro de los principales aportes de esta investigación, es una propuesta para la solución secuencial de la metodología de escalado, la cual fue aplicada sobre procesos de hidrólisis enzimática de almidón de trigo, pero puede ser aplicada a otro tipo de procesos, anexo A.

1.3. Esquema de tesis

Para una correcta comprensión del escalado de procesos de hidrólisis enzimática de materiales amiláceos se propone el siguiente esquema:

Capítulo 2. Una revisión de los materiales amiláceos:

- Revisión de la composición de los materiales amiláceos.

- Caracterización de materiales amiláceos.

Capítulo 3. Entendimiento del proceso de hidrólisis enzimática:

- Condiciones del proceso de hidrólisis enzimática de almidón.
- Enzimas implicadas en la hidrólisis enzimática de almidón.
- Relaciones enzima-sustrato en procesos de hidrólisis enzimática.

Capítulo 4. Modelado, simulación y escalado del proceso de hidrólisis enzimática:

- Definición de modelos.
- Modelos de hidrólisis enzimática de materiales amiláceos.
- Definición y problemas del escalado.
- Métodos de escalado de procesos químicos y bioquímicos.

Capítulo 5. Análisis dinámico de procesos:

- Análisis de sistemas de control en el espacio de estados.
- Controlabilidad y observabilidad de estados.
- Matriz de Hankel y su obtención a partir de matrices de observabilidad y controlabilidad.
- Descomposición en valores singulares y su aplicación en la matriz de Hankel.
- Definición de conceptos: punto de operación, régimen de operación y régimen de operación crítico, variable de capacidad, variables de estado y diseño.

Capítulo 6. Metodología de escalado de procesos de hidrólisis enzimática:

- Descripción del proceso y la tarea de escalado.
- Planteamiento del MSBF.
- Ajuste del modelo a los datos experimentales.
- Obtención de las matrices de observabilidad, controlabilidad y matriz de Hankel.
- Cálculo del IEI y régimen de operación.
- Cálculo del IEI_{real} y determinación de la matriz de Hankel en la alta escala.
- Determinación de las variables de diseño para la alta escala y factores de escala.

- Verificación del escalado.

Capítulo 7. Aplicación de conceptos al escalado de procesos de hidrólisis enzimática de materiales amiláceos:

- Desarrollo experimental del proceso de hidrólisis enzimática.
- Aplicación de la metodología de escalado.
- Verificación del escalado.

Capítulo 8. Conclusiones y recomendaciones:

- Conclusiones.
- Limitaciones del trabajo.
- Futuros trabajos.

2. Generalidades de los materiales amiláceos

2.1. Composición del almidón

Los materiales amiláceos están constituidos por almidón, a su vez, este está conformado por polímeros como la amilosa formada por moléculas de D-glucosa formando cadenas lineales extensas unidas por enlaces glucosídicos α -1,4 (Figura 2-1) y amilopectina, polisacárido ramificado soluble en agua que consta de cadenas lineales cortas de 10-60 unidades de glucosa unidas por enlaces α -1,4 y cadenas laterales de 15-45 unidades de glucosa unidas por enlaces α -1,6 a la cadena lineal (Figura 2-2) (Curvelo-Santana et al., 2010; Chung and Liu, 2009; Pandey et al., 2017).

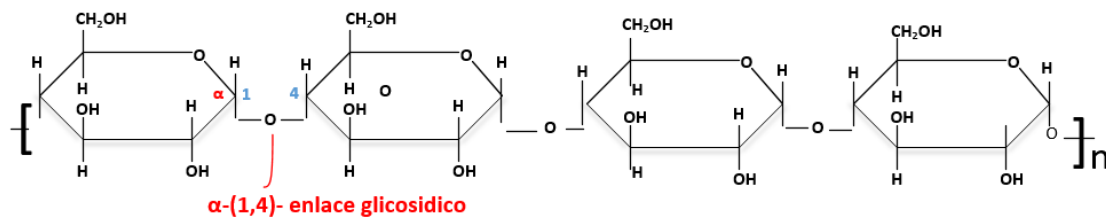


Figura 2-1. Estructura de la amilosa.

El almidón es un polisacárido producido por una gran cantidad de plantas como reserva energética, se almacena intracelularmente en forma de gránulos esféricos de 1-110 μ m de diámetro (Liu et al., 2009; Cinelli, 2012). La proporción de amilosa y amilopectina varía dependiendo del tipo de almidón, Chung and Liu (2009) lo definen entre 20 – 30 % amilosa y 70 – 80 % de amilopectina y Pandey et al. (2017) entre un 25 – 28 % de amilosa y amilopectina entre el 72 – 75 %. La naturaleza lineal, flexible y de gran longitud de la cadena de amilosa, le confiere la capacidad de enrollarse formando una estructura helicoidal, con seis unidades de D-glucosa por giro, de esta forma dentro de la hélice se propicia un entorno hidrofóbico con la capacidad de formar complejos con yodo, alcoholes o ácidos orgánicos. Se ha considerado que las regiones helicoidales son relativamente rígidas y se presentan de 10 a 15 giros por región (Tovar Benítez, 2008).

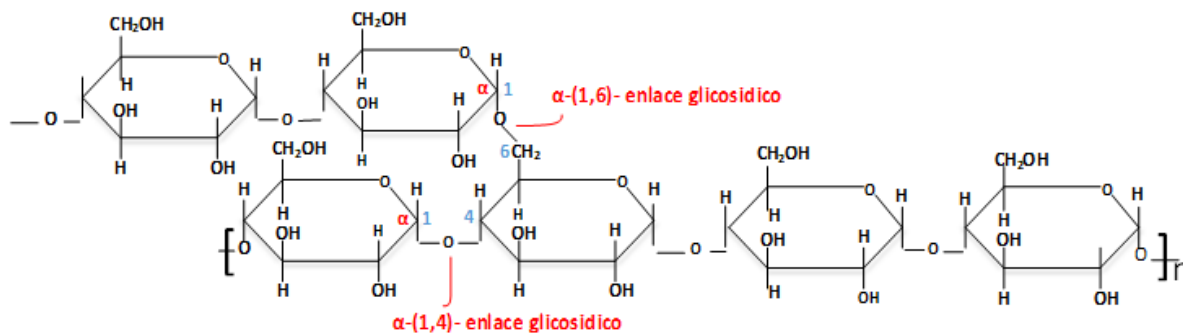


Figura 2-2. Estructura de la amilopectina.

La amilosa y amilopectina se organizan formando la región amorfa y cristalina del almidón. Se cree que las regiones cristalinas son estructuras densamente empaquetadas, compuestas en su mayoría por amilopectina, mientras la amilosa predomina en las regiones amorfas de los gránulos de almidón (Chung and Liu, 2009), es decir, la parte cristalina genera una estructura organizada donde las cadenas cortas lineales forman dobles hélices organizadas (paralelas) en una estructura cristalina tridimensional, por medio de puentes de hidrógeno, mientras que la región amorfa está formada por la amilosa más la amilopectina que no se encuentra formando las dobles hélices (Ao and Jane, 2007). Gracias a la amilopectina los gránulos de almidón confieren la propiedad de semicristalinidad con la parte amorfa y cristalina (Ao and Jane, 2007; Hernández-Medina et al., 2008; Hosney and Delcour, 2010), por esto, los pesos moleculares para esta varían dependiendo de la materia prima, por ejemplo para trigo se tienen pesos moleculares desde $2,6 \times 10^8$ g/mol hasta $7,0 \times 10^8$ g/mol, para maíz y arroz valores de $2,8 \times 10^8$ g/mol y $3,4 \times 10^8$ g/mol, respectivamente (Poonam and Pandey, 2009).

La región amorfa y cristalina poseen diferente susceptibilidad ante una degradación enzimática, siendo la región amorfa la más susceptible debido a que solo amilosa se encuentra formando esta parte del almidón es posible concluir que, a mayor contenido de amilosa, menor será la región cristalina presente y por ende más susceptible a la degradación enzimática será el material amiláceo. Trabajos como los realizados por Tester et al. (2006) presentan un análisis de la grado de cristalinidad¹, determinada por el método de dispersión de rayos X y la cantidad de dobles hélices que poseen los materiales², determinadas mediante una resonancia magnética nuclear. Para avena se presenta un contenido de cristales de 0,24, para un contenido de cristales de 0,39 : 0,43 y dobles hélices de 0,38 : 0,43, para trigo un contenido de cristales de 0,36 : 0,39 y dobles hélices de 0,32 : 0,46, arroz un contenido de cristales de 0,38 : 0,51 y dobles hélices de 0,49 : 0,63, cebada un contenido de cristales de 0,23 : 0,53 y papa un contenido de cristales de 0,23 : 0,53 y dobles hélices de 0,29 : 0,64.

¹Unidad de medición (WAXS) dispersión granangular de rayos X.

²Unidad de medición (¹³C CP-MAS/NMR) Polarización cruzada-ángulo de hilado/resonancia magnética nuclear.

Con base en la densidad del empaquetamiento de la estructura de dobles hélices la cual es consecuencia directa de la longitud de las ramificaciones de amilopectina, se pueden identificar dos tipos de cristales o estructuras polimorfos (A o B) en el almidón (Quintero et al., 2016). Los cristales tipo A son consecuencia de ramificaciones de amilopectina más largas que los de tipo B, lo cual hace que ambos cristales posean diferentes morfologías, área superficial específica, propiedades físicas, comportamiento ante un hinchamiento y gelatinización. Los almidones tipo A poseen mayor contenido de amilosa que los de tipo B, estos últimos poseen un mayor contenido de fosfolípidos formando complejos lípido-amilosa (Kim and Huber, 2010). La Figura 2-3 presenta el efecto del empaquetamiento de las dobles hélices en los cristales de almidón con la longitud de las cadenas ramificadas de amilopectina.

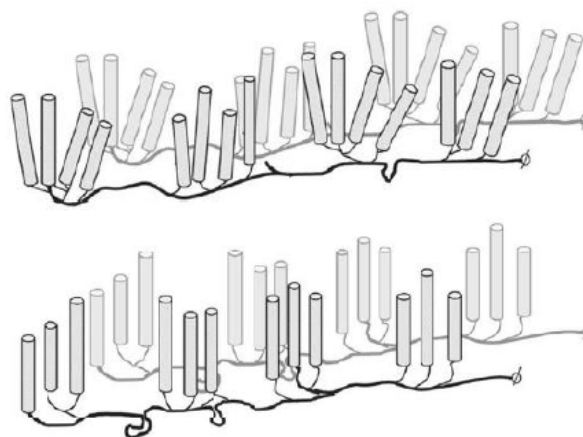


Figura 2-3. Empaquetamiento de las dobles hélices en los gránulos de almidón, superior: tipo B, inferior: tipo A (Zhu, 2017).

Los almidones tipo A poseen una estructura más cristalina que los tipo B gracias a su mayor longitud de las cadenas ramificadas de amilopectina, lo que les permite empaquetarse de forma más densa. Lo anterior trae como consecuencia que los gránulos formados por los almidones tipo A posean un mayor diámetro que los de tipo B. Para el almidón de trigo, el tipo A posee un diámetro entre $10 - 38nm$ y forma de disco, mientras que los tipo B inferior a los $10nm$ y forma esférica (Kim and Huber, 2010).

Autores como Tester et al. (2006) han reportado la relación entre el tamaño del gránulo y la proporción área superficial:volumen del mismo, dado que a mayor tamaño del gránulo menor será esta relación y por ende la superficie disponible para el ataque enzimático, es decir, el tamaño del gránulo es un factor que controla la velocidad y el grado de hidrólisis del almidón (ambas variables relacionadas de forma inversa con el tamaño del gránulo). Por esto, se puede llegar a pensar que la actividad enzimática depende más del área superficial disponible que de la concentración de sustrato. También observaron que la velocidad y el

grado de hidrólisis con una α -amilasa es mayor para el trigo, seguido por el maíz y por último para papa, lo cual corresponde al orden ascendente de tamaño del gránulo, la Tabla 2-1 resume algunas características de los gránulos de algunos materiales amiláceos como el diámetro, forma y relación área superficial:volumen.

Tabla 2-1. Características de gránulos en materiales amiláceos (Tester et al., 2006; Kim and Huber, 2010; Zhu, 2017).

Material amiláceo	Tipo de almidón	Forma del gránulo	Diámetro (nm)	Relación área superficial:volumen
Avena	A	Poligonal	10-15	-
	B	-	3-10	-
Maíz	-	Esférica,/poliédrica	2-30	0,2-3:1
Trigo	A	Lenticular	21,9	-
	B	Esférica	2-10	0,6-3:1
Arroz	A	Poliédrica	-	-
	B	Poliédrica	3-8	0,8-2:1
Cebada	A	Lenticular	15-25	0,2-0,4:1
	B	Esférica	2-5	1,2-3:1
Papa	A	Lenticular	-	-
	B	Lenticular	5-100	0,06-1,2:1

El lector puede identificar más detalles de estas relaciones en el trabajo mencionado y para otros tipos de materiales amiláceos no tan comunes, pero de manera general se observa la influencia de la relación área superficial-volumen, en donde materiales como trigo, arroz y cebadas pueden usarse para mejorar el grado de hidrólisis.

2.2. Caracterización de materias primas amiláceas

Los materiales amiláceos no solo constan de polímeros de glucosa, también de carbohidratos, proteínas, fibras y lípidos en menor proporción, los cuales poseen un efecto importante en la disponibilidad del almidón para ser hidrolizado debido a que pueden formar complejos no susceptibles a hidrólisis y disminuyen la disponibilidad del agua. En la naturaleza todos estos componentes de los materiales amiláceos se encuentran distribuidos en el endospermo parte rica en almidón y proteína, el germen parte rica en grasas y vitaminas y el salvado parte rica en fibra.

Este tipo de materiales se pueden clasificar según su contenido de almidón y demás componentes no amiláceos en cereales como arroz, maíz, trigo, cebada y avena, con un contenido aproximado de 30 – 80 %, leguminosas como garbanzos, lentejas, soya, frijol, chícharo y haba, con un contenido de almidón entre 25 – 50 % y tubérculos como papa, yuca, tapioca, ñame, con un contenido de almidón entre 60 – 90 % de la materia seca (Tovar Benítez, 2008; Ruiz Cruz, 2012). Todos estos materiales amiláceos deben pasar por un proceso de molienda

y tamizado previo a su hidrólisis enzimática, con los cuales se busca disminuir el tamaño de partícula y aumentar el área superficial disponible. Dependiendo del tamaño final de partícula y de la cantidad de sólidos remanentes en el material amiláceo estos pueden ser solubles, si se trabaja con harinas cuyo tamaño de partícula es del orden de micrómetros, o insolubles cuando el tamaño de partícula final es del orden de milímetros (Roman et al., 2017).

Cada materia prima amilácea contiene una cantidad de proteínas, lípidos, carbohidratos, cenizas, y almidón, siendo este último equivalente al 98 – 99 % del peso seco (Tovar Benítez, 2008), lo que le confiere una estructura determinada al grano, por esto, hay diferencias entre las características químicas, morfológicas y fisicoquímicas de cada materia prima.

Gonzalez Tello et al. (1989) realizaron una serie de publicaciones donde exponían las tendencias actuales a la fecha, en la producción de hidrolizados enzimáticos de cereales, lactosa y proteínas para su aplicación a la industria alimentaria. Tenían como principal objetivo la producción de cereales hidrolizados por vía enzimática, con el fin de mostrar las ventajas respecto a métodos tradicionales de hidrólisis ácida o básica, que obligan a su neutralización, generando cambios en las características organolépticas de los alimentos, para esto, hallaron el contenido de almidón de cereales como avena, trigo, maíz, etc, tubérculos como papa, ñame, etc y leguminosas como lentejas, datos presentados en la Tabla 2-2.

Tabla 2-2. Contenido de almidón en materias primas amiláceas (Gonzalez Tello et al., 1989).

Materia prima	Almidón (%)
Maíz blanco	71:74-76*-88**-(78,89,84,65)***
Maíz azul	82
Trigo	67:69
Avena	63:67
Arroz	75:88
Cebada	65:68
Papa	65:85
Ñame	68:83
Mandioca	85:87
Lentejas	55:68
Habas	30:43

* (Agama-Acevedo et al., 2013) ** (Liu et al., 2009) *** (Tovar Benítez, 2008)

Torruco-ucó and Betancur-ancona (2007) trabajaron el aislamiento y caracterización molecular de almidón de Makal (*Xanthosoma yucatanensis*), donde tenían como objetivo principal investigar las propiedades fisicoquímicas y propiedades funcionales del almidón aislado de este tubérculo y compararlo con otras materias primas. Se encontró un contenido de amilosa y amilopectina de 22,4 % y 77,6 %, se compararon con almidones de yuca, maíz, papa, los cuales son presentados en la Tabla 2-3. El contenido aparente de amilosa se estimó formando un complejo de yodo, utilizando el método de Morrison y Laignelet (1983). El contenido de

amilopectina se calculó por diferencia de almidón total menos el contenido de amilosa.

Tabla 2-3. Contenido de amilosa y amilopectina en materias primas amiláceas (Torruco-ucó and Betancur-ancona, 2007).

Componente Materia prima	Amilosa (%)	Amilopectina (%)	Referencia
Maíz blanco	33-24-28-23:27-27	67-NR-72-NR-73	a, b, c, d, e, f
Maíz azul	27-28	73-73	f, g
Makal	24-22	76-78	f
Camote	20	80	f
yuca	17-17-14-17:33	83-83-86-84	d, f, h
Sagú	23	77	f
Papa	34-21-21	65-79-79	d, g, h
Trigo	27-26-27-28-23:32	73-72-73-72-68:77	e, g, i, j

^a(Gonzalez Tello et al., 1989) ^b(Agama-Acevedo et al., 2013) ^c(Liu et al., 2009) ^d(Tovar Benítez, 2008)

^e(Kearsley and Dziedzic, 1995) ^f(Hernández-Medina et al., 2008) ^g(Sivak and Preiss, 1998) ^h(Osundahunsi et al., 2003) ⁱ(Villar, 2017) ^j(Vamadevan and Bertoft, 2015)

Li et al. (2007) analizaron el contenido de almidón en el endospermo de maíz blanco en diferentes días de maduración y encontraron que a partir de los 12 días el contenido de almidón incrementó desde 2g/100g hasta 88g/100g, permaneciendo constante después de 30 días de maduración. Observaron que el contenido de amilosa aumenta con su maduración encontrándose a los 12 días 9,2g/100g, a los 20 días 21,4g/100g y a los 30 días 24g/100g, el cual permanece sin cambio cuando el maíz llega a su madurez fisiológica completa a los 45 días. Se tenía como objetivo el estudio de la morfología del gránulo de almidón, el contenido de amilosa, la distribución de longitud de cadena de amilopectina y las propiedades térmicas de los almidones del endospermo, información útil para la comprensión de cómo enzimas catalizan la biosíntesis de almidón y el crecimiento de gránulos durante el desarrollo del grano de maíz. El contenido de almidón se determinó mediante un kit total de almidón (Megazyme. Co. Wicklow. Irlanda). El endospermo fue liofilizado antes del análisis, se molió y después se lavó con etanol al 80% para la eliminación de glucosas. La muestra se digirió entonces con α -amilasa y amiloglucosidasa, mezclado con el reactivo goPod (Megazyme. Co. Wicklow. Irlanda), luego fue leído a 510nm.

El contenido de amilosa en el almidón se determinó mediante el uso de cromatografía de permeación en gel, siguiendo el método de Song & Jane (2000): almidón (15mg) se humedeció con agua 0,2mL y se dispersó en dimetil sulfoxido (1.8 mL) en un baño de agua a ebullición, precipitando el almidón con etanol y se volvió a dispersar hirviendo en agua destilada (5mL). Esta dispersión de almidón se inyecta en una columna de gel de Sefarosa CL-2B gel de permeación (Pharmacia. Piscataway. NJ) y se eluyó mediante el uso de un eluyente que contiene 25mM de NaCl y 1mM de NaOH a una velocidad de 0,7ml/min en

modo descendente. Muestras de 1,0mL se tomaron y se analizaron el total de carbohidratos (método del ácido sulfúrico-fenol) y tinción con yodo a 490nm y 630nm, respectivamente.

Hernández-Medina et al. (2008) determinaron el contenido de amilosa y amilopectina mediante el método colorimétrico, para tubérculos como el makal, camote, yuca y sagú, encontrando el contenido de amilosa presentado en la Tabla 2-3. Los contenidos de amilopectina de los almidones de makal y sagú (76,4 % y 77,3 %, respectivamente) fueron menores a los encontrados en los almidones de camote y yuca (80,4 % y 83,0 %, respectivamente), la caracterización completa de estos elementos se presenta en la Tabla 2-4. El objetivo de este trabajo fue la extracción y caracterización fisicoquímica y funcional de almidones de fuentes poco comunes o no convencionales, como el makal (*Xanthosoma yucatanensis*), el camote (*Ipomea batata*), la yuca (*Manihot esculenta Crantz*) y sagú (*Marantha arundinacea*), con el fin de incentivar el trabajo con materias primas no convencionales. La determinación de amilosa y amilopectina se realizó con el método colorimétrico de Morrison y Laignelet (1983). El contenido de amilopectina se calculó por diferencia al 100 % del contenido de amilosa.

Tabla 2-4. Caracterización fisicoquímica de almidones no convencionales (Hernández-Medina et al., 2008).

Componentes (%)	Makal	Camote	Yuca	Sagú	Papa**
Humedad	8,99	9,83	9,48	10,50	0,24:0,27
Proteína	0,16	0,22	0,06	0,64	0,55:0,61
Lípidos	0,19	0,31	0,20	0,36	NR
Fibra cruda	0,35	0,28	1,01	0,06	NR
Minerales	0,12	0,26	0,29	0,22	NR
Carbohidratos totales *	99,28	98,93	98,44	98,72	NR
Amilosa	23,60	19,60	17,00	22,70	22,65:27,05
Amilopectina	76,40	80,40	83,00	77,30	NR

NR: No reportado *Carbohidratos totales como extracto libre de nitrógeno ** (Rosicka Kaczmarek et al., 2016).

Tovar Benítez (2008) realizó la determinación del contenido de almidón, mediante el aislamiento de almidón de maíz por cuatro métodos de extracción diferentes, encontrando el porcentaje de almidón recuperado como la relación del peso seco del almidón recuperado respecto al peso seco de harina o granos de maíz, encontrando para cada método un 77,52 %, 89,37 %, 83,59 % y 65,21 %, respectivamente, así mismo se apoyó en (Astiasarán Anchia and Martínez Hernández, 2003) para reportar los componentes del trigo, maíz, cebada y otras materias primas, presentadas en la Tabla 2-5. Este trabajo tenía como objetivo la aplicación de diferentes métodos de aislamiento para la obtención de un almidón de mayor pureza.

Tabla 2-5. Composición química de materiales amiláceos en porcentaje base seca (To-var Benítez, 2008).

Componente (%)	Trigo	Centeno	Maíz	Maíz**	Cebada	Avena	Arroz	Mijo	Harina de trigo tostada*	Yuca***
Humedad	13,2	13,7	12,5	19,0	11,7	13,0	13,1	12,1	3,0	1,7
Proteína	11,7	11,6	9,2	8,3	10,6	12,6	7,4	10,6	11,9	0,1
Lípidos	2,2	1,7	3,8	3,5	2,1	5,7	2,4	4,1	1,3	1,1
Almidón	59,2	52,4	62,6	58,1	52,2	40,1	70,4	64,4	79,4	94,6
HCO	10,1	16,6	8,4	2,10	19,6	22,8	5,0	6,3	3,3	1,7
Fibra cruda	2,0	2,1	2,2	7,9	1,6	1,6	0,7	1,1	0,7	1,7
Minerales	1,5	1,9	1,3	1,1	2,3	2,9	1,2	1,6	0,5	0,30

HCO: Otros Carbohidratos *(Gonzalez Tello et al., 1989) *(Arias et al.) *** (Torruco-uco and Betancur-ancona, 2007).

Agama-Acevedo et al. (2013) realizaron un análisis sobre dos clases de maíz, blanco y azul, cuya diferencia era la dureza del grano, cuantificando la cantidad de almidón, amilosa y distribución de las cadenas de amilopectina. Encontraron que el contenido de almidón antes de la etapa de maduración era aproximadamente 71,00g/100g para ambos, pero luego de la etapa de maduración (madurez fisiológica) la acumulación del almidón fue de 81,7g/100g para el maíz blanco y 76,22g/100g para el maíz azul. El contenido de amilosa antes de la etapa de maduración presenta diferencias significativas entre el maíz blanco y maíz azul de 20,6g/100g y 22,40g/100g, respectivamente, luego del proceso de maduración la diferencia fue de 32,90g/100g y 27,40g/100g (Tabla 2-2), comprobando que existen diferencias en el proceso de biosíntesis de estas moléculas. Es importante señalar que el contenido de amilosa también depende de la variedad ya que en maíz el intervalo en el contenido de amilosa es 25,00-35,00g/100g (Tabla 2-3) para almidones normales.

Rosicka Kaczmarek et al. (2016) menciona como cerca del 37 % de la agricultura global, esta dedicada a la producción de cereales y al crecimiento de varias especies de trigos. Presentando a líderes productores como China (19 %), India (12 %), Estados Unidos (11 %), entre otros. Adicional a esto, realizaron un análisis sobre tres tipos de trigo, caracterizando el contenido total de proteínas, lípidos, fosfato y amilosa. Encontrando diferencias significativas entre los diferentes cultivos lo cual mencionan puede deberse a las condiciones climáticas y tipo de suelo. El almidón aislado se analizó mediante el método de Polish Standard PN-84/A-74706, el contenido de proteína mediante el método de Kjeldahl y el contenido de lípidos totales mediante método Soxhlet Weibull usando éter de petróleo como solvente. El contenido de amilosa aparente fue determinado usando un kit enzimático comercial (Megazyme AM/AMP 01/96, Wicklow, Ireland).

Se deja al lector la disponibilidad de encontrar más información respecto a caracterizaciones y contenidos de almidón en trabajos como los realizados por (Zhu, 2017), el cual realiza una revisión de literatura encontrando contenido de amilosa y su método de cuantificación

proteínas, lípidos, cenizas y fosfatos, de mas de 10 especies de almidones.

2.3. Conclusiones

Con este capítulo se buscó que el lector adquiriera una idea global de la composición del almidón, algunas de las materias primas y procesos de cuantificación, notando que es interesante el trabajo con estos materiales ya que cerca del 37 % de la agricultura global, está dedicada a la producción de cereales y al crecimiento de varias especies de trigos. Presentando a líderes productores como China (19 %), India (12 %), Estados Unidos (11 %), entre otros (Rosicka Kaczmarek et al., 2016).

Las fuentes de almidón más importantes son los cereales (maíz, arroz, trigo) con un contenido aproximado de 30 – 80 %, leguminosas (frijol, chicharo, haba) un 25 – 50 % y en tubérculos (papa, tapioca, yuca, ñame) un 60 – 90 % de la materia seca (Tovar Benítez, 2008) y también existe una gran variedad en cuanto al contenido de almidón en las materias primas, dentro de las mas tradicionales se tiene el maíz blanco con una cantidad entre el 65 % y 89 %, el trigo con cantidades entre el 67 % y 69 % y papa entre el 65 % y el 85 %.

La composición de amilosa y amilopectina dentro de una molécula de almidón dependerá de la fuente y condiciones climáticas o tipo de suelo sobre el cual fue sembrado, variando entre un 20 % : 30 % de amilosa y 70 % : 80 % de amilopectina (Chung and Liu, 2009; Pandey et al., 2017), dada la naturaleza lineal, flexible y de gran longitud de la amilosa, le confiere la capacidad de enrollarse formando estructuras helicoidales, generando entornos hidrófobos en su interior, para la amilopectina al encontrarse en mayor proporción genera estructuras organizadas donde las cadenas lineales forman dobles hélices paralelas en una estructura cristalina tridimensional, lo que permite clasificar el almidón en dos regiones, una amorfa y otra cristalina, las cuales poseen diferente susceptibilidad ante degradaciones enzimáticas, siendo la región amorfa mas susceptible, de lo que se puede concluir que a mayor contenido de amilosa, menor sera la región cristalina presente y por lo tanto mas susceptible a dichas degradaciones enzimáticas. Según esto se pueden identificar materias primas como el trigo con un contenido de cristales de 0,36 : 0,39 (Tester et al., 2006) que lo hacen ideal respecto a otras para su trabajo a gran escala.

Se puede concluir que materiales como el trigo, arroz y la cebada son buenos prospectos para trabajar procesos de hidrólisis y la existencia de una relación entre el tamaño del gránulo y la proporción área superficial:volumen del mismo, dado que a mayor tamaño del gránulo menor será esta relación y por ende la superficie disponible para el ataque enzimático, es decir, el tamaño del gránulo es un factor que controla la velocidad y el grado de hidrólisis del almidón.

3. Hidrólisis enzimática de materiales amiláceos

3.1. Hidrólisis enzimática de almidón

Sobre los materiales amiláceos se realiza un pretratamiento con el fin de obtener una materia prima en la cual sus elementos de interés (almidón) se encuentren disponibles. Este pretratamiento puede ser físico (Roman et al., 2017), consiste en la disminución del tamaño de partícula mediante molienda de la muestra, permitiendo mejorar efectos de transferencia de masa y una mayor disponibilidad de la enzima por el sustrato (Monsalve G. et al., 2006). Otro tipo de pretratamiento es fisicoquímico (calentamiento en presencia de agua y presiones elevadas). Dentro de estas últimas se prefiere la técnica del calentamiento rápido seguido de una descompresión súbita, después de un tiempo de contacto pequeño, lo que se conoce como HTST (*high temperature, short time*) (Gonzalez Tello et al., 1989).

La hidrólisis enzimática de materiales amiláceos consiste en una serie de reacciones múltiples, en las cuales actúan las amilasas, complejo enzimático que funciona de forma sinérgica en su acción sobre el almidón, degradándolo en polisacáridos y oligosacáridos de glucosa (Cinelli, 2012), se divide en tres etapas principales, gelatinización, licuefacción y sacarificación, descritas a continuación.

Gelatinización: Proceso mediante el cual el almidón en solución acuosa es sometido a un aumento de la temperatura, lo que genera hidratación, hinchazón y retención del agua por parte de los granos de almidón, esto sucede hasta un punto donde la temperatura es lo suficientemente alta para el grano lograr retener la máxima cantidad de agua posible, generando así su rompimiento de manera irreversible, exponiendo los componentes de interés como la amilosa y la amilopectina en el seno del fluido. Este proceso genera un aumento progresivo de la viscosidad del sistema, cuando los gránulos se rompen, la viscosidad se reduce hasta un valor estable en el que se produce un gel cuyas características físicas y químicas son diferentes en cada almidón (Ruiz Cruz, 2012).

En general, los gránulos hinchados son enriquecidos en amilopectina, mientras que la amilosa lineal se difunde o lixivia fuera de los gránulos hinchados y forma la fase continua fuera de los gránulos (Ji et al., 2017; Kong et al., 2018). Este hinchamiento de los gránulos causa a su

vez un aumento en el número y tamaño de los poros y agujeros presentes en la superficie de los gránulos y en los canales internos, por donde puede difundir más fácilmente las enzimas que realizarán la hidrólisis, lo que aumenta su afinidad y absorción (Kong et al., 2018). En la gelatinización, se calienta el almidón en solución acuosa a presión atmosférica o a altas presiones, en cuanto al efecto de la presión, se sabe que las altas presiones afectan la estructura secundaria de la región cristalina del almidón (hélices), además de que el efecto es inmediato e independiente del tamaño y la forma de los gránulos de almidón (Li et al., 2015), sin embargo, el efecto de la presión por sí solo no causa una hinchazón de los gránulos ni una liberación de la amilosa hacia el exterior de los mismos (Ji et al., 2017), por lo que la mejor opción es combinarlo con altas temperaturas o con agitación, lo cual incrementa su efecto.

Varios autores han reportado las condiciones de la etapa de gelatinización para diferentes materias primas, Baks et al. (2008) realiza la gelatinización de almidón de trigo a una temperatura de 90°C durante 30min, Ruiz et al. (2011) la realiza sobre almidón de yuca a 66°C durante 30min y 390rpm, Betiku et al. (2013) lo realiza sobre almidón de papa a 97°C por 5min, Zabed et al. (2016) sobre almidón de maíz a 90°C entre 5 y 15min al igual que Li et al. (2015) a 90°C pero durante 1h y Dura et al. (2014) llevando la temperatura desde 50°C hasta 90°C durante periodos inferiores a los 5min.

Licuefacción: En este proceso se genera la hidrólisis parcial de los componentes de la parte amorfa del almidón, generalmente mediante unas enzimas denominadas α -amilasas, las cuales generan polisacáridos de longitud media (5 a 10 unidades de glucosa) y pequeñas cantidades de otros componentes de alto y bajo peso molecular como glucosa, maltosa, etc (Gonzalez Tello et al., 1989; Li et al., 2007).

Tabla 3-1. Condiciones de operación etapa de licuefacción.

Temperatura (°C)	pH	Agitación (rpm)	Presión (bar)	%p/p Almidón	Relación enzima-sustrato	Tipo de gelatinización	Referencia
Almidón de trigo							
60	6,5	300	1	1	1,4-113,0%p/p	NR	(Ozbek and Semra, 2001)
NR	NR	NR	1	20-70	NR	Térmica	(Guo et al., 2018)
50	7,0	NR	45000	5	0,1-10,0%p/p	Térmica/altas presiones	(Baks et al., 2008)
90	7,0	NR	NR	20%p/p	NR	Térmica	(Kovaa et al., 2013)
Almidón de Maíz							
90	6	NR	1	25	0,45%p/p	Térmica	(Zabed et al., 2016)
37	7	350	1	0,5	3,7U/mg	Térmica	(Roman et al., 2017)
40	6-7	160	1	45	500U/g	Térmica	(Kong et al., 2018)
50	6	50	1	20	5U/g	Química	(Dura et al., 2014)
90	6	200	1	10-60	12U/g	Térmica	(Li et al., 2015)
Almidón de Yuca							
95	5,5	200	1	1	0,09%p/p	peptinasas	(Collares et al., 2012)
80	5	390	1	10	130,5U/g	Térmica	(Ruiz et al., 2011)
40	4,0	100	NR	20%p/v	NR	Térmica	(Krajang and Chamsart)
Almidón de arroz							
50-60	6,5	300	1	1	9000U/g	NR	(Apar and Özbek, 2004)

NR:No reporta

En la Tabla 3-1 se observa una variedad en las condiciones de la etapa de licuefacción, entre materias primas se presentan variaciones, la temperatura varía entre los 37°C y los 95°C, siendo 90°C la más común. Para almidón de trigo, maíz y arroz se reportan pH básicos iguales

o superiores a 6,0. Respecto a la agitación se observan variaciones pero es común encontrar valores entre los 200rpm y 300rpm, también se reportan diferencias entre los porcentajes de almidón y relaciones enzimas sustrato, todo dependiendo del objetivo de la investigación.

Sacarificación: Una vez generados los componentes a partir del proceso anterior otro grupo de enzimas llamado Amiloglucosidasas (AMG) se encargan de hidrolizar completamente los polisacáridos de tamaño intermedio hasta glucosa principalmente. Compuestos como maltosa, maltotriosa y otros, se generan, pero nuevamente son hidrolizados por las enzimas (Gonzalez Tello et al., 1989; Ruiz Cruz, 2012).

Tabla 3-2. Condiciones de operación etapa de sacarificación.

Temperatura (°C)	pH	Agitación (rpm)	Presión (bar)	%p/p Almidón	Relación enzima-sustrato	Tipo de gelatinización	Referencia
Almidón de Maíz							
30	4,2	200	1	25	0,34	Térmica	(Zabed et al., 2016)
50	4,0	50	1	20	4U/g	Química	(Dura et al., 2014)
Almidón de Yuca							
60	4,0	200	1	1	0,052-0,084 %p/p	Con peptinasa	(Collares et al., 2012)
70	4,5	390	1	10	81,5U/g	Térmica	(Ruiz et al., 2011)
Almidón de papa							
45	NR	NR	NR	27,5 %p/v	NR	Térmica	(Betiku et al., 2013)
30:60	3,5:5,9	NR	NR	NR	1 %v/v	Térmica	(Miklasevicius et al., 2013)

NR: No reporta

En la Tabla 3-2 se observa una variedad en las condiciones de la etapa de sacarificación entre materias primas se presentan variaciones, las temperaturas varían entre los 30°C y 70°C siendo menores a las reportadas en sacarificación, los pH varían entre 3,5 y 5,9 y la agitación puede encontrarse entre las 50rpm y 200rpm, el contenido de almidón y las relaciones enzima sustrato difieren en cada caso, de acuerdo al objetivo de investigación, lo que lleva a tener resultados diferentes con cada especificación.

3.2. Enzimas implicadas en la hidrólisis de almidón

En la sección anterior se habló de la hidrólisis enzimática de materiales amiláceos y las etapas que la caracterizan, pero esto no es independiente de las enzimas que actúan en el proceso, lo que hace necesario profundizar un poco en sus propiedades, condiciones óptimas de actuación y complementar y dar una idea acertada del proceso de hidrólisis enzimática.

Las enzimas usadas en este proceso se denominan hidrolasas, específicamente las amilasas; de acuerdo a su mecanismo de acción se pueden clasificar en tres tipos α -amilasas (1,4- α -D-glucano-glucanohidrolasas), β -amilasas (1,4- α -D-glucano-maltohidrolasas) y amiloglucosidasas (1,4- α -D-glucanohidrolasas). Los posibles puntos del ataque enzimático sobre el almidón son en los enlaces glucosídicos α -(1,4) y α -(1,6) de los residuos terminales de glucosa (exoamilasas), enlaces internos α -(1,4) de la amilosa y amilopectina (endoamilasas) y enlaces α -(1,6) de los puntos de ramificación (enzimas de desramificación) (Khlestkin et al.,

2018).

Este proceso se realiza mediante un complejo enzimático, el cual está conformado por endoamilasas que catalizan la hidrólisis de enlaces α -1,4 en el polímero de manera aleatoria, generando oligosacáridos lineales y ramificados, un ejemplo de estas es la α -amilasa. Otro grupo son las exoamilasas que actúan sobre los extremos de las cadenas de amilosa y amilopectina, catalizando tanto la hidrólisis de enlaces α -1,4 como α -1,6, ataca preferiblemente oligosacáridos (la hidrólisis de polisacáridos se produce a tasas más lentas), generando la liberación de moléculas de D-glucosa desde los extremos no terminales. Se tienen enzimas desramificadoras, que se encargan de catalizar la hidrólisis exclusiva de enlaces α -1,6 presente en los puntos de ramificación de la amilopectina, las principales son la isoamilasas y pululaninas (Cinelli, 2012), así mismo, se presenta el uso frecuente de la amiloglucosidasa usada en la industria alimenticia, aunque existen otras como la β -amilasa, sólo actúa en α -1,4 de cadenas no reductoras terminales y el principal producto de hidrólisis es maltosa (disacárido de glucosa) y la α -glucosidasa, también conocida como la maltasa, para el caso de interés se profundizará un poco en las α -amilasas y amiloglucosidasas.

3.2.1. α -amilasa EC.3.2.1.1

También conocida como α -1,4 glucanohidrolasa o glucogenasa, es una glucanasa endoactiva que cataliza la hidrólisis al azar de los enlaces α -(1,4)-D-glucosídicos en polisacáridos que contienen tres o más unidades de D-glucosa. Trabaja sobre el almidón, glucógeno, polisacáridos y oligosacáridos relacionados de manera aleatoria; Los grupos reductores se liberan en la configuración alfa (α), el cual se refiere a la configuración anomérica inicial del grupo de azúcar liberado y no a la configuración del enlace hidrolizado (Kadziola et al., 1994).

La α -amilasa actúa en la región central de las cadenas de amilosa y amilopectina excepto en las proximidades de los puntos de ramificación (Presečki et al., 2012). La hidrólisis de la amilopectina por esta enzima produce glucosa, maltosa y una serie de dextrinas que contienen enlaces ramificados conformados por cuatro o más residuos de moléculas de glucosa que presentan enlaces α -1,6 provenientes de las uniones glucosídicas de la estructura original. Los productos obtenidos en mayor concentración son maltosa, maltotriosa y maltopentosa, hidrolizando completamente la maltohexosa (Morales et al., 2008).

Las α -amilasas comerciales pueden ser de origen bacteriano (*Bacillus Licheniformis*, *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens*) o de origen fúngico (*Aspergillus Orizae*, *A. niger*, *A. flavus*). Las enzimas de origen bacteriano suelen ser más termoestables que las que las de origen fúngico Gonzalez Tello et al. (1989). El peso molecular reportado para las α -amilasas provenientes de *Bacillus Licheniformis* se encuentra alrededor de los 60kDa (Ruiz Cruz, 2012).

Esta enzima presenta una secuencia de 403 aminoácidos la cual contiene en los sitios activos residuos como (AS) ASP 179, GLU 204, ASP 289 y otros como (SS) TRP 276 y TRP 277 (Kadziola et al., 1994). Está conformada por las estructuras secundarias: 3 Hojas beta, 6 unidades beta -alpha- beta, 4 horquillas beta, 6 bucles beta, 15 hebras, 19 hélices, 15 interacciones hélice-hélice, 35 giros beta, 9 giros gamma (Figura 3-1), si se desea tener más información de la enzima se puede buscar con el código PDB: 1amy.

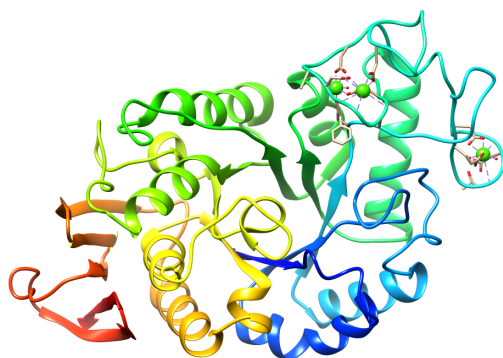


Figura 3-1. Estructura de la enzima α -amilasa. Tomado de UCSF Chimera.

Se sabe que forma interacciones con iones calcio (Ca^{+2}), los cuales presentan una función estructural Ca502 (A) y otros una función catalítica Ca501 (A) y Ca 500 (A), quienes están asociados con 8, 8 y 7 ligandos, adicional a esto presenta asociadas a su estructura 142 moléculas de agua.



Figura 3-2. Cavidades de la α -amilasa. Tomado de BRENDA.

La Figura 3-2 muestra 10 cavidades que se presentan en la α -amilasa, de las cuales la de mayor volumen es la presentada en color púrpura y es equivalente a $1228,92\text{\AA}^3$ seguida de la cavidad de color roja con $883,41\text{\AA}^3$ hasta la cavidad de color azul claro, la cual tiene el menor volumen equivalente a $434,11\text{\AA}^3$. La cavidad de mayor volumen contiene en su mayoría aminoácidos aromáticos como triptófano, tirosina, fenilalanina y otros como alifáticos, positivos, negativos y neutros, por lo cual se puede pensar que es el sitio activo de la proteína dada la variedad de estos aminoácidos dentro de los cuales se encuentran incluidos los del

sitio catalítico.

Como se mencionó las α -amilasas pueden provenir de varias fuentes bacteriano o microbiano, por ejemplo de *Bacillus licheniformis*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae* y muchas otras, lo que generan variaciones en las condiciones de operación con estas enzimas como pH, temperatura, activadores, fuentes de sustrato. La base de datos BRENDA ¹ (Braunschweig Enzyme Database) presenta un conjunto de condiciones tomadas de diferentes fuentes. Para temperatura reportes desde los 25°C hasta 100°C, pH entre los 4,0 unidades hasta 9,0 unidades y activadores como Ca^{+2} ; CaCl_2 ; Mg^{+2} ; Na^+ ; PO_4^{-3} ; S_2O_3^2 . Las condiciones frecuentemente reportadas son temperaturas $>50^\circ\text{C}$ y $\text{pH} > 5$ unidades. Estos datos son corroborados con fichas técnicas como el caso de la α -amilasa comercial producida por *Bacillus licheniformis*, la cual reporta pH óptimos entre 5,5 : 5,8 y temperaturas entre los 95°C (para 90 : 120min, base húmeda) y 85 : 93°C (para 90 : 120min, base seca), junto con 50ppm de Ca^{+2} (Genencor, 2006).

Se tienen otros autores que también reportan las condiciones óptimas para la α -amilasa, como, Tomasik and Horton (2012) y Pandey et al. (2017), reportan varias temperaturas y pH óptimo para α -amilasa de acuerdo a su fuente, si proviene del páncreas humano su temperatura óptima esta entre los 30 : 50°C y el pH óptimo entre los 7,0 : 7,2, pero si se trata de fuentes como *B. licheniformis* las temperaturas óptimas pueden estar entre los 70 : 90°C con un pH óptimo de 7,9 o si proviene de *A. niger* la temperatura óptima esta entre 40 – 60°C y pH óptimo entre 4 : 6, lo que muestra la variabilidad de la enzima de acuerdo a su fuente.

3.2.2. Amiloglucosidasa EC.3.2.1.3

Conocida como glucan- α -(1,4)-D-glucosidasa, glucan 4- α -D-glucohidrolasa, glucoamilasa, Exo- α -1,4-glucosidasa. Exoenzima que cataliza la hidrólisis de residuos terminales de D-glucosa unidos por enlaces α -1,4, desde extremos no reductores con liberación de β -D-glucosa, donde (β) se refiere a la configuración anomérica inicial del grupo del azúcar liberado (Kadziola et al., 1994).

Muchas formas de la enzima pueden hidrolizar rápidamente enlaces α -(1,4) y α -1,6-D-glucosídicos, a más baja velocidad, cuando el siguiente enlace en la secuencia es 1,4 (Kadziola et al., 1994), dado que se unen más fácilmente a las cadenas largas que a las cortas e hidrolizan antes los enlaces α -1,4 que los α -1,6 (Gonzalez Tello et al., 1989). Adicional a esto, algunas enzimas de este tipo hidrolizan no solo enlaces α -1,6, sino enlaces α -(1,3)-D-glucosídicos de otros polisacáridos.

¹<https://www.brenda-enzymes.org/enzyme.php?ecno=3.2.1.1&Suchword=&reference=&UniProtAcc=&organism%5B%5D=Bacillus+licheniformis>

Las principales fuentes de amilogucosidasas, se encuentran hongos filamentosos del género *Aspergillus* y *Rhizopus*, específicamente *A. niger*, *A. awamori* y *R. oryzae*. Las principales cepas bacterianas productoras de amilogucosidasas son *Flavobacterium sp.*, *B. stearootherophilus*, *Clostridium sp.* y *Lactobacillus amylovorus*, entre las cuales, aquellas producidas por *Bacillus* y *Clostridium* presentan termoestabilidad. Poseen pesos moleculares cercanos a 60kDa. El peso molecular de las amilogucosidasas fúngicas también depende de la fuente, para las formadas a partir de *Aspergillus niger*, su peso molecular se encuentra entre 60kDa y 70kDa (Paszczyński et al., 1982; Harsa and Furusaki, 2001).

Se cree que contiene en su cadena principal de aproximadamente 108 aminoácidos un sitio activo conformado por aspartato (Asp 200), glutamato (Glu 203), triptófano (Trp 144) (<http://www.uniprot.org/uniprot/P69328>). Está conformada por las estructuras secundarias: 3 hojas beta, 1 giro beta, 1 horquilla beta, 8 hebras, 1 hélice, 12 giros beta, 6 giros gamma, 1 puente disulfuro (Figura 3-3), si se desea tener más información de la enzima se puede buscar con el código PDB:1acz.

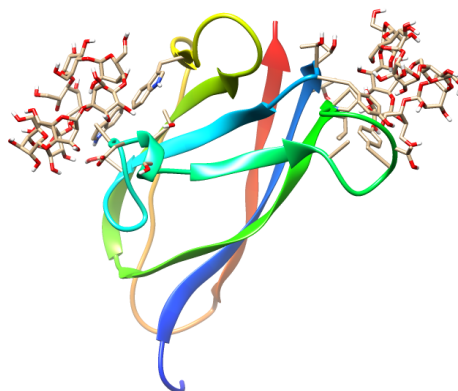


Figura 3-3. Estructura de la amilogucosidasa. Tomado de UCSF Chimera.

Puede formar dos asociaciones denominadas ligandos con estructuras como oligosacáridos de glucosa, en sus diferentes configuraciones. El primer ligando conformado por 7 moléculas de glucosa interactúa formando puentes de hidrógeno con el TRP 543 específicamente con el oxígeno ácido y forma interacciones de otro tipo (electrostáticas) con el Glu 544 y Trp 590, todos en la cadena (A). El segundo ligando conformado por 7 moléculas de glucosa, se encuentra asociado a los residuos catalíticos como Tyr 566, Pro 561, Thr 524, Thr 525, mediante puentes de hidrógeno y asociado a moléculas como thr 557, Lys 555, Tyr 527, Ser 558, mediante otro tipo de interacciones (electrostáticas).

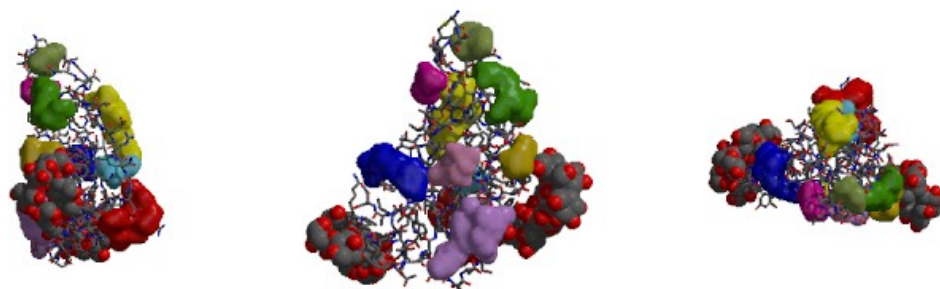


Figura 3-4. Cavidades de la Amiloglucosidasa. Tomado de BRENDA.

La Figura 3-4 muestra las cavidades que se presentan en la amiloglucosidasa, donde se encuentran 10 de las cuales la de mayor volumen es la presentada en color rojo y es equivalente a $683,02\text{\AA}^3$ seguida de la cavidad de color purpura con $494,44\text{\AA}^3$ hasta la cavidad de color azul claro, la cual tiene el menor volumen equivalente a $165,80\text{\AA}^3$. La cavidad de mayor volumen contiene en su mayoría aminoácidos negativos como el aspartato y el glutamato, se cree que este es el sitio activo de la proteína dado que este tipo de aminoácidos están pertenecientes al sitio activo y por su proximidad a los ligandos asociados.

Al igual que las α -amilasas, las amiloglucosidasas provienen de diversas fuentes, como lo son *Aspergillus Niger*, *Aspergillus Oryzae*, *Bacillus Licheniformis*, *Bacillus Subtilis*, algunas clases de *Saccharomyces*, entre otras (Scheer et al., 2011), por esto, se presentan diversas condiciones de operación con estas enzimas como pH, temperatura, activadores, fuentes de sustrato. En la base de datos BRENDA ² presenta un conjunto de condiciones tomadas de diferentes fuentes. Para temperatura reportes desde los 20°C hasta 70°C , pH entre los 3,5 unidades hasta las 8,0 unidades y activadores como Ca^{+2} , Ba^{+2} , Cu^{+2} , Co^{+2} , Mn^{+2} , Zn^{+2} . Las condiciones frecuentemente reportadas son temperaturas mayores a 50°C y pH superiores > 4 unidades. Estos datos, corroborados con fichas técnicas como el caso de la AMG comercial producida por *Aspergillus niger*, la cual reporta temperaturas entre los $58 : 65^{\circ}\text{C}$ y pH óptimos entre 4,0 unidades y 4,4 unidades (Genencor, 2007).

Al igual que para las α -amilasas, (Tomasik and Horton, 2012) y Pandey et al. (2017), reportan varias temperaturas y pH óptimo para amiloglucosidasas de acuerdo a su fuente, por ejemplo, *A. niger* presenta temperaturas óptimas entre los $50 : 70^{\circ}\text{C}$, con pH óptimos entre 4,0 : 5,0, si la fuente es *A. oryzae*, la temperatura óptima esta entre los $50 : 65^{\circ}\text{C}$ y el pH óptimo es de 4,5, pero si proviene de *A. awamori* presenta una temperatura óptima de 60°C y un pH de 4,5. de esta manera se observa que para estas enzimas las temperaturas óptimas se encuentran alrededor de los 60°C y pH alrededor de 4,5.

²<https://www.brenda-enzymes.org/enzyme.php?ecno=3.2.1.3&Suchword=&reference=&UniProtAcc=&organism%5B%5D=Aspergillus+niger>

3.2.3. Otras enzimas

β -amilasa (EC 3.2.1.2): cataliza la hidrólisis de los enlaces glucosídicos α -(1,4) en polisacáridos, con el fin de eliminar las sucesivas unidades de maltosa en los extremos no reductores de las cadenas, actúa sobre almidón, glucógeno, polisacáridos relacionados y oligosacáridos produciendo β -maltosa por una inversión (Swiss Institute of Bioinformatics, 2017). 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 se encuentra un enlace α -(1,6) (Gonzalez Tello et al., 1989).

α -glucosidasa (EC 3.2.1.20): también conocida como maltasa, cataliza la hidrólisis de residuos de cadenas no reductoras con enlaces α -(1,4), para la liberación de glucosa, son un grupo de enzimas cuya especificidad se dirige principalmente hacia la exohidrólisis de enlaces glucosídicos α -(1,4), hidrolizan rápidamente oligosacáridos, en relación con los polisacáridos, que se hidrolizan relativamente a tasas más lentas o no lo hacen (Gonzalez Tello et al., 1989; Swiss Institute of Bioinformatics, 2017).

Pululanasa (EC: 3.2.1.41): también conocida como pululan-6-glucanohidrolasa, hidroliza los enlaces glucosídicos α -1,6 en el pululan, amilopectina y glucógeno tiene como producto principal la maltotriosa y maltosa (Swiss Institute of Bioinformatics, 2017), esta es usada como enzima complementaria para la hidrólisis de amilopectina junto con la α -amilasa, hidroliza fácilmente las amilopectinas del almidón (Gonzalez Tello et al., 1989). Las pululanases tienen un peso molecular que fluctúa entre 70kDa y 110kDa (Ruiz Cruz, 2012).

Isoamilasas (EC. 3.2.1.68): cataliza la hidrólisis de los enlaces glucosídicos α -(1,6) en glucógeno y amilopectina. La maltosa es el azúcar más pequeño que puede liberar de un enlace α -(1,6) (Swiss Institute of Bioinformatics, 2017).

A partir de esta información se puede proponer un esquema general de hidrólisis enzimática partiendo de amilosa y amilopectina, proveniente del proceso de gelatinización (Figura 3-5, luego se da la conversión de estos compuestos a otros de menor peso molecular con grado de polimerización entre 4 y 7, como maltosa, maltotriosa, maltotetrosa y maltopentosa, donde finalmente en el proceso de sacarificación son transformados a glucosa. Desde el proceso de gelatinización hasta el proceso de sacarificación, las enzimas implicadas no solo generan los componentes mayoritarios, también presentan en menor proporción la formación de moléculas de glucosa.

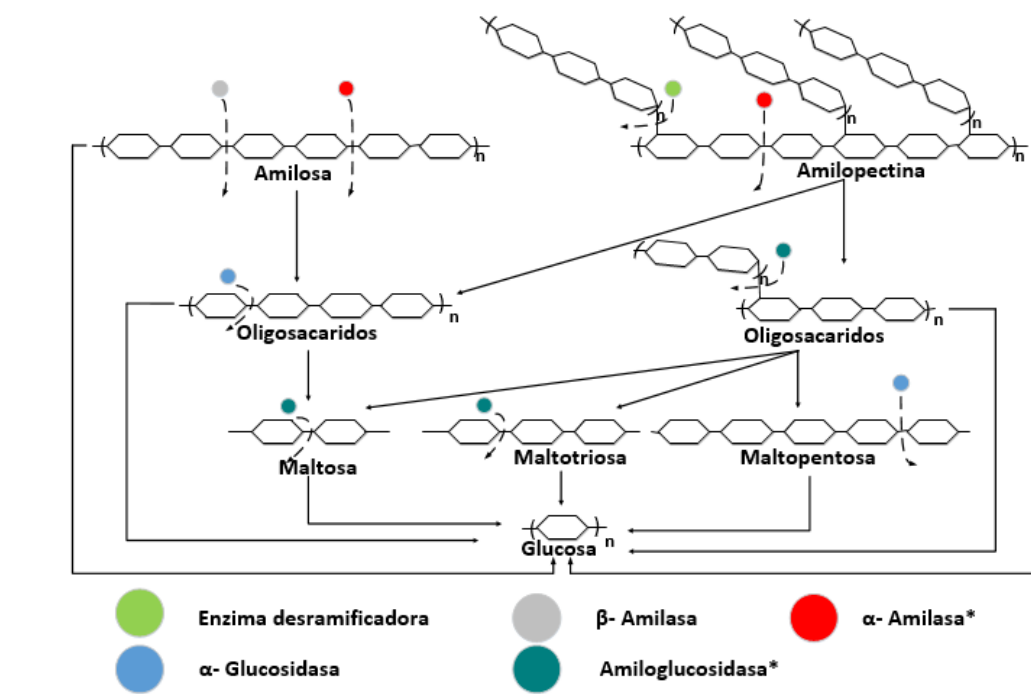


Figura 3-5. Acción de enzimas sobre la amilosa y amilopectina.

Es importante resaltar que no se conoce exactamente la ruta mediante la cual la amilosa y amilopectina es hidrolizada o como los oligosacáridos de mayor peso molecular llegan hasta maltosa, maltotriosa, maltotetrosa, maltopentosa y glucosa, el esquema de la Figura 3-5 es una generalización de los posibles puntos de ruptura por parte de las enzimas (dado su carácter endo o exo) sobre los oligosacáridos involucrados, como se discutirá en secciones posteriores los oligosacáridos como maltosa, maltotriosa y maltopentosa se pueden encontrar en mayor proporción respecto a otros.

3.3. Relaciones enzima-sustrato

Aspectos como el pH, la temperatura de operación y agitación del sistema, juegan un papel fundamental en el entendimiento de los procesos de hidrólisis enzimática, pero no son los únicos, variables como el porcentaje de sólidos y la relación enzima-sustrato (relación E/S) presentadas en secciones anteriores tienen un rol fundamental en estos procesos.

La relación E/S habla de la cantidad de enzima que se adiciona por cierta cantidad de almidón o en su defecto cantidad de masa. Es importante conocer estas cantidades dado que es común encontrar en este tipo de procesos inhibiciones por producto o sustrato (Zanin et al., 1996; Morales et al., 2008; Ruiz Cruz, 2012).

Tabla 3-3. Relaciones enzima sustrato para α -amilasa.

Relación E/S	Relación E/S ($L_{\alpha\text{-amilasa}}/TM_{\text{almidón seco}}$)	Referencia
0,068 %p/p	0,57	(Baks et al., 2008)
2,25mL α -amilasa/L almidón	2,25	(Ozbek and Semra, 2001)
1 %v/v	0,10	(Betiku et al., 2013)
0,8 μ L α -amilasa/g almidón	0,80	(Collares et al., 2012)
3kg α -amilasa/TM almidón	2,50	(Zabed et al., 2016)
0,5mL α -amilasa/kg masa	0,40	(Johnston and McAloon, 2014)
1,4:113 %p/p	11,67:941,67	(Ozbek and Semra, 2001)
1,2:1,4kg α -amilasa/TM almidón seco	1,40	(Genencor, 2006)

La Tabla 3-3 y Tabla 3-4 presentan diferentes relaciones E/S para las enzimas α -amilasa y AMG, respectivamente. Puede encontrarse una gran variedad de relaciones y en diferentes unidades incluso puede analizarse en función de la actividad enzimática (U) como se observa en la Tabla 3-1 y Tabla 3-2, Cuando asumimos que la densidad de las enzimas y del almidón diluido son aproximadamente 1,2g/mL y 1,0g/mL podemos llevar los valores a una unidad genérica ($L_{\text{enzima}}/TM_{\text{almidón seco}}^3$) (Genencor, 2006, 2007).

Tabla 3-4. Relaciones enzima sustrato para AMG.

Relación E/S	Relación E/S ($L_{\text{AMG}}/TM_{\text{almidón seco}}$)	Referencia
0,52 mg AMG /g almidón	0,43	(Collares et al., 2012)
0,075 %v/v	0,75	(Zabed et al., 2016)
0,4 mL AMG / kg masa^* (1,6 kg/MT maíz seco)	0,40	(Johnston and McAloon, 2014)
0,47uL AMG /g almidón	0,47	(Ruiz Cruz, 2012)
0,4 mL AMG /400mL solución almidón	1,00	(Zanin et al., 1996)
1,5mL AMG /L solución almidón	1,50	(Morales et al., 2008)
0,36:1kg AMG (0,29:0,88L AMG) / TM almidón seco	0,88	(Genencor, 2007)

*Se multiplicó por el porcentaje de almidón encontrado para este trabajo 80,70 %

Como punto de comparación se tiene la información trabajada por las fichas técnicas (última fila de cada Tabla), respecto al cual para α -amilasa se presentan relaciones superiores e inferiores este valor y para AMG la mayoría de valores están son inferiores a excepción de dos valores 1,00 y 1,50 ($L_{\text{AMG}}/TM_{\text{almidón seco}}$), los cuales pueden ser propuestos para su uso en el proceso.

3.4. Conclusiones

Las α -amilasas poseen rangos de operación para temperatura y pH superiores a los 50°C y 5,0, respectivamente, la amiloglicosidasa posee rangos de operación para temperatura y pH superiores a los 50°C y 4,0, respectivamente, de este modo puede pensarse en temperaturas

³Las unidades fueron organizadas de acuerdo con las reportadas por las fichas técnicas usadas donde $TM_{\text{almidón seco}}$ hace referencia a 1000kg de almidón seco

de operación similares (alrededor de los 60°C). Estas enzimas también poseen una diferencia en la cantidad de aminoácidos que la conforman 403 para la α -amilasa y 108 para la amiloglucosidasa lo que generan una variación en sus pesos moleculares, 60kDa y 60 : 70kDa, respectivamente, lo que les confiere propiedades diferentes a las enzimas, de modo que actúan sobre cadenas de oligosacáridos diferentes.

Para el proceso de hidrólisis enzimática se debe analizar de manera conjunta las condiciones del proceso y las condiciones óptimas de las enzimas como pH y temperatura, si bien no son los únicos factores que afectan, tienen una gran importancia a la hora de efectuarse el proceso, por ejemplo, las α -amilasas provenientes de hongos poseen un pH óptimo más ácido que aquellas provenientes de bacterias, animales o plantas, lo cual es debido al carácter acidófilo que por lo general poseen estos primeros. En contraste, aquellas α -amilasas producidas por bacterias soportan mejor condiciones alcalinas que el resto. En cuanto la temperatura se observa que las enzimas bacterianas tienden a ser termófilas, mientras que las fúngicas y animales requieren temperaturas más bajas, lo cual es debido a que a altas temperaturas estas comienzan a sufrir cambios conformacionales que decrecen de forma significativa su actividad (Pandey et al., 2017).

Entre las ventajas de emplear enzimas termoestables se incluye la reducción de la viscosidad de la mezcla de reacción, así como la contaminación con otros microorganismos. Muchas α -amilasas son metal-dependientes de iones divalentes como por ejemplo Ca^{+2} , Mg^{+2} , Mn^{+2} y Zn^{+2} . Suplementar el medio con Ca^{+2} es generalmente requerido para las α -amilasas bacterianas, dado que aumenta su termoestabilidad gracias a que expulsa los residuos hidrofóbicos de la proteína hacia el exterior por medio de un proceso de salting out. Sin embargo, algunos iones metales divalentes como el Li^{+2} , Cu^{+2} y el Hg^{+2} poseen efectos negativos (Pandey et al., 2017).

La importancia en la determinación y análisis de relaciones E/S, se fundamenta en su impacto en el escalado de procesos, aplicando la metodología propuesta en este trabajo y en como la variación del volumen del proceso, genera cambios significativos en las relaciones E/S.

4. Modelado, simulación y escalado del proceso de hidrólisis enzimática

4.1. Definición de modelo

Los modelos han sido ampliamente usados en la industria de procesos químicos, con gran potencial como herramienta de predicción, control, diseño, optimización y diagnóstico (Toro Alvarez, 2008; Monsalve-Bravo et al., 2014), Así mismo, se ha observado su aplicación en temas de escalado de procesos químicos y bioquímicos (Ruiz Colorado, 2009).

Son varias las definiciones que se pueden proponer para un modelo, una acorde a procesos químicos es la presentada por Basmadjian (1999), que también ha sido tomada por otros autores como Alvarez et al. (2009), la cual describe el modelo como una representación aproximada de un sistema de proceso, dicha representación puede ser de tipo material (maquetas para estudios hidrodinámicos), o ser una construcción matemática (conjunto de ecuaciones), se dice aproximación porque cada proceso que se desee modelar debe conocerse en detalle, frecuentemente y en el caso de modelos matemáticos esto presenta una gran dificultad, ya que no se conoce en detalle algunos fenómenos a modelar.

Alvarez et al. (2009) menciona como los modelos pueden ser de tres tipos: Mecanísticos, también conocidos como fenomenológicos o de caja blanca, fenomenológicos debido a que proviene de fenómenos como la transferencia de masa, la transferencia de calor y la transferencia de cantidad de movimiento (Morales Vélez, 2004) y son basados en fundamentos teóricos que permiten explicar perfectamente el comportamiento del proceso. Empíricos o de caja negra, construidos mediante experimentación y observación, haciendo luego uso de los datos experimentales para ajustar parámetros en una estructura matemática dada, pero es poco conocido el mecanismo real del proceso. Estos modelos emplean ecuaciones de ajuste donde los parámetros tienen muy poco, o ningún significado físico (Hangos and Cameron, 2001). Finalmente, una combinación de los dos tipos anteriores, llamados modelos de caja gris o semifísicos (si la estructura es fenomenológica) o semiempíricos (si la estructura es empírica). Este último es de especial interés ya que, en los procesos químicos y bioquímicos su modelado parte de los balances elementales de materia, energía y cantidad de movimiento, los cuales en su estructura son relaciones entre términos como variables, parámetros y constantes.

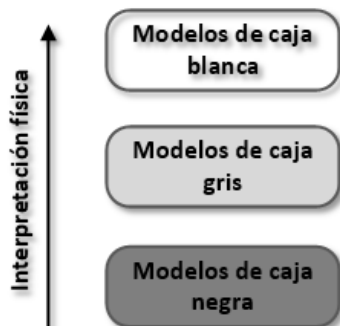


Figura 4-1. Tipos de modelos y su interpretación física (Monsalve-Bravo et al., 2014).

Respecto a este tipo de modelos, Monsalve Bravo (2014) presenta un diagrama que permite analizar la interpretación física de cada uno. Como se mencionó anteriormente, los modelos de caja negra presentan ecuaciones que contienen parámetros con muy poca o sin ninguna interpretación física, luego están los modelos de caja gris, los cuales presentan una combinación entre lo empírico y lo fenomenológico, y finalmente los modelos de caja blanca, compuesto en su totalidad por ecuaciones con un sentido como los balances elementales. Esto se menciona dada la importancia que tiene el uso de modelos fundamentados en la fenomenología del proceso, balances elementales de materia, energía y cantidad de movimiento y como estos se convierten en la base para la metodología de escalado aplicada en esta tesis.

Existen otro tipo de modelos, de acuerdo el tipo de ecuaciones que lo constituyen, el estado del proceso, respecto al tipo de operación del reactor, batch, continuo o semicontinuo, los parámetros que lo conforman, se deja al lector la búsqueda de estos para su entendimiento.

- Modelos lineales y no lineales
- Modelos estáticos y dinámicos
- Modelos discretos y continuos en el tiempo
- Modelos de parámetros distribuidos y concentrados.

Incluso se puede hablar de modelos cinéticos para describir el crecimiento celular los cuales pueden partir de una base simple y descripción de las células como un promedio (modelo no estructurado-no segregado) luego está el análisis de las células como un solo componente pero una población celular heterogénea (modelo no estructurado-segregado) y llegar a modelos más complejos como el análisis de la célula como un sistema multicomponente y descripción de las células como un promedio (modelo estructurado- no segregado) o el caso más complejo analizar las células como un sistema multicomponente y las poblaciones celulares de manera

heterogénea, lo que lleva a un nivel de detalle en donde cada célula es tratada de manera individual (modelo estructurado-segregado) (Casablanco and Santin, 1998; Ruiz Colorado, 2009).

La construcción de cada modelo dependerá del objetivo que se tenga con este sea realizar predicciones sobre el comportamiento de un sistema, tener un seguimiento de los principales sustratos o productos, analizar la respuesta de la variación de parámetros o variables, es por esto que para un mismo proceso se pueden presentar diferentes modelos, dependiendo de lo que se asume, lo que se conoce o puede ser calculado, todo desde la perspectiva del autor, es por esto que se dice que “todos los modelos están equivocados, algunos son útiles” (Hangos and Cameron, 2001).

4.2. Modelos de hidrólisis enzimática

Varios autores han trabajado el modelado del proceso de hidrólisis enzimática para materiales amiláceos, donde debe tenerse en cuenta los procesos de gelatinización, licuefacción y sacarificación. A continuación los trabajos más destacados.

Beschkov et al. (1983) presenta un modelo para el proceso de sacarificación con la enzima glucoamilasa, con la descripción de un modelo cinético para la formación de glucosa, maltosa e isomaltosa, a partir de tres reacciones reversibles, el modelo tiene en cuenta la inhibición por maltosa y maltotriosa. La expresión de la velocidad cinética para la hidrólisis de maltosa y maltotriosa es basada en una cinética de Michaelis-Menten, con inhibición competitiva por glucosa y una expresión de segundo orden para la condensación de glucosa en isomaltosa, las ecuaciones 4-1 y 4-2 son las expresiones que representan las velocidades de reacción, donde la primera hace referencia a maltosa o maltotriosa y la segunda a isomaltosa.

$$r_n = \frac{V_n - [M][G]/K_{(n-1)eq}}{Km(1 + [G]/Ki) + [MT]} \quad (4-1)$$

$$r_{IM} = KIM([G]^2 - [IM]/K_{2eq}) \quad (4-2)$$

Zanin et al. (1996) plantea un modelo para la sacarificación de almidón de yuca a partir de la enzima glucoamilasa y menciona como el proceso de licuefacción fue realizado por una α -amilasa. La formación de oligosacáridos con grado de polimerización mayor a 3 ($n > 3$) son tomados como oligosacáridos de grado de polimerización igual a 5, dado que son los que se generan en mayor cantidad. De acuerdo con la acción de la α -amilasa, supone que estos oligosacáridos presentan una fracción susceptible y otra resistente para la hidrólisis. También menciona como la hidrólisis de maltotriosa produce maltosa y es reversible, y la hidrólisis de

maltosa produce glucosa y es reversible, presenta formación de isomaltosa e inhibición por producto en el caso de la glucosa, la ecuación 4-3 es la expresión que representa de manera genérica la formación de alguno de los oligosacáridos de interés.

$$r_n = \frac{V_{mn}EG_n}{[K_{mn}(1 + G/K_i) + G_n + G_2K_{mn}/K_{m2} + G_3K_{mn}/K_{m3} + G_6K_{mn}/K_{m6} + 1/K_s]} \quad (4-3)$$

Paolucci-jeanjean et al. (2000) presenta una expresión cinética general para la concentración de producto en función del tiempo, en el proceso de licuefacción a partir de la enzima α -amilasa. La ecuación relaciona la velocidad de reacción de cada producto a la suma de las concentraciones de oligosacáridos con alto grado de polimerización, menciona como el modelo empírico se adapta satisfactoriamente a los datos de oligosacáridos con grado de polimerización de 1 a 7. La ecuación 4-4 es la expresión que representa de manera genérica la formación de oligosacáridos, el termino hS_0 hace referencia a la máxima cantidad del oligosacárido de interés que se puede formar a partir de la concentración inicial de sustrato y los términos p y q son parámetros que deben ser calculados experimentalmente.

$$V_f(n) = \left(\frac{p}{S_0} + q \right) \left(\sum_{i=m}^{inf} P_i - hS_0 \right) E \quad (4-4)$$

Morales et al. (2008) propone un modelo a partir de los modelos de (Zanin et al., 1996) y (Paolucci-jeanjean et al., 2000), presentando un modelo más elaborado en donde se pueden representar las etapas de licuefacción y sacarificación. Estos modelos presentan modificaciones con el fin de incluir aspectos que no fueron tomados en cuenta anteriormente, por ejemplo, en el proceso de licuefacción relaciona la actividad enzimática con la temperatura. En la etapa de sacarificación modifica el proceso para operar de manera continua, además permite la predicción de glucosa reducida debido a la inclusión de una constante de desactivación térmica, permitiendo así tener una simulación más completa del proceso y obtener mayor comprensión de las etapas de hidrólisis enzimática y de los mecanismos para la obtención de la glucosa. Se aclara que los oligosacáridos como maltotetraosa y maltohexosa se modelan en conjunto con la maltopentosa, debido a que se presentan en menor proporción respecto a esta última. Las ecuaciones 4-5 y 4-6 son las expresiones que representan las velocidades de reacción, para la licuefacción y sacarificación, el subíndice n indica que puede ser cualquiera de los oligosacáridos de interés.

$$r_f(n) = Kn \left(Xn \left(S - \sum_{i=1}^m C_i \right) - \sum_{i=1}^{inf} C_{i,lim} \right) \quad (4-5)$$

$$r_n = \frac{V_{mx} [G_n - (G_{n-1}^2/K_{eqn})]}{K_{mn} \left[1 + (G/K_I) + (1/K_S) + \sum_{j=2}^6 G_j/K_{m,j} \right]} \quad (4-6)$$

Presečki et al. (2012) Propone un modelo matemático para la hidrólisis de almidón a partir de dos tipos de α -amilasas, la cinética de ambas enzimas fue descrita por Michaelis-Menten, con inhibición no competitiva por producto, también analizo los efectos de pH y temperatura, menciona como se da la incorporación de un efecto de desactivación enzimática a partir de una ecuación de primer orden. La ecuación 4-7 presenta la expresión que describe la velocidad de reacción para este proceso.

$$r = \frac{EV_m C_{starch}}{K_m + C_{starch}(1 + C_{glucose}/K_{iG} + C_{maltose}/K_{iM})} \quad (4-7)$$

Dado que no se conoce con exactitud la forma en la que enzimas como la α -amilasa o amiloglicosidasa degradan la amilosa, amilopectina, se puede pensar que dado su carácter endo y exo pueden existir múltiples rutas o mecanismos de reacción. Una ruta es la propuesta por (Zanin et al., 1996) y también trabajada por (Morales et al., 2008) la cual se presenta en la Figura 4-2 izquierda. Una vez se tiene la amilosa y amilopectina expuesta pueden ser degradadas por la α -amilasa a unas velocidades de reacción (V_i) para formar maltosa, maltotriosa y maltopentosa en mayor proporción. Luego estas son hidrolizadas por la AMG a unas velocidades de reacción (r_i) hasta convertirse en glucosa. Pero no es la única opción, también puede darse de acuerdo con la Figura 4-2 derecha, en donde maltopentosa ya no se encargaría de generar maltotriosa y glucosa, sino maltosa y glucosa, lo cual nos lleva a formular tres procesos estequiométricos.

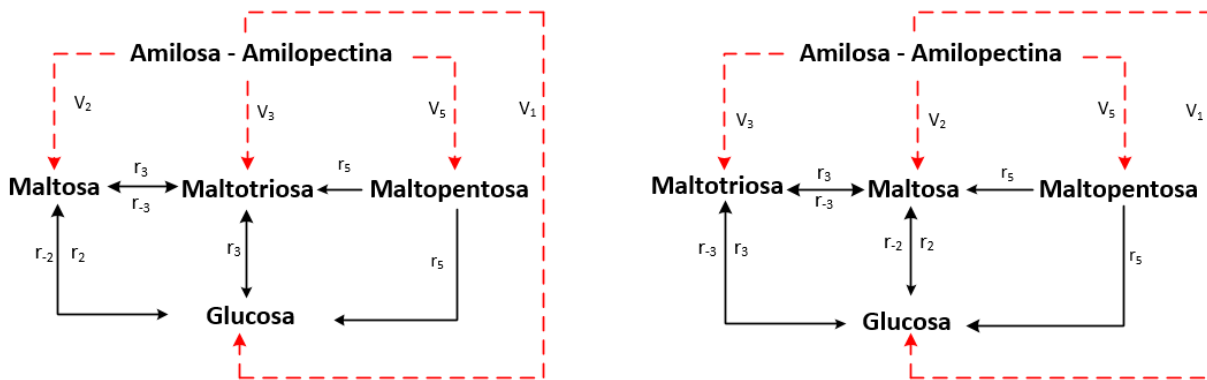
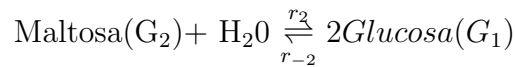
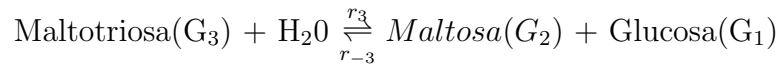
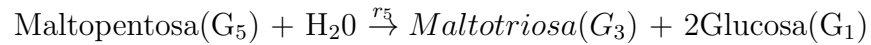
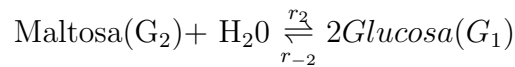
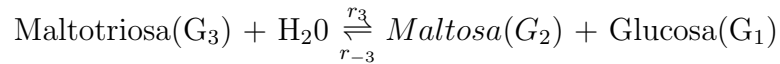
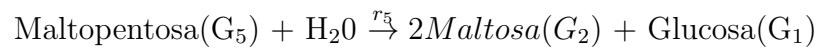


Figura 4-2. Mecanismos de hidrólisis enzimática de almidones.

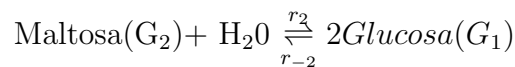
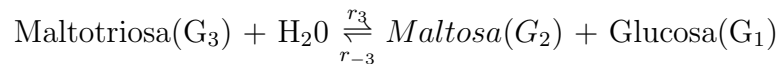
El primer mecanismo propone la hidrólisis de maltopentosa en una molécula de maltotriosa y dos de glucosa:



El segundo mecanismo propone la hidrólisis de maltopentosa en dos moléculas de maltosa y una glucosa:



El tercer mecanismo propone la hidrólisis de maltopentosa en una molécula de maltosa y tres de glucosa:



El modelado del proceso de hidrólisis enzimática puede ser analizado a través de cinéticas de primer orden, segundo orden y cinéticas basadas en el modelo de Michaelis-Menten. El modelo permite tener una aproximación del proceso real, siendo más representativo a medida que se tienen en cuenta más etapas del proceso (Figura 4-2) y efectos medio ambientales como pH, temperatura, desactivación enzimática por efectos térmicos u otros factores. Se deja como idea principal la propuesta de un modelo que abarque las principales etapas licuefacción, sacarificación, y tenga en cuenta dichos efectos medio ambientales. Se presentan como principales suposiciones el modelado de la hidrólisis de amilosa y amilopectina como un mismo sustrato y la unión de oligosacáridos como maltotriosa, maltotetrosa, maltohexosa y maltoheptosa como maltopentosa (Zanin et al., 1996; Morales et al., 2008), el mecanismo de reacción se fundamentara en el mejor ajuste del modelo propuesto a los datos experimentales obtenidos.

4.3. Simulación de procesos

La simulación de los modelos mencionados anteriormente se realiza a través de herramientas que tienen la capacidad de dar solución a ecuaciones diferenciales con sus respectivas condiciones iniciales o simplemente a ecuaciones algebraicas que representan el comportamiento de diversos fenómenos biológicos, químicos y físicos. La simulación permite tener una idea del comportamiento del proceso sin necesidad de realizar algún tipo de proceso experimental, basta con proponer unas condiciones iniciales y se podrá obtener una respuesta. Desde el planteamiento del modelo hasta su simulación lo que se logra obtener es una aproximación al proceso real, pero como lo menciona (Morales Vélez, 2004) esto confrontados con datos experimentales, aumentan el grado de comprensión del sistema real.

Para la solución de este tipo de problemas se utilizan software matemáticos como MATLAB[®], MATLAB[®] SIMULINK, Berkeley Madonna[®], que son software pagos, u otros como EMSO, Scilab, Python y otros que son gratuitos. Estos permiten la solución de las ecuaciones diferenciales ordinarias (ODE) que representan los balances elementales con ayuda de métodos numéricos; solo basta con que el usuario conozca conceptos básicos de programación para el trabajo con estos.

4.4. Escalado de procesos químicos y bioquímicos

4.4.1. Definición de escalado

A lo largo del tiempo se ha buscado la producción de grandes cantidades de productos de alto valor agregado, generados a partir de un proceso químico o bioquímico. Dado los costos y la complejidad que pueda presentar la generación de este, su producción generalmente va precedida de una etapa de investigación y desarrollo a nivel de laboratorio con bajos volúmenes, con el fin de encontrar las condiciones adecuadas que permitan tener una eficiencia satisfactoria para el proceso. Es por esto que se recurre al escalado de procesos como herramienta principal con la finalidad de fundamentar la toma de futuras decisiones en nuevas o ya existentes plantas de proceso (Anaya-durand and Pedroza-flores, 2008).

Han sido varios los autores que han buscado dar una definición certera al cambio de escala en procesos químicos y bioquímicos, (Casablancas and Santin, 1998) lo define como la instalación y operación de un equipo a escala industrial, cuyo diseño y condiciones de operación se basan en parte en la experimentación y demostración a una menor escala de operación, (González Castellanos, 2000) en su trabajo de tesis lo define como el proceso mediante el cual se logra la exitosa puesta en marcha y la operación económica de una unidad a escala comercial basándose, al menos en parte, en resultados de investigación realizada a escala más pequeña, la cual es una variante de la definición dada por (Johnstone and Thring, 1957),

definición muy similar a la propuesta años más tarde por (Bisio and Kabel, 1985). Anayadurand and Pedroza-flores (2008) habla del escalamiento como el proceso mediante el cual se desarrollan los criterios y las reglas de asignación numérica que determinan las unidades de medida significativas para llevar de un tamaño dado a otro tamaño mayor o menos una operación u objeto.

Para este trabajo se tomará como definición general de escalado la instalación y operación de un equipo a escala de tamaño industrial, cuyo diseño y condiciones de operación se basan en parte en la experimentación y demostración a una menor escala (Casablanco and Santin, 1998; Ruiz Colorado, 2009).

4.4.2. Problemas del escalado

El cambio de escala es por si solo un proceso complejo debido a la interacción de los múltiples factores que afectan la reología o comportamiento del sistema. Se generan problemas como cambios en los tiempos de respuesta del proceso, aparición de comportamientos cinéticos no contemplados (subproductos) y poca especificación del flujo de fluidos. De modo general esto se puede ver como la aparición de fenómenos no considerados en la baja escala (Kossen, 1994) debido a que no presentan un efecto significativo sobre el sistema como lo puede ser en grandes volúmenes donde hay una notoria interacción de los fenómenos de transferencia de masa, calor y de cantidad de movimiento (Ruiz and Alvarez, 2011).

En teoría, una reacción química o bioquímica tiene lugar a una velocidad de reacción que es independiente del tamaño del reactor y de su geometría. No obstante, la velocidad de reacción está afectada por los procesos físicos de transporte de cantidad de movimiento, materia y energía, que generalmente son controlados por la estructura y tamaño del reactor (Casablanco and Santin, 1998), con base en esto, los resultados esperados a partir de los ensayos a nivel de laboratorio pueden variar trabajando con grandes volúmenes, haciendo que el escalado sea un proceso no exacto y que muchas veces se realice de manera heurística, adicionalmente, en la escala de laboratorio los fenómenos predominantes son las reacciones químicas y bioquímicas, mientras que se supone que los fenómenos de transferencia de masa y calor se dan de manera adecuada. Al cambiar de escala, la hidrodinámica del proceso también lo hará, convirtiéndose estos últimos en los fenómenos más relevantes.

El método más utilizado para hacer escalado se basa en la selección del factor o factores más importantes del proceso, es decir, mediante el conocimiento del sistema se determina la etapa controlante y, sobre ésta, se aplican relaciones de carácter empírico, para conocer su magnitud en el proceso a gran escala. Este método introduce errores en el escalado, pues no hace consideraciones sobre los efectos del cambio en el volumen sobre las variables del proceso. Otro aspecto importante es el uso de modelos, los cuales se ha encaminado en su

formulación de manera empírica, y aplicación en la evaluación de diferentes condiciones de un proceso (simulaciones), sin ninguna experimentación (Ruiz Colorado, 2009), generando el sobrediseño y tanteo y error para el ajuste de las variables del modelo.

4.4.3. Principio de similitud

Para realizar un cambio de escala en el cual se puedan observar los resultados esperados a partir de la experimentación a nivel de laboratorio, sería ideal aumentar de manera progresiva el volumen del sistema hasta alcanzar el deseado a gran escala, pero dado que el interés de la aplicación del escalado es la obtención de grandes cantidades en el desarrollo de un nuevo producto o la operación del proceso a unas condiciones que permitan la obtención de una mejor cantidad y calidad del producto que ha sido probado a una escala menor satisfactoriamente, los costos podrían elevarse considerablemente así como los tiempos para la obtención de resultados, es por esto que el escalado recurre a distintas metodologías de cambio de escala, las cuales tienen como objetivo poder anticipar los efectos del cambio de escala, e introducir las variaciones requeridas en el diseño de los equipos cuando varia su tamaño (Casablancas and Santin, 1998).

El principio de similitud tiene que ver con las relaciones entre sistemas físicos de tamaños diferentes, esenciales para el cambio de escala de procesos químicos y bioquímicos. Para la aplicación del principio, se parte de considerar que los objetos materiales y los sistemas físicos en general, se caracterizan por tres cualidades: tamaño, forma y composición, las cuales son variables independientes. Esto quiere decir que dos objetos pueden diferir en tamaño teniendo la misma composición química y forma o pueden ser iguales en forma pero tener diferentes tamaños y estar compuestos de materiales diferentes. El principio está especialmente ligado con el concepto general de forma, aplicado a sistemas complejos, que incluye no solamente las proporciones geométricas de sus miembros sólidos y superficies, sino también factores como los patrones de flujo de fluidos, gradientes de temperaturas, perfiles de concentración, etc. En términos más precisos se define como: El principio de similaridad establece que la configuración espacial y temporal de un sistema físico, se determina por relaciones de magnitud dentro del sistema mismo y no depende del tamaño del sistema ni de las unidades de medida en las cuales se miden esas magnitudes (Johnstone and Thring, 1957; González Castellanos, 2000; Ruiz Colorado, 2009).

4.4.4. Métodos de escalado de procesos químicos

El escalado se puede realizar a partir de diversos métodos sea a partir de un análisis dimensional, una similaridad geométrica, relaciones empíricas, modelos, entre otros, como se presenta en la Figura 4-3.

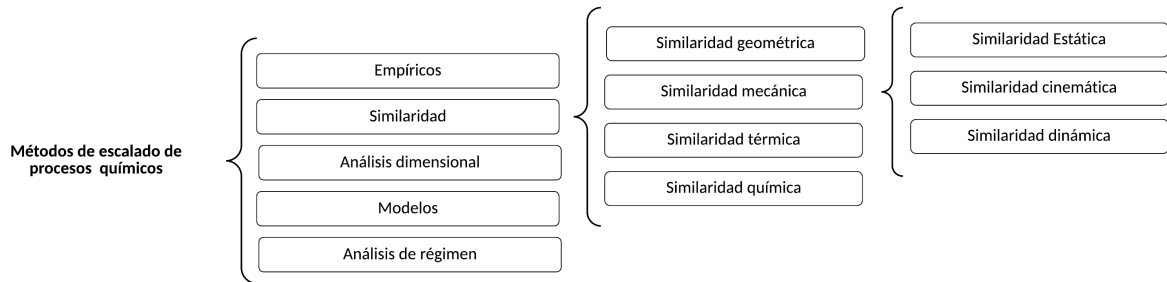


Figura 4-3. Métodos de escalado de procesos químicos.

4.4.4.1. Empíricos

Este tipo de métodos se basa en el uso de datos experimentales con los cuales se recurre a la formulación de relaciones matemáticas, y planteamiento de correlaciones empíricas, estas pueden ser usadas junto con el análisis dimensional, la similaridad o un modelo, permitiendo así escalar el proceso. Dado que es realizado a partir de datos experimentales y a unas condiciones específicas, el cambio de escala se convierte en algo impreciso en cuanto a los resultados esperados, presentándose como una desventaja y adicional a esto una limitación del proceso si se desea cambiar las condiciones del proceso (no es generalizable) (Ruiz Colorado, 2009).

4.4.4.2. Análisis dimensional

Es una técnica que permite expresar el comportamiento de un sistema físico en términos de un número mínimo de variables independientes de modo que no sean afectados por un cambio en las magnitudes de las unidades de medidas. Su resultado fundamental, el teorema de Vaschy-Buckingham (Teorema de π), el cual permite cambiar el conjunto original de parámetros de entrada dimensionales de un problema físico por otro conjunto de parámetros de entrada adimensionales más reducido. Estos parámetros adimensionales se obtienen mediante combinaciones adecuadas de los parámetros dimensionales y no son únicos, aunque si lo es el número mínimo necesario para estudiar cada sistema (Anaya-durand and Pedroza-flores, 2008), así, al obtener uno de estos conjuntos de tamaño mínimo se consigue:

- Analizar con mayor facilidad el sistema objeto de estudio.
- Reducir drásticamente el número de ensayos que debe realizarse para averiguar el comportamiento o respuesta de un sistema determinado.

El teorema π establece que si hay una ley física que da una relación entre cierto número de cantidades físicas, entonces hay una ley equivalente que puede ser expresada como la relación entra cierta cantidad adimensionales, a menudo denotadas como $(\pi_1, \pi_2, \pi_3, \dots)$ (Logan, 2013). El método se usa de la siguiente manera:

1. Contar el número de variables dimensionales n .
2. Contar el número de unidades básicas (longitud, tiempo, masa, temperatura, etc) .
3. Determinar el número de grupos adimensionales. Numero de $\Pi = (n - m)$.
4. Hacer que cada número $\Pi = f(n - m)$, dependa de $n-m$ variables fijas y que cada uno dependa además de una de las m variables restantes (se recomienda que las variables fijas sean una del fluido, una geométrica, y otra cinemática).
5. El número π que tenga la variable que se desea determinar se pone como función de los demás números adimensionales.
6. El modelo debe tener sus números adimensionales iguales a las del prototipo para asegurar similitud.
7. Se determina la dependencia del número adimensional requerido experimentalmente.

Para un mayor detalle de este procedimiento y algunos ejercicios buscar en el trabajo realizado por (Logan, 2013).

4.4.4.3. Similaridad

El principio de similitud busca mantener constantes los fenómenos que caracterizan el proceso y hacer uso de grupos adimensionales.

Johnstone and Thring (1957) habla de cómo la similitud puede definirse de dos maneras, especificando las relaciones de diferentes mediciones en el mismo cuerpo o de mediciones correspondientes en diferentes cuerpos. La forma geométrica de un cuerpo está determinada por sus proporciones intrínsecas, la relación entre la altura y ancho o ancho y espesor, etc. En cuerpos geoméricamente similares, todas estas relaciones (o factores de forma) son constantes. Alternativamente, cuando se comparan dos cuerpos geoméricamente similares, existe una relación constante entre sus respectivas alturas, amplitudes y otras mediciones correspondientes, que se denomina relación de escala. El segundo método tiene la ventaja práctica de que una proporción de escala única se sustituye por una serie de factores de forma. Por esta razón, la similitud geométrica se define mejor en términos de correspondencia y proporción de escala: Pero, habiéndose hecho esto, la similitud con respecto a otras variables tales como velocidad, fuerza o temperatura puede definirse generalmente por una única razón intrínseca para cada sistema. Una correspondencia geométrica punto a punto entre dos sistemas asegura que si todos los valores de la relación intrínseca son iguales, entonces los valores de los puntos correspondientes serán iguales en todas partes. Estas relaciones intrínsecas son grupos adimensionales que definen similitud bajo diferentes condiciones. Por tanto, cuando se dice que dos sistemas son semejantes es necesario, además especificar cuáles

con las configuraciones internas de los mismo que se comparan, geométricas, cinemáticas, terminas, etc.

Cuatro estados de similitud son importantes en ingeniería química de acuerdo con la naturaleza de las variables que presentan similitud: Geométrica, mecánica, térmica y (bio)química. Aquí cada una de ellas es un pre-requisito para la siguiente, en el orden que se han introducido, por ejemplo, para tener similitud química se requiere tener similitud térmica, mecánica y geométrica (Johnstone and Thring, 1957).

Similaridad geométrica: Ha sido mejor definida en términos de correspondencia y por tanto por el factor de escala, el cual relaciona las distintas dimensiones lineales de un sistema con las del otro, de otra forma, se define entonces que dos cuerpos son geoméricamente semejantes cuando para cada punto en uno de ellos existe al menos un punto correspondiente en el otro, donde existe una relación o factor de escala constante (González Castellanos, 2000).

Similaridad mecánica: Esta similitud puede ser considerada una extensión del concepto de similitud geométrica a los sistemas estacionarios o en movimiento, bajo la influencia de fuerzas. Según el tipo de sistemas y de fuerzas, esta Similitud puede ser estática, cinemática o dinámica.

- Similaridad estática: Se relaciona con los cuerpos sólidos o estructuras sometidas a tensiones constantes. Dos cuerpos geoméricamente semejantes son semejantes estáticamente cuando ante tensiones contantes, sus deformaciones relativas son tales que permanecen geoméricamente semejantes.
- Similaridad cinemática: La similitud cinemática se relaciona con sólidos o sistemas fluidos en movimiento, lo que añade a las tres coordenadas espaciales, en las cuales se puede trabajar la similitud estática, la dimensión adicional del tiempo. Los sistemas en movimiento semejantes geoméricamente son cinemáticamente semejantes, cuando partículas correspondientes trazan trayectorias semejantes geoméricamente en intervalos de tiempo correspondientes.
- Similaridad dinámica: La similitud dinámica se relaciona con las fuerzas que aceleran o retardan masa en movimiento en sistemas dinámicos. Las fuerzas de una misma clase (gravitacional, centrífuga, etc.) que actúan sobre partículas correspondientes en tiempos correspondientes, se denominan fuerzas correspondientes, así, los sistemas en movimiento geoméricamente semejantes son dinámicas semejantes cuando las relaciones entre todas las fuerzas correspondientes son iguales.

En los sistemas fluidos o en los sistemas compuestos por partículas sólidas discretas, la similitud cinemática necesariamente conlleva la similitud dinámica puesto que el movimiento

del sistema es función de las fuerzas aplicadas al mismo. En los sistemas de flujo de fluidos, la similitud dinámica es de importancia directa cuando se desea predecir caídas de presión o consumos de potencia. En el caso de la transferencia de calor y masa o en las reacciones químicas, su importancia es principalmente indirecta, como una vía para establecer la similitud cinemática (González Castellanos, 2000).

Similitud térmica: La similitud térmica tiene que ver con sistemas en los cuales hay flujo de calor, por lo que introduce la dimensión de temperatura, además de las dimensiones de longitud, masa y tiempo. El calor puede fluir de un punto a otro por radiación, convección, conducción y movimiento global de materia mediante la acción de un gradiente de presión. Para los primeros tres procesos se requiere un gradiente de diferencias de temperaturas y por ello, si se mantienen las otras dos condiciones iguales, la variación con respecto al tiempo del flujo de calor entre dos puntos varía con la diferencia de temperatura entre ellos. El cuarto proceso de transferencia de calor, el movimiento global de la materia, depende a su vez de la forma de movimiento o del patrón de flujo del sistema y por consiguiente en sistemas térmicos en movimiento, la similitud térmica requiere de la similitud cinemática. La similitud térmica se define entonces planteando que: Dos sistemas geoméricamente semejantes son térmicamente semejantes cuando la relación entre las diferencias de temperatura correspondientes es constante y cuando los sistemas, si están en movimiento, son cinemáticamente semejantes.

Similitud química: La similitud química se relaciona con sistemas en los que se desarrollan reacciones químicas y en los cuales la composición varía de un punto a otro y en los procesos discontinuos o cíclicos de un instante a otro. Para esta Similitud no se requiere introducir nuevas dimensiones, pero hay uno o más parámetros de concentración, en dependencia del número de compuestos químicos variables independientes, con respecto a los cuales se establece la similitud. No es necesario, tampoco, que la composición química en los dos sistemas sea la misma, aunque debe existir una relación fija entre las concentraciones puntuales de los compuestos que son comparados.

La variación con respecto al tiempo de la acción química depende de la temperatura, la razón de cambio de la difusión depende del gradiente de concentración y la razón de cambio del transporte global depende de la trayectoria del flujo. Por consiguiente, la similitud química necesita tanto de la Similitud térmica como de la cinemática y, a su vez, depende de las diferencias de concentración más que de las concentraciones absolutas. Con esa base se define la similitud química: Sistemas semejantes geométrica y térmicamente son semejantes químicamente cuando las diferencias de concentración correspondientes mantienen una razón constante entre ellas y cuando dichos sistemas, si están en movimiento, son cinemáticamente semejantes.

4.4.4.4. Modelado

Los sistemas pueden ser representados en su mayoría por modelos basados en ecuaciones diferenciales que son planteadas a partir de los balances de materia y energía, junto con un conjunto de ecuaciones constitutivas que permiten darle una rigurosidad al modelo. Lo ideal sería que este estudio se pudiera realizar de manera teórica, sin necesidad de experimentos, dando solución a dichas ecuaciones (González Castellanos, 2000). La complejidad del modelo dependerá de cuan exacto y confiable se desea elaborar el proceso. Autores como (Johnstone and Thring, 1957) y (Bisio and Kabel, 1985) concuerdan con la idea que un escalado apropiado puede deducirse y llevarse de manera satisfactoria a partir del modelo apropiado.

4.4.4.5. Análisis de régimen

El análisis de régimen se usa para interpretar el proceso a gran escala al comparar diferentes tiempos característicos del proceso, luego se establece un sistema de simulación de escala basado en esta información. Se ha demostrado que es una forma efectiva de investigar el efecto de los entornos oscilantes sobre el comportamiento metabólico y fisiológico de las células en un equipo de laboratorio. Se han diseñado varios sistemas de reducción de escala para investigar los efectos de heterogeneidad tales como pH, temperatura, oxígeno disuelto y sustrato en la fisiología de bacterias, levaduras, hongos filamentosos y células de mamíferos (Xia et al., 2015).

Sweere et al. (1987) presenta una revisión del escalado de procesos y menciona como es común dividirlos en cuatro etapas, un análisis de régimen, la simulación del proceso, optimización del modelado y su aplicación en los diferentes procesos. Permitiendo obtener a partir del análisis de régimen respuesta a varias preguntas como ¿cuál es el mecanismo limitante?, ¿el proceso está regido por un único mecanismo (mecanismo puro) o por más mecanismo (régimen mixto) ?, ¿Cómo se darán los cambios en el régimen?. El análisis debe permitir cambios de escala, cambios en los parámetros del proceso y el curso del proceso. Un factor importante en el rendimiento de los microorganismos es si el régimen existente será caracterizado por la limitación del sustrato o nutrientes, las fluctuaciones en el entorno de las celdas, por ejemplo, en la concentración de un componente, en el pH, en la temperatura o velocidad de cizallamiento, afectando así el rendimiento de biomasa o productos.

Esta metodología se divide en el análisis de parámetros característicos, por ejemplo, los tiempos característicos y en un análisis de sensibilidad de parámetros (Sweere et al., 1987). En la comparación de tiempos característicos para los diferentes mecanismos involucrados en el proceso de fermentación global. El tiempo característico de cierto proceso, que se modela como un proceso de primer orden, se define como el recíproco de la constante de velocidad. Para los procesos que no son de primer orden, el tiempo característico se puede calcular como la relación entre la capacidad (por ejemplo, el contenido volumétrico de las especies

consideradas) y el flujo (por ejemplo, la tasa de consumo volumétrico de las especies). Al analizar las características de los tiempos, es posible identificar posibles problemas, como la limitación de oxígeno en el proceso a gran escala. El análisis de régimen también puede sugerir estudios adicionales a escala reducida, como la exposición repetida al agotamiento del sustrato. Algunos de los tiempos característicos trabajados son el tiempo de circulación, tiempo de mezcla, transferencia de masa en procesos gas-líquido, tiempo de crecimiento de biomasa, tiempo de consumo del sustrato, o de adición de sustrato (Sweere et al., 1987; Nielsen et al., 2014).

4.4.5. Métodos de escalado de procesos bioquímicos

Similar a los procesos químicos, se basa en el concepto de similitud ($m' = k * m$) entre los valores de una magnitud independiente en ambos equipos, el de pequeña escala (m) y el de gran escala que se está diseñando (m'), siendo k el factor de escala (Casablanca and Santin, 1998).

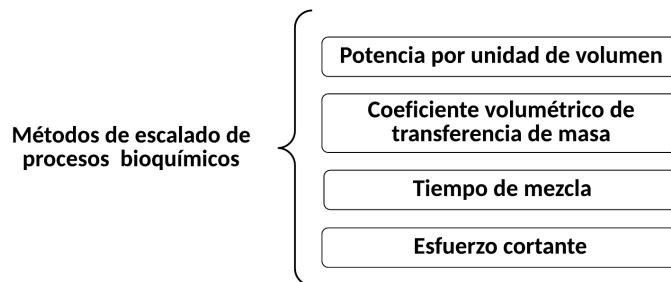


Figura 4-4. Métodos de escalado de procesos bioquímicos.

Al igual que en procesos químicos, los procesos bioquímicos pueden presentar la dificultad a la hora de realizar un cambio de escala. Las técnicas usualmente usadas en procesos químicos proporcionan en este tipo de casos, cierto conocimiento para el escalado, pero esto no es suficiente para llegar a una descripción completa del problema, dado que se necesita información de las rutas metabólicas, influencia del flujo por unidad de área del reactor sobre la reacción, efectos de mezcla del sustrato en el medio del reactor (Ruiz Colorado, 2009), por esto se trabaja en conjunto con el análisis de régimen, llegando al planteamiento de criterios que son más comúnmente usados en el cambio de escala de procesos bioquímicos. Con base en esto, investigaciones y trabajos se han basado en mantener una similitud geométrica y además mantener constantes variables como: la agitación por unidad de volumen, coeficiente volumétrico de transferencia de masa, esfuerzo cortante máximo, tiempo de mezcla, las cuales se describen de manera breve a continuación.

4.4.5.1. Potencia por unidad de volumen constante

Habla de la potencia suministrada a un sistema sea por agitación o aireación y como tiene un efecto sobre la hidrodinámica del sistema y las propiedades de transferencia de masa. Mostrando como la P/V determina el número de Reynolds, que a su vez tiene influencia sobre la turbulencia del sistema y así sobre los valores de los coeficientes de transferencia de masa, también la velocidad lineal del agitador puede influir determinando el esfuerzo cortante máximo y sobre el tamaño de las burbujas en caso de ser un sistema con aireación.

4.4.5.2. Coeficiente volumétrico de transferencia de masa

En procesos bioquímicos es común mantener constante para un cambio de escala el coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno, entre la fase gas (generalmente aire) y el medio de cultivo, esto es debido a la dificultad de la transferencia de oxígeno en procesos como fermentaciones aerobias a grandes escalas.

4.4.5.3. Tiempo de mezcla

Se trata de como los tiempos de mezcla dependen del tamaño del equipo, es un método muy impreciso, dado que el cambio de escala puede generar zonas muertas y gradientes de concentración, algo no deseado en este tipo de procesos.

Esfuerzo cortante

Fuerza que se ejerce sobre las células o microorganismos del sistema, lo que impone como una limitación para el cambio de escala en procesos bioquímicos, actualmente no se cuenta con la capacidad de relacionar el esfuerzo cortante con la morfología y actividad de las células, de manera que como indicación se toma la forma general la máxima velocidad lineal del agitador.

4.5. Conclusiones

El escalado de procesos químicos y bioquímicos puede realizarse a partir de diferentes metodologías todas fundamentadas en el principio de similitud; aunque muchas de ellas se realizan de manera satisfactoria, siguen ignorando fenómenos que a baja escala no son significativos, pero a medida que aumenta el volumen del proceso empiezan a tener efectos sobre la dinámica de este mismo; efectos como cambios en los tiempos de respuesta del proceso, aparición de comportamientos cinéticos no contemplados (subproductos), poca especificación del flujo de fluidos y los cambios en las materias primas sobre el producto. Estas son algunas de las dificultades con la que se debe enfrentar al momento de realizar escalado de proceso.

La fenomenología del proceso de interés siempre debe tenerse en cuenta a la hora de realizar algún proceso productivo, es indispensable tener una metodología que permita realizar el

análisis sin necesidad de llevar a cabo ensayos en planta o laboratorio, es por esto que los modelos son una herramienta que cada vez revoluciona la forma de trabajar un proceso de interés, su complejidad varía dependiendo del objetivo, desde la compartimentación celular hasta la caracterización de células individuales.

Los modelos semifísicos de base fenomenológica permiten abordar esta área de interés desde el análisis en el tiempo, todo a partir de los balances elementales del proceso, permitiendo caracterizar los comportamientos entre compuestos involucrados, como se generan o consumen, las interacciones entre ellos que pueden llevar a efectos inhibitorios y la generación de los problemas típicos del escalado, todo esto fundamentado en lo que es la dinámica del proceso.

5. Análisis dinámico de procesos

5.1. Análisis de sistemas de control en el espacio de estados

Un sistema moderno complejo posee muchas entradas y muchas salidas que se relacionan entre sí de una forma complicada. Para analizar un sistema de este tipo, es esencial reducir la complejidad de las expresiones matemáticas (Ogata, 2013). La teoría de control es una herramienta que permite realizar este tipo de análisis de manera que todo el proceso se centre en el análisis en el espacio de estados, debe aclararse que la teoría de control convencional se basa en la relación entrada-salida, o función de transferencia, la teoría de control moderna se basa en la descripción de las ecuaciones de un sistema en términos de n ecuaciones diferenciales de primer orden, que se combinan en una ecuación diferencial vectorial de primer orden (Ogata, 2013).

Como parte de este análisis se deben definir algunos conceptos básicos trabajados por varios autores, como la representación de sistemas en el espacio de estados, la controlabilidad y la observabilidad de estado (Ziegler and Nichols, 1943; Kalman, 1959; Skogestad and Postlethwaite, 1998; Ogata, 2013) y utilizada en diversas aplicaciones como control de plantas de proceso, selección de lazos de control, diseño integrado (Toro Alvarez, 2008), escalado (Ruiz Colorado, 2009; Monsalve Bravo, 2014).

5.1.1. Controlabilidad de estado

Kalman (1959) un sistema es controlable si existen acciones de control $u_1(t)$ definidas en un intervalo de tiempo finito ($0 \leq t \leq t_1$) capaces de llevar el sistema desde un estado inicial hacia un estado final, es decir, un sistema es controlable en el tiempo t_0 si se puede transferir desde cualquier estado inicial $x(t_0)$ a cualquier otro estado, mediante un vector de control sin restricciones, en un intervalo de tiempo finito (Skogestad and Postlethwaite, 1998; Ogata, 2013). Esto se representa por el vector diferencial lineal de ecuaciones de orden n :

Para un sistema dinámico continuo en el tiempo:

$$\begin{aligned}\frac{dx}{dt} &= F(t)x + D(t)u(t) \\ y(t) &= B(t)x(t)\end{aligned}\tag{5-1}$$

O para un sistema dinámico discreto en el tiempo:

$$\begin{aligned}x(t_{k+1}) &= \phi(t_k)(x(t_k) + A(t_k)u(t_k)) \\ y(t) &= B(t_k)x(t_k)\end{aligned}\tag{5-2}$$

Donde es equivalente representar los sistemas como:

Sistema continuo en el tiempo:

Sistema discreto en el tiempo:

$$\begin{aligned}\frac{dx}{dt} &= A_c x + B_c u \\ y &= C_c x\end{aligned}\qquad\qquad\begin{aligned}x(j+1) &= A_d x(j) + B_d u(j) \\ y(j) &= C_d x(j)\end{aligned}\tag{5-3}$$

Dónde: $x \in R^n$ es el vector de estados del sistema, $u \in R^m$ es el vector de las entradas manipuladas y $y \in R^l$ es el vector que contiene los valores de las salidas medidas. Este es completamente controlable si y sólo si el rango (rC_0) de la matriz de controlabilidad C_0 es igual al orden n del sistema, su determinante es diferentes de cero o que sus componentes son linealmente independientes (Ruiz Colorado, 2009; Ogata, 2013), es decir, los n vectores columna $B, AB, \dots, A^{n-1}B$ de la matriz 5-4 son linealmente independientes (la matriz es no singular).

$$C_0 = [B \ AB \ \dots \ A^{n-1}B]\tag{5-4}$$

Si el sistema no es controlable, se dice que la diferencia entre el rango de la matriz y el orden del sistema corresponde a los modos no controlables del sistema. Aquí debe aclararse que la controlabilidad implica estrictamente que el estado final alcanzado sea el origen. Si se trata de cualquier estado final, el concepto es alcanzabilidad (Ruiz Colorado, 2009; Toro Alvarez, 2008). De la anterior definición, se puede notar que la controlabilidad de estado sólo tiene en cuenta los estados x del sistema en relación con las entradas u , independientemente de lo que ocurra con las salidas y (Ruiz Colorado, 2009). Cuando el sistema es llevado a términos discretos se puede llegar a una herramienta que permite evaluar la controlabilidad de la salida, matriz de controlabilidad de salida o matriz de Hankel, esta no permite cuantificar dicha controlabilidad, solo la evalúa como una condición que se cumple o no en el sistema, si el

sistema resulta controlable, no se puede discriminar cuan controlable es (Toro Alvarez, 2008).

Como lo mencionó Ogata (2013) la definición de controlabilidad es la capacidad de llevar un sistema desde un estado a otro, mediante un vector de control sin restricciones, en un intervalo de tiempo finito, esto se fundamenta en la principal suposición del trabajo realizado por Kalman (1959), donde u_k es de manera general una función constante en todo el intervalo $(-T,0),(0,T)$, donde T es positivo pero de otra manera arbitraria, en otras palabras, la acción de control no presenta restricciones, es decir no es acotada y por lo tanto, la controlabilidad está garantizada en el intervalo $(-\infty, +\infty)$ de esta variable manipulada (Ruiz Colorado, 2009).

Skogestad and Postlethwaite (1998) mencionan una desventaja de la controlabilidad de estado, no considera la calidad de la respuesta entre y después de los dos estados, inicial y final; además no indica cuántas acciones de control se requieren para alcanzar el estado final. La controlabilidad de estado, pese a ser un concepto riguroso, no es capaz de medir o cuantificar la controlabilidad de los estados y se limita simplemente a evaluarla en un sentido binario.

5.1.2. Observabilidad de estado

Kalman (1959) define un sistema como observable, si todos los valores de estado x en el tiempo 0 pueden ser determinados a partir de las medidas de las salidas del sistema $y_1(t)$ en un intervalo de tiempo finito $(0 \geq t \geq t_2)$, es decir, se dice que un sistema es observable en el tiempo t_0 si, con el sistema en el estado $x(t_0)$, es posible determinar este estado a partir de la observación de la salida durante un intervalo de tiempo finito (Skogestad and Postlethwaite, 1998; Ogata, 2013). Este concepto se define dado que la controlabilidad de estado no tiene en cuenta la salida. De acuerdo con su definición, un sistema es observable si el estado puede ser determinado a partir de la observación de la salida durante un intervalo de tiempo finito. Según esto, el sistema es completamente observable si cada variable de estado del sistema afecta a alguna de las salidas medibles (Ruiz Colorado, 2009).

En los sistemas lineales, se dice que un sistema es completamente observable si y sólo si el rango rO_b de la matriz de observabilidad O_b es igual al orden n del sistema o tiene n vectores columna linealmente independientes (Ruiz Colorado, 2009; Ogata, 2013), es decir, los n vectores columna C, CA, \dots, CA^{n-1} de la matriz 5-5 son linealmente independientes (la matriz no es singular).

$$O_b = [C \ CA \ \dots \ CA^{n-1}]^T \quad (5-5)$$

5.2. Matriz de Hankel

El uso de la matriz de Hankel (\mathcal{H}) surge en diversas áreas de la matemática, tales como problemas relacionados con el poder de momentos, teoría de la interpolación y teoría del control. Dentro de estas áreas, el potencial de esta herramienta ha sido explorado en la reducción de modelos, identificación de sistemas, diseño de filtros digitales, la determinación del orden del modelo y el diseño de los controladores al determinar emparejamientos de entrada-salida (Monsalve Bravo, 2014).

La matriz de Hankel y su interpretación consideran el sistema lineal discreto en el tiempo y es descrito por el modelo de espacio de estados:

$$\begin{aligned} x(k+1) &= A_d x(k) + B_d u(k) \\ y(k) &= C_d x(k) \end{aligned} \quad (5-6)$$

Dónde: $x(k) \in R^n$ es el vector de estados del sistema, los vectores de entrada y salida $u(k) \in R^p$, $y(k) \in R^m$, respectivamente, $A_d \in R^{n \times n}$, $B_d \in R^{n \times p}$, $C_d \in R^{m \times n}$, son las matrices del sistema, control y salidas respectivamente, las cuales son constantes.

Empíricamente la matriz de Hankel se define como la respuesta impulso del sistema y se calcula a partir de los parámetros de Markov, que son los valores de la respuesta impulso del sistema (Toro Alvarez, 2008; Ruiz Colorado, 2009), esto sucede si $x(0) = 0$ (Monsalve Bravo, 2014), definiéndose como:

$$h_i = C_d A_d^{i-1} B_d \quad i = 1, 2, 3, \dots, j \quad (5-7)$$

Donde la matriz de Hankel está dada por, asumiendo $i = 1$ y $j = n - 1$

$$\mathcal{H} = \begin{bmatrix} h_i & h_{i+1} & h_{i+2} & \cdots & h_{i+j} \\ h_{i+1} & h_{i+2} & h_{i+3} & \cdots & h_{i+j+1} \\ h_{i+2} & h_{i+3} & h_{i+4} & \cdots & h_{i+j+2} \\ \vdots & \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ h_{i+j} & h_{i+j+1} & h_{i+j} & \cdots & h_{i+j+2} \end{bmatrix} \quad (5-8)$$

Si el sistema es de orden n , la matriz de Hankel $\mathcal{H}_{i,i+r}$ es no singular para $r \leq n$ y singular para $r > n$. Adicionalmente, el rango de la matriz de Hankel es el número de filas linealmente independientes de la matriz y por lo tanto el orden del sistema.

Se puede demostrar que la matriz de Hankel es el producto de las matrices de observabilidad y controlabilidad:

$$\mathcal{H}_{i,j} = \begin{bmatrix} C \\ CA \\ \vdots \\ CA^{n-1} \end{bmatrix} [B \ \cdots \ A^{n-2}B \ A^{n-1}B] \quad (5-9)$$

Investigaciones como las realizadas por Moore (1981) presentan la relación entre las matrices de observabilidad y controlabilidad a través de la matriz de Hankel, mediante el análisis dinámico de procesos y la descomposición en valores singulares, aplicada a la reducción de modelos, otras como las realizadas por Van De Wal and De Jager (2001) menciona como las entradas diagonales de la matriz de Hankel reflejan la interacción entre la controlabilidad y observabilidad, en donde ambas tienen un sentido binario, es decir, una planta presenta o no la propiedad.

De modo general, para un sistema discreto es equivalente a decir:

$$\mathcal{H} = \begin{bmatrix} C_d B_d & C_d A_d B_d & C_d A_d^2 B_d & \cdots & C_d A_d^{n-1} B_d \\ C_d A_d B_d & C_d A_d^2 B_d & C_d A_d^3 B_d & \cdots & C_d A_d^n B_d \\ C_d A_d^2 B_d & C_d A_d^3 B_d & C_d A_d^4 B_d & \cdots & C_d A_d^{n+1} B_d \\ \vdots & \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ C_d A_d^{n-1} B_d & C_d A_d^n B_d & C_d A_d^{n+1} B_d & \cdots & C_d A_d^{2n-2} B_d \end{bmatrix} \quad (5-10)$$

5.2.1. Obtención de la matriz de observabilidad

El sistema representado de manera discreta en el tiempo es observable si hay un k finito, tal que el conocimiento de las entradas $u(0), u(1), \dots, u(k)$ y de las salidas $y(0), y(1), \dots, y(n-1)$ es suficiente para determinar el estado inicial del sistema. Como simplificación se supone que $u(k) = 0$ y que $y(0), y(1), \dots, y(n-1)$ son conocidos.

$$\begin{aligned} x(k+1) &= A_d x(k) & x(0) &= x_0 = \text{Desconocido} \\ y(k) &= C_{(d)} x(k) \end{aligned} \quad (5-11)$$

Para determinar la matriz de observabilidad, es necesario establecer si es posible conocer el comportamiento dinámico completo del sistema definido en el anterior sistema usando solo la información medida en las salidas (Toro Alvarez, 2008), con esto puede escribirse el siguiente conjunto de ecuaciones para $k = 0, 1, 2, \dots, n-1$ (Toro Alvarez, 2008; Ruiz Colorado, 2009), esto aparece como solución verdadera de las ecuaciones de estado invariantes en el tiempo $\frac{dx}{dt} = Ax(t)$ (Ogata, 2013):

$$\begin{aligned}
y(0) &= C_d x(0) \\
y(1) &= C_d x(1) = C_d A_d x(0) \\
y(2) &= C_d x(2) = C_d A_d^2 x(0) \\
&\vdots \\
y(n-1) &= C_d x(n-1) = C_d A_d^{n-1} x(0)
\end{aligned}$$

De manera vectorial esto es:

$$\begin{bmatrix} y(0) \\ y(1) \\ y(2) \\ \vdots \\ y(n-1) \end{bmatrix}_{nm,1} = \begin{bmatrix} C_d \\ C_d A_d \\ C_d A_d^2 \\ \vdots \\ C_d A_d^{n-1} \end{bmatrix}_{nm,n} x(0) = O(b)x(0) \quad (5-12)$$

Finalmente se obtiene la matriz de observabilidad $O_b(A_d, C_d) \in R^{nm \times n}$, la cual presenta la salida del sistema en función del estado inicial, es decir la relación entre el estado inicial $x(0)$ y la secuencia de mediciones de la salida $y(0), y(1), \dots, y(n-1)$.

5.2.2. Obtención de la matriz de controlabilidad

Si se supone que se conoce el estado inicial $x(0)$ para el sistema discreto presentado y asumiendo una solución similar a la anterior Ogata (2013) se obtiene el siguiente sistema de ecuaciones:

$$\begin{aligned}
x(1) &= A_d x(0) + B_d u(0) \\
x(2) &= A_d x(1) + B_d u(1) = A_d^2 x(0) + A_d B_d u(0) + B_d u(1) \\
x(3) &= A_d x(2) + B_d u(2) = A_d^3 x(0) + A_d^2 B_d u(0) + A_d B_d u(1) + B_d u(2) \\
&\vdots \\
x(n) &= A_d^n x(0) + A_d^{(n-1)} B_d u(0) + A_d^{(n-2)} B_d u(1) + \dots + A_d B_d u(n-2) + B_d u(n-1)
\end{aligned}$$

De manera vectorial esto es:

$$x(n) = A_d^n x(0) + [B_d \ A_d B_d \ \dots \ A_d^{n-2} B_d \ A_d^{n-1} B_d]_{n,np} \begin{bmatrix} u(n-1) \\ u(n-2) \\ \vdots \\ u(1) \\ u(0) \end{bmatrix}_{np,1} \quad (5-13)$$

Esta es la matriz de controlabilidad $C_o(A_d, B_d) \in R^{n \times np}$, la cual relaciona las entradas del sistema anteriores $u(0), u(1), \dots, u(n-1)$ y el actual estado $x(n)$.

5.2.3. Definición de la matriz de Hankel

Evaluando la matriz de observabilidad para un tiempo n cualquiera:

$$\begin{bmatrix} y(n) \\ y(n+1) \\ y(n+2) \\ \vdots \\ y(2n-1) \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} C_d \\ C_d A_d \\ C_d A_d^2 \\ \vdots \\ C_d A_d^{n-1} \end{bmatrix} x(n) \quad (5-14)$$

Y reemplazando la expresión de la matriz de controlabilidad (ecuación 5-4) en la expresión anterior (ecuación 5-14), obtenemos:

$$\begin{bmatrix} y(n) \\ y(n+1) \\ y(n+2) \\ \vdots \\ y(2n-1) \end{bmatrix} = A_d^n x(0) \begin{bmatrix} C_d \\ C_d A_d \\ C_d A_d^2 \\ \vdots \\ C_d A_d^{n-1} \end{bmatrix} + \begin{bmatrix} C_d \\ C_d A_d \\ C_d A_d^2 \\ \vdots \\ C_d A_d^{n-1} \end{bmatrix} [B_d \ \dots \ A_d^{n-2} B_d \ A_d^{n-1} B_d]_{n \times np} \begin{bmatrix} u(n-1) \\ u(n-2) \\ \vdots \\ u(1) \\ u(0) \end{bmatrix}_{np \times 1}$$

De manera abreviada:

$$\begin{bmatrix} y(n) \\ y(n+1) \\ y(n+2) \\ \vdots \\ y(2n-1) \end{bmatrix} = A_d^n x(0) O_b(A_d, C_d) + O_b(A_d, C_d) C_o(A_d, B_d) \begin{bmatrix} u(n-1) \\ u(n-2) \\ \vdots \\ u(1) \\ u(0) \end{bmatrix}_{np \times 1} \quad (5-15)$$

Dónde $\mathcal{H}(A_d, B_d, C_d) = O_b(A_d, C_d) C_o(A_d, B_d)$, el cual representa la relación dinámica entre las entradas anteriores al instante n y las salidas posteriores a n , esta es la matriz de Hankel

y se denotara con \mathcal{H} tal como se presentó en las ecuaciones 5-9 y 5-10 y el primer término de la expresión es constante y se denotará por K , obteniendo:

$$\begin{bmatrix} y(n) \\ y(n+1) \\ y(n+2) \\ \vdots \\ y(2n-1) \end{bmatrix} = \mathcal{H} \begin{bmatrix} u(n-1) \\ u(n-2) \\ \vdots \\ u(1) \\ u(0) \end{bmatrix} + K \quad (5-16)$$

Es aquí donde se puede ver claramente las ideas tratadas por los autores mencionados, una representación dinámica del sistema en términos de sus entradas y salidas a partir de las matrices de observabilidad y controlabilidad, relacionándose a través de la matriz de Hankel, ahora se debe buscar la forma de encontrar en esta matriz como cuantitativamente se relacionan estos conceptos y el impacto que tienen las dinámicas de un proceso.

5.3. Descomposición en valores singulares (DVS)

Cualquier matriz $G \in R^{l \times m}$ de rango r puede factorizarse como una descomposición de valores singulares, en donde existen matrices unitarias ortogonales $U \in R^{l \times l}$ y $V \in R^{m \times m}$ y una matriz diagonal $\Sigma \in R^{l \times m}$ de valores singulares reales no negativos σ_{ij} , dispuestos en orden descendente¹, con $\sigma_{11} \geq \sigma_{22} \geq \dots \geq \sigma_{rr} > 0$, cabe aclarar que los valores singulares de G son las raíces cuadradas de los eigenvalores de $G^T G$ (Poole, 2011).

$$G = U \Sigma V^T \quad (5-17)$$

La matriz U consiste en los vectores propios ortonormales asociados a los valores propios más grandes de GG^T y se llaman vectores singulares izquierdos de G . La matriz V consiste en los vectores propios ortonormales de $G^T G$ y se llaman vectores singulares derechos de G . Los elementos diagonales de Σ son las raíces cuadradas no negativas de los valores propios de $G^T G$ y GG^T y se llaman valores singulares de G (Monsalve Bravo, 2014):

$$\Sigma = \begin{bmatrix} S & 0 \\ 0 & 0 \end{bmatrix} \quad (5-18)$$

Dónde: $S = \text{diagonal } \sigma_{11}, \sigma_{22}, \dots, \sigma_{rr} \quad \text{con}(\sigma_{11} \geq \sigma_{22} \geq \dots \geq \sigma_{rr} > 0)$.

Los cuales se pueden hallar como:

$$\sigma_i(G) = \sqrt{(\lambda_i(G^T G))} = \sqrt{(\lambda_i(GG^T))} \quad (5-19)$$

¹El concepto aplica para toda matriz (simétrica o no, cuadrada o no) (Poole, 2011).

Geoméricamente los valores singulares corresponden a la mitad de los ejes mayor y menor de la elipse en R^3 proveniente de la transformación de una circunferencia unitaria en R^2 mediante la multiplicación con una matriz G , se puede encontrar mas detalle en el texto de (Poole, 2011).

Finalmente, desde una perspectiva física, la matriz de valores singulares (Σ) proporciona intensa información del sistema representado por G , donde el valor singular más alto contiene la mayor la información del sistema. Por lo tanto, mediante el análisis de valores singulares, la información contenida en R puede reconstruirse representando simplemente el sistema con las variables entrada-salida relacionadas con valores singulares más altos.

5.3.1. DVS en la matriz de Hankel

De la sección 5.2, la matriz de Hankel esta asociada a sistemas de tiempo discreto caracterizados por secuencias de parámetros de Markov (respuesta de impulso). Considerando un caso específico en el que el número de variables de estado $\mathbf{n} = \mathbf{2}$, número de entradas $\mathbf{p} = \mathbf{2}$ y número de salidas $\mathbf{m} = \mathbf{2}$, el sistema resultante de las ecuaciones escritas en forma de matriz se proporciona como sigue:

$$\begin{bmatrix} y_1(2) \\ y_2(2) \\ y_1(3) \\ y_2(3) \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} C_d B_d & C_d A_d B_d \\ C_d A_d B_d & C_d A_d^2 B_d \end{bmatrix} \begin{bmatrix} u_1(1) \\ u_2(1) \\ u_1(0) \\ u_2(0) \end{bmatrix}$$

La descomposición de \mathcal{H} en valores singulares y considerando que rango $\mathcal{H} = n = 2$, se obtiene la factorización:

$$\mathcal{H} = \begin{bmatrix} U_{11} & U_{12} & U_{13} & U_{14} \\ U_{21} & U_{22} & U_{23} & U_{24} \\ U_{31} & U_{32} & U_{33} & U_{34} \\ U_{41} & U_{42} & U_{43} & U_{44} \end{bmatrix} \begin{bmatrix} \sigma_{11} & 0 & 0 & 0 \\ 0 & \sigma_{22} & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 \end{bmatrix} \begin{bmatrix} V_{11}^T & V_{21}^T & V_{31}^T & V_{41}^T \\ V_{12}^T & V_{22}^T & V_{32}^T & V_{42}^T \\ V_{13}^T & V_{23}^T & V_{33}^T & V_{43}^T \\ V_{14}^T & V_{24}^T & V_{34}^T & V_{44}^T \end{bmatrix} \quad (5-20)$$

Las salidas (columna) de \mathcal{H} esta compuesta por las primeras dos columnas de U y las entradas (filas) de \mathcal{H} están compuestas por las primeras dos filas de V^T , entonces se puede reconstruir de la forma:

$$\mathcal{H} = \begin{bmatrix} U_{11} & U_{12} \\ U_{21} & U_{22} \\ U_{31} & U_{32} \\ U_{41} & U_{42} \end{bmatrix} \begin{bmatrix} \sigma_{11} & 0 \\ 0 & \sigma_{22} \end{bmatrix} \begin{bmatrix} V_{11}^T & V_{21}^T & V_{31}^T & V_{41}^T \\ V_{12}^T & V_{22}^T & V_{32}^T & V_{42}^T \end{bmatrix} \quad (5-21)$$

Para calcular el impacto de las entradas y salidas en todo el proceso, una vez obtenida la matriz de Hankel, se reemplaza en la expresión con $x(0) = 0$.

$$\begin{bmatrix} y_1(2) \\ y_2(2) \\ y_1(3) \\ y_2(3) \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} U_{11} & U_{12} \\ U_{21} & U_{22} \\ U_{31} & U_{32} \\ U_{41} & U_{42} \end{bmatrix} \begin{bmatrix} \sigma_{11} & 0 \\ 0 & \sigma_{22} \end{bmatrix} \begin{bmatrix} V_{11}^T & V_{21}^T & V_{31}^T & V_{41}^T \\ V_{12}^T & V_{22}^T & V_{32}^T & V_{42}^T \end{bmatrix} \begin{bmatrix} u_1(0) \\ u_2(0) \\ u_1(0) \\ u_2(0) \end{bmatrix} \quad (5-22)$$

Resolviendo el producto de matrices:

$$\begin{bmatrix} y_1(2) \\ y_2(2) \\ y_1(3) \\ y_2(3) \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} U_{11}\sigma_{11}(V_{11}^T u_1(1) + V_{21}^T u_2(1) + V_{31}^T u_1(0) + V_{41}^T u_2(0)) \\ U_{21}\sigma_{11}(V_{11}^T u_1(1) + V_{21}^T u_2(1) + V_{31}^T u_1(0) + V_{41}^T u_2(0)) \\ U_{31}\sigma_{11}(V_{11}^T u_1(1) + V_{21}^T u_2(1) + V_{31}^T u_1(0) + V_{41}^T u_2(0)) \\ U_{41}\sigma_{11}(V_{11}^T u_1(1) + V_{21}^T u_2(1) + V_{31}^T u_1(0) + V_{41}^T u_2(0)) \end{bmatrix} + \begin{bmatrix} U_{12}\sigma_{22}(V_{12}^T u_1(1) + V_{22}^T u_2(1) + V_{32}^T u_1(0) + V_{42}^T u_2(0)) \\ U_{22}\sigma_{22}(V_{12}^T u_1(1) + V_{22}^T u_2(1) + V_{32}^T u_1(0) + V_{42}^T u_2(0)) \\ U_{32}\sigma_{22}(V_{12}^T u_1(1) + V_{22}^T u_2(1) + V_{32}^T u_1(0) + V_{42}^T u_2(0)) \\ U_{42}\sigma_{22}(V_{12}^T u_1(1) + V_{22}^T u_2(1) + V_{32}^T u_1(0) + V_{42}^T u_2(0)) \end{bmatrix}$$

Donde cada salida es discriminada por $U_{i1} \sigma_{11}$ y $U_{i2} \sigma_{22}$ y cada entrada se distingue por $V_{i1}^T \sigma_{11}$ y $V_{i2}^T \sigma_{22}$, aquí σ_{ii} $i = 1, 2, 3, 4$ para ambos casos. Cada una de estas salidas no es posible asociarla a una sola entrada, sino al conjunto de estas:

$$y_1(2) = U_{11}\sigma_{11}(V_{11}^T u_1(1) + V_{21}^T u_2(1) + V_{31}^T u_1(0) + V_{41}^T u_2(0)) + U_{12}\sigma_{22}(V_{12}^T u_1(1) + V_{22}^T u_2(1) + V_{32}^T u_1(0) + V_{42}^T u_2(0))$$

$$y_1(3) = U_{31}\sigma_{11}(V_{11}^T u_1(1) + V_{21}^T u_2(1) + V_{31}^T u_1(0) + V_{41}^T u_2(0)) + U_{32}\sigma_{22}(V_{12}^T u_1(1) + V_{22}^T u_2(1) + V_{32}^T u_1(0) + V_{42}^T u_2(0))$$

(Ruiz Colorado, 2009) resalta como la única diferencia de las salidas entre sí son los valores del vector de salida U_{ij} . Esto significa que el análisis permite determinar el impacto de cada entrada sobre todo el proceso, sin discriminar entre las salidas y este impacto está dado solamente por el valor de V_{ij}^T .

Para cada entrada manipulada no es posible determinar la salida a la cual más impacta, en relación con las demás entradas, puesto que las salidas están ponderadas por un valor U_{ij} que multiplica al término que contiene las entradas. Por tanto, sólo es posible determinar el impacto neto de las entradas sobre cada salida a través de los valores de U_{ij} .

5.3.2. Efecto dinámico de entradas y salidas

Para cuantificar el impacto dinámico de cada entrada y salida, se calcula la norma del vector correspondiente a cada entrada y cada salida, de tal manera que se estime el efecto global en el tiempo de cada variable (Toro Alvarez, 2008; Ruiz Colorado, 2009; Monsalve Bravo, 2014), el efecto en la salida i (α_{yi}) se calcula con base en los vectores de salida U_{ij} dando idea de que tan impactable es esta salida en el proceso:

$$\alpha_{y1} = \sqrt{U_{11}^2 \sigma_{11}^2 + U_{31}^2 \sigma_{11}^2 + U_{12}^2 \sigma_{22}^2 + U_{32}^2 \sigma_{22}^2} \quad (5-23)$$

$$\alpha_{y2} = \sqrt{U_{21}^2 \sigma_{11}^2 + U_{41}^2 \sigma_{11}^2 + U_{22}^2 \sigma_{22}^2 + U_{42}^2 \sigma_{22}^2} \quad (5-24)$$

De la misma manera, el efecto en la entrada j (α_{uj}) se calcula utilizando los vectores de entrada V_{ij} :

$$\alpha_{u1} = \sqrt{(V_{11}^T)^2 \sigma_{11}^2 + (V_{31}^T)^2 \sigma_{11}^2 + (V_{12}^T)^2 \sigma_{22}^2 + (V_{32}^T)^2 \sigma_{22}^2} \quad (5-25)$$

$$\alpha_{u2} = \sqrt{(V_{21}^T)^2 \sigma_{11}^2 + (V_{41}^T)^2 \sigma_{11}^2 + (V_{22}^T)^2 \sigma_{22}^2 + (V_{42}^T)^2 \sigma_{22}^2} \quad (5-26)$$

Si se analiza cada α_{u1} y se toma el sistema con r valores singulares, con orden r el sistema se obtiene:

$$\alpha_{y1} = \sqrt{\sum_{i=1}^r \alpha_{ii}^2 (U_{1i}^2 + U_{3i}^2)} \quad \alpha_{u1} = \sqrt{\sum_{i=1}^r \alpha_i^2 \left((V_{i1}^T)^2 + (V_{i3}^T)^2 \right)}$$

$$\alpha_{y2} = \sqrt{\sum_{i=1}^r \alpha_{ii}^2 (U_{2i}^2 + U_{4i}^2)} \quad \alpha_{u2} = \sqrt{\sum_{i=1}^r \alpha_{ii}^2 \left((V_{i2}^T)^2 + (V_{i4}^T)^2 \right)}$$

Esto se puede generalizar para tener una expresión del sistema con p entradas, m salidas:

$$\alpha_{yj} = \sqrt{\sum_{i=1}^r \sigma_{ii}^2 \left(\sum_{g=0}^{n-1} U_{j+mg,i}^2 \right)} \quad j = 1, 2, \dots, m \quad (5-27)$$

$$\alpha_{uk} = \sqrt{\sum_{i=1}^r \sigma_{ii}^2 \left(\sum_{h=0}^{n-1} (V_{i,k+ph}^T)^2 \right)} \quad k = 1, 2, \dots, p \quad (5-28)$$

α_{yj} y α_{uk} representan la impactabilidad de las entradas de proceso manipuladas u como un todo sobre la k -ésima salida dada y_j y la impactabilidad de la l -ésima entrada de proceso manipulada u_k sobre las salidas del proceso y_i como un todo, respectivamente (Monsalve Bravo, 2014), en otras palabras, El índice α_{yj} da una medida de qué tan impactable dinámicamente es la salida i en el proceso y el índice α_{uk} da una medida de qué tan impactante dinámicamente es la entrada j en el proceso (Ruiz Colorado, 2009), en la Figura 5-1

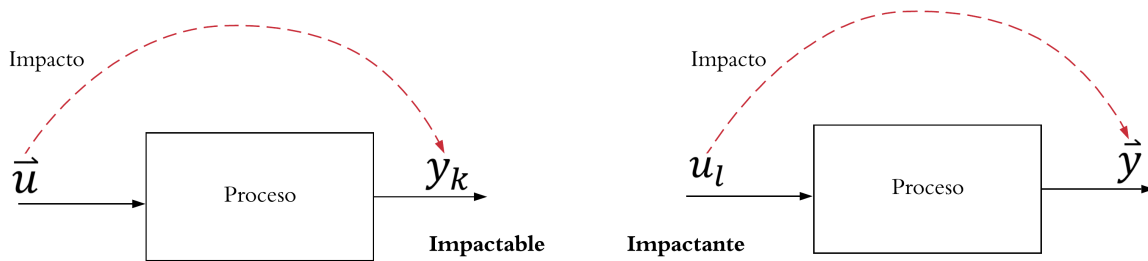


Figura 5-1. Interpretación de α_{yj} y α_{uk} en un proceso.

α_{yj} representa el índice de estado impactable (IEI) que tiene cada variable en el proceso. Esto es importante para determinar la relevancia de las dinámicas más impactantes del proceso, según Ruiz Colorado (2009) permite determinar la jerarquía de las dinámicas con lo cual se define el Régimen de Operación.

5.4. Punto de operación y régimen de operación

El Punto de Operación (PdeO) hace referencia a las características físicas y químicas que definen el estado del sistema. El estado de un sistema dinámico es el conjunto más pequeño de números que pueden ser especificados en el tiempo $t=t_0$ con el fin de tener disponible para predecir el comportamiento del sistema para todo tiempo $t \geq t_0$ (Kalman, 1959). A partir de la definición anterior Ruiz Colorado (2009), la complementa y propone una restricción: “El estado de un proceso es el conjunto más pequeño de variables x , de modo que conociendo su valor en el instante inicial $x(t_0)$ y las entradas al proceso $u(t)$ desde t_0 hasta t , es posible predecir el valor del estado en el instante t ”. La restricción adicional propuesta consiste en que todas las variables de estado deben tener interpretación en la definición y operación del

proceso. El PdeO es un punto de equilibrio en R^n (n la dimensión del espacio de estados del proceso) y el valor de las variables de estado corresponde a la condición de operación del proceso.

Debido a que los estados deben cumplir con la restricción mencionada, es necesario que su deducción provenga del MSBF. Además, puesto que la base de los MSBF es la aplicación de las ecuaciones de conservación (materia, energía y cantidad de movimiento), las variables que aparecen en los diferenciales de las ecuaciones del modelo pueden tomarse directamente como los estados del proceso, como lo trato Kalman (1959). De este modo, su interpretación está garantizada desde la deducción misma del modelo al aplicar balances de masa, energía y cantidad de movimiento en estado transitorio (Ruiz Colorado, 2009).

Adicionalmente, Ruiz Colorado (2009) define el PdeO como un punto de equilibrio del sistema matemático que describe al proceso: la derivada de x respecto a t es igual a cero con $u = u_{equilibrio} = constante$ (u es el vector de parámetros de diseño).

El Régimen de Operación (RdeO), por su parte, es la relación de jerarquía evidente entre los efectos que coexisten en el sistema en un intervalo de tiempo finito, en el cual se caracteriza y define el comportamiento del proceso. Tal jerarquía se establece de acuerdo con una o más características de interés, analizadas en cada uno de los efectos individuales del proceso, se debe aclarar que RdeO es diferente a los regímenes de los cuales se habla de manera habitual en el área de procesos (Ruiz Colorado, 2009): Régimen de flujo, Régimen térmico, Régimen de transferencia de masa y energía, Régimen químico-bioquímico, así como puede existir un régimen mixto donde se de la interacción de varios de los regímenes mencionados (Ruiz Colorado, 2009), los cuales se enfocan en analizar alguna operación unitaria en el proceso o análisis químico-bioquímico, no se enfoca en una jerarquía como lo propone el RdeO.

Para este trabajo se modifican las definiciones del punto de operación (PdeO) y se mantiene la de régimen de operación (RdeO) presentados por (Ruiz Colorado, 2009), al igual que se toman las definiciones de estado tomada de (Kalman, 1959) y variable de diseño presentadas por (Monsalve Bravo, 2014). Se propone la definición de régimen de operación crítico (RdeO*).

Definición 1: *El PdeO es equivalente al vector de variables de estado del proceso, siempre y cuando todas las variables de estado tengan interpretación de acuerdo con la definición y operación del proceso. Hace referencia a las características químicas y físicas que definen el estado del sistema.*

La diferencia con definiciones dadas por (Ruiz Colorado, 2009) precisa en que no se tomará como un punto de equilibrio del sistema, sino como las concentraciones de salida dada la

naturaleza batch del proceso. Mantener el PdeO en el escalado no implica mantener el valor de todas las variables en la escala inicial. Se permite que las variables de estado (x) estén en un intervalo pequeño alrededor de los valores originales de cada variable en la escala inicial.

Definición 2: El régimen de operación (RdeO) es una relación de jerarquía que se establece de acuerdo con un criterio o característica dada, entre los efectos dinámicos que coexisten en el sistema en el PdeO y que caracterizan y definen el comportamiento del proceso en un punto específico y en un entorno que lo contenga. La jerarquía se establece entre cada uno de los efectos individuales del proceso, que no son más que el conjunto de estados (x).

Definición 3: Régimen de operación crítico (RdeO*) del proceso es el valor o región en la cual la dinámica de interés presenta su valor máximo de IEI, o mejor conocido como IEI_{Max} , quiere decir que va a ser mayormente impactada respecto a otras dinámicas. Corresponde dentro de las jerarquías analizadas y su orden de interés, al punto máximo en el cual el proceso será impactado de mayor manera, por lo cual la dominancia de las jerarquías se expresa en mayor medida, esto se representa como el IEI_{Max} .

Definición 4: Variable de capacidad (VdeC) corresponde al valor de capacidad al cual se propone escalar el proceso, haciendo referencia a la capacidad con la cual varía el escalado desde una baja escala a una alta escala.

Definición 5: Estado es el conjunto más pequeño de variables x , de modo que conocido su valor en el instante inicial $x(t_0)$ y las entradas al proceso $u(t)$ desde t_0 hasta t , es posible predecir el valor del estado en el instante t .

Definición 6: Variables de diseño (z) son el conjunto de variables que pueden ser libremente variadas por el diseñador para definir el proceso o verificar su efecto sobre este.

5.5. Conclusiones

Los problemas del escalado de procesos químicos y bioquímicos, han llevado al planteamiento de metodologías que no solo se enfoquen en realizar un análisis dimensional o usar el principio de similitud como herramienta, se hace necesario entender el proceso y los fenómenos que ocurren al interior de estos y de esta forma encontrar una solución adecuada a las dificultades propias del escalado. El análisis de sistemas de control en el espacio de estados es una de estas herramientas que está empezando a ser explorada, unificando los conceptos de controlabilidad y observabilidad a partir de la matriz de Hankel, si bien es una herramienta poderosa, se comporta de manera binaria, en donde menciona si un sistema es controlable o no lo es, o si un sistema es observable o no lo es, es gracias a la descomposición en valores singulares de la matriz de Hankel que permite discriminar en una matriz asociada a

las salidas del proceso (U), otra asociada a las entradas (V) y una matriz diagonal (Σ) que proporciona información del sistema de interés, además permite observar como las dinámicas del proceso son afectadas por estas entradas y salidas a partir del IEI . Es de resaltar que esta herramienta permite ver la interacción de las salidas del sistema con las diferentes entradas, se puede notar que cada una de estas salidas no es posible asociarla a una sola entrada sino a un conjunto de estas. En la Figura 5-2 se presenta una ruta secuencial que permite analizar como desde en análisis en el espacio de estados y la formulación de MSBF se pueden proponer criterios que permiten la jerarquización de los estados de interés en el escalado de procesos.

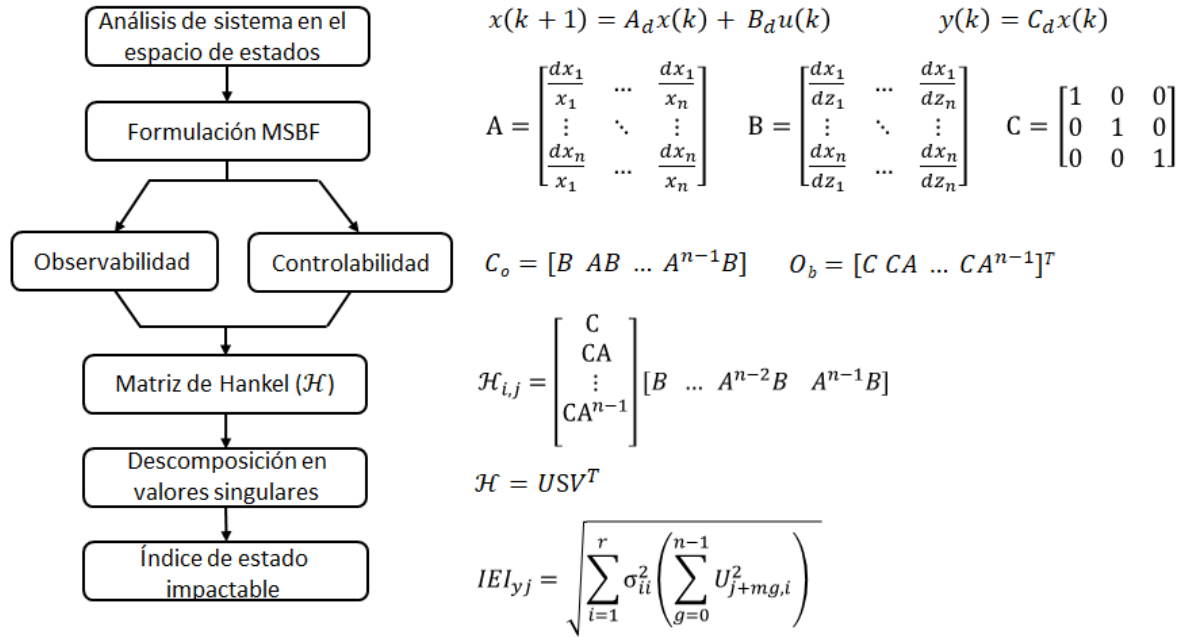


Figura 5-2. Interpretación secuencial de análisis dinámico aplicado al escalado de procesos.

Un punto importante es el planteamiento de las definiciones de RdeO, PdeO, VdeC como uno de los principales aportes realizados por Ruiz Colorado (2009), así como la definición de variables de estado y de diseño presentados por (Monsalve Bravo, 2014). Lo que este trabajo permite complementar con el RdeO* ya que debe pensarse que en operaciones en modo batch, donde la definición de RdeO se vera enfocada en el análisis de un IEI_{Max} para cada VdeC analizada, lo que permitirá proponer una manera de relacionar el efecto máximo de los parámetros del proceso sobre las variables de estado de interés.

6. Metodología de escalado de procesos de hidrólisis enzimática

A continuación se presenta la metodología de escalado de procesos en modo batch, la cual, a modo de ejemplo será aplicada sobre un proceso de hidrólisis enzimática. La metodología comprende una serie de pasos que se desarrollan de manera metódica. De modo general se busca que el lector a partir de cualquier modelo semifísico de base fenomenológica (MSBF) propuesto pueda aplicarla y usar los conceptos aquí propuestos como una herramienta adicional que permita complementar su escalado, independiente de la manera en que se realice. El objetivo es tener un mayor conocimiento del efecto del aumento de escala sobre el proceso, su régimen de operación (RdeO) y el comportamiento de las variables involucradas en este.

Se deja al lector una serie de rutinas que se desarrollan de manera metódica propuestas en el Anexo A, específicamente aplicado al proceso de hidrólisis enzimática de materiales amiláceos en la etapa de licuefacción. Se parte desde la solución del MSBF, su ajuste de parámetros, hasta la aplicación de cada uno de los pasos propuestos en este capítulo. Todas las subrutinas presentan una descripción de su desarrollo y como se debe proceder para manejar su información de entrada y salida, logrando que el lector, con conocimientos básicos en el área de simulación, tenga la capacidad de desarrollar de principio a fin un escalado de este tipo.

6.1. Especificar el proceso y la tarea de escalado

Esta sección consiste en realizar una descripción de cada una de las etapas de proceso, condiciones de operación (concentraciones iniciales, pH, temperatura, agitación, activadores, relaciones entre enzimas, cantidades de sustrato o alguna otra condición de importancia. Se realiza la selección y especificación de variables de estado (x), variables de diseño (z) y variable de capacidad (VdeC) al cual se desea escalar. Para esto se propone:

- Realizar una descripción detallada del proceso, indicando condiciones iniciales para las variables de estado y condiciones de operación.
- Especificar variables de estado, es decir, punto de operación (PdeO), variables de diseño, todas con su valor correspondiente al PdeO de la baja escala (BE) y el régimen de operación (RdeO) deseado.

- Indicar el valor de la VdeC del cual se parte y al cual se quiere llegar y la eficiencia mínima a lograr en ese PdeO de la alta escala (AE).

6.2. Planteamiento del MSBF del proceso

En esta sección se propone realizar el planteamiento del MSBF del proceso. Partiendo de las suposiciones y restricciones que se tendrán en cuenta. Proponer los balances de materia para cada uno de los compuestos de interés y los balances de energía para la representación adecuada del proceso. Se deben indicar las ecuaciones constitutivas que acompañan el proceso, tales como definiciones de velocidades de reacción, velocidades máximas, constantes cinéticas, concentraciones de enzimas, efectos de temperatura y pH sobre las enzimas, definiciones de coeficientes de transferencia de calor, masa o alguna otra ecuación de importancia. Autores como Beschkov et al. (1983); Rosso et al. (1995); Zanin et al. (1996); Paolucci-jeanjean et al. (2000); Morales et al. (2008); Presečki et al. (2012) son una buena base de partida para el planteamiento de modelos de hidrólisis enzimática de materiales amiláceos.

6.3. Ajuste de parámetros a los datos experimentales

Una vez se tiene el MSBF propuesto, se procede a realizar el ajuste del modelo a los datos experimentales propuestos esto se puede realizar usando MATLAB[®] y la función de optimización *fmincon*, además, se deben determinar las restricciones para los parámetros o constantes a estimar, de acuerdo con criterios establecidos. Se debe proponer una función objetivo para ser optimizada como propuesta para el proceso de hidrólisis enzimática de materiales amiláceos se presenta la suma de los cuadrados de los residuales (*SCE*):

$$SCE = \sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_1)^2 \quad (6-1)$$

Donde: y_i corresponde a los valores observados de la variable dependiente y \hat{y}_1 a los valores estimados por el modelo.

6.4. Formulación de la Matriz de Hankel y DVS

- Linealizar el MSBF del proceso y llevarlo a la forma canónica:

$$\begin{aligned}\frac{dx}{dt} &= Ax + Bu \\ y &= Cx\end{aligned}\tag{6-2}$$

- A partir de las matrices A , B y C realizar la formulación de las matrices de observabilidad (O_b) y controlabilidad (C_o) de la siguiente manera:

$$\begin{aligned}C_o &= [A \ AB \ \dots \ A^{n-1}B] \\ O_b &= [C \ CA \ \dots \ CA^{n-1}]^T\end{aligned}\tag{6-3}$$

- Se calcula la matriz de Hankel (\mathcal{H}) como el producto de las matrices de observabilidad y controlabilidad:

$$\mathcal{H} = O_b \cdot C_o\tag{6-4}$$

- Realizar la descomposición en valores singulares de la matriz de Hankel para obtener las matrices U , S , V :

$$\mathcal{H} = U \cdot S \cdot V^T\tag{6-5}$$

6.5. Construcción de la curva de Jerarquía de las dinámicas

- Calcular el vector de índice de estado impactable (IEI) en función del tiempo para un valor puntual de la VdeC, con los valores de las variables de diseño en la BE reemplazados en \mathcal{H} y con las componentes de U y S calcular:

$$IEI_n = \sqrt{\sum_{i,i} s_{i,i}^2 \sum_{j=0}^{n-1} u_{k+m,j,i}^2}\tag{6-6}$$

- A partir de esto, determinar el RdeO (jerarquía de las dinámicas). Para esto se debe analizar el comportamiento de las variables de estado de interés y teniendo en cuenta su magnitud en un intervalo de tiempo ($0 > t_1 \geq t_2$) se puede concluir cual de ellas se encuentra mayormente impactada respecto a las otras, por ejemplo, las variable de estado x_1 presenta un orden de magnitud en su comportamiento de 1×10^{10} las variable de estado x_2 y x_1 presentan ordenes de magnitud de 1×10^2 y 1×10^{15} , respectivamente. Por consiguiente, la jerarquía de estas dinámicas es $x_3 \geq x_1 \geq x_2$.

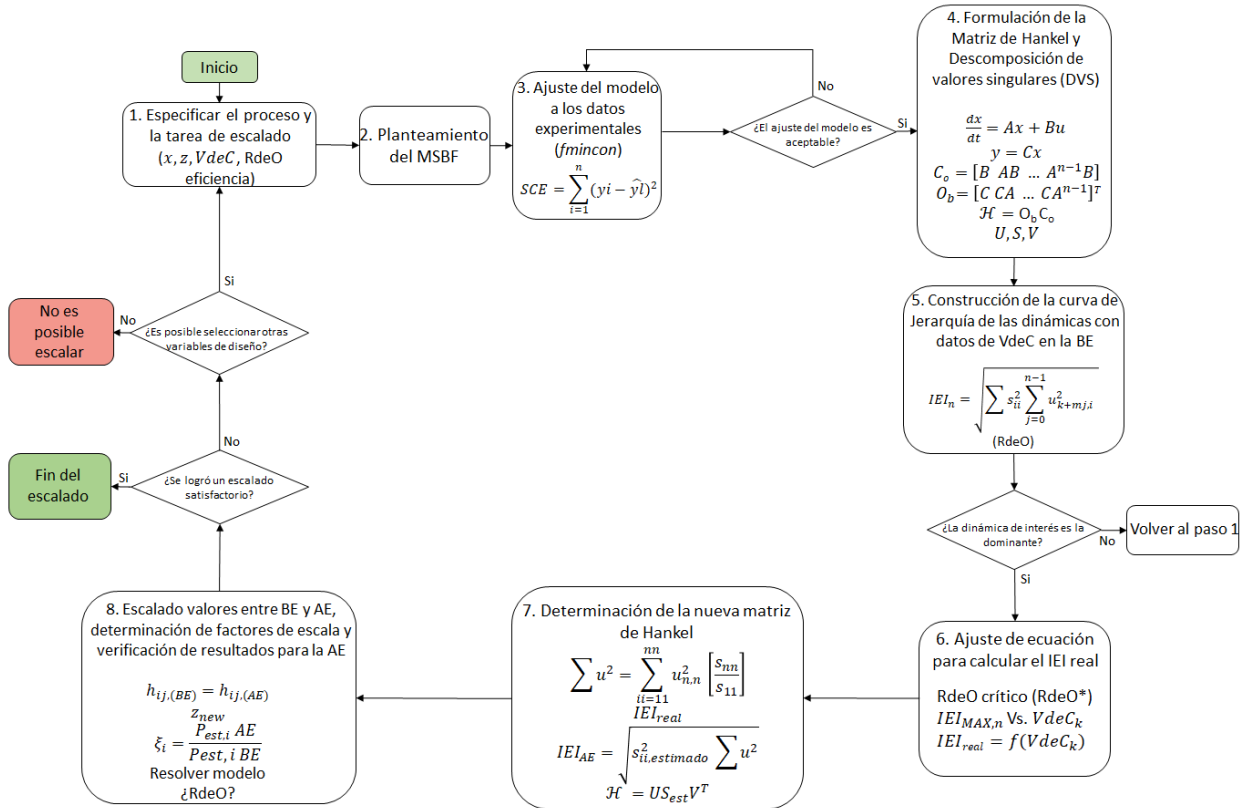


Figura 6-1. Metodología de escalado de procesos aplicando teoría de control.

6.6. Ajuste de ecuación para calcular el *IEI* real

- Incrementar la *VdeC* desde $VdeC_{BE}$ hasta $VdeC_{AE}$ y a partir del cálculo del *IEI* de la dinámica de interés en función del tiempo, seleccionar el *RdeO* crítico (*RdeO**) y reportar como el $IEI_{Max,n}$ para la dinámica de interés junto con el tiempo en el que se da. Realizar una curva de $VdeC_k$ respecto al $IEI_{Max,n}$ y reportar la ecuación de esta curva. En este caso pueden usarse polinomios, curvas de potencia u otro tipo de ecuación con el que se logre un ajuste adecuado. Seleccionar incrementos para la *VdeC* de modo que permita realizar un seguimiento adecuado sobre las variables de estado:

$$VdeC_k = VdeC_{k-1} + \Delta VdeC \quad (6-7)$$

- De acuerdo con la forma de la curva $IEI_{Max,n}$ respecto a $VdeC_k$ con n la dinámica de interés, seleccionar un número de puntos para $VdeC_k$ que permitan la mejor representación de toda esa curva. Halle una ecuación que ajuste las parejas $(IEI_{Max,n}, VdeC_k)$, que permita calcular $IEI_{real} = f(VdeC_k)$. El *IEI* así calculado se denominará IEI_{real} .

6.7. Determinación de la nueva matriz de Hankel

- Iniciar en el valor de la $VdeC_{BE}$ y tomando entre dos y tres valores de la $VdeC$ intermedios entre $VdeC_{BE}$ y $VdeC_{AE}$, escalar como se indica a continuación, sucesivamente cada nuevo valor de la $VdeC$ usando las condiciones de entrada de la $VdeC$ inmediatamente anterior, hasta llegar al valor de la $VdeC_{AE}$.
- De la descomposición en valores singulares de \mathcal{H} , tomar las componentes $u_{n1}, u_{n2}, u_{n3}, \dots, u_{nn}$ de U con n el número de la fila de la variable de estado de interés.
- De la misma descomposición, tomar los valores singulares $s_{11}, s_{22}, s_{33} \dots s_{ii}$ mayores que cero de S y calcular las proporciones de cada s_{ii} respecto a s_{11} .

- Calcular la sumatoria:

$$\sum u^2 = \sum_{ii=11}^{nn} u_{n,n}^2 \left[\frac{s_{nn}}{s_{11}} \right] = u_{11}^2 \left[\frac{s_{11}}{s_{11}} \right] + u_{22}^2 \left[\frac{s_{22}}{s_{11}} \right] + u_{33}^2 \left[\frac{s_{33}}{s_{11}} \right] + \dots + u_{nn}^2 \left[\frac{s_{ii}}{s_{11}} \right] \quad (6-8)$$

- Con el valor de la $VdeC$ actual y la ecuación de la curva del IEI_{real} propuesto, determinar el valor del IEI_{real} .
- Despejar el $s_{(ii,estimado)}^2$ de:

$$IEI_{AE} = \sqrt{s_{ii,estimado}^2 \sum u^2} \quad (6-9)$$

- Usando las proporciones entre $s_{22}, s_{33}, \dots, s_{ii}$ y s_{11} , estimar nuevos s_{ii} en adelante $s_{ii,estimados}$ y con ellos estimar la nueva matriz S .
- Determinar una nueva $\mathcal{H} = US_eV^T$ con la U y la V calculadas para el valor de la $VdeC$ inmediatamente anterior.

6.8. Escalado de valores entre BE y AE y Factores de escala

- Leer e igualar los valores de las h_{ij} componentes de \mathcal{H} en la BE y AE con sus formulaciones expresadas a partir de las matrices A , B y C :

$$h_{ij,(BE)} = h_{ij,(AE)} \quad (6-10)$$

- Calcular los nuevos valores de las variables de diseño para la $VdeC$ actual.

- Determinar los factores de escala (ξ_i) asociados a cada parámetro estimado ($P_{est,i}$), con las condiciones de entrada para la $VdeC_{AE}$ se ajusta nuevamente el modelo, lo que permite obtener una relación entre los parámetros en la AE y la BE:

$$\xi_i = \frac{P_{est,i}AE}{P_{est,i}BE} \quad (6-11)$$

- Con las condiciones de entrada para la $VdeC_{AE}$ y los $P_{est,i}$, se resuelve el modelo para estimar la eficiencia del proceso en la AE y con el vector IEI a $VdeC_{AE}$ se verifica el RdeO. Si la eficiencia no se ajusta a lo esperado, se revisa el PdeO o se realiza la selección de otro conjunto de variables de diseño (Figura 6-1) hasta lograr la eficiencia deseada.

6.9. Conclusiones

Se logró obtener una propuesta para el escalado de procesos, fundamentada en la teoría de control, matrices de observabilidad, controlabilidad y matriz de Hankel, lo que se complementa con la descomposición en valores singulares y permite darle un peso a cada una de las salidas del proceso sobre las variables de estado de interés. Este trabajo complementa lo realizado por (Ruiz and Alvarez, 2011) y (Monsalve-Bravo et al., 2014) incorporando la obtención de un IEI_{Max} lo que permite la definición de un RdeO*. Otro aspecto a tener en cuenta es la definición de factores de escala (ξ_i) y como se busca a partir de un primer escalado generar un peso sobre los parámetros estimados, los cuales permitirán realizar los siguientes escalados y obtener eficiencias deseadas con el cambio de escala.

Se propone una herramienta para el escalado de procesos usando herramientas de teoría de control, las rutinas y forma metódica de solución se presenta en detalle en el Anexo A, estas pueden ser aplicables a cualquier proceso, pero su trabajo se realizará sobre la hidrólisis enzimática de almidón de trigo, centrándose en la etapa de licuefacción y sacarificación.

7. Escalado del proceso de hidrólisis enzimática de almidón de trigo

Esta sección describe la aplicación de la metodología de escalado propuesta en el Capítulo 6 y el proceso experimental desarrollado para el escalado de procesos de hidrólisis enzimática de almidón de trigo. Inicialmente se presenta la caracterización del material amiláceo, almidón de trigo puro, la determinación de la actividad enzimática de las enzimas α -amilasa y AMG y su contenido proteico. Posteriormente se realizó un análisis de desactivación enzimática para detener la reacción en las muestras tomadas y un análisis de efectos inhibitorios por producto (glucosa), luego se desarrollan los pasos de la metodología de escalado propuesta para las etapas de licuefacción y sacarificación de la hidrólisis enzimática de almidón de trigo.

7.1. Caracterización de almidón de trigo

Se realizó la caracterización del almidón de trigo por parte del grupo de investigación Bioprocesos y Flujos Reactivos (BIOFRUN) de acuerdo con las técnicas de caracterización de biomasa, desarrolladas por el National Renewable Energy Laboratory ¹ (NREL) y adaptadas por el Laboratorio de Investigación en Bioprocesos y Flujos Reactivos de la Universidad Nacional de Colombia, preparación de la muestra (NREL/TP-510-42620), determinación del contenido de sólidos y humedad (NREL/TP-510-42621), cenizas (NREL/TP-510-42622), extractivos (NREL/TP-510-42619), proteína por el método de Kjeldahl (método de análisis basado en la Norma Técnica Colombiana 4657) y almidón por el método polarimétrico de Ewers (ISO-10520), estos últimos métodos se realizaron en el Laboratorio de Análisis Químico y Bromatológico de la Universidad Nacional de Colombia.

En la Tabla 7-1 se observan los diferentes elementos a caracterizar en un material amiláceo, la cantidad de almidón es el principal interés ya que permite saber cuanto realmente de todo el material adicionado al proceso interactúa con la enzima, para este caso solo el 80,70 % esta disponible para el proceso de hidrólisis enzimática. Comparado con los trabajos realizados por Tovar Benítez (2008); Bashir and Aggarwal (2017); Frakolaki et al. (2018) donde el contenido de almidón a partir de trigo es aproximadamente 59 %, 40 %, 64 %, respectivamente

¹<https://www.nrel.gov/>

y con otras materias primas como arroz donde el contenido es del 70 % (Tovar Benítez, 2008), representa un valor significativo de sustrato inicial para el proceso de hidrólisis. Esta información se complementa con la presentada en las Tablas **2-2:2-5** de la Sección 2.2 donde se realiza la descripción y caracterización de otros materiales amiláceos.

Tabla 7-1. Comparación de caracterizaciones para almidones.

Componente	Referencia				
	BIOFRUN	(Tovar Benítez, 2008) (Trigo)	(Bashir and Aggarwal, 2017) (Trigo)	(Frakolaki et al., 2018) (Trigo)	(Tovar Benítez, 2008) (Arroz)
Humedad	7,87±0,22	13,2	7,96±0,09	12,5	13,1
Sólidos	92,13±0,22	-	-	-	-
Extractivos con hexano (lípidos)	0,03±0,01	2,2	0,32±0,14	-	2,4
Extractivos con agua	2,26±0,14	-	-	-	-
Extractivos con etanol	1,02±0,06	-	-	-	-
Almidón base seca	80,70±0,01	59,2	40,00	64,21±0,38	70,4
Cenizas	0,350±0,002	-	0,29±0,05	1,96±0,41	-
Proteína base seca	2,30	11,7	0,39±0,12	15,17±1,13	7,4
Total	86,67	73,10	41,00	81,34	80,2

El valor total de la caracterización equivale a un 86,67 % asociado al valor de extractivos, contenido de almidón, cenizas y proteína. Se observa una caracterización más completa respecto a otros autores como Tovar Benítez (2008); Bashir and Aggarwal (2017); Frakolaki et al. (2018) con valores de 73 %, 41 % y 81 % para trigo y 80 % para otros cereales como arroz. El contenido de proteína puede ser de interés dado la posibilidad de formar complejos almidón-proteína-lípidos (Guo et al., 2018) pero dada su proporción 2,30 % (libre de extractivos) respecto al 80.70 % de almidón no es significativo. Los extractivos en agua equivalen al 2,26 %, en etanol al 1,02 % y en hexano al 0,03 %, siendo de interés en el proceso porque se asocian con material inorgánico, azúcares no estructurales o material nitrogenado, residuos de clorofila, ceras y otros componentes minoritarios y lípidos provenientes de la producción de almidón. Esto es importante porque materiales como lípidos pueden generar complejos almidón-lípidos (Wang et al., 2017; Guo et al., 2018; Kong et al., 2018) y disminuir su disponibilidad para procesos de hidrólisis, comparando el contenido de lípidos con los demás reportados se puede descartar esto y concluir que se cuenta con un alto grado de pureza del almidón que lo convierte en una materia prima adecuada como estándar en el escalado de este tipo de procesos. El porcentaje restante puede asociarse con material orgánico e inorgánico (fibra cruda, minerales, entre otros) en la biomasa debido a su proceso de producción.

7.2. Determinación del contenido de proteína en α -amilasa y amiloglucosidasa

Para la determinación del contenido de proteína en las enzimas se utilizó el método de Bradford (Comassie Blue): se basa en la unión del colorante Azul de Comassie a las proteínas. El colorante existe en dos formas, una azul y otra naranja. Las proteínas se unen a la forma azul para formar un complejo proteína-colorante. El tinte azul de Comasie G-250 tiene absorción máxima a $465nm$; al unirse a la proteína absorbe a $595nm$. El colorante azul de Coomassie se une principalmente a los residuos de aminoácidos básicos y aromáticos, especialmente arginina (Walker, 2002).

Para $500mL$ de Colorante Reactivo, se disolvió $50mg$ de Coomassie Blue Brilliant G-250 en $25mL$ de etanol al 95% . Se añadió a esta solución $50mL$ de ácido fosfórico 85% p/v. Finalmente, en un balón de $500mL$ se adiciono la solución resultante y se aforo el volumen con agua destilada, se agito en plancha magnética por $5min$, se filtró en montaje de vacío con papel Whatman N°1 y se deposito en frascos oscuros o ámbar a temperatura ambiente.

Se tomo un patrón de albúmina de suero bovino (ABS) y se disolvieron $10mg$ en $10mL$ de agua destilada, con lo que obtuvo una solución madre con una concentración de $1mg/mL$. Se preparó una curva de calibración variando la cantidad de albumina desde 0 hasta $80\mu L$ en $3100\mu L$ de muestra con agua destilada y reactivo de Bradford. Los estándares se dejaron en reposo por $5min$ y se leyeron en el espectrofotómetro a $595nm$. Con la ecuación de la recta generada, se encontró la concentración de proteína (mg/mL) del analito de interés. Este mismo procedimiento se realizó para cada una de las enzimas por triplicado a cada una de ellas se le realizaron dos diluciones seriadas una primera con un factor de dilución de $1 : 110$ y otra con un factor de dilución de $1 : 3$, para un factor final de $1 : 330$, garantizando que la muestra se encontraba dentro de la curva de calibración.

Tabla 7-2. Cantidad de proteína α -amilasa y AMG.

Enzima	Absorbancia	Absorbancia prom	Concentración de Proteína (mg/mL)	Desviación estandar	Cantidad de proteína (mg)
α -amilasa	0,622	0,612	4210,55	0,02	4,21
	0,627				
	0,587				
AMG	0,497	0,552	3781,69	0,05	4,78
	0,581				
	0,578				
	0,578				

A partir de los resultados de la Tabla 7-2 se observa una concentración de proteína en las muestras de α -amilasa y AMG, de $4211mg/mL$ y $3782mg/mL$, respectivamente. No fue posible encontrar ni en la bibliográfica revisada ni en las fichas técnicas de los proveedores, datos reportados para realizar una comparación de los resultados, Este dato da un primer acercamiento a la caracterización de las enzimas y su contenido proteico. Además permitirá

expresar la actividad enzimática de la enzima por cantidad de proteína como actividad específica.

7.3. Determinación de la actividad enzimática de α -amilasa y amilogucosidasa

7.3.1. Medición de la actividad enzimática de α -amilasa

Para el caso de la determinación de la actividad enzimática de α -amilasa comercial, se define una unidad (U) como la cantidad de enzima que libera 1,0mg de maltosa del almidón en 15min a pH de 6,9 y 95°C (Ramírez et al., 2018b). Para la medición de la actividad enzimática de α -amilasa se usaron los protocolos de NREL. Para esto se debe realizar la construcción de una curva de calibración de maltosa con concentraciones entre los 0,05g/L y 2,00g/L utilizando la técnica de DNS (Miller, 1959). Cada una de las soluciones de maltosa se preparan por triplicado y la curva se construye al graficar sus promedios contra sus correspondientes absorbancias. La ecuación de dicha curva tendrá una forma dada por la ecuación de la línea recta:

$$Maltosa(g/l) = Pendiente \cdot Abs - Intercepto \quad (7-1)$$

La determinación de los productos de hidrólisis de almidón con la enzima α -amilasa se realiza por el método DNS, para el cual se emplea la curva estándar de maltosa construida.

Primero se debe realizar un pretratamiento de la solución de almidón preparada. Para esto, se lleva la solución de almidón a ebullición y se mantiene a esta temperatura por 15min con agitación mecánica. Luego, se deja enfriar la solución y se completa de nuevo a 25mL con agua destilada permitiendo la liberación de amilosa y amilopectina hacia el seno del fluido.

La α -amilasa puede presentar inhibición por sustrato (almidón) y por lo tanto se debe de someter la solución a un primer tratamiento a 20°C por 3min para que haya un primer consumo del sustrato disponible. Posteriormente, se lleva a cabo la reacción de hidrólisis propiamente a una temperatura entre 80°C–95°C que es el rango óptimo para la α -amilasa durante 5min (Ramírez et al., 2018b).

Una vez calculada la absorbancia, a partir de la ecuación de la curva estándar de maltosa y teniendo en cuenta el factor de dilución (fd) realizado en el presente ensayo (1/6); se calcula la concentración real de maltosa liberada. Los mg de maltosa liberados se calculan como:

$$mg \text{ maltosa} = \left(\frac{g_{maltosa \text{ reales}}}{L} \right) \cdot \left(\frac{1000mg_{maltosa \text{ reales}}}{1g_{maltosa \text{ reales}}} \right) \cdot L_{solución \text{ almidón}} \quad (7-2)$$

La actividad enzimática de la α -amilasa está dada por:

$$U_{\alpha\text{-amilasa}} = \frac{mg \text{ maltosa}}{mL_{\text{disolución enzima}} \cdot t_{\text{reacción}}} \quad (7-3)$$

Donde: mg de maltosa son obtenidos a partir de la concentración de maltosa liberada calculada en la ecuación 7-8, mL de disolución de enzima son los mililitros de enzima diluida tomados para realizar el ensayo y $t_{\text{reacción}}$ es el tiempo de reacción al que fue sometido la muestra. Luego este valor ser multiplicado por un factor de dilución ($fd_{\alpha\text{-amilasa}}$) de la enzima.

Otra forma más precisa de reportar la actividad enzimática es a partir de la cantidad proteínica en la enzima (actividad específica) o a partir de la cantidad de almidón adicionada a la solución. Luego este valor ser multiplicado por un factor de dilución ($fd_{\alpha\text{-amilasa}}$) de la enzima:

$$U_{\alpha\text{-amilasa}} = \frac{mg \text{ maltosa}}{mL_{\text{disolución enzima}} \cdot t_{\text{reacción}} \cdot mg_{\text{Proteína}}} \quad (7-4)$$

$$U_{\alpha\text{-amilasa}} = \frac{mg \text{ maltosa}}{mL_{\text{disolución enzima}} \cdot t_{\text{reacción}} \cdot g_{\text{almidón}}} \quad (7-5)$$

Inicialmente se presenta la curva de calibración de maltosa, Figura 7-1, para una concentración entre 0,05g/L y 2,00g/L, la cual presenta un coeficiente de correlación de R^2 de 0,9991 y es representada por la ecuación:

$$\text{Concentración}(g/l) = 2,9029 \cdot Abs + 0,0419 \quad (7-6)$$

Se observa un coeficiente de correlación adecuado para el proceso, lo que permite tener resultados acertados.

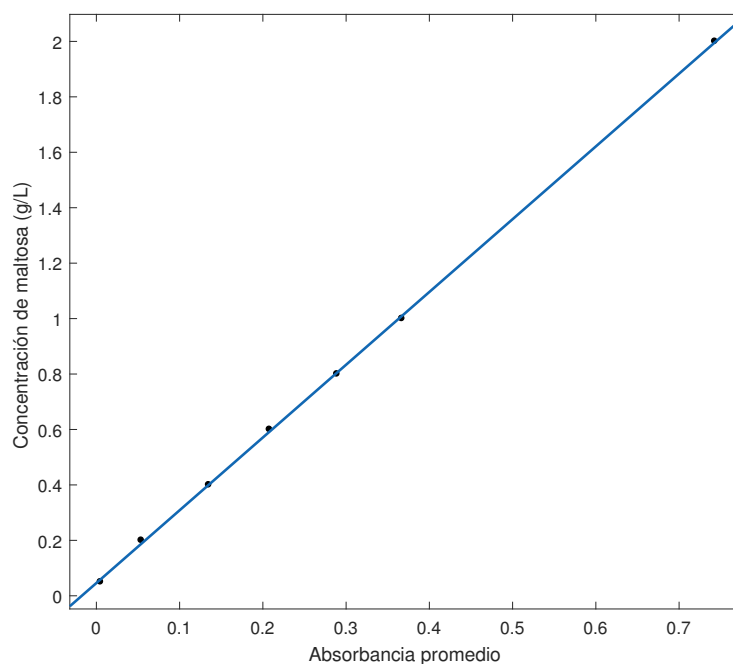


Figura 7-1. Curva de calibración estándar de maltosa.

Se seleccionaron factores de dilución entre 1/18000 y 1/40000 y se aplicó la metodología mencionada, para cada uno de los factores de dilución se obtuvo las cantidades de maltosa liberadas, presentadas en la Tabla 7-3.

Tabla 7-3. Cantidad de maltosa liberada respecto al factor de dilución.

Factor de dilución	Absorbancia promedio	Absorbancia corregida*	Maltosa liberada (g/L)	Maltosa liberada (mg)
1/18000	0,091	0,056	1,233	1,233
1/19000	0,112	0,054	1,198	1,198
1/20000	0,082	0,050	1,042	1,042
1/40000	0,047	0,011	0,437	0,437

*Absorbancia a la cual se le resta tanto un blanco de enzima como de sustrato.

Se observa que la dilución de enzima que está más cerca en liberar 1,000mg de maltosa corresponde a un factor de dilución de 1/20000, en el cual se obtuvo 1,042mg de maltosa liberados, los datos más precisos se obtuvieron para el fd de 1/40000 dado que es el que posee menor desviación estándar.

Finalmente, para calcular el factor de dilución en el que se obtendría exactamente 1,000mg de maltosa liberado se realizó a partir de los resultados obtenidos, una curva de logaritmo de la concentración de enzima respecto a los miligramos de maltosa liberados, esta curva se puede graficar para cada uno de los factores de dilución de enzima evaluados. La Figura 7-2 presenta la regresión para la concentración de enzima en escala logarítmica respecto a los

miligramos de maltosa liberados, presenta un coeficiente de correlación (R^2) de 0,9845 y se representa por la ecuación:

$$\text{Log concentración enzima}(\mu\text{L}/\text{mL}) = 0,4375 \cdot \text{Maltosa liberada}(\text{mg}) - 1,7869 \quad (7-7)$$

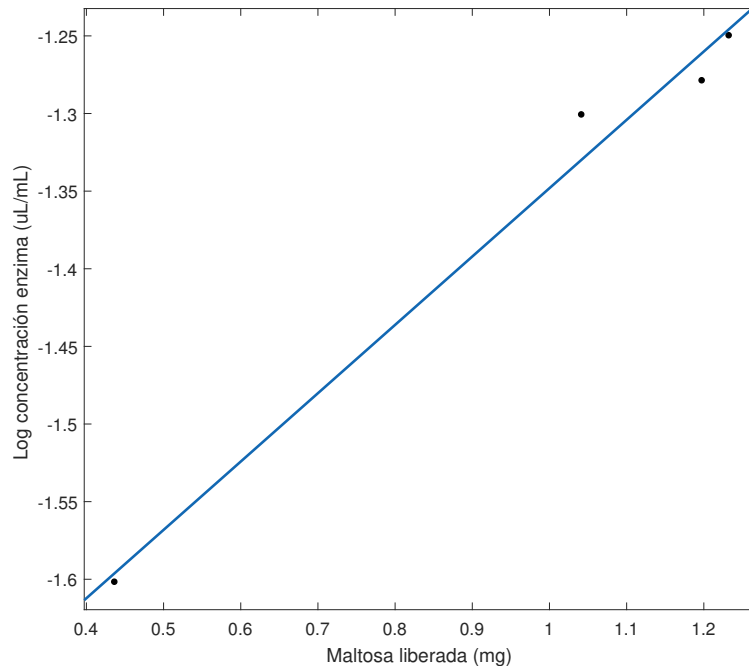


Figura 7-2. Concentración de enzima en escala logarítmica respecto a miligramos de maltosa liberados.

A partir de la ecuación de la Figura 7-2 se calcula la concentración de enzima requerida para liberar 1,00mg de maltosa la cual es igual a $0,0447\mu\text{L}/\text{mL}$, que corresponde a un factor de dilución de 22356 y con la que se obtiene una actividad enzimática de $1490U$ y es posible de manera específica por unidad de proteína $354U_{\alpha\text{-amilasa}}/\text{mg}_{\text{proteína}}$.

7.3.2. Medición de la actividad enzimática de amilogucosidasa

La actividad de la enzima amilogucosidasa se determinó mediante cromatografía líquida de alta resolución o *HPLC* por sus siglas en inglés, a una temperatura de 50°C , usando como fase móvil 50mM ácido sulfúrico en agua y un flujo de $0,6\text{mL}/\text{min}$; a partir de una curva de calibración estándar de glucosa con un tiempo de retención de 9,278min a las condiciones de operación mencionadas. Una unidad de amilogucosidasa (U) se definió como la cantidad de enzima AMG que libera 1mg de glucosa a 25°C a pH 4,3 durante 30min (Ramírez et al.,

2018a) . Luego este valor se multiplicado por el factor de dilución (fd_{AMG}) de la enzima.

Los mg de glucosa liberados se calculan como:

$$mg \text{ glucosa liberados} = \left(\frac{g_{glucosa \text{ reales}}}{L} \right) \cdot \left(\frac{1000mg_{glucosa \text{ reales}}}{1g_{glucosa \text{ reales}}} \right) \cdot L_{solución \text{ maltosa}} \quad (7-8)$$

La actividad enzimática de la amiloglucosidasa está dada por:

$$U_{AMG} = \frac{mg \text{ glucosa liberados}}{mL \text{ enzima} \cdot tiempo_{rxn}} \quad (7-9)$$

Otra forma más precisa de reportar la actividad enzimática es a partir de la cantidad proteína en la enzima (actividad específica) o a partir de la cantidad de almidón adicionada a la solución. Luego este valor ser multiplicado por un factor de dilución (fd_{AMG}) de la enzima:

$$U_{AMG} = \frac{mg_{glucosa}}{mL_{disolución \text{ enzima}} \cdot t_{reacción} \cdot mg_{Proteina}} \quad (7-10)$$

$$U_{AMG} = \frac{mg_{glucosa}}{mL_{disolución \text{ enzima}} \cdot t_{reacción} \cdot g_{almidón}} \quad (7-11)$$

Dada la simplicidad de la técnica usando *HPLC* solo se necesita de la preparación de una solución de maltosa 2%p/v y buffer de ácido fumárico a pH 4,3 y pH 9,0 (usado en el proceso de hidrólisis enzimática).

Para la parte experimental se tiene la muestra, un blanco de enzima y un blanco de sustrato, a la muestra y blancos se les adicionó determinadas cantidades de enzima, buffer pH 4,3 y solución de maltosa. Se dejó un periodo de 30min a temperatura ambiente y luego se procede a detener la reacción con el buffer de pH 9,0, luego se realiza la determinación mediante *HPLC* con una curva de calibración de glucosa valida entre 0,1 – 2,0g/L, la cual es descrita por la ecuación 7-12 ²:

$$Concentración(g/l) = 3,42853 \times 10^{-6} \cdot Area - 5,80024 \times 10^{-4} \quad (7-12)$$

Luego de esto, se realizaron diferentes diluciones de enzima, para un volumen total de 250mL. Este fd varió desde 1/2500 con 100,0 μ L de enzima, 1/3000 con 83,3 μ L de enzima, 1/3500 con 71,4 μ L de enzima, 1/4000 con 50,0 μ L de enzima, hasta 1/5000 con 40,0 μ L de enzima. Para

²La curva de calibración de glucosa es preparada en el *HPLC*, la cual lee áreas para dar concentraciones.

cada fd se realizó la metodología y se obtuvo las cantidades de glucosa liberada presentadas en la Tabla 7-4:

Tabla 7-4. Cantidad de glucosa liberada respecto al factor de dilución.

Volumen de enzima	Dilución	Concentración de enzima ($\mu\text{L}/\text{mL}$)	mg glucosa liberados	Log (concentración de enzima)
100,0	1/2500	0,400	1,438	-0,398
83,3	1/3000	0,333	1,342	-0,477
71,4	1/3500	0,286	1,285	-0,544
50,0	1/4000	0,250	1,168	-0,602
40,0	1/5000	0,200	1,063	-0,699

Se reportan los mg de glucosa liberados para cada factor de dilución asociado. De acuerdo a la definición de actividad presentada el factor de dilución más cercano corresponde a 1/5000 con 1,063mg de glucosa liberados.

Finalmente, para calcular el factor de dilución en el que se obtendría exactamente 1mg de maltosa liberado se realiza primero, a partir de los resultados obtenidos, una curva de logaritmo de la concentración de enzima contra mg de maltosa liberados. esta curva se puede graficar para cada uno de los factores de dilución de enzima evaluados.

La Figura 7-3 presenta la regresión para la concentración de enzima en escala logarítmica respecto a los miligramos de glucosa liberados, presenta un coeficiente de correlación (R^2) de 0,9881 y se representa por la ecuación:

$$\text{Log concentración enzima}(\mu\text{L}/\text{mL}) = 0,7804 \cdot \text{Glucosa liberada}(\text{mg}) - 1,5267 \quad (7-13)$$

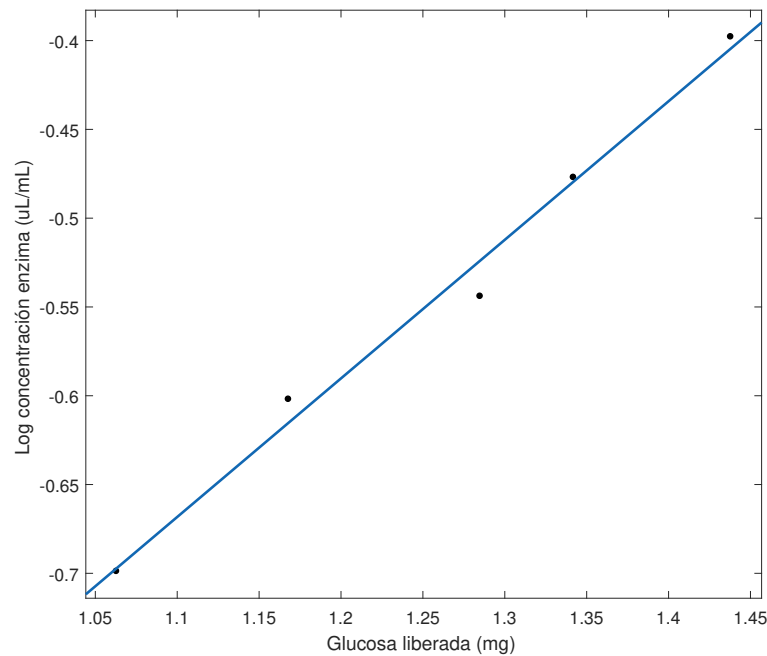


Figura 7-3. Concentración de enzima en escala logarítmica respecto a miligramos de glucosa liberada.

A partir de la ecuación de la Figura 7-3 se calcula la concentración de enzima requerida para liberar 1mg de maltosa la cual es igual a $0,179\mu\text{L}/\text{mL}$, que corresponde a un factor de dilución de $1/5576$ y con la que se obtiene una actividad enzimática de 186U , también se puede definir de manera específica por cantidad de proteína lo que es equivalente a $449U_{AMG}/\text{mgProteína}$.

La enzima α -amilasa presenta una mayor actividad enzimática respecto a la enzima AMG, esto significa menor cantidad de enzima α -amilasa para generar la misma cantidad de sustrato, pero se debe tener en cuenta que son diferentes sustratos los que se analizan y en tiempo de reacción diferentes.

7.4. Cinética de hidrólisis enzimática de almidón de trigo

En secciones anteriores se menciona como la hidrólisis enzimática de materiales amiláceos se compone de tres etapas, gelatinización, licuefacción y sacarificación. Para cada una de estas etapas se debe tener en cuenta condiciones de pH, temperatura, concentración de sustrato, relación E/S, activadores, desactivación de las enzimas, tipo de buffer y tiempos de proceso.

7.4.1. Condiciones de operación del proceso

En la Tabla 7-5 se presentan las condiciones generales para el proceso de hidrólisis de almidón de trigo. Se preparó 3L de una solución con un porcentaje de sólidos del 20 %, lo que es equivalente para un volumen de 3L a 600g de almidón y 2400g de buffer fumárico dado su grado alimenticio, se ajustó el pH en 5,8 y se adicionó como activador 50ppm de CaCl₂.

La muestra se sometió al proceso de gelatinización a temperaturas entre los 90 : 95°C durante un tiempo de 15min y una agitación de 310rpm. Al final de esta etapa se ajusto nuevamente el pH en 5,8 y se llevo a la etapa de licuefacción, adicionando una cantidad de 163,3μL de α-amilasa (equivalente a 3,1U_{α-amilasa/galmidón}) de acuerdo con la relación E/S 0,036 %p/p y el volumen de operación, el calculo se presenta en la ecuación 7-14:

$$mL_{enzima} = \frac{\text{Relación E/S} \cdot g_{Biomasa} \cdot \%almidón}{100 \cdot \rho_{enzima} \cdot \%sólidos secos} \quad (7-14)$$

Dado que esta etapa depende directamente de la cantidad de sólidos se debe realizar esta corrección, el proceso se sometió a una agitación de 310rpm a presión atmosférica, luego se inicio el conteo de 2h donde se tomaron muestras del proceso cada 30min.

Tabla 7-5. Condiciones para la hidrólisis enzimática de almidón de trigo.

% sólidos secos	% almidón	Volumen de trabajo (mL)	% Sólidos	Biomasa a pesar (g)	Cantidad de buffer (mL)	% Sólidos real
0,9213	80,70	3000	20	600	2402	19,99
Etapa de gelatinización						
Temperatura (°C)	Presión		Tiempo (min)		Agitación (rpm)	pH
90:95	Atmosférica		15		310	5,8
Etapa de licuefacción						
Temperatura (°C)	Presión		Tiempo (horas)		Agitación (rpm)	pH
60	Atmosférica		2		310	5,8
Cantidades relacionadas						
E/ S (%p/p)		α-amilasa (mL)		α-amilasa (mL) corregida		α-amilasa (uL) corregida
0,036		0,1504		0,1633		163
Etapa de sacarificación						
Temperatura (°C)	Presión		Tiempo (horas)		Agitación (rpm)	pH
60	Atmosférica		6,5		310	4,3
Cantidades relacionadas						
E/ S (%p/p)		Glucoamilasa (mL)				Glucoamilasa (uL)
0,18		0,7744				774

Para la etapa de sacarificación, una vez finalizada la etapa de anterior, se llevo el pH de la solución a 4,3, se agregó una cantidad de 774,4μL de AMG de acuerdo con la relación E/S 0,18 %p/p (equivalente a 0,4U_{AMG/galmidón}), se sometió a una agitación de 310rpm y presión atmosférica y se inicio el conteo de 6,5h, luego se tomaron muestras cada 30min, a excepción de los 90min, donde se tomaron muestras cada 10min de modo que permitiera observar las variaciones de la concentración de maltosa. Cada vez que se tomaba una muestra, esta era centrifugada a 10000rpm y 4°C por 7min, el sobrenadante era inactivado con HCL 1M y

filtrado en tamaño de poro $0,45\mu\text{m}$ para ser leído mediante *HPLC* ³.

Las relación E/S seleccionada para la etapa de licuefacción se fundamentó en trabajos anteriores del grupo de investigación y la usada en la etapa de sacarificación se seleccionó de acuerdo con la revisión presentada en secciones pasadas, tomando la mayor cantidad reportada. Al seleccionar estas relaciones E/S como variable de diseño en el escalado, caso que se expondrá más adelante, permitirá observar como al aumentar las cantidades de enzima, se aumentan las velocidades de reacción del proceso, lo que implicaría mejoras en términos de tiempos de proceso.

7.4.2. Aspectos a tener en cuenta sobre el proceso

La solución de almidón de trigo 20 % se sometió a una rampa de calentamiento, como proceso de gelatinización, desde temperaturas entre los 25° y 30° hasta los 90°C y 95°C , esto tardó aproximadamente 2h. Una vez alcanzado este rango de temperatura se dejo 15min de modo que todo el material se encontrara completamente gelatinizado, luego de esto, se llevo la solución de almidón de trigo a la temperatura de licuefacción (60°C), lo cual tardo 30min aproximadamente, se presenta un esquema en la Figura 7-4 , durante todo el proceso la solución de almidón se sometió a una agitación de 310rpm (máxima operable), usando un agitador helicoidal.

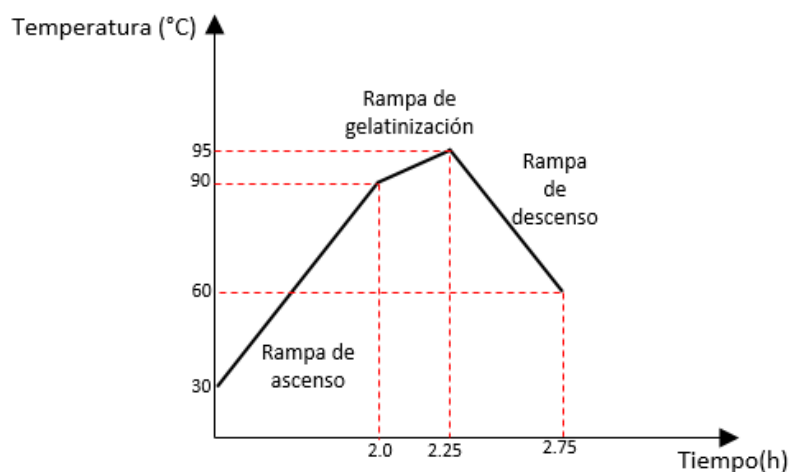


Figura 7-4. Gelatinización mediante métodos térmicos (rampa de calentamiento).

La gelatinización de materiales amiláceos dependerá de la matriz de la cual está compuesta, para el caso de almidón de trigo, se encuentran reportes donde la solución es sometida a temperaturas de 90°C durante 30min (Baks et al., 2008). Reportes más detallados como

³En la Sección 7.5 se encuentra la discusión en detalle de este proceso.

los presentados por Xie et al. (2019) analiza varios tipos de almidón de trigo presentando temperaturas de inicio de gelatinización desde los 56°C hasta los 59°C y temperaturas de finalizado de la gelatinización entre los 83°C y 86°C. Rosicka-Kaczmarek et al. (2017) presenta un inicio del proceso de gelatinización a los 65°C y una temperatura de 67,5°C para una gelatinización completa, (Sjoo and Nilsson, 2017) presenta temperaturas de inicio de la gelatinización de 57,1°C y finalizado de 66,2°C, (Allan et al., 2018) encontró un inicio de la temperatura de gelatinización en 60,2°C y finalizado cerca de los 72°C. Experimentalmente se determinó que la mezcla de almidón de trigo a las condiciones indicadas presenta un cambio en la viscosidad de manera cualitativa (no fue posible medir la viscosidad de la solución) a partir de los 68°C aproximadamente, lo que concuerda con los dos últimos reportes.

Respecto al proceso de hidrólisis enzimática, existen investigaciones respecto a los tres procesos que la componen. Respecto a la gelatinización se han investigado diferentes tipos de tratamientos a los cuales puede ser sometida una muestra, como ejemplo se tiene la investigación realizada por Wang et al. (2017) la cual se enfocó en mostrar como procesos de ultrasonido aplicado a soluciones de almidón de trigo pueden mejorar la eficiencia de hidrólisis por encima de tratamientos comunes e incluso tratamientos con sonicación, trabajos similares se realizaron sobre almidón de maíz (Li et al., 2018), revisiones respecto a este tipo de pretratamientos se pueden encontrar en Zhu (2015). Por otro lado, Leite et al. (2017) propone un método físico como el high pressure processing (HPP) como alternativa, obteniendo resultados satisfactorios sobre almidón de alverja para presiones superiores a los 500 MPa/15min.

Otra metodología para realizar gelatinización consiste en rampas de calentamiento, estas se fijan en función de los reportes presentados por Baks et al. (2008) e investigaciones realizadas sobre otras matrices amiláceas como la reportada por Betiku et al. (2013), la cual somete la solución de almidón de papa a 97°C durante 5min o la reportada por Zbed et al. (2016) sobre almidón de maíz, el cual se sometió a 90°C entre 5min y 15min. Otros trabajos como los realizados por Bravo Rodríguez et al. (2006) presentan una gelatinización de almidón de papa a 95°C y Dura et al. (2014) presenta el proceso llevado en una rampa de calentamiento desde 50°C a 95°C durante 282seg, luego se mantuvo a esta temperatura por 150seg y finalmente se llevo a 50°C, para este trabajo, se observó como estos procesos ofrecen una alternativa atractiva para el aumento del grado de porosidad o relación área superficial/volumen (Tester et al., 2006; Kim and Huber, 2010; Zhu, 2017) y posterior trabajo con enzimas dada la mejora en la disponibilidad del almidón (amilosa y amilopectina) por parte de estas.

Malumba et al. (2018) realizó un aporte interesante desde el análisis del efecto de la tasa de calentamiento sobre la respuesta dinámica de los gránulos de almidón en términos de gelatinización, hinchazón granular, comportamiento de pegado así como en términos de características en la textura de las muestras después de diferentes tratamientos hidrotérmicos

de almidón. El trabajo tuvo como objetivo analizar rampas de calentamiento de 0,5K/min, 2,0K/min y 5,0K/min, sobre almidón de trigo y de papa. Se encontró como a medida que aumenta tasa de calentamiento aumenta la temperatura de gelatinización para almidón de trigo, pero entre 0,5K/min y 5,0K/min este aumento va desde 58,14°C hasta 61,49°C, lo cual implica que no genera un cambio representativo sobre la gelatinización del proceso, si se analiza desde el punto de vista del gránulo de almidón y su tamaño, a mayor tasa de calentamiento se tendrá un leve aumento del diámetro del gránulo, pero lo interesante es observar como a medida que aumenta la temperatura, independiente de la tasa de calentamiento, el diámetro si sufre un cambio significativo pasando de un valor cercano a los 20 μ m para temperaturas entre los 30°C y 50°C hasta valores superiores a los 30 μ m para temperaturas entre los 70°C y 80°C; en este punto se evidencia que los gránulos de almidón se encuentran hinchados debido a la adsorción de las moléculas de agua, pero al llegar a valores de 70°C el diámetro del almidón de papa empieza a decrecer, lo que se atribuye a su rompimiento, en comparación del almidón de trigo que logra mantener su diámetro constante para temperaturas cercanas a los 80°C.

A pesar de encontrar reportes con temperaturas entre los 65° y 66°C para la gelatinización de almidón de trigo, se decidió someter la solución a temperaturas superiores entre los 90° y 95°C, a modo de rampa de calentamiento como se presenta en la Figura 7-4, los tiempos de la rampa de ascenso y descenso son tomados de acuerdo con la dinámica del reactor, fijado por el sistema de control.

7.4.3. Resultados cinética de hidrólisis enzimática de almidón de trigo

Una vez analizadas condiciones de proceso, la gelatinización asociada rampas de calentamiento puede tener un efecto significativo sobre el almidón, someterlo a temperaturas superiores a la temperatura de gelatinización puede estimular una mayor liberación de los componentes de interés, lo cual implicaría un mayor aprovechamiento en procesos de hidrólisis enzimática, por esto desde los primeros tiempos de toma de muestras se observan concentraciones elevadas de maltopentosa como las presentadas en la Figura 7-5 y el efecto de la α -amilasa es poco sobre la amilosa y amilopectina, el tiempo de 2h fue tomado respecto a ensayos anteriores, donde se pudo constatar que a 4h y 8h los aumentos en la concentración de maltodextrinas no fue significativo.

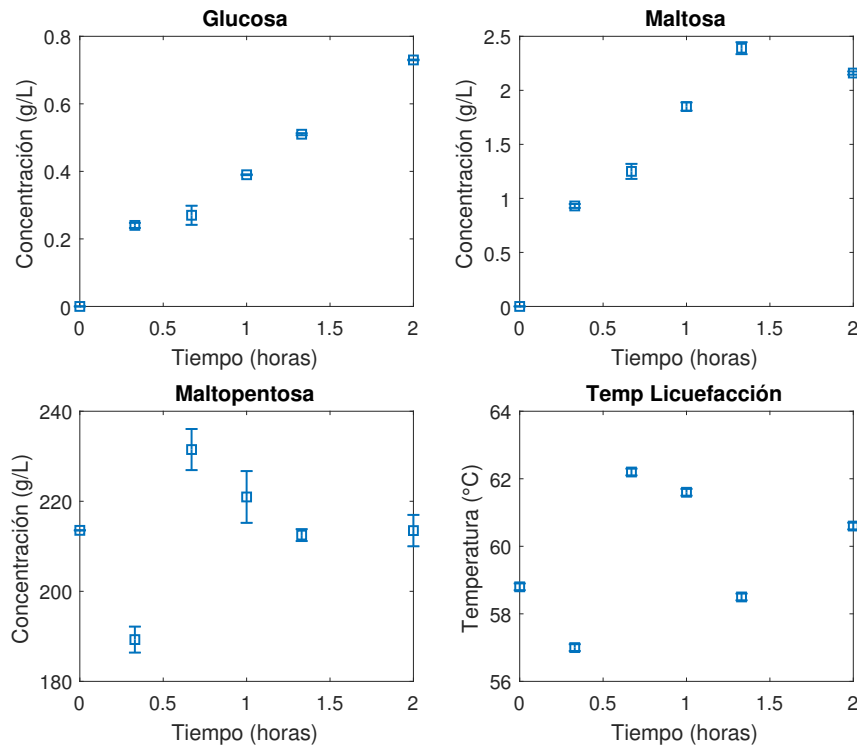


Figura 7-5. Cinética del proceso de hidrólisis enzimática para almidón de trigo, etapa de licuefacción, volumen 3L, porcentaje sólidos 20 %, relación E/S 0,036 %p/p, S_0 161g/L, CaCl_2 20ppm, temperatura 60°C.

En la Figura 7-5 se presentan los perfiles de concentración de glucosa, maltosa, maltopentosa y temperatura del reactor, las tendencias de aumento de las concentraciones de glucosa y maltosa no son significativas respecto a la concentración de maltopentosa, quien es el oligosacárido de interés en esta etapa. Para la concentración inicial de maltopentosas, la alta viscosidad de las muestras no permitió la obtención de una fase líquida para su cuantificación, por lo cual se asume que las concentraciones iniciales de glucosa y maltosa son cercanas a cero y la concentración de maltopentosas inicial es un promedio de los datos obtenidos en el tiempo, esta decisión se toma de acuerdo a experimentaciones previas y los posibles efectos de la metodología de gelatinización (Sección 7.4.2) sobre el almidón de trigo generando la liberación de la amilosa y amilopectina en el seno del fluido.

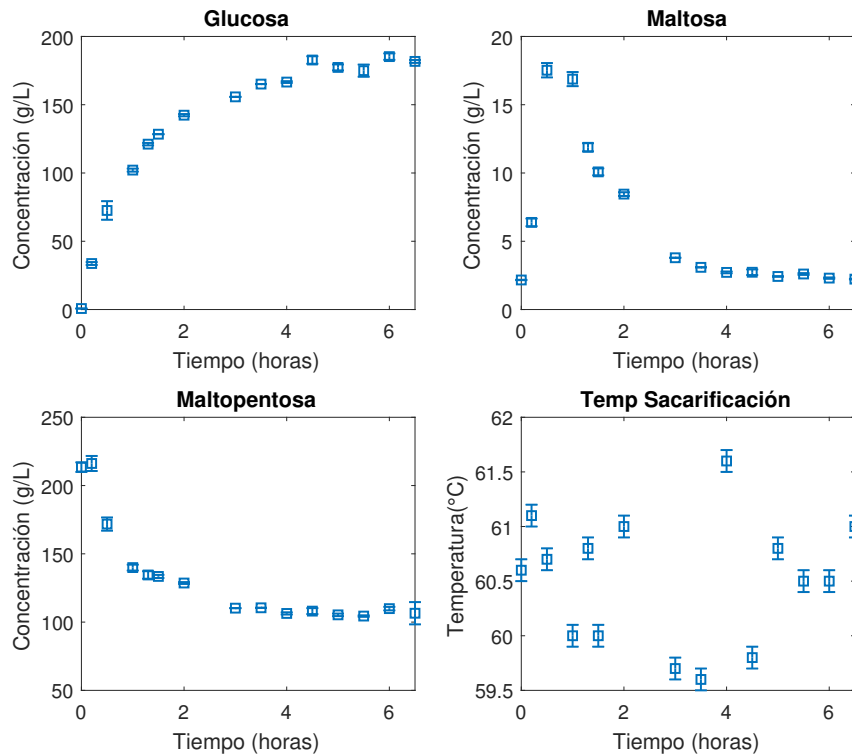


Figura 7-6. Cinética del proceso de hidrólisis enzimática para almidón de trigo, etapa de sacarificación, volumen 3L, relación E/S 0,11 %p/p, $C_{0,glucosa}$ 0,734g/L, $C_{0,maltosa}$ 2,165g/L, $C_{0,maltopentosa}$ 213,493g/L, temperatura 60°C.

Para la etapa de sacarificación, presentada en la Figura 7-6 se observan los perfiles de concentración de glucosa, maltosa, maltopentosa y temperatura del reactor, la glucosa alcanzó concentraciones de 181g/L aproximadamente, donde luego de 4h empezó a estabilizarse, la concentración de maltosa presenta el comportamiento habitual de aumento y posterior descenso por acción de la AMG, al igual que la maltopentosa, la cual presenta una disminución significativa desde valores cercanos a los 213g/L hasta los 106g/L, valores que aún son altos para el proceso, inicialmente esto puede atribuir a una inhibición competitiva por producto glucosa y por sustrato, ya que componentes residuos de oligosacáridos de mayor peso molecular pueden interactuar con la enzima (Zanin et al., 1996; Morales et al., 2008; Ruiz Cruz, 2012), una opción para evitar este tipo de inhibiciones es proponer reactores para el proceso de hidrólisis enzimática operando en modo feed batch como el trabajo realizado por (Morales et al., 2008), quien luego de 4h de operación en modo batch, inicio una operación continua y se logró obtener concentraciones más bajas de maltopentosa en el proceso, por esto, en las siguientes secciones se realizaran ensayos de inhibición por producto-glucosa, adicionando cantidades de esta al inicio de la hidrólisis enzimática y comparando su comportamiento con otra hidrólisis a las mismas condiciones pero sin adición de glucosa. otro factor que puede

influir es la naturaleza del sustrato, su fracción amorfa y cristalina, donde esta última pueda ser significativa respecto a la otra (Tester et al., 2006; Ao and Jane, 2007; Hernández-Medina et al., 2008; Chung and Liu, 2009), o simple saturación de la enzima con otros componentes diferentes a glucosa. El tiempo de reacción se seleccionó de acuerdo a experimentos anteriores, donde se evaluaron tiempos 8h y se concluyó que el aumento de la concentración de glucosa y maltosa no era significativo a partir de las 6h, por lo cual se reduce en 1,5h.

La temperatura del sistema se fijo en 60°C, pero dada la dinámica del reactor la temperatura varió entre los 57°C y 62°C, valores por debajo del 5% tomado como margen de error (57°C como límite inferior y 63°C como límite superior).

Comparando estos resultados con los obtenidos por Morales et al. (2008) se presenta una disminución significativa en la concentración de glucosa y maltosa (cantidades superiores a los 50g/L), pero cantidades similares para maltodextrinas (alrededor de los 230g/L). Estas diferencias se pueden asociar a las variaciones en las condiciones de proceso, especialmente en la relación E/S de 0,060 %p/p respecto al usado en este experimento de 0,036 %p/p, valor tomado de trabajos previos para condiciones similares de proceso. Para 4h de sacarificación alcanzaron una concentración superior a los 400g/L doblando la concentración encontrada en este experimento para ese tiempo, las condiciones de proceso fueron similares, temperatura 59°C, pH 4.5 en un volumen de 5L, pero la diferencia se atribuye a efectos asociados a la etapa anterior. Otras investigaciones como las realizadas por Zabed et al. (2016) obtuvieron concentraciones de azúcares reductores superiores a los 20g/L y 150g/L, en las etapas de licuefacción y sacarificación, pero usando una relación E/S de 0,3 %p/p en ambas etapas, mayor en ambos casos respecto a la usada en el experimento.

7.5. Desactivación enzimática

Para el análisis de procesos de hidrólisis enzimática es necesario realizar procesos de inactivación de las enzimas implicadas para detener las reacciones de hidrólisis y obtener mediciones exactas en tiempos específicos. Autores como (Morales et al., 2008; Betiku et al., 2013; Jeddou et al., 2014) y otros usaron el sometimiento a altas temperaturas para la inactivación de enzimas como α -amilasa y AMG. Autores como (Beschkov et al., 1983; Morales et al., 2008; Kovaa et al., 2013; Li et al., 2015) utilizaron el pH como método de desactivación de estas enzimas.

En este trabajo las muestras se sometieron a un proceso de hidrólisis enzimática en un volumen de 200mL, con un porcentaje de sólidos del 20%, equivalente a 40g de almidón. Para el proceso de gelatinización se ajustó el pH de las muestras en 5,8 y se sometieron a autoclave durante 15min con presiones inferiores a los 5psi, una vez finalizado el proceso se tomaron muestras, se llevaron a una temperatura de 60°C y se procedió a dar inicio a la etapa de

licuefacción con la adición de $11,20\mu\text{L}$ de α -amilasa, se contabilizaron 2h y luego se procedió a llevar las soluciones a un pH de 4,3 y adicionar $32,84\mu\text{L}$ de AMG para dar inicio al proceso de sacarificación durante 4h. Las muestras inactivadas por pH fueron centrifugadas a 10000rpm y 4°C durante 10min, el sobrenadante fue inactivado con HCl 1M y pasado a través de filtros de $0,2\mu\text{m}$ donde finalmente fueron leídas mediante HPLC.

Las muestras inactivadas por temperatura fueron centrifugadas a 10000rpm y 4°C durante 10min, el sobrenadante fue llevado a tubos de ensayo sometidos a ebullición durante 5min, luego al congelador (0°C) durante 15min, las muestras fueron pasadas a través de filtros de $0,2\mu\text{m}$ donde finalmente fueron leídas mediante HPLC. Luego de 6h las muestras son leídas de nuevo para poder comparar el efecto de los pretratamientos. Es importante mencionar que se tomaron muestras sin inactivar como una referencia, estas fueron centrifugadas y filtradas igual que las muestras anteriores, pero no sufrieron ningún tipo de proceso adicional como aumento de temperatura o adición de ácidos fuertes.

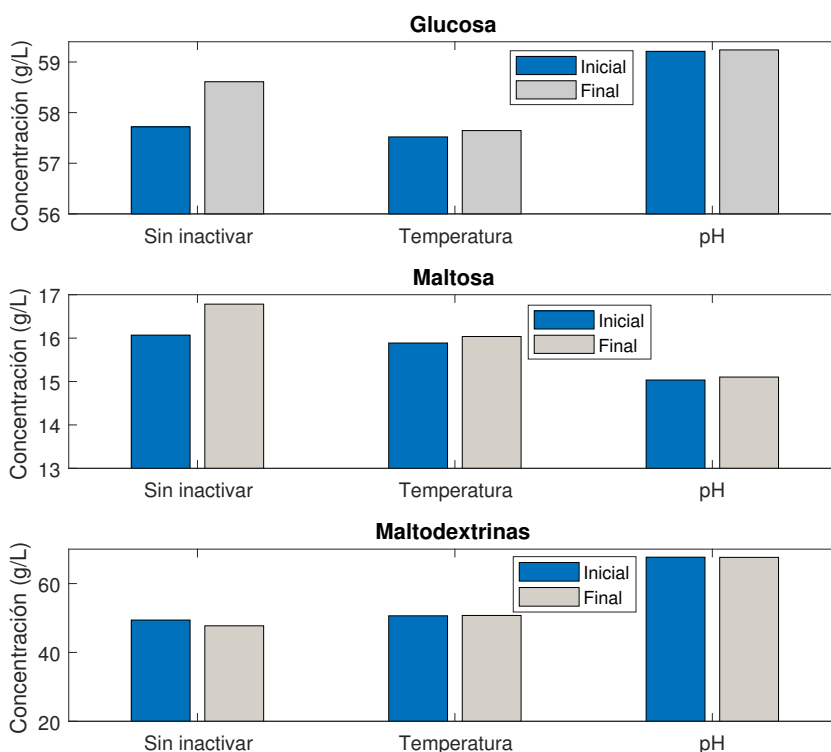


Figura 7-7. Desactivación del proceso de hidrólisis enzimática de almidón de trigo.

En la Figura 7-7 se muestra la concentración de glucosa, maltosa y maltodextrinas con su respectiva desviación estándar calculadas al final de la hidrólisis y 6h después para las muestras sin inactivar, inactivadas por choque térmico e inactivadas por pH. Los dos métodos

de inactivación analizados son efectivos para detener la reacción de hidrólisis, dado que para ningún caso se observa un cambio apreciable en la concentración de glucosa, maltosa o maltodextrinas luego de 6h de realizar la inactivación. Con base en los resultados anteriores se eligió el método de inactivación por pH para detener la reacción de hidrólisis, debido a que metodológicamente es más simple que un choque térmico.

7.6. Efectos inhibitorios por producto (glucosa)

Se realizó un análisis de efectos inhibitorios por producto específicamente glucosa. Se preparó una solución de almidón y glucosa en buffer de ácido fumárico y un estándar de almidón buffer de ácido fumárico al cual no se le adicionó glucosa, ambos con un volumen efectivo de 200mL y un porcentaje de sólidos del 20 %, lo que es equivalente a 40g de almidón y 160g de buffer fumárico.

De acuerdo con experimentaciones previas y para el porcentaje de sólidos trabajado, la máxima concentración alcanzada de glucosa en la etapa de sacarificación es de aproximadamente 180g/L para un tiempo de 4h en esta etapa y 6h en todo el proceso, para una cantidad de enzima α -amilasa de 10,3 μ L (relación E/S= 0,036 %p/p) y de amilogucosidasa de 51,6 μ L (relación E/S= 0,18 %p/p). Partiendo de estos datos, a la muestra se le adicionó 36g de glucosa al inicio del proceso para obtener una concentración inicial de 180g/L y el estándar sin adición inicial de glucosa, se tomó como el punto de comparación para analizar posibles efectos inhibitorios.

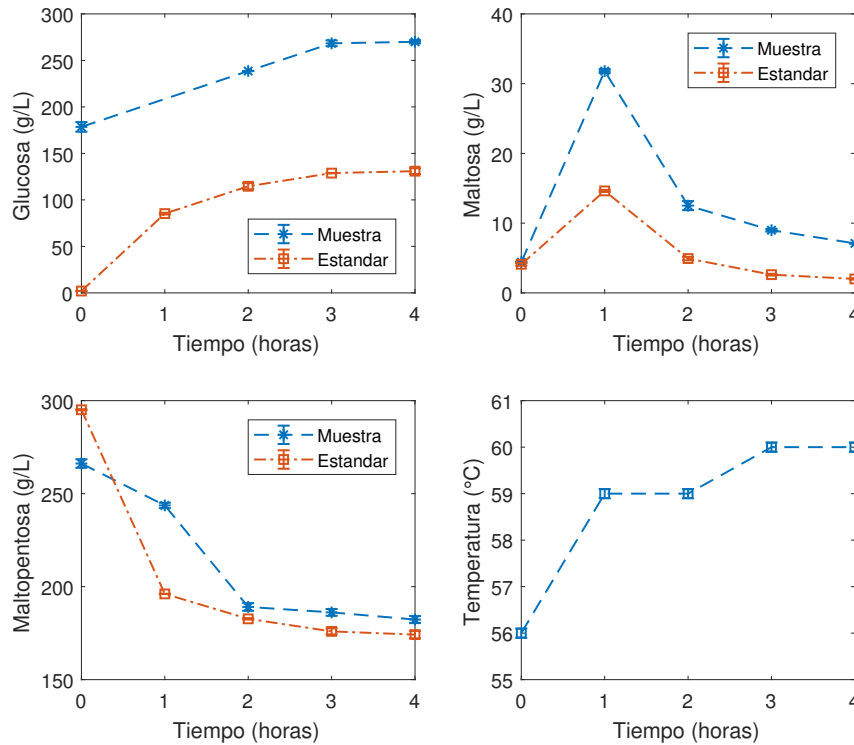


Figura 7-8. Análisis de efectos inhibitorios por glucosa, tiempo $_{Licuefacción}$ =2h, relación $E/S_{\alpha-amialsa}$ = 0,036 %p/p, tiempo $_{Sacarificación}$ =4h, relación E/S_{AMG} = 0,18 %p/p, temperatura de proceso=60°C, concentración de glucosa en muestra= 180g/L.

La etapa de licuefacción se realizó durante 2h y la etapa de sacarificación durante 4h, en este tiempo no se realizó muestreo de la etapa de licuefacción, solo se tomo para la etapa de sacarificación debido al interés en analizar si la aparición de glucosa presentaba un efecto negativo sobre esta etapa del proceso.

La adición de glucosa al inicio del proceso no permite evidenciar si existe inhibición alguna. Las concentraciones finales de maltosa alcanzaron valores cercanos a los 30g/L para un tiempo de 1h cuando se adicionaba glucosa, respecto al estándar que alcanzó valores cercanos a los 14g/L para el mismo tiempo, Figura 7-8, lo cual se considera algo favorable en el proceso, pero la variable determinante a analizar es la concentración de maltodextrinas, para la cual se observa que para 1h de proceso la concentración es mayor en la muestra con 243g/L, respecto al estándar con 196g/L, pero luego para valores superiores a las 2h las concentraciones en la muestra y el estándar son cercanas, esto permite concluir que estas concentraciones de glucosa no son inhibitorias en el proceso o que no se tiene un efecto negativo sobre las concentraciones de proceso, es interesante analizar el comportamiento estabilizante de la temperatura y como se acerca al valor propuesto de 60°C a medida que avanza el tiempo.

Estudios realizados por Zanin et al. (1996) presentan análisis de efectos inhibitorios por glucosa en la etapa de sacarificación, realizaron dos ensayos a las mismas condiciones, temperatura de 45°C y pH de 4,5, con una relación E/S de 0,12 %p/p, uno sin glucosa adicionada y otro con una adición de 100g/L de glucosa. Se encontró para tiempos superiores a 20h ambos ensayos presentaban conversiones de almidón en glucosa similares y superiores al 75 %, pero en tiempos inferiores la conversión de glucosa era superior en el ensayo sin glucosa adicionada, permitiendo corroborar una inhibición competitiva. Si se compara con los resultados obtenidos en este experimento no es posible concluir si existe este tipo de inhibición, pero permite ver como el efecto de adición de glucosa no presenta efectos significativos sobre el proceso.

7.7. Metodología de escalado en la hidrólisis enzimática de almidón de trigo

7.7.1. Especificar el proceso y la tarea de escalado

A continuación, se describe un proceso de hidrólisis enzimática en fase acuosa para la producción de un jarabe de glucosa en un reactor de 3L operando en modo *batch*. Como materia prima se usa almidón de trigo con un contenido de almidón del 80,70 % en base seca. Como condición inicial se usa almidón de trigo de 161,4g/L, equivalente a un 20 % de sólidos.

En la etapa de gelatinización se busca mediante un aumento de la temperatura $T_{gelatinización}=90 : 95^{\circ}\text{C}$ durante un tiempo $t_{gelatinización}=10 : 15\text{min}$, generar la hidratación, hinchazón y retención del agua por parte de los granos de almidón, para la liberación de la amilosa y amilopectina. En la etapa de licuefacción se da la hidrólisis de estos componentes a una Temperatura $T_{licuefacción}=60^{\circ}\text{C}$ y $\text{pH}_{licuefacción}=5.8$ durante un tiempo $t_{licuefacción}=2\text{h}$, con ayuda de la enzima α -amilasa comercial (1490U), usando una relación enzima sustrato (E/S) de 0,036 %p/p (163,0 μL de enzima), atacando al azar los enlaces α -(1,4) glucosídicos de la región central de las cadenas de amilosa y amilopectina, generando oligosacáridos de longitud media (5 a 10 unidades de glucosa) y pequeñas cantidades de otros componentes de alto y bajo peso molecular. Finalmente, la etapa de sacarificación, se da a una Temperatura $T_{sacarificación}=60^{\circ}\text{C}$ y un $\text{pH}_{sacarificación}=4,3$ durante un tiempo $t_{sacarificación}=6,5\text{h}$, usando como condiciones iniciales las concentraciones finales de la etapa de licuefacción. Se utiliza la enzima AMG (186U), usando una relación E/S de 0,18 %p/p (774,4 μL de enzima), atacando los enlaces α -1,4 de extremos no reductores de polisacáridos para la formación de glucosa y los enlaces α -1,6 a más baja velocidad hidrolizando completamente los polisacáridos de tamaño intermedio hasta glucosa, el proceso se resume en la Figura 7-9. Toda la hidrólisis se realizó con la máxima agitación permitida por el reactor 310rpm, usando un agitador tipo hélice.

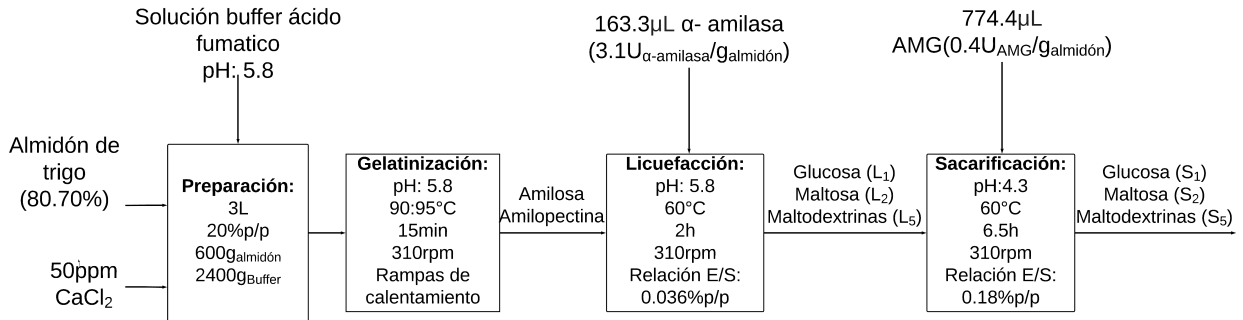


Figura 7-9. Diagrama de flujo del proceso de hidrólisis enzimática de almidón de trigo.

Las variables de estado (x_i) de interés en el proceso para la etapa de licuefacción son: concentración de glucosa (L_1), maltopentosa (L_5) y temperatura del sistema (Tr_L), como variables de diseño se tienen la concentración inicial de enzima $E_{01} = 0,0544 mL_{\alpha-amilasa} / L_{solución}$, concentración inicial de sustrato $S_0 = 161,4g/L$ y volumen del reactor $V_r = 3L$, se espera que la dinámica que domine el proceso sea L_1 y los valores en el punto de operación sean $L_1 = 0,6g/L$, $L_2 = 2,4g/L$, $L_5 = 213,6g/L$, $Tr_L = 60^\circ C$. Para la etapa de sacarificación las variables de estado son: concentración de glucosa (S_1), maltopentosa (S_5) y temperatura (Tr_S), como variables de diseño se tienen concentración inicial de enzima $E_{02} = 0,2581 mL_{AMG} / L_{solución}$, concentración inicial de sustrato S_0 manteniéndose desde el proceso anterior y volumen del reactor V_r , se espera que la dinámica que domine el proceso sea S_1 y los valores en el punto de operación sean $S_1 = 163,0g/L$, $S_2 = 2,9g/L$, $S_5 = 95,0g/L$, $Tr_S = 60^\circ C$.

El volumen inicial es de 3L ($V_{deC_{BE}}$), se escalará el proceso hasta un volumen de 4L ($V_{deC_{AE}}$), donde se espera que la eficiencia mínima sean valores para las variables de estado 20% superiores e inferiores a los valores en la BE.

7.7.2. Planteamiento del MSBF para el proceso de hidrólisis enzimática

Esta sección contiene el planteamiento del MSBF de un proceso de hidrólisis enzimática de almidón de trigo, la sección 4.2 habla de los posibles mecanismos y rutas en los que puede darse la hidrólisis, con base en esto, se propone realizar los balances de materia para los componentes de glucosa, maltosa, maltotriosa y maltopentosa, así como realizar un balance de energía sobre el sistema, tanto para la etapa de licuefacción como en sacarificación.

7.7.2.1. Etapa de Licuefacción

Esta sección presenta el modelo cinético que describe la hidrólisis de almidón como sustrato convirtiéndolo en maltopentosa, maltosa y glucosa, es decir, se da la hidrólisis del almidón en oligosacáridos con grado de polimerización (GP) desde uno hasta cinco. El modelo es

tomado de Paolucci-jeanjean et al. (2000), luego Morales et al. (2008) realizó modificaciones a este, finalmente se toma y modifica este último para aplicación a este proceso.

Suposiciones del modelo:

- El modelo base tiene en cuenta la formación de oligosacáridos con GP desde uno hasta siete, pero dado el método de cuantificación mediante *HPLC* donde la curva de calibración incluye oligosacáridos con GP de 3 a 7, se asume que los oligosacáridos con $GP \geq 3$ se agrupan todos con $GP=5$ (oligosacárido en mayor cantidad), es decir, compuestos como maltotriosa, maltotetrosa, maltohexosa y maltoheptosa se agrupan como maltopentosa.
- Se propone el planteamiento de velocidades de reacción para maltotriosa, pero dada la incapacidad que presenta este disacárido para ser cuantificado individualmente por *HPLC* donde la curva de calibración incluye oligosacáridos con GP de 3 a 7, se asume que hace parte de la clasificación como oligosacáridos ($n = 5$), esto quiere decir que valores entre el 93 % y el 97 % se asocian a maltopentosa y valores entre el 7 % y 3 % se asocian a maltotriosa (fundamentado en experimentaciones previas).
- El modelo propuesto sigue una cinética de primer orden de modo que $V = KC$ (Paolucci-jeanjean et al., 2000; Morales et al., 2008).
- Los diferentes sustratos L_5 , L_3 , L_2 y L_1 compiten por el sitio activo de la enzima α -amilasa (Paolucci-jeanjean et al., 2000; Morales et al., 2008).
- Compuestos con $Gp > 5$ pueden llegar a hidrolizarse en compuestos como maltopentosa en mayor proporción y en compuesto como glucosa y maltosa en menor proporción (Paolucci-jeanjean et al., 2000; Morales et al., 2008).

Balances de materia y energía.

A partir de las definiciones anteriores se presentan las ecuaciones diferenciales que describen la concentración de cada oligosacárido en el tiempo:

Para maltopentosa, ecuación 7-15:

$$\frac{dL_5}{dt} = V_5 \quad (7-15)$$

Para maltotriosa, ecuación 7-16:

$$\frac{dL_3}{dt} = V_3 \quad (7-16)$$

Para maltosa, ecuación 7-17:

$$\frac{dL_2}{dt} = V_2 \quad (7-17)$$

Para glucosa, ecuación 7-18:

$$\frac{dL_1}{dt} = V_1 \quad (7-18)$$

Para el balance de energía se utiliza el propuesto por (Fogler, 2008) y adaptado por (Monsalve-Bravo et al., 2014) para este tipo de procesos:

$$\frac{dT_r}{dt} = -\frac{U_r A_i (T_r - T_j)}{(\rho_r V_r C p_r)} + \frac{\sum_{i=1}^n (-\Delta H_r \cdot r_i)}{(\rho_r C p_r)} \quad (7-19)$$

Donde el subíndice r y j indican al interior del reactor y en el exterior o chaqueta respectivamente, U_r corresponde al coeficiente global de transferencia de calor, A_i al área de sección transversal para la transferencia de calor, V_r al volumen efectivo del reactor, ρ_r , $C p_r$ y ΔH_r , se asume son valores asociados al oligosacárido más pequeño GP=1, los valores usados se reportan en la Tabla 7-6.

Tabla 7-6. Variables del balance de energía.

Variable	Valor	Referencia
U_r (W/m ² K)	900:2500	https://www.engineeringtoolbox.com/overall-heat-transfer-coefficient-d_434.html
A_i (m ²)	0,022	Este trabajo
ρ_r (mol/m ³)	$8,5484 \times 10^3$	http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/Tablasdepropiedadestermodinamicas_12182.pdf
V_r (L)	3,0	Este trabajo
C_{pr} (J/mol K)	218,6	http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/Tablasdepropiedadestermodinamicas_12182.pdf
ΔH_r (Kj/mol)	-1271	http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/Tablasdepropiedadestermodinamicas_12182.pdf

Ecuaciones constitutivas:

La ecuación 6-9 describe la velocidad de reacción de cada compuesto de manera genérica:

$$V_n = K_n \sum_{i=m}^{\infty} L_i - b_n \quad (7-20)$$

Donde: V_n es la velocidad de formación del oligosacárido con GP igual a n , L_i es la concentración de producto con GP igual a i , K_n corresponde a la constante cinética de reacción y b_n es un valor constante, m corresponde al oligosacárido con GP más pequeño que conduce al producto n durante la hidrólisis, por lo tanto $m > n$. $\sum_{i=m}^{\infty} L_i$ corresponde con la suma

de todos los oligosacáridos con GP más pequeño que conduce a la formación del producto n . Como ejemplo (Paolucci-jeanjean et al., 2000) menciona como el oligosacárido con $n=1$, $n=2$, $n=5$ se forma a partir de los oligosacáridos con $m = 6$, los oligosacáridos con $n = 3$ y $n = 4$, se forma a partir de los oligosacáridos con $m = 7$. b_n , ecuación 7-21, corresponde al término que representa la concentración total límite de oligosacáridos que no son hidrolizados con GP mayor o igual a m .

$$b_n = \sum_{i=m}^{\infty} L_{i,lim} \quad (7-21)$$

Este término según las investigaciones realizadas (Paolucci-jeanjean et al., 2000) es independiente de la concentración de enzima (E_1) y proporcional a la concentración inicial de almidón, ecuación 7-22:

$$\sum_{i=m}^{\infty} L_{i,lim} = hS_0 \quad (7-22)$$

Donde: h es una constante adimensional y S_0 es la concentración inicial de almidón. El valor para la constante h sirve para delimitar la concentración de sustrato del oligosacárido disponible para producción de cada maltodextrina (Morales et al., 2008).

El valor de K_n , ecuación 7-23, se relaciona con la concentración de enzima y la concentración inicial de sustrato, donde incrementos en esta última generan una disminución en su valor y aumenta la probabilidad de darse inhibiciones por producto.

$$K_n = \frac{p_n}{S_0 - q_n} E_1 \quad (7-23)$$

Esta expresión indica la dependencia de K_n sobre la concentración enzimática actual (E_1) y la concentración inicial de sustrato (S_0) dentro de una ecuación empírica incluyendo dos constantes que pueden ser identificadas experimentalmente (p_n , q_n), ambas constantes empíricas están asociadas con cada oligosacárido GP= n (Morales et al., 2008).

Finalmente, la ecuación 7-24 representa la forma genérica para la velocidad de reacción:

$$V_n = \frac{p_n}{S_0 - q_n} \left(\sum_{i=m}^{\infty} L_i - hS_0 \right) E_1 \quad (7-24)$$

Complementando el modelo trabajado se propone la siguiente expresión:

$$V_n = \frac{p_n}{S_0 - q_n} \left(S_0 - \sum_{i=m}^{\infty} L_i - hS_0 \right) E_1 \quad (7-25)$$

Esta expresión tiene en cuenta la diferencia entre el sustrato inicial y la sumatoria de todos los oligosacáridos con GP más pequeño que conduce al producto n durante la hidrólisis, por lo tanto $m \geq n$, obteniendo así una cantidad de sustrato disponible para reaccionar, al cual se le resta el término b_n , correspondiente al término que representa la concentración total límite de oligosacáridos que no son hidrolizados con GP mayor o igual a m . Con esto las velocidades de reacción son:

Velocidad de reacción para maltopentosa, ecuación 7-26:

$$V_5 = \frac{p_5}{S_0 - q_5} \left(S_0 - \sum_{i=m}^{\infty} L_i - h_5 S_0 \right) E_1 \quad (7-26)$$

Velocidad de reacción para maltotriosa, ecuación 7-27:

$$V_3 = \frac{p_3}{S_0 - q_3} \left(S_0 - \sum_{i=m}^{\infty} L_i - h_3 S_0 \right) E_1 \quad (7-27)$$

Velocidad de reacción para maltosa, ecuación 7-28:

$$V_2 = \frac{p_2}{S_0 - q_2} \left(S_0 - \sum_{i=m}^{\infty} L_i - h_2 S_0 \right) E_1 \quad (7-28)$$

Velocidad de reacción para glucosa, ecuación 7-29:

$$V_1 = \frac{p_1}{S_0 - q_1} \left(S_0 - \sum_{i=m}^{\infty} L_i - h_1 S_0 \right) E_1 \quad (7-29)$$

Para inactivación enzimática se presenta la ecuación 7-30, la cual tiene en cuenta la pérdida de funcionalidad de la enzima a medida que avanza en el tiempo dada una constante de desactivación K_{d1} .

$$E_1 = E_{0,1} e^{-k_{d1} \cdot t} \quad (7-30)$$

Para modelar los efectos de pH y temperatura se usan las ecuaciones 7-31 y 7-32 propuestas por (Rosso et al., 1995), las cuales aplican para modelos de crecimiento celular, pero se extiende a procesos enzimáticos.

$$\tau(T) = \frac{(Tr - T_{Max}) \cdot (Tr - T_{Min})^2}{(T_{Opt} - T_{Min}) \cdot [(T_{Opt} - T_{Min}) \cdot (Tr - T_{Opt}) - (T_{Opt} - T_{Max}) \cdot (T_{Opt} + T_{Min} - 2Tr)]} \quad (7-31)$$

$$\rho(pH) = \frac{(pH - pH_{Min}) \cdot (pH - pH_{Max})^2}{((pH - pH_{Min}) \cdot (pH - pH_{Max}) - (pH - pH_{Opt})^2)} \quad (7-32)$$

Las cuales deben cumplir las siguientes condiciones:

$$V_{rxn} = \begin{cases} pH < pH_{Min}, & 0, 0 \\ pH_{Min} < pH < pH_{Max}, & V_{rxn,max}\tau(T) \\ pH > pH_{Max}, & 0, 0 \end{cases}$$

$$V_{rxn} = \begin{cases} T < T_{Min}, & 0, 0 \\ T_{Min} < T < T_{Max}, & V_{rxn,max}\rho(pH) \\ T > T_{Max}, & 0, 0 \end{cases}$$

Para lo cual la expresión se modifica y es representada por la ecuación 7-33:

$$V_{rxn} = V_{rxn,max}\tau(T)\rho(pH) \quad (7-33)$$

En la Tabla 7-7 se presentan los valores mínimos, máximos y óptimos de temperatura y pH a ser usados en las ecuaciones 7-31 y 7-32 para el modelado del proceso (Scheer et al., 2011):

Tabla 7-7. Parámetros para el proceso de licuefacción.

Parámetro	Valor	Parámetro	Valor
Tmin	25°C	pHmin	5.0
Tmax	90°C	pHmax	9.0
Topt	88°C	pHopt	5.2

7.7.2.2. Etapa de Sacarificación

Esta sección presenta el modelo cinético que describe la hidrólisis de maltopentosa y maltosa para la formación de glucosa, es decir, una vez se da la etapa de licuefacción, el siguiente paso es la hidrólisis completa de todos los oligosacáridos con grado de polimerización mayor a uno ($GP > 1$) hasta glucosa. El modelo es tomado de Zanin et al. (1996), luego Morales et al. (2008) realizó modificaciones a este, finalmente se toma y modifica este último para aplicación a este proceso.

Suposiciones del modelo:

- El modelo base tiene en cuenta la formación de oligosacáridos con GP desde uno hasta siete, pero dado el método de cuantificación mediante *HPLC* donde la curva de calibración incluye oligosacáridos con GP de 3 a 7, se asume que los oligosacáridos con $GP \geq 3$ se agrupan todos con $GP=5$ (oligosacárido en mayor cantidad), es decir, compuestos como maltotriosa, maltotetrosa, maltohexosa y maltoheptosa se agrupan como maltopentosa.
- Se propone el planteamiento de velocidades de reacción para maltotriosa pero dada la incapacidad que presenta este disacárido para ser cuantificado individualmente por *HPLC* donde la curva de calibración incluye oligosacáridos con GP de 3 a 7, se asume que hace parte de la clasificación como oligosacáridos ($n = 5$), esto quiere decir que valores entre el 93 % y el 97 % se asocian a maltopentosa y valores entre el 3 % y 7 % se asocian a maltotriosa (fundamentado en experimentaciones previas).
- Se asume que los oligosacáridos están formados por dos fracciones, una más susceptible a la hidrólisis conformada por moléculas unidas mediante enlaces (α -1,4) y otra con cierta resistencia a la hidrólisis conformada por moléculas unidas con enlaces (α -1,6), las cuales se hidrolizan más lento que las primeras.
- Se asume que el modelo presenta una cinética de tipo Michaelis-Menten.
- No se tendrá en cuenta la formación de isomaltosa, debido al tiempo de reacción no es suficiente para su formación.
- Se tiene en cuenta la inhibición por producto (K_I) por parte de la glucosa sobre las múltiples reacciones.
- Se tiene en cuenta la inhibición por sustrato (K_s) para los oligosacáridos con grado de polimerización $n > 3$, esto quiere decir que afecta a oligosacáridos como maltopentosa mas no a maltosas.
- Los diferentes componentes S_5, S_3, S_2, S_1 compiten por el sitio activo de la enzima AMG.
- La sacarificación procede mediante múltiples reacciones que ocurren simultáneamente: se asume el tercer mecanismo de reacción propuesto en la sección 4.2, en la cual la maltopentosa forma una molécula de maltosa y tres de glucosa, la maltotriosa se degrada en maltosa y glucosa y la maltosa en dos moléculas de glucosa.

Balances de materia y energía.

A partir de las definiciones anteriores se presentan las ecuaciones diferenciales que describen la concentración de cada oligosacárido en el tiempo:

Para maltopentosa, ecuación 7-34:

$$\frac{dS_5}{dt} = -r_5 \quad (7-34)$$

Para maltotriosa, ecuación 7-35:

$$\frac{dS_3}{dt} = -r_3 \quad (7-35)$$

Para maltosa, ecuación 7-36:

$$\frac{dS_2}{dt} = r_5 + r_3 - r_2 \quad (7-36)$$

Para glucosa, ecuación 7-37:

$$\frac{dS_1}{dt} = 3r_5 + r_3 + 2r_2 \quad (7-37)$$

Para el balance de energía se utiliza el propuesto por Fogler (2008) y adaptado por Monsalve Bravo (2014) para este tipo de procesos:

$$\frac{dT_r}{dt} = \frac{-U_r A_i (T_r - T_j)}{\rho_r V_r C p_r} + \frac{\sum_{i=1}^n -\Delta H_r r_i}{\rho_r C p_r} \quad (7-38)$$

Donde el subíndice r y j indican que el proceso se da al interior del reactor y en el exterior o chaqueta respectivamente, U_r corresponde al coeficiente global de transferencia de calor, A_i al área de sección transversal para la transferencia de calor, V_r al volumen efectivo del reactor, ρ_r , $C p_r$ y ΔH_r , se asumen valores asociados al oligosacárido más pequeño $G_p=1$, los valores usados se reportan en la Tabla 7-6.

Ecuaciones constitutivas.

La ecuación 7-39 representa de forma genérica la velocidad de reacción:

$$r_n = \frac{V_{m,n} \left[S_n - \left(\frac{S_{n-1}^2}{K_{eq,n}} \right) \right] E_2}{K_{m,n} \left[1 + \frac{S_1}{K_I} + \frac{1}{K_s} + \sum_{j=2}^6 \frac{G_j}{K_{m,j}} \right]} \quad (7-39)$$

El subíndice n indica el oligosacárido con GP: 1 glucosa, 2 maltosa, 3 maltotriosa, 5 maltopentosa. S_n es la concentración del respectivo oligosacárido, $K_{m,n}$ es la constante de Michaelis-Menten, K_s y K_I son las constantes de inhibición para el sustrato y producto respectivamente, $V_{mx,n}$ es la máxima velocidad de producción de producto, E_2 es la concentración de enzima, $K_{eq,n}$ es la constante de equilibrio. El término $S_{n-1}^2/K_{eq,n}$ es válido solo para maltosa y maltotriosa donde el numerador es equivalente a $S_1 \cdot S_2$, debido a la reversibilidad de las reacciones y el término $1/K_s$ es válido solo para maltopentosa. Con esto, las velocidades de reacción son:

Velocidad de reacción para maltopentosa, ecuación 7-40:

$$r_5 = \frac{V_{mx,5} S_5 E_2}{K_{m,5} \left[1 + \frac{S_1}{K_I} + \frac{1}{K_s} + \sum_{j=2}^6 \frac{G_j}{K_{m,j}} \right]} \quad (7-40)$$

Velocidad de reacción para maltotriosa, ecuación 7-41:

$$r_3 = \frac{V_{mx,3} \left[S_3 - \left(\frac{S_3^2}{K_{eq,3}} \right) \right] E_2}{K_{m,3} \left[1 + \frac{S_1}{K_I} + \frac{1}{K_s} + \sum_{j=2}^6 \frac{G_j}{K_{m,j}} \right]} \quad (7-41)$$

Velocidad de reacción para maltosa, ecuación 7-42:

$$r_2 = \frac{V_{mx,2} \left[S_2 - \left(\frac{S_1^2}{K_{eq,2}} \right) \right] E_2}{K_{m,2} \left[1 + \frac{S_1}{K_I} + \frac{1}{K_s} + \sum_{j=2}^6 \frac{G_j}{K_{m,j}} \right]} \quad (7-42)$$

Se presenta la ecuación 7-43 para la variación de la velocidad máxima en función de la temperatura y la energía de activación.

$$V_{mx,n} = V_{0mx,n} e^{\frac{-E_{a,l}}{RT r_s}} \quad (7-43)$$

Para inactivación enzimática se presenta la ecuación 7-44 que permite tener en cuenta como la enzima pierde funcionalidad a medida que avanza en el tiempo dada una constante de desactivación K_{d2} .

$$E_2 = E_{0,2} e^{-k_{d2} \cdot t} \quad (7-44)$$

Para modelar los efectos de pH y Temperatura se usan las ecuaciones propuestas por (Rosso et al., 1995), las cuales aplican para modelos de crecimiento celular, pero se extiende a procesos enzimáticos. En este caso se usan las mismas ecuaciones presentadas en la etapa de

licuefacción 7-31 y 7-32.

Para lo cual la expresión se modifica y es representada por la ecuación 7-45:

$$r_{rxn} = V_{rxn,max} \tau(T) \rho(pH) \quad (7-45)$$

En la Tabla 7-8 se presentan los valores mínimos, máximos y óptimos de temperatura y pH a ser usados en las ecuaciones 7-31 y 7-32 para el modelado del proceso (Scheer et al., 2011):

Tabla 7-8. Parámetros para el proceso de sacarificación.

Parámetro	valor	Parámetro	Valor
Tmin	50°C	pHmin	3.5
Tmax	65°C	pHmax	5.0
Topt	63°C	pHopt	4.4

7.7.3. Ajuste de parámetros a los datos experimentales

Para esta sección se realiza la simulación del modelo y ajuste de algunos parámetros a los datos experimentales obtenidos para la hidrólisis enzimática en un volumen de 3L, usando la función *fmincon*, que permite encontrar óptimos locales para una determinada función objetivo. Los parámetros se ajustan teniendo en cuenta las variables de estado glucosa, maltosa, maltopentosa y temperatura del reactor ya que son las variables medibles en el proceso. Los valores semilla usados para la estimación de parámetros se tomaron de las referencias usadas para proponer los modelos de ambos procesos, se propone el ajuste de estos, dado que la mayoría realizó su trabajo sobre almidón de yuca, por lo cual, al cambiar la materia prima a almidón de trigo se consideró necesario un nuevo ajuste de estos.

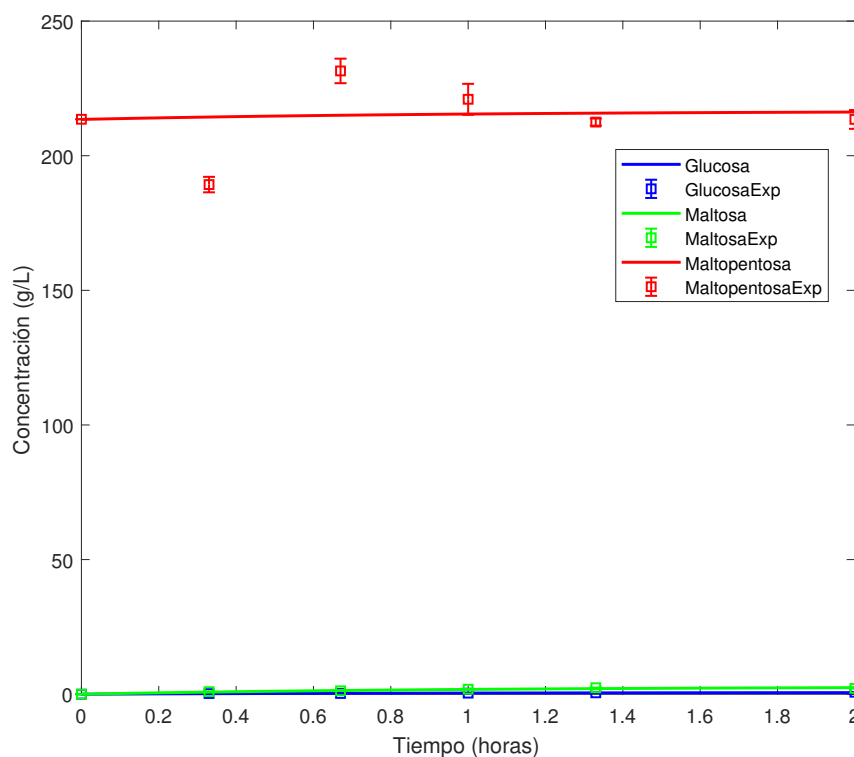
7.7.3.1. Licuefacción

En esta etapa se realizó el ajuste de los parámetros p_n , q_n y h_n , para glucosa, maltosa, maltotriosa y maltopentosa, estos valores varían en diferentes autores, ya que son dependientes del tipo de materia prima a trabajar. Con almidón de trigo se obtienen 12 parámetros a estimar, se usó la función de optimización *fmincon* de MATLAB[®], la cual tenía como objetivo minimizar la suma del cuadrado de los residuales (*SCE*), en la Tabla 7-9 se presentan los valores para los parámetros ajustados para un *SCE* de 968,6879.

Tabla 7-9. Parámetros estimados para la etapa de licuefacción.

Parámetro	Valor	Unidades	Parámetro	Valor	Unidades
h_1	0,9014	adi	p_3	0,4999	$g/mL \cdot h$
h_2	0,8939	adi	p_5	0,3690	$g/mL \cdot h$
h_3	1,5224	adi	q_1	0,0893	$L/mL \cdot h$
h_5	1,5185	adi	q_2	0,3435	$L/mL \cdot h$
p_1	1,3229	$g/mL \cdot h$	q_3	0,3133	$L/mL \cdot h$
p_2	0,3847	$g/mL \cdot h$	q_5	0,0117	$L/mL \cdot h$

Para el proceso se seleccionó una temperatura de 60°C y pH de 5,8, la concentración inicial de sustrato equivale a $161,4\text{g/L}$ para un almidón de trigo con un contenido del 80,70 %, las concentraciones iniciales de glucosa, maltosa, maltopentosa son cero, se utilizó una relación E/S de 0,036 %p/p, equivalente a una cantidad de enzima de $163,3\mu\text{L}$ de α -amilasa.

**Figura 7-10.** Simulación de la etapa de licuefacción en la BE.

Una vez se realizó el ajuste de parámetros los errores promedios para glucosa, maltosa, maltopentosa y temperatura del reactor fueron 15,1184 %, 11,1783 %, 5,1369 %, 0,4455 %, respectivamente y se obtiene la simulación presentada en la Figura 7-10, donde se observan en las tendencias de las dinámicas de interés una buena representación del proceso.

Para analizar en detalle cada una de las variables de interés, se presenta la Figura 7-11, donde se observan de manera individual las concentraciones de glucosa, maltosa, maltopentosa y la temperatura del reactor, donde el modelo busca ajustarse a los datos experimentales, da inferencia como experimentalmente la dinámica es lenta y le cuesta al proceso llegar a su valor objetivo de 60°C.

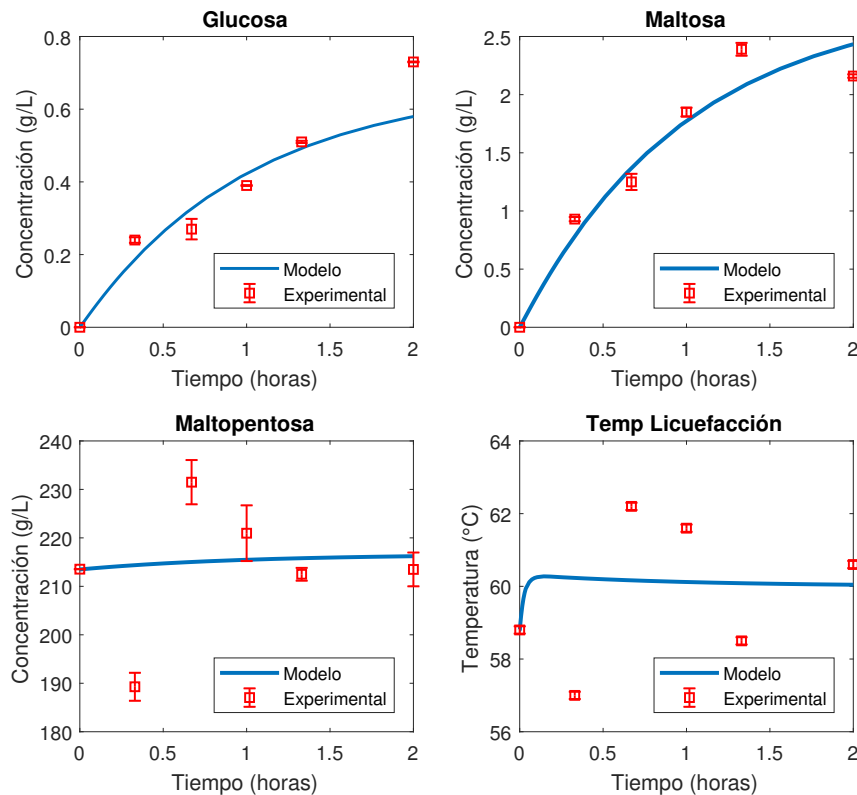


Figura 7-11. Simulación de la etapa de licuefacción en la BE con balance de energía.

La dificultad en este modelo es la dependencia entre sí de las variables de estado, la formación de los compuestos no es independiente, para observar esto se presenta la Figura 7-12, las tres variables de estado se relacionan a condiciones de proceso en la BE, ninguna de ellas es independiente de la otra. Dada la tendencia de las curvas se puede asociar con un pseudoequilibrio, lo que implica que tanto la glucosa en relación con la maltosa y maltopentosa o que la maltosa en relación con la maltopentosa, se encuentran relacionadas y que el efecto o variación de alguna de ellas dará como resultado cambios en las otras. Este concepto es definido por Palsson (2015) para sistemas biológicos. Menciona un pseudoequilibrio en donde dos sistemas moviéndose en la misma escala de tiempo con pendiente positiva se interpreta como una dependencia entre variables. Es importante mencionar que este análisis solo permite ver la interacción entre las diferentes variables de estado pero no el comportamiento de ellas en el proceso, por ejemplo, las variables de estado anteriormente descritas, presentan

una interacción lineal pero esto no quiere decir que sus comportamientos sean lineales en el tiempo.

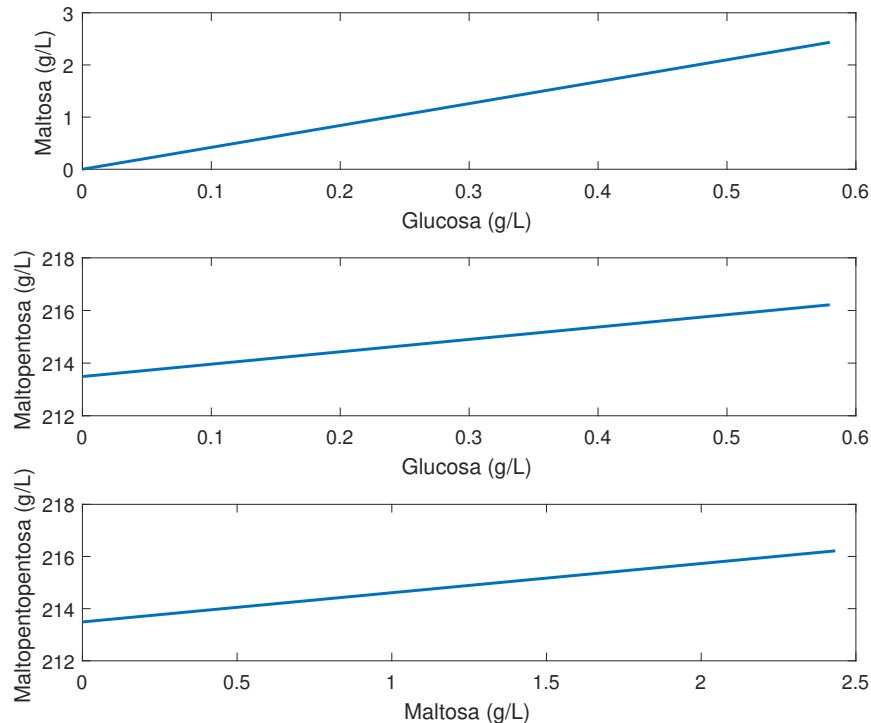


Figura 7-12. Relación de variables de estado en la etapa de licuefacción.

Vale la pena analizar este comportamiento respecto a otra variable de interés en el proceso, la temperatura. En la Figura 7-13 se observa como las variables de estado se encuentran en pseudoequilibrio con la temperatura del sistema, aumentos en la temperatura generan aumentos en la concentración de glucosa, maltosa y maltopentosa, pero esto solo ocurre hasta un valor de 60,55°C, valor a partir del cual se convierten en relaciones de conservación, esto quiere decir que a medida que aumenta una de las variables la otra disminuye. Este concepto es definido por Palsson (2015) en sistemas biológicos. Menciona una conservación en donde dos sistemas moviéndose en la misma escala de tiempo con pendiente negativa se interpreta como una relación inversa. Como un sustrato y un producto, mientras que uno aumenta el otro disminuye. Si bien no podemos hablar de la temperatura como un sustrato o producto, la relación nos permite ver la existencia de un efecto de la temperatura que puede ser positivo o negativo.

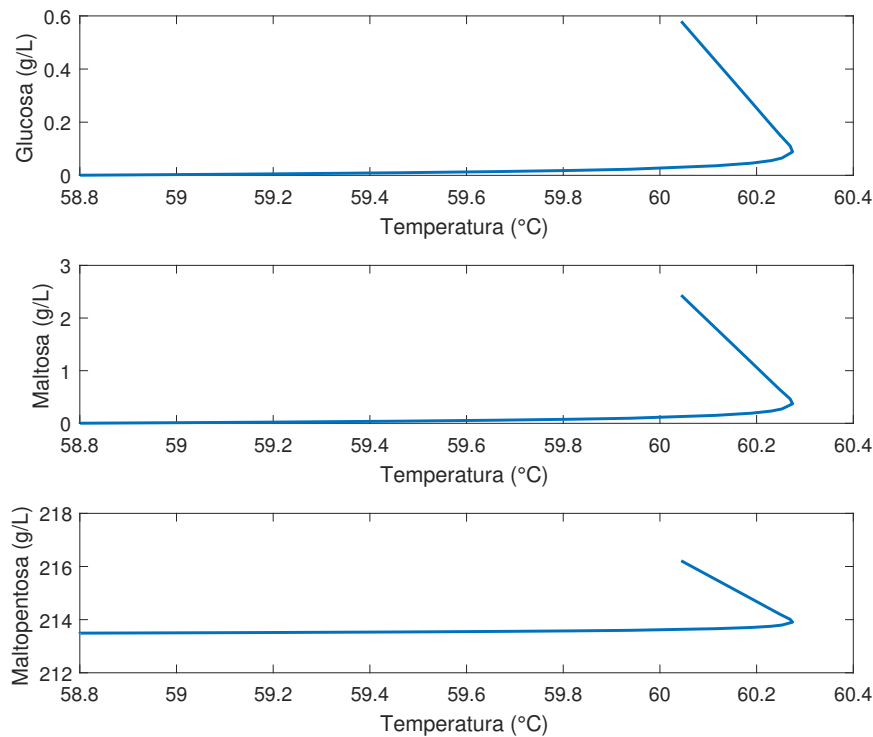


Figura 7-13. Relación de variables de estado con la temperatura en la etapa de licuefacción.

Analizando el sistema desde la teoría de control, este presenta un punto en el cual estabiliza, por mucho que aumente el tiempo de proceso siempre se llegará a este equilibrio. Esto concuerda con la naturaleza del experimento y del modelo, donde se tendrán valores estables a partir de determinados tiempos del *batch*. Como se observa en las Figuras 7-14 y 7-15, se tienen interacciones para tres variables de estado y el punto de equilibrio a partir del cual no se presentan cambios en las variables de estado, esto equivale para el sistema completo a tener el punto de equilibrio $[0,67; 2,82; 216,60; 60,00]$ asociado a las variables de estado glucosa, maltosa, maltopentosa y temperatura del reactor, respectivamente. Cabe resaltar que este vector de sistema estable corresponde a unas condiciones iniciales de proceso, pero si se usan otras este cambiará, lo que quiere decir que es sistema es estabilizante más no atractivo.

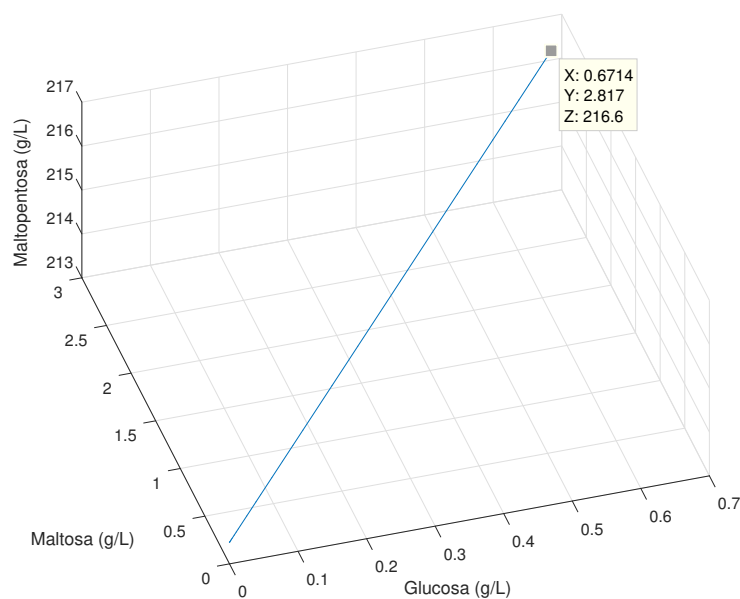


Figura 7-14. Interacciones de variables de estado, glucosa, maltosa y maltopentosa en la etapa de licuefacción.

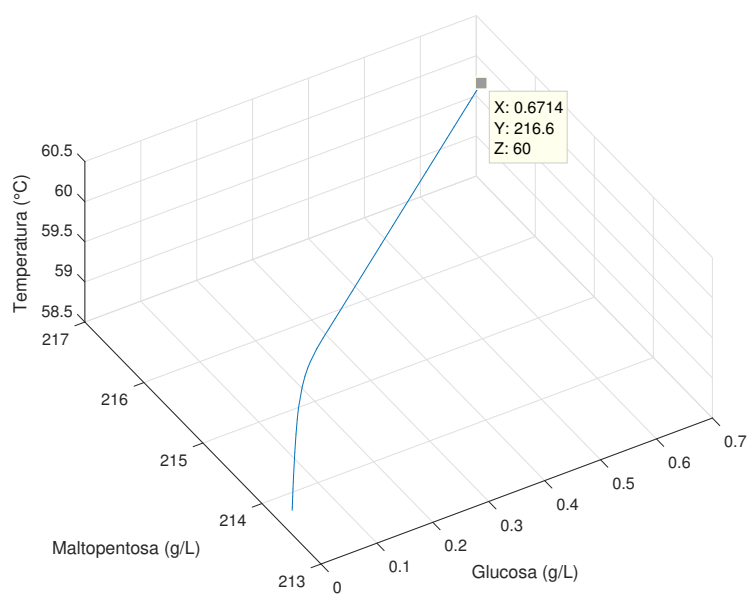


Figura 7-15. Interacciones de variables de estado, glucosa, maltopentosa y temperatura del reactor en la etapa de licuefacción.

7.7.3.2. Sacarificación

Para la etapa de sacarificación se realiza el ajuste de los parámetros $K_{eq,n}$, K_d , $K_{m,n}$, $V_{0,max,n}$, K_s y K_I , para glucosa, maltosa, maltotriosa y maltopentosa, estos valores varían entre autores (Zanin et al., 1996), ya que son dependientes del tipo de materia prima a trabajar, se obtienen 14 parámetros a estimar, se usó la función de optimización *fmincon* de MATLAB[®], la cual tenía como objetivo minimizar la SCE, en la Tabla 7-10 se presentan los valores para los parámetros ajustados para un SCE de $3,7808 \times 10^3$.

Tabla 7-10. Parámetros estimados etapa de sacarificación.

Parámetro	Valor	Unidades	Parámetro	Valor	Unidades
K_s	$1,7959^{-4}$	mol/h·mL _{enz}	K_{m2}	$7,6480^{-5}$	mol/L
K_d	$1,6563^{-4}$	mol/h·mL _{enz}	K_{m3}	$1,2224^{-4}$	mol/L
K_I	0,0099	mol/h·mL _{enz}	K_{m5}	0,0011	mol/L
V_{0mx2}	$3,0000^{33}$	mol/h·mL _{enz}	K_{eq1}	23,9000	mol/L
V_{0mx3}	$9,0010^{33}$	mol/h·mL _{enz}	K_{eq2}	99,9818	mol/L
V_{0mx5}	$9,0900^{34}$	mol/h·mL _{enz}	K_{eq3}	0,0664	mol/L
K_{m1}	0,0251	mol/L	K_{eq5}	65,1547	mol/L

Para el proceso se seleccionó una temperatura de 60°C y pH de 4,3, la concentración inicial para glucosa, maltosa y maltopentosa, se toman las condiciones de salida de la etapa de licuefacción, 0,7347g/L, 2,1650g/L y 213,493g/L, respectivamente. Se utilizó una relación E/S de 0,18 %p/p, equivalente a una cantidad de enzima de 774,4μL de AMG.

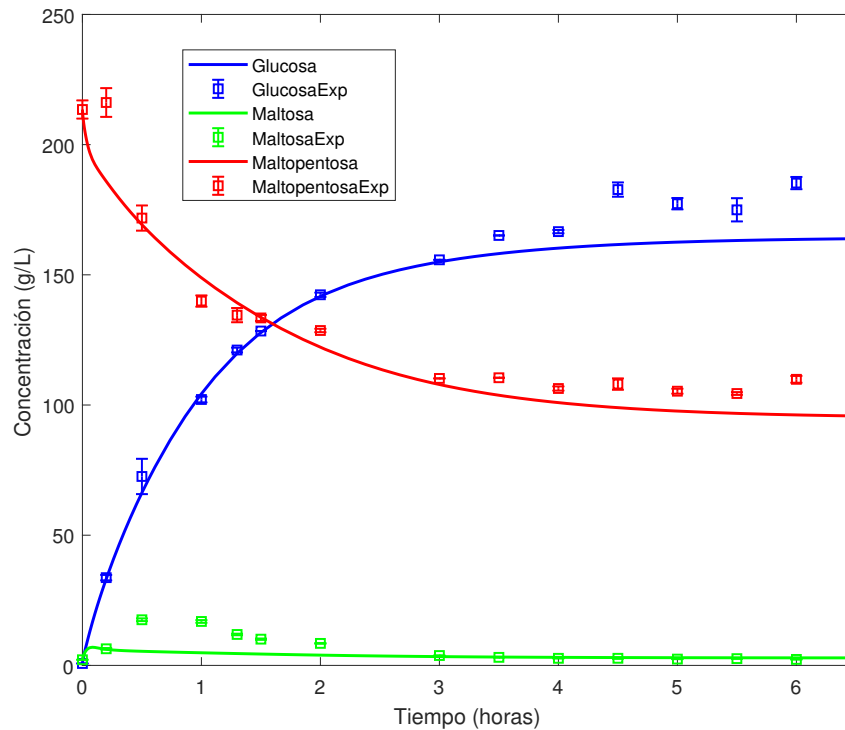


Figura 7-16. Simulación de la etapa de sacarificación en la BE.

Una vez se realizó el ajuste de parámetros los errores promedios para glucosa, maltosa, maltopentosa y temperatura del reactor fueron 4,7290 %, 29,6351 %, 5,9492 %, 0,1883 %, respectivamente y se obtiene la simulación presentada en la Figura 7-16.

La Figura 7-17, permite realizar un análisis más detallado de cada una de las variables de interés, desde las concentraciones de glucosa, maltosa, maltopentosa, hasta la temperatura del reactor, que busca ajustarse a los datos experimentales, lo que da inferencia como experimentalmente la dinámica es lenta y le cuesta al proceso llegar a su valor objetivo de 60°C. Al analizar en detalle la concentración de glucosa se observa una diferencia en el ajuste hacia el final de la etapa. Para la concentración de maltosa el modelo no logra alcanzar las concentraciones máximas de maltosa cercanas a las 0,5h, estos comportamientos están asociados con la interacción de las variables de estado y a la forma como se realiza el ajuste de los parámetros donde la función *fmincon* busca minimizar la *SCE* analizando la sumatoria de los residuales independiente de lo que sucede con un punto específico.

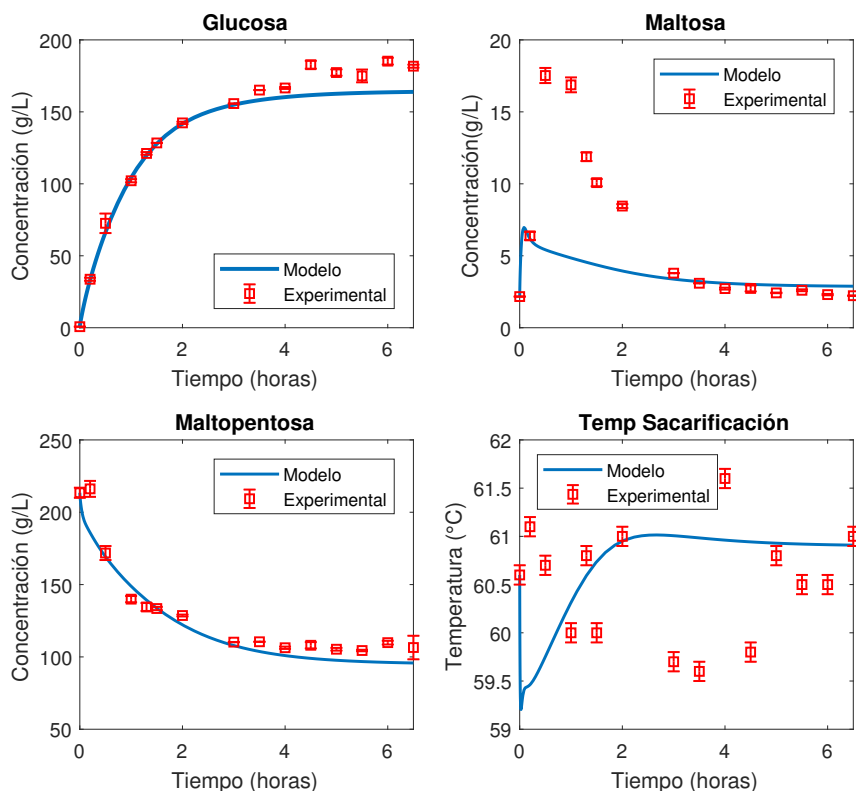


Figura 7-17. Simulación de la etapa de sacarificación en la BE con balance de energía.

Al igual que el proceso anterior, la dependencia de unas variables de estado de otras a condiciones de proceso para esta etapa generan una dificultad en el modelado del proceso. No se da la formación de cualquiera de los compuestos de manera independiente, cada uno depende de la interacción y cantidad de los demás participantes en la reacción. Para observar esto se presenta la Figura 7-18, en este caso en el cual la concentración de maltosa aumenta y disminuye en el tiempo, su relación con la variable de estado glucosa presenta inicialmente un pseudoequilibrio, pero luego de una concentración de maltosa de 7,4g/L inicia una relación conservativa, a medida que aumenta la concentración glucosa disminuye la concentración de maltosa. La relación entre las variables de estado maltopentosa y glucosa, generan una relación conservativa que era de esperarse dada la naturaleza del modelo propuesto, en cual buscaba la disminución de la maltopentosa y aumento de la glucosa. Para el análisis de la relación de las variables de estado maltosa y maltopentosa, se observa que a medida que disminuye la concentración de maltopentosa aumenta la maltosa, generando una relación conservativa, a partir de concentraciones de 7,4g/L de maltosa, tanto esta como la maltopentosa disminuye generando un pseudoequilibrio.

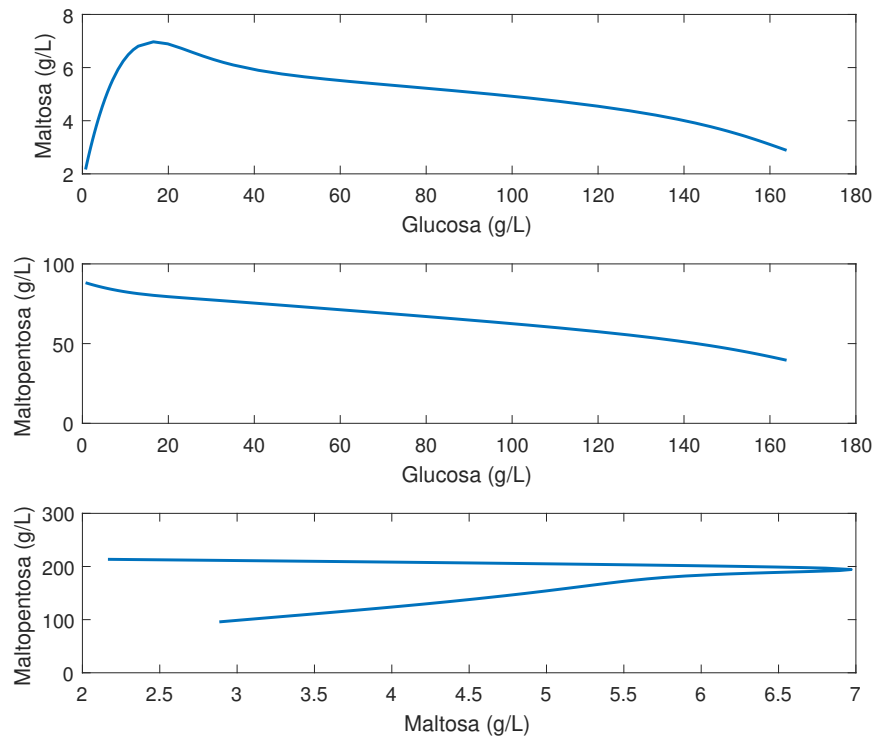


Figura 7-18. Relación de variables de estado en la etapa de sacarificación.

En la Figura 7-19 se realiza un análisis de las variables de estado respecto a la temperatura del sistema para las condiciones del proceso a esta escala. Si se analiza la variable glucosa se observa como su relación con la temperatura puede darse como estado conservativo y pseudoequilibrio. A medida que la temperatura sufre disminuciones por debajo del valor esperado $60,00^{\circ}\text{C}$, la concentración de glucosa tiende a incrementar con menor razón (conservativo), respecto a valores de la temperatura superiores a los $59,25^{\circ}\text{C}$, donde la glucosa aumenta a una razón mayor hasta llegar a un valor cercano a los $61,20^{\circ}\text{C}$ (pseudoequilibrio) en el cual se esperaría un cambio de pendiente, de este modo se debe ser cuidadoso con la selección de las condiciones de operación del proceso. La maltosa presenta una forma cerrada respecto a la temperatura, lo que se puede pensar en esta última como una especie de perturbación. Este concepto es definido por Palsson (2015) en sistemas biológicos. Menciona una perturbación como una variable sin efecto positivo o negativo ya que tiende a regresar a su estado inicial, para este caso variaciones de la temperatura no se interpretan como un efecto positivo o negativo sobre la maltosa ya que esta regresa a su estado inicial. La relación entre maltopentosa y la temperatura se puede pensar de alguna forma como el efecto inverso que sufre la glucosa, La concentración de maltopentosa disminuye hasta alcanzar una temperatura de $59,20^{\circ}\text{C}$ en un pseudoequilibrio. Luego se da una relación de conservación alcanzando valores cercanos a los $61,20^{\circ}\text{C}$ donde se da un nuevo cambio de pendiente.

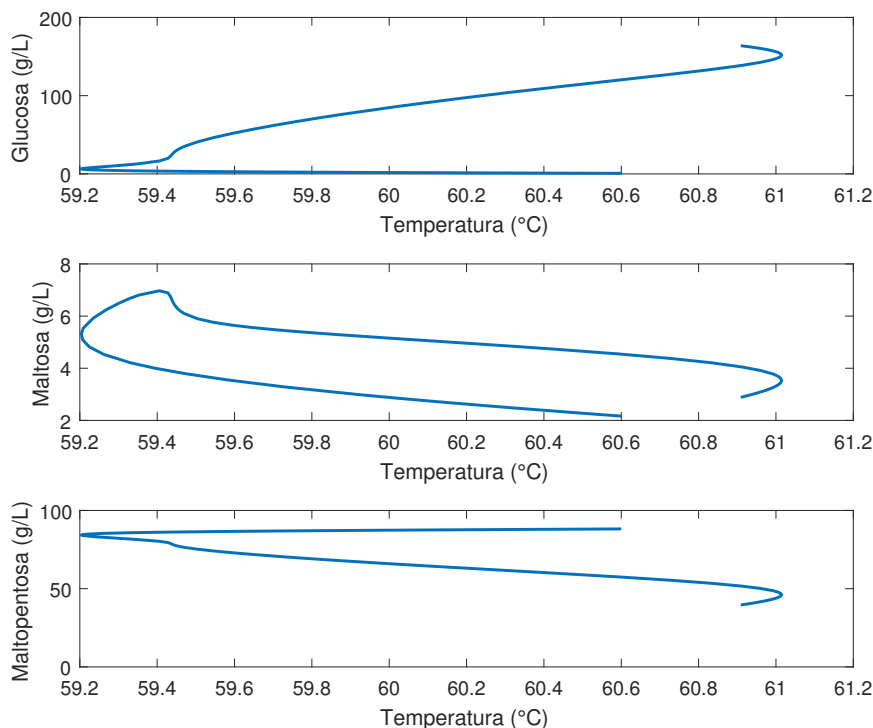


Figura 7-19. Relación de variables de estado con la temperatura en la etapa de sacarificación.

Analizando el sistema desde la teoría de control, este presenta un punto en el cual estabiliza, por mucho que aumente el tiempo de proceso siempre se llegará a este equilibrio. Esto concuerda con la naturaleza del experimento y del modelo, donde se tendrán valores estables a partir de determinados tiempos del *batch*. Como se observa en las Figuras 7-20 y 7-21, se tienen interacciones para tres variables de estado y el punto de equilibrio a partir del cual no se presentan cambios en las variables de estado, esto equivale para el sistema completo a tener el punto de equilibrio [164,50; 2,85; 94,96; 60,90] asociado a las variables de estado glucosa, maltosa, maltopentosa y temperatura del reactor, respectivamente. Cabe resaltar que este vector de sistema estable corresponde a unas condiciones iniciales de proceso, pero si se usan otras este cambiará, lo que quiere decir que el sistema es estabilizante más no atractivo.

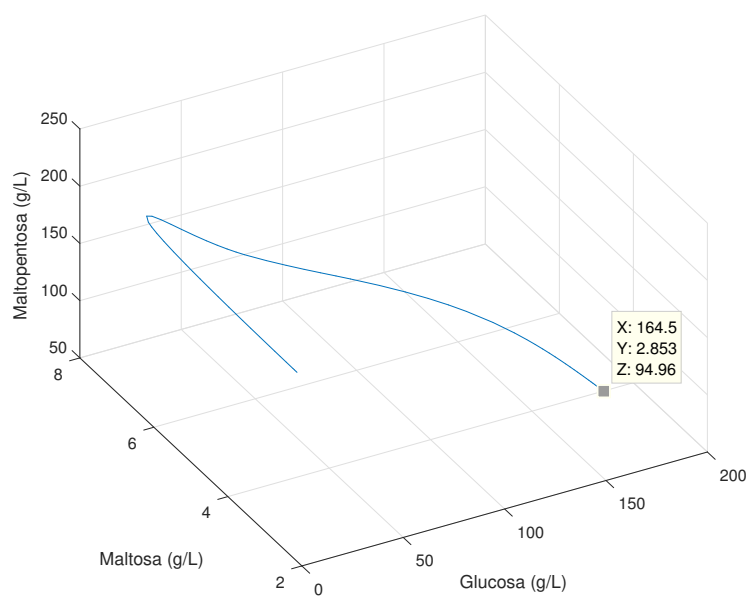


Figura 7-20. Interacciones de variables de estado, glucosa, maltosa, maltopentosa en la etapa de sacarificación.

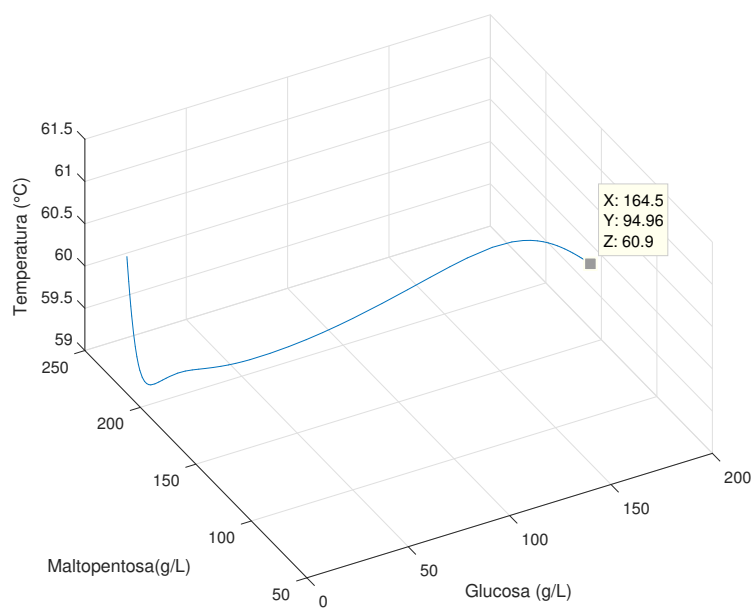


Figura 7-21. Interacciones de variables de estado, glucosa, maltopentosa y temperatura del reactor en la etapa de sacaificación.

7.7.4. Formulación de la matriz de Hankel y DVS

La manera como se presentan los MSBF para la etapa de licuefacción y sacarificación son de la forma canónica:

$$\frac{dL_n}{dt} = V_n \qquad \frac{dS_n}{dt} = r_n \qquad (7-46)$$

Como salidas del sistema se tienen las mismas variables de estado medibles, las concentraciones de glucosa, maltosa y maltopentosas, al igual que la temperatura del reactor, se cuentan con 3 salidas G_1 , G_5 y T_r , estas se seleccionan dado que se consideran las variables de mayor interés en el proceso.

7.7.4.1. Etapa de licuefacción

Las matrices A , B y C están asociadas al sistema, control y salida, respectivamente, por esto, la matriz A se deriva de la diferenciación parcial de las variables de estado respecto a ellas mismas, la matriz B se deriva de la diferenciación parcial de las ecuaciones de estado respecto a las variables de diseño seleccionadas y C se construye asumiendo que por cada variable de estado existe una salida.

$$A = \begin{bmatrix} \frac{dL_1}{dL_1} & \frac{dL_1}{dL_5} & \frac{dL_1}{dT_{rL}} \\ \frac{dL_5}{dL_1} & \frac{dL_5}{dL_5} & \frac{dL_5}{dT_{rL}} \\ \frac{dT_{rL}}{dL_1} & \frac{dT_{rL}}{dL_5} & \frac{dT_{rL}}{dT_{rL}} \end{bmatrix} \quad B = \begin{bmatrix} \frac{dL_1}{dE_{01}} & \frac{dL_1}{dV_r} & \frac{dL_1}{dS_0} \\ \frac{dL_5}{dE_{01}} & \frac{dL_5}{dV_r} & \frac{dL_5}{dS_0} \\ \frac{dT_{rL}}{dE_{01}} & \frac{dT_{rL}}{dV_r} & \frac{dT_{rL}}{dS_0} \end{bmatrix} \quad C = \begin{bmatrix} 1 & 0 & 0 \\ 0 & 1 & 0 \\ 0 & 0 & 1 \end{bmatrix}$$

Luego de esto se construyen las matrices de observabilidad y controlabilidad, dado que para la baja escala se tienen múltiples matrices de O_b y C_o , se seleccionan los correspondientes al punto de operación, el cual corresponde al tiempo en el cual se tienen el IEI_{Max} para el volumen de la baja escala:

$$O_b = 1,0 \times 10^3 \cdot \begin{bmatrix} 0,0010 & 0,0000 & 0,0000 \\ 0,0000 & 0,0010 & 0,0000 \\ 0,0000 & 0,0000 & 0,0010 \\ 0,0000 & 0,0000 & 0,0000 \\ 0,0000 & 0,0000 & 0,0000 \\ 0,0000 & 0,0000 & -0,0390 \\ 0,0000 & 0,0000 & -0,0005 \\ 0,0000 & 0,0000 & -0,0001 \\ -0,0003 & -0,0003 & 1,5220 \end{bmatrix}$$

$$C_o = 1,0 \times 10^5 \cdot \begin{bmatrix} 0,0000 & 0,0000 & 0,0000 & 0,0000 & 0,0000 & 0,0000 & -0,0004 & -0,0000 & -0,0000 \\ 0,0000 & 0,0000 & 0,0000 & 0,0000 & 0,0000 & 0,0000 & -0,0001 & -0,0000 & -0,0000 \\ 0,0007 & 0,0000 & 0,0000 & -0,0290 & -0,0005 & -0,0000 & 1,1327 & 0,0211 & 0,0000 \end{bmatrix}$$

A partir del producto de estas matrices se obtiene la matriz \mathcal{H} :

$$\mathcal{H} = 1,0 \times 10^8 \cdot \begin{bmatrix} 0,0000 & 0,0000 & 0,0000 & 0,0000 & 0,0000 & 0,0000 & -0,0000 & -0,0000 & -0,0000 \\ 0,0000 & 0,0000 & 0,0000 & 0,0000 & 0,0000 & 0,0000 & -0,0000 & -0,0000 & -0,0000 \\ 0,0000 & 0,0000 & 0,0000 & -0,0000 & -0,0000 & -0,0000 & 0,0015 & 0,0000 & 0,0000 \\ 0,0000 & 0,0000 & 0,0000 & -0,0000 & -0,0000 & -0,0000 & 0,0000 & 0,0000 & 0,0000 \\ 0,0000 & 0,0000 & 0,0000 & -0,0000 & -0,0000 & -0,0000 & 0,0000 & 0,0000 & 0,0000 \\ -0,0000 & -0,0000 & -0,0000 & 0,0015 & 0,0000 & 0,0000 & -0,0587 & -0,0011 & -0,0000 \\ -0,0000 & -0,0000 & -0,0000 & 0,0000 & 0,0000 & 0,0000 & -0,0009 & -0,0000 & -0,0000 \\ -0,0000 & -0,0000 & -0,0000 & 0,0000 & 0,0000 & 0,0000 & -0,0001 & -0,0000 & -0,0000 \\ 0,0015 & 0,0000 & 0,0000 & -0,0587 & -0,0011 & -0,0000 & 2,2872 & 0,0425 & 0,0000 \end{bmatrix}$$

Finalmente, la descomposición en valores singulares de la matriz \mathcal{H} :

$$U = \begin{bmatrix} -0,0007 & -1,0000 & 0,0003 & 0,0004 & 0,0000 & 0,0001 & -0,0000 & 0,0000 & 0,0000 \\ -0,0000 & -0,0001 & -0,0052 & 0,0114 & -0,0650 & -0,9276 & 0,3656 & -0,0341 & -0,0191 \\ -0,0000 & -0,0000 & -0,0011 & 0,0043 & -0,0194 & -0,3668 & -0,9260 & 0,0865 & 0,0002 \\ 0,0256 & -0,0005 & -0,6441 & -0,7644 & 0,0077 & -0,0065 & -0,0004 & -0,0002 & 0,0001 \\ 0,0005 & -0,0000 & -0,0216 & 0,0076 & -0,9974 & 0,0677 & -0,0051 & 0,0083 & 0,0029 \\ 0,0000 & -0,0000 & 0,0000 & 0,0003 & 0,0002 & -0,0174 & -0,0107 & -0,1906 & 0,9814 \\ -0,9995 & 0,0006 & -0,0307 & -0,0076 & 0,0001 & 0,0001 & -0,0000 & -0,0000 & -0,0000 \\ -0,0186 & 0,0000 & 0,7640 & -0,6445 & -0,0222 & -0,0103 & 0,0007 & 0,0001 & 0,0000 \\ -0,0000 & 0,0000 & -0,0001 & -0,0001 & 0,0080 & -0,0039 & 0,0927 & 0,9772 & 0,1908 \end{bmatrix}$$

$$V = \begin{bmatrix} -0,0007 & -1,0000 & -0,0037 & 0,0008 & -0,0001 & -0,0001 & 0,0000 & -0,0001 & -0,0000 \\ -0,0000 & -0,0001 & 0,0005 & 0,0070 & 0,0153 & 0,7774 & 0,1118 & 0,6184 & 0,0208 \\ -0,0000 & -0,0000 & 0,0000 & 0,0000 & -0,0001 & -0,1212 & -0,9388 & 0,3223 & -0,0065 \\ 0,0256 & -0,0017 & 0,6294 & 0,7766 & 0,0057 & -0,0045 & -0,0007 & -0,0036 & 0,0001 \\ 0,0005 & -0,0000 & 0,0218 & -0,0102 & -0,9996 & 0,0072 & 0,0043 & 0,0150 & 0,0008 \\ 0,0000 & -0,0000 & -0,0000 & -0,0002 & 0,0003 & -0,0002 & -0,0173 & -0,0303 & 0,9994 \\ -0,9995 & 0,0005 & 0,0306 & 0,0082 & 0,0001 & -0,0001 & -0,0000 & -0,0001 & 0,0000 \\ -0,0186 & 0,0034 & -0,7762 & 0,6298 & -0,0234 & -0,0030 & -0,0003 & -0,0021 & 0,0001 \\ -0,0000 & 0,0000 & 0,0001 & -0,0001 & 0,0077 & -0,6171 & 0,3253 & 0,7159 & 0,0272 \end{bmatrix}$$

$$S = 1,0 \times 10^8 \cdot \begin{bmatrix} 1,7253 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0,0000 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0,0000 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0,0000 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0,0000 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0,0000 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0,0000 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0,0000 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0,0000 \end{bmatrix}$$

7.7.4.2. Etapa de sacarificación

Las matrices A , B y C se obtienen de la misma forma que en la etapa anterior:

$$A = \begin{bmatrix} \frac{dS_1}{dS_1} & \frac{dS_1}{dS_5} & \frac{dS_1}{dTr_S} \\ \frac{dS_5}{dS_1} & \frac{dS_5}{dS_5} & \frac{dS_5}{dTr_S} \\ \frac{dTr_S}{dS_1} & \frac{dTr_S}{dS_5} & \frac{dTr_S}{dTr_S} \end{bmatrix} \quad B = \begin{bmatrix} \frac{dS_1}{dE_{02}} & \frac{dS_1}{dV_r} & \frac{dS_1}{dS_0} \\ \frac{dS_5}{dE_{02}} & \frac{dS_5}{dV_r} & \frac{dS_5}{dS_0} \\ \frac{dTr_S}{dE_{02}} & \frac{dTr_S}{dV_r} & \frac{dTr_S}{dS_0} \end{bmatrix} \quad C = \begin{bmatrix} 1 & 0 & 0 \\ 0 & 1 & 0 \\ 0 & 0 & 1 \end{bmatrix}$$

Luego de esto se construyen las matrices de observabilidad y controlabilidad, dado que para la baja escala se tienen múltiples matrices de O_b y C_o , se seleccionan los correspondientes al punto de operación, el cual corresponde al tiempo en el cual se tienen el IEI_{Max} para el volumen de la baja escala:

$$O_b = 1,0 \times 10^4 \cdot \begin{bmatrix} 0,0001 & 0,0000 & 0,0000 \\ 0,0000 & 0,0001 & 0,0000 \\ 0,0000 & 0,0000 & 0,0001 \\ -0,0002 & 0,0004 & 0,0000 \\ 0,0000 & -0,0001 & -0,0000 \\ -0,0026 & -0,0968 & -0,0091 \\ -0,0001 & -0,0195 & -0,0018 \\ 0,0002 & 0,0061 & 0,0006 \\ 0,2447 & 8,9710 & 0,8410 \end{bmatrix}$$

$$C_o = 1,0 \times 10^6 \cdot \begin{bmatrix} 0,0000 & 0,0000 & 0,0000 & -0,0001 & -0,0000 & 0,0000 & 0,0046 & 0,0004 & 0,0000 \\ -0,0000 & 0,0000 & 0,0000 & 0,0000 & 0,0000 & 0,0000 & -0,0014 & -0,0001 & 0,0000 \\ -0,0003 & -0,0000 & 0,0000 & 0,0234 & 0,0020 & 0,0000 & -2,1525 & -0,1845 & 0,0000 \end{bmatrix}$$

A partir del producto de estas matrices se obtiene la matriz \mathcal{H} :

$$\mathcal{H} = 1,0 \times 10^{10} \cdot \begin{bmatrix} 0,0000 & 0,0000 & 0,0000 & -0,0000 & -0,0000 & 0,0000 & 0,0000 & 0,0000 & 0,0000 \\ -0,0000 & 0,0000 & 0,0000 & 0,0000 & 0,0000 & 0,0000 & -0,0000 & -0,0000 & 0,0000 \\ -0,0000 & -0,0000 & 0,0000 & 0,0000 & 0,0000 & 0,0000 & -0,0002 & -0,0000 & 0,0000 \\ -0,0000 & -0,0000 & 0,0000 & 0,0000 & 0,0000 & 0,0000 & -0,0000 & -0,0000 & 0,0000 \\ 0,0000 & 0,0000 & 0,0000 & -0,0000 & -0,0000 & 0,0000 & 0,0000 & 0,0000 & 0,0000 \\ 0,0000 & 0,0000 & 0,0000 & -0,0002 & -0,0000 & 0,0000 & 0,0198 & 0,0017 & 0,0000 \\ 0,0000 & 0,0000 & 0,0000 & -0,0000 & -0,0000 & 0,0000 & 0,0039 & 0,0003 & 0,0000 \\ -0,0000 & -0,0000 & 0,0000 & 0,0000 & 0,0000 & 0,0000 & -0,0012 & -0,0001 & 0,0000 \\ -0,0002 & -0,0000 & 0,0000 & 0,0198 & 0,0017 & 0,0000 & -1,8222 & -0,1562 & 0,0000 \end{bmatrix}$$

Finalmente la descomposición en valores singulares de la matriz \mathcal{H} es:

$$U = \begin{bmatrix} -0,0001 & 0,9967 & -0,0289 & -0,0751 & -0,0026 & 0,0000 & 0,0000 & 0,0000 & 0,0000 \\ -0,0000 & 0,0001 & 0,0185 & -0,0389 & 0,9628 & -0,2667 & -0,0000 & -0,0000 & 0,0000 \\ 0,0000 & 0,0000 & 0,0000 & -0,0000 & 0,0000 & -0,0000 & 1,0000 & -0,0000 & 0,0000 \\ 0,0108 & 0,0025 & 0,9433 & -0,3279 & -0,0396 & -0,0297 & -0,0000 & -0,0000 & 0,0000 \\ 0,0009 & -0,0006 & -0,0363 & 0,0150 & -0,2655 & -0,9633 & -0,0000 & -0,0000 & 0,0000 \\ 0,0000 & 0,0000 & 0,0000 & 0,0000 & 0,0000 & 0,0000 & 0,0000 & 1,0000 & 0,0000 \\ -0,9963 & -0,0070 & -0,0178 & -0,0838 & -0,0032 & -0,0007 & -0,0000 & -0,0000 & 0,0000 \\ -0,0854 & 0,0802 & 0,3275 & 0,9371 & 0,0299 & -0,0061 & -0,0000 & -0,0000 & 0,0000 \\ 0,0000 & 0,0000 & 0,0000 & 0,0000 & 0,0000 & 0,0000 & 0,0000 & 0,0000 & 1,0000 \end{bmatrix}$$

$$V = \begin{bmatrix} -0,0001 & 0,0149 & -0,4517 & 0,8568 & -0,2456 & 0,0351 & -0,0000 & 0,0000 & 0,0000 \\ -0,0000 & -0,0004 & 0,0162 & -0,0317 & 0,0026 & 0,9994 & -0,0000 & 0,0000 & 0,0000 \\ 0,0000 & 0,0000 & 0,0000 & -0,0000 & 0,0000 & -0,0000 & -1,0000 & 0,0000 & 0,0000 \\ 0,0108 & -0,1004 & 0,8863 & 0,4421 & -0,0938 & -0,0001 & -0,0000 & 0,0000 & 0,0000 \\ 0,0009 & -0,0085 & -0,0291 & 0,2611 & 0,9648 & 0,0062 & -0,0000 & -0,0000 & 0,0000 \\ 0,0000 & 0,0000 & 0,0000 & 0,0000 & 0,0000 & 0,0000 & -0,0000 & -1,0000 & 0,0000 \\ -0,9963 & -0,0860 & 0,0014 & 0,0020 & -0,0003 & 0,0000 & -0,0000 & 0,0000 & 0,0000 \\ -0,0854 & 0,9911 & 0,0964 & 0,0343 & 0,0025 & -0,0001 & 0,0000 & -0,0000 & 0,0000 \\ 0,0000 & 0,0000 & 0,0000 & 0,0000 & 0,0000 & 0,0000 & 0,0000 & 0,0000 & 1,0000 \end{bmatrix}$$

$$S = 1,0 \times 10^{10} \cdot \begin{bmatrix} 1,8291 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0,0000 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0,0000 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0,0000 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0,0000 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0,0000 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0,0000 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0,0000 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0,0000 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \end{bmatrix}$$

7.7.5. Construcción de la curva de jerarquía de las dinámicas

Para esta sección se construye el IEI para las etapas de licuefacción y sacarificación en función del tiempo y para cada uno se analizan tres variables de estado, glucosa, maltopentosa y temperatura del reactor, de las cuales todas son medibles y pueden tomarse como tres salidas. Se plantean 3 variables de diseño, V_r , E_{0i} y S_0 , el sistema queda descrito como número de variables de estado $n=3$, número de entradas $p=3$ y número de salidas $m=3$.

7.7.5.1. Etapa de licuefacción

En la Figura 7-22 se observa el IEI para las variables de estado glucosa, maltopentosa y temperatura del reactor, de manera clara se observa como el $IEI_{glucosa}$ y el $IEI_{maltopentosa}$ son significativamente mayores respecto al $IEI_{T_{reactor}}$ y como el $IEI_{glucosa}$ es dominante de manera global.

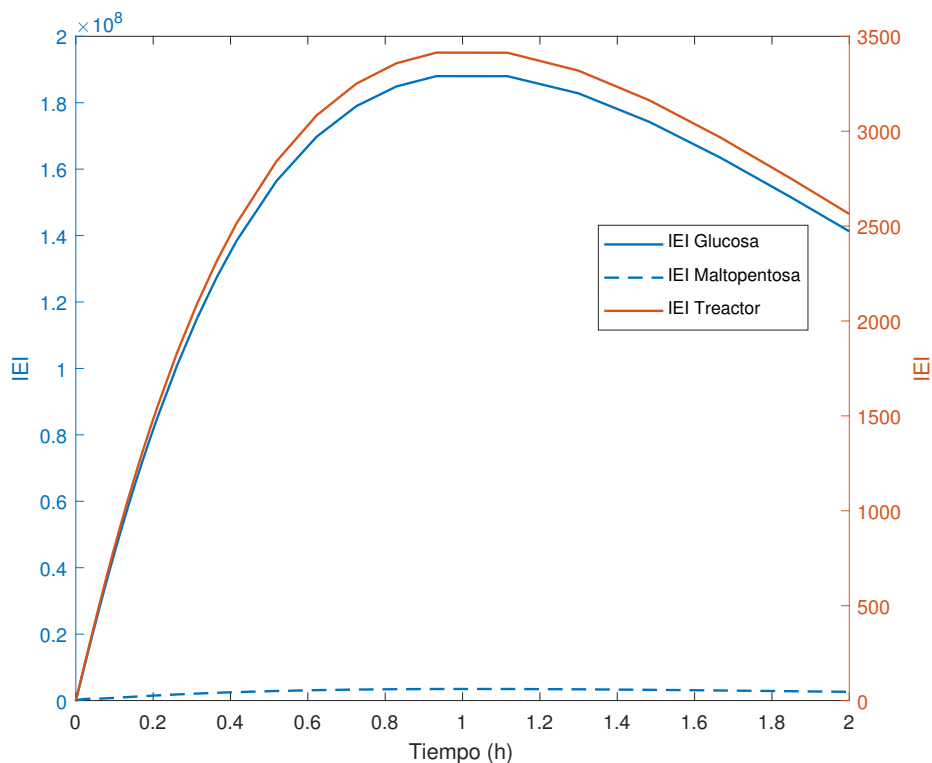


Figura 7-22. IEI para las variables de estado glucosa, maltopentosa y $T_{reactor}$, etapa de licuefacción en la BE. Nota: La escala del $IEI_{T_{reactor}}$ corresponde al eje y derecho.

En la Figura 7-23 se observa que la dinámica de la maltopentosa con un orden de 1×10^6 es inferior a la de glucosa con un orden de 1×10^8 y como el $IEI_{T_{reactor}}$ con un orden de 1×10^3 se

encuentra por debajo de los demás analizados, esto lleva a pensar como el diseño del proceso está enfocado en la generación y consumo de compuestos como glucosa y maltopentosa, respecto a la generación de cambios en la temperatura del sistema, a partir de esto se tiene claro como la variable de estado glucosa tiene un mayor impacto por variaciones, sea en los parámetros de sistema, variables de diseño o en las otras variables de estado, respecto a las variables maltopentosa y $T_{reactor}$ la cual se encuentra cinco ordenes por debajo, lo que quiere decir, que si sera impactada por los cambios mencionados pero el impacto sera mucho menor respecto a las demás dinámicas.

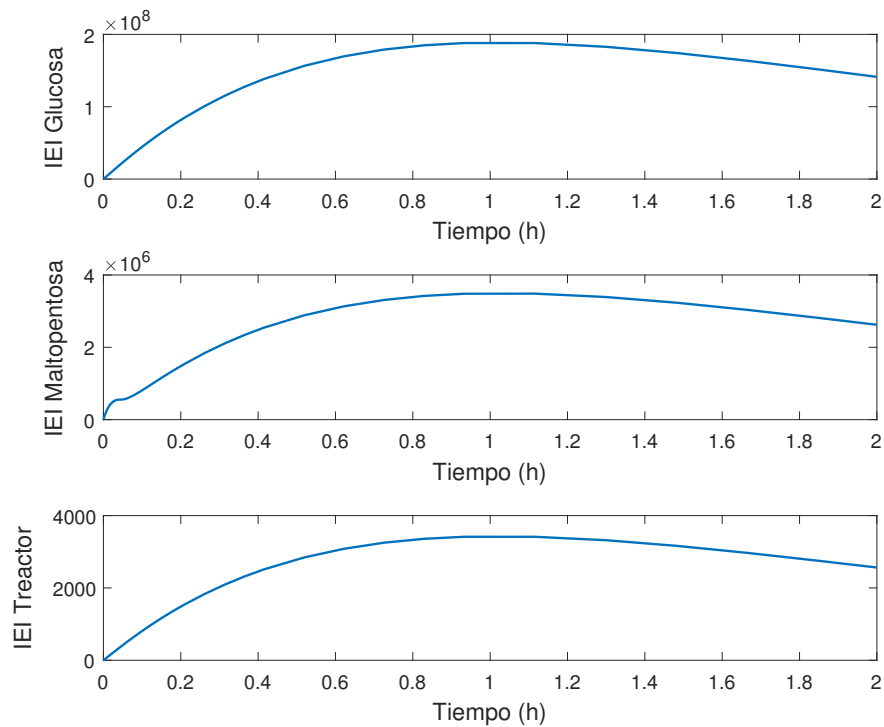


Figura 7-23. *IEI* diferenciados para las variables de estado glucosa, maltopentosa y $T_{reactor}$ etapa de licuefacción en la BE.

Vale la pena aclarar en este punto, como el *IEI* es analizado respecto al tiempo de proceso y como el IEI_{Max} corresponde al valor máximo del *IEI* alcanzado por las variables analizadas, esto se denomino el RdeO*, el cual se tomará para cada Δ VdeC y permitirá una asociación del *IEI* con la VdeC, como se expone en la siguiente sección.

7.7.5.2. Etapa de sacarificación

En la Figura 7-24 se observan los IEI para las dinámicas de glucosa, maltopentosa y temperatura en el reactor, claramente se observa como el $IEI_{glucosa}$ y el $IEI_{maltopentosa}$ presentan un impacto significativo respecto al proceso, para $IEI_{Treactor}$ se puede pensar que no se encuentra tan impactada como las otras, incluso puede llegar a pensarse que el efecto del proceso sobre esta variable de estado es mínimo.

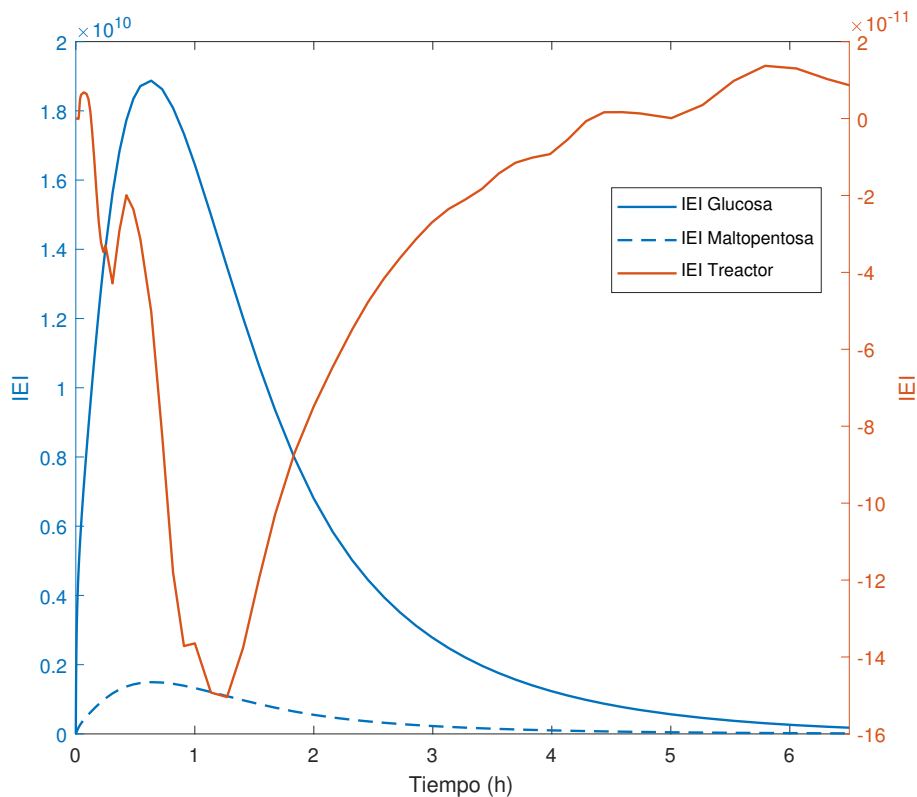


Figura 7-24. IEI para las variables de estado glucosa, maltopentosa y $T_{reactor}$ etapa de sacarificación en la BE. Nota: La escala del $IEI_{Treactor}$ corresponde al eje y derecho.

De acuerdo con la Figura 7-25 se puede establecer un régimen de operación, en el cual la dinámica dominante será la de glucosa, seguida de la dinámica de maltopentosa y por último y con mucho menos peso la dinámica de la temperatura, es importante notar los órdenes de magnitud entre estas variables de estado, siendo $IEI_{glucosa}$ de un orden de $\times 10^{10}$ y el $IEI_{maltosa}$ del orden de $\times 10^9$, si bien es un orden más el que representa la variable de estado glucosa, puede hablarse de una cercanía y como el proceso está centrado en la generación y consumo de estas dos variables respecto a las demás, esto quiere decir que van a sufrir cambios significativos en el proceso lo que puede verse reflejado en las variaciones de las concentraciones de estas en el tiempo respecto al $IEI_{Treactor}$, el cual es del orden $\times 10^{-10}$,

lo que lleva a pensar que el proceso presenta estabilidad respecto a la temperatura, es decir que será la dinámica menos impactada frente al sistema.

Es importante resaltar que no existe una relación entre el *IEI* y la concentración de estas variables, la metodología tiene la capacidad de determinar dentro de un conjunto de variables de estado analizadas cual tendrá un mayor impacto, es decir, cual será mayormente influenciada por variaciones en el proceso que pueden ir desde variaciones en las variables de diseño, variación en los parámetros, variación de otras variables de estado, pero no está en capacidad de responder o decir si la variación de la concentración en el tiempo será superior, inferior o igual entre las variables de estado analizadas y tampoco en las cantidades de estas, simplemente una variación frente a unas condiciones propuestas.

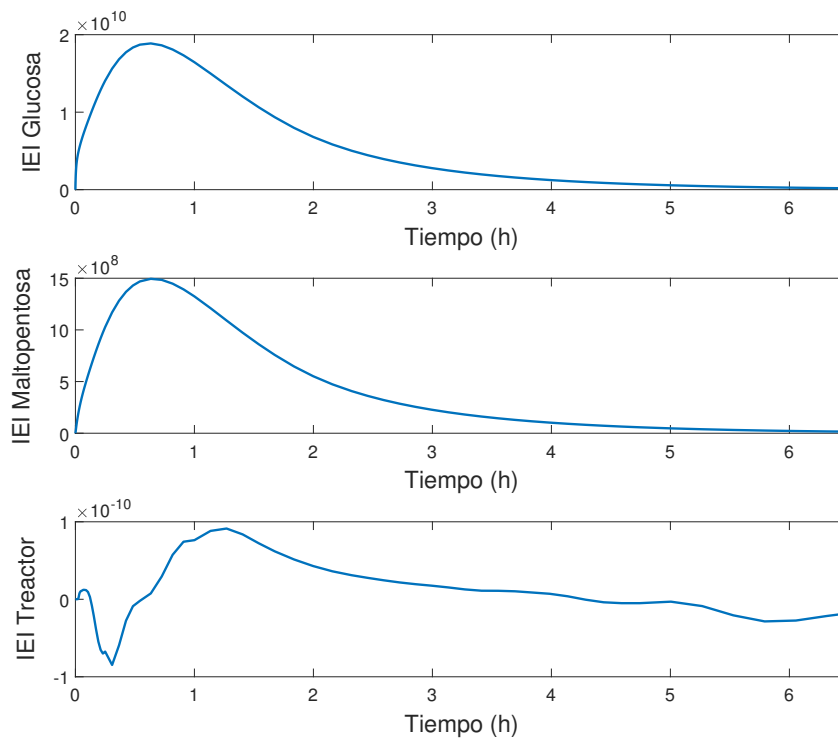


Figura 7-25. *IEI* diferenciados para las variables de estado glucosa, maltopentosa y $T_{reactor}$ etapa de sacarificación en la BE.

7.7.6. Ajuste de ecuación para calcular el IEI real

7.7.6.1. Etapa de licuefacción

Para la construcción de una curva para calcular el IEI_{real} , es conveniente antes analizar el comportamiento del IEI para variaciones en la VdeC a las condiciones del proceso en la BE. La Figura 7-26 presenta un perfil completo de todos los IEI para cada valor de la variable de capacidad, pasando de volúmenes en la BE (franjas azules), hasta volúmenes en la AE (franjas rojas), con un Δ VdeC de $0,1L$, se evidencia como los IEI aumentan con el tiempo hasta alcanzar un valor máximo y luego descienden, es evidente una relación entre la VdeC y el tiempo de proceso con respecto al IEI , aumentos de la VdeC y del tiempo de proceso generan una disminución del IEI .

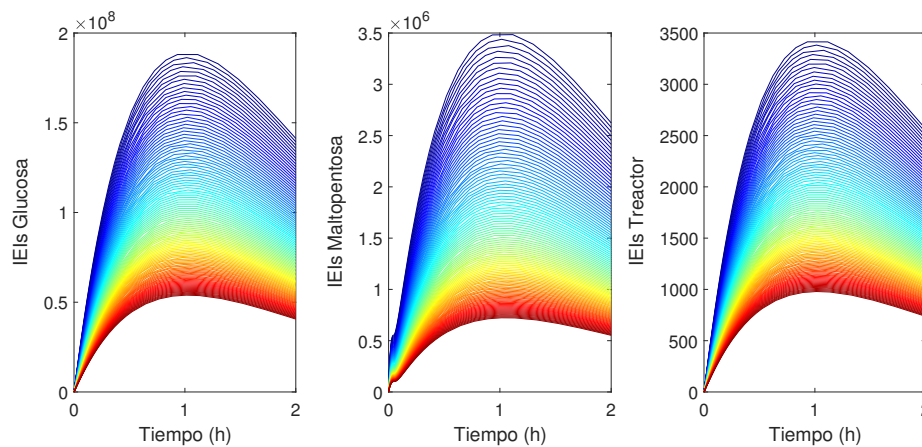


Figura 7-26. IEI para cada valor de la VdeC para 2h de proceso, etapa de licuefacción en la BE.

Si se prolonga el tiempo de proceso, Figura 7-27, se observa una disminución prolongada del IEI , lo que puede ser un indicativo que no es necesario un tiempo de proceso prolongado y a medida que se extiende, las variables de estado serán menos impactadas por el proceso.

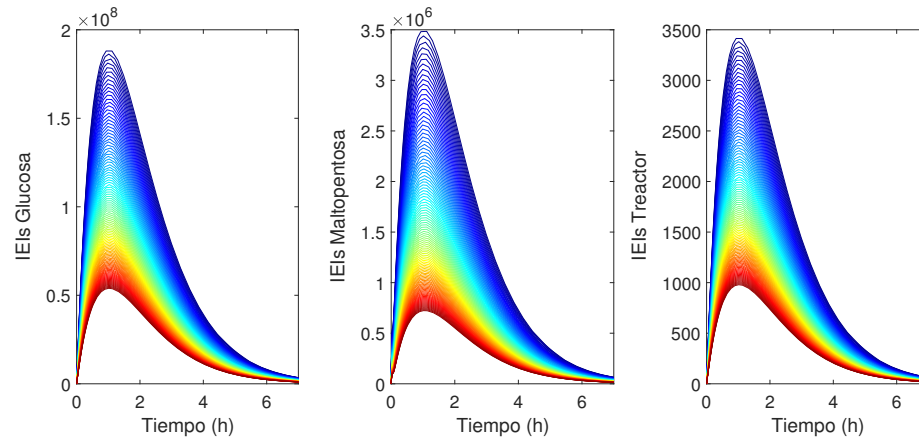


Figura 7-27. IEI para cada valor de la VdeC para 7h de proceso etapa de licuefacción en la BE.

Lo interesante de estos comportamientos es la región de IEI_{MAX} tan notoria que se puede presentar en el proceso, como se propuso anteriormente este se denominará RdeO*, el cual se presenta para cada Δ VdeC en valores de tiempo cercanos. Si se analiza este punto en la variable de estado de mayor interés (glucosa) se puede obtener la información presentada en la Tabla 7-11. A partir de esto se construye una curva de potencia que permite realizar lecturas del IEI_{real} dado su ajuste respecto a otras curvas como polinomios.

Tabla 7-11. Determinación de IEI_{real} para la etapa de licuefacción.

VdeC (L)	Tiempo (h)	IEI_{MAX} Cglucosa (RdeO*)	IEI_{real}	% Error
3.0	1.116	1.8801×10^8	1.8829×10^8	0.1498
3.1	1.007	1.6538×10^8	1.6498×10^8	0.2426
3.2	0.990	1.4538×10^8	1.4516×10^8	0.1512
3.3	1.003	1.2849×10^8	1.2823×10^8	0.2052
3.4	1.018	1.1387×10^8	1.1369×10^8	0.1596
3.5	1.107	1.0103×10^8	1.0115×10^8	0.1194
3.6	1.033	9.0353×10^7	9.0292×10^7	0.0670
3.7	1.023	8.0925×10^7	8.0851×10^7	0.0913
3.8	1.079	7.2565×10^7	7.2610×10^7	0.0627
3.9	1.057	6.5370×10^7	6.5392×10^7	0.0339
4.0	0.988	5.8987×10^7	5.9048×10^7	0.1029
Tiempo promedio	1.038	Error promedio		0.1260

La forma de la curva de potencia con un R^2 y R^2_{Ajust} de 1.0 es:

$$IEI_{real} = 1,578 \times 10^{10} \cdot VdeC - 4,031 \quad (7-47)$$

La cual representa un error promedio del 0,1260% para los puntos analizados, lo que se considera una buena aproximación para el cálculo del IEI_{real} , se debe aclarar que esto se logra gracias a un Δ VdeC de 0,1L, lo que permite tener un proceso más fino de escalado,

por esto cuando se escala a volúmenes mayores se propone realizarlo en pasos secuenciales, adoptando la información de la VdeC inmediatamente anterior.

Para verificar que aun existe una consistencia en el modelo para esta escala, es decir si se mantiene la eficiencia del proceso, se realiza un análisis del IEI_{Max} a medida que aumenta el valor de la VdeC, Figura 7-28 y de las concentraciones de salida de cada variable de estado, Figura 7-29.

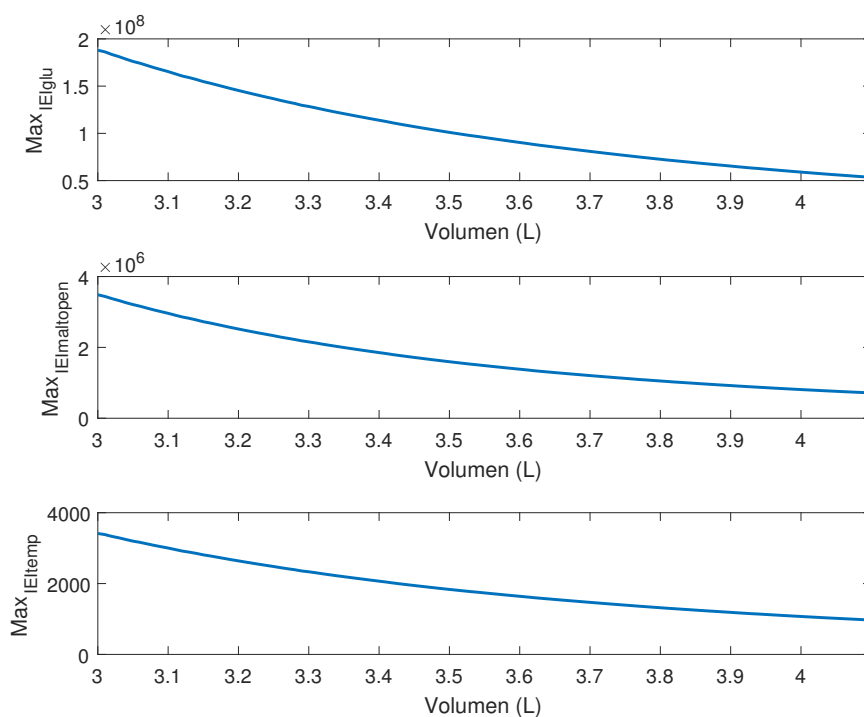


Figura 7-28. IEI_{Max} para las variables de estado de interés respecto a la VdeC etapa de licuefacción en la BE.

Al aumentar el valor de la VdeC desde la BE hasta la AE con un Δ VdeC de 0,1L, los $IEI_{Max,glucosa}$, $IEI_{Max,maltopentosa}$ y $IEI_{Max,Treactor}$ disminuyen, lo se asocia con el cambio de escala y otros fenómenos del proceso empiezan a cobrar mayor importancia, esto permite observar para determinado valor de la VdeC este IEI_{Max} sera tan bajo que permitirá concluir respecto a un volumen en el cual ya no se recomienda escalar.

Otro aspecto a tener en cuenta en este análisis es la manera como se realiza el escalado, es decir, la importancia de tomar valores intermedios para escalar cuando se va desde la BE a la AE, dado que esto se toma como el IEI_{real} y se ajusta a ecuaciones de potencia y al tener un gran paso entre la BE y AE perderá ajuste. Es importante notar como independiente-

mente de la disminución del IEI_{Max} , el régimen de operación se mantiene, $IEI_{Max,glucosa} > IEI_{Max,maltopentosa} > IEI_{Max,Treactor}$, aspecto importante ya que confirma la fuerza del modelo para la representación de estas variables de estado.

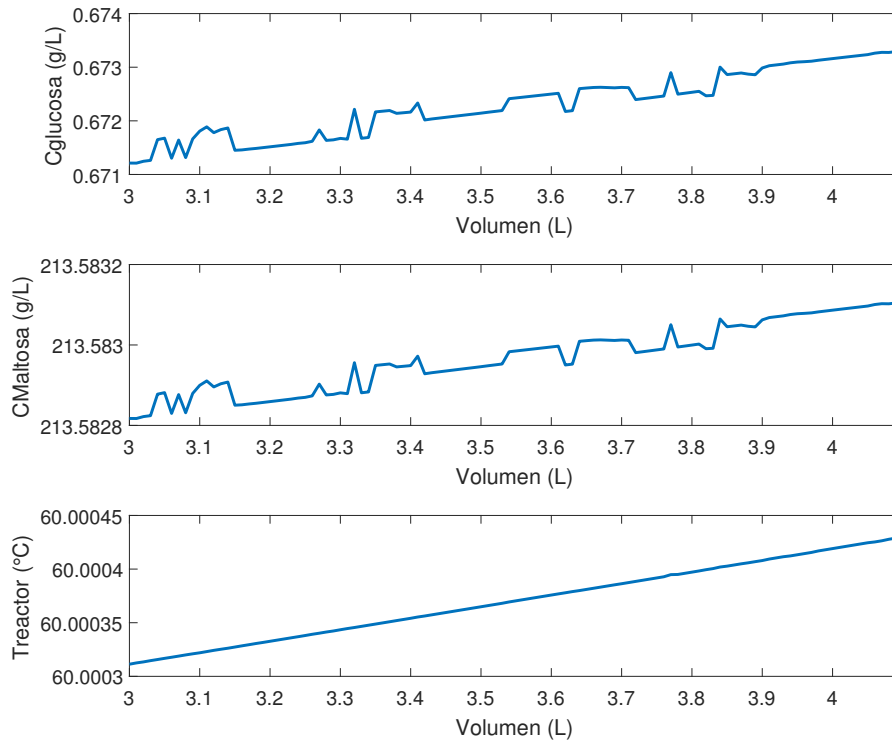


Figura 7-29. Concentraciones de salida respecto a la VdeC etapa de licuefacción en la BE.

Para cualquiera de las variables de estado de interés a las condiciones de proceso en la BE, las concentraciones de salida varía respecto al aumento de escala, Figura 7-29, pero no es significativo, estos impulsos se asocian al valor del Δ VdeC (0,1L) el cual es muy bajo y a medida que avanza la tendencia de la curva busca unir punto a punto pequeñas variaciones, por ejemplo, para un paso de 3L a 4L la concentración de salida de glucosa va desde el 0,505g/L hasta 0,507g/L, lo que equivale a una desviación del 0,4%, la de maltopentosa va desde 213,5701g/L hasta 213,5704g/L, con una desviación del 1×10^{-4} y la temperatura del reactor desde 60,04°C hasta 59,97°C con una desviación de 1×10^{-3} . Esto permite observar con este aumento de escala, como la eficiencia del proceso se mantiene a las condiciones de proceso tratadas.

7.7.6.2. Etapa de sacarificación

Igual que en la etapa anterior, se realizó un análisis del comportamiento del IEI para cambios de VdeC desde la BE hasta la AE, con incrementos en el $\Delta VdeC$ de 0,1L, Figura 7-30, se encuentra para este proceso, la misma relación anterior, aumentos de valores del IEI a medida que avanza el tiempo hasta un valor máximo y luego un descenso de este, llegando a la misma conclusión, para aumentos de valores de la VdeC y tiempos de proceso, se observa una disminución en los valores del IEI , pasando de valores en la BE (franja azul), hasta valores en la AE (franja roja). Claramente el $IEI_{Treactor}$ no presenta tendencia alguna y sus valores oscilan cercanos a cero, los impulsos que se observan están asociados a la forma como se resuelve la ecuación en procesos iterativos más que a un sentido físico. Esto puede dar una idea del poco impacto del proceso sobre esta variable de estado.

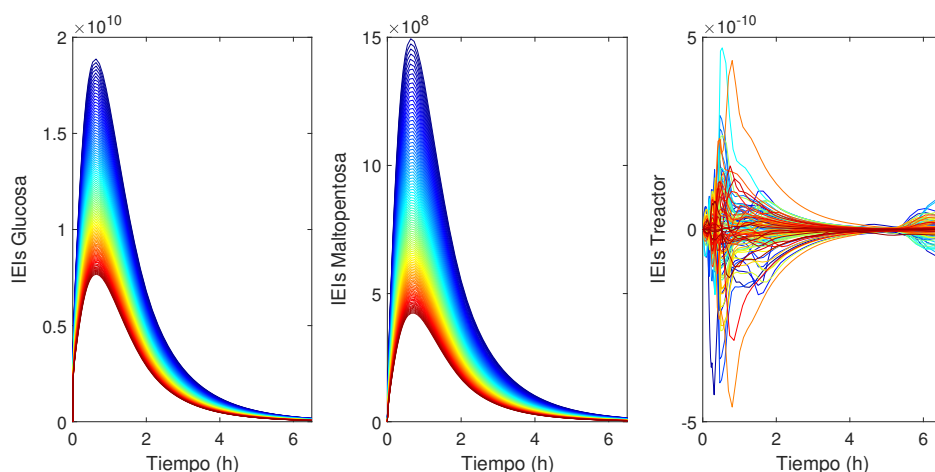


Figura 7-30. IEI para cada valor de la VdeC para 6.5h de proceso etapa de sacarificación en la BE.

Para la variable de estado de interés, glucosa, para cada valor de la VdeC se seleccionó el IEI_{Max} , que corresponde al $RdeO^*$ para esa VdeC correspondiente, junto con el tiempo en el cual se presenta. Esta información se reporta en la Tabla 7-12. Se construye una curva de potencia que permite realizar lecturas del IEI_{real} dado su ajuste respecto a otras curvas como polinomios.

Tabla 7-12. Determinación de IEI_{real} para la etapa de sacarificación.

VdeC (L)	Tiempo (h)	Max IEI Cglucosa (RdeO*)	IEI_{real}	% Error
3,0	0,6365	$1,887 \times 10^{10}$	$1,883 \times 10^{10}$	0,1940
3,1	0,5983	$1,711 \times 10^{10}$	$1,712 \times 10^{10}$	0,0231
3,2	0,6019	$1,559 \times 10^{10}$	$1,560 \times 10^{10}$	0,1118
3,3	0,6065	$1,424 \times 10^{10}$	$1,426 \times 10^{10}$	0,1566
3,4	0,628	$1,306 \times 10^{10}$	$1,308 \times 10^{10}$	0,1309
3,5	0,6357	$1,2000 \times 10^{10}$	$1,202 \times 10^{10}$	0,1108
3,6	0,6453	$1,106 \times 10^{10}$	$1,107 \times 10^{10}$	0,0790
3,7	0,6444	$1,022 \times 10^{10}$	$1,022 \times 10^{10}$	0,0207
3,8	0,6521	$9,464 \times 10^9$	$9,453 \times 10^9$	0,1099
3,9	0,6127	$8,783 \times 10^9$	$8,764 \times 10^9$	0,2140
4,0	0,5912	$8,156 \times 10^9$	$8,140 \times 10^9$	0,1973
Tiempo promedio (h)	0,6230	Error promedio		0,1226

La forma de la curva de potencia con un R^2 de 1 un R_{Ajust}^2 de 1 es:

$$IEI_{real} = 4,637 \times 10^{11} \cdot VdeC - 2,916 \quad (7-48)$$

La cual representa un error promedio del 0,1226 % para los puntos analizados, lo que se considera una buena aproximación para el cálculo del IEI_{real} .

Para verificar que aun existe una consistencia en el modelo para esta escala, se realiza un análisis del IEI a medida que aumenta el valor de la VdeC, Figura 7-31 y de las concentraciones de salida de cada variable de estado, Figura 7-32.

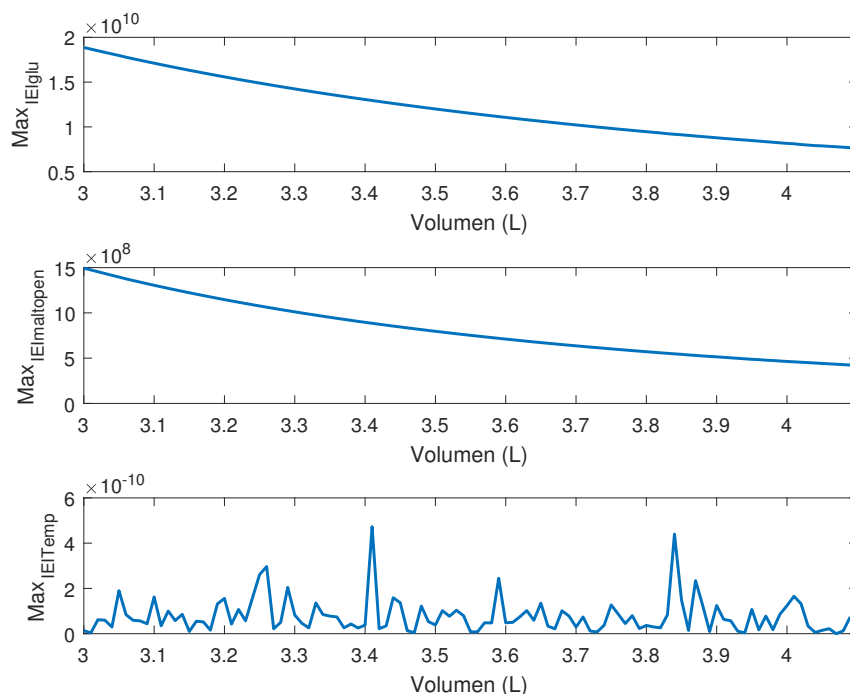


Figura 7-31. IEI_{Max} para las variables de estado de interés respecto a la VdeC etapa de sacarificación en la BE.

Al igual que en la etapa anterior, los $IEI_{Max,glucosa}$, $IEI_{Max,maltopentosa}$ disminuyen en el proceso, lo que puede deberse a los aspectos mencionados anteriormente, se debe analizar es como respecto a la etapa anterior esta presenta una mayor estabilidad a medida que disminuyen los IEI , si se analiza el $IEI_{Max,glucosa}$ en la etapa de licuefacción, este disminuye desde $1,8 \times 10^8$ hasta $5,9 \times 10^7$ pasando de 3L a 4L, pero el $IEI_{Max,glucosa}$ para la etapa de sacarificación disminuye desde $1,9 \times 10^{10}$ hasta $8,2 \times 10^9$, lo que permite usar valores para escalar entre la BE y AE mayores. El $IEI_{Max,Treactor}$ presenta una fluctuación pero del orden de 1×10^{-10} lo que lleva a concluir en esta etapa el impacto del proceso sobre esta variable es mínimo y que dicha fluctuación se debe a la formulación matemática dada la proximidad al cero.

La Figura 7-32 permite observar a condiciones de proceso en la BE, como las concentraciones de glucosa pasan de 163,90g/L hasta 163,80g/L, con desviación del $6 \times 10^{-2} \%$, la de maltopentosa va desde 95,75g/L hasta 95,85g/L, con una desviación del 0,1% y la temperatura del reactor va desde 60,910°C hasta 60,913°C con una desviación del $1 \times 10^{-3} \%$, con esto se mantiene la eficiencia del proceso para este cambio de escala.

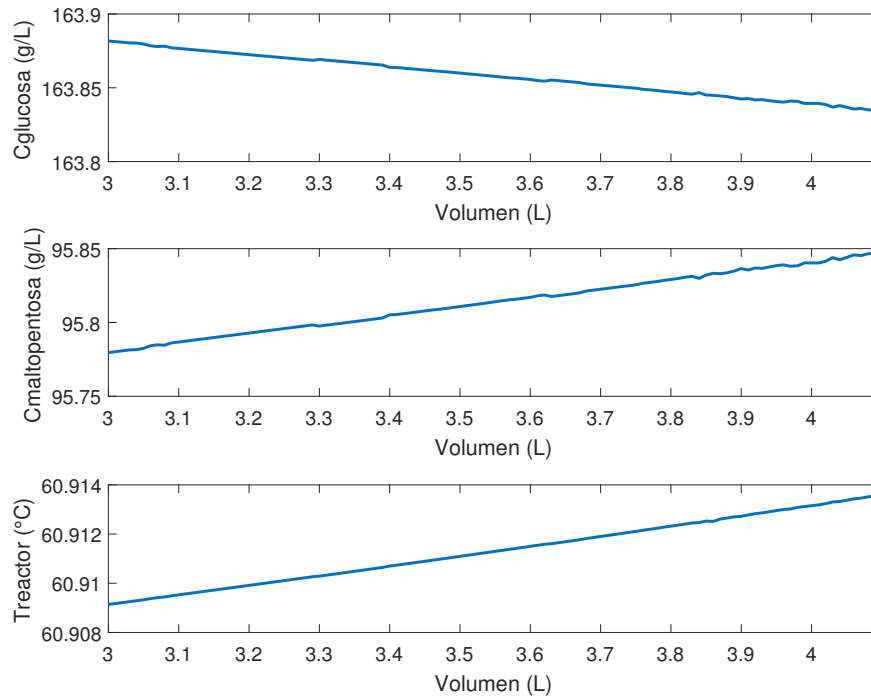


Figura 7-32. Concentraciones de salida respecto a la VdeC etapa de sacarificación en la BE.

7.7.7. Determinación de la nueva matriz de Hankel

Para esta sección inicialmente se determinó la matriz S_{est} , luego con ayuda de las matrices U y V en la BE tomadas de la DVS se determinó la nueva matriz de Hankel, para este caso se utilizó la ecuación de potencia del IEI_{real} , la cual permitió despejar el $S_{ii,estimado}$ de la ecuación 6-9.

7.7.7.1. Etapa de licuefacción

Se determina de matriz S_{estLic} :

$$S_{estLic} = \begin{bmatrix} 8,4354 \times 10^{10} & 0,0000 & 0,0000 \\ 0,0000 & 0,0000 & 0,0000 \\ 0,0000 & 0,0000 & 0,0000 \end{bmatrix}$$

Luego multiplicando las matrices U y V de la BE ($\mathcal{H}_{newLic} = U \cdot S_{estLic} \cdot V^T$) se obtiene la nueva matriz de Hankel:

$$\mathcal{H}_{newLic} = 1,0 \times 10^{10} \cdot \begin{bmatrix} 0,0000 & 0,0000 & 0,0000 & -0,0002 & -0,0000 & 0,0000 & 0,0059 & 0,0001 & 0,0000 \\ 0,0000 & 0,0000 & 0,0000 & 0,0000 & 0,0000 & 0,0000 & 0,0000 & 0,0000 & 0,0000 \\ 0,0000 & 0,0000 & 0,0000 & 0,0000 & 0,0000 & 0,0000 & 0,0000 & 0,0000 & 0,0000 \\ -0,0002 & 0,0000 & 0,0000 & 0,0055 & 0,0001 & 0,0000 & -0,2158 & -0,0040 & 0,0000 \\ -0,0000 & 0,0000 & 0,0000 & 0,0001 & 0,0000 & 0,0000 & -0,0042 & -0,0001 & 0,0000 \\ 0,0000 & 0,0000 & 0,0000 & 0,0000 & 0,0000 & 0,0000 & 0,0000 & 0,0000 & 0,0000 \\ 0,0059 & 0,0000 & 0,0000 & -0,2158 & -0,0042 & 0,0000 & 8,4270 & 0,1568 & 0,0000 \\ 0,0001 & 0,0000 & 0,0000 & -0,0040 & -0,0001 & 0,0000 & 0,1568 & 0,0029 & 0,0000 \\ 0,0000 & 0,0000 & 0,0000 & 0,0000 & 0,0000 & 0,0000 & 0,0000 & 0,0000 & 0,0000 \end{bmatrix}$$

7.7.7.2. Etapa de sacarificación

Se determina de matriz S_{estSac} :

$$S_{estSac} = \begin{bmatrix} 8,1401 \times 10^{13} & 0,0000 & 0,0000 \\ 0,0000 & 0,0000 & 0,0000 \\ 0,0000 & 0,0000 & 0,0000 \end{bmatrix}$$

Luego multiplicando las matrices U y V de la BE ($H = U \cdot S_{estSac} \cdot V^T$) se obtiene la matriz de Hankel:

$$\mathcal{H}_{newSac} = 1,0 \times 10^{13} \cdot \begin{bmatrix} 0,0000 & 0,0000 & 0,0000 & -0,0000 & -0,0000 & 0,0000 & 0,0008 & 0,0000 & 0,0000 \\ 0,0000 & 0,0000 & 0,0000 & 0,0000 & 0,0000 & 0,0000 & 0,0000 & 0,0000 & 0,0000 \\ 0,0000 & 0,0000 & 0,0000 & 0,0000 & 0,0000 & 0,0000 & 0,0000 & 0,0000 & 0,0000 \\ -0,0001 & 0,0000 & 0,0000 & 0,0023 & 0,0000 & 0,0000 & -0,0879 & -0,0016 & 0,0000 \\ -0,0000 & 0,0000 & 0,0000 & 0,0002 & 0,0000 & 0,0000 & -0,0073 & -0,0001 & 0,0000 \\ 0,0000 & 0,0000 & 0,0000 & 0,0000 & 0,0000 & 0,0000 & 0,0000 & 0,0000 & 0,0000 \\ 0,0057 & 0,0000 & 0,0000 & -0,2084 & -0,0041 & 0,0000 & 8,1059 & 0,1508 & 0,0000 \\ 0,0005 & 0,0000 & 0,0000 & -0,0179 & -0,0003 & 0,0000 & 0,6948 & 0,0129 & 0,0000 \\ 0,0000 & 0,0000 & 0,0000 & 0,0000 & 0,0000 & 0,0000 & 0,0000 & 0,0000 & 0,0000 \end{bmatrix}$$

Se observa como el tamaño de la matriz S y S_{est} para ambas etapas difiere, pero esto se debe a que son tres variables de estado las que se están analizando por lo cual solo se necesitan las primeras tres columnas para determinar el IEI de los procesos, simplificando las matrices en la nueva escala.

7.7.8. Escalado con valores entre BE y AE y Factores de escala

Para la determinación del valor de las variables de diseño en la nueva escala, se procede a igualar las componentes de la matriz de Hankel en la baja escala con los valores de la matriz en la alta escala. La complejidad de estas matrices se fundamenta en las múltiples interacciones entre variables que se derivan a partir de las matrices A , B y C de cada etapa, en el Anexo B se presenta la primer fila de la matriz de Hankel de la etapa de licuefacción, se observa la complejidad de esta primera fila para relacionar variables de diseño, variables de estado y parámetros, para lo cual se necesita redefinir 37 nuevas variables (σ), es por esto que se omite la escritura de toda la matriz para estas etapas y se propone dentro de la metodología de escalado que la solución sea a partir de un software matemático, ya que despejar y manejar de manera manual implicaría algo muy complejo.

Las variables de diseño seleccionadas al inicio del escalado fueron la concentración inicial de enzima E_{0i} , el volumen del reactor V_r y la concentración inicial de sustrato S_0 . Dado que la variable de diseño V_r , del reactor se fija desde VdeC en la AE, su valor se asume como el valor de la nueva escala (4L), una vez se realiza esto, se buscan desde la igualdad relaciones entre las otras dos variables y se determina cuál de los resultados es el más cercano para el proceso real.

7.7.8.1. Determinación de las variables de diseño

Para la etapa de licuefacción, al igualar las componentes en la matriz de Hankel, se obtienen los valores para la variable de diseño S_0 presentados en la Tabla 7-13.

Tabla 7-13. Valores de la variable de diseño S_0 en la AE, etapa de licuefacción.

Componente de la Matriz \mathcal{H}	Valor (g/L)
$h_{1,1a}$	14,8141
$h_{1,1b}$	2220,8000
$h_{1,3a}$	180,8459
$h_{1,3b}$	-181,8459
$h_{1,5a}$	14,8141
$h_{1,5b}$	2220,8000
$h_{2,1a}$	-419,8266
$h_{2,1b}$	31,5385
$h_{2,5a}$	-419,8266
$h_{2,5b}$	31,5385
$h_{4,2}$	4,6398
$h_{5,2}$	4,6398
$h_{8,2}$	4,6398

De igualar las componentes de la matriz de Hankel se tienen 81 posibilidades para obtener valores y relaciones matemáticas entre las variables de diseño. De estas, solo 13 componentes arrojaron valores para S_0 , entre las cuales existen valores negativos y dada la naturaleza de la variable de diseño estos valores no son posibles, por lo cual se descartan, al comparar el resto de valores con la condición de la variable de diseño en la BE de 161,4g/L, El valor más cercano es 180,8459g/L, por lo cual se toma como la nueva condición de diseño, se espera que al darse este aumento la otra variable también aumente, para esto, 52 de las componentes generan expresiones matemáticas de las cuales al reemplazar el valor de $S_0 = 180,8459\text{g/L}$, se obtienen diferentes valores incluso algunos imaginarios, los valores se reportan en la Tabla 7-14, dado que se busca utilizar la menor cantidad de enzima, al relacionarlo con la concentración de enzima en la BE $0,05\text{mL}_{\alpha\text{-amilasa}}/\text{L}_{\text{solución}}$, equivalente a adicionar $0,1630\text{mL}_{\alpha\text{-amilasa}}$, el valor más cercano es $15,0966\text{mL}_{\alpha\text{-amilasa}}/\text{L}_{\text{solución}}$ y al relacionarlo con la variable $V_r = 4\text{L}$, se obtienen una cantidad de enzima de $60,3864\text{mL}_{\alpha\text{-amilasa}}$, para lo cual se realiza la corrección por sólidos secos (0,92 %) de la muestra se obtiene una cantidad de $65,5448\text{mL}_{\alpha\text{-amilasa}}$, siendo significativo respecto a la BE.

Tabla 7-14. Valores de la variable de diseño E_{01} en la AE, etapa de licuefacción.

Componente de la Matriz \mathcal{H}	Concentración de enzima ($\text{mL}_{\text{enzima}}/\text{L}_{\text{solución}}$)	Cantidad de enzima a adicionar ($\text{mL}_{\text{enzima}}$)
$h_{1,7a}$	3379,10	13519,99
$h_{1,5b}$	15,13	60,50
$h_{2,8}$	15,12	60,48
$h_{3,4}$	15,10	60,41
$h_{3,5a}$	15,17	60,68
$h_{3,6b}$	15,11	60,45
$h_{6,2}$	15,17	60,68
$h_{7,2}$	15,10	60,39
$h_{8,2}$	15,10	60,39

La etapa de sacarificación no depende directamente de la variable de diseño S_0 , dado que toma como condiciones de entrada las salidas de la etapa de licuefacción, por esto al igualar las componentes de su matriz de Hankel se obtienen 35 valores para la concentración de enzima E_{02} de los cuales 22 se reportan en la Tabla 7-15, algunos son números imaginarios o valores negativos que no concuerdan con la naturaleza de la variable de diseño.

Tabla 7-15. Valores de la variable de diseño E_{02} en la AE, etapa de sacarificación.

Concentración de enzima ($mL_{enzima}/L_{solución}$)	Cantidad de enzima (mL_{enzima})	Concentración de enzima ($mL_{enzima}/L_{solución}$)	Cantidad de enzima (mL_{enzima})
$h_{1,7a}$	3379,1000	$h_{6,1}$	0,7864
$h_{1,7b}$	3379,1000	$h_{6,2}$	0,7866
$h_{3,5}$	0,7866	$h_{7,1}$	102,4460
$h_{4,1}$	1347,4845	$h_{7,4}$	48,2979
$h_{4,4a}$	109,0263	$h_{7,5}$	10,0668
$h_{4,4b}$	-131,7584	$h_{7,7a}$	16,7851
$h_{4,7}$	19,3904	$h_{7,8}$	6,4154
$h_{4,8}$	6,3740	$h_{8,1}$	12,9595
$h_{5,4}$	4,7349	$h_{8,4}$	7,4277
$h_{5,7}$	9,1209	$h_{8,7}$	9,4241
$h_{5,8}$	0,7572	$h_{8,8}$	1,0659

La concentración de enzima AMG en la BE es de $0,26mL_{AMG}/L_{solución}$, equivalente a adicionar $0,7744mL_{AMG}$, relacionando esto con los resultados de la Tabla 7-15 componentes como $h_{5,8}$ presentan un valor de $0,7572mL_{AMG}/L_{solución}$, equivalente a $3,0288mL_{AMG}$.

Al proponer y obtener los nuevos valores de estas variables de diseño para el proceso, $V_r = 4L$, $S_0 = 180,8459g/L$, $E_{01} = 15,0966mL_{\alpha-amilasa}/L_{solución}$ y $E_{02} = 0,7572mL_{AMG}/L_{solución}$, el proceso debe definirse nuevamente ya que algunas condiciones iniciales cambian, para este caso, según la concentración inicial, el volumen al cual se desea escalar y el porcentaje de almidón en la muestra, la cantidad de masa a adicionar se calcula a partir de la ecuación 7-49:

$$g_{masa\ almidón} = \frac{S_0 \cdot V_r}{\%almidón} = \frac{181g/L \cdot 4L}{0,8070} = 896g \quad (7-49)$$

Relacionando esta cantidad de masa con la cantidad de volumen a trabajar (asumiendo la densidad del medio como la densidad de agua) el porcentaje de sólidos se calcula a partir de la ecuación 7-50:

$$Porcentaje\ de\ Sólidos(\%) = \frac{g_{masa\ almidón}}{g_{masa\ totales}} \cdot 100\% = \frac{896g}{4000g} \cdot 100\% = 22\% \quad (7-50)$$

Finalmente se calculan las nuevas relaciones E/S a partir de la ecuación 7-51:

$$Relación\ E/S = \frac{mL_{enz} \cdot \rho_{enz}}{g_{masa\ totales} \cdot \%almidón} \cdot 100\% \quad (7-51)$$

El porcentaje de almidón en la muestra es del 0,8070%, la densidad de la enzima α -amilasa y AMG son 1,16g/mL y 1,13g/mL, respectivamente. Evaluando esto junto con las cantidades de enzima propuestas se obtiene una relación E/S para α -amilasa de 10,50%, equivalente a

10,2U/g almidón y para AMG de 0,47 %, equivalente a 1,3U/g almidón.

Comparando estas variables respecto al proceso en la BE, se observa un aumento en las relaciones E/S para ambas enzimas y un aumento en la concentración inicial de sustrato lo que es equivalente a un aumento del 20 % al 22 % de sólidos.

7.7.8.2. Resultados experimentales

Se realizó el proceso para el nuevo valor de la variable de capacidad 4L, con las condiciones obtenidas a partir de la propuesta de escalado, se obtuvieron los comportamientos para las etapas de licuefacción y sacarificación presentados en las Figuras 7-33 y 7-34.

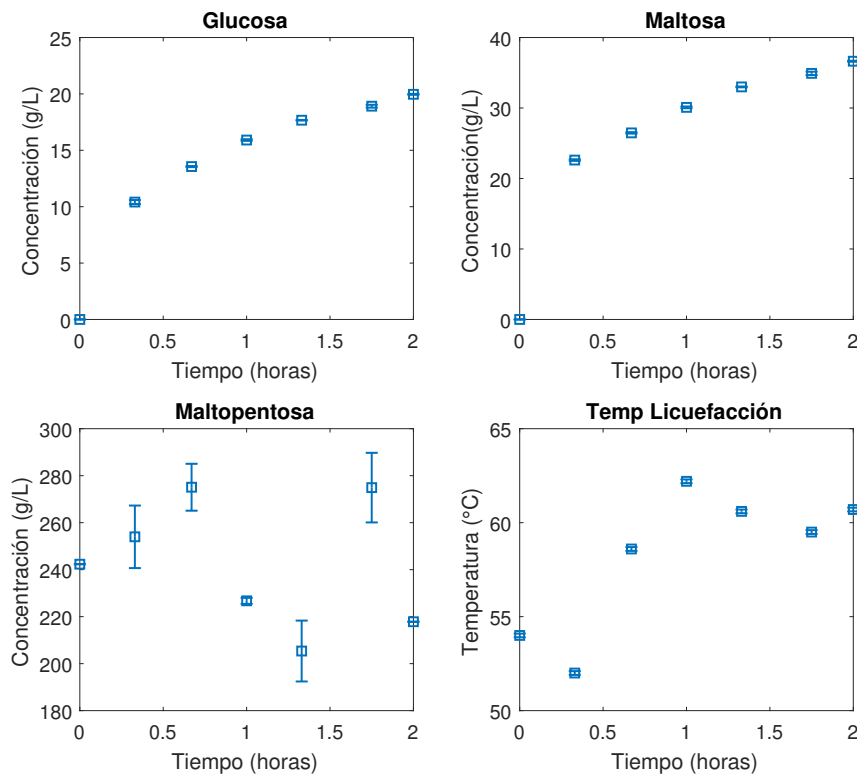


Figura 7-33. Cinética del proceso de hidrólisis enzimática para almidón de trigo, etapa de licuefacción, volumen 4L, porcentaje de sólidos 22 %, relación E/S 10,50 %p/p, S_0 181g/L, CaCl_2 20ppm, temperatura 60°C.

Para la etapa de licuefacción se presentan los comportamientos esperados respecto a la baja escala, para la glucosa y maltosa, se obtuvo valores de 19g/L y 36g/L, respectivamente, para un tiempo de 2h, lo cual varía significativamente respecto a los valores esperados, esto debido a la cantidad significativa de enzima usada, por otro lado, si analizamos la maltopentosa,

encontramos que a pesar de aumentar la cantidad de enzima su valor de salida es cercano al valor esperado, lo cual concuerda con el efecto positivo de la gelatinización realizada. La temperatura del reactor varió dentro de los valores esperados a excepción de sus primeros dos valores que se encontraron fuera del 5 % de error aceptado.

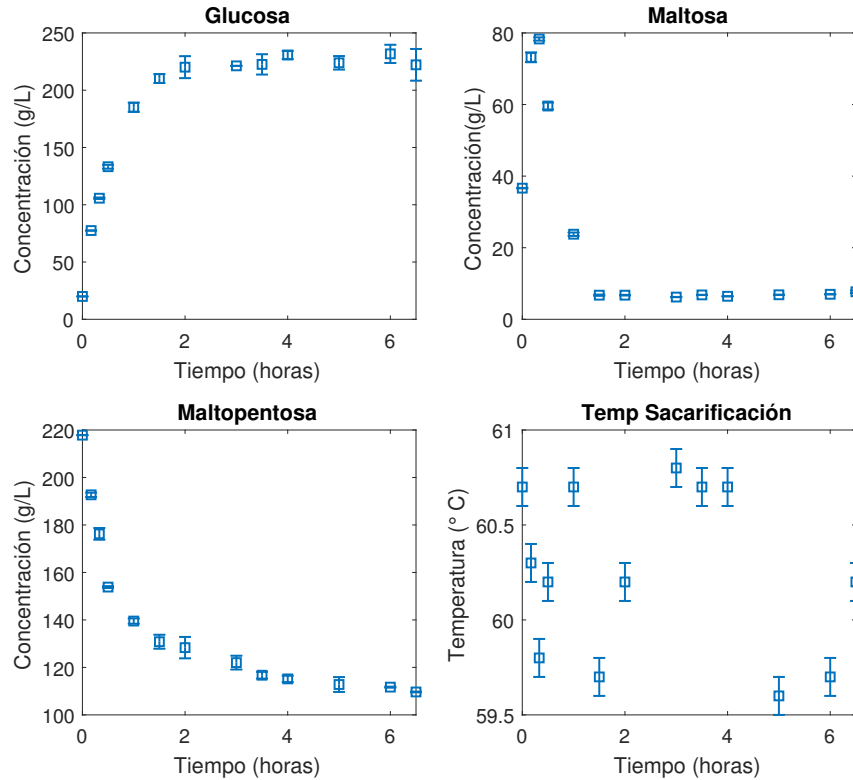


Figura 7-34. Cinética del proceso de hidrólisis enzimática para almidón de trigo, etapa de sacarificación, volumen 4L, relación E/S 0,47 %p/p, $C_{0,glucosa}$ 19,965g/L, $C_{0,maltosa}$ 36,637g/L, $C_{0,maltopentosa}$ 217,834g/L, temperatura 60°C.

La etapa de sacarificación presenta los comportamientos esperados respecto a la BE, pero los valores de la glucosa y maltosa difieren significativamente, ya que los valores alcanzados para las 6.5h son cercanos a los 222g/L y 7g/L, respectivamente, por otro lado, el valor de la maltopentosa, 109g/L, es cercano al valor esperado, la temperatura presentó el valor esperado cercano a los 60°C.

Al realizar la comparación de los valores promedio de salida para cada variable de estado en cada etapa se obtienen los valores presentados en la Tabla 7-16.

Tabla 7-16. Resultados comparativos del escalado de procesos.

Resultados promedio hidrólisis enzimática 3L					
Etapa de licuefacción			Etapa de sacarificación		
Glucosa (g/L)	Maltosa (g/L)	Maltopentosa (g/L)	Glucosa (g/L)	Maltosa (g/L)	Maltopentosa (g/L)
0,4	1,5	21	174	2,7	107
Resultados promedio hidrólisis enzimática 4L					
Etapa de licuefacción			Etapa de sacarificación		
Glucosa (g/L)	Maltosa (g/L)	Maltopentosa (g/L)	Glucosa (g/L)	Maltosa (g/L)	Maltopentosa (g/L)
16	29	242	223	6,8	118
Porcentaje de ganancia					
>100 %	>100 %	13 %	28 %	>100 %	10 %

Al realizar el proceso experimentalmente se observó a través de las Figuras 7-33 y 7-34, el comportamiento obtenido, pero la Tabla 7-16 permite realizar un análisis más detallado. Para la etapa de licuefacción comparando los valores entre la BE y AE, se observaron ganancias superiores al 100 % para las variables glucosa y maltosa y del 13 % para la maltopentosa. En la etapa de sacarificación se observaron ganancias del 28 % para la variable glucosa, mayores al 100 % para la variable maltosa y del 10 % para la maltopentosa. Esto se traduce en valores superiores a los esperados respecto a la BE.

7.7.8.3. Simulación de procesos en AE y Factores de escala (ξ_i)

Con las variables de diseño en la AE para la etapa de licuefacción, se realiza el ajuste de parámetros, se obtienen los errores promedio de 10,28 % para la concentración de glucosa, 12,18 % para la concentración de maltosa, 10,56 % para la concentración de maltopentosa y 0,84 % para la temperatura del sistema. A partir de los parámetros ajustados en la AE y asociándolos con los parámetros en la BE se determinan los factores de escala, Tabla 7-17.

Tabla 7-17. Parámetros ajustados en la BE, AE y factores de escala, etapa de licuefacción.

Parámetro	Pest _i BE	Pest _i AE	ξ_i
h ₁	0,9014	0,9006	0,9991
h ₂	0,8939	0,2683	0,3001
h ₃	1,5224	0,5482	0,3601
h ₅	1,5185	0,5154	0,3394
p ₁	1,3229	0,7680	0,5805
p ₂	0,3846	0,0648	0,1685
p ₃	0,4999	4,9058	9,8136
p ₅	0,3690	2,9481	7,9894
q ₁	0,0893	0,0145	0,1624
q ₂	0,3435	0,0278	0,0809
q ₃	0,3133	0,0209	0,0667
q ₅	0,0117	0,0213	1,8205

Una vez calculados los ξ_i , se realiza la simulación del modelo con los valores de las variables de

diseño propuestas (Figura 7-35), se determina nuevamente los errores promedio, obteniendo 9,99 % para glucosa, 12,19 % para maltosa, 10,56 % para maltopentosa y 0,8448 % para la temperatura del reactor, lo cual presenta un mejor ajuste respecto a la BE y da idea como el aumento de la concentración de enzima, aumenta las concentraciones de glucosa y maltosa, permitiendo un ajuste más preciso.

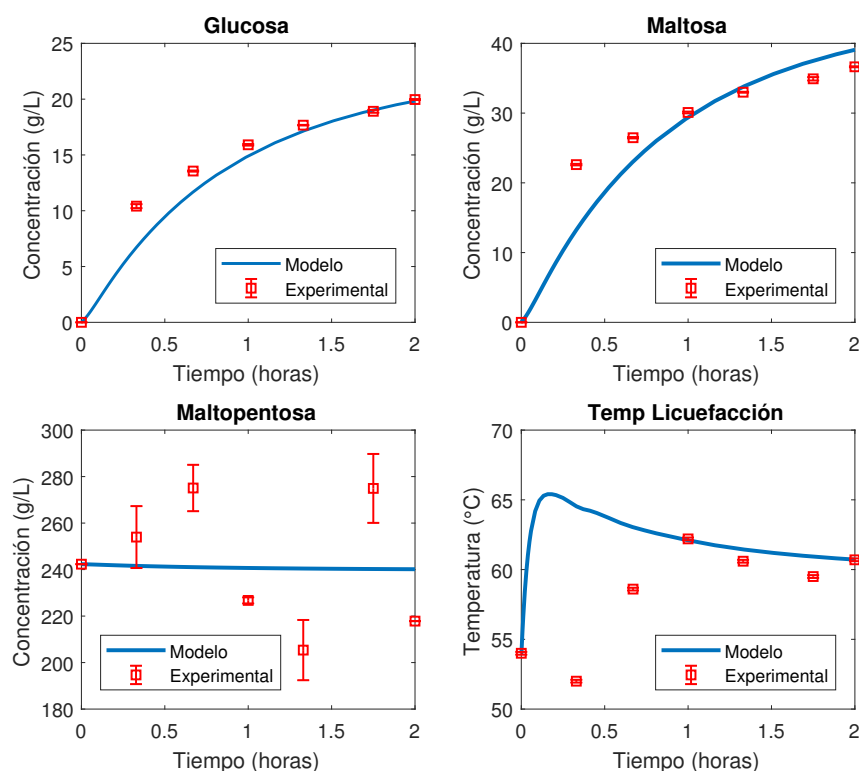


Figura 7-35. Simulación del modelo de hidrólisis enzimática para VdeC 4L con factores de escala, etapa de licuefacción con balance de energía en la AE.

Al igual que en la etapa de licuefacción, se realiza el ajuste de parámetros con los valores de las variables de diseño de la AE para la etapa de sacarificación, obteniendo errores promedio del 5,4846 % para la concentración de glucosa, 20,2675 % para la concentración de maltosa, 7,3918 % para la concentración de maltopentosa y 0,3646 % para la temperatura del sistema, a partir de los parámetros ajustados en la AE y asociándolos con los valores en la BE, se determinan los factores de escala, Tabla 7-18.

Tabla 7-18. Parámetros ajustados en la BE, AE y factores de escala, etapa de sacarificación.

Parámetro	Pest _i BE	Pest _i AE	ξ_i
K _s	$1,795 \times 10^{-4}$	0,0019	10,5797
K _{d2}	$1,6563 \times 10^{-4}$	0,0014	8,4526
K _I	0,0099	0,0100	1,0101
V0 _{mx2}	$3,0000 \times 10^{33}$	$3,0000 \times 10^{33}$	1,0000
V0 _{mx3}	$9,0010 \times 10^{33}$	$9,0010 \times 10^{33}$	1,0000
V0 _{mx5}	$9,0900 \times 10^{34}$	$9,0900e \times 10^{34}$	1,0000
Km ₁	0,0251	0,0249	0,9920
Km ₂	$7,6480 \times 10^{-5}$	0,0024	31,3808
Km ₃	$1,2224 \times 10^{-5}$	0,0095	77,7160
Km ₅	0,0011	0,0039	3,5455
K _{eq1}	23,9000	91,1225	3,8127
K _{eq2}	99,9818	89,6361	0,8965
K _{eq3}	0,0664	0,1544	2,3253
K _{eq5}	65,1547	10,5794	0,1624

Una vez son calculados los ξ_i , se realiza la simulación del modelo con los valores de las variables de diseño propuestas, Figura **7-36**, se determina nuevamente los errores promedio, obteniendo 5,2258 % para la concentración de glucosa, 20,2569 % para concentración de maltosa, 7,6246 % para la concentración de maltopentosa y 0,3821 % para la temperatura del sistema, permitiendo concluir al igual que en la etapa de licuefacción, como el aumento de escala genera un ajuste más preciso.

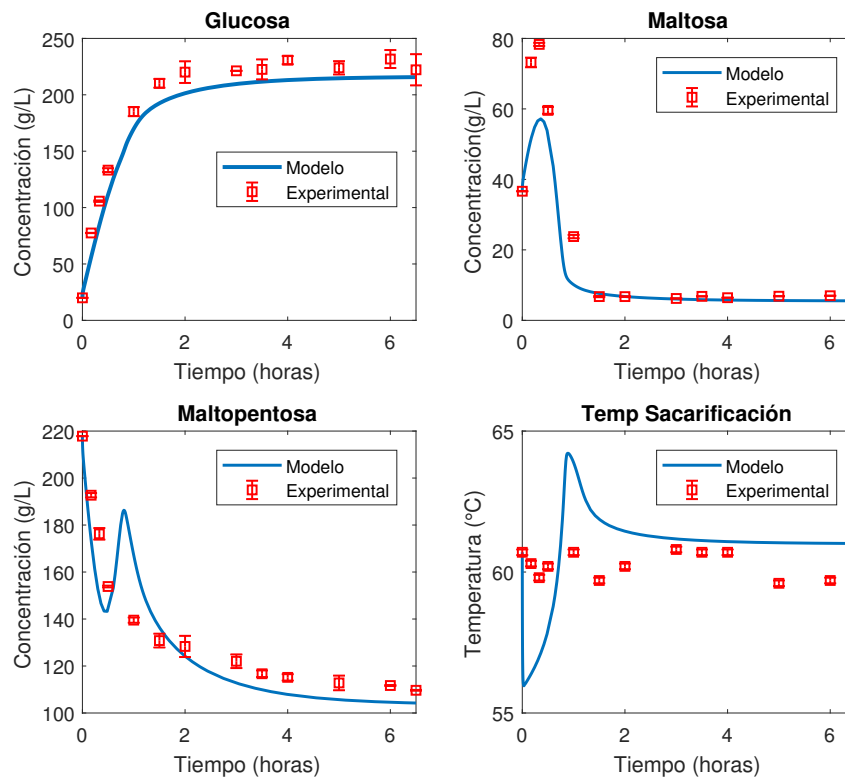


Figura 7-36. Simulación del modelo de hidrólisis enzimática para VdeC 4L con factores de escala, etapa de sacarificación con balance de energía en la AE.

En esta etapa, las variables de estado se ajustan satisfactoriamente, para la variable de estado maltopentosa se observa un pico en un tiempo de 0,6h, pero se asocia a un ruido obtenido desde el planteamiento del modelo, donde oligosacáridos como maltotriosa aumentan, pero luego se hidrolizan nuevamente, aun así, su error promedio es inferior al 10 %, otro aspecto interesante, es la dinámica de la temperatura del reactor, donde se observa, que el modelo busca ajustarse a la temperatura de operación logrando errores promedio inferiores al 1 %.

Finalmente, el objetivo es determinar los ξ_i es poder moverse libremente entre VdeC superiores a la propuesta como AE. si tomamos como ejemplo una VdeC de 5L y se mantienen las condiciones de la escala anterior 4L, los errores promedio asociados al modelo de licuefacción son inferiores al 28 % para todas sus variables de estado y errores promedio inferiores al 17 % para la etapa de sacarificación, es importante notar, que las condiciones iniciales de cada etapa, juegan un papel fundamental en el proceso y su nivel de detalle determinará una mejor aplicación de la metodología de escalado, lo que se traduce en conocimiento del proceso que se va a escalar.

7.7.8.4. Verificación de Regímenes de Operación

Una vez se determinan los ξ_i , se simula el proceso a las condiciones de diseño de la AE se procede a verificar el RdeO y RdeO* para ambas etapas. La Figura 7-37 y la Figura 7-38 presenta el $IEI_{glucosa}$, $IEI_{maltopentosa}$ y $IEI_{T_{reactor}}$ respecto al tiempo para cada una de las etapas de licuefacción y sacarificación, respectivamente.

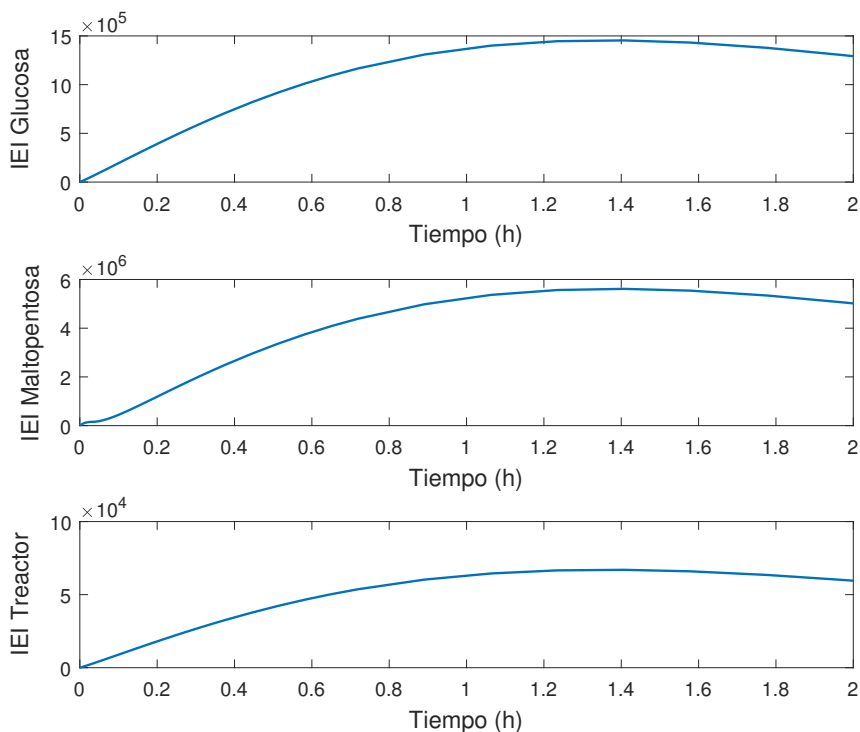


Figura 7-37. IEI diferenciados para las variables de estado glucosa, maltopentosa y $T_{reactor}$ etapa de licuefacción en la AE.

La jerarquía de las dinámicas para la etapa de licuefacción varían respecto a la BE, ahora la dinámica dominante es la de maltopentosa, luego glucosa y finalmente la temperatura del reactor, lo que permite concluir para el proceso, como al llegar a la AE, la dinámica de glucosa es menos impactada respecto a la BE, con lo cual se infiere como el modelo está generando una alta sensibilidad sobre la metodología de escalado, dado el impacto que tienen las variables de diseño.

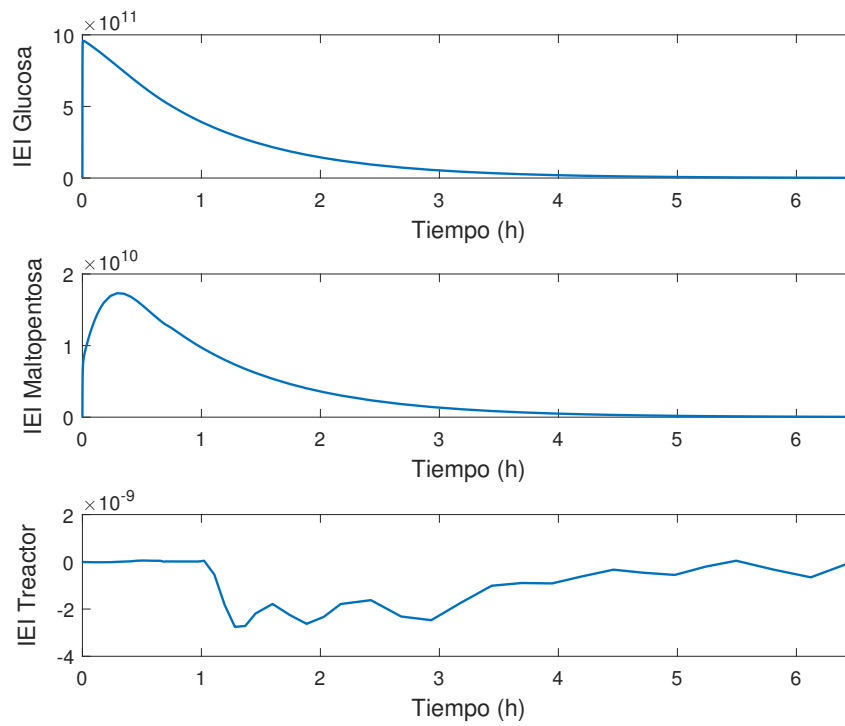


Figura 7-38. *IEI* diferenciados para las variables de estado glucosa, maltopentosa y $T_{reactor}$ etapa de sacarificación en la AE.

Para la etapa de sacarificación la jerarquía de las dinámicas se mantiene, estando el $IEI_{glucosa}$ en primer lugar, seguido del $IEI_{maltopentosa}$ en segundo lugar y finalmente $IEI_{Treactor}$. Se observa un aumento del $IEI_{Max,glucosa}$ desde un orden de magnitud de 1×10^9 hasta 1×10^{11} , el $IEI_{Max,maltopentosa}$ pasa de 1×10^8 hasta 1×10^9 , mientras el $IEI_{Max,Treactor}$ se mantiene en el mismo orden.

Con esto, se observa la sensibilidad del modelo, las variaciones significativas que sufre frente a cambios en las variables de diseño y como esto impacta fuertemente la jerarquía de las dinámicas de interés, hasta el punto de generar cambios en el $RdeO^*$ de las etapas analizadas, lo cual tiene sentido desde el punto de vista de la metodología aplicada, ya que estrictamente no se tienen que mantener los valores de la BE, tanto valores de las variables de diseño, como los órdenes de los regímenes de operación pueden variar, siempre manteniendo las jerarquías de las dinámicas.

7.8. Conclusiones

Una vez aplicada la metodología sobre ambas etapas existen algunos aspectos que se deben tener en cuenta. En la etapa de licuefacción para la BE se propuso como variables de diseño la concentración inicial de sustrato S_0 , la concentración inicial de enzima α -amilasa E_{01} y el volumen del reactor V_r , con sus valores correspondientes 161,4g/L, 0,0544mL α -amilasa/L $_{solución}$ y 3L. Para la AE una vez se aplicó la metodología se verificó la jerarquía de las dinámicas y se notó cambios respecto a la BE, siendo la dinámica dominante la concentración de maltopentosa, luego la concentración de glucosa y finalmente la temperatura del sistema.

Se obtuvieron valores de S_0 , E_{01} y V_r de 181g/L, 15,1mL α - amilasa/L $_{solución}$ y 4L, respectivamente. De esta forma se puede considerar que la selección de las variables de diseño S_0 y V_r son adecuadas para la etapa de licuefacción a las condiciones de proceso propuestas. Respecto a E_{01} , se puede considerar que las condiciones descritas en la etapa y llevadas a la metodología de escalado, sugieren implementar una mayor cantidad de enzima. Para realizar un análisis más detallado se aplicó la metodología desde una escala de 4L a 3L, obteniendo para la variable de diseño S_0 un valor de 138g/L pero la variable de diseño E_{01} sugiere utilizar valores superiores a los 541mL α -amilasa/L $_{solución}$, con lo cual, a las condiciones de proceso dadas y la influencia del ajuste de parámetros a los datos experimentales, la metodología siempre sugerirá un aumento de E_{01} .

Para la etapa de sacarificación, las variables de diseño propuestas son S_0 , E_{02} y V_r , al no depender directamente de S_0 y ser el mismo volumen, se limita a proponer valores de E_{02} en la BE de 0,26mL $_{AMG}$ /L $_{solución}$. Para la AE una vez se aplicó la metodología de escaldado se obtuvo un valor para E_{02} de 0,76mL $_{AMG}$ /L $_{solución}$, con lo cual al verificar la jerarquía de las dinámicas se mantuvo el orden esperado, siendo la dinámica dominante la concentración de glucosa, seguida de la concentración de maltopentosa y finalmente la temperatura del sistema.

Otro aspecto interesante es el mejoramiento del ajuste de los parámetros con los valores en la AE, sugiere que es conveniente aplicar la metodología con volúmenes en la BE superiores, así como una E_{01} superior a la usada, lo que permitirá una mayor robustez en la aplicación de la metodología en procesos de hidrólisis enzimática en ambas etapas.

8. Conclusiones y recomendaciones

En este trabajo se realizó el escalado de un proceso de hidrólisis enzimática de almidón de trigo para las etapas de licuefacción y sacarificación a partir de una metodología de escalado fundamentada en el MSBF del proceso y la aplicación de herramientas de teoría de control. Con el desarrollo experimental realizado y la metodología propuesta se buscó tener en cuenta cada detalle del proceso para tener una visión global de este y como es afectado por el cambio de escala. Lo que involucró, caracterización de materias primas, determinación de actividades enzimáticas, desactivación de enzimas y análisis de inhibición por producto y determinación de jerarquías entre las variables de estado, concentración de glucosa, concentración de maltopentosa y temperatura del sistema, adicional a esto, se propuso el uso de factores de escala que permitieran un escalado satisfactorio.

Los principales aportes de este trabajo a nivel de investigación, experimentación y desarrollo son:

- La caracterización de un almidón de trigo con un contenido de almidón cercano al 80 %, la determinación de la actividad enzimática de la α -amilasa comercial y la amiloglucosidasa comercial.
- Respecto a la etapa de gelatinización en el proceso de hidrólisis enzimática se logró evidenciar un efecto positivo sobre el almidón de trigo, al ser sometido a rampas de calentamiento durante un tiempo aproximado de 3h.
- Se lograron obtener metodologías para la inactivación enzimática por medio de temperatura y pH, siendo esta última más viable dado el tiempo que requiere.
- Se determinó como el almidón de trigo caracterizado al ser sometido a un proceso de hidrólisis enzimática no sufre efectos de inhibición por glucosa significativos, comparando un estándar de la hidrólisis, con otro, al que se adicionó un equivalente a 180g/L de glucosa.
- Se realizó una hidrólisis enzimática de almidón de trigo con volúmenes entre los 3L y 4L usando las enzimas α -amilasa comercial y la amiloglucosidasa comercial; con tiempos de proceso para la etapa de licuefacción de 2.0h y para la etapa de sacarificación 6.5h, logrando evidenciar los comportamientos esperados.

- Se tienen modelos semifísicos de base fenomenológica para la etapa de licuefacción y sacarificación, incluyendo en la cinética efectos de pH, temperatura, desactivación enzimática. También se presentan los balances de energía en cada etapa.
- Para la etapa de licuefacción con una relación E/S de 0.036 %p/p por 2h se obtuvieron concentraciones de 0.7g/L, 2.0g/L y 220g/L para glucosa, maltosa y maltopentosa y para la etapa de sacarificación con una relación E/S de 0.18 %p/p por un tiempo de 6.5h se obtuvieron concentraciones de 180g/L, 3g/L, 100g/L para glucosa, maltosa y maltopentosa.
- Se realizó la simulación de las etapas de licuefacción y sacarificación, un ajuste de parámetros en ambas etapas, se realizaron cinéticas a 3L y 4L según lo arrojado por la metodología de escalado y se estableció el concepto de régimen de operación crítico ($RdeO^*$), índice de estado impactable máximo (IEI_{Max}) y factores de escala (ξ_i).
- La metodología de escalado recomienda mantener como variables de diseño V_r , E_{02} y S_0 en la etapa de sacarificación para lograr como régimen de operación una dominancia de la variable de estado glucosa.
- La aplicación de la metodología de escalado sobre la hidrólisis enzimática de almidón de trigo, para la etapa de licuefacción sugiere un régimen de operación de acuerdo con la tendencia del proceso, se recomienda el uso de un conjunto de variables de diseño diferentes al propuesto o diferentes valores de estas.

Algunas de las limitaciones del trabajo son:

- La dificultad del proceso experimental al cuantificar la variable de estado maltopentosa, dado que su estándar asociaba oligosacáridos con grado de polimerización desde 3 hasta 7, lo que genera ruido en su modelado y escalado de igual forma la imposibilidad del medio dada su alta viscosidad para medir los componentes de interés en el tiempo inicial del proceso.
- La limitación en información de los parámetros y variables de los modelos propuestos para la hidrólisis enzimática de almidón de trigo, lo que dificulta la limitación de estas en el ajuste de parámetros a los datos experimentales.

Respecto a los objetivos propuestos, se concluye:

Objetivo general:

Plantear el escalado para la producción de jarabes de glucosa a partir de hidrólisis enzimática de materiales amiláceos aplicando la simulación del proceso y elementos de teoría de control.

Para realizar el escalado de procesos de hidrólisis enzimática, en el Capítulo 2 se realizó un análisis de los diferentes materiales amiláceos existentes, en el Capítulo 3 se realizó una revisión de la hidrólisis enzimática de materiales amiláceos y una vez se alcanzada la comprensión del proceso, en el Capítulo 4 se realizó una revisión de los conceptos de modelado, simulación y las diferentes metodologías de escalado, luego, en el Capítulo 5 se realizó una contextualización del análisis dinámico de procesos con lo que finalmente en el Capítulo 6 se propuso una metodología de escalado de procesos usando simulación de modelos y herramientas de teoría de control, incluyendo el análisis del RdeO* y la propuesta de factores de escala.

Objetivos específicos:

1. Proponer un modelo semifísico de base fenomenológica (MSBF) para el proceso de hidrólisis enzimática en la etapa de sacarificación.

En el Capítulo 4, Sección 4.2 se propuso un mecanismo de reacción para el proceso de hidrólisis enzimática y en el Capítulo 7, Sección 7.7.2 se realizó en planteamiento del MSBF para la hidrólisis enzimática de almidón de trigo en las etapas de licuefacción y sacarificación, incluyendo balance de energía y efectos medio ambientales como pH, temperatura y desactivación enzimática.

2. Realizar el proceso de hidrólisis enzimática para un material amiláceo al volumen de la escala de laboratorio a partir del cual se va a escalar.

En el Capítulo 7 las Secciones 7.1, 7.2 y 7.3, se realizaron procesos experimentales necesarios para el proceso de hidrólisis enzimática de almidón de trigo, partiendo desde la caracterización de la materia prima, hasta la determinación de la actividad enzimática y su contenido proteico. En la Sección 7.4 se realizó la cinética de hidrólisis enzimática de almidón de trigo, centrándose en las etapas, gelatinización, licuefacción y sacarificación, se discutió algunos aspectos a tener en cuenta en este tipo de procesos, finalmente en las Secciones 7.5 y 7.6 se analizaron metodologías de desactivación enzimática e inhibiciones por producto.

3. Realizar escalado de valores de baja escala a alta escala aplicando la metodología de escalado propuesta para la etapa de sacarificación.

En el Capítulo 7 a partir de la Sección 7.7 se desarrolla toda la metodología sobre el proceso de hidrólisis enzimática de almidón de trigo. Se inició con la especificación del proceso y tarea de escalado, planteamiento del MSBF para las etapas de licuefacción

y sacarificación, luego se realizó el ajuste de parámetros a los datos experimentales, posteriormente, se propuso una matriz de Hankel y SVD, lo que permitió la jerarquización de las variables de estado concentración de glucosa, maltopentosa y temperatura del reactor, todo para ambas etapas, esto llevo a al ajuste del IEI_{real} con el análisis del $RdeO^*$, lo que finalmente llevo a la determinación de una nueva matriz de Hankel y escalado entre BE y AE.

Como trabajos a futuro se propone:

- Realizar un análisis de identificabilidad de modelos y sensibilidad de parámetros como refinamiento de la metodología de escalado propuesta.
- Implementación en la metodología de escalado de un modelo heterogéneo que permita ver en detalle muchos otros cambios en el proceso e incluir efectos por variación de la densidad y viscosidad del medio.
- Realizar un análisis de la relación E/S usada en la etapa de licuefacción, ya que se sugiere que el la metodología puede dar indicios de que se requieren valores mayores para la obtención de mejores resultados.
- Realizar el escalado desde una BE hasta una AE mayor a la propuesta, que permita a partir del conocimiento adquirido en las escalas trabajadas un desarrollo adecuado de la metodología.

A. Anexo: Herramienta para el escalado de procesos aplicando teoría de control

A continuación se presenta una secuencia de subrutinas, cada una de ellas con su respectivo código (COD), que permiten la solución del escalado de procesos aplicando herramientas de teoría de control. De manera específica se presenta aplicada a procesos de hidrólisis enzimática de materiales amiláceos en la etapa de licuefacción, Figura A, pero su aplicación puede darse sobre cualquier proceso.

DatosExperimentalesLic Se introducen los datos obtenidos a partir de la experimentación, específicamente el tiempo (*TiempoLicuefaccion*) y las concentraciones de glucosa (*CexpGlucosa*), maltosa (*CexpMaltosa*), maltopentosa (*CexpMaltodex*) y temperatura del reactor (*TempLic*), con sus respectivas desviaciones estándares, *DesvestGlu*, *DesvestMalto*, *DesvestMaltodex*, *DesvestTempLic*, dado que cada una de estas variables se maneja de manera vectorial, todos deben presentar la misma magnitud, en caso de necesitar uno en particular se debe especificar un nuevo vector de tiempo, es decir, si la variable maltosa presenta una magnitud diferente se debe hablar de (*TiempoMaltosa*, *CexpMaltosa*). Esto permite tener una mirada general a los datos experimentales del proceso.

SimulaciónLicuefacciónAjuste-fmin COD:00L Se introducen los datos experimentales previamente analizados, Al igual que todos los parámetros y constantes, se especifican las condiciones iniciales para las cada una de las variables de estado y variables de diseño.

Para realizar el ajuste parámetros, se introducen cada uno de los valores semilla de la forma $W_0(i) = \text{valorsemilla}$, en este punto también se pueden especificar restricciones para los parámetros sea un valor superior (*up*) o un valor inferior (*lb*), esto juega un papel importante, dado que algunos de los parámetros a estimar presentan un sentido físico. Una vez indicadas estas opciones se introduce el modelo en la función *Liquefaccion* tanto ecuaciones diferenciales como ecuaciones constitutivas, como resultado se obtiene el vector W con los valores estimados de los parámetros de interés, también permite observar los errores respecto a cada punto experimental y el error promedio para cada variables de estado.

Simulación Licuefaccion COD:01L Aquí se introducen los valores estimados, las ecuaciones constitutivas y ecuaciones diferenciales del modelo, junto con sus respectivas condiciones iniciales, lo que permite su análisis y uso de esta subrutina como plantilla para los siguientes pasos.

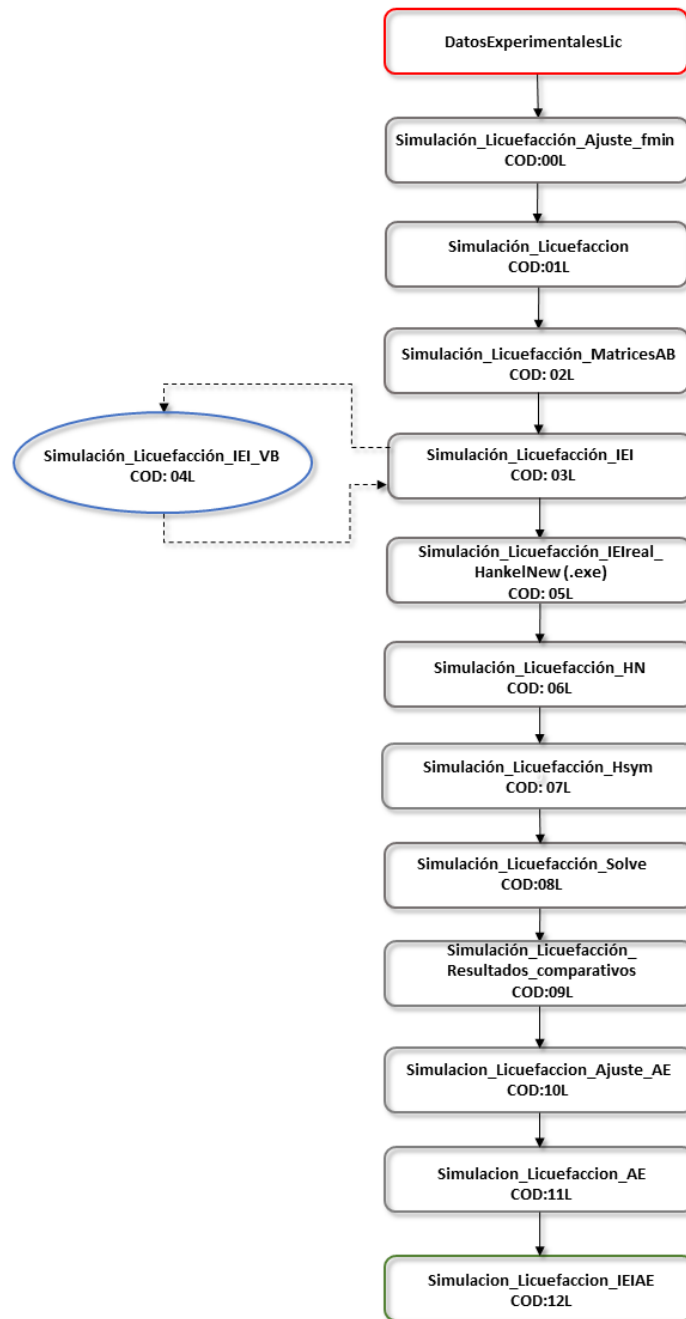


Figura A-1. Secuencia de subrutinas para el escalado de procesos usando herramientas de teoría de control.

Simulación Licuefacción Matrices AB COD: 02L Se definen los parámetros, variables y constantes del modelo de manera simbólica (*syms*), se usa el modelo, ecuaciones constitutivas y se realiza la diferenciación parcial de las ecuaciones diferenciales del modelo respecto a las demás variables de estado y variables de diseño, por ejemplo, si se desea realizar la diferenciación parcial de la variable de estado maltosa, respecto a la de glucosa, se escribe de la forma $\frac{dL_2}{dL_1} = \text{diff}\left(\frac{dL_2}{dt}, L_1\right)$, luego, se construyen las matrices A y B de acuerdo al orden n del sistema, recordando que las matrices A, B y C son las matrices del sistema, control y salidas respectivamente, la matriz A se puede determinar por diferenciación parcial respecto a las variables de estado, la matriz B respecto a las variables de diseño y C asumiendo que por cada variable de estado analizada existe una salida, por ejemplo para un sistema de orden 3, se tienen:

$$A_3 = \begin{bmatrix} \frac{dL_1}{dL_1} & \frac{dL_1}{dL_5} & \frac{dL_1}{dT_{rL}} \\ \frac{dL_5}{dL_1} & \frac{dL_5}{dL_5} & \frac{dL_5}{dT_{rL}} \\ \frac{dT_{rL}}{dL_1} & \frac{dT_{rL}}{dL_5} & \frac{dT_{rL}}{dT_{rL}} \end{bmatrix} \quad B_3 = \begin{bmatrix} \frac{dL_1}{dE_{01}} & \frac{dL_1}{dV_r} & \frac{dL_1}{dS_0} \\ \frac{dL_5}{dE_{01}} & \frac{dL_5}{dV_r} & \frac{dL_5}{dS_0} \\ \frac{dT_{rL}}{dE_{01}} & \frac{dT_{rL}}{dV_r} & \frac{dT_{rL}}{dS_0} \end{bmatrix} \quad C_3 = \begin{bmatrix} 1 & 0 & 0 \\ 0 & 1 & 0 \\ 0 & 0 & 1 \end{bmatrix}$$

Simulación Licuefacción IEI COD: 03L Presenta el cálculo del índice de estado impactable para el sistema, se ingresan los parámetros, variables y constantes junto con las ecuaciones constitutivas y diferenciales del modelo con sus respectivas condiciones iniciales, dentro de la función *Liquefaccion* se ingresan las matrices A, B y C propuestas en el paso anterior, indicando el número de estados y salidas del sistema, como respuesta se obtienen los IEI del sistema en función del tiempo para cada una de las variables de estado.

Simulación Licuefacción IEI_{VB} COD: 04L Aquí se observa el IEI en función de la VdeC al cual se desea llegar. Se debe especificar el valor de la VdeC_{BE}, el $\Delta VdeC$ y en valor de la VdeC_{AE}, también presenta la variación a la salida de las variables de estado con el cambio de la VdeC entra la AE y BE.

Simulación Licuefacción IEIrealHankelNew(.exe) COD: 05L Una vez definidos VdeC_{BE}, el $\Delta VdeC$ y en valor de la VdeC_{AE}, para la variable de estado de interés, se seleccionan los máximos IEI, (**Max IEI C_{glucosa}**) con su respectivo tiempo, a medida que se varía entre la alta y baja escala, con los datos obtenidos se selecciona una ecuación que represente Max IEI real con un R^2 y R^2_{Ajust} adecuado, se toma el dato promedio del tiempo para el **Max IEI C_{glucosa}** se introducen los componentes de S_{ii} y U_{ii} , correspondientes a las matrices en ese tiempo promedio y se obtienen los valores de S_{est} con los que se construye la matriz S_{est} para la VdeC_{EA}.

Simulación Licuefacción HN COD: 06L Ingresando la matriz S_{est} y las componentes de las Matrices U y V de acuerdo al orden del sistema se obtiene la nueva matriz de Hankel

(Hankel_{New}) para la EA.

SimulaciónLicuefacciónHsym COD: 07L Se deben definir de manera simbólica las variables de diseño a estimar en la AE, se ingresan todos parámetros y valores de las variables de estado en el tiempo promedio determinado anteriormente, se introducen las matrices A, B y C, además se introduce la matriz Hankel_{New} , y se toman las componentes de las matrices que se desea igualar.

SimulaciónLicuefacciónSolve COD:08L Con las componentes igualadas de la matriz de Hankel en la BE y AE, se usa la opción solve para igualar y despejar la variable de interés, por ejemplo, si la componente $H_{(1,3)}BE = 0$ y en $H_{(1,3)}AE = S_0 - 1524E_{01}$, y se desea dejar E_{01} en función de S_0 se expresa como $H_{(1,3)}E_{01} = \text{solve}(0 = -1524E_{01}, E_{01})$, lo que permite obtener el valor o expresiones para las variables de diseño de interés.

SimulaciónLicuefacciónResultadoscomparativos COD:09L finalmente, si se tienen expresiones matemáticas para unas variables de diseño en función de otras, se almacenan en esta rutina, y una vez se complete el análisis, se proponen valores y se resuelven las expresiones, de modo que se obtienen todos los valores de diseño en la AE.

SimulaciónLicuefacciónAjusteAE COD:10L Esta rutina permite realizar el nuevo ajuste del modelo con los valores de las variables de diseño en la AE y extraer los Pest_i para la AE. Este paso solo se usa para un primer escalado, con posteriores aumentos de la VdeC solo se deben relacionar los parámetros estimados por primera vez con los factores de escala.

SimulaciónLicuefacciónAE COD:11L Permite una vez encontrados los Pest_i para la AE, determinar los factores de escala (ξ_i) y junto con las variables de diseño en la AE, se dará el resultado final de la simulación.

SimulaciónLicuefacciónAE COD:12L Permite determinar el IEI para las dinámicas de interés en la AE.

B. Anexo:Componentes de la matriz de Hankel

Se presenta la primer fila de la matriz de Hankel en la etapa de licuefacción, lo que corresponde submatriz de orden 1x9, se definen 37 nuevas variables σ , para la simplificación de las componentes de la submatriz, esta simplificación es propuestas por la herramienta *mupad* de MATLAB[®].

$$\begin{aligned}
 H1, i = & \left[\left[\frac{\sigma_{17}}{\sigma_{27}}, 0, \sigma_6, \frac{1000 \text{ Drxn } \sigma_{11} \sigma_5}{\text{cpr rhor}} + \frac{E01 \sigma_{13} \sigma_{14} (\text{Tmax} - \text{TrL})^2 (\text{Tmin} - \text{TrL})^4 (\text{pH1} - \text{pHmin})^2 (\text{pH1} - \text{pHmax})^2 \sigma_{35}}{\sigma_{12}} \right. \right. \\
 & + \frac{E01 \sigma_{13} (q1 - \frac{p1}{s0}) (q5 - \frac{p5}{s0}) (\text{Tmax} - \text{TrL})^2 (\text{Tmin} - \text{TrL})^4 (\text{pH1} - \text{pHmin})^2 (\text{pH1} - \text{pHmax})^2 \sigma_{32}}{\sigma_{12}}, \\
 & \frac{1000 \text{ Ai Ur } (\text{Tc0} - \text{TrL}) \sigma_{11}}{\sigma_1}, \frac{1000 \text{ Drxn } \sigma_{11} \sigma_4}{\text{cpr rhor}} + \frac{E01 e^{-Kd1 t} \sigma_6 (q1 - \frac{p1}{s0}) (\text{Tmax} - \text{TrL}) (\text{Tmin} - \text{TrL})^2 (\text{pH1} - \text{pHmin}) (\text{pH1} - \text{pHmax})}{\sigma_{27}} \\
 & + \frac{E01 e^{-Kd1 t} \sigma_7 (q1 - \frac{p1}{s0}) (\text{Tmax} - \text{TrL}) (\text{Tmin} - \text{TrL})^2 (\text{pH1} - \text{pHmin}) (\text{pH1} - \text{pHmax})}{\sigma_{27}}, \frac{1000 \text{ Drxn } \sigma_2 \sigma_5}{\text{cpr rhor}} \\
 & + \frac{e^{-Kd1 t} (q1 - \frac{p1}{s0}) (\text{Tmax} - \text{TrL}) (\text{Tmin} - \text{TrL})^2 (\text{pH1} - \text{pHmin}) (\text{pH1} - \text{pHmax}) \sigma_3 \sigma_{35}}{\sigma_{27}} \\
 & \left. \left. + \frac{e^{-Kd1 t} (q5 - \frac{p5}{s0}) (\text{Tmax} - \text{TrL}) (\text{Tmin} - \text{TrL})^2 (\text{pH1} - \text{pHmin}) (\text{pH1} - \text{pHmax}) \sigma_3 \sigma_{32}}{\sigma_{27}}, \frac{1000 \text{ Ai Ur } (\text{Tc0} - \text{TrL}) \sigma_2}{\sigma_1}, \sigma_6 \sigma_3 + \sigma_7 \sigma_3 + \frac{1000 \text{ Drxn } \sigma_2 \sigma_4}{\text{cpr rhor}} \right] \right]
 \end{aligned}$$

Figura B-1. Submatriz de 1x9 (primer fila de la matriz de Hankel).

Variables definidas:

$$\sigma_1 = Vr^2 \text{ cpr rhor}$$

$$\begin{aligned} \sigma_2 = & \left(\left(1000 \text{ Drxn} \left(\frac{\sigma_{30}}{\sigma_{21}} + \frac{E01 e^{-Kd1 t} (q2 - \frac{p2}{S0}) (Tmin - TrL)^2 (pH1 - pHmin) (pH1 - pHmax) \sigma_{16}}{\sigma_{20}} \right. \right. \right. \\ & + \frac{E01 e^{-Kd1 t} (q3 - \frac{p3}{S0}) (Tmin - TrL)^2 (pH1 - pHmin) (pH1 - pHmax) \sigma_{15}}{\sigma_{19}} + \frac{\sigma_{10}}{\sigma_{18}} + \frac{\sigma_{29}}{\sigma_{21}} + \frac{E01 e^{-Kd1 t} (q2 - \frac{p2}{S0}) (Tmax - TrL) (pH1 - pHmin) (pH1 - pHmax) \sigma_{34} \sigma_{16}}{\sigma_{20}} \\ & + \frac{E01 e^{-Kd1 t} (q3 - \frac{p3}{S0}) (Tmax - TrL) (pH1 - pHmin) (pH1 - pHmax) \sigma_{34} \sigma_{15}}{\sigma_{19}} + \frac{\sigma_9}{\sigma_{18}} - \frac{\sigma_{28}}{\text{pm1 } \sigma_{37}^2 \sigma_{36} (Tmin - Topt)} \\ & - \frac{E01 e^{-Kd1 t} (q2 - \frac{p2}{S0}) (Tmax - TrL) (Tmin - TrL)^2 (pH1 - pHmin) (pH1 - pHmax) \sigma_{33} \sigma_{16}}{\text{pm2 } \sigma_{37}^2 \sigma_{36} (Tmin - Topt)} \\ & \left. \left. \left. - \frac{E01 e^{-Kd1 t} (q3 - \frac{p3}{S0}) (Tmax - TrL) (Tmin - TrL)^2 (pH1 - pHmin) (pH1 - pHmax) \sigma_{33} \sigma_{15}}{\text{pm3 } \sigma_{37}^2 \sigma_{36} (Tmin - Topt)} - \frac{\sigma_8}{\text{pm5 } \sigma_{37}^2 \sigma_{36} (Tmin - Topt)} \right) \right) \right) / \left(\text{cpr rhor} - \frac{1000 \text{ Ai Ur}}{Vr \text{ cpr rhor}} \right) \sigma_{11} \\ & + \frac{E01 e^{-Kd1 t} (q1 - \frac{p1}{S0}) (Tmax - TrL) (Tmin - TrL)^2 (pH1 - pHmin) (pH1 - pHmax) \sigma_{11}}{\sigma_{27}} \\ & + \frac{E01 e^{-Kd1 t} (q1 - \frac{p1}{S0}) (Tmax - TrL) (Tmin - TrL)^2 (pH1 - pHmin) (pH1 - pHmax) \left(\frac{\sigma_{10}}{\sigma_{27}} + \frac{\sigma_9}{\sigma_{27}} - \frac{\sigma_8}{\sigma_{31}} \right)}{\sigma_{27}} \\ \sigma_3 = & \left(1000 \text{ Drxn} \sigma_{11} \left(\frac{E01 e^{-Kd1 t} (q1 - \frac{p1}{S0}) (Tmax - TrL) (Tmin - TrL)^2 (pH1 - pHmin) (pH1 - pHmax)}{\sigma_{21}} \right. \right. \\ & + \frac{E01 e^{-Kd1 t} (q2 - \frac{p2}{S0}) (Tmax - TrL) (Tmin - TrL)^2 (pH1 - pHmin) (pH1 - pHmax)}{\sigma_{20}} + \frac{E01 e^{-Kd1 t} (q3 - \frac{p3}{S0}) (Tmax - TrL) (Tmin - TrL)^2 (pH1 - pHmin) (pH1 - pHmax)}{\sigma_{19}} \\ & \left. \left. + \frac{E01 e^{-Kd1 t} (q5 - \frac{p5}{S0}) (Tmax - TrL) (Tmin - TrL)^2 (pH1 - pHmin) (pH1 - pHmax)}{\sigma_{18}} \right) \right) / \left(\text{cpr rhor} \right) \\ & + \frac{E01^2 \sigma_{13} \sigma_{14} (Tmax - TrL)^2 (Tmin - TrL)^4 (pH1 - pHmin)^2 (pH1 - pHmax)^2}{\sigma_{12}} \\ & + \frac{E01^2 \sigma_{13} (q1 - \frac{p1}{S0}) (q5 - \frac{p5}{S0}) (Tmax - TrL)^2 (Tmin - TrL)^4 (pH1 - pHmin)^2 (pH1 - pHmax)^2}{\sigma_{12}} \\ \sigma_4 = & \frac{\sigma_{22}}{\sigma_{21}} + \frac{E01 e^{-Kd1 t} (q2 - \frac{p2}{S0}) (Tmax - TrL) (Tmin - TrL)^2 (pH1 - pHmin) (pH1 - pHmax) (h2 - 1)}{\sigma_{20}} \\ & + \frac{E01 e^{-Kd1 t} (q3 - \frac{p3}{S0}) (Tmax - TrL) (Tmin - TrL)^2 (pH1 - pHmin) (pH1 - pHmax) (h3 - 1)}{\sigma_{19}} + \frac{\sigma_{24}}{\sigma_{18}} + \frac{\sigma_{23}}{S0^2 \text{ pm1 } \sigma_{37} \sigma_{36} (Tmin - Topt)} \\ & + \frac{E01 \text{ p2 } e^{-Kd1 t} (Tmax - TrL) (Tmin - TrL)^2 (pH1 - pHmin) (pH1 - pHmax) \sigma_{16}}{S0^2 \text{ pm2 } \sigma_{37} \sigma_{36} (Tmin - Topt)} + \frac{E01 \text{ p3 } e^{-Kd1 t} (Tmax - TrL) (Tmin - TrL)^2 (pH1 - pHmin) (pH1 - pHmax) \sigma_{15}}{S0^2 \text{ pm3 } \sigma_{37} \sigma_{36} (Tmin - Topt)} \\ & + \frac{\sigma_{25}}{S0^2 \text{ pm5 } \sigma_{37} \sigma_{36} (Tmin - Topt)} \end{aligned}$$

$$\sigma_5 = \frac{\sigma_{17}}{\sigma_{21}} + \frac{e^{-Kd1 t} (q2 - \frac{p2}{S0}) (Tmax - TrL) (Tmin - TrL)^2 (pH1 - pHmin) (pH1 - pHmax) \sigma_{16}}{\sigma_{20}}$$

$$+ \frac{e^{-Kd1 t} (q3 - \frac{p3}{S0}) (Tmax - TrL) (Tmin - TrL)^2 (pH1 - pHmin) (pH1 - pHmax) \sigma_{15}}{\sigma_{19}} + \frac{e^{-Kd1 t} (q5 - \frac{p5}{S0}) (Tmax - TrL) (Tmin - TrL)^2 (pH1 - pHmin) (pH1 - pHmax) \sigma_{32}}{\sigma_{18}}$$

$$\sigma_6 = \frac{\sigma_{22}}{\sigma_{27}} + \frac{\sigma_{23}}{\sigma_{26}}$$

$$\sigma_7 = \frac{\sigma_{24}}{\sigma_{27}} + \frac{\sigma_{25}}{\sigma_{26}}$$

$$\sigma_8 = E01 e^{-Kd1 t} (q5 - \frac{p5}{S0}) (Tmax - TrL) (Tmin - TrL)^2 (pH1 - pHmin) (pH1 - pHmax) \sigma_{33} \sigma_{32}$$

$$\sigma_9 = E01 e^{-Kd1 t} (q5 - \frac{p5}{S0}) (Tmax - TrL) (pH1 - pHmin) (pH1 - pHmax) \sigma_{34} \sigma_{32}$$

$$\sigma_{10} = E01 e^{-Kd1 t} (q5 - \frac{p5}{S0}) (Tmin - TrL)^2 (pH1 - pHmin) (pH1 - pHmax) \sigma_{32}$$

$$\sigma_{11} = \frac{\sigma_{30}}{\sigma_{27}} + \frac{\sigma_{29}}{\sigma_{27}} - \frac{\sigma_{28}}{\sigma_{31}}$$

$$\sigma_{12} = \sigma_{37}^2 \sigma_{36}^2 (Tmin - Topt)^2$$

$$\sigma_{13} = e^{-2 Kd1 t}$$

$$\sigma_{14} = (q1 - \frac{p1}{S0})^2$$

$$\sigma_{15} = L1 + L2 + L3 + L5 - S0 + S0 h3$$

$$\sigma_{16} = L1 + L2 + L3 + L5 - S0 + S0 h2$$

$$\sigma_{17} = e^{-Kd1 t} (q1 - \frac{p1}{S0}) (Tmax - TrL) (Tmin - TrL)^2 (pH1 - pHmin) (pH1 - pHmax) \sigma_{35}$$

$$\sigma_{18} = pm5 \sigma_{37} \sigma_{36} (Tmin - Topt)$$

$$\sigma_{19} = pm3 \sigma_{37} \sigma_{36} (Tmin - Topt)$$

$$\sigma_{20} = pm2 \sigma_{37} \sigma_{36} (Tmin - Topt)$$

$$\sigma_{21} = pm1 \sigma_{37} \sigma_{36} (Tmin - Topt)$$

$$\sigma_{22} = E01 e^{-Kd1 t} (q1 - \frac{p1}{S0}) (Tmax - TrL) (Tmin - TrL)^2 (pH1 - pHmin) (pH1 - pHmax) (h1 - 1)$$

$$\sigma_{22} = E01 e^{-Kd1 t} \left(q1 - \frac{p1}{S0}\right) (Tmax - TrL) (Tmin - TrL)^2 (pH1 - pHmin) (pH1 - pHmax) (h1 - 1)$$

$$\sigma_{23} = E01 p1 e^{-Kd1 t} (Tmax - TrL) (Tmin - TrL)^2 (pH1 - pHmin) (pH1 - pHmax) \sigma_{35}$$

$$\sigma_{24} = E01 e^{-Kd1 t} \left(q5 - \frac{p5}{S0}\right) (Tmax - TrL) (Tmin - TrL)^2 (pH1 - pHmin) (pH1 - pHmax) (h5 - 1)$$

$$\sigma_{25} = E01 p5 e^{-Kd1 t} (Tmax - TrL) (Tmin - TrL)^2 (pH1 - pHmin) (pH1 - pHmax) \sigma_{32}$$

$$\sigma_{26} = S0^2 \sigma_{37} \sigma_{36} (Tmin - Topt)$$

$$\sigma_{27} = \sigma_{37} \sigma_{36} (Tmin - Topt)$$

$$\sigma_{28} = E01 e^{-Kd1 t} \left(q1 - \frac{p1}{S0}\right) (Tmax - TrL) (Tmin - TrL)^2 (pH1 - pHmin) (pH1 - pHmax) \sigma_{33} \sigma_{35}$$

$$\sigma_{29} = E01 e^{-Kd1 t} \left(q1 - \frac{p1}{S0}\right) (Tmax - TrL) (pH1 - pHmin) (pH1 - pHmax) \sigma_{34} \sigma_{35}$$

$$\sigma_{30} = E01 e^{-Kd1 t} \left(q1 - \frac{p1}{S0}\right) (Tmin - TrL)^2 (pH1 - pHmin) (pH1 - pHmax) \sigma_{35}$$

$$\sigma_{31} = \sigma_{37}^2 \sigma_{36} (Tmin - Topt)$$

$$\sigma_{32} = L1 + L2 + L3 + L5 - S0 + S0 h5$$

$$\sigma_{33} = 2 Tmax + Tmin - 3 Topt$$

$$\sigma_{34} = 2 Tmin - 2 TrL$$

$$\sigma_{35} = L1 + L2 + L3 + L5 - S0 + S0 h1$$

$$\sigma_{36} = (pH1 - pHmin) (pH1 - pHmax) - (pH1 - pHopt)^2$$

$$\sigma_{37} = (Tmin - Topt) (Topt - TrL) + (Tmax - Topt) (Tmin + Topt - 2 TrL)$$

Figura B-2. Definición de variables sigma para la submatriz de Hankel.

Bibliografía

- Agama-Acevedo, E., Juárez-García, E., Evangelista-Lozano, S., Rosales-Reynoso, O. L., and Bello-Pérez, L. A. (2013). Characteristics of maize starch and relationship with its biosynthesis enzymes. *Agrociencia*, 47:1–12.
- Allan, M. C., Rajwa, B., and Mauer, L. J. (2018). Effects of sugars and sugar alcohols on the gelatinization temperature of wheat starch. *Food Hydrocolloids*, 84(June):593–607.
- Alvarez, H., Lamanna, R., Vega, P., and Revollar, S. (2009). Metodología para la Obtención de Modelos Semifísicos de Base Fenomenológica Aplicada a una Sulfitadora de Jugo de Caña de Azúcar. *Revista Iberoamericana de Automática e Informática Industrial RIAI*, 6(3):10–20.
- Anaya-durand, A. and Pedroza-flores, H. (2008). Scaling-up , the art of chemical engineering : Pilot plants , the step between the egg and the hen. *Tecnología, Ciencia, Educación*, 23(1):31–39.
- Ao, Z. and Jane, J.-I. (2007). Characterization and modeling of the A- and B-granule starches of wheat , triticale , and barley. *Carbohydrate Polymers*, 67:46–55.
- Apar, D. K. and Özbek, B. (2004). α -Amylase inactivation by temperature during starch hydrolysis. *Process Biochemistry*, 39:1137–1144.
- Arias, W. A. A., Pineda, J. C., and Alzate, C. A. C. Análisis comparativo de diferentes materias primas amiláceas para la obtención de alcohol carburante. page 10, Manizales-Colombia. Memorias del congreso colombiano de ingenieros químico ISSN: 1692 – 925X.
- Astiasarán Anchia, I. and Martínez Hernández, A. J. (2003). *Alimentos Composición y Propiedades*. Pamplona: McGraw Hill.
- Baks, T., Kappen, F. H. J., Janssen, A. E. M., and Boom, R. M. (2008). Towards an optimal process for gelatinisation and hydrolysis of highly concentrated starch – water mixtures with alpha -amylase from *B. licheniformis*. *Journal of Cereal Science*, 47:214–225.
- Bashir, K. and Aggarwal, M. (2017). Physicochemical, thermal and functional properties of gamma irradiated chickpea starch. *International Journal of Biological Macromolecules*, 97:426–433.

- Basmadjian, D. (1999). *The Art of Modeling in Science and Engineering*. New York: CRC Press LLC.
- Beschkov, V., Marc, A., and Engasser, J. (1983). A Kinetic Model for the Hydrolysis and Synthesis of Maltose, Isomaltose, and Maltotriose by Glucoamylase. *Biotechnology and Bioengineering*, 6:0–4.
- Betiku, E., Akindolani, O. O., and Ismaila, A. R. (2013). Enzymatic hydrolysis optimization of sweet potato (*ipomoea batatas*) peel using a statistical approach. *Journal, Brazilian*, 30(03):467–476.
- Bisio, A. and Kabel, R. L. (1985). *Scaleup of Chemical Processes: Conversion from Laboratory Scale Tests to Successful Commercial Size Design*. New York: John Wiley & Sons.
- Bravo Rodríguez, V., Jurado Alameda, E., Martínez Gallegos, J. F., Reyes Requena, a., and García López, a. I. (2006). Enzymatic hydrolysis of soluble starch with an alpha-amylase from *Bacillus licheniformis*. *Biotechnology progress*, 22(3):718–722.
- Casablancas, F. G. and Santin, J. L. (1998). *Ingeniería bioquímica*. Madrid: Editorial Síntesis.
- Chung, H.-j. and Liu, Q. (2009). Impact of molecular structure of amylopectin and amylose on amylose chain association during cooling. *Carbohydrate Polymers*, 77(4):807–815.
- Cinelli, B. A. (2012). *Produção de etanol a partir da fermentação simultânea à hidrólise do amido granular de resíduo agroindustrial*. Tesis de Maestría. Universidade Federal Do Rio De Janeiro, Brasil.
- Collares, R. M., Miklasevicius, L. V. S., Bassaco, M. M., Salau, N. P. G., Mazutti, M. A., Bisognin, D. A., and Terra, L. M. (2012). Optimization of enzymatic hydrolysis of cassava to obtain fermentable sugars. *Journal of Zhejiang University*, 13(7):579–586.
- Curvelo-Santana, J. C., Ehrhardt, D. D., and Tambourgi, E. B. (2010). Otimização da produção de álcool de mandioca. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 30(3):613–617.
- Dura, A., Błaszczak, W., and Rosell, C. M. (2014). Functionality of porous starch obtained by amylase or amyloglucosidase treatments. *Carbohydrate Polymers*, 101(1):837–845.
- Fogler, H. S. (2008). *Elements of chemical reaction engineering*. Boston: Pearson Educación International.
- Frakolaki, G., Giannou, V., Topakas, E., and Tzia, C. (2018). Chemical characterization and breadmaking potential of spelt versus wheat flour. *Journal of Cereal Science*, 79(March 2018):50–56.

- Genencor (2006). Spezyme ® fred. *Enzyme data sheet*, (Wet Mill):7–8.
- Genencor (2007). Optidex ® l-400. *Product data sheet*, pages 4–5.
- González Castellanos, R. A. (2000). *Principios Básicos de Escalado*. Universidad de Matanzas Camilo Cienfuegos, Centro de Estudios de Combustión y Energía (CECYEN).
- Gonzalez Tello, A., Camacho Rubio, F., and Robles Medina, A. (1989). hidrolizados enzimáticos de interés en la iaa. *Alimentación, equipos y tecnología*, page 7.
- Guo, P., Yu, J., Copeland, L., Wang, S., and Wang, S. (2018). Mechanisms of starch gelatinization during heating of wheat flour and its effect on in vitro starch digestibility. *Food Hydrocolloids*, 82(June):370–378.
- Hangos, K. and Cameron, I. (2001). *Process Modelling and Model Analysis*. San Diego: Academic Press.
- Harsa, S. and Furusaki, S. (2001). Chromatographic separation of amyloglucosidase from the mixtures of enzymes. *Biochemical Engineering Journal*, 8(3):257–261.
- Hernández-Medina, M., Torruco-uco, J. G., Chel-Guerrero, L., and Betancur-ancona, D. (2008). Caracterización fisicoquímica de almidones de tubérculos cultivados en Yucatán, México. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 28(3):718–726.
- Hoseney, R. C. and Delcour, J. A. (2010). Principles of Cereal Science and Technology. *Journal of Cereal Science*, 51(3):415.
- Jeddou, B., Sameh, M., Imen, G., Donyes, F., Dhouha, G., Ghorbel, E., and Oumèma, N.-e. (2014). Potato peel as feedstock for bioethanol production : A comparison of acidic and enzymatic hydrolysis. *Industrial Crops & Products*, 52:144–149.
- Ji, Z., Yu, L., Liu, H., Bao, X., Wang, Y., and Chen, L. (2017). Effect of pressure with shear stress on gelatinization of starches with different amylose/amylopectin ratios. *Food Hydrocolloids*, 72:331–337.
- Johnston, D. B. and McAloon, A. J. (2014). Protease increases fermentation rate and ethanol yield in dry-grind ethanol production. *Bioresource Technology*, 154:18–25.
- Johnstone, R. and Thring, M. (1957). *Pilot plants, Models, and Scale-Up Methods in Chemical Engineering*. New York: McGraw Hill.
- Kadziola, A., Abe, J.-i., Svensson, B., and Haser, R. (1994). Crystal and Molecular Structure of Barley α -Amylase. *Journal of Molecular Biology*, 239(1):104–121.
- Kalman, R. E. (1959). On the general theory of control systems. *IEEE Transactions on Automatic Control*, 4(3):481–492.

- Kearsley, M. and Dziejczak, S. (1995). *Handbook of Starch Hydrolysis Products and their Derivatives*. Norwich: Springer Science+Business Media.
- Khlestkin, V. K., Peltek, S. E., and Kolchanov, N. A. (2018). Review of direct chemical and biochemical transformations of starch. *Carbohydrate Polymers*, 181(October 2017):460–476.
- Kim, H.-s. and Huber, K. C. (2010). Physicochemical properties and amylopectin fine structures of A- and B-type granules of waxy and normal soft wheat starch. *Journal of Cereal Science*, 51(3):256–264.
- Kong, H., Yang, X., Gu, Z., Li, Z., Cheng, L., Hong, Y., and Li, C. (2018). Heat pretreatment improves the enzymatic hydrolysis of granular corn starch at high concentration. *Process Biochemistry*, 64(June 2017):193–199.
- Kossen, N. (1994). *Scale-up*. Delf: Advances in Bioprocess Engineering.
- Kovaa, P., Horsky, J., Sárkaa, E., Kolaceka, J., Netopilíkb, M., Walterovab, Z., Krulis, Z., Synytsyaa, A., and Hruskovab, K. (2013). Hydrolysis of wheat B-starch and characterisation of acetylated maltodextrin zen Sárka. *Carbohydrate Polymers*, 98:43–49.
- Krajang, M. and Chamsart, S. Raw Cassava Starch Hydrolysis for Single-Step Ethanol Production Using Combination of Raw Starch Hydrolysis and Fermentation to Pilot-Scale.
- Leite, T. S., de Jesus, A. L. T., Schmiele, M., Tribst, A. A., and Cristianini, M. (2017). High pressure processing (HPP) of pea starch: Effect on the gelatinization properties. *LWT - Food Science and Technology*, 76:361–369.
- Li, L., Blanco, M., and Jane, J.-I. (2007). Physicochemical properties of endosperm and pericarp starches during maize development. *Carbohydrate Polymers*, 67(4):630–639.
- Li, M., Li, J., and Zhu, C. (2018). Effect of ultrasound pretreatment on enzymolysis and physicochemical properties of corn starch. *International Journal of Biological Macromolecules*, 111:848–856.
- Li, Z., Liu, W., Gu, Z., Li, C., and Hong, Y. (2015). The effect of starch concentration on the gelatinization and liquefaction of corn starch. *Food hydrocolloids*, 48:189–196.
- Liu, H., Xie, F., Yu, L., Chen, L., and Li, L. (2009). Thermal processing of starch-based polymers. *Progress in Polymer Science*, 34:1348–1368.
- Logan, J. D. (2013). *Dimensional Analysis and Scaling. Taken from: Applied mathematics. A contemporary approach*. New Jersey: John Wiley & Sons.

- Malumba, P., Doran, L., Danthine, S., Blecker, C., and Béra, F. (2018). The effect of heating rates on functional properties of wheat and potato starch-water systems. *LWT - Food Science and Technology*, 88(August 2017):196–202.
- Martínez, C. M., Adamovic, T., Cantero, D. A., and Cocero, M. J. (2019). Scaling up the production of sugars from agricultural biomass by ultrafast hydrolysis in supercritical water. *Journal of Supercritical Fluids*, 143(August 2018):242–250.
- Miklasevicius, L., Ramon, A. P., Pra, D., Leaes, E. X., Bassaco, M. M., Terra, L. M., and Mazutti, M. A. (2013). Effect of ultrasound-assisted irradiation on the activities of α -amylase and amyloglucosidase. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 2:21–25.
- Miller, G. L. (1959). Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Analytical Chemistry*, 31(3):426–428.
- Monsalve-Bravo, G., Moscoso-Vasquez, H., and Alvarez, H. (2014). Scale-up of continuous reactors: Using phenomenological-based models. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 32(3):42.
- Monsalve Bravo, G. M. (2014). *An approximation to the scale-up of batch processes using phenomenological-based models*. Tesis de Maestría. Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín.
- Monsalve G., J. F., Medina de Perez, V. I., and Ruiz Colorado, A. A. (2006). Ethanol production of banana shell and cassava starch. *Dyna*, 150:21–27.
- Moore, B. (1981). Principal component analysis in linear systems: Controllability, observability, and model reduction. *IEEE Transactions on Automatic Control*, 26(1):17–32.
- Morales, S., Alvarez, H., and Sanchez, C. (2008). Dynamic models for the production of glucose syrups from cassava starch. *Food and Bioproducts Processing*, 86(1):25–30.
- Morales Vélez, S. P. (2004). *Simulación de un bioproceso para la obtención de jarabes glucosados y fructosados a partir de almidón de yuca*. Tesis de Maestría. Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín.
- Nielsen, J., Villadsen, J., and Gunnar, L. (2014). *Principles, Bioreaction Engineering*. New York: Springer.
- Ogata, K. (2013). *Ingeniería de Control Moderna*, volume 53. Madrid: Pearson Educación.
- Osundahunsi, O. F., Fagbemi, T. N., Kesselman, E., and Shimoni, E. (2003). Comparison of the Physicochemical Properties and Pasting Characteristics of Flour and Starch from Red and White Sweet Potato Cultivars Comparison of the Physicochemical Properties and Pasting Characteristics of Flour and Starch from Red and White Sweet. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1499:2232–2236.

- Ozbek, B. and Semra, Y. (2001). α -Amylase inactivation during wheat starch hydrolysis process. *Process Biochemistry*, 37:87–95.
- Palsson, B. (2015). *Systems Biology : Simulation of Dynamic Network States*. Cambridge: Kindle Edition.
- Pandey, A., Negi, S., and Soccol, C. R. (2017). *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering Production , Isolation and Purification Edited by*. Amsterdam: El Sevier.
- Paolucci-jeanjean, D., Belleville, M.-p., Zakhia, N., and Rios, G. M. (2000). Kinetics of Cassava Starch Hydrolysis with Termamyl Enzyme. *Biotechnology and Bioengineering*, 88(1).
- Paszczvdski, A., Miedziak, I., Paszczyński, A., Miedziak, I., Łobarzewski, J., Kochmańska, J., and Trojanowski, J. (1982). A simple method of affinity chromatography for the purification of glucoamylase obtained from *Aspergillus niger* C. *FEBS Letters*, 149(1):63–66.
- Pino, M. S., Rodríguez-Jasso, R. M., Michelin, M., Flores-Gallegos, A. C., Morales-Rodriguez, R., Teixeira, J. A., and Ruiz, H. A. (2018). Bioreactor design for enzymatic hydrolysis of biomass under the biorefinery concept. *Chemical Engineering Journal*, 347:119–136.
- Poole, D. (2011). *Álgebra lineal, Una Introducción Moderna*. Peterborough: CENGAGE Learning.
- Poonam, S. N. and Pandey, A. (2009). *Biotechnology for Agro-Industrial Residues Utilisation*. Northern Ireland: Springer Science+Business Media B.
- Presečki, A. V., Blažević, F., and Vasić-rački, (2012). Mathematical modeling of maize starch liquefaction catalyzed by α -amylases from *Bacillus licheniformis*: effect of calcium, pH and temperature. *Bioprocess Biosyst Eng* (, 36(July 2016):117–126.
- Quintero, J. A., Dávila, J. A., Moncada, J., Giraldo, O. H., and Cardona Alzate, C. A. (2016). Analysis and characterization of starchy and cellulosic materials after enzymatic modification. *Dyna*, 83(197):44.
- Ramírez, K. B., Zabala, K. B., Ángela Adriana, R.-C., and Castaño, H. (2018a). Determinación de la actividad enzimática amiloglucosidasa.
- Ramírez, K. B., Zabala, K. B., Peláez, A., Daza, S., Castaño, H. I., and Ruiz-Colorado, A. (2018b). Determinación de la actividad enzimática alfa-amilasa.

- Roman, L., Gomez, M., Li, C., Hamaker, B. R., and Martinez, M. M. (2017). Biophysical features of cereal endosperm that decrease starch digestibility. *Carbohydrate Polymers*, 165:180–188.
- Rosicka-Kaczmarek, J., Kwaśniewska-Karolak, I., Nebesny, E., and Komisarczyk, A. (2017). *The Functionality of Wheat Starch*. Lodz: Starch in Food.
- Rosicka Kaczmarek, J., Makowski, B., Nebesny, E., Tkaczyk, M., Komisarczyk, A., and Nita, Z. (2016). Composition and thermodynamic properties of starches from facultative wheat varieties. *Food Hydrocolloids*, 54:66–76.
- Rosso, L., Lobry, J. R., Bajard, S., and Flandrois, J. P. (1995). Convenient model to describe the combined effects of temperature and pH on microbial growth. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(2):610–616.
- Ruiz, A. A. and Alvarez, H. (2011). Escalamiento de Procesos Químicos y Bioquímicos basado en un Modelo Fenomenológico. *Información Tecnológica*, 22(6):33–52.
- Ruiz, M. I., Sanchez, C. I., Torresa, R. G., and Molina, D. R. (2011). Enzymatic Hydrolysis of Cassava Starch for Production of Bioethanol with a Colombian Wild Yeast Strain. *Brazilian Chemical Society*, 22(12):2337–2343.
- Ruiz Colorado, A. A. (2009). *Factores de escala para la producción biotecnológica de etanol carburante*. Tesis de Doctorado. Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín.
- Ruiz Cruz, K. A. (2012). *Modelado del proceso de hidrólisis enzimática de almidones gelatinizados del fruto de la planta de banano*. Tesis de Maestría. Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín.
- Scheer, M., Grote, A., Chang, A., Schomburg, I., Munaretto, C., Rother, M., Söhngen, C., Stelzer, M., Thiele, J., and Schomburg, D. (2011). BRENDA, the enzyme information system in 2011. *Nucleic Acids Research*.
- Sivak, M. N. and Preiss, J. (1998). *Starch: Basic Science to Biotechnology. Advances in Food and Nutrition Research*, volume 41. Michigan: Academic Press.
- Sjoo, M. and Nilsson, L. (2017). *Starch in Food. Structure, Function and Applications*. Duxford: Woodhead Publishing.
- Skogestad, S. and Postlethwaite, I. (1998). Multivariable feedback control analysis and design. *International Journal of Robust and Nonlinear Control*, 8(14):1237–1238.
- Sweere, A. P., Luyben, K. C. A., and Kossen, N. W. (1987). Regime analysis and scale-down: Tools to investigate the performance of bioreactors. *Enzyme and Microbial Technology*, 9(7):386–398.

- Swiss Institute of Bioinformatics (2017). ExpASy - Bioinformatic Resource Portal.
- Tester, R. F., Qi, X., and Karkalas, J. (2006). Hydrolysis of native starches with amylases. *Animal Feed Science and Technology*, 130(1-2):39–54.
- Tomasik, P. and Horton, D. (2012). Enzymatic conversions of starch. *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*, 68:59–436.
- Toro Alvarez, L. A. (2008). *Metodología para el diseño de control total de planta*. Tesis de Maestría. Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín.
- Torruco-uco, J. and Betancur-ancona, D. (2007). Food Chemistry Physicochemical and functional properties of makal (*Xanthosoma yucatanensis*) starch. *Food Chemistry*, 101:1319–1326.
- Tovar Benítez, T. (2008). *Caracterización morfológica y térmica del almidón de maíz (Zea mays L) obtenido por diferentes métodos de aislamiento*. Tesis de Pregrado. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Pachuca, México.
- Vamadevan, V. and Bertoft, E. (2015). Structure-function relationships of starch components. *Starch/Staerke*, 67(1-2):55–68.
- Van De Wal, M. and De Jager, B. (2001). Review of methods for input/output selection. *Automatica*, 37(4):487–510.
- Villar, M. A. (2017). *Starch-Based Materials in Food Packaging*. London: Academic Press.
- Walker, J. M. (2002). *The Protein Protocols Handbook*, volume 3. New Jersey: Humana Press.
- Wang, D., Ma, X., Yan, L., Chantapakul, T., Wang, W., Ding, T., Ye, X., and Liu, D. (2017). Ultrasound assisted enzymatic hydrolysis of starch catalyzed by glucoamylase: Investigation on starch properties and degradation kinetics. *Carbohydrate Polymers*, 175:47–54.
- Xia, J., Wang, G., Lin, J., Wang, Y., Chu, J., Zhuang, Y., and Zhang, S. (2015). Advances and Practices of Bioprocess Scale-up. In: Bao J., Ye Q., Zhong JJ. (eds) Bioreactor Engineering Research and Industrial Applications II. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 152(July 2015):127–141.
- Xie, Y., Li, M. N., Chen, H. Q., and Zhang, B. (2019). Effects of the combination of repeated heat-moisture treatment and compound enzymes hydrolysis on the structural and physicochemical properties of porous wheat starch. *Food Chemistry*, 274(September 2018):351–359.

- Zabed, H., Faruq, G., Boyce, A. N., Sahu, J. N., and Ganesan, P. (2016). Evaluation of high sugar containing corn genotypes as viable feedstocks for decreasing enzyme consumption during dry-grind ethanol production. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 58:467–475.
- Zanin, G. M., Moraes, F. F. D. E., and De Moraes, F. F. (1996). Modeling cassava starch saccharification with amyloglucosidase. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 57-58(1):617–625.
- Zhu, F. (2015). Impact of ultrasound on structure, physicochemical properties, modifications, and applications of starch. *Trends in Food Science and Technology*, 43(1):1–17.
- Zhu, F. (2017). Structures , properties , modifications , and uses of oat starch. *Food Chemistry*, 229:329–340.
- Ziegler, J. and Nichols, N. (1943). Process lags in automatic control circuits. *Transactions of the American Society of Mechanical Engineers*, 65:433–444.