



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

Simulación del proceso de clarificación enzimática de jarabes glucosados producidos por medio de celulasas a partir de residuos agroindustriales

Simulation of the enzymatic clarification process of glucose syrups produced by cellulases from agro-industrial waste

Alejandro Morrales González

Universidad Nacional De Colombia
Facultad De Minas
Posgrado En Ingeniería – Maestría En Ingeniería Química
Medellín
2023

Simulación del proceso de clarificación enzimática de jarabes glucosados producidos por medio de celulasas a partir de residuos agroindustriales

Alejandro Morrales González

Tesis presentada para optar al título de magíster en ingeniería química

Directora

Ángela Adriana Ruíz-Colorado

Ingeniera Química, Ph.D.

Docente – Universidad Nacional de Colombia

Co-Director

Juan Camilo Acosta-Pavas

Ingeniero Biológico, M.Sc.

Estudiante doctoral en Toulouse Biotechnology Institute, Bio & Chemical Engineering

Línea de Investigación:

Pretratamiento de residuos agroindustriales por vía química y enzimática

Grupo de Investigación:

Bioprocesos y Flujos Reactivos (BIOFRUN)

Universidad Nacional De Colombia

Facultad De Minas

Posgrado En Ingeniería – Maestría En Ingeniería Química

Medellín

2023

NOTA DE ACEPTACIÓN:

Ing. Ángela Adriana Ruíz-Colorado, Ph.D.
Directora de Tesis

Ing. Juan Camilo Acosta-Pavas, M.Sc.
Co-Director de Tesis

Firma del Jurado

Firma del Jurado

Medellín, Abril de 2023

Dedicatoria

Le dedico este trabajo a mis padres, mis abuelos y el resto de mi familia, los cuales siempre me han apoyado durante mis estudios, brindándome afecto y apoyo cuando lo necesitaba y asegurándose que tuviera las mejores oportunidades.

AMG

Declaración de obra original

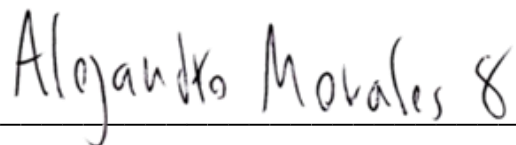
Yo declaro lo siguiente:

He leído el Acuerdo 035 de 2003 del Consejo Académico de la Universidad Nacional. «Reglamento sobre propiedad intelectual» y la Normatividad Nacional relacionada al respeto de los derechos de autor. Esta disertación representa mi trabajo original, excepto donde he reconocido las ideas, las palabras, o materiales de otros autores.

Cuando se han presentado ideas o palabras de otros autores en esta disertación, he realizado su respectivo reconocimiento aplicando correctamente los esquemas de citas y referencias bibliográficas en el estilo requerido.

He obtenido el permiso del autor o editor para incluir cualquier material con derechos de autor (por ejemplo, tablas, figuras, instrumentos de encuesta o grandes porciones de texto).

Por último, he sometido esta disertación a la herramienta de integridad académica, definida por la universidad.



Alejandro Morales González

Fecha: 21/01/2023

Agradecimientos

Le agradezco extremadamente a la profesora Angela Adriana y a Juan Camilo Acosta, los cuales me brindaron su apoyo, sugerencias y conocimientos cuando lo necesitaba durante la experimentación y escritura de los artículos que componen este trabajo.

A mis Compañeras Yesenia Castaño, Nataly Bonilla y Maria Camila Castro, las cuales me ayudaron bastante al momento de realizar experimentos y caracterización, no solo para realizarlos de una manera más eficiente, sino con sus conocimientos y sugerencias al momento de realizarlos.

Al profesor Francisco José Valencia y al Grupo de Investigación “Bioprocesos y Flujos Reactivos”, que me brindaron sus opiniones y conocimientos en la preparación de los documentos y las exposiciones que forman parte de estas tesis.

A la Universidad Nacional de Colombia y a mis profesores de pregrado y posgrado, cuyos conocimientos son los que me permiten estar en esta posición y haber cumplido con los logros que he realizado.

Y finalmente a los evaluadores Hernán Dario Álvarez y Orlando Simón Ruíz por sus aportes y disposición a evaluar mi trabajo.

Resumen

En general, esta investigación busca modelar y simular el proceso de clarificación enzimática con pectinasas y mejorar los procesos de clarificación tradicionales utilizados en los jarabes glucosados producidos a partir de residuos agroindustriales, permitiendo mejorar los jarabes producidos por el grupo de Investigación Bioprocesos y Flujos Reactivos de la Universidad Nacional de Colombia (BIOFRUN).

Los jarabes glucosados son soluciones ricas principalmente en glucosa, producidas por la hidrólisis ácida o enzimática del almidón, celulosa de residuos agroindustriales y/u otros materiales. A través de los pretratamientos y la hidrólisis, no solo se libera la glucosa, también quedan en la solución restos de las células vegetales, proteínas, grasas, aceites, pectinas y otros compuestos disueltos y suspendidos que le dan una apariencia turbia y opaca a los jarabes producidos. Dependiendo de los usos de estos jarabes, estos necesitan ser tratados con métodos de clarificación que remuevan o degraden estos compuestos contaminantes del jarabe. Estos métodos presentan algunos inconvenientes, la decantación y la centrifugación, a pesar de ser simples, presentan pérdidas considerables de jarabe (40 - 50%), la adsorción con carbón activado, a pesar de presentar la mejor eliminación del color, tiene el inconveniente de adsorber los azúcares del jarabe (alrededor del 14%), y la floculación mejora los procesos de clarificación, pero no puede actuar por sí sola, por lo que se ha buscado otros métodos para realizar este proceso.

En los jarabes producidos a partir de residuos agroindustriales hay presencia de un residuo de particular interés, la pectina, un polisacárido complejo de alto peso molecular, que tiene la capacidad de formar geles cuando las largas cadenas de una molécula interactúa con las de otra, atrapando otras sustancias disueltas y sólidas, dando una apariencia turbia a las soluciones en las que está presente.

Otros productos donde la pectina también está presente son los jugos y vinos producidos a partir de frutas. Por esta razón, para su clarificación son usadas enzimas pectínicas, que modifican y degradan la pectina, obteniendo un producto más claro y menos turbio. Este uso de las enzimas pectínicas se aplicó en este trabajo en jarabes glucosados con el fin de degradar la pectina presente en estos y obtener un aumento de su claridad.

Esta investigación tuvo como propósito la evaluación de enzimas pectínicas aplicadas al momento de realizar la clarificación de jarabes glucosados producidos a partir de residuos de carácter lignocelulósico, encontrando las mejores condiciones para realizar dicho proceso y modelarlo usando datos de la investigación. La primera parte de este trabajo comienza con una recopilación bibliográfica de los temas relacionados con este proceso, empezando con la historia de los jarabes glucosados, las materias primas de las que se obtienen, sus métodos de producción y clarificación, que es la pectina y las enzimas pectínicas, estudios previos para la clarificación de jugos y jarabes, y el modelamiento.

La segunda parte de esta investigación corresponde al proceso de clarificación enzimática, que inicia con la caracterización de la materia prima utilizada para la producción del jarabe y las enzimas usadas para la clarificación, encontrando propiedades como la composición química de la materia prima, los parámetros cinéticos y la actividad de la enzima. Con estos datos se procede a preparar el jarabe y realizar los ensayos de clarificación, variando la concentración de enzima y la agitación para encontrar la combinación de parámetros que obtienen la mejor clarificación, y finalmente seguir el proceso de clarificación de los jarabes a lo largo del tiempo.

La última etapa de este estudio es utilizar los datos de clarificación contra tiempo y parámetros cinéticos obtenidos en la etapa anterior, para combinarlos con otra información de la literatura y así llegar al planteamiento de un modelo dinámico con base fenomenológica que sea capaz de simular como se degrada la pectina en oligosacáridos de ácido poligalacturónico, hasta llegar a la formación de ácido galacturónico, y vincular esta degradación con la clarificación del jarabe. Adicionalmente, se buscó la optimización de los parámetros del modelo, comparando los datos simulados con los experimentales, encontrando la combinación de parámetros que reduzca sus diferencias por medio de programas matemáticos.

Palabras clave: hidrólisis, jarabes glucosados, residuos agroindustriales, materiales lignocelulósicos, pectina, enzimas pectídicas, modelamiento.

Abstract

In general, this study tries to simulate the clarification process with pectolytic enzymes and enhance the traditional clarification methods used in glycosidic syrups produced from agro-industrial wastes, to improve the syrups produced by the research group Bioprocess and Reactive Flows of the National University of Colombia (BIOFRUN).

Glucose syrups are solutions mainly composed of glucose, produced by the acid or enzymatic hydrolysis of starch, cellulose from agro-industrial residues or other materials. Through the pretreatments and hydrolysis, not only glucose is liberated, other remnants like pieces of vegetable cells, proteins, fats, oils, pectin and other dissolved and suspended residues are produced, that gives the syrup a hazy and dark appearance. Depending on the use of the syrups, needing to be treated with clarification methods that remove or degrade these contaminants from the syrup. These methods have disadvantages, while the decantation and the centrifugation process are simple, a considerable quantity of syrup is lost (40 - 50%), the adsorption with activated charcoal presents the best color removal, but it has the inconvenience of also adsorbing the sugars from the syrup (around 14%) and the flocculation enhances the clarification methods, but it cannot be used alone, for this reason other methods to do this process were researched.

In the glucose syrups produced from agro-industrial residues exist a compound of particular interest, pectin, a complex polysaccharide with a high molecular weight, which has the capability to produce gels when the long chains of one molecule interact with ones of another, this gel can ensnare other suspended molecules, giving the solutions in which, it is present a hazy appearance.

Other products that present pectin, are the fruit juices and wines, for this reason pectolytic enzymes are used for their clarification, enzymes that can modify and degrade the pectin, obtaining a clearer and less hazy product. The use of this kind of enzyme was applied to glucose syrups in this work, to degrade the pectin and achieve an increment on its clarity.

The purpose of this research work was to verify if this clarification process with pectolytic enzymes could be used in the clarification of glucose syrups produced from lignocellulosic residues, finding the best conditions to execute this process, and modeling it using the data from the investigation.

The first part of this work begins with a bibliographic compilation of the themes related to this process, beginning with the history of glycosidic syrups, the materials used in its production, the methods to produce and clarify them, what are pectin and pectolitic enzymes, previous studies about clarification of juices and syrups and process modeling.

The second part of this investigation covers the enzymatic clarification process, beginning with the characterization of the lignocellulosic material used to produce the syrup and the

enzymes used for its clarification, finding properties like the chemical composition of the materials, the kinetic parameters and activity of the enzyme. After obtaining this information, the production and clarification of the syrup began, varying the enzyme concentration and stirring to find the combination of parameters that produces the highest clarity, and finally follow the clarification process through the time.

The last stage of this study is to use the information obtained from following the clarification process through the time and kinetic parameters obtained in the previous part, combine it with other information from the literature to propose a semi-physical mathematical model that is capable to simulate how pectin degrades in polygalacturonic acid oligosaccharides until it becomes monomers of galacturonic acid and link this degradation with the clarification of the syrup. Additionally, the model parameters were optimized, comparing the experimental data with the simulated ones, searching the combination of parameters that minimizes the difference through mathematical programs.

Keywords: hydrolysis, glycosidic syrup, agro-industrial residue, lignocellulosic material, pectin, pectolytic enzyme, modeling.

Objetivos de la investigación

Objetivo general

Formular y simular una metodología para la clarificación enzimática con poligalacturonasa/pectinasa de jarabes glucosados producidos a partir de biomásas agroindustriales.

Objetivos específicos

1. Producir jarabe de glucosa a partir de una biomasa amilácea o lignocelulósica siguiendo el procedimiento utilizado por el laboratorio de bioprocesos y flujos reactivos, descrito en la patente #08-055808 / #WO2017212405A1.
2. Desarrollar una metodología para la clarificación enzimática de un jarabe producido a partir de una biomasa amilácea o lignocelulósica.
3. Modelar y simular la cinética del proceso enzimático de clarificación.

Tabla de contenido

Resumen.	7
Abstract.	9
Objetivos de la investigación.	11
Listado de figuras.	15
Listado de tablas.	16
Lista de símbolos y abreviaturas.	17
CAPÍTULO 1: Fundamentos y antecedentes de la producción de jarabes glucosados, clarificación, uso de enzimas peptídicas y simulación.	19
1.1. <i>Abstract.</i>	19
1.2. <i>Introducción.</i>	19
1.3. <i>Estado de Arte.</i>	20
1.4. <i>Materias primas.</i>	21
1.4.1. <i>Materiales amiláceos.</i>	21
1.4.2. <i>Materiales lignocelulósicos.</i>	22
1.5. <i>Pectina.</i>	25
1.6. <i>Métodos de producción de jarabe.</i>	26
1.6.1. <i>Método ácido.</i>	27
1.6.2. <i>Método enzimático.</i>	27
1.7. <i>Métodos de separación y clarificación del jarabe.</i>	28
1.7.1. <i>Precipitación/sedimentación/decantación.</i>	28
1.7.2. <i>Centrifugación.</i>	28
1.7.3. <i>Filtración.</i>	29
1.7.4. <i>Floculación / Coagulación.</i>	29
1.7.5. <i>Adsorción.</i>	30
1.7.6. <i>Uso de membranas de intercambio iónico.</i>	30
1.8. <i>Clarificación enzimática.</i>	32
1.8.1. <i>Enzimas pectídicas.</i>	32
1.8.2. <i>Clarificación enzimática de jarabes.</i>	34
1.9. <i>Modelamiento del proceso de clarificación.</i>	35
1.9.1. <i>Cinética del proceso de clarificación.</i>	36
1.9.2. <i>Propuesta de un modelo para la clarificación enzimática de jarabes.</i>	37
1.10. <i>Conclusión.</i>	40
1.11. <i>Bibliografía.</i>	40

CAPÍTULO 2: Desarrollo de la metodología para la clarificación enzimática de jarabes glucosados. 53

2.1. Introducción.	53
2.2. Materiales y métodos.	55
2.2.1. Materiales.	55
2.2.2. Caracterización de la materia prima.	55
2.2.3. Producción de jarabe a partir de la fibra de maíz.	56
2.2.4. Determinación de la actividad enzimática de la pectinasa.	56
2.2.5. Optimización del proceso de clarificación.	57
2.2.6. Determinación de los parámetros cinéticos de la enzima.	57
2.2.7. Cinética del proceso de clarificación.	58
2.3. Resultados y discusión.	58
2.3.1. Resultados de la caracterización de la materia prima.	58
2.3.2. Resultados de la producción de jarabe a partir de la fibra de maíz.	59
2.3.3. Resultados de la determinación de la actividad enzimática de la pectinasa.	60
2.3.4. Resultados de la optimización del proceso de clarificación.	61
2.3.5. Resultados de la determinación de los parámetros cinéticos de la enzima.	63
2.3.6. Resultados de la cinética del proceso de clarificación.	64
2.4. Conclusiones.	65
2.5. Bibliografía.	65

CAPÍTULO 3: Simulación del proceso enzimático de clarificación de jarabes glucosados. 71

3.1 Introducción.	71
3.2. Materiales y métodos.	72
3.2.1. Materiales.	72
3.2.2. Modelado y estimación de parámetros para la hidrólisis enzimática de la pectina.	72
3.2.3. Datos del proceso de clarificación.	74
3.2.4. Validación del modelo.	75
3.3. Resultados y discusión.	75
3.3.1. Resultados del modelado y estimación de parámetros para la hidrólisis enzimática de la pectina.	75
3.3.2. Resultados del ajuste paramétrico del modelo.	79
3.3.3. Resultados de la validación del modelo.	82
3.4. Conclusión.	84
3.5. Bibliografía.	85

Conclusiones generales. 88

Recomendaciones generales.	89
Bibliografía de la recomendación general	89
Anexos.	90

Listado de figuras

Capítulo 1

Figura 1.1. Estructura de las principales regiones de la pectina.	25
Figura 1.2. Estructura de la poligalacturonasa.	33
Figura 1.3. Estructura de la pectin liasa.	33
Figura 1.4. Estructura de la Pectin metilesterasa.	34
Figura 1.5. Proceso de degradación de la pectina.	37
Figura 1.6. Mecanismo de reacción propuesto para la degradación de la pectina usando la poligalacturonasa del <i>Aspergillus niger</i> .	39

Capítulo 2

Figura 2.1. a) Contorno de claridad respecto agitación y relación E/S. b) Representación 3D de la superficie.	63
Figura 2.2. Jarabe sin tratar y jarabe tratado.	65

Capítulo 3

Figura 3.1. Mecanismo de reacción propuesto para la degradación de la pectina.	73
Figura 3.2. Linealización de la claridad contra la concentración de azúcares.	78
Figura 3.3. Concentración de azúcares y pectina contra el tiempo.	79
Figura 3.4. Comparación de la claridad y concentración de azúcares experimentales contra los simulados.	80
Figura 3.5. Comparación de la claridad y concentración de azúcares en la primera validación.	82
Figura 3.6. Comparación de la claridad y concentración de azúcares en la segunda validación.	84

Listado de Tablas

Capítulo 1

Tabla 1.1. Composición de la fibra de maíz base seca.	24
Tabla 1.2. Métodos para la producción de jarabes.	28
Tabla 1.3. Ventajas y desventajas de los métodos de clarificación.	31

Capítulo 2

Tabla 2.1. Diseño central compuesto.	57
Tabla 2.2. Caracterización de la fibra de maíz base seca.	59
Tabla 2.3. Condiciones para la producción de los jarabes.	60
Tabla 2.4. Diseño de experimentos para la etapa de clarificación.	61
Tabla 2.5. ANOVA para claridad.	62
Tabla 2.6. Validación del diseño central compuesto.	63
Tabla 2.7. Velocidades iniciales y concentración.	63

Capítulo 3

Tabla 3.1. Parámetros cinéticos del modelo.	78
Tabla 3.2. Valor inicial de los compuestos.	79
Tabla 3.3. Comparación de los resultados obtenidos.	80
Tabla 3.4. Parámetros cinéticos estimados del modelo.	81
Tabla 3.5. Comparación de los resultados de la primera validación.	83
Tabla 3.6. Comparación de los resultados de la segunda validación.	84

Lista de símbolos y abreviaturas

A: Área
Az: Concentración de azúcares
Abs: Absorbancia
A.Gal: Ácido Galacturónico
ANOVA: Análisis de varianza
AOAC: Association of Official Agricultural Chemists
Biofrun: Bioprocesos y flujos reactivos
C: Claridad
Cp: Calor específico
DE: Equivalente de dextrosa
DNS: Ácido 3,5-dinitrosalicílico
DS2 = Disacárido de A. Gal
E: Enzima
H: Coeficiente de transferencia de calor
HE: Hidrólisis enzimática
HG: Homogalacturonano
HPLC: Cromatógrafo líquido de alta eficacia
k: Conductividad térmica
Kd: Inactivación por efecto de la temperatura
K_M: Constante de Michaelis-Menten
K_i: Constante de inhibición
K_{in}: Constante de inactivación de la enzima
m = Número de variables dependientes estudiadas
MS1 = Mono sacárido de A. Gal
n = Cantidad de valores experimentales obtenidos
NREL: National Renewable Energy Laboratory
OGS3 = Trisacárido de A. Gal
OGS4 = Tetrasacárido de A. Gal
OGS5 = Pentasacárido de A. Gal
OGS6 = Hexasacárido de A. Gal
PG: Poligalacturonasa
pH: Potencial de hidrógeno
pH_{max}: pH máximo al cual trabaja la enzima
pH_{min}: pH mínimo al cual trabaja la enzima
pH_{opt}: pH óptimo al cual trabaja la enzima

PL: Pectinlialasa
 PME: Pectin metilesterasa
 P: Producto
 PSI: Libras por pulgada cuadrada
 R^2 : coeficiente de determinación
 R^2 ajustado: coeficiente de determinación ajustado
 R E/S: Relación enzima/sustrato
 Rho: Efecto del pH
 ρ : Densidad
 RGI: Ramnogalacturonano 1
 RGII: Ramnogalacturonano 2
 rpm: Rotaciones por minuto
 rps: Rotaciones por segundo
 S: Sustrato
 SSE: Suma del error cuadrático
 MSE: Error cuadrático medio
 MSE_{Global} : error cuadrático medio global
 T: Temperatura
 t: Tiempo
 Te: Temperatura exterior
 Thau: Efecto de la temperatura
 T_{max} : Temperatura máxima a la cual trabaja la enzima
 T_{min} : Temperatura mínima a la cual trabaja la enzima
 T_{opt} : Temperatura óptima a la cual trabaja la enzima
 U: Unidad enzimática
 V: Velocidad
 v: viscosidad cinemática
 V_i : Velocidad inicial
 V_{max} : Velocidad máxima
 Vol: Volumen
 y_{ij}^e : Valor experimental de las variables dependientes
 \hat{y}_{ij} : Valor de las variables predichas
 [X]: Concentración del compuesto X
 % P/P: porcentaje peso/peso o masa en masa
 %T600: Porcentaje de transmitancia a 600 nm
 α : Puntos axiales

CAPÍTULO 1: Fundamentos y antecedentes de la producción de jarabes glucosados, clarificación, uso de enzimas pectídicas y simulación.

En este capítulo se hace una recopilación de los temas pertinentes al proceso de clarificación enzimática de jarabes glucosados producidos a partir de residuos agroindustriales, empezando con una breve recopilación de su historia, los materiales utilizados para su elaboración, al igual que los diferentes métodos empleados para su producción y clarificación, junto con algunos trabajos previos sobre pretratamiento de jarabes glucosados producidos a partir de frutas y un poco sobre el desarrollo de un modelo semifísico en base fenomenológica para simular la clarificación del jarabe.

1.1. Abstract

La comercialización de jarabes azucarados producidos a partir de almidón, celulosa y otros residuos agroindustriales, ha tenido una gran importancia en diferentes industrias a lo largo de la historia, desde el inicio de su investigación en el siglo XIX. La producción de jarabes se realiza por hidrólisis ácida o enzimática de biomásas amiláceas o lignocelulósicas, con presencia de compuestos no degradados que atribuyen una apariencia turbia y oscura al jarabe. Estos jarabes son sujetos a procesos de clarificación como decantación, centrifugación, floculación, filtración o adsorción, retirando los compuestos no degradados, entre ellos compuestos pectídicos, pero son procesos complicados, costosos o presentan pérdida de jarabe y azúcares alrededor del 10 - 50% y 14 - 35% por la adhesión del jarabe a la materia prima/equipo o por la adsorción de estos en los adsorbentes. El uso de enzimas pectídicas para la clarificación, es una metodología que ha sido ampliamente aplicada en jugos de fruta y vinos, con un aumento de la claridad en 3 - 20%. Este proceso se logra al degradar la pectina que forma geles opacos, los cuales aportan viscosidad y turbidez a las soluciones donde están presentes. Existen algunos investigadores que se han enfocado en simular el proceso de degradación de pectina por medio de enzimas, pero muy pocos se han centrado en simular el proceso de clarificación, limitándose en buscar los puntos óptimos, pero no intentando seguir el desarrollo de este a lo largo del tiempo. En este escrito se hace una revisión del proceso de producción y clarificación del jarabe, el proceso de degradación de pectina y el modelado del proceso de clarificación de jarabes, que permitan estudiar este proceso de una manera sencilla y sin el uso de reactivos y buscando una disminución del tiempo de proceso.

1.2. Introducción

Existe una gran necesidad de compuestos ricos en glucosa y otros azúcares en la industria, desde su uso como edulcorantes y humectantes (aditivo que tiene la capacidad de evitar la desecación de los alimentos) en la industria de los alimentos, o por su

capacidad de brindar energía a los animales en la industria agropecuaria, y su uso como transportadores de medicamentos en la industria farmacéutica, pero para ser comercializados, estos deben presentar unas características mínimas que demuestren su calidad. Una de estas características es la claridad, la cual se ve afectada por la presencia de pequeñas partículas flotantes que no se degradan durante los procesos de producción del jarabe, dando al jarabe una apariencia turbia y opaca que dispersa la luz que incide en estos productos. Uno de los compuestos que afecta la claridad en los jarabes glucosados producidos a partir de residuos agroindustriales es la pectina, compuesto que ha sido ampliamente estudiado llegando a artículos donde se ha simulado el proceso de degradación de este polisacárido, pero no existen muchos artículos que modelen el proceso de clarificación de jarabe en general. En este trabajo, se muestra una recopilación de los diferentes aspectos que caracterizan a los jarabes glucosados, empezando con los materiales utilizados en su producción, pasando por los métodos de producción y clarificación tradicionales y llegando al uso de modelamiento semifísico de base fenomenológica para la simulación del proceso de clarificación.

1.3. Estado de Arte

La obtención de jarabes glucosados a partir de la hidrólisis de materiales vegetales ha sido un proceso que ha evolucionado desde la antigüedad. Los estudios relacionados a este tema comenzaron en el siglo XIX con los ensayos realizados por el químico de origen alemán Konstantin Gottlieb Sigismund Kirchoff en la Academia de ciencias de Rusia, quien produjo jarabes azucarados a partir de papas y trigo empleando ácidos y calor para realizar la hidrólisis del almidón que los componen (Hull, 2010a; Kainuma, 1980; Schwartz & Whistler, 2009; Whistler, 1984). Seguido, por el descubrimiento de una de las primeras enzimas por el químico francés Anselm Payen en 1833, la diastasa, también conocida como α -amilasa, que tiene la capacidad de degradar el almidón en glucosa y otros polisacáridos, evitando los inconvenientes de la hidrólisis ácida como la formación de sabores, colores y olores indeseados, y la necesidad de usar equipamiento anticorrosivo (Bedford & Masey O'Neill, 2018; Lentze, 2018; R. S. Singh et al., 2017). Para finalmente, llegar a los estudios realizados por Richard O. Marshall y Earl R. Kooi para convertir parte de la glucosa que compone los jarabes en fructosa, por medio de la enzima isomerasa obtenida del microorganismo *Pseudomonas hydrophilia*, obteniendo jarabes más dulces, porque la fructosa presenta una dulzura 2 a 2.2 veces más alta que la glucosa (Casey, 1976; Colonna et al., 2006; Kainuma, 1980; Marshall & Kooi, 1957).

Estos productos son de gran importancia en la industria alimentaria, al ser empleados ampliamente para prolongar el tiempo de vida de diferentes alimentos, controlar su viscosidad, evitar la cristalización de los azúcares y proporcionar otras cualidades como brillo, cuerpo y dulzura. Gracias a estas propiedades y la búsqueda de alternativas al azúcar, los jarabes edulcorantes presentan un mercado bastante grande, por ejemplo, el comercio del jarabe de maíz de alta fructosa movió 9.8 billones de dólares en el año 2021 (Dinesh & Roshan, 2022; Hartel et al., 2018; Hull, 2010b; P. Singh et al., 2020).

La industria de los jarabes edulcorantes usualmente emplea cultivos ricos en almidón como la papa, el maíz, la yuca, el arroz o el trigo para la producción de este tipo de productos, aunque investigadores como Barros et al. (2019), Pihlajaniemi et al. (2020) y Ruiz-Colorado et al. (2009 y 2020) han encontrado alternativas a estas materias primas como el uso de residuos agroindustriales, tanto amiláceos como lignocelulósicos, permitiendo aprovechar la enorme cantidad de residuos que se producen en el planeta. Tan solo en Colombia, se producen 71.943.813 toneladas de residuos al año, de los cuales el 56.44% son residuos orgánicos que son llevados a residuos sanitarios o incinerados para producir energía (Afanasjeva et al. 2017; Peñaranda et al., 2017; Piñeros-Castro, 2014).

1.4. Materias primas

1.4.1. Materiales amiláceos

El almidón está compuesto por largas cadenas de glucosa que se unen en dos conformaciones diferentes conocidas como amilosa y amilopectina, dependiendo del tipo de enlace que se encuentra entre las unidades. La amilosa está conformada por cadenas lineales de glucosa unidas por enlaces glucosídicos α (1–4), mientras que la amilopectina, además de poseer enlaces α (1–4) también presenta enlaces α (1–6) que forman ramificaciones cortas. Dependiendo del tipo de cultivo, la proporción de amilosa va del 15 al 30% y la de amilopectina del 60 al 85%, modificando las propiedades químicas y nutricionales del almidón de acuerdo a esta relación. Las plantas guardan el almidón en pequeños gránulos insolubles en el endospermo de las células de los frutos y semillas, por lo que se requiere de un pretratamiento para poder solubilizar este material y permitir el acceso de las enzimas o ácidos (Bertoft, 2015; Hanashiro, 2015; Nawaz et al., 2020; Wu & Zhou, 2018).

La amilosa y la amilopectina son degradadas por enzimas conocidas como amilasas, que tienen la capacidad de promover la hidrólisis de los enlaces α (1–4) entre unidades de glucosa. Esta familia de enzimas está dividida de acuerdo con la manera como se realiza el corte, entre todas estas la α -amilasa es de gran interés, esta enzima está presente en gran cantidad de organismos como animales, plantas, hongos y bacterias, realizando cortes aleatorios al interior de las moléculas de almidón para generar polisacáridos de menor tamaño como maltosa, dextrina, etc. Otra enzima importante en la degradación de estos materiales es la glucoamilasa, que tiene la capacidad de degradar los enlaces α (1–6) de la amilopectina para generar unidades de D-glucosa, los cuales no son afectados por la α -amilasa. Al usar estas dos enzimas se hace un efecto sinérgico que permite degradar efectivamente los compuestos amiláceos en un jarabe rico en glucosa, el cual puede ser concentrado y clarificado para su venta (Belitz et al., 2009a; Patil et al., 2021).

1.4.2. Materiales lignocelulósicos

El término material lignocelulósico puede ser aplicado a diferentes materiales como los pastos, cáscaras, hojas, tallos y maderas, que se caracterizan por estar conformados principalmente por celulosa y una menor parte de hemicelulosa, lignina y pectina, (Ballesteros et al., 2018; ETIP Bioenergy 2016). La celulosa constituye alrededor del 40 al 60% del peso seco de estos materiales, proporcionando rigidez y protección a la pared celular. Este polímero está formado por unidades de glucosa unidas por enlaces glucosídicos β (1–4) llegando a un tamaño de 500 a 1400 unidades, este tipo de enlaces no puede ser degradado por las amilasas, por lo que se requiere del uso de enzimas conocidas como celulasas (EC 3.2.1.4). El 20 a 25% del peso está compuesto por hemicelulosa, un heteropolisacárido formado por diversos azúcares como xilosa, arabinosa, galactosa, manosa y glucosa, unidos por enlaces β (1–4) para formar conjuntos de 100 a 200 unidades. La lignina es un heteropolímero compuesto por alcoholes aromáticos con la función de darle soporte estructural, rigidez, protección e impermeabilidad a los polisacáridos estructurales de celulosa y hemicelulosa, compone el 15 – 40% del peso seco de estos materiales (Ballesteros et al., 2018; Munguía, 2016; Zoghiami & Paës, 2019).

Tanto los materiales amiláceos como los lignocelulósicos pueden ser caracterizados para conocer su composición química y así poder emplearlos en procesos investigativos o industriales de una mejor manera. La caracterización de los materiales amiláceos implica medir la cantidad de almidón que estos presentan por medio de una degradación enzimática del material, incubando la muestra por media hora en presencia de alfa-amilasa y glucoamilasa, seguido por la medición de los azúcares producidos por medio de un *high performance liquid chromatograph* (HPLC por sus siglas en inglés) o por medio de métodos colorimétricos (Beth et al., 2015; McCleary et al., 2019; Sluiter & Sluiter, 2008), mientras que la caracterización de los materiales lignocelulósicos conlleva a degradar los polisacáridos estructurales (Celulosa, hemicelulosa), la pectina y la lignina por medio de hidrólisis ácida o enzimática y luego su medición por medio de HPLC para los azúcares de los polisacáridos, espectrofotómetro para los alcoholes de la lignina y precipitando la pectina (Cristancho & Monroy, 2014; secretaria de comercio y fomento industrial, 1980; Sluiter et al., 2008a; Toscano et al., 2015). Otros procesos necesarios para la caracterización de estas dos materias es la determinación de los sólidos totales y la humedad, calentando la muestra a 105 °C y midiendo la cantidad de humedad que se evaporó (Govett et al., 2010; Icontec, 2018; Sluiter et al., 2008b; Zamora et al., 2016), la determinación de las cenizas, calcinando las muestras en una mufla con rampa de calentamiento hasta una temperatura de 575 °C por 4 horas y midiendo la cantidad de residuo que no se volatilizó (Flores et al., 2021; Icontec, 2020 y 2022; Sluiter et al., 2008c) y la determinación de los extractivos, realizando la extracción de estos con solventes apolares (Hexano), polares próticos (agua) y polares apróticos (etanol) por medio de un soxhlet, y midiendo el cambio en el peso del recipiente para calcular el porcentaje de estos

presentes en las muestras (Flórez & López, 2016; Redfern et al., 2016; Sluiter et al., 2008d).

Los resultados de la caracterización siguiendo las metodologías del *National Renewable Energy Laboratory* (NREL) realizada en este trabajo se presentan como ejemplo. En la Tabla 1.1 se hace una comparación de resultados obtenidos para la fibra de maíz (una mezcla del recubrimiento de los granos de maíz y una pequeña parte del endospermo) que queda como residuo de la extracción del germen, almidón y gluten (Gáspár et al., 2005, 2007).

Comparando los resultados obtenidos por la metodología NREL, se puede apreciar que se reportan en base seca y no se reportan extractivos en los artículos de la literatura, la publicación de estos valores ayudaría a comparar los resultados y a responder por la fracción faltante en los artículos de Kalman et al., B. Zhang et al., Kaur et al., Myat & Ryu y Nouredini & Byun. Respecto al valor de las cenizas, este es comparable al obtenido por Kalman et al., Kaur et al., Myat & Ryu y Nouredini & Byun, solo presentando un 0.1, 1.3, 0.1 y 0.2% de diferencia respectivamente, el resultado obtenido por Gáspár et al. es notablemente mayor, siendo 10 veces más alto, este valor podría ser atribuido a la presencia de aditivos o contaminantes a la materia prima. El valor obtenido en este estudio con respecto a la cantidad de celulosa fue el menor, aunque es cercano al valor obtenido por Kalman et al. y Nouredini & Byun, este bajo valor puede ser explicado por qué el material utilizado es un desecho que ha sido sometido a diferentes procesos para extraer productos de interés, mientras que los materiales de la literatura es un desecho sin tratar o solo se le ha retirado el almidón. Los resultados del porcentaje de hemicelulosa se encuentran como un valor intermedio a los reportados en la literatura, mientras que el valor de lignina se encuentra entre los valores reportados por Gáspár et al. y Myat & Ryu. La cantidad de proteína presente en la fibra de maíz fue un valor intermedio a los publicados por Kálmán et al. y Kaur et al., mostrando cantidades similares en otras fibras de maíz. Durante la caracterización se llegó a un total aproximado de 113%, las caracterizaciones de biomásas por las técnicas del NREL, se acepta que se explique entre un 90 y un 110% de su composición, dada la complejidad de estos materiales. La sobreestimación en este caso, puede explicarse por qué durante la medición de los extractivos también se extrajo parte de compuestos nitrogenados y proteínas desnaturalizadas, que se solubilizan durante la extracción con agua, tenidos en cuenta en la cuantificación de la proteína de la muestra en natura. Finalmente, los resultados de la literatura que más se acercan a los resultados obtenidos en este estudio son los de Myat & Ryu, y Nouredini & Byun, este último también utilizan la metodología del NREL para caracterizar su materia prima, mostrando valores similares en el porcentaje de cenizas, humedad, sólidos, celulosa y hemicelulosa, aunque estos artículos no especifican la presencia de extractivos y utilizan fibra de maíz con presencia de almidón, lo que podría explicar parte de las diferencias en el porcentaje de glucosa, hemicelulosa y lignina, que pueden ser afectados por la presencia de este compuesto o por los procesos para retirarlo.

Tabla 1.1. Composición de la fibra de maíz base seca

Componente	Trabajo actual	(Gáspár et al., 2005)	(Kálmán et al., 2006)	(B. Zhang et al., 2021)	(Myat & Ryu, 2014)	(Kaur et al., 2020)	(Noureddini & Byun, 2010)
Metodología	NREL	No reportado	No reportado	No reportado	AOAC	AOAC y Van Soest	NREL
Humedad	8.6	-	-	-	-	-	5.3
Sólidos	91.4	-	-	-	-	-	94.7
Celulosa	14.3	20.4	15.0	26.5	20.3	22.0	17.5
Hemicelulosa	27.8	41.0	37.1	30.5	29.8	22.4	32.5
Lignina	16.7	12.2	-	-	18.5	3.1	7.8
Pectina	0.4	-	-	-	-	-	-
Proteína*	17.6	-	14.0	-	8.5	20.1	9.9
Almidón	0.00	-	21.3	12.3	-	6.9	17.7
Ceniza	0.9	8.6	1.0	-	0.8	2.1	0.6
Otros	-	17.8	3.0	2.3	-	-	11.6
Extractivos Totales	112.9	-	-	-	-	-	-
Agua	35.2	-	-	-	-	-	-
Etanol	25.5	-	-	-	-	-	-
Hexano	8.6	-	2.0	-	2.0	2.3	2.5
Total	1.1	100.0	93.4	71.6	79.8	79.0	100.0

* Muestra en natura

Fuente: elaboración propia

1.5. Pectina

La pectina es un polisacárido de alto peso molecular, conformado por hasta 17 tipos de azúcares, los cuales pueden estar enlazados por 20 tipos de enlaces diferentes dependiendo de la fuente de donde se obtiene la pectina (Bonnin & Pelloux, 2020). A pesar de la alta complejidad que le dan todos estos diferentes azúcares, la pectina presenta regiones con cierto grado de orden, la primera de estas regiones es conocida como Homogalacturonano (HG), compuesta por unidades de ácido galacturónico unidas por enlaces α (1–4) formando largas cadenas, componiendo alrededor del 60% de la pectina, las regiones lineales de ácido poligalacturónico con presencia de azúcares de xilosa y apiosa llevan el nombre de xilogalacturano y apiogalacturano. Las otras regiones principales son las regiones ramificadas de Ramnogalacturonano uno (RGI) y Ramnogalacturonano dos (RGII), formados por una cadena central de ácido galacturónico unida por enlaces α (1–4) entrelazado con restos de L-ramnosa con un enlace α (1-2), estos residuos sirven como anclaje para cadenas laterales compuestas de monosacáridos como la α -L-arabinosa o D-galactosa para el RGI y de otros azúcares poco frecuentes como la apiosa, o ácido acérico para el RGII, unidas por enlaces β (1–4) y β (1–2) a la cadena principal de ácido galacturónico y L-ramnosa (Ravve, 2012; Ropartz & Ralet, 2020; Van Buren, 1991), esta estructura puede ser apreciada en la figura 1.1, mostrando los azúcares y enlaces que componen estas diferentes regiones.

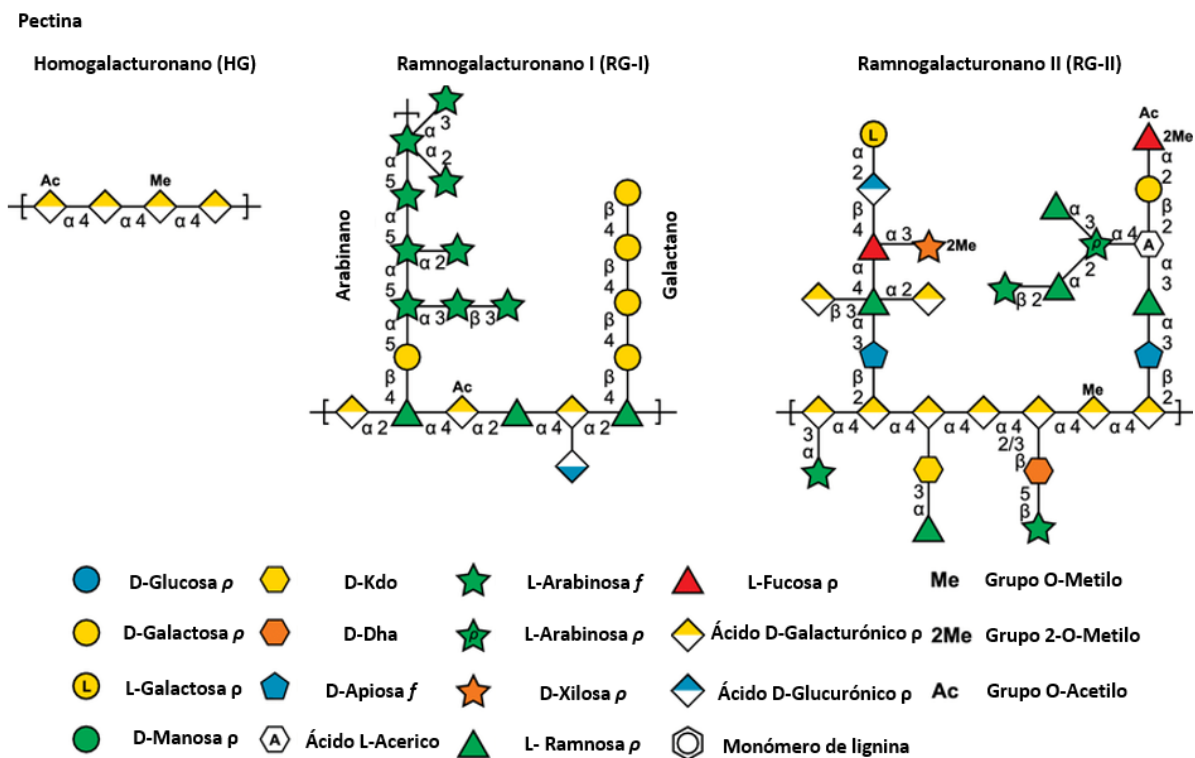


Figura 1.1. Estructura de las principales regiones de la pectina. Adaptado de “Correction to: Combined whole cell wall analysis and streamlined in silico carbohydrate- active enzyme discovery to improve biocatalytic conversion of agricultural crop residues” por Tingley et al. 2021, *Biotechnology for Biofuels* 14.

La pectina se encuentra en la pared celular y capas intercelulares de las células vegetales, principalmente en las cáscaras de las frutas, el mucílago y las raíces de las plantas terrestres superiores, permitiendo la adhesión de las células unas con las otras al entrelazarse con las cadenas de celulosa, hemicelulosa y lignina (BeMiller, 2019a; Flutto, 2003; Yang & Anderson, 2020). La pectina se caracteriza por la formación de geles cuando las largas cadenas de HG se entrecruzan unas con las otras, formando una red tridimensional de moléculas en la cual partículas sólidas y disueltas quedan atrapadas. Este proceso se da por dos maneras diferentes dependiendo del grado de metilación de la pectina, para pectinas con un bajo grado de metilación, la presencia de una alta concentración de azúcares y un pH bajo llevan a la deshidratación de sus moléculas, permitiendo una interacción hidrofóbica y la formación del gel; para las pectinas de alto grado de metilación, la presencia de iones de calcio es suficiente para formar enlaces entre los residuos metilados. La presencia de cadenas laterales en las regiones del RGI y el RGII evitan una sobreinteracción de los geles, que podría llevar a un aumento de la densidad y la precipitación de estos sólidos (BeMiller, 1986; Gawkowska, 2018). Aunque esta capacidad de formar geles hace a la pectina un compuesto útil para la producción de geles de soporte, postres y otros usos ingenieriles, médicos y gastronómicos, al quedar suspendidos los sólidos, estos dispersan la luz que incide a los jugos, vinos y jarabes, reduciendo su claridad, adicionalmente, a esto, la presencia de los geles causan un aumento de la viscosidad, lo que dificulta los procesos de extracción, transporte y clarificación posteriores (Archut et al., 2023; Pinelo et al., 2010; U.S. Geological Survey, 2018). Cuando se preparan jarabes glucosados se degradan las cadenas de celulosa o almidón en los residuos agroindustriales, con enzimas o ácidos para generar glucosa, y la hemicelulosa, lignina y pectina con pretratamientos para permitir un mejor acceso por parte de las enzimas, pero estos procesos no degradan completamente los polisacáridos dejando residuos de pectina y sólidos suspendidos, que llevan a un aumento de la turbiedad del producto.

1.6. Métodos de producción de jarabe

Para la obtención de jarabes edulcorantes con diferentes niveles de dulzura se emplean diferentes métodos de producción, el método ácido emplea compuestos ácidos para fomentar la hidrólisis de los enlaces glucosídicos en la celulosa y el almidón con el fin de crear un jarabe con una concentración de azúcares del 36 al 42% de equivalente de dextrosa (DE) (Belitz et al., 2009b; Hobbs, 2009; Lloyd & Nelson, 1984). Por otro lado, el método enzimático permite la obtención de jarabes con una concentración de azúcares entre el 63 y 95%, a partir del hidrolizado con un DE entre el 36 y el 42% producido en el método ácido o soluciones concentradas de almidón (BeMiller, 2019; Hebeda, 1993; Hull, 2010b).

1.6.1. Método ácido

En el método ácido se emplea ácido hidroclicórico para acidificar y gelatinizar una solución de almidón con 30 a 40% de sólidos, esta solución se hace pasar a través de dos intercambiadores de calor con una temperatura de 143 y 135 °C respectivamente, rompiendo los enlaces de la amilosa y la amilopectina para generar una solución opaca de glucosa sin concentrar. Posteriormente, se añade carbonato de sodio para subir el pH a 4.5, parando la hidrólisis y precipitando las proteínas presentes en la solución, las cuales son removidas junto con otros contaminantes por un proceso de centrifugación y/o filtración, clarificando el jarabe. Por la aplicación del ácido se producen algunas reacciones indeseadas con la materia prima y los metales del equipo, que producen compuestos como el furfural o el hidroximetilfurfural por la deshidratación de la glucosa, los cuales son tóxicos y producen sabores, olores y colores indeseados, por lo que es necesario pasar el jarabe a través de filtros de carbón activado e intercambio iónico, que tiene la capacidad de adsorber estos contaminantes y otros compuestos orgánicos e iónicos respectivamente. Finalmente, se concentra el jarabe evaporándose al vacío, evitando la formación de compuestos coloreados, llevando el jarabe al DE y viscosidad deseados, parando el crecimiento de microorganismos por la alta concentración de azúcar (Belitz et al., 2009b; BeMiller, 1986; Hull, 2010b).

1.6.2. Método enzimático

Para la producción de jarabes con un DE más alto se utilizan enzimas como las amiloglucosidasas, α -amilasas y/o enzimas productoras de maltosa, usando como sustrato el jarabe centrifugado y filtrado obtenido a partir del método ácido o soluciones de almidón pretratadas con ácido diluido, alta temperatura y presión (185 °C y 150 PSI). Generando jarabes con un DE del 63 y 95% respectivamente, los cuales son clarificados, decolorados y concentrados para obtener el producto final (BeMiller, 2019; Domínguez et al., 2004; Hebeda, 1993).

El método empleado por el grupo de Investigación Bioprocesos y Flujos Reactivos en la línea de investigación pretratamiento de residuos agroindustriales por vía química y enzimática, de la universidad Nacional de Colombia - sede Medellín (BIOFRUN) empieza con la caracterización de la materia prima, siguiendo los protocolos del National Renewable Energy Laboratory (NREL), permitiendo conocer las características del material y poder escoger las condiciones de pretratamiento (molienda, gelatinización, uso de ácidos, etc.) y de proceso (tiempo, cantidad y tipo de enzima, etc.), con este conocimiento se puede proceder a realizar la hidrólisis, transformando residuos agroindustriales en jarabes ricos en glucosa utilizando enzimas para degradar la celulosa que los compone, los cuales pueden ser isomerizados para producir jarabes glucosados y fructosados con un nivel de dulzura más alto (Bueno, 2018; de Barros et al., 2019; Pihlajaniemi et al., 2020; Ruiz & Bueno, 2017). En la tabla 1.2, se presentan las diferentes condiciones, ventajas y desventajas que tienen estos diferentes métodos de producción.

Tabla 1.2. Métodos para la producción de jarabes

Método de producción	Condiciones	Ventajas	Desventajas	Fuente
Ácido	Temperatura: 135 y 143 °C pH: 1.65 30 - 40 % de sólidos Presión: 5.4 atm	- Ampliamente empleado y estudiado. - Método rápido: 15 a 20 minutos para la hidrólisis.	- Mantenimiento constante de los equipos por las propiedades corrosivas del ácido. - Se producen subproductos tóxicos o peligrosos, los cuales deben ser eliminados del jarabe.	(BeMiller, 2019; Belitz, 2009; Hobbs, 2009; Hull, 2010b)
Enzimático	Temperatura: 60 °C pH: 4.7 30 - 40 % de sólidos Uso de amilasas y glucoamilasas	- No se producen subproductos tóxicos o peligrosos. - Jarabe con alta concentración de azúcares.	- Requiere pretratamiento de la materia prima para conseguir una solución rica en almidón. - Lento, 36 horas de hidrólisis.	(BeMiller, 2019; Belitz, 2009; Hobbs, 2009; Hull, 2010b; Quaglia & Gennaro, 2003)
Enzimático a partir de residuos lignocelulósicos	Temperatura: 50 °C pH: 5 7% de sólidos Uso de amilasas y glucoamilasas o celulasas	- Producción a partir de desechos agroindustriales. - No se producen subproductos tóxicos o peligrosos.	- Método en desarrollo. - Requiere pretratamiento de la materia prima para degradar la hemicelulosa y lignina. - Lento, 48 horas de hidrólisis.	(de Barros et al., 2019; Pihlajaniemi et al., 2020; Ruiz-Colorado & Bueno, 2017)

Fuente: elaboración propia

1.7. Métodos de separación y clarificación del jarabe

Una vez finalizada la hidrólisis se realiza el proceso de separación y clarificación del jarabe producido, degradando o retirando compuestos como enzimas, otras proteínas, restos de la pared celular, grasas, aceites y otro material que no fue hidrolizado, los cuales le dan una apariencia turbia y opaca a los jarabes. Para realizar este procedimiento existen diversos métodos químicos y físicos, cada uno con sus propias ventajas y desventajas.

1.7.1. Precipitación/sedimentación/decantación

En este proceso se deja el jarabe en reposo por un periodo prolongado de tiempo, permitiendo que las partículas con una mayor densidad se desplacen al fondo del recipiente por acción de la gravedad, los cuales son separados del clarificado usando succión o vertiendo la parte superior del fluido. Este proceso depende de la diferencia de densidad entre los compuestos, la viscosidad del fluido, el tamaño de partícula y la fuerza de gravedad (Fitch, 1962; Pérez, 2005; Letki, 2000a). Una dificultad de este proceso es que requiere extensos períodos de reposo y los sólidos precipitados pueden ser perturbados con facilidad si se agita el fluido (Domínguez et al., 2004).

1.7.2. Centrifugación

Este método de clarificación permite separar los residuos más densos del jarabe por medio de la aplicación de una fuerza centrífuga, la cual es generada al hacer rotar las muestras alrededor de un eje a altas velocidades, forzando las partículas con mayor

densidad/tamaño a moverse al punto más alejado del eje, concentrando estos compuestos en el fondo del recipiente en centrífugas discontinuas o removiéndolos en el caso de centrífugas continuas. Este método de separación está influenciado por la densidad de los compuestos a separar, la viscosidad del fluido, la temperatura a la cual se realiza el proceso y la velocidad/rotaciones por minuto de la centrífuga. El proceso tiene las ventajas de no añadir ningún compuesto químico al jarabe, ser rápido y simple, aunque se tiene el problema de requerir equipamiento costoso y con una alta necesidad de mantenimiento por sus múltiples partes móviles, además que, si los sólidos son muy finos, estos no se compactan bien al fondo del recipiente, por lo que son fáciles de perturbar al momento de separarlos del jarabe (Domínguez et al., 2004; Letki, 2000b; Silayo et al., 2003; Stephenson, 2016).

1.7.3. Filtración

En este método de separación se hace pasar el jarabe a través de un medio poroso, el cual permite el paso de este, pero atrapa las partículas que tienen un tamaño mayor que el de los poros. Para lograr este proceso se aplica presión o vacío para generar una fuerza impulsora que hace pasar el líquido de un lado del filtro o membrana al otro. Este proceso puede ser clasificado en filtración, microfiltración (poros de 0.1-10 μm), ultrafiltración (poros de 0.001-0.1 μm) y nanofiltración (poros de 0.1 nm-0.001 μm) de acuerdo con el tamaño de las partículas que son retenidas (Asociación Española De Desalación Y Reutilización, 2020, Moldoveanu & David, 2021; Worsfold et al., 2005). En los últimos años, se ha estudiado una nueva técnica de clarificación en la cual se usan membranas de microfiltración no solo para remover los contaminantes, sino para concentrar el jarabe y remover el color, sin requerir tanto equipo o espacio (Almandoz et al., 2010; Li et al., 2016; Słomińska & Niedbacha, 2009).

1.7.4. Floculación / Coagulación

Este es un proceso de dos fases, en la primera parte de coagulación se añade un compuesto que neutraliza las cargas de las partículas dispersas en la solución, que por su pequeño tamaño y baja densidad no precipitan. Al neutralizar estas cargas se elimina la fuerza que evitaba la aglomeración de estas pequeñas partículas formando microflóculos. En la segunda parte de floculación se añaden polímeros de alto peso molecular a los cuales se adhieren los microflóculos formando flóculos de mayor tamaño que puede ser separados con más facilidad por otros métodos de separación como la sedimentación, filtración, centrifugación o aireación (Lozano, 2003; Cruz et al., 2019; Domínguez et al., 2004; Kuma, 2018).

1.7.5. Adsorción

La adsorción se realiza para remover los compuestos biológicos solubles no polares que causan colores, olores y sabores indeseados en los jarabes. Este proceso puede ser realizado porque el carbón activado tiene una enorme cantidad de microporos (< 2 nm) y mesoporos (2-50 nm) que le dan una gran área superficial (hasta 2500 m²/g) y por qué al momento de calcinar el carbón se eliminan la mayor cantidad de elementos diferentes al carbono lo que hace que estas superficies presentan una alta naturaleza no polar, haciendo que los contaminantes no polares se adhieran a estos poros por medio de fuerzas de dispersión de London y van der Waals, aunque esta adsorción tiene la desventaja de adsorber parte de las azúcares del jarabe (Bansal & Goyal, 2019; Domínguez et al., 2004; Djalal et al., 2019; Mudoga et al., 2008; Nowicki, 2016).

1.7.6. Uso de membranas de intercambio iónico

Los minerales, sales y otros compuestos inorgánicos cargados que pueden generar cambios de color, sabor y olor indeseados en el jarabe son removidos usando este proceso. Para lograr esto se emplean geles que han sido tratados para generar grupos cargados positiva o negativamente a los cuales se pueden adherir los iones por medio de interacciones ion-ion. Una vez se acaba el proceso, estos grupos son regenerados haciendo pasar soluciones de ácidos y bases fuertes (Ácido clorhídrico, hidróxido de sodio, amoniaco, etc.), que retiran los iones y los reemplaza con otros que no se adhieren tan fuertemente (Poole & Cooke, 2000; Kwan, 2018). Para el tratamiento de jarabes se utilizan tanto los procesos de intercambio aniónico como los de intercambio catiónico, usualmente en una serie de pares de columnas que son rotadas a medida que éstas se saturan de contaminantes (Hull, 2010a).

La Tabla 1.3 presenta las ventajas y desventajas de los diferentes métodos, encontradas en la literatura y durante la experimentación.

Los métodos de centrifugación y precipitación, a pesar de ser capaces de producir jarabes relativamente claros, tener una buena remoción de sólidos (97.69% y 86.45% respectivamente) y ser los más sencillos, no forman precipitados compactos, los cuales son fácilmente perturbados al momento de separarlos del jarabe, además se pierde una considerable cantidad del jarabe que no puede ser separado de los sólidos, por lo que presentan un bajo rendimiento (44.0 a 53.33%), lo que lleva a que no sean muy usados en la industria o la investigación (Domínguez et al., 2004). El método con la mejor remoción de sólidos (99.99%) y el mejor rendimiento (~100.00) al momento de obtener jarabes clarificados es el uso de la filtración, empezando en filtros de mayor tamaño de poro y a los de menor tamaño, esto se hace con el fin de mejorar el proceso de clarificación y aumentar la vida de las membranas de microfiltración reduciendo la incrustación de sólidos y el taponamiento no reversible de los poros; sin embargo, es un proceso costoso (Almandoz et al., 2010; Bueno, 2018; Domínguez et al., 2004; Li et al., 2016).

La floculación no es un proceso de clarificación muy efectivo por su cuenta, pero al combinarse con los procesos anteriores, mejora su rendimiento (sedimentación: 44.0 a 52.0%, centrifugación: 53.33 a 58.33% y filtración: 78.0 a 87.0%) y la capacidad de eliminar sólidos (sedimentación: 86.45 a 98.13%, centrifugación: 97.69 a 98.13% y filtración: 89.1 a 93.8%). Los procesos de adsorción con carbón activado y membranas de intercambio iónico no son muy usados para clarificar el jarabe, pero son los mejores al momento de eliminar sustancias coloreadas y olores y sabores indeseados, el primero es útil para eliminar sustancias apolares, mientras que el segundo se encarga de eliminar compuestos polares como las sales (Domínguez et al., 2004) pero esta capacidad de adsorber compuestos tiene la desventaja de retener azúcares reduciendo el poder edulcorante de los jarabes decolorados.

Tabla 1.3. Ventajas y desventajas de los métodos de clarificación.

Método	Ventajas	Desventajas	Referencia
Precipitación/ sedimentación/ decantación	<ul style="list-style-type: none"> - Simple - No requiere de equipo adicional. - Buena eliminación de sólidos. - Se realiza a condiciones ambiente. 	<ul style="list-style-type: none"> - Lento - Los sedimentos pueden ser perturbados con facilidad. - Bajo rendimiento de la operación ~55% (volumen del clarificado/volumen inicial) 	(Domínguez et al., 2004)
Centrifugación	<ul style="list-style-type: none"> - Simple - Rápido. - Buena eliminación de sólidos. - Puede ser realizado a condiciones ambiente. 	<ul style="list-style-type: none"> - El equipo puede ser costoso y requerir un alto mantenimiento. - Los sedimentos pueden ser perturbados. - Bajo rendimiento de la operación ~50% 	(Domínguez et al., 2004)
Filtración	<ul style="list-style-type: none"> - Permite eliminar la mayor cantidad de partículas coloidales en el jarabe. - Alto rendimiento de la operación 70% para la filtración y de 100% para la filtración seguida de ultrafiltración - Buena eliminación de sólidos. 	<ul style="list-style-type: none"> - El uso de filtros más finos requiere equipos de mayor tamaño, potencia y costo. - Proceso en etapas para obtener los mejores resultados y reducir la obstrucción de los filtros (Filtros más gruesos a más finos). - Pérdida de parte del jarabe al quedarse adherido a los filtros. 	(Almandoz et al., 2010; Bueno, 2018; Domínguez et al., 2004; Li et al., 2016)
Floculación / Coagulación	<ul style="list-style-type: none"> - Facilita la separación de las partículas en otros procesos de separación. - Los floculantes y coagulantes utilizados no son muy costosos. - Buena eliminación de sólidos al combinarse con otros métodos. 	<ul style="list-style-type: none"> - Requiere de un segundo proceso para eliminar los flóculos obtenidos. - El tamaño variado de las partículas que causan la turbidez en el jarabe dificulta el proceso de nucleación. 	(Cruz et al., 2019; Domínguez et al., 2004)
Adsorción	<ul style="list-style-type: none"> - Mejor eliminación de color y sabores y olores indeseados al adsorber compuestos apolares. 	<ul style="list-style-type: none"> - Se adsorbe una considerable cantidad de azúcares. - Se requiere el lavado del carbón activado con agua para recuperar parte del jarabe, por lo que se alargan los procesos de concentración. - El calentamiento de la muestra puede generar color 	(Domínguez et al., 2004; Kwan et al., 2018; Montañez Soto et al., 2011; Mudoga et al., 2008)
Uso de membranas de intercambio iónico	<ul style="list-style-type: none"> - Eliminación de compuestos tóxicos / colores / sabores / olores indeseados al atrapar compuestos polares o iónicos. 	<ul style="list-style-type: none"> - Las membranas tienen que ser regeneradas usando ácidos y bases fuertes, los cuales tienen que ser tratados para ser dispuestos. - Pérdida de parte del jarabe al quedarse adherido a las membranas. 	(Hull, 2010; Kwan et al., 2018; Silayo et al., 2003)

Fuente: elaboración propia

1.8. Clarificación enzimática

Un método de clarificación que ha sido utilizado frecuentemente por la industria de los jugos de fruta y los vinos, es el uso de enzimas para catalizar la degradación de la pectina, reduciendo la turbiedad y la viscosidad de los jugos, facilitando los procesos de maceración de la fruta y el procesamiento del jugo, obteniendo mayor cantidad de jugo, y mejorando su presentación obteniendo productos menos coloreados, menos turbios, aumentando la claridad en 5 a 20% y con menos partículas flotantes (Cerreti et al., 2017; Hosseini et al., 2021; Kharazmi et al., 2020; Ladeira Ázar et al., 2020). Para este proceso se utiliza una familia de enzimas conocidas como enzimas pectídicas, las cuales se encargan de modificar o degradar la pectina en muchos procesos biológicos como la maduración de frutas o degradación de paredes celulares.

1.8.1. Enzimas pectídicas

La presencia de la pectina en la pared celular de las plantas dificulta el ataque de los patógenos como los hongos del género *Aspergillus* o las bacterias del género *Enterobacter*, llevando a que estos microorganismos generen enzimas que permiten su degradación. Otra fuente importante de estos compuestos son las plantas en sí, ya que estas proteínas tienen gran importancia en los procesos de maduración de las frutas, dentro de esta gran familia de enzimas se destacan tres subcategorías en particular (Hosseini et al., 2021).

Poligalacturonasa (PG): este tipo de enzima tiene la función de catalizar la hidrólisis de los enlaces α (1-4) presentes en las cadenas de ácido poligalacturónico no metiladas del HG, generando unidades de ácido galacturónico. Dependiendo de donde se realizó el corte, estas enzimas pueden ser separadas en endo-poligalacturonasas (EC 3.2.1.15) y exo-poligalacturonasa (EC 3.2.1.67), las endo-poligalacturonasas realizan los cortes en el interior de la cadena generando polisacáridos de menor tamaño, mientras que las de tipo exo actúan en los extremos de estas nuevas cadenas, reduciendo el tamaño de estas una unidad a la vez (Cho et al., 2001; Santen et al., 1999; Tu et al., 2016). Este tipo de enzimas presenta una estructura cuaternaria compuesta por dos cadenas polipeptídicas, formadas principalmente por giros, láminas y protuberancias beta, formando una estructura cilíndrica con una hendidura en la parte exterior donde se encuentra el sitio activo de la enzima, el cual está compuesto por la asparagina 178, el aspartato 180, 201 y 202, la histidina 223, la Glicina 224, la arginina 256, y La lisina 258. La poligalacturonasa dos obtenida del hongo *Aspergillus niger* presenta un peso molecular de 76.27 kDa y una longitud de 724 aminoácidos (RCSB protein data bank, s.f.a, Santen et al., 1999). La estructura cuaternaria de una poligalacturonasa puede ser apreciadas en la figura 1.2.

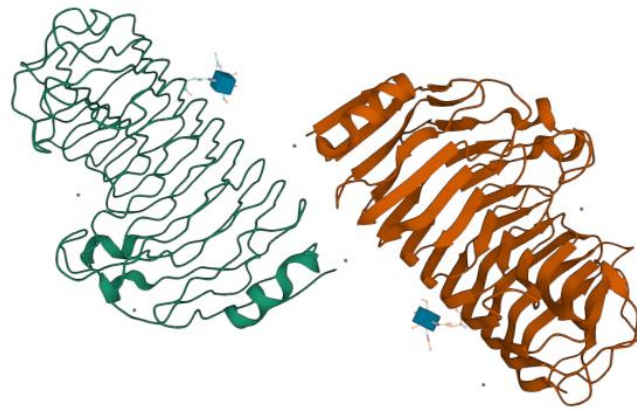


Figura 1.2. Estructura de la poligalacturonasa. Adaptado de “1CZF Endo-polygalacturonase ii from *Aspergillus niger*” en la base de datos RCSB protein databank. <https://www.rcsb.org/structure/1czf>

Pectin liasa (PL): al igual que las poligalacturonasas estas enzimas se encargan de cortar los enlaces glucosídicos α (1-4) entre las unidades de ácido D-galacturónico en las regiones no metiladas del HG., la diferencia radica en que, no es por medio de la hidrólisis, sino a través de un proceso de β -eliminación que genera compuestos con insaturaciones, necesitando iones Ca^{2+} como cofactores. Estas enzimas también pueden encontrarse en forma endo (EC 4.2.2.2 y 4.2.2.10) y exo (EC 4.2.2.9) cortando la pectina en su interior o sus extremos respectivamente (Saharan & Sharma, 2019; J. Zhang et al., 2021; Zheng et al., 2022). La estructura de las pectin liasas está principalmente compuesta por láminas y giros beta, conformando dos cadenas polipeptídicas, formando una estructura con hendiduras donde entran las cadenas de pectina, que reaccionan con los Aspartato 154, Arginina 176 y Arginina 236 del sitio activo. El peso de la pectinliasa A del *Aspergillus niger* es de 75.92 kDa, presenta una longitud de 718 péptidos y su estructura puede ser apreciada en la figura 1.3 (Mayans et al., 1997; RCSB PDB s.f.b).

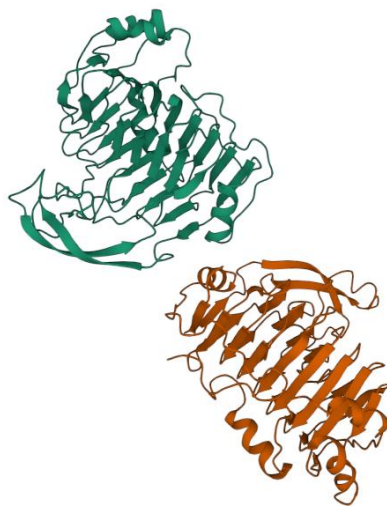


Figura 1.3. Estructura de la pectin liasa. Adaptado de “1IDJ Pectin lyase A” en la base de datos RCSB protein databank. <https://www.rcsb.org/structure/1idj>

Pectin metilesterasa (PME): también conocidas como pectilhidrolasas o pectinmetilesterasas (EC 3.1.1.11), estas son las enzimas que se encargan de la demetilesterificación de los grupos metil éster del ácido D-galacturónico liberando protones y metanol, generando regiones de ácido poligalacturónico permitiendo una mejor interacción entre las poligalacturonasas y las pectinliasas, facilitando su degradación (Fries et al., 2007; Johansson et al., 2002; Pinchao et al., 2014). A diferencia de las otras dos enzimas, la pectin metilesterasa está compuesta por una sola cadena de aminoácidos, la cual está formada principalmente por láminas y giros beta, formando una hendidura donde se encuentra el sitio activo, conformado por los aspartatos 178 y 199, y las glutaminas 153 y 177. La pectin metilesterasa del *Aspergillus niger* tiene una longitud de 299 residuos y un peso de 33.05 kDa, en la figura 1.4 se puede apreciar su estructura (Kent et al., 2016; RCSB PDB s.f.c).

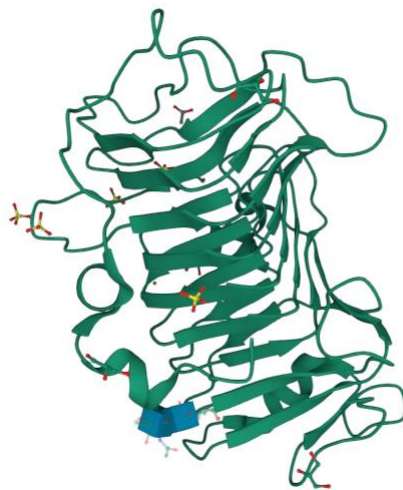


Figura 1.4. Estructura de la Pectin metilesterasa. Adaptado de “5C1E Crystal Structure of the Pectin Methylesterase from *Aspergillus niger* in Penultimately Deglycosylated Form (N-acetylglucosamine Stub at Asn84)” en la base de datos RCSB protein databank. <https://www.rcsb.org/structure/5c1e>

1.8.2. Clarificación enzimática de jarabes

El uso de enzimas pectínicas para la clarificación de jarabes no es una idea completamente nueva, diversos investigadores como Abbès et al. (2011), Borchani et al. (2019) y Hosseini et al. (2021) han estudiado el pretratamiento de jarabes de dátil y tuna con enzimas pectínicas, aplicando la solución enzimática a los jugos que se desean concentrar para preparar los jarabes, degradando la pectina, clarificando y reduciendo la viscosidad de los jugos antes de ser concentrados. En el trabajo realizado por Abbès et al. se trataron 20 g de pasta de dátil disuelta en 60 mL de agua destilada con 50 U de pectinasa y 5 unidades de celulasa para mejorar la extracción del jugo y obtener un jugo con menos turbiedad, logrando un aumento de los sólidos disueltos del 2.87% y reduciendo la turbiedad en 83.73%. Para el trabajo de Borchani et al. se incubaron los jugos de tuna con 20 U de pectinasa y 5 U de celulasa para realizar la extracción y clarificación, calentando las muestras a 50 °C por 150 minutos, aumentando los sólidos

disueltos en 1.65% y reduciendo la cantidad de pectina de 1.51% a 0.67%, degradando este compuesto en un 55.63%. Para el trabajo de Hosseini et al. se realizó la clarificación de jugo de dátil utilizando 0.011 g de pectinasa por cada 100 mL de jarabe, incubando la muestra de 40–50 °C, reduciendo la turbiedad de la muestra en un 93.6%, este experimento difiere de los demás porque se usa gelatina para aumentar la viscosidad de los jarabes aplicando 0.009 g por cada 100 mL de jarabe.

Por las similitudes entre los procesos de clarificación de jugos de fruta y estos trabajos anteriores para el pretratamiento de jarabes, se planteó la idea de aplicar este método de clarificación en los jarabes producidos a partir de residuos agroindustriales, ambos métodos comienzan con la obtención de un líquido rico en azúcares y presencia de pectina (jugo de fruta o hidrolizado), el cual es clarificado para eliminar su turbidez y finalmente es concentrado para obtener el jarabe, y en ambos casos la presencia de pectina es un factor contribuyente a la turbidez de estos.

1.9. Modelamiento del proceso de clarificación

El uso de modelos computacionales y simulaciones es una herramienta útil en la industria, con ventajas como realizar procedimientos prolongados en cuestión de segundos, no utilizar reactivos peligrosos o costosos, seguir el desarrollo de procesos siendo capaz de retroceder o avanzar en el tiempo, etc. Aunque no son muy numerosos, en la literatura se pueden apreciar trabajos que modelan partes del proceso de degradación de la pectina o la clarificación de jugos o jarabes. En el estudio realizado por Massa et al. (2007) se estudia el método de acción de una poligalacturonasa obtenida de la bacteria *Burkholderia cepacia*, estudiando empíricamente como la enzima corta la molécula de pectina y sus oligosacáridos, midiendo la frecuencia de ataque a los diferentes puntos de corte, la selectividad y parámetros cinéticos para cada sustrato, generando un modelo capaz de simular la degradación de la pectina y la formación de estos oligosacáridos de una manera bastante cercana a la realidad. En el trabajo publicado por Bernardi et al. (2019) se modela la clarificación del jugo de caña de azúcar por medio de la aplicación de ozono, para generar su modelo, estos experimentadores midieron cómo cambia la absorbancia del jugo a medida que se aplica el ozono, y luego por medio de suposiciones y correlaciones se llega a una ecuación que puede ser ajustada comparando los resultados obtenidos con la simulación contra los resultados experimentales. Existen otros trabajos como los publicados por Hassan et al. (2022) o Kaur et al. (2011) donde se busca la optimización de los procesos de clarificación por medio de modelos neuronales o metodología de superficie de respuesta, aunque estos solo se centran en encontrar los mejores parámetros para lograr la clarificación y lograr una simulación de este, sin estudiar cómo funciona el proceso de degradación de pectina. Como el uso de enzimas para la clarificación de jarabes no ha sido muy estudiado, no existen trabajos donde se modelen este tipo de procesos, pero con los trabajos anteriores y experimentación se puede llegar a proponer una simulación del proceso.

Con el fin de crear un modelo confiable y preciso, es necesario conocer y poder incorporar matemáticamente la mayor cantidad de procesos físicos y químicos que se pueda, sin llegar al punto de sobre complicar el sistema, realizando suposiciones y simplificaciones que permitan tener en cuenta estos procesos de una manera fácil de aplicar. El proceso de realizar modelos matemáticos comienza con un estudio del proceso en sí, decidiendo cuán complicado se desea hacer el modelo, luego se incorporan las diferentes ecuaciones diferenciales y constitutivas que rigen los fenómenos del modelo, y finalmente se verifica y valida el modelo con datos experimentales reales (Álvarez et al., 2009; Gómez et al., 2008; Ortega et al., 2016). En los procesos donde se trabaja con enzimas es muy importante conocer con qué tipo de modelo cinético trabajan las enzimas, si la velocidad con la que realizan la catálisis depende de la cantidad de sustrato relativo a la cantidad de enzima, además de los parámetros cinéticos de la enzima.

1.9.1. Cinética del proceso de clarificación

El proceso de degradación de la pectina comienza cuando la enzima pectinesterasa cataliza la eliminación de los grupos metilo del esqueleto de ácido poligalacturónico, liberando metanol en el proceso (Fries et al., 2007; Johansson et al., 2002). Estas unidades de ácido galacturónico libres de grupos metilo son el sustrato donde actúan la poligalacturonasa y la pectinliasa. La poligalacturonasa cataliza la hidrólisis de los enlaces glucosídicos que se encuentran junto a los grupos carboxilos libres, (Cho et al., 2001, 2001; Santen et al., 1999; Tu et al., 2016). La pectinliasa por su parte, realiza un corte por medio de una beta eliminación, generando productos con dobles enlaces (Novoa De Armas et al., 2004), este proceso de degradación puede ser apreciado en la figura 1.5.

Las poligalacturonasas y las pectinliasas pueden categorizarse aún más, dependiendo de donde se realicen el corte de la pectina, la primera de estas categorías son las denominadas exo-poligalacturonasa y exo-pectinliasa, que realizan los cortes en los extremos de la molécula, generando un monosacárido. Las otras categorías son las endo-poligalacturonasas y endo-pectinliasas que cortan la pectina en su interior, generando polisacáridos de menor tamaño que el original. Estas dos categorías de enzimas trabajan en conjunto para degradar más efectivamente la pectina, reduciendo el tamaño inicial de la molécula con las endo y luego cortando los extremos generados con las exo (Benen et al., 1999; Bonnin & Pelloux, 2020; Desagiaco et al., 2021; Massa et al., 2007; Ropartz & Ralet, 2020).

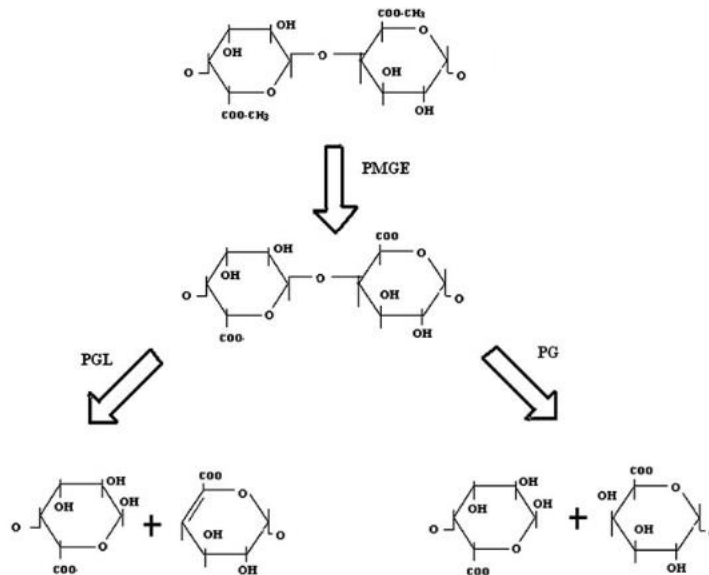


Figura 1.5. Proceso de degradación de la pectina. Adaptado de “Microbial pectinase: sources, characterization and applications” Sharma et al. 2013. 12, 45–60

Según los estudios realizados por Bélafi-Bakó et al. (2007), Dalagnol et al. (2017) y Todisco et al. (1994), las enzimas pectídicas presentan una cinética de Michaelis-Menten, mostrando como las enzimas se van saturando a medida que la concentración de sustrato aumenta, hasta que se llega a una velocidad máxima donde la velocidad de la reacción no aumentará si se incrementa la cantidad inicial de sustrato. Este modelo fue propuesto en 1913 por el bioquímico, fisicoquímico y médico alemán Leonor Michaelis y la doctora canadiense Maud Leonora Menten, siguiendo la ecuación 1.1, conocida como ecuación de Michaelis-Menten:

$$V = \frac{d[P]}{dt} = V_{max} * \frac{[S]}{K_M + [S]} \quad (1.1)$$

Donde la velocidad (V) de la enzima depende de la concentración de sustrato, la velocidad máxima de la enzima con ese sustrato específico (V_{max}), y el K_M , una constante que corresponde a la concentración de sustrato cuando la V es igual a $V_{max}/2$.

1.9.2. Propuesta de un modelo para la clarificación enzimática de jarabes

Buscando en la literatura se encontraron algunos modelos que explicaban el proceso de degradación de la pectina, según el estudio realizado por Todisco et al. en 1994, cuando la pectinasa obtenida del moho *Rhizopus* reacciona con la pectina se generan inicialmente fragmentos de pectina con un peso molecular de 50000 a 10000 UMA, las cuales vuelven a reaccionar generando fragmentos de 10000 a 2000 UMA, que finalmente se degradan en oligosacáridos de ácido poligalacturónico de 1 a 9 unidades (2000-212 UMA), midiendo la producción de los diferentes fragmentos por medio de membranas de microfiltración del

tamaño correcto. Por su parte, Wang et al. publicaron en el 2007 un artículo que modela el proceso de degradación de pectina por medio de la ecuación cinética empírica de “Ghose–Walseth” presentada a continuación:

$$P = K * t^m \quad (1.2)$$

Que explica la producción de ácido galacturónico en función de una constante cinética K, el tiempo t y un parámetro m característico del sistema enzima sustrato. Otro mecanismo fue propuesto por Massa et al. (2007), este explica que la pectina se degrada inicialmente en fragmentos de 6 a 3 unidades de ácido poligalacturónico, los cuales vuelven a reaccionar para producir trisacáridos, disacáridos y monosacáridos de ácido galacturónico. De estos se escogió como base el modelo publicado por Massa et al., que explica la degradación de pectina paso a paso, se puede medir los productos fácilmente por medio del HPLC o método DNS y se tienen otros artículos para completar el modelo para la pectinasa obtenida del hongo *Aspergillus niger*, que muestran las reacciones y parámetros cinéticos.

En total se utilizaron los trabajos realizados por Bélafi-Bakó et al. (2007), Bennen et al. (1996 y 1999), Massa et al. (2007), Rexová-Benková (1973) y Rosso et al. (1993 y 1995). Del trabajo de Massa et al. se obtiene la suposición de que la pectina se degrada inicialmente por la enzima en oligosacáridos de 3 a 6 unidades de ácido galacturónico, los cuales luego vuelven a reaccionar con la enzima para formar trímeros, dímeros y monómeros de ácido galacturónico que se acumulan. De los trabajos realizados por Bennen et al. y Rexová-Benková se obtienen las reacciones que realiza la enzima específica del *Aspergillus*, en que proporción son formados los productos y los parámetros cinéticos para la degradación de estos oligosacáridos. Haciendo la suposición de que la pectina se fragmenta inicialmente en partes iguales para la generación de los oligosacáridos de mayor tamaño y con la información anterior, se crea el siguiente mecanismo de reacción.

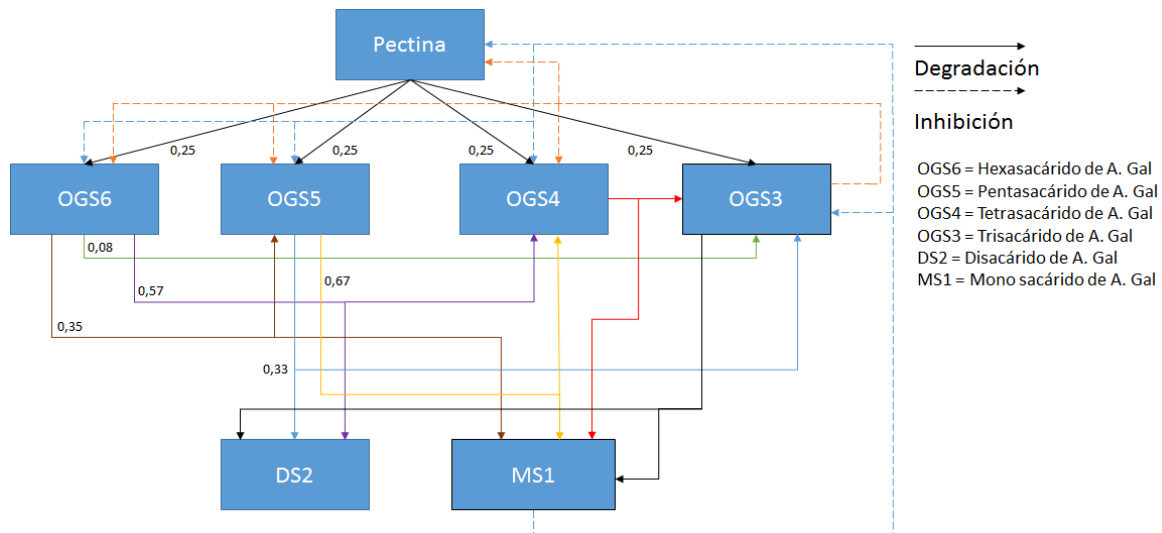


Figura 1.6. Mecanismo de reacción propuesto para la degradación de la pectina usando la poligalacturonasa del *Aspergillus niger*. Adaptado de los trabajos de Bélafi-Bakó et al. (2007), Bennen et al. (1996 y 1999), Massa et al. (2007), Rexová-Benková (1973) y Rosso et al. (1995).

Combinando el mecanismo obtenido con la información de la cinética de Michaelis-Menten y la inhibición causada por el monómero y trímero obtenida de los artículos de Bélafi-Bakó et al. y Rexová-Benková, y las ecuaciones para tener en cuenta el efecto de la temperatura y el pH del artículo de Rosso et al. Se genera el modelo para la degradación de la pectina, por medio de una serie de ecuaciones diferenciales que calcula la degradación y acumulación de los diferentes compuestos.

$$r_x = \frac{V_{max} * [X] * Thau * Rho}{K_{MX} * \left(1 + \frac{[MS1]}{K_{i1}}\right) * \left(1 + \frac{[OGS3]}{K_{i3}}\right) + [X]} \quad (1.3)$$

$$Thau = \frac{(T - T_{max}) * (T - T_{min})^2}{(T_{opt} - T_{min}) * ((T_{opt} - T_{min}) * (T - T_{opt}) - (T_{opt} - T_{max}) * (T_{opt} + T_{min} - 2 * T))} \quad (1.4)$$

$$Rho = \frac{(pH - pH_{min}) * (pH - pH_{max})}{(pH - pH_{min}) * (pH - pH_{max}) - (pH - pH_{opt})^2} \quad (1.5)$$

$$\frac{dMS1}{dt} = 0.35 * r_{OGS6} + 0.67 * r_{OGS5} + r_{OGS4} + r_{OGS3} \quad (1.6)$$

$$\frac{dOGS5}{dt} = 0.25 * r_{pectina} + 0.35 * r_{OGS6} - r_{OGS5} \quad (1.7)$$

La ecuación 1.3 es una versión modificada de la ecuación de Michaelis-Menten que describe la velocidad con la cual se consumen la pectina y los diferentes oligosacáridos producidos, teniendo en cuenta el efecto de la temperatura y el pH, descritos en las ecuaciones 1.4 y 1.5, y el efecto inhibitorio causado por la presencia del monosacárido y el trisacárido que compiten con el sustrato por el sitio activo de la enzima. Las ecuaciones 1.6 y 1.7 son parte de una serie de ecuaciones que describen la degradación y acumulación de cada uno de los compuestos basado en la velocidad de cómo estos se degradan y forman.

1.10. Conclusión

En este capítulo se presentan las diferentes etapas de la producción de jarabes glucosados, incluyendo sus métodos de clarificación y modelamiento, y se resalta la producción de jarabes a partir de materiales lignocelulósicos. En el proceso de clarificación enzimática, se identificaron las propiedades de la pectina y las enzimas que actúan sobre estas. Finalmente, se abordó el modelamiento de la clarificación enzimática, para esto se obtuvo la cinética del proceso de clarificación de un jarabe producido para el ejemplo de la fibra de maíz y se propuso un modelo con base en la revisión bibliográfica, que posteriormente será usado para la simulación.

1.11. Bibliografía

- Abbès, F., Bouaziz, M. A., Blecker, C., Masmoudi, M., Attia, H., & Besbes, S. (2011). Date syrup: Effect of hydrolytic enzymes (pectinase/cellulase) on physico-chemical characteristics, sensory and functional properties. *LWT - Food Science and Technology*, 44(8), 1827–1834. <https://doi.org/10.1016/J.LWT.2011.03.020>
- Afanasjeva, Natalia, Luis C. Castillo, Juan C. Sinisterra, y University of Valle. «Lignocellulosic Biomass. Part I: Biomass Transformation.» En *Journal of Science with Technological Applications*, 3:27-43, 2017. <https://doi.org/10.34294/j.jsta.17.3.22>.
- Almandoz, Cristina, Cecilia Pagliero, Ariel Ochoa, y José Marchese. «Corn Syrup Clarification by Microfiltration with Ceramic Membranes». *Journal of Membrane Science* 363, n.o 1 (1 de noviembre de 2010): 87-95. <https://doi.org/10.1016/j.memsci.2010.07.017>.
- Alvarez, Hernán, Rosalba Lamanna, Pastora Vega, y Silvana Revollar. «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, n.º 3 (1 de julio de 2009): 10-20. [https://doi.org/10.1016/S1697-7912\(09\)70260-2](https://doi.org/10.1016/S1697-7912(09)70260-2).
- Archut, Artwin, Martina Klost, Stephan Drusch, y Hanna Kastner. «Complex Coacervation of Pea Protein and Pectin: Contribution of Different Protein Fractions to Turbidity». *Food Hydrocolloids* 134 (1 de enero de 2023): 108032. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2022.108032>.
- Ballesteros, Lina Fernanda, Michele Michelin, António Augusto Vicente, José António Teixeira, y Miguel Ângelo Cerqueira. «Functional Properties of Lignocellulosic Materials». En *Lignocellulosic Materials and Their Use in Bio-Based Packaging*, editado por Lina Fernanda Ballesteros, Michele Michelin, António Augusto Vicente, José António Teixeira, y Miguel Ângelo Cerqueira, 35-47. SpringerBriefs in Molecular Science. Cham: Springer International Publishing, 2018. https://doi.org/10.1007/978-3-319-92940-8_3.
- Bansal, Roop Chand, y Meenakshi Goyal. *Activated Carbon Adsorption*. Boca Raton: CRC Press, 2005. <https://doi.org/10.1201/9781420028812>.

- Barros, Rodrigo da Rocha Olivieri de, Paolo Becarelli, Raul Alves de Oliveira, Leonardo Tognotti, y Elba Pinto da Silva Bon. «Triticum Spelta Straw Hydrothermal Pretreatment for the Production of Glucose Syrups via Enzymatic Hydrolysis». *Biochemical Engineering Journal* 151 (15 de noviembre de 2019): 107340. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2019.107340>.
- Bedford, Michael R., y Helen V. Masey O'Neill. «Introduction». En *Enzymes in Human and Animal Nutrition*, editado por Carlos Simões Nunes y Vikas Kumar, xxvii-xl. Academic Press, 2018. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-805419-2.00037-X>.
- Bélafi-Bakó, K., M. Eszterle, K. Kiss, N. Nemestóthy, y L. Gubicza. «Hydrolysis of Pectin by *Aspergillus Niger* Polygalacturonase in a Membrane Bioreactor». *Journal of Food Engineering* 78, n.º 2 (1 de enero de 2007): 438-42. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2005.10.012>.
- Belitz, Hans-Dieter, Werner Grosch, y Peter Schieberle, eds. «Carbohydrates». En *Food Chemistry*, 248-339. Berlin, Heidelberg: Springer, 2009. https://doi.org/10.1007/978-3-540-69934-7_5.
- Belitz, Hans-Dieter, Werner Grosch, y Peter Schieberle, eds. «Sugars, Sugar Alcohols and Honey». En *Food Chemistry*, 862-91. Berlin, Heidelberg: Springer, 2009. https://doi.org/10.1007/978-3-540-69934-7_20.
- BeMiller, James N. «An Introduction to Pectins: Structure and Properties». En *Chemistry and Function of Pectins*, 310:2-12. ACS Symposium Series 310. American Chemical Society, 1986. <https://doi.org/10.1021/bk-1986-0310.ch001>.
- BeMiller, James N. «15 - Pectins». En *Carbohydrate Chemistry for Food Scientists (Third Edition)*, editado por James N. BeMiller, 303-12. AACC International Press, 2019. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812069-9.00015-7>.
- BeMiller, James N. «19 - Carbohydrate and Noncarbohydrate Sweeteners». En *Carbohydrate Chemistry for Food Scientists (Third Edition)*, editado por James N. BeMiller, 371-99. AACC International Press, 2019. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812069-9.00019-4>.
- Benen, J. A., H. C. Kester, y J. Visser. «Kinetic Characterization of *Aspergillus Niger* N400 Endopolygalacturonases I, II and C». *European Journal of Biochemistry* 259, n.º 3 (febrero de 1999): 577-85. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.1999.00080.x>.
- Benen, Jacques A. E., Harry C. M. Kester, Lucie Parenicová, y Jaap Visser. «Kinetics and Mode of Action of *Aspergillus Niger* Polygalacturonases». En *Progress in Biotechnology*, editado por J Visser y A. G. J. Voragen, 14:221-30. Pectins and Pectinases. Elsevier, 1996. [https://doi.org/10.1016/S0921-0423\(96\)80257-7](https://doi.org/10.1016/S0921-0423(96)80257-7).
- Bernardi, Ricardo, Luiz Mario de Matos Jorge, y Paulo Roberto Paraíso. «Kinetic Modeling of Sugarcane Juice Clarification by Ozonation in Batch Reactor with Ozone Saturation Control». *Food Science and Technology* 39 (11 de abril de 2019): 81-84. <https://doi.org/10.1590/fst.35417>.
- Bertoft, Eric. «Fine Structure of Amylopectin». En *Starch: Metabolism and Structure*, editado por Yasunori Nakamura, 3-40. Tokyo: Springer Japan, 2015. https://doi.org/10.1007/978-4-431-55495-0_1.
- Bonnin, Estelle, y Jérôme Pelloux. «Pectin Degrading Enzymes». En *Pectin: Technological and Physiological Properties*, editado por Vassilis Kontogiorgos, 37-

60. Cham: Springer International Publishing, 2020. https://doi.org/10.1007/978-3-030-53421-9_3.
- Borchani, M., Masmoudi, M., ben Amira, A., Abbès, F., Yaich, H., Besbes, S., Blecker, C., Garvin, A., Ibarz, A., & Attia, H. (2019). Effect of enzymatic treatment and concentration method on chemical, rheological, microstructure and thermal properties of prickly pear syrup. *LWT*, 113, 108314. <https://doi.org/10.1016/J.LWT.2019.108314>
- Bueno Zabala, K. (2018). *Efecto de la membrana en recuperación de jarabes de glucosa in situ a partir de residuos agroindustriales*. [Tesis de doctorado, Universidad Nacional de Colombia]. Repositorio Institucional – Universidad Nacional de Colombia.
- Casey, James P. «High Fructose Corn Syrup – A Case History of Innovation». *Research Management* 19, n.º 5 (1976): 27-32. <http://www.jstor.org/stable/24117895>
- Cerreti, Martina, Kristina Kantorova, Marco Esti, Michal Rosenberg, y Martin Rebroš. «Immobilisation of pectinases into PVA gel for fruit juice application». *International Journal of Food Science & Technology* 52 (1 de febrero de 2017): 531-39. <https://doi.org/10.1111/ijfs.13309>.
- Cho, Sang Woo, Seungho Lee, y Whanchul Shin. «The X-Ray Structure of Aspergillus Aculeatus Polygalacturonase and a Modeled Structure of the Polygalacturonase-Octagalacturonate Complex1 1Edited by J. Thornton». *Journal of Molecular Biology* 311, n.º 4 (24 de agosto de 2001): 863-78. <https://doi.org/10.1006/jmbi.2001.4919>.
- Colonna, W.J., Upasiri Samaraweera, Margaret Clarke, Michael Cleary, Mary Godshall, y John White. «Sugar», 2006. <https://doi.org/10.1002/0471238961.1618151603151215.a01.pub2>.
- Cristancho, L. M., y Monroy R. A. (2014) «Manual de métodos generales para determinación de carbohidratos». UPTC. <https://es.slideshare.net/LeidyCristancho/manual-de-mtodos-generales-para-determinacin-de-carbohidratos>.
- Cruz, Leandra Cristina Crema, Roger Darros Barbosa, y Pedro Alexandre da Cruz. «Effects of Temperature and Cationic Surfactant on the Clarification of Sugar Syrup by Air Dissolved Flotation». *International Journal of Advanced Engineering Research and Science* 6, n.º 6 (5 de octubre de 2019). <http://journal-repository.com/index.php/ijaers/article/view/659>.
- Djalal, M., F. Bastian, S. H. Hidayat, y A. Laga. «Glucose Syrup Clarification with a Different Form of Activated Charcoal». *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science* 343, n.º 1 (octubre de 2019): 012073. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/343/1/012073>.
- Dalagnol, Luíza M. G., Vitória C. C. Silveira, Halisson Baron da Silva, Vitor Manfroi, y Rafael C. Rodrigues. «Improvement of Pectinase, Xylanase and Cellulase Activities by Ultrasound: Effects on Enzymes and Substrates, Kinetics and Thermodynamic Parameters». *Process Biochemistry* 61 (1 de octubre de 2017): 80-87. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2017.06.029>.
- Desagiaco, Carla Cristina Villela, Robson Carlos Alnoch, Vanessa Elisa Pinheiro, Mariana Cereia, Carla Botelho Machado, André Damasio, Marlei Josiele Augusto,

- Wellington Pedersoli, Roberto Nascimento Silva, y Maria de Lourdes Teixeira de Moraes Polizeli. «Structural Model and Functional Properties of an Exo-Polygalacturonase from *Neosartorya Glabra*». *International Journal of Biological Macromolecules* 186 (1 de septiembre de 2021): 909-18. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.07.065>.
- Dinesh T. & Roshan D. (2022). *Corn Syrup Market by Type (Light Syrup, Dark Syrup, Corn Syrup Solids, High Fructose Corn Syrup), by Application (Food and Beverages, Pharmaceuticals), by Distribution Channel (B2B, B2C): Global Opportunity Analysis and Industry Forecast, 2021-2031* (Report No. A16985). Allied Market Research. <https://www.alliedmarketresearch.com/corn-syrup-market-A16985>
- Domínguez, Oscar, Gloria Cruz, Gloria González, y Andira Rentería. «Alternativas para la clarificación del jarabe de glucosa obtenido por hidrólisis enzimática del almidón.» *Ingeniería e Investigación* 55 (1 de septiembre de 2004): 8-21. (Castellanos)
- TIP Bioenergy. (2016). Lignocellulosic crops. Recuperado el 26 de agosto del 2021 de <https://www.etipbioenergy.eu/value-chains/feedstocks/agriculture/lignocellulosic-crops>
- Fitch, Bryant. «WHY PARTICLES SEPARATE IN SEDIMENTATION PROCESSES». *Industrial & Engineering Chemistry* 54, n.º 10 (1 de octubre de 1962): 44-51. <https://doi.org/10.1021/ie50634a008>.
- Flores, Leenin, Anthony Ruiz, y Alberto Oscanoa. «Protocolo para determinación de cenizas en microalgas liofilizadas» 48, n.º 1 (2021): 3. <https://hdl.handle.net/20.500.12958/3537>
- Flórez-Pardo, Luz Marina, y Jorge Enrique López-Galán. «Chemical Analysis and Characterization of Biomass for Biorefineries». En *Analytical Techniques and Methods for Biomass*, editado por Sílvio Vaz Jr., 235-73. Cham: Springer International Publishing, 2016. https://doi.org/10.1007/978-3-319-41414-0_9.
- Flutto, L. «PECTIN | Food Use». En *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition (Second Edition)*, editado por Benjamin Caballero, 4449-56. Oxford: Academic Press, 2003. <https://doi.org/10.1016/B0-12-227055-X/00902-0>.
- Fries, Markus, Jessica Ihrig, Keith Brocklehurst, Vladimir E Shevchik, y Richard W Pickersgill. «Molecular basis of the activity of the phytopathogen pectin methylesterase». *The EMBO Journal* 26, n.º 17 (5 de septiembre de 2007): 3879-87. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601816>.
- Gáspár, M., T. Juhász, Zs. Szengyel, y K. Réczey. «Fractionation and Utilisation of Corn Fibre Carbohydrates». *Process Biochemistry* 40, n.º 3 (1 de marzo de 2005): 1183-88. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2004.04.004>.
- Gáspár, Melinda, Gergely Kálmán, y Kati Réczey. «Corn Fiber as a Raw Material for Hemicellulose and Ethanol Production». *Process Biochemistry* 42, n.º 7 (1 de julio de 2007): 1135-39. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2007.04.003>.
- Gawkowska, Diana, Justyna Cybulska, y Artur Zdunek. «Structure-Related Gelling of Pectins and Linking with Other Natural Compounds: A Review». *Polymers* 10, n.º 7 (julio de 2018): 762. <https://doi.org/10.3390/polym10070762>.
- Gómez, César Augusto, Yudy Alexandra Calderón, y Hernán Álvarez. «Construcción de modelos semifísicos de base fenomenológica: caso proceso de fermentación».

- Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial* 6, n.º 2 (diciembre de 2008): 28-39.
- Govett, R., Mace, T., & Bowe, S. (octubre de 2010). *A practical guide for the determination of moisture content of woody biomass*. <http://www.tropicaltimber.info/wp-content/uploads/2015/06/A-Practical-Guide-for-Determination-of-Moisture-Content-of-Woody-Biomass-2010GovettR.University-of-WisconsinStevens-Point20-pp.pdf>
- Hall, Mary Beth y Collaborators: «Determination of Dietary Starch in Animal Feeds and Pet Food by an Enzymatic-Colorimetric Method: Collaborative Study». *Journal of AOAC INTERNATIONAL* 98, n.º 2 (1 de marzo de 2015): 397-409. <https://doi.org/10.5740/jaoacint.15-012>.
- Hanashiro, Isao. «Fine Structure of Amylose». En *Starch: Metabolism and Structure*, editado por Yasunori Nakamura, 41-60. Tokyo: Springer Japan, 2015. https://doi.org/10.1007/978-4-431-55495-0_2.
- Harris, G. Keith, y Maurice R. Marshall. «Ash Analysis». En *Food Analysis*, editado por S. Suzanne Nielsen, 287-97. Food Science Text Series. Cham: Springer International Publishing, 2017. https://doi.org/10.1007/978-3-319-45776-5_16.
- Hartel, Richard W., Joachim H. von Elbe, y Randy Hofberger. «Chemistry of Bulk Sweeteners». En *Confectionery Science and Technology*, editado por Richard W. Hartel, Joachim H. von Elbe, y Randy Hofberger, 3-37. Cham: Springer International Publishing, 2018. https://doi.org/10.1007/978-3-319-61742-8_1.
- Hassan, Shady S., Gwilym A. Williams, y Amit K. Jaiswal. «Computational Modelling Approach for the Optimization of Apple Juice Clarification Using Immobilized Pectinase and Xylanase Enzymes». *Current Research in Food Science* 3 (1 de noviembre de 2020): 243-55. <https://doi.org/10.1016/j.crfs.2020.09.003>.
- Hebeda, RONALD E. «CHAPTER 12 - Starches, Sugars, and Syrups». En *Enzymes in Food Processing (Third Edition)*, editado por Tilak Nagodawithana y Gerald Reed, 321-46. Food Science and Technology. London: Academic Press, 1993. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-057145-4.50019-0>.
- Hobbs, Larry. «Chapter 21 - Sweeteners from Starch: Production, Properties and Uses». En *Starch (Third Edition)*, editado por James BeMiller y Roy Whistler, 797-832. Food Science and Technology. San Diego: Academic Press, 2009. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-746275-2.00021-5>.
- Hosseini, Seyed Saeid, Faramarz Khodaiyan, Seyed Mohammad Mousavi, y Seyedeh Zahra Azimi. «Clarification of the Pomegranate Juice in a Bioreactor Packed by Pectinase Enzymes Immobilized on the Glass Bead Activated with Polyaldehyde Polysaccharides». *LWT* 137 (1 de febrero de 2021): 110500. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.110500>.
- Hull, Peter. «History of Glucose Syrups». En *Glucose Syrups*, 1-7. John Wiley & Sons, Ltd, 2010. <https://doi.org/10.1002/9781444314748.ch1>.
- Hull, Peter. «Glucose Syrup Manufacture». En *Glucose Syrups*, 19-44. John Wiley & Sons, Ltd, 2010. <https://doi.org/10.1002/9781444314748.ch3>.

- Icontec. (2022). *Alimentos para animales. Determinación de ceniza cruda*. (Norma núm. NTC 4648). <https://tienda.icontec.org/gp-ntc-alimentos-para-animales-determinacion-de-ceniza-cruda-ntc4648-2022.html>
- Icontec. (2020). *Ceniza en madera, pulpa, papel y cartón: combustión a 525 °C*. (Norma núm. NTC 841:2020). <https://tienda.icontec.org/gp-ceniza-en-madera-pulpa-papel-y-carton-combustion-a-525-c-ntc841-2020.html>
- Icontec. (1999). *Extracción de muestras de residuos sólidos para análisis químico mediante extracción soxhlet*. (Norma núm. NTC 4709:1999). <https://tienda.icontec.org/gp-extraccion-de-muestras-de-residuos-solidos-para-analisis-quimico-mediante-extraccion-soxhlet-ntc4709-1999.html>
- Icontec. (2018). *Medición directa del contenido de humedad en la madera y materiales a base de madera*. (Norma núm. NTC 206-2:2018). <https://tienda.icontec.org/gp-ceniza-en-madera-pulpa-papel-y-carton-combustion-a-525-c-ntc841-2020.html>
- Johansson, Kenth, Mustapha El-Ahmad, Rosmarie Friemann, Hans Jörnvall, Oskar Markovič, y Hans Eklund. «Crystal Structure of Plant Pectin Methylesterase». *FEBS Letters* 514, n.º 2-3 (2002): 243-49. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(02\)02372-4](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(02)02372-4).
- Johnston, David, Arland Hotchkiss, y Kevin Hicks. «Corn fiber gum: A potential gum arabic replacer for beverage flavor emulsification». *Food Hydrocolloids* 21 (1 de octubre de 2007): 1022-30. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2006.07.009>.
- Kainuma, Keiji. «Isomerized Glucose Syrup-History, Chemistry and Industrial Aspects». *Journal of the Japanese Society of Starch Science* 27, n.º 2 (1980): 139-45. <https://doi.org/10.5458/jag1972.27.139>.
- Kálmán, Gergely, Katalin Recseg, Maria Gaspar, y K Réczey. «Novel Approach of Corn Fiber Utilization». *Applied biochemistry and biotechnology* 131 (1 de abril de 2006): 738-50. <https://doi.org/10.1385/ABAB:131:1:738>.
- Kaur, Dalveer, Gisha Singla, Umesh Singh, y Meena Krishania. «Efficient Process Engineering for Extraction of Hemicellulose from Corn Fiber and Its Characterization». *Carbohydrate Polymer Technologies and Applications* 1 (25 de diciembre de 2020): 100011. <https://doi.org/10.1016/j.carpta.2020.100011>.
- Kaur, Sawinder, B.c. Sarkar, H.k. Sharma, y Charanjiv Singh. «Response Surface Optimization of Conditions for the Clarification of Guava Fruit Juice Using Commercial Enzyme». *Journal of Food Process Engineering* 34, n.º 4 (2011): 1298-1318. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4530.2009.00414.x>.
- Kent, Lisa M., Trevor S. Loo, Laurence D. Melton, Davide Mercadante, Martin A. K. Williams, y Geoffrey B. Jameson. «Structure and Properties of a Non-Processive, Salt-Requiring, and Acidophilic Pectin Methylesterase from *Aspergillus Niger* Provide Insights into the Key Determinants of Processivity Control». *The Journal of Biological Chemistry* 291, n.º 3 (15 de enero de 2016): 1289-1306. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.673152>.
- Kharazmi, Sara, Asghar Taheri-Kafrani, y Asieh Soozanipour. «Efficient Immobilization of Pectinase on Trichlorotriazine-Functionalized Polyethylene Glycol-Grafted Magnetic Nanoparticles: A Stable and Robust Nanobiocatalyst for Fruit Juice

- Clarification». *Food Chemistry* 325 (30 de septiembre de 2020): 126890. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126890>.
- Kuma, N. (2018). Syrup clarification using flotation system with optimized dosages of phosphate and cationic flocculant: the case of wonji sugar factory. (Tesis de maestría, Addis Ababa Institute of Technology, Addis Ababa, Ethiopia). <http://213.55.95.56/handle/123456789/12035?show=full>
- Kwan, Tsz Him, Khai Lun Ong, Md Ariful Haque, Wentao Tang, Sandeep Kulkarni, y Carol Sze Ki Lin. «High Fructose Syrup Production from Mixed Food and Beverage Waste Hydrolysate at Laboratory and Pilot Scales». *Food and Bioprocess Processing* 111 (1 de septiembre de 2018): 141-52. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2018.08.001>.
- Ladeira Ázar, Rafaela I. S., Marciana da Luz Morales, Gabriela Piccolo Maitan-Alfenas, Daniel L. Falkoski, Rafael Ferreira Alfenas, y Valéria M. Guimarães. «Apple Juice Clarification by a Purified Polygalacturonase from *Calonectria Pteridis*». *Food and Bioprocess Processing* 119 (1 de enero de 2020): 238-45. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2019.11.013>.
- Letki, A. G. «Centrifugation | Decanters». En *Encyclopedia of Separation Science*, editado por Ian D. Wilson, 1-10. Oxford: Academic Press, 2007. <https://doi.org/10.1016/B978-012226770-3/10688-0>.
- Letki, A. G. «Centrifugation | Theory of Centrifugation». En *Encyclopedia of Separation Science*, editado por Ian D. Wilson, 336-42. Oxford: Academic Press, 2000. <https://doi.org/10.1016/B0-12-226770-2/04631-7>.
- Lentze, Michael J. «The History of Maltose-Active Disaccharidases». *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* 66 Suppl 3 (junio de 2018): S4-6. <https://doi.org/10.1097/MPG.0000000000001960>.
- Li, Wen, Guo-Qing Ling, Pin Huang, Kai Li, Hai-Qin Lu, Fang-Xue Hang, Yu Zhang, et al. «Performance of Ceramic Microfiltration Membranes for Treating Carbonated and Filtered Remelt Syrup in Sugar Refinery». *Journal of Food Engineering* 170 (1 de febrero de 2016): 41-49. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2015.09.012>.
- Lloyd, NORMAN E., y WILLIAM J. Nelson. «CHAPTER XXI - Glucose- and fructose-containing sweeteners from starch». En *Starch: Chemistry and Technology (Second Edition)*, editado por ROY L. Whistler, JAMES N. Bemiller, y EUGENE F. Paschall, 611-60. Food Science and Technology. San Diego: Academic Press, 1984. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-746270-7.50027-6>.
- Lozano, J. E. «Separation And Clarification». En *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition (Second Edition)*, editado por Benjamin Caballero, 5187-96. Oxford: Academic Press, 2003. <https://doi.org/10.1016/B0-12-227055-X/01070-1>.
- Mardawati, Efri, Robi Andoyo, K Syukra, MTAP Kresnowati, y Yazid Bindar. «Production of xylitol from corn cob hydrolysate through acid and enzymatic hydrolysis by yeast». *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science* 141 (1 de marzo de 2018): 012019. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/141/1/012019>.
- Marshall, R. O., y E. R. Kooi. «Enzymatic Conversion of D-Glucose to D-Fructose». *Science (New York, N.Y.)* 125, n.º 3249 (5 de abril de 1957): 648-49. <https://doi.org/10.1126/science.125.3249.648>.

- Massa, Claudia, Mads H. Clausen, Jure Stojan, Dorian Lamba, y Cristiana Campa. «Study of the mode of action of a polygalacturonase from the phytopathogen *Burkholderia cepacia*». *The Biochemical Journal* 407, n.º Pt 2 (15 de octubre de 2007): 207-17. <https://doi.org/10.1042/BJ20061833>.
- Mayans, O., M. Scott, I. Connerton, T. Gravesen, J. Benen, J. Visser, R. Pickersgill, y J. Jenkins. «Two Crystal Structures of Pectin Lyase A from *Aspergillus* Reveal a PH Driven Conformational Change and Striking Divergence in the Substrate-Binding Clefs of Pectin and Pectate Lyases». *Structure (London, England: 1993)* 5, n.º 5 (15 de mayo de 1997): 677-89. [https://doi.org/10.1016/s0969-2126\(97\)00222-0](https://doi.org/10.1016/s0969-2126(97)00222-0).
- McCleary, Barry V., Lucie M. J. Charmier, y Vincent A. McKie. «Measurement of Starch: Critical Evaluation of Current Methodology». *Starch - Stärke* 71, n.º 1-2 (2019): 1800146. <https://doi.org/10.1002/star.201800146>.
- Meng, Yanmei, Shuangshuang Yu, Zhenyong Qiu, Jinlai Zhang, Jianfan Wu, Tao Yao, y Johnny Qin. «Modeling and Optimization of Sugarcane Juice Clarification Process». *Journal of Food Engineering* 291 (1 de febrero de 2021): 110223. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2020.110223>.
- Montañez Soto, Jose Luis, José González, Aurea Bernardino-Nicanor, y Emma Ramos-Ramírez. «Enzymatic production of high fructose syrup from Agave tequilana fructans and its physicochemical characterization». *AFRICAN JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY* 10 (19 de diciembre de 2011): 19137-43. <https://doi.org/10.5897/AJB11.2704>.
- Mudoga, H. L., H. Yucel, y N. S. Kincal. «Decolorization of Sugar Syrups Using Commercial and Sugar Beet Pulp Based Activated Carbons». *Bioresource Technology* 99, n.º 9 (1 de junio de 2008): 3528-33. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.07.058>.
- Munguía Aguilar, D. (2016). *Deslignificación de la penca de Agave tequilana F.A.C. Weber empleando peróxido de hidrógeno alcalino como pretratamiento para la producción de biohidrógeno* [Tesis de maestría, INSTITUTO POTOSINO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA, A.C.]. Repositorio Institucional ipicyt.
- Nagodawithana, T. W. y Reed G. «Enzymes in Food Processing. 3rd Ed.» *Food Science and Technology (USA)*, 1993. <https://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US19950104734>.
- Myat, Lin, y Gi-Hyung Ryu. «Characteristics of Destarched Corn Fiber Extrudates for Ethanol Production». *Journal of Cereal Science* 60, n.º 2 (1 de septiembre de 2014): 289-96. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2014.06.006>.
- Noureddini, H., y J. Byun. «Dilute-Acid Pretreatment of Distillers' Grains and Corn Fiber». *Bioresource Technology* 101, n.º 3 (1 de febrero de 2010): 1060-67. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.08.094>.
- Novoa De Armas, Hector, Christel Verboven, Camiel Ranter, Jos Desair, Ann Broek, Jos Vanderleyden, y Anja Rabijns. «Azospirillum irakense pectate lyase displays a toroidal fold». *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography* 60 (1 de julio de 2004): 999-1007. <https://doi.org/10.1107/S090744490400602X>.

- Nawaz, Haq, Rashem Waheed, Mubashir Nawaz, y Dur Shahwar. «Physical and Chemical Modifications in Starch Structure and Reactivity», 2020. <https://doi.org/10.5772/intechopen.88870>.
- Nowicki, Henry. «The Basics of Activated Carbon Adsorption». Water Technology, febrero de 2016. <https://www.watertechonline.com/wastewater/article/15549902/the-basics-of-activated-carbon-adsorption>.
- Ortega, Fabián A., Omar A. Pérez, y Emiro A. López. «Phenomenological-Based Semiphysical Model of Continuous Alcoholic Fermentation Process». *Información tecnológica* 27, n.º 1 (2016): 21-32. <https://doi.org/10.4067/S0718-07642016000100004>.
- Palomar, Lydia Toscano, Alan Gabriel Ayala Bautista, Gisela Montero Alpirez, Lourdes Cervantes Díaz, Ricardo Torres Ramos, Erick Romero Uscanga, Maria Guadalupe Amado Moreno, y Ángel García Velázquez. «Determinación simplificada del contenido de Lignina en paja de trigo por método volumetrico y su caracterización química.» *Ciencia y Tecnología*, 2 de noviembre de 2015. <https://doi.org/10.18682/cyt.v1i15.286>.
- Patil, Anirudh G., Kounaina Khan, S. Aishwarya, Subrahmanya Padyana, Ravish Huchegowda, Kakarla Raghava Reddy, Roshan Pais, et al. «Fungal Amylases and Their Industrial Applications». En *Industrially Important Fungi for Sustainable Development: Volume 2: Bioprospecting for Biomolecules*, editado por Ahmed M. Abdel-Azeem, Ajar Nath Yadav, Neelam Yadav, y Minaxi Sharma, 407-34. Fungal Biology. Cham: Springer International Publishing, 2021. https://doi.org/10.1007/978-3-030-85603-8_11.
- Peñaranda Gonzalez, Laura Victoria, Sandra Patricia Montenegro Gómez, y Paula Andrea Giraldo Abad. «Aprovechamiento de residuos agroindustriales en Colombia». *Revista de Investigación Agraria y Ambiental* 8, n.º 2 (5 de junio de 2017): 141-50. <https://doi.org/10.22490/21456453.2040>.
- Pérez Farrás, L. E. (2005). Teoría de la sedimentación. [En línea] Agosto de 2015. [Citado el: 25 de octubre de 2022.] <https://cms.fi.uba.ar/uploads/institutos teoria sedimentacion 8d6be3a941.pdf>
- Pinchao, Yamid A., Oswaldo Osorio, y Diego Mejía. «Thermal Inactivation of Pectinmethylesterase in Cape Gooseberry Juice (*Physalis peruviana* L.)». *Información tecnológica* 25, n.º 5 (2014): 55-64. <https://doi.org/10.4067/S0718-07642014000500009>.
- Pihlajaniemi, Ville, Outi Mattila, Taru Koitto, Markus Nikinmaa, Raija-Liisa Heiniö, Lotta Sorsamäki, Matti Siika-aho, y Emilia Nordlund. «Production of Syrup Rich in Arabinoxylan Oligomers and Antioxidants from Wheat Bran by Alkaline Pretreatment and Enzymatic Hydrolysis, and Applicability in Baking». *Journal of Cereal Science* 95 (1 de septiembre de 2020): 103043. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2020.103043>.
- Pinelo, Manuel, Birgitte Zeuner, y Anne S. Meyer. «Juice Clarification by Protease and Pectinase Treatments Indicates New Roles of Pectin and Protein in Cherry Juice Turbidity». *Food and Bioproducts Processing* 88, n.º 2 (1 de junio de 2010): 259-65. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2009.03.005>.

- Piñeros-Castro, Yineth. *Aprovechamiento de biomasa lignocelulósica, algunas experiencias de investigación en Colombia*. Primera edición. Vol. 1. Bogota, Colombia: UTadeo, 2014. <https://www.utadeo.edu.co/es/publicacion/libro/editorial/235/aprovechamiento-de-biomasa-lignocelulosica-algunas-experiencias-de-investigacion-en-colombia>.
- Poole, C. F., & Cooke, M. (2000). *Encyclopedia of Separation Science (English Edition)* (1.a ed.). Academic Press. <https://www.sciencedirect.com/referencework/9780122267703/encyclopedia-of-separation-science>
- Ropartz, David, y Marie-Christine Ralet. «Pectin Structure». En *Pectin: Technological and Physiological Properties*, editado por Vassilis Kontogiorgos, 17-36. Cham: Springer International Publishing, 2020. https://doi.org/10.1007/978-3-030-53421-9_2.
- Quaglia, G. B., y L. Gennaro. «ENZYMES | Uses in Food Processing». En *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition (Second Edition)*, editado por Benjamin Caballero, 2125-39. Oxford: Academic Press, 2003. <https://doi.org/10.1016/B0-12-227055-X/00420-X>.
- Ravve, A. «Naturally Occurring Polymers». En *Principles of Polymer Chemistry*, editado por A. Ravve, 537-65. New York, NY: Springer, 2012. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-2212-9_8.
- RCSB protein databank. (s.f.). *1CZF Endo-Polygalacturonase li From Aspergillus Niger*. <https://www.rcsb.org/structure/1czf>
- RCSB protein databank. (s.f.). *1IDJ Pectin Lyase A*. <https://www.rcsb.org/structure/1IDJ>
- RCSB protein databank. (s.f.). *5C1E Crystal Structure of the Pectin Methylsterase from Aspergillus niger in Penultimately Deglycosylated Form (N-acetylglucosamine Stub at Asn84)*. <https://www.rcsb.org/structure/5c1e>
- Redfern, James, Malcolm Kinninmonth, Dariel Burdass, y Joanna Verran. «Using Soxhlet Ethanol Extraction to Produce and Test Plant Material (Essential Oils) for Their Antimicrobial Properties†». *Journal of Microbiology & Biology Education* 15, n.º 1 (1 de mayo de 2014): 45-46. <https://doi.org/10.1128/jmbe.v15i1.656>.
- Rexová-Benková, Lubomíra. «The Size of the Substrate-Binding Site of an Aspergillus Niger Extracellular Endopolygalacturonase». *European Journal of Biochemistry* 39, n.º 1 (1973): 109-15. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1973.tb03109.x>.
- Rosso, L., Lobry, J. R., & Flandrois, J. (1993). An Unexpected Correlation between Cardinal Temperatures of Microbial Growth Highlighted by a New Model. *Journal of Theoretical Biology*, 162(4), 447–463. <https://doi.org/10.1006/jtbi.1993.1099>
- Rosso, L., J. R. Lobry, S. Bajard, y J. P. Flandrois. «Convenient Model To Describe the Combined Effects of Temperature and pH on Microbial Growth». *Applied and Environmental Microbiology* 61, n.º 2 (febrero de 1995): 610-16.
- Ruiz-Colorado, A. A., Bohórquez, C., Herrera, S. N., Medina De Perez, V. I., Mejia, M. C., Hoyos, L. M., & Pérez, Y. M. (2009). “Procedimiento para la produccion de jarabe azucarado por degradacion de materiales amiláceos y lignocelulósicos de la planta de banano”. (n.º de patente 08-055808).
- Ruiz-Colorado, A. A., Bueno, K. A., Acosta Pavas , J. C., & Guarín Florez, L. M. (2020). “Proceso para obtener un jarabe de isómeros de glucosa a partir de residuos amiláceos o lignocelulósicos que comprende su caracterización antes del pre-

- tratamiento e hidrólisis enzimática” (WO2017212405A1). WIPO. <https://patents.google.com/patent/WO2017212405A1/es>
- Secretaria de comercio y fomento industrial *norma mexicana NMX-F-347-S-1980 frutas y derivados-determinacion de pectina fruits and derivatives-determination of pectine direccion general de normas*. (1980).
- Rueda, Gimena, Cynthia Gutierrez, Gabriela Mistretta, Florencia Peralta, Marcos Golato, Marcelo Ruiz, y Dora Paz. «Determinación del contenido de humedad del bagazo de caña de azúcar por medio de microondas». *Revista Industrial y Agrícola de Tucumán* 93 (1 de diciembre de 2016): 07-12. (Zamora)
- Saharan, Ritu, y Kanti Prakash Sharma. «Production, Purification and Characterization of Pectin Lyase from Bacillus Subtilis Isolated from Moong Beans Leaves (Vigna Radiata)». *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* 21 (1 de septiembre de 2019): 101306. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.101306>.
- Santen, Yovka van, Jacques A. E. Benen, Klaus-Hasso Schröter, Kor H. Kalk, Sylvie Armand, Jaap Visser, y Bauke W. Dijkstra. «1.68-Å Crystal Structure of Endopolygalacturonase II From Aspergillus Niger and Identification of Active Site Residues by Site-Directed Mutagenesis *». *Journal of Biological Chemistry* 274, n.º 43 (22 de octubre de 1999): 30474-80. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.43.30474>.
- Sharma, Nevadita, Madhu Rathore, y Mukesh Sharma. «Microbial Pectinase: Sources, Characterization and Applications». *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology* 12, n.º 1 (1 de marzo de 2013): 45-60. <https://doi.org/10.1007/s11157-012-9276-9>.
- Schwartz, Deborah, y Roy L. Whistler. «Chapter 1 - History and Future of Starch». En *Starch (Third Edition)*, editado por James BeMiller y Roy Whistler, 1-10. Food Science and Technology. San Diego: Academic Press, 2009. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-746275-2.00001-X>.
- Silayo, Valerian C. K., John Y. Lu, y Heshmat A. Aglan. «development Of A Pilot System For Converting Sweet Potato Starch Into Glucose Syrup». *Habitation* 9, n.º 1 (1 de enero de 2003): 9-15. <https://doi.org/10.3727/1542966034605306>.
- Singh, Priyanka, Y. G. Ban, Lenika Kashyap, Archana Siraree, y J. Singh. «Sugar and Sugar Substitutes: Recent Developments and Future Prospects». En *Sugar and Sugar Derivatives: Changing Consumer Preferences*, editado por Narendra Mohan y Priyanka Singh, 39-75. Singapore: Springer, 2020. https://doi.org/10.1007/978-981-15-6663-9_4.
- Singh, R. S., K. Chauhan, y R. P. Singh. «Enzymatic Approaches for the Synthesis of High Fructose Syrup». En *Plant Biotechnology: Recent Advancements and Developments*, editado por Suresh Kumar Gahlawat, Raj Kumar Salar, Priyanka Siwach, Joginder Singh Duhan, Suresh Kumar, y Pawan Kaur, 189-211. Singapore: Springer, 2017. https://doi.org/10.1007/978-981-10-4732-9_10.
- Słomińska, Lucyna, y Joanna Niedbacha. «Study on the Influence of the So-Called Filtration Enzyme Action on the Membrane Filtration Process of Wheat Starch Hydrolysates». *Desalination, The Third Membrane Science and Technology Conference of Visegrad Countries (PERMEA)*; part 2, 241, n.º 1 (31 de mayo de 2009): 296-301. <https://doi.org/10.1016/j.desal.2007.10.101>.

- Sluiter, A., Hames, B., Hyman, D., Payne, C., Ruiz, R., Scarlata, C., Sluiter, J., Templeton, D., & Wolfe, J. (2008). *Determination of Total Solids in Biomass and Total Dissolved Solids in Liquid Process Samples Laboratory Analytical Procedure (LAP) Issue Date: 3/31/2008.* <https://www.nrel.gov/docs/gen/fy08/42621.pdf>
- Sluiter, A., Hames, B., Ruiz, R., Scarlata, C., Sluiter, J., & Templeton, D. (2008). *Determination of Ash in Biomass: Laboratory Analytical Procedure (LAP); Issue Date: 7/17/2005.* <https://www.nrel.gov/docs/gen/fy08/42622.pdf>
- Sluiter, A., Hames, B., Ruiz, R., Scarlata, C., Sluiter, J., Templeton, D., & Crocker, D. (2008). *Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass: Laboratory Analytical Procedure (LAP); Issue Date: 4/25/2008.* <https://www.nrel.gov/docs/gen/fy13/42618.pdf>
- Sluiter, A., Ruiz, R., Scarlata, C., Sluiter, J., & Templeton, D. (2008). *Determination of Extractives in Biomass: Laboratory Analytical Procedure (LAP); Issue Date 7/17/2005.* <https://www.nrel.gov/docs/gen/fy08/42619.pdf>
- Sluiter, A., & Sluiter, J. (2008). *Determination of starch in solid biomass samples by HPLC: Laboratory analytical procedure (LAP) : issue date, 07/17/2005.* National Renewable Energy Laboratory. <https://permanent.fdlp.gov/LPS94088/42624.pdf>
- Stephenson, Frank H. «Chapter 12 - Centrifugation». En *Calculations for Molecular Biology and Biotechnology (Third Edition)*, editado por Frank H. Stephenson, 431-38. Boston: Academic Press, 2016. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802211-5.00012-6>.
- Tingley, Jeffrey, Kristin Low, Xiaohui Xing, y D. Wade Abbott. «Correction to: Combined whole cell wall analysis and streamlined in silico carbohydrate- active enzyme discovery to improve biocatalytic conversion of agricultural crop residues». *Biotechnology for Biofuels* 14 (8 de febrero de 2021). <https://doi.org/10.1186/s13068-021-01888-z>.
- Todisco, S., V. Calabrò, y G. Iorio. «A Kinetic Model for the Pectin Hydrolysis Using an Endo-Acting Pectinase from *Rhizopus*». *Journal of Molecular Catalysis* 92, n.º 3 (13 de septiembre de 1994): 333-46. [https://doi.org/10.1016/0304-5102\(94\)00076-X](https://doi.org/10.1016/0304-5102(94)00076-X).
- Tu, Tao, Yeqing Li, Xiaoyun Su, Kun Meng, Rui Ma, Yuan Wang, Bin Yao, Zhemin Lin, y Huiying Luo. «Probing the Role of Cation- π Interaction in the Thermotolerance and Catalytic Performance of Endo-Polygalacturonases». *Scientific Reports* 6, n.º 1 (8 de diciembre de 2016): 38413. <https://doi.org/10.1038/srep38413>.
- Van Buren, J. P. «CHAPTER 1 - Function of Pectin in Plant Tissue Structure and Firmness». En *The Chemistry and Technology of Pectin*, editado por Reginald H. Walter, 1-22. Food Science and Technology. San Diego: Academic Press, 1991. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-092644-5.50006-6>.
- Wan+g, Qiang, Xuerong Fan, Zhaozhe Hua, Weidong Gao, y Jian Chen. «Degradation Kinetics of Pectins by an Alkaline Pectinase in Bioscouring of Cotton Fabrics». *Carbohydrate Polymers* 67, n.º 4 (19 de febrero de 2007): 572-75. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2006.06.031>.
- Whistler, ROY L. «CHAPTER I - History And Future Expectation Of Starch Use». En *Starch: Chemistry and Technology (Second Edition)*, editado por ROY L. Whistler, JAMES N. Bemiller, y EUGENE F. Paschall, 1-9. Food Science and Technology.

- San Diego: Academic Press, 1984. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-746270-7.50007-0>.
- Wu, Chunsen, y Xing Zhou. «The Overview of Functional Starch». En *Functional Starch and Applications in Food*, editado por Zhengyu Jin, 1-26. Singapore: Springer, 2018. https://doi.org/10.1007/978-981-13-1077-5_1.
- «Turbidity and Water | U.S. Geological Survey». Junio 6, 2018. Accedido 8 de octubre de 2022. <https://www.usgs.gov/special-topics/water-science-school/science/turbidity-and-water>.
- Yang, Yang, y Charles T. Anderson. «Biosynthesis, Localisation, and Function of Pectins in Plants». En *Pectin: Technological and Physiological Properties*, editado por Vassilis Kontogiorgos, 1-15. Cham: Springer International Publishing, 2020. https://doi.org/10.1007/978-3-030-53421-9_1.
- Zdunek, Artur, Piotr M. Pieczywek, y Justyna Cybulska. «The Primary, Secondary, and Structures of Higher Levels of Pectin Polysaccharides». *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 20, n.º 1 (2021): 1101-17. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12689>.
- Zhang, Jing, Xinru Yu, Chaojun Zhang, Qiong Zhang, Ying Sun, Heqin Zhu, y Canming Tang. «Pectin Lyase Enhances Cotton Resistance to Verticillium Wilt by Inducing Cell Apoptosis of Verticillium Dahliae». *Journal of Hazardous Materials* 404 (15 de febrero de 2021): 124029. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.124029>.
- Zhang, Bin, Baorui Zhan, y Jie Bao. «Reframing Biorefinery Processing Chain of Corn Fiber for Cellulosic Ethanol Production». *Industrial Crops and Products* 170 (15 de octubre de 2021): 113791. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2021.113791>.
- Zheng, Ling, Zilong Guo, Yinxiao Xu, Benwei Zhu, y Zhong Yao. «Biochemical Characterization and Immobilization of a Novel Pectate Lyase ErPL2 for Efficient Preparation of Pectin Oligosaccharides». *International Journal of Biological Macromolecules* 204 (15 de abril de 2022): 532-39. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.02.022>.
- Zoghalmi, Aya, y Gabriel Paës. «Lignocellulosic Biomass: Understanding Recalcitrance and Predicting Hydrolysis». *Frontiers in Chemistry* 7 (2019). <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fchem.2019.00874>.

CAPÍTULO 2: Desarrollo de la metodología para la clarificación enzimática de jarabes glucosados

Usando los parámetros encontrados en la información consultada en el capítulo anterior, se procedió a formular una metodología que permita realizar la clarificación de jarabes glucosados producidos a partir de residuos agroindustriales. Inicialmente, se comenzó con la caracterización de la materia prima empleada para la preparación del jarabe, por medio de las metodologías del National Renewable Energy Laboratory (NREL). Posteriormente, se caracterizó la enzima empleada para la clarificación, encontrando su actividad y parámetros cinéticos (V_{max} y K_M), esta información permitió encontrar el punto de máxima clarificación al variar la agitación y la cantidad de enzima aplicada por medio de un análisis de superficie de respuesta, los cuales son la base para el desarrollo de la metodología presentada en este capítulo.

2.1. Introducción

Actualmente, industrias como la agropecuaria, azucarera, industrias de jugos de fruta, y cafetera, afrontan problemas en la disposición de sus residuos, cáscaras y las semillas de las frutas, hojas y tallos de plantas herbáceas como la caña de azúcar, la cascarilla del arroz y el maíz. En Colombia, se producen aproximadamente 72 millones de toneladas de estos residuos anualmente, las cuales son principalmente residuos de la cosecha, postcosecha, procesamiento y comercialización de estos cultivos, que son llevados a residuos sanitarios o incinerados (Peñaranda et al. 2017).

Investigadores han estudiado metodologías para transformar estos residuos en productos de interés industrial, como fertilizantes, aditivos, suplementos, compuestos químicos como el furfural usado en la fabricación de plásticos, solventes o aceite, o la producción de combustibles líquidos y gaseosos (Ahmed et al., 2021; Gonzalez & Ciliana, 2019; Zhang et al., 2019). Dentro de estas metodologías está la producción de jarabes glucosados por medio de la hidrólisis enzimática de residuos amiláceos y lignocelulósicos. Estos jarabes son soluciones ricas en glucosa con la capacidad de endulzar, producir energía y dar brillo en la fabricación de bebidas transparentes, ideales como insumo para la nutrición animal, o ingredientes para la preparación de medicamentos. La primera etapa en la producción de jarabes glucosados es su pretratamiento. Compuestos como lignina y hemicelulosa son degradados, permitiendo un acceso más fácil a la celulosa y/o el almidón por parte de las enzimas utilizadas en las etapas posteriores. Este pretratamiento puede darse por medio de molienda, alta temperatura y presión en presencia de agua. La siguiente etapa es la aplicación de enzimas amilasas o celulasas, las cuales tienen la capacidad de hidrolizar los enlaces que unen las unidades de glucosa que componen el almidón y la celulosa, obteniendo una solución opaca rica en este azúcar. La solución resultante se somete a procesos de clarificación y decoloración para reducir la turbiedad y el color que presenta, y a procesos de concentración, para eliminar parte del agua que la componen, obteniendo soluciones más concentradas y con un nivel de dulzura más alto

(Barros et al., 2019; Pihlajaniemi et al., 2020; Ruiz-Colorado & Bueno, 2017; Ruiz-Colorado et al., 2009).

Esta etapa de clarificación es realizada comúnmente mediante la centrifugación, filtración, adsorción con carbón activado o membranas de intercambio iónico (Belitz et al., 2009; BeMiller, 2019; Hull, 2010). El objetivo de estas etapas es la remoción de sustancias disueltas como restos de la pared celular, proteínas y grasas que no fueron degradados durante la etapa de hidrólisis, los cuales dispersan la luz que incide en estos productos, aportando color y turbiedad a los jarabes (Almandoz et al., 2010; Cruz et al., 2019; Djalal et al., 2019; Domínguez et al., 2004; Li et al., 2016; Singh et al., 2017). Pero la mayoría de los métodos de clarificación presentan inconvenientes, la decantación y centrifugación a pesar de ser sencillos, presentan pérdidas de material alrededor del 50%, la filtración a pesar de los mejores resultados, requiere el uso de un proceso escalonado con equipo costoso y la adsorción a pesar de tener la mejor capacidad de retirar compuestos coloreados, también adsorbe el 14.4% de los azúcares reductores totales de los jarabes (Almandoz et al., 2010; Domínguez et al., 2004; Kwan et al., 2018; Montañez et al. 2011).

Dentro de los residuos que presenta un efecto sobre la turbiedad está la pectina, un polisacárido complejo presente en la pared celular de las plantas superiores, compuesto por largas cadenas lineales de ácido poligalacturónico unidas por enlaces α (1-4) y regiones ramificadas de azúcares variados unidos por hasta 20 tipos de enlaces diferentes (Bonnin & Pelloux, 2020; Ravve, 2012; Ropartz & Ralet, 2020; Van Buren, 1991). La remoción o degradación de la pectina es un proceso de interés industrial, dada la capacidad de este compuesto de formar geles cuando las regiones lineales de una molécula de pectina interaccionan con las de otra, formando redes tridimensionales donde se atrapan otras partículas sólidas, aumentando la turbidez y la viscosidad de las soluciones donde este compuesto está presente, dando una apariencia menos deseable a los consumidores del producto final y dificultando procesos dependientes de la viscosidad de fluido, los métodos de clarificación mencionados anteriormente, corresponden a los métodos aplicados a la remoción de pectina y otros contaminantes (Cerreti et al., 2017; Hosseini et al., 2021; Kharazmi et al., 2020; Ladeira et al., 2020). Un método de clarificación estudiado en la industria de los jugos de fruta y vinos es el uso de enzimas pectínicas para realizar la clarificación de sus productos, porque las enzimas tienen la capacidad de modificar y degradar la pectina, permitiendo obtener mayor cantidad de un producto más claro durante los procesos de extracción, además de facilitar el transporte y el procesamiento por la reducción en la viscosidad (Ahmed & Sohail, 2020; Pagnonceli et al., 2019; Lu et al., 2016; Ninga et al., 2021).

El objetivo de este capítulo es proponer una metodología para la clarificación de jarabes glucosados mediante el uso de enzimas pectínicas, la caracterización de la materia prima para la preparación del jarabe, la medición de la actividad y parámetros cinéticos de la enzima para la hidrólisis de la pectina. Luego se desarrolla un diseño de experimentos, mediante superficie de respuesta, para encontrar las condiciones óptimas de agitación y relación enzima - jarabe para la etapa de clarificación.

2.2. Materiales y métodos

2.2.1. Materiales

Para la producción de jarabes glucosados se utilizó como sustrato fibra de maíz proveniente del departamento del Valle del Cauca, la cual está conformada por los restos del endospermo de los granos del maíz producto de la maceración del maíz y extracción de almidón (Gáspár et al., 2005 y 2007; Kálmán et al., 2006; Kaur et al., 2020; Zhang et al., 2021).

La enzima pectinasa/poligalacturonasa (EC 3.2.1.15), producida a partir del fitopatógeno *Aspergillus niger*, fue obtenida del proveedor Sigma-Aldrich. La preparación enzimática consiste en una solución parda y transparente con glicerol como base, la cual es almacenada a temperaturas entre 2 y 8 °C para su conservación. Teóricamente, esta solución enzimática presenta > 5 U/mg unidades enzimáticas por miligramo de proteína, donde una unidad enzimática corresponde con la cantidad de enzima que produce un μmol de ácido galacturónico por minuto a un pH de 4.0 y una temperatura de 45 °C.

2.2.2. Caracterización de la materia prima

Para conocer la composición química de la fibra de maíz utilizada en la producción del jarabe, esta fue sometida a un proceso de caracterización bajo los protocolos propuestos por el National Renewable Energy Laboratory (NREL por sus siglas en inglés) (Sluiter et al., 2008a, 2008b, 2008c, 2008d, 2008e) y modificados por el laboratorio de procesos y flujos reactivos de la universidad Nacional de Colombia - Sede Medellín (BIOFRUN). Se determinó el contenido de humedad y sólidos totales, secando las muestras en un horno de convección Binder a 105 °C (NREL TP-510-42621), contenido de ceniza, calcinando las muestras en una mufla con rampa de temperatura hasta los 575 °C (NREL TP-510-42622), y extractivos en agua, etanol y hexano, calentando el solvente hasta la ebullición, (NREL TP-510-42619). Luego, se determinó su contenido de carbohidratos estructurales, celulosa y hemicelulosa y de lignina por medio de una hidrólisis ácida (NREL TP-510-42618 y TP-510-42617) y su contenido de almidón usando enzimas amilasas para degradar este compuesto (NREL TP-510-42624), midiendo la cantidad de azúcares producidos para calcular la proporción de estos polisacáridos en la muestra.

Para la determinación del contenido de pectina se utilizó el procedimiento descrito por la Norma Oficial Mexicana F-347-S-1980 (secretaría de comercio y fomento industrial, 1980), hirviendo 50 g del material en 400 mL de agua destilada, precipitando la pectina con hidróxido de sodio 1 N, cloruro de calcio 1 N y ácido acético 1 N, y filtrando la muestra a través de un papel filtro Whatman No. 41, con el fin de medir el cambio de peso que sufre este filtro después de este proceso. Para medir la cantidad de proteína se realizó su medición en el laboratorio de Bromatología de la Universidad Nacional de Colombia, sede Medellín, que utilizó el método de Kjeldahl.

2.2.3. Producción de jarabe a partir de la fibra de maíz

La producción del jarabe siguió la metodología propuesta en las patentes del laboratorio BIOFRUN (Ruiz-Colorado & Bueno, 2017; Ruiz-Colorado et al., 2009). Empezando con un pretratamiento térmico de la materia prima, añadiendo 850 ± 5 g de agua destilada y 150 ± 5 g de fibra de maíz para obtener un porcentaje de sólidos del 15%, luego fue llevada a autoclavado y sometida a altas condiciones de presión (15 - 20 psig) y temperatura ($121 \text{ }^\circ\text{C}$) durante 40 minutos. Los sólidos obtenidos fueron lavados con agua destilada y secados siguiendo el protocolo NREL TP-510-42620 (Hames et al., 2008). Una vez finalizado el proceso de secado, se realizó la hidrólisis enzimática (HE), añadiendo 28 g del material y 375 g de buffer de acetato 0.1 M con un pH de 5.0. Posteriormente, fueron añadidos 14.8 ml de la celulasa. La solución resultante se incubó a una temperatura de $50 \text{ }^\circ\text{C}$ y una agitación de 180 rpm durante 48 horas, finalmente la solución rica en glucosa se sometió a un baño de agua en ebullición para desnaturalizar la enzima. Para verificar la degradación de la fibra de maíz, se realizó el seguimiento de los sólidos disueltos ($^\circ\text{Brix}$) presentes en la solución, tomando 1 ml de la solución y midiendo sus grados Brix en un refractómetro de bolsillo PAL-BX/RI, al principio de la reacción, después de añadir la enzima y cada 24 horas. Igualmente, fue medido el contenido de pectina del jarabe con el procedimiento mencionado anteriormente en la sección 2.2.

2.2.4. Determinación de la actividad enzimática de la pectinasa

Para la determinación de la actividad enzimática de las pectinasas. Se siguió la metodología propuesta por Li et al. (2015). Inicialmente, se construyó una curva de calibración con diluciones de 1/6000, 1/9000 y 1/12000, las cuales fueron incubadas a $50 \text{ }^\circ\text{C}$ por 30 minutos, en una solución 5 g/L de pectina de manzana, lo que permitió determinar la cantidad de ácido galacturónico y sus oligosacaridos liberados utilizando el método del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS). Luego, mediante la ecuación de la curva obtenida, se determinó el factor de dilución que libera 0.4 g/L de ácido galacturónico, que se usa en la ecuación 2.1 para determinar la actividad enzimática.

$$Actividad_{Enzima} = Factor\ de\ diluci3n \cdot \frac{0.687\ U}{mL} \quad (2.1)$$

Donde $0.687\ U/mL$ corresponde con la cantidad de enzima que libera 0.4 g/L, según los ensayos de Li et al. (2015), la curva de liberación de ácido galacturónico contra el inverso de la dilución presenta una región lineal entre 0.2 a 0.6 g/L, por lo que este punto central fue seleccionado.

Para la determinación de la cantidad de proteína en la solución enzimática, se utilizó el método propuesto por Bradford (1976), midiendo la absorbancia a 595 nm al mezclar la solución con un tinte preparado a partir de Coomassie Brilliant Blue G-250 y comparando la absorbancia de las muestras contra una curva de calibración preparada a partir de albúmina de suero bovino con puntos en 0.2, 0.4, 0.8, 1.2, 1.6 y 2.0 g/L.

Método DNS modificado: se usó una versión modificada del método DNS propuesto por Li et al. (2015). Se preparó el reactivo DNS diluyendo 1 g de ácido 3,5-dinitrosalicílico y 1.6 g de hidróxido de sodio en 100 ml de agua destilada. Se adicionaron 3 ml de este reactivo a 1 ml de las soluciones estudiadas en tubos de ensayo de 25 ml, los cuales fueron calentados en un baño María en ebullición por 5 minutos y enfriados en un baño de hielo durante 10 minutos para desarrollar el color. Finalmente, se adicionó 16 ml de agua destilada para hacer una dilución inicial de las soluciones. Para obtener un patrón con el cual se puede contrastar la cantidad de azúcares de las muestras anteriores, se preparó una curva de calibración usando soluciones de ácido galacturónico de 0.125 a 20.0 g/L. Finalmente, se midió la absorbancia de las muestras a 540 nm en un espectrofotómetro UV-visible Thermo Scientific™ Evolution 60S, realizando una segunda dilución de las muestras si la absorbancia medida sobrepasaba un valor de 0.8.

2.2.5. Optimización del proceso de clarificación

Con el fin de encontrar las condiciones óptimas de agitación y relación, enzima-sustrato (E/S) se realizó un diseño central compuesto generado con el programa Minitab 2015 (versión gratuita), los intervalos y puntos axiales (α) para la relación E/S y la agitación utilizados en este diseño central son reportados en la Tabla 2.1.

Tabla 2.1. Diseño central compuesto.

Variable	Valor				
	$-\alpha$	-1	0	+1	$+\alpha$
Relación E/S [U/mL (solución de sustrato)]	2.08	2.50	3.50	4.50	4.91
Agitación [rpm]	200.5	215.0	250.0	285.0	299.5

Fuente: elaboración propia.

El diseño obtenido corresponde con 4 experimentos usando los puntos axiales, 4 experimentos combinando los extremos de los intervalos y 6 puntos centrales, para un total de 14 experimentos. Durante estos ensayos se incubaron 100 ml de jarabe centrifugado a 4500 rpm, a 50 °C por dos horas, utilizando los parámetros estudiados. Una vez acabado este periodo de tiempo se midió claridad del jarabe, expresado como el porcentaje de transmitancia a 600 nm (%T 600) por medio de un espectrofotómetro UV-Visible Thermo Scientific™ Evolution 60S, el pH con un pH-metro Titulador 848 Titrino plus, los sólidos totales (°Brix) con un refractómetro de bolsillo PAL-BX/RI y los azúcares reductores usando el método DNS. Estos datos fueron analizados por medio de un análisis de varianza (ANOVA) usando el programa Minitab 2015.

2.2.6. Determinación de los parámetros cinéticos de la enzima

Para determinar los parámetros cinéticos de la enzima pectinasa, velocidad máxima (V_{max}) y la constante de Michaelis-Menten (K_M), se siguió la metodología propuesta por Doran (2013). Se prepararon 300 ml de soluciones de pectina de manzana con una

concentración entre 0.01 - 0.15% p/p, las cuales fueron tratadas con la relación E/S y agitación óptima determinadas en el diseño central compuesto de la sección 2.2.5. Para estimar la cantidad de producto generado por la acción de la enzima, se tomaron 5 ml del medio de reacción cada 5 min, inactivando la enzima en un baño de agua en ebullición. Luego se midió la cantidad de oligosacáridos de ácido galacturónico liberados utilizando el método DNS. Posteriormente, se graficó la cantidad de azúcar liberada en moles respecto al tiempo y se tomó la pendiente generada por los primeros 5 datos experimentales, lo que permitió determinar la velocidad inicial (V_i) del proceso. Estos valores de velocidad son usados para generar un diagrama de Lineweaver-Burk, graficando el inverso de la velocidad ($1/V_i$) contra el inverso de la concentración de sustrato ($1/[S]$), lo que permitió determinar V_{max} y K_M .

2.2.7. Cinética del proceso de clarificación

Se realizó un seguimiento del cambio de la claridad y concentración de azúcares reductores en el tiempo de los jarabes tratados mediante HE, sometiendo 300 ml de jarabe a un proceso de clarificación, con la concentración enzimática y agitación de óptimas a 50 °C. Cada 20 minutos se retiraron 10 ml de solución, inactivando la enzima en un baño de agua hirviendo a 95 °C durante 5 minutos y enfriando en un baño de hielo, luego son centrifugados a 4500 rpm por 5 minutos. Por medio del método DNS se determinó la cantidad de oligosacáridos de ácido galacturónico liberados y se midió la transmitancia a 600 nm para determinar la claridad en los jarabes producidos.

2.3. Resultados y discusión

2.3.1 Resultados de la caracterización de la materia prima

La Tabla 2.2 presenta los resultados de la caracterización de la fibra de maíz, con estos ensayos se determinó un 12.9% de celulosa, la cual puede ser hidrolizada por medio de celulasas, y un 0.4% de pectina, la cual termina en los jarabes por los procesos de calentamiento e hidrólisis de la celulosa.

Tabla 2.2. Caracterización de la fibra de maíz base seca.

Componente	Porcentaje (%)
Humedad	8.5 ± 0.1
Sólidos Totales	91.5 ± 0.1
Celulosa	16.3 ± 0.1
Hemicelulosa	27.5 ± 0.1
Lignina	13.4 ± 0.1
Pectina	0.4 ± 0.1
Almidón	0.0 ± 0.1
Proteína	9.4 ± 0.1
Cenizas	0.6 ± 0.1
Extractivos Totales	32.4 ± 0.1
Total	100.1 ± 0.1

Fuente: elaboración propia

Comparando los resultados obtenidos con los presentados por Gáspár et al., Kálmán et al., Kaur et al. y Zhang et al., (Gáspár et al., 2005; Kálmán et al., 2006; Kaur et al., 2020; Zhang et al., 2021), se puede apreciar valores similares en la celulosa, y cenizas en el trabajo de Kálmán et al. que reporta un valor del 15% para la celulosa y del 1% para las cenizas. El valor de la hemicelulosa fue menor comparado con este trabajo donde reportan un valor del 37.1%, siendo más cercano al valor reportado por Kaur et al. donde se presenta un 22.4%. El artículo de Gáspár et al. obtuvo un valor de lignina del 12.2% bastante similar al obtenido en este estudio. Una posible fuente de variación es la presencia de almidón reportada por estos autores, el residuo que se utilizó en este ensayo es se le han realizado diversos procesos para retirar el almidón, mientras en la literatura reporta fibra de maíz en natura a la cual aún no se le ha retirado el almidón o solo se les ha realizado este proceso.

2.3.2 Resultados de la producción de jarabe a partir de la fibra de maíz

En la Tabla 2.3 se puede apreciar las condiciones para la elaboración de los jarabes que se usarán en los ensayos de clarificación.

Tabla 2.3. Condiciones para la producción de los jarabes.

Recipiente	1	2	3	4	5
Peso Sólidos [± 0.0001 g]	28.2848	29.2029	28.2521	28.0483	28.0177
Peso buffer [± 5 g]	375	375	375	375	375
% sólidos [p/p]	7.01	7.22	7.01	6.96	6.95
% enzima [v/v]	3.70	3.70	3.70	3.70	3.70
°Brix iniciales fibra de maíz [$\pm 0,1^\circ$]	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8
°Brix enzima [$\pm 0,1^\circ$]	2.3	2.4	2.6	2.6	2.6
°Brix 24 horas [$\pm 0,1^\circ$]	5.2	5.0	5.0	5.1	4.9
°Brix 48 horas [$\pm 0,1^\circ$]	5.4	5.1	5.0	5.0	5.0

Fuente: elaboración propia

Observando el desarrollo de los sólidos disueltos, este fue muy similar en todos los ensayos, duplicándose durante las primeras 24 horas después de haber añadido la enzima, pero permaneciendo aproximadamente constante hasta llegar a las 48 horas. Estas cinco soluciones se centrifugaron a 4500 rpm por cinco minutos para eliminar los sólidos de mayor tamaño y se combinaron, obteniendo un jarabe con 4,8 °Brix y una concentración de pectina del 0.13 ± 0.02 %. Este jarabe presentó inicialmente una concentración de azúcares reductores de 22.37 g/L y una claridad de 11.8 %T600, la cual pasó a 62.6 %T600 después de la centrifugación inicial, este jarabe es el que se usará para los ensayos de clarificación con enzima.

2.3.3 Resultados de la determinación de la actividad enzimática de la pectinasa

La cantidad de oligosacáridos de ácido galacturónico liberados por las soluciones enzimáticas con un factor de dilución de 6000, 9000 y 12000 fue de 0.472, 0.385 y 0.314 g/L respectivamente, graficando estos resultados contra su correspondiente factor de dilución se obtuvo una línea con un coeficiente de determinación R^2 de 0.996 y una ecuación:

$$\text{Factor de dilución} = -37830 \cdot A. Gal + 23759 \quad (2.2)$$

Reemplazando el valor de 0.4 g/L en esta ecuación muestra que la concentración de enzima que libera 0.4 g/L de ácido galacturónico presenta un factor de dilución de 8627, utilizando este dato en la ecuación 2.1 se determinó que la solución enzimática original tiene una actividad de 5.926 U/ μ L.

La curva de calibración de albúmina entre 0.2 a 2.0 g/L utilizada para la determinación de la proteína presenta un coeficiente de determinación R^2 de 0.968 y es representada por la ecuación 2.3:

$$\text{Concentración (g/L)} = 40,5826 \cdot Abs - 0,0439 \quad (2.3)$$

Donde Abs es la absorbancia de la muestra y *Concentración (g/L)* es la cantidad de proteína presente en la muestra. Midiendo la absorbancia a 595 nm de 1 μ L de solución

enzimática disuelta en 1 ml de agua destilada, se encontró una absorbancia de 0.027 ± 0.001 , que corresponde a una concentración de 1.072 mg de proteína/ μ L en la solución enzimática, lo que nos permite encontrar que la actividad específica de la enzima tiene un valor de 5.528 U/mg de proteína, que concuerda con el valor reportado por el proveedor de > 5 U/mg de proteína.

2.3.4. Resultados de la optimización del proceso de clarificación

Los resultados de claridad, pH, azúcares liberados y sólidos disueltos para los 14 ensayos, un blanco sin tratamiento enzimático y jarabe sin centrifugar pueden apreciarse en la Tabla 2.4.

Tabla 2.4. Diseño de experimentos para la etapa de clarificación.

Ensayo	Relación E/S	Agitación	Claridad (%T600)	pH	Azúcar liberado (g/L)	Sólidos ($^{\circ}$ Brix)
1	$\alpha+$	0	74.4	4.851	25.265	4.7
2	0	0	79.7	4.842	24.553	4.6
3	0	0	78.5	4.835	24.506	4.6
4	-1	+1	77.2	4.823	24.695	4.5
5	+1	-1	77.7	4.855	25.312	4.6
6	0	$\alpha-$	71.4	4.837	23.177	4.6
7	0	0	79.1	4.835	24.648	4.6
8	-1	-1	69.7	4.860	24.221	4.6
9	0	0	80.1	4.833	24.411	4.6
10	0	0	79.3	4.840	24.316	4.6
11	$\alpha-$	0	67.5	4.877	23.936	4.5
12	+1	+1	77.8	4.857	25.122	4.6
13	0	0	76.9	4.843	24.506	4.6
14	0	$\alpha+$	77.1	4.752	24.695	4.6
Blanco enzima	-	-	62.6	4.897	22.655	4.5
Blanco de Jarabe	-	-	11.8	4.914	22.370	4.5

Fuente: elaboración propia

Haciendo un análisis de los resultados, se observa que a una mayor relación enzimática se libera más ácido galacturónico, lo que lleva a una reducción del pH, y también se puede apreciar un ligero aumento de los sólidos disueltos a medida que se aplica más enzima, pero al momento de estudiar la interacción entre la relación enzimática y la agitación, y el efecto que tienen estas variables en la claridad se hace difícil encontrar un resultado claro, por lo que estos datos fueron procesados con Minitab 2015 (versión gratuita), en la Tabla 2.5 se puede apreciar los resultados de este análisis, con el fin de poder apreciar más fácilmente la presencia de puntos de inflexión en la superficie generada al generar un modelo empírico de segundo orden:

Tabla 2.5. ANOVA para claridad.

Coefficientes	Valor	Valor p
R ²	0.878	0.002
R ² ajustado	0.802	0.002
Constante	78.933	5.138e-14
R E/S	2.295	0.006
Agitación	1.958	0.01
R E/S ²	-3.242	0.001
Agitación ²	-1.592	0.04
R E/S*Agitación	-1.850	0.07
Falta de ajuste	-	0.06

Fuente: elaboración propia

Este modelo generado por el análisis ANOVA muestra que los coeficientes de primer y segundo orden para la relación enzimática y la agitación son significativos, con un nivel de confianza mayor al 95%, al presentar un valor p menor que 0.05, pero la interacción de estos dos coeficientes al presentar un valor p mayor que 0.05, no se puede asumir como significativo a este nivel de confianza. El modelo empírico puede ser expresado por la siguiente expresión polinómica

$$\text{Claridad (\%T600)} = 78.933 + 2.295 \cdot \text{Relación E/S} + 1.958 \cdot \text{agitacion} - 3.242 \cdot \text{Relación E/S}^2 - 1.592 \cdot \text{agitación}^2 \quad (2.4)$$

El desempeño de este modelo puede ser verificado con los valores del coeficiente de determinación (R²), coeficiente de determinación ajustado (R² ajustado) y el valor p de la falta de ajuste, los datos utilizados para generar al modelo se ajustan a este, por lo que el valor de R² y R² ajustado son cercanos a 1 y presentan un valor p (0.001) menor que 0.05, por otra parte, la falta de ajuste al modelo tiene un valor de 0.06 mayor que 0.05 mostrando que este modelo es aceptable para representación de estos y la predicción valores nuevos, al utilizar valores nuevos de agitación y relación E/S en la ecuación 2.4. En la primera parte de la figura 2.1 se puede apreciar que la claridad presentan un máximo al aplicar 3.716 unidades de enzima por ml de jarabe (0.627 µL de solución enzimática por mL de jarabe) y una agitación de 267 rpm, al aplicar una cantidad de enzima menor no se remueven completamente los residuos de pectina y se obtiene una claridad menor, mientras que si se usa una cantidad mayor de enzima la presencia de estos compuestos disueltos causa que la transmitancia de la luz sea menor, obteniendo jarabes menos claros. En la segunda parte de la figura se muestra una representación 3D de la superficie obtenida con el diseño experimental, mostrando claramente la presencia de un máximo en la región mencionada anteriormente.

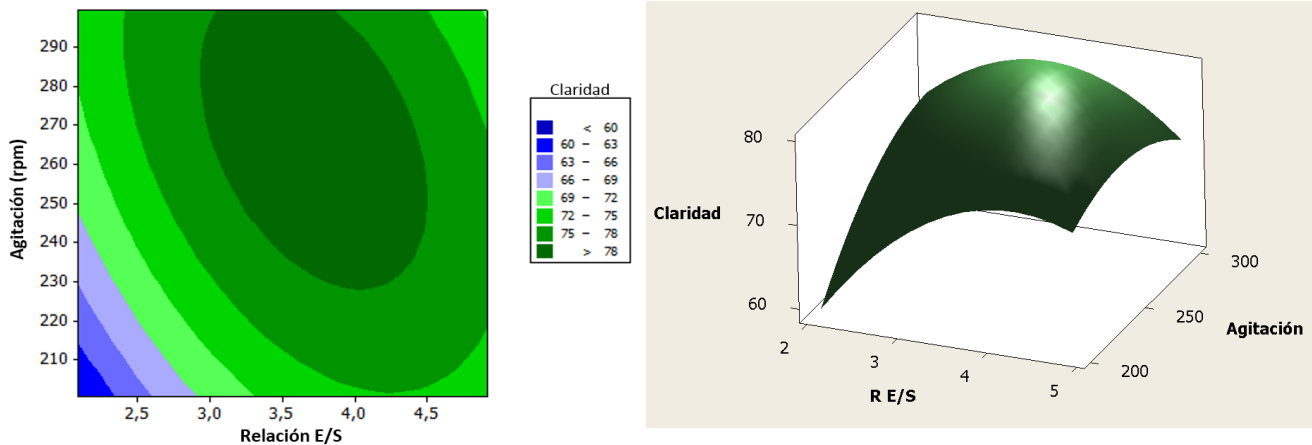


Figura 2.1. a) Contorno de claridad respecto agitación y relación E/S. b) Representación 3D de la superficie. Fuente: Elaboración propia

Para validar los resultados de la optimización hecha usando este modelo se realizaron pruebas de clarificación por triplicado en el punto óptimo (3.7143 U/mL y 267.4991 rpm), uno con alta agitación y enzima (4.9142 U/mL y 299.4975 rpm), y uno con baja agitación y enzima (2.0858 U/mL y 200.5025 rpm), comparando los resultados obtenidos con los predichos, en la Tabla 2.6 se observan los resultados obtenidos:

Tabla 2.6. Validación del diseño central compuesto.

Ensayo	Valor obtenido	Valor esperado	%Error
Alto	74.9 ± 2.9	74.9	0.1
Óptimo	78.6 ± 0.6	79.7	1.4
Bajo	70.3 ± 1.7	71.1	1.1

Fuente: elaboración propia

Bajos valores de error (<2%) indican que el modelo obtenido puede ser usado y que el óptimo se encuentra en la región alrededor de 3.7143 U/mL y 267.4991 rpm.

2.3.5. Resultados de la determinación de los parámetros cinéticos de la enzima

Las soluciones de pectina de manzana utilizadas para esta determinación fueron de 0.010, 0.015, 0.030, 0.090 y 0.150% p/p, la velocidad inicial obtenidas al graficar la cantidad de azúcares liberados contra el tiempo, tomando la pendiente obtenida en los primeros 25 minutos pueden ser apreciadas en la Tabla 2.7.

Tabla 2.7. Velocidades iniciales y concentración.

Concentración (% p/p)	Velocidades iniciales ($g/L \cdot min$)
0.010	0.012
0.015	0.017
0.030	0.035
0.090	0.112
0.150	0.186

Fuente: elaboración propia

Graficando el inverso de estos valores de velocidad inicial y el inverso de la concentración de pectina en moles, se obtiene el diagrama de Lineweaver-Burk, el cual presenta un coeficiente de determinación del 0.998 y es explicado por la ecuación:

$$1/V_i = 6.68E - 04 \cdot 1/[pectina] + 0.0522 \quad (2.5)$$

Con este diagrama se encontró que la V_{max} de la enzima es de 2439,7 mg/(mL*min) y un K_M de 1.656 mg/mL, este valor de K_M es similar al obtenido por Dalagnol et al. [56] que presenta una V_{max} 1513 mg/(mL*min), $K_M = 1.6$ mg/mL. Una comparación entre estos resultados puede ser hecha, porque en este estudio también se busca la actividad de enzimas pectídicas producidas por el hongo *Aspergillus niger*, utilizando la pectina de manzana como sustrato. La presencia de polimorfismos en las enzimas de la familia de las pectinasas, y al uso de otros factores al momento de encontrar los parámetros como el uso de ultrasonidos o la aplicación de otros métodos de obtención y purificación son posibles razones para explicar la diferencia obtenida en el trabajo de Dalagnol et al y el trabajo actual

2.3.6. Resultados de la cinética del proceso de clarificación

Para realizar estos ensayos se utilizó una nueva muestra de jarabe siguiendo los mismos pasos para su preparación que en los ensayos anteriores, esta solución presentaba inicialmente una claridad de 65.8 %T600, 0.051 ± 0.002 % de pectina y unos azúcares reductores de 17.636 g/L, después de las dos horas de tratamiento, el incremento de la claridad llegó a un valor de 88,1 %T600, siguiendo una línea curva con un coeficiente de determinación R^2 del 0.993, la cual es descrita por la ecuación polinomial:

$$Claridad (\%T600) = 66 + 0.15 \cdot t + 2.66E - 04 \cdot t^2 \quad (2.6)$$

Los azúcares reductores llegaron a un valor de 20,901 g/L, esta propiedad siguió una línea curva, la cual puede ser descrita por la siguiente ecuación y presenta un R^2 de 0.987:

$$Azúcares (g/L) = 17.5 + 0.0445 \cdot t + -1.28E - 04 \cdot t^2 \quad (2.7)$$

Comparando estos resultados con los obtenidos durante las pruebas de clarificación anteriores mostrados en la Tabla 2.4, se puede apreciar que se obtuvo una mayor claridad del jarabe, pero una menor cantidad de oligosacáridos de ácido galacturónico liberados, estos resultados pueden ser explicados por qué el jarabe utilizado en estos nuevos ensayos presenta una menor cantidad inicial de pectina, logrando llegar a un jarabe final con menos pectina que es más claro y al degradar menos pectina se presentan menos de estos compuestos. En la figura 2.2 se puede apreciar la apariencia del jarabe antes y después del proceso de clarificación enzimática, mostrando el incremento de la claridad por acción de este proceso.



Figura 2.2. Jarabe sin tratar y jarabe tratado. Fuente: elaboración propia

2.4. Conclusiones

En este capítulo fue posible producir un jarabe de glucosa a partir de fibra de maíz y desarrollar una metodología para la clarificación de jarabes glucosados mediante enzimas pectínicas. La caracterización de la fibra de maíz utilizada para la preparación del jarabe contiene 16.3% de celulosa, 27.8% de hemicelulosa, 13.4% de lignina, 0.4% de pectina, 0.6% de cenizas y 32.4% de extractivos. Se obtuvo un jarabe de glucosa siguiendo las metodologías del laboratorio BIOFRUN, con una concentración de azúcares reductores entre 17.63 - 22.37 g/L y una concentración de pectina entre 0.05 - 0.13%, entre 62.6 - 65.8 %T600 de claridad en los diferentes lotes. Mediante un análisis ANOVA se determinó que la cantidad de enzima y la agitación que generaban la respuesta más alta en la claridad del jarabe se encuentran alrededor de 3,716 U/mL y una agitación de 267 rpm, pasando de 65.8 a 88.1 %T600. Adicionalmente, se realizó una caracterización de la enzima proveniente del hongo *Aspergillus niger*, la cual presenta una actividad de 5.528 U/mg y una V_{max} 19151 U/mL y K_M de 1.656 mg/mL, cuando es usada pectina de manzana como sustrato. A partir de los diferentes resultados, se buscará estudiar el modelado del proceso de clarificación por medio de la simulación del proceso de degradación de pectina y ver cómo esta afecta la claridad del jarabe

2.5. Bibliografía

Abo Nouh, Fatma Ahmed, Sara Atef Gezaf, Hebatallah H. Abo Nahas, Yousef H. Abo Nahas, Celia Vargas-De-La-Cruz, Richard A. Solorzano Acosta, Daniela Landa-Acuña, Bernabe Luis-Alaya, y Ahmed M. Abdel-Azeem. «Bioprospecting for Biomolecules from Different Fungal Communities: An Introduction». En Industrially Important Fungi for Sustainable Development: Volume 2: Bioprospecting for Biomolecules, editado por Ahmed M. Abdel-Azeem, Ajar Nath Yadav, Neelam

- Yadav, y Minaxi Sharma, 1-71. *Fungal Biology*. Cham: Springer International Publishing, 2021. https://doi.org/10.1007/978-3-030-85603-8_1.
- Ahmed, Asia, y Muhammad Sohail. «Characterization of Pectinase from *Geotrichum Candidum* AA15 and Its Potential Application in Orange Juice Clarification». *Journal of King Saud University - Science* 32, n.o 1 (1 de enero de 2020): 955-61. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2019.07.002>.
- Ahmed, Shams Forruque, Nazifa Rafa, M. Mofijur, Irfan Anjum Badruddin, Abrar Inayat, Md Sawkat Ali, Omar Farrok, y T. M. Yunus Khan. «Biohydrogen Production From Biomass Sources: Metabolic Pathways and Economic Analysis». *Frontiers in Energy Research* 9 (2021). <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fenrg.2021.753878>.
- Almandoz, Cristina, Cecilia Pagliero, Ariel Ochoa, y José Marchese. «Corn Syrup Clarification by Microfiltration with Ceramic Membranes». *Journal of Membrane Science* 363, n.o 1 (1 de noviembre de 2010): 87-95. <https://doi.org/10.1016/j.memsci.2010.07.017>.
- Balbool, Bassem A., Fatma Ahmed Abo Nouh, Sara Atef Gezaf, Akram H. Mohamed, y Ahmed M. Abdel-Azeem. «Bioprospecting of Thermophilic Fungal Enzymes and Potential Applications». En *Industrially Important Fungi for Sustainable Development: Volume 2: Bioprospecting for Biomolecules*, editado por Ahmed M. Abdel-Azeem, Ajar Nath Yadav, Neelam Yadav, y Minaxi Sharma, 347-75. *Fungal Biology*. Cham: Springer International Publishing, 2021. https://doi.org/10.1007/978-3-030-85603-8_9.
- Barros, Rodrigo da Rocha Olivieri de, Paolo Becarelli, Raul Alves de Oliveira, Leonardo Tognotti, y Elba Pinto da Silva Bon. «Triticum Spelta Straw Hydrothermal Pretreatment for the Production of Glucose Syrups via Enzymatic Hydrolysis». *Biochemical Engineering Journal* 151 (15 de noviembre de 2019): 107340. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2019.107340>.
- Belitz, Hans-Dieter, Werner Grosch, y Peter Schieberle, eds. «Sugars, Sugar Alcohols and Honey». En *Food Chemistry*, 862-91. Berlin, Heidelberg: Springer, 2009. https://doi.org/10.1007/978-3-540-69934-7_20.
- BeMiller, James N. «15 - Pectins». En *Carbohydrate Chemistry for Food Scientists (Third Edition)*, editado por James N. BeMiller, 303-12. AACC International Press, 2019. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812069-9.00015-7>.
- BeMiller, James N. «19 - Carbohydrate and Noncarbohydrate Sweeteners». En *Carbohydrate Chemistry for Food Scientists (Third Edition)*, editado por James N. BeMiller, 371-99. AACC International Press, 2019. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812069-9.00019-4>.
- Bonnin, Estelle, y Jérôme Pelloux. «Pectin Degrading Enzymes». En *Pectin: Technological and Physiological Properties*, editado por Vassilis Kontogiorgos, 37-60. Cham: Springer International Publishing, 2020. https://doi.org/10.1007/978-3-030-53421-9_3.
- Bradford, Marion M. «A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding». *Analytical*

- Biochemistry 72, n.o 1 (7 de mayo de 1976): 248-54. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3).
- Cerreti, Martina, Kristina Kantorova, Marco Esti, Michal Rosenberg, y Martin Rebroš. «Immobilisation of pectinases into PVA gel for fruit juice application». *International Journal of Food Science & Technology* 52 (1 de febrero de 2017): 531-39. <https://doi.org/10.1111/ijfs.13309>.
- Cruz, Leandra Cristina Crema, Roger Darros Barbosa, y Pedro Alexandre da Cruz. «Effects of Temperature and Cationic Surfactant on the Clarification of Sugar Syrup by Air Dissolved Flotation». *International Journal of Advanced Engineering Research and Science* 6, n.o 6 (5 de octubre de 2019). <http://journal-repository.com/index.php/ijaers/article/view/659>.
- Dalagnol, Luíza M. G., Vitória C. C. Silveira, Halisson Baron da Silva, Vitor Manfroi, y Rafael C. Rodrigues. «Improvement of Pectinase, Xylanase and Cellulase Activities by Ultrasound: Effects on Enzymes and Substrates, Kinetics and Thermodynamic Parameters». *Process Biochemistry* 61 (1 de octubre de 2017): 80-87. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2017.06.029>.
- Djalal, M., F. Bastian, S. H. Hidayat, y A. Laga. «Glucose Syrup Clarification with a Different Form of Activated Charcoal». *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science* 343, n.o 1 (octubre de 2019): 012073. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/343/1/012073>.
- Domínguez, Oscar, Gloria Cruz, Gloria González, y Andira Rentería. «Alternativas para la clarificación del jarabe de glucosa obtenido por hidrólisis enzimática del almidón.» *Ingeniería e Investigación* 55 (1 de septiembre de 2004): 8-21.
- Doran, Pauline M. «Chapter 12 - Homogeneous Reactions». En *Bioprocess Engineering Principles (Second Edition)*, editado por Pauline M. Doran, 599-703. London: Academic Press, 2013. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-220851-5.00012-5>.
- Gonzalez, Andres Felipe Rojas, y Cilia Flórez Montes. «Valorización de residuos de frutas para combustión y pirólisis». *Revista Politécnica* 15, n.o 28 (25 de junio de 2019): 42-53. <https://doi.org/10.33571/rpolitec.v15n28a4>.
- Gáspár, Melinda, Gergely Kálmán, y Kati Réczey. «Corn Fiber as a Raw Material for Hemicellulose and Ethanol Production». *Process Biochemistry* 42, n.o 7 (1 de julio de 2007): 1135-39. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2007.04.003>.
- Gáspár, M., T. Juhász, Zs. Szengyel, y K. Réczey. «Fractionation and Utilisation of Corn Fibre Carbohydrates». *Process Biochemistry* 40, n.o 3 (1 de marzo de 2005): 1183-88. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2004.04.004>.
- Hames, B, R Ruiz, C Scarlata, A Sluiter, J Sluiter, y D Templeton. «Preparation of Samples for Compositional Analysis: Laboratory Analytical Procedure (LAP); Issue Date 08/08/2008». Technical Report, 2008, 12.
- Hosseini, Seyed Saeid, Faramarz Khodaiyan, Seyed Mohammad Mousavi, y Seyedeh Zahra Azimi. «Clarification of the Pomegranate Juice in a Bioreactor Packed by Pectinase Enzymes Immobilized on the Glass Bead Activated with Polyaldehyde Polysaccharides». *LWT* 137 (1 de febrero de 2021): 110500. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.110500>.

- Hull, Peter. «History of Glucose Syrups». En *Glucose Syrups*, 1-7. John Wiley & Sons, Ltd, 2010. <https://doi.org/10.1002/9781444314748.ch1>.
- Kharazmi, Sara, Asghar Taheri-Kafrani, y Asieh Soozanipour. «Efficient Immobilization of Pectinase on Trichlorotriazine-Functionalized Polyethylene Glycol-Grafted Magnetic Nanoparticles: A Stable and Robust Nanobiocatalyst for Fruit Juice Clarification». *Food Chemistry* 325 (30 de septiembre de 2020): 126890. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126890>.
- Kálmán, Gergely, Katalin Recseg, Maria Gaspar, y K Réczey. «Novel Approach of Corn Fiber Utilization». *Applied biochemistry and biotechnology* 131 (1 de abril de 2006): 738-50. <https://doi.org/10.1385/ABAB:131:1:738>.
- Kaur, Dalveer, Gisha Singla, Umesh Singh, y Meena Krishania. «Efficient Process Engineering for Extraction of Hemicellulose from Corn Fiber and Its Characterization». *Carbohydrate Polymer Technologies and Applications* 1 (25 de diciembre de 2020): 100011. <https://doi.org/10.1016/j.carpta.2020.100011>.
- Kwan, Tsz Him, Khai Lun Ong, Md Ariful Haque, Wentao Tang, Sandeep Kulkarni, y Carol Sze Ki Lin. «High Fructose Syrup Production from Mixed Food and Beverage Waste Hydrolysate at Laboratory and Pilot Scales». *Food and Bioproducts Processing* 111 (1 de septiembre de 2018): 141-52. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2018.08.001>.
- Ladeira Ázar, Rafaela I. S., Marciana da Luz Morales, Gabriela Piccolo Maitan-Alfenas, Daniel L. Falkoski, Rafael Ferreira Alfenas, y Valéria M. Guimarães. «Apple Juice Clarification by a Purified Polygalacturonase from *Calonectria Pteridis*». *Food and Bioproducts Processing* 119 (1 de enero de 2020): 238-45. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2019.11.013>.
- Li, Qian, Anthony M. Coffman, y Lu-Kwang Ju. «Development of Reproducible Assays for Polygalacturonase and Pectinase». *Enzyme and Microbial Technology* 72 (1 de mayo de 2015): 42-48. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2015.02.006>.
- Li, Wen, Guo-Qing Ling, Pin Huang, Kai Li, Hai-Qin Lu, Fang-Xue Hang, Yu Zhang, et al. «Performance of Ceramic Microfiltration Membranes for Treating Carbonated and Filtered Remelt Syrup in Sugar Refinery». *Journal of Food Engineering* 170 (1 de febrero de 2016): 41-49. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2015.09.012>.
- Lu, Xiaohua, Jianguo Lin, Changgao Wang, Xin Du, y Jun Cai. «Purification and Characterization of Exo-Polygalacturonase from *Zygoascus Hellenicus* V25 and Its Potential Application in Fruit Juice Clarification». *Food Science and Biotechnology* 25, n.o 5 (2016): 1379-85. <https://doi.org/10.1007/s10068-016-0215-3>.
- Montañez Soto, Jose Luis, José González, Aurea Bernardino-Nicanor, y Emma Ramos-Ramírez. «Enzymatic production of high fructose syrup from Agave tequilana fructans and its physicochemical characterization». *AFRICAN JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY* 10 (19 de diciembre de 2011): 19137-43. <https://doi.org/10.5897/AJB11.2704>.
- Ninga, Kombele Aime, Zangue Steve Carly Desobgo, Sirshendu De, y Emmanuel Jong Nso. «Pectinase Hydrolysis of Guava Pulp: Effect on the Physicochemical Characteristics of Its Juice». *Heliyon* 7, n.o 10 (1 de octubre de 2021). <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e08141>.

- Peñaranda González, Laura Victoria, Sandra Patricia Montenegro Gómez, y Paula Andrea Giraldo Abad. «Aprovechamiento de residuos agroindustriales en Colombia». *Revista de Investigación Agraria y Ambiental* 8, n.o 2 (5 de junio de 2017): 141-50. <https://doi.org/10.22490/21456453.2040>.
- Pihlajaniemi, Ville, Outi Mattila, Taru Koitto, Markus Nikinmaa, Raija-Liisa Heiniö, Lotta Sorsamäki, Matti Siika-aho, y Emilia Nordlund. «Production of Syrup Rich in Arabinoxylan Oligomers and Antioxidants from Wheat Bran by Alkaline Pretreatment and Enzymatic Hydrolysis, and Applicability in Baking». *Journal of Cereal Science* 95 (1 de septiembre de 2020): 103043. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2020.103043>.
- Pagnonceli, J., L. M. Rasbold, G. B. Rocha, J. L. C. Silva, M. K. Kadowaki, R. C. G. Simão, y A. Maller. «Biotechnological Potential of an Exo-Polygalacturonase of the New Strain *Penicillium Janthinellum* VI2R3M: Biochemical Characterization and Clarification of Fruit Juices». *Journal of Applied Microbiology* 127, n.o 6 (diciembre de 2019): 1706-15. <https://doi.org/10.1111/jam.14426>.
- Ravve, A. «Naturally Occurring Polymers». En *Principles of Polymer Chemistry*, editado por A. Ravve, 537-65. New York, NY: Springer, 2012. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-2212-9_8.
- Ruiz-Colorado, Angela Adriana, y Bueno Zabala, Karen Alejandra. Proceso para obtener jarabes azucarados a partir de residuos agroindustriales. World Intellectual Property Organization WO2017212405A1, filed 6 de junio de 2017, y issued 14 de diciembre de 2017. <https://patents.google.com/patent/WO2017212405A1/es>.
- Ruiz-Colorado, A. A., Bohórquez, C., Herrera, S. N., Medina De Perez, V. I., Mejia, M. C., Hoyos, L. M., & Pérez, Y. M. (2009). "Procedimiento para la producción de jarabe azucarado por degradación de materiales amiláceos y lignocelulósicos de la planta de banano". (n.º de patente 08-055808).
- Ropartz, David, y Marie-Christine Ralet. «Pectin Structure». En *Pectin: Technological and Physiological Properties*, editado por Vassilis Kontogiorgos, 17-36. Cham: Springer International Publishing, 2020. https://doi.org/10.1007/978-3-030-53421-9_2.
- Secretaria de comercio y fomento industrial. (1980). "frutas y derivados- determinación de pectina" (NMX-F-347-S-1980).
- Singh, R. S., K. Chauhan, y R. P. Singh. «Enzymatic Approaches for the Synthesis of High Fructose Syrup». En *Plant Biotechnology: Recent Advancements and Developments*, editado por Suresh Kumar Gahlawat, Raj Kumar Salar, Priyanka Siwach, Joginder Singh Duhan, Suresh Kumar, y Pawan Kaur, 189-211. Singapore: Springer, 2017. https://doi.org/10.1007/978-981-10-4732-9_10.
- Sluiter, A. «Determination of Ash in Biomass: Laboratory Analytical Procedure (LAP); Issue Date: 7/17/2005». Technical Report, 2008a, 8.
- Sluiter, A. «Determination of Extractives in Biomass: Laboratory Analytical Procedure (LAP); Issue Date 7/17/2005». Technical Report, 2008b, 12.
- Sluiter, A. «Determination of Total Solids in Biomass and Total Dissolved Solids in Liquid Process Samples: Laboratory Analytical Procedure (LAP)». Technical Report, 2008c, 9.

- Sluiter, A, y J Sluiter. «Determination of Starch in Solid Biomass Samples by HPLC: Laboratory Analytical Procedure (LAP); Issue Date: 07/17/2005». Technical Report, 2008d, 10.
- Sluiter, A. Hames, B. Ruiz, R. Scarlata, C. Sluiter, J. Templeton, D. y Crocker D. «Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass: Laboratory Analytical Procedure (LAP); Issue Date 4/25/2008». Technical Report, 2008e, 18.
- Van Buren, J. P. «CHAPTER 1 - Function of Pectin in Plant Tissue Structure and Firmness». En The Chemistry and Technology of Pectin, editado por Reginald H. Walter, 1-22. Food Science and Technology. San Diego: Academic Press, 1991. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-092644-5.50006-6>.
- Zhang, Bin, Baorui Zhan, y Jie Bao. «Reframing Biorefinery Processing Chain of Corn Fiber for Cellulosic Ethanol Production». Industrial Crops and Products 170 (15 de octubre de 2021): 113791. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2021.113791>.
- Zhang, Luxin, Guoyun Xi, Kun Yu, Han Yu, y Xiaochang Wang. «Furfural Production from Biomass-Derived Carbohydrates and Lignocellulosic Residues via Heterogeneous Acid Catalysts». Industrial Crops and Products 98 (1 de abril de 2017): 68-75. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.01.014>.

CAPÍTULO 3: Simulación del proceso enzimático de clarificación de jarabes glucosados

En este capítulo se realiza la simulación del proceso de clarificación enzimática de jarabe, utilizando los datos experimentales encontrados en el capítulo anterior e información de la literatura, se procede a formular un mecanismo de reacción para la degradación de la pectina por medio de las enzimas pectínicas, que combinado con los parámetros cinéticos encontrados en el capítulo 2 y en la literatura permiten encontrar un modelo capaz de simular el proceso de degradación de la pectina y formación del ácido galacturónico y sus oligosacáridos, y la relación de esta degradación con la clarificación del jarabe.

3.1 Introducción

En el proceso de producción de jarabes glucosados a partir de residuos agroindustriales, son usadas enzimas amilasas y celulasas para degradar el almidón y la celulosa presentes, liberando la glucosa que los compone y así obtener una solución rica en este azúcar (Barros et al., 2019; Pihlajaniemi et al., 2020; Ruiz-Colorado & Bueno, 2017; Ruiz-Colorado et al., 2009). Al momento de realizar esta hidrólisis, quedan sólidos suspendidos en el jarabe que le dan un aspecto turbio y opaco al dispersar la luz que entra a este. Por esta razón, estos jarabes son sometidos a procesos de clarificación, donde estos compuestos son degradados o removidos (BeMiller, 2019; Domínguez et al., 2004; Hobbs, 2009; Hull, 2010). En el capítulo anterior se estudió, el uso de enzimas pectínicas para realizar la hidrólisis de la pectina, un compuesto que tiene la capacidad de formar geles, los cuales atrapan otros sólidos, causando aumentos de la viscosidad y turbidez (BeMiller, 1986; Rexová-Benková 1973). En el capítulo anterior se encontró que las enzimas pectínicas presentan la capacidad de mejorar el proceso de clarificación de los jarabes glucosados producidos a partir de residuos agroindustriales, aumentando la claridad de los jarabes de un 65 - 70 % a un 85 - 90 %.

Existen diversos estudios que se han centrado en analizar, como las diferentes enzimas pectínicas obtenidas de diferentes hongos, bacterias y plantas actúan sobre la pectina y los subproductos formados durante la degradación de las biomasas lignocelulósicas, y otras maneras de mejorar el proceso de degradación de pectina, como los publicados por Biz et al. (2014), Desagiaco et al. (2021) y Munir et al. (2020). Biz et al. estudiaron la cinética del proceso de degradación de pectina, la formación de los azúcares contra el tiempo y la reducción en velocidad que sucede al principio de la reacción, Desagiaco et al., estudiaron la enzima desde su estructura ternaria y cuaternaria de la cadena polipeptídica, el modo de acción, las condiciones óptimas de operación y la inactivación por presencia de inhibidores metálicos y Munir et al. también estudiaron los métodos de producción de la enzima, sus diferentes aplicaciones industriales y la caracterización cinética de la enzima. Hay muy pocos estudios centrados en modelar el proceso de clarificación enzimática, y los pocos que hay se centran en buscar las condiciones óptimas para obtener la clarificación más alta y la predicción de la operación del proceso, por medio

de modelos de redes neuronales o usando exclusivamente diseños de superficie de respuesta. El uso de modelos matemáticos con base fenomenológica presenta ventajas para su uso en la investigación y la industria, permitiendo realizar la simulación del proceso en solo segundos, con la capacidad de devolverse y analizando la formación y degradación de cada uno de los compuestos que intervienen en la reacción (Álvarez et al., 2009; Gómez et al., 2008; Ortega et al., 2016). En este trabajo se realizó la simulación del proceso de clarificación de jarabes glucosados, teniendo en cuenta efectos como la temperatura, el pH, la agitación y la inactivación de la enzima por transferencia de calor, que son procesos inherentes de la hidrólisis enzimática y cuya incorporación permitiría obtener unos resultados más similares a la realidad del proceso.

3.2. Materiales y métodos

3.2.1. Materiales

En este trabajo se utilizó como sustrato el jarabe glucosado producido a partir de la hidrólisis de la fibra de maíz, un residuo generado por la molienda de los granos del maíz y la extracción del almidón, dejando solo el endospermo del grano. La caracterización de esta materia prima por medio de las metodologías del National Renewable Energy Laboratory (NREL) y el método de producción del jarabe por medio de la hidrólisis enzimática de la fibra de maíz fue reportado, en el capítulo 2.

Para realizar la degradación de la pectina se utilizó la pectinasa/poligalacturonasa (EC 3.2.1.15) proveniente del hongo *Aspergillus niger*, obtenida del proveedor Sigma-Aldrich. Esta solución consiste en un líquido transparente de color café en base de glicerol, el proveedor informa > 5 unidades enzimáticas por miligramo de proteína, donde una unidad enzimática corresponde a la cantidad de enzima que produce un μmol de ácido galacturónico por minuto a un pH de 4.0 y una temperatura de 45 °C. Para conservar la solución enzimática, esta se mantiene a una temperatura de 2 a 8 °C

Se utilizó el programa MATLAB® y la función *ode15s* para la solución del sistema y la función *fmincon* con el fin de realizar la optimización de los parámetros del modelo, que tiene la capacidad de encontrar los mínimos locales en las ecuaciones no lineales como las usadas en el modelo, permitiendo la optimización de los parámetros de este.

3.2.2. Modelado y estimación de parámetros para la hidrólisis enzimática de la pectina.

Planteamiento del mecanismo de reacción de la hidrólisis: para el planteamiento del mecanismo para la degradación de la pectina se acudió a la literatura para buscar modelos o mecanismos de reacción, que explican esta reacción por medios enzimáticos. Durante esta búsqueda se llegó al trabajo realizado por Massa et al. (2007), donde se estudió el modo de acción de una poligalacturonasa obtenida del fitopatógeno *Burkholderia cepacia*, generando un mapa de reacciones que muestra como la degradación de la pectina

comienza con la hidrólisis de este polisacárido en oligosacáridos de 3 a 6 unidades de ácido galacturónico, los cuales vuelven a reaccionar con la poligalacturonasa, generando monómeros, dímeros y trímeros de este ácido, que se acumulan al no reaccionar con la pectina o tener una baja velocidad de reacción.

Pero como en la experimentación se utilizó la enzima obtenida del hongo *Aspergillus niger*, no se pueden utilizar las mismas reacciones, por esta razón se acudió a los artículos publicados por Bennen et al. (1999) y Rexova-Benkova (1973) que muestran cómo actúa la poligalacturonasa obtenida de este hongo sobre la pectina y los oligosacáridos producidos durante el proceso, estudiando en que enlaces de las moléculas se realiza el corte y en qué proporción se forman los productos. El polisacárido de 6 unidades (OGS6) puede ser cortado en 3 diferentes posiciones (primer, segundo y tercer enlace), generando un monómero de ácido galacturónico (MS1) y un polisacárido de 5 unidades (OGS5) el 65% de los casos, un dímero (DS2) y un polisacárido de 4 unidades (OGS4) el 57% de los casos o dos unidades del trimero (OGS3) el 8% de los casos. El OGS5 solo puede ser cortado en el primer o segundo enlace, generando MS1 y OGS4 el 67% o DS2 y OGS3 el 33%. A pesar de que el OGS4 puede ser cortado en 2 diferentes enlaces, la poligalacturonasa del *Aspergillus niger* solo cataliza el corte del primer enlace formando un MS1 y un OGS3 (Rexova-Benkova, 1973; Bennen et al., 1996 y 1999). Combinando esta información se llegó al planteamiento de un mecanismo de reacción, el cual puede ser apreciado en la Figura 3.1.

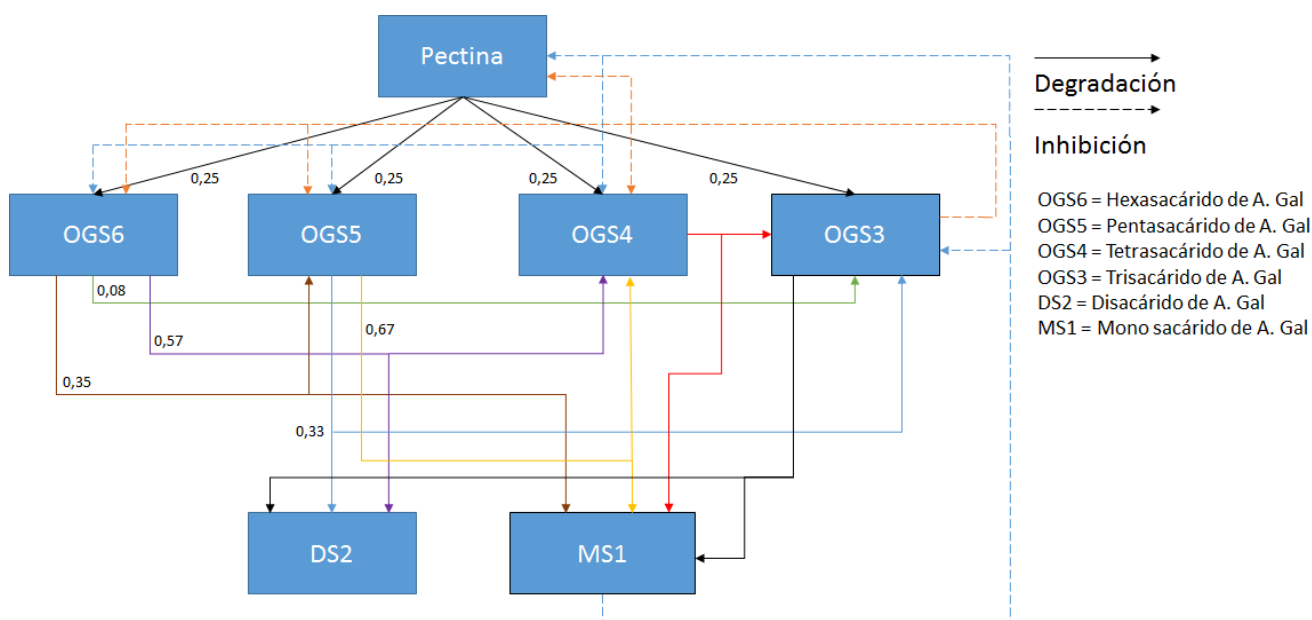


Figura 3.1. Mecanismo de reacción propuesto para la degradación de la pectina. Adaptado de los trabajos de Bélafi-Bakó et al. (2007), Bennen et al. (1996 y 1999), Massa et al. (2007), Rexová-Benková (1973) y Rosso et al. (1995).

Parámetros cinéticos del modelo: según los estudios realizados por Bélafi-Bakó et al. (2007), Dalagnol et al. (2017) y Todisco et al. (1994), las enzimas pectídicas siguen una cinética de Michaelis-Menten, por esta razón en el capítulo anterior se estimaron estos parámetros para la degradación de la pectina por medio de un diagrama de Lineweaver-

Burk. Los parámetros cinéticos para las reacciones donde se degradan los oligosacáridos fueron obtenidos de los trabajos realizados por Bennen et al. (1999) y Rexova-Benkova (1973), mientras que los parámetros para la inhibición causada por la presencia del ácido galacturónico y su trímero fueron obtenidos de los trabajos realizados por Bealafi-Bako et al. (2007) y Rexova-Benkova (1973), en este último artículo también se habla que el dímero de ácido galacturónico no produce un efecto inhibitorio en la enzima, por lo que no se tuvo en cuenta ningún parámetro de inhibición para este compuesto.

Selección de la ecuación de optimización para la hidrólisis de la pectina: con el fin de optimizar la simulación del proceso de hidrólisis enzimática de la pectina y verificar la veracidad de los parámetros encontrados experimentalmente y en la literatura, se buscó estimar los parámetros cinéticos de la reacción usando la ecuación *fmincon* del software MATLAB®, permitiendo encontrar un mínimo local de una función no lineal multivariada. La función escogida para realizar esto fue el error cuadrático medio global (MSE_{Global}), mostrada a continuación:

$$MSE_{Global} = \frac{\sum_{j=1}^m (MSE_j)}{m} \quad (3.1)$$

Donde $m = 2$ es el número de variables dependientes estudiadas j (Claridad del jarabe C y concentración de azúcares Az), MSE_j corresponde al error cuadrático medio y SSE_j es la suma del error cuadrático, expresados mediante las ecuaciones 3.2. y 3.3.

$$MSE_j = \frac{SSE_j}{n} \quad (3.2)$$

$$SSE_j = \sum_{i=1}^n (y_{ij}^e - \hat{y}_{ij})^2 \quad (3.3)$$

y_{ij}^e corresponde al valor experimental de las variables dependientes (j) para C y Az , \hat{y}_{ij} es el valor predicho de estos dos resultados y $n = 7$ es la cantidad de valores experimentales obtenidos. Para definir si el modelo presenta una buena aproximación a los datos reales, se puso una meta de obtener un $\%MSE_{Global}$ menor al 10%, mostrando el buen ajuste de los datos simulados a los datos experimentales.

3.2.3. Datos del proceso de clarificación

Se utilizaron los datos de la variación de la claridad y la concentración de azúcares durante el proceso de clarificación obtenidos en la clarificación enzimática realizada en el capítulo anterior para hacer la comparación del modelo con los datos reales.

3.2.4. Validación del modelo

Para verificar la validez del modelo, se prepararon jarabes con condiciones iniciales diferentes, siguiendo el protocolo del capítulo 2 y se sometieron al proceso de clarificación aplicado anteriormente, añadiendo 3.716 Unidades enzimáticas por mL de jarabe y aplicando una agitación de 267 rpm, comparando los resultados obtenidos experimentalmente con los simulados por el modelo optimizado, utilizando los parámetros estimados por medio del software MATLAB® y su función *fmincon*.

3.3. Resultados y discusión

3.3.1. Resultados del modelado y estimación de parámetros para la hidrólisis enzimática de la pectina.

Planteamiento del mecanismo de reacción de la hidrólisis: el objetivo del modelo es ser capaz de simular el proceso de clarificación enzimática del jarabe por medio de la degradación de la pectina presente en él, teniendo en cuenta efectos como la inhibición por la presencia del ácido galacturónico y su triglicérido, el efecto de la temperatura, pH, inactivación por temperatura y agitación.

Suposiciones:

- La reacción inicial de la pectina con la poligalacturonasa solo genera oligosacáridos de 6, 5, 4 y 3 unidades.
- La degradación de la pectina produce oligosacáridos de 6, 5, 4 y 3 unidades por partes iguales.
- El disacárido no produce inhibición en ninguna de las reacciones de degradación.
- La concentración inicial de los oligosacáridos es de 0 g/L.
- Se asume que la solución presenta propiedades termodinámicas similares a las del agua.

Balances de materia y energía

$$\frac{dPectina}{dt} = -r_p \quad (3.4)$$

$$\frac{dOGS6}{dt} = 0.25 * r_p - r_{OGS6} \quad (3.5)$$

$$\frac{dOGS5}{dt} = 0.25 * r_p + 0.35 * r_{OGS6} - r_{OGS5} \quad (3.6)$$

$$\frac{dOGS4}{dt} = 0.25 * r_p + 0.57 * r_{OGS6} + 0.67 * r_{OGS5} - r_{OGS4} \quad (3.7)$$

$$\frac{dOGS3}{dt} = 0.25 * r_p + 0.08 * 2 * r_{OGS6} + 0.33 * r_{OGS5} + r_{OGS4} - r_{OGS3} \quad (3.8)$$

$$\frac{dDS2}{dt} = 0.57 * r_{OGS6} + 0.33 * r_{OGS5} + r_{OGS3} \quad (3.9)$$

$$\frac{dMS1}{dt} = 0.35 * r_{OGS6} + 0.67 * r_{OGS5} + r_{OGS4} + r_{OGS3} \quad (3.10)$$

$$\frac{dT}{dt} = \frac{H * A * (Te - T)}{(Vol * Densidad * Cp)} \quad (3.11)$$

Las ecuaciones 3.4 a 3.10 presentan los balances de masa para la pectina y sus oligosacáridos menores, la velocidad de reacción r_p corresponde con la velocidad a la que se degrada la pectina, r_{OGS3} con la degradación del trisacárido, r_{OGS4} con la degradación del OGS4, r_{OGS5} con la degradación del OGS5 y r_{OGS6} con la degradación del OGS6. La ecuación 3.11 es un balance de energía para ver la variación de la temperatura con el tiempo, H es el coeficiente de transferencia de calor, A es el área exterior del recipiente, Te es la temperatura exterior que calienta la solución, T es la temperatura actual de la solución, Vol es el volumen de la solución y Cp es el calor específico de la solución, sin tener en cuenta efectos de calentamiento por la agitación o por calores de reacción exo o endotérmicos.

Ecuaciones constitutivas

$$r_x = \frac{Vmax_X * [X] * Thau * Rho * Kd}{(Km_X * (1 + (MS1/KI1)) * (1 + (OGS3/KI3) + [X]))} \quad (3.12)$$

La ecuación 3.12 es una versión modificada de la ecuación de Michaelis-Menten, añadiendo el efecto de la temperatura (Thau), pH (Rho), inactivación por efecto de la temperatura (Kd) y la inhibición causada por la presencia del ácido galacturónico y su trimero. Para cada compuesto X se varían los valores de concentración ([X]), velocidad máxima (V_{max}) y constante de Michaelis-Menten (K_M) de acuerdo a los parámetros encontrados.

$$Thau = \frac{(T - T_{max}) * (T - T_{min})^2}{(T_{opt} - T_{min}) * ((T_{opt} - T_{min}) * (T - T_{opt}) - (T_{opt} - T_{max}) * (T_{opt} + T_{min} - 2 * T))} \quad (3.13)$$

$$Rho = \frac{(pH - pH_{min}) * (pH - pH_{max})}{(pH - pH_{min}) * (pH - pH_{max}) - (pH - pH_{opt})^2} \quad (3.14)$$

Las ecuaciones 3.13 y 3.14 fueron obtenidas del artículo publicado por Rosso et al. (1993 y 1995), estas ecuaciones explican el efecto que tiene la temperatura y el pH en una reacción bioquímica de una manera aproximada. Para lograr esto se usan los valores de pH y temperatura máximos y mínimos soportados por la enzima, y el valor óptimo al que trabaja, los cuales fueron obtenidos de la literatura (Cerreti et al., 2017; Dal Magro et al., 2019; Hosseini et al. 2021; Kharazmi et al., 2020; Ladeira et al., 2020; Mohammadi et al.,

2020; Ninga et al., 2021; Pagnonceli et al., 2019), además de los valores actuales de temperatura y pH

$$Kd = [E] * e^{(-K_{in}*t)} \quad (3.15)$$

La ecuación 3.15 explica la inactivación de la enzima por el efecto de la temperatura, según los estudios realizados por Serrano et al. (2021), la poligalacturonasa del *Aspergillus niger* comienza a degradarse a los 40 °C. La ecuación fue obtenida del trabajo de Ma et al. (2015) que estudia la inactivación térmica de una poligalacturonasa obtenida del hongo *Aspergillus niger*, donde de t es el tiempo en minutos, [E] es la concentración inicial de la enzima y K_{in} es el factor de inactivación (para 50 °C $k_{in} = 0.0210$ 1/min)

Para el cálculo del coeficiente de transferencia de calor H, se empezó calculando el número de Reynolds en recipientes agitados con la correlación 3.16 obtenida del artículo de Mahir et al. (2021), que utiliza la velocidad de agitación (rps), la viscosidad cinemática ν (kg*m/s), densidad ρ (kg/m³) y diámetro del recipiente (m) para calcular este número adimensional.

$$Reynolds = \frac{\rho * Agitación * Diámetro^2}{\nu} \quad (3.16)$$

Otro número adimensional necesario para realizar este cálculo es el número de Prandtl, que viene dado por una correlación 3.17 entre la viscosidad cinemática, el calor específico C_p (kJ/kg*K) y conductividad térmica k (W/m*K).

$$Prandtl = \frac{\nu * C_p}{k} \quad (3.17)$$

Con estos dos números se encuentra el número de Nussel, usando la correlación de Dittus & Boelter (3.18), que permite calcular este número para sistemas turbulentos, como este sistema se está calentando el valor de $n = 0.4$. Este número adimensional es la relación entre el coeficiente de transferencia de calor H, la longitud característica/diámetro D y la conductividad térmica k, permitiendo despejar este parámetro H.

$$Nussel = 0.023 * (Reynolds^{0.8}) * (Prandtl^n) \quad (3.18)$$

$$Nussel = \frac{H * Diámetro}{k} \quad (3.19)$$

$$H = \frac{Nussel * k}{diámetro} \quad (3.20)$$

La concentración total de azúcares [Azúcares] es calculada sumando las concentraciones de los diferentes oligosacáridos producidos durante el proceso de degradación de pectina y la cantidad inicial de azúcares presentes en el jarabe [Azúcares_I].

$$[Azúcares] = [Azúcares_I] + [MS1] + [DS2] + [OGS3] + [OGS4] + [OGS5] + [OGS6] \quad (3.21)$$

Este valor es utilizado para el cálculo de la claridad, por medio de la linealización de los datos experimentales de claridad contra los datos experimentales de concentración de azúcares usando la función barra invertida de MATLAB®, obteniendo un dato de pendiente y un intercepto, que al ser combinados con el dato de la concentración de azúcares permite hallar la claridad del jarabe en función de la concentración de azúcar.

$$\text{Claridad} = \text{pendiente} * [\text{azúcares}] + \text{Intercepto} \quad (3.22)$$

Se escogió este tipo de ecuación por la tendencia lineal que presentaban los datos de concentración de azúcares y claridad encontrados en el capítulo 2, cuando se graficaban el uno contra el otro, como muestra la Figura 3.2.

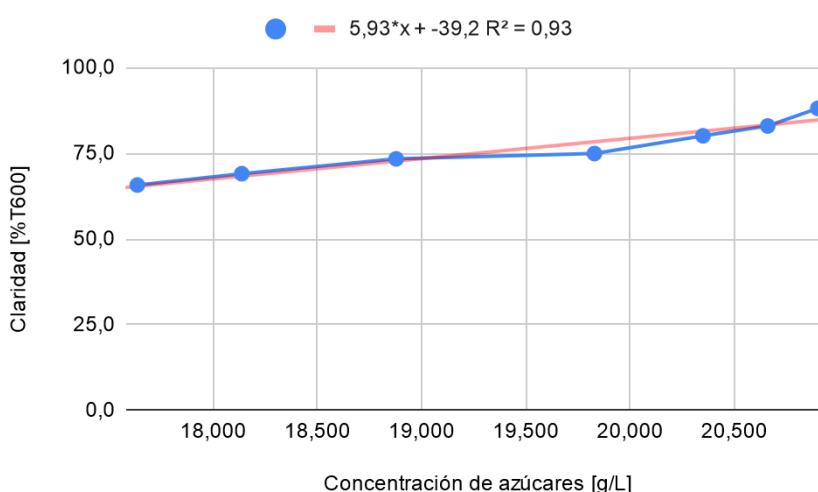


Figura 3.2. Linealización de la claridad contra la concentración de azúcares. Fuente: elaboración propia

Parámetros del sistema

Los valores iniciales de los parámetros del modelo que fueron estimados pueden ser apreciados en la Tabla 3.1.

Tabla 3.1. Parámetros cinéticos del modelo.

Parámetro	Valor estimado	Unidad	Referencia
V_{max} Pectina	19.151	mM/min	Experimentación capítulo 2
K_M Pectina	12.796	mM	Experimentación capítulo 2
V_{max} OGS6	1.540	mM/min	Rexova-Benkova, 1973
K_M OGS6	0.005	mM	Bennen et al. 1999
V_{max} OGS5	0.894	mM/min	Rexova-Benkova, 1973
K_M OGS5	0.130	mM	Rexova-Benkova, 1973
V_{max} OGS4	0.880	mM/min	Rexova-Benkova, 1973
K_M OGS4	0.430	mM	Rexova-Benkova, 1973
V_{max} OGS3	0.384	mM/min	Rexova-Benkova, 1973
K_M OGS3	1.100	mM	Rexova-Benkova, 1973
KI MS1	16.122	mM	Bealafi-Bako et al, 2007
KI OGS3	0.670	mM	Rexova-Benkova, 1973

Fuente: elaboración propia

3.3.2. Resultados del ajuste paramétrico del modelo.

Las concentraciones iniciales de las diferentes especies para resolver el sistema de ecuaciones son presentadas en la Tabla 3.2.

Tabla 3.2. Valor inicial de los compuestos.

Compuesto	Valor	Unidad
Pectina	3.92×10^{-4}	mM
OGS6	0.000	mM
OGS5	0.000	mM
OGS4	0.000	mM
OGS3	0.000	mM
DS2	0.000	mM
MS1	0.000	mM

Fuente: elaboración propia

Usando estos datos se realizó la simulación del proceso de clarificación, tomando siete puntos en los mismos tiempos que los puntos experimentales. En las Figuras 2 y 3 y Tabla 3 se muestran los valores obtenidos en la simulación contra los experimentales, tanto para la claridad como para la concentración de azúcares.

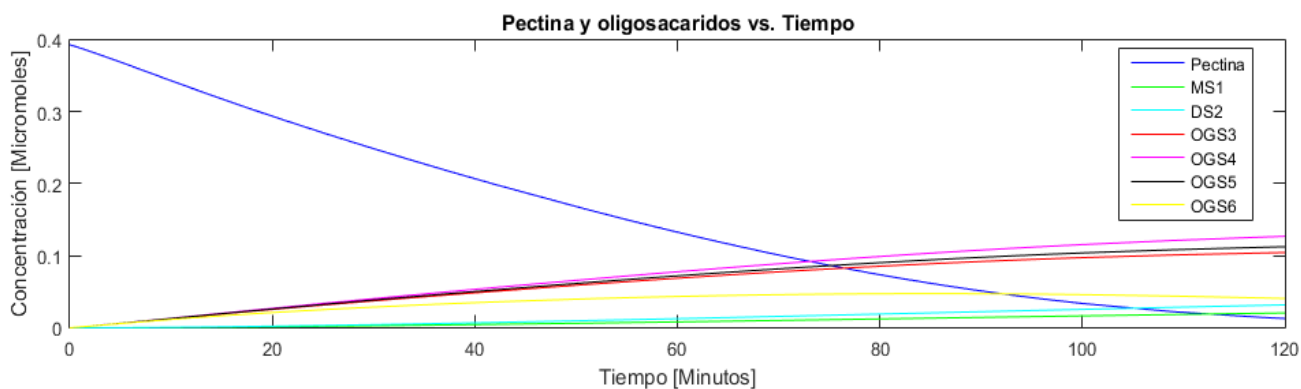


Figura 3.3. Simulación de la concentración de azúcares y pectina contra el tiempo. Fuente: elaboración propia

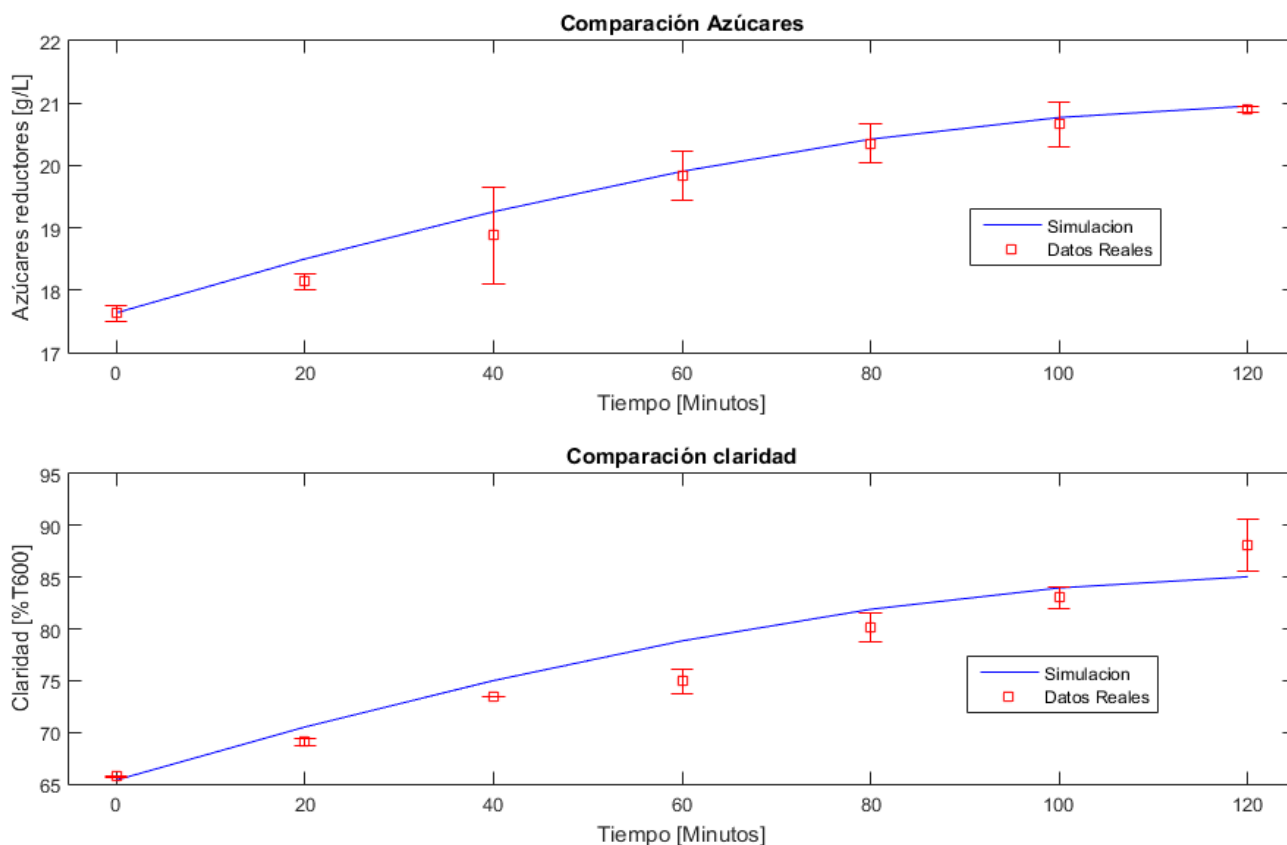


Figura 3.4. Comparación de la claridad y concentración de azúcares experimentales contra los simulados. Fuente: elaboración propia

Tabla 3.3. Comparación de los resultados obtenidos.

Tiempo (minutos)	Valor experimental		Valor Simulado	
	Claridad (%T600)	Azúcares (g/L)	Claridad (%T600)	Azúcares (g/L)
0	65.75 ± 0.07	17.636 ± 0.127	65.38	17.636
20	69.05 ± 0.35	18.137 ± 0.127	70.51	18.500
40	73.40 ± 0.00	18.878 ± 0.778	75.00	19.260
60	74.95 ± 1.20	19.829 ± 0.396	78.83	19.910
80	80.10 ± 1.41	20.350 ± 0.311	81.89	20.420
100	83.00 ± 0.99	20.661 ± 0.354	83.96	20.770
120	88.10 ± 2.55	20.901 ± 0.042	85.04	20.953

Fuente: elaboración propia

La Figura 3.3 muestra como a medida que se degrada la pectina se empiezan a formar los oligosacáridos de 3 a 6 unidades (OGS3, OGS4, OGS5 y OGS6), los cuales son degradados para formar el monosacárido (MS1), el disacárido (DS2) y el trisacárido del ácido galacturónico (OGS3), este último se acumula al presentar una baja reactividad con la pectina y ser generado por la mayoría de las reacciones que ocurren en el proceso.

En la Figura 3.4 se indica como la velocidad a la que se forman los azúcares comienza a disminuir a medida que pasa el tiempo, al reducirse la cantidad de pectina en el medio, aumenta la concentración de inhibidores hasta que la concentración de azúcares queda casi constante. Los datos de la simulación se ajustaron bastante bien a la curva generada por los datos experimentales. Con respecto a la clarificación, la mayoría de los datos se ajustaron bastante bien al modelo, solo los datos a los 60 y 120 minutos presentan una variación considerable con los datos del modelo, errores que pudieron ser causados por una incorrecta manipulación de las muestras, pero al hacer la comparación de todos los resultados, se obtuvo un MSE_{Global} del 0.045, que muestra el buen ajuste de los valores simulados a los valores reales. Durante la simulación se realizó la estimación de los parámetros cinéticos del modelo, los nuevos valores y el cambio ocurrido se muestran en la Tabla 3.4.

Tabla 3.4. Parámetros cinéticos estimados del modelo.

Parámetro	Valor inicial	Valor estimado	Cambio
V_{max} Pectina	19151	16278	- 2872
K_M Pectina	12.796	14.715	1.919
V_{max} OGS6	1.540	1.595	0.055
K_M OGS6	0.005	$4.858 \cdot 10^{-03}$	- $3.3 \cdot 10^{-05}$
V_{max} OGS5	0.894	0.895	0.001
K_M OGS5	0.130	0.130	$1.804 \cdot 10^{-08}$
V_{max} OGS4	0.880	0.880	- $3.809 \cdot 10^{-04}$
K_M OGS4	0.430	0.430	$6.2654 \cdot 10^{-08}$
V_{max} OGS3	0.384	0.383	- $9.034 \cdot 10^{-04}$
K_M OGS3	1.100	1.100	- $1.049 \cdot 10^{-08}$
KI MS1	16.122	16.122	$9.821 \cdot 10^{-09}$
KI OGS3	0.670	0.669	- 0.001

Fuente: elaboración propia

Estos datos muestran como los parámetros de la literatura presentaron pocos cambios, pero los hallados experimentalmente si tuvieron una variación considerable. El aumento del K_M y la disminución de la V_{max} para la degradación de la pectina, pueden ser explicados en las diferencias de sustrato, la pectina utilizada para la obtención experimental de estos parámetros en el capítulo 2 fue pectina de manzana, uno de los cultivos atacados por el hongo *Aspergillus niger*, mientras que la presente en los jarabes es de maíz, las diferencias entre estas dos pectinas podría explicar por qué se da una más lenta degradación (reducción de V_{max}) y una menor especificidad (menor K_M) de la enzima por la pectina de maíz, como por ejemplo por una mayor presencia de regiones ramificadas o una mayor metilación, que evitan una correcta interacción de la poligalacturonasa con la pectina, disminución su velocidad de degradación. Los datos de la literatura variaron poco, ya que la degradación de la pectina de maíz aún produce los mismos oligosacáridos que la pectina de manzana, así que no se debe esperar un cambio grande.

3.3.3. Resultados de la validación del modelo

Inicialmente, el modelo fue calibrado para un jarabe con una claridad de 65.8 ± 0.07 %T600, 0.051 ± 0.002 % de pectina y unos azúcares reductores de 17.636 ± 0.127 g/L, realizando la clarificación a un volumen de 300 mL. Para realizar la validación del modelo se prepararon jarabes con condiciones iniciales ligeramente diferentes en su claridad y concentraciones iniciales de azúcares y pectina, realizando la simulación con los nuevos parámetros cinéticos hallados anteriormente. El primero de estos jarabes presentaba inicialmente una claridad de 78.90 ± 0.71 %T600, una concentración inicial de azúcares del 9.947 ± 0.270 g/L y una concentración de pectina del 0.040 ± 0.002 % p/p y la clarificación se realizó a las mismas condiciones del ensayo inicial (300 mL, 50 °C, 3,7143 U/mL y 267,4991 rpm). En la Figura 3.5 y la Tabla 3.5 se puede observar los resultados obtenidos.

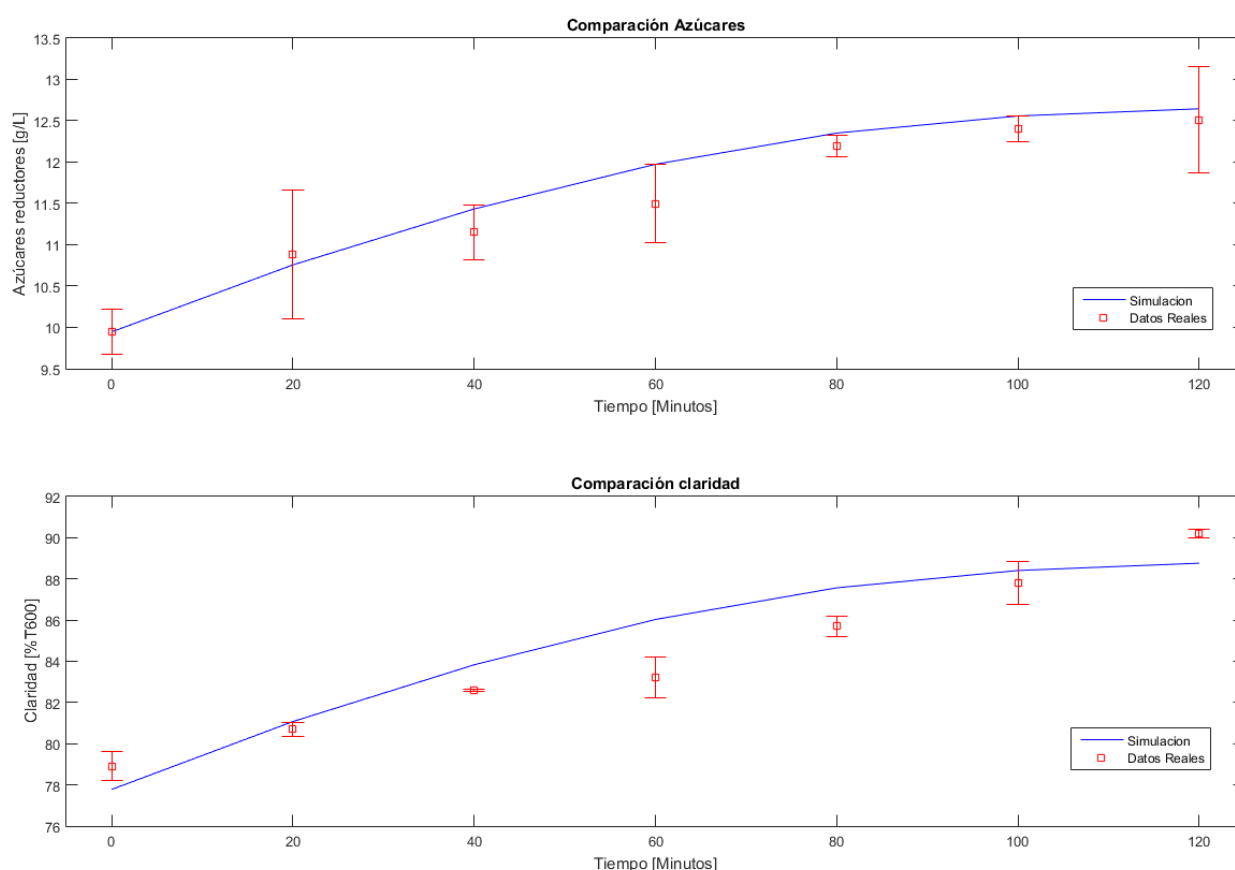


Figura 3.5. Comparación de la claridad y concentración de azúcares en la primera validación. Fuente: elaboración propia

Tabla 3.5. Comparación de los resultados de la primera validación.

Tiempo (minutos)	Valor experimental		Valor Simulado	
	Claridad (%T600)	Azúcares (g/L)	Claridad (%T600)	Azúcares (g/L)
0	78.90 ± 0.71	9.947 ± 0.270	77.78	9.947
20	80.70 ± 0.35	10.886 ± 0.780	81.07	10.760
40	82.60 ± 0.07	11.151 ± 0.327	83.97	11.470
60	83.20 ± 0.99	11.500 ± 0.469	86.17	12.010
80	85.70 ± 0.49	12.198 ± 0,129	87.66	12.370
100	87.80 ± 1.06	12.403 ± 0.157	88.45	12.570
120	90.20 ± 0.21	12.511 ± 0.639	88.78	12.650

Fuente: elaboración propia

Comparando los resultados obtenidos contra los experimentales se encontró un MSE_{Global} del 0.046, mostrando un buen ajuste de los datos experimentales a los predichos.

En la segunda validación se utilizó un jarabe con una claridad inicial de 79.35 ± 1.06 %T600 y una concentración de pectina de $0.05\% \pm 0.002$ similar a la de la validación anterior, pero el jarabe presentaba una concentración inicial de azúcares más alta de 31.346 ± 0.157 g/L, además este ensayo se realizó a un volumen mayor, pasando de 300 ml a 1 L para ver como se comportaba el modelo a mayores volúmenes, los resultados de este ensayo se presentan en la Figura 3.6:

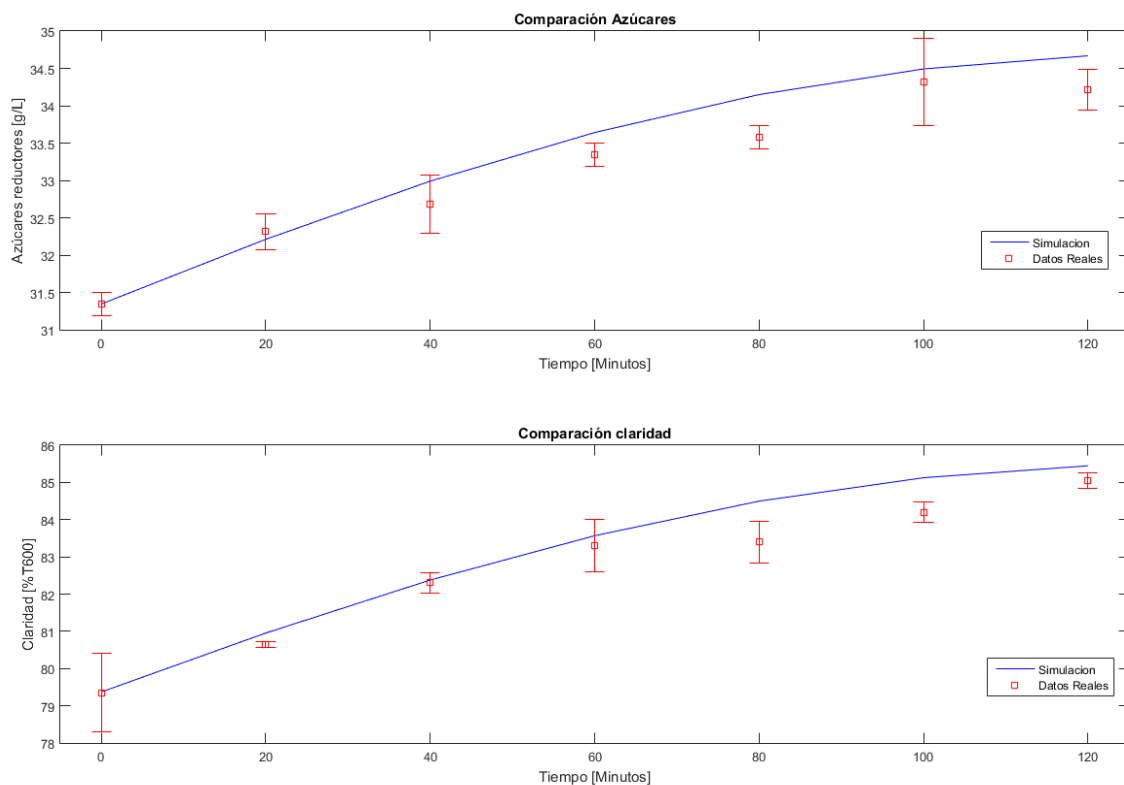


Figura 3.6. Comparación de la claridad y concentración de azúcares en la segunda validación. Fuente: elaboración propia

Tabla 3.6. Comparación de los resultados de la segunda validación.

Tiempo (minutos)	Valor experimental		Valor Simulado	
	Claridad (%T600)	Azúcares (g/L)	Claridad (%T600)	Azúcares (g/L)
0	79.35 ± 1.06	31.346 ± 0.157	79.37	31.350
20	80.65 ± 0.07	32.315 ± 0.242	80.95	32.210
40	82.30 ± 0.28	32.682 ± 0.384	82.38	32.990
60	83.30 ± 0.70	33.349 ± 0.157	83.57	33.640
80	83.40 ± 0.57	33.583 ± 0.157	84.50	34.150
100	84.20 ± 0.28	34.317 ± 0.582	85.13	34.490
120	85.05 ± 0.21	34.217 ± 0.270	85.45	34.668

Fuente: elaboración propia

Esta segunda validación obtuvo un MSE_{Global} del 0.054, mostrando la buena aproximación del modelo al momento de calcular la concentración de azúcares producidos por la degradación de la pectina.

3.4. Conclusión

Se propuso un mecanismo para explicar la manera como se degrada la pectina, empezando con su degradación a oligosacáridos de 3 a 6 unidades, los cuales reaccionan para terminar en la formación de ácido galacturónico y su dímero y trímero; que se usó como base para realizar el modelo de clarificación. Fue posible realizar el modelamiento del proceso de degradación de pectina, teniendo en cuenta los efectos de la temperatura, pH, agitación, inhibición e inactivación de la enzima, que son características inherentes del proceso de hidrólisis enzimática. Para esto se usó como sustrato un jarabe glucosado con un porcentaje inicial de pectina del 0.05%, una concentración de azúcares de 17.64 g/L y una claridad del 65.75 %T600, los cuales fueron llevados a un valor de 88.1% y 20.90 g/L. El modelo propuesto presentó un MSE_{Global} del 0.045%, menor al límite del 10% que se propuso, mostrando el buen ajuste de los resultados obtenidos contra los valores experimentales. Este modelo además fue validado con la simulación del proceso de clarificación a diferentes condiciones (mayor y menor concentración inicial de azúcar, pectina, claridad y mayor volumen), logrando obtener unos $MSE_{Globales}$ del 0.046 y 0.054, mostrando la capacidad del modelo para simular diferentes condiciones experimentales, por ejemplo, un buen ajuste para un volumen de 1 litro de jarabe, lo que podría servir en trabajos futuros para realizar el escalado de procesos de clarificación de jarabes a mayores volúmenes.

3.5. Bibliografía

- Almandoz, Cristina, Cecilia Pagliero, Ariel Ochoa, y José Marchese. «Corn Syrup Clarification by Microfiltration with Ceramic Membranes». *Journal of Membrane Science* 363, n.o 1 (1 de noviembre de 2010): 87-95. <https://doi.org/10.1016/j.memsci.2010.07.017>.
- Alvarez, Hernán, Rosalba Lamanna, Pastora Vega, y Silvana Revollar. «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, n.o 3 (1 de julio de 2009): 10-20. [https://doi.org/10.1016/S1697-7912\(09\)70260-2](https://doi.org/10.1016/S1697-7912(09)70260-2).
- Barros, Rodrigo da Rocha Olivieri de, Paolo Becarelli, Raul Alves de Oliveira, Leonardo Tognotti, y Elba Pinto da Silva Bon. «Triticum Spelta Straw Hydrothermal Pretreatment for the Production of Glucose Syrups via Enzymatic Hydrolysis». *Biochemical Engineering Journal* 151 (15 de noviembre de 2019): 107340. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2019.107340>.
- Bélafi-Bakó, K., M. Eszterle, K. Kiss, N. Nemestóthy, y L. Gubicza. «Hydrolysis of Pectin by *Aspergillus Niger* Polygalacturonase in a Membrane Bioreactor». *Journal of Food Engineering* 78, n.o 2 (1 de enero de 2007): 438-42. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2005.10.012>.
- BeMiller, James N. «An Introduction to Pectins: Structure and Properties». En *Chemistry and Function of Pectins*, 310:2-12. ACS Symposium Series 310. American Chemical Society, 1986. <https://doi.org/10.1021/bk-1986-0310.ch001>.
- BeMiller, James N. «19 - Carbohydrate and Noncarbohydrate Sweeteners». En *Carbohydrate Chemistry for Food Scientists (Third Edition)*, editado por James N. BeMiller, 371-99. AACC International Press, 2019. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812069-9.00019-4>.
- Benen, Jacques A. E., Harry C. M. Kester, Lucie Parenicová, y Jaap Visser. «Kinetics and Mode of Action of *Aspergillus Niger* Polygalacturonases». En *Progress in Biotechnology*, editado por J Visser y A. G. J. Voragen, 14:221-30. Pectins and Pectinases. Elsevier, 1996. [https://doi.org/10.1016/S0921-0423\(96\)80257-7](https://doi.org/10.1016/S0921-0423(96)80257-7).
- Benen, J. A., H. C. Kester, y J. Visser. «Kinetic Characterization of *Aspergillus Niger* N400 Endopolygalacturonases I, II and C». *European Journal of Biochemistry* 259, n.o 3 (febrero de 1999): 577-85. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.1999.00080.x>.
- Biz, Alessandra, Fernanda Cardoso Farias, Francine Aline Motter, Diogo Henrique de Paula, Peter Richard, Nadia Krieger, and David Alexander Mitchell. «Pectinase Activity Determination: An Early Deceleration in the Release of Reducing Sugars Throws a Spanner in the Works!» *PLOS ONE* 9, n.o 10 (22 de octubre de 2014): e109529. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0109529>.
- Cerreti, Martina, Kristina Kantorova, Marco Esti, Michal Rosenberg, y Martin Rebroš. «Immobilisation of pectinases into PVA gel for fruit juice application». *International Journal of Food Science & Technology* 52 (1 de febrero de 2017): 531-39. <https://doi.org/10.1111/ijfs.13309>.

- Dalagnol, Luíza M. G., Vitória C. C. Silveira, Halisson Baron da Silva, Vitor Manfroi, y Rafael C. Rodrigues. «Improvement of Pectinase, Xylanase and Cellulase Activities by Ultrasound: Effects on Enzymes and Substrates, Kinetics and Thermodynamic Parameters». *Process Biochemistry* 61 (1 de octubre de 2017): 80-87. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2017.06.029>.
- Dal Magro, Lucas, Kelly Silva de Moura, Betina Elys Backes, Eliana Weber de Menezes, Edilson Valmir Benvenuto, Sabrina Nicolodi, Manuela P. Klein, Roberto Fernandez-Lafuente, y Rafael C. Rodrigues. «Immobilization of Pectinase on Chitosan-Magnetic Particles: Influence of Particle Preparation Protocol on Enzyme Properties for Fruit Juice Clarification». *Biotechnology Reports* 24 (1 de diciembre de 2019): e00373. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2019.e00373>.
- Desagiacomo, Carla Cristina Villela, Robson Carlos Alnoch, Vanessa Elisa Pinheiro, Mariana Cereia, Carla Botelho Machado, André Damasio, Marlei Josiele Augusto, Wellington Pedersoli, Roberto Nascimento Silva, y Maria de Lourdes Teixeira de Moraes Polizeli. «Structural Model and Functional Properties of an Exo-Polygalacturonase from *Neosartorya Glabra*». *International Journal of Biological Macromolecules* 186 (1 de septiembre de 2021): 909-18. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.07.065>.
- Domínguez, Oscar, Gloria Cruz, Gloria González, y Andira Rentería. «Alternativas para la clarificación del jarabe de glucosa obtenido por hidrólisis enzimática del almidón.» *Ingeniería e Investigación* 55 (1 de septiembre de 2004): 8-21.
- Gómez, César Augusto, Yudy Alexandra Calderón, y Hernán Álvarez. «Construcción de modelos semifísicos de base fenomenológica: caso proceso de fermentación.» *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial* 6, n.o 2 (diciembre de 2008): 28-39.
- Hobbs, Larry. «Chapter 21 - Sweeteners from Starch: Production, Properties and Uses». En *Starch (Third Edition)*, editado por James BeMiller y Roy Whistler, 797-832. *Food Science and Technology*. San Diego: Academic Press, 2009. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-746275-2.00021-5>.
- Hosseini, Seyed Saeid, Faramarz Khodaiyan, Seyed Mohammad Mousavi, y Seyedeh Zahra Azimi. «Clarification of the Pomegranate Juice in a Bioreactor Packed by Pectinase Enzymes Immobilized on the Glass Bead Activated with Polyaldehyde Polysaccharides». *LWT* 137 (1 de febrero de 2021): 110500. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.110500>.
- Hull, Peter. «Glucose Syrup Manufacture». En *Glucose Syrups*, 19-44. John Wiley & Sons, Ltd, 2010. <https://doi.org/10.1002/9781444314748.ch3>.
- Kharazmi, Sara, Asghar Taheri-Kafrani, y Asieh Soozanipour. «Efficient Immobilization of Pectinase on Trichlorotriazine-Functionalized Polyethylene Glycol-Grafted Magnetic Nanoparticles: A Stable and Robust Nanobiocatalyst for Fruit Juice Clarification». *Food Chemistry* 325 (30 de septiembre de 2020): 126890. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126890>.
- Ladeira Ázar, Rafaela I. S., Marciana da Luz Morales, Gabriela Piccolo Maitan-Alfenas, Daniel L. Falkoski, Rafael Ferreira Alfenas, y Valéria M. Guimarães. «Apple Juice Clarification by a Purified Polygalacturonase from *Calonectria Pteridis*». *Food and*

- Bioproducts Processing 119 (1 de enero de 2020): 238-45. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2019.11.013>.
- Ma, Xiaobin, Wenjun Wang, Mingming Zou, Tian Ding, Xingqian Ye, y Donghong Liu. «Properties and Structures of Commercial Polygalacturonase with Ultrasound Treatment: Role of Ultrasound in Enzyme Activation». *RSC Advances* 5, n.o 130 (17 de diciembre de 2015): 107591-600. <https://doi.org/10.1039/C5RA19425C>.
- Mahir, Maha, Anas El Maakoul, Ismail Khay, Said Saadeddine, y Mohamed Bakhouya. «An Investigation of Heat Transfer Performance in an Agitated Vessel». *Processes* 9 (5 de marzo de 2021): 468. <https://doi.org/10.3390/pr9030468>.
- Massa, Claudia, Mads H. Clausen, Jure Stojan, Doriano Lamba, y Cristiana Campa. «Study of the mode of action of a polygalacturonase from the phytopathogen *Burkholderia cepacia*». *The Biochemical Journal* 407, n.o Pt 2 (15 de octubre de 2007): 207-17. <https://doi.org/10.1042/BJ20061833>.
- Mohammadi, Maryam, Reza Rezaei Mokarram, Rahim Shahvalizadeh, Khashayar Sarabandi, Loong-Tak Lim, y Hamed Hamishehkar. «Immobilization and Stabilization of Pectinase on an Activated Montmorillonite Support and Its Application in Pineapple Juice Clarification». *Food Bioscience* 36 (1 de agosto de 2020): 100625. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2020.100625>.
- Montañez Soto, Jose Luis, José González, Aurea Bernardino-Nicanor, y Emma Ramos-Ramírez. «Enzymatic production of high fructose syrup from Agave tequilana fructans and its physicochemical characterization». *AFRICAN JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY* 10 (19 de diciembre de 2011): 19137-43. <https://doi.org/10.5897/AJB11.2704>.
- Munir, M., Roheena Abdullah, Ikram Haq, Afshan Kaleem, M. Iqtadar, y Sarah Ashraf. «Purification, characterization, kinetics and thermodynamic analysis of polygalacturonase from *Aspergillus tamarii* for industrial applications». *Revista Mexicana de Ingeniería Química* 19 (1 de septiembre de 2020): 293-304. <https://doi.org/10.24275/rmiq/Bio1753>.
- Ninga, Kombele Aime, Zangue Steve Carly Desobgo, Sirshendu De, y Emmanuel Jong Nso. «Pectinase Hydrolysis of Guava Pulp: Effect on the Physicochemical Characteristics of Its Juice». *Heliyon* 7, n.o 10 (1 de octubre de 2021). <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e08141>.
- Ortega, Fabián A., Omar A. Pérez, y Emiro A. López. «Phenomenological-Based Semiphysical Model of Continuous Alcoholic Fermentation Process». *Información tecnológica* 27, n.o 1 (2016): 21-32. <https://doi.org/10.4067/S0718-07642016000100004>.
- Pagnonceli, J., L. M. Rasbold, G. B. Rocha, J. L. C. Silva, M. K. Kadowaki, R. C. G. Simão, y A. Maller. «Biotechnological Potential of an Exo-Polygalacturonase of the New Strain *Penicillium Janthinellum* VI2R3M: Biochemical Characterization and Clarification of Fruit Juices». *Journal of Applied Microbiology* 127, n.o 6 (diciembre de 2019): 1706-15. <https://doi.org/10.1111/jam.14426>.
- Pihlajaniemi, Ville, Outi Mattila, Taru Koitto, Markus Nikinmaa, Raija-Liisa Heiniö, Lotta Sorsamäki, Matti Siika-aho, y Emilia Nordlund. «Production of Syrup Rich in Arabinoxylan Oligomers and Antioxidants from Wheat Bran by Alkaline

- Pretreatment and Enzymatic Hydrolysis, and Applicability in Baking». *Journal of Cereal Science* 95 (1 de septiembre de 2020): 103043. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2020.103043>.
- Rexová-Benková, Lubomíra. «The Size of the Substrate-Binding Site of an *Aspergillus Niger* Extracellular Endopolygalacturonase». *European Journal of Biochemistry* 39, n.o 1 (1973): 109-15. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1973.tb03109.x>.
- Rosso, L., Lobry, J. R., & Flandrois, J. (1993). An Unexpected Correlation between Cardinal Temperatures of Microbial Growth Highlighted by a New Model. *Journal of Theoretical Biology*, 162(4), 447–463. <https://doi.org/10.1006/jtbi.1993.1099>
- Rosso, L., J. R. Lobry, S. Bajard, y J. P. Flandrois. «Convenient Model To Describe the Combined Effects of Temperature and pH on Microbial Growth». *Applied and Environmental Microbiology* 61, n.o 2 (febrero de 1995): 610-16.
- Ruiz-Colorado, Angela Adriana, Y Karen Alejandra Bueno Zabala. Proceso para obtener jarabes azucarados a partir de residuos agroindustriales. World Intellectual Property Organization WO2017212405A1, filed 6 de junio de 2017, y issued 14 de diciembre de 2017. <https://patents.google.com/patent/WO2017212405A1/es>.
- Ruiz-Colorado, A. A., Bohórquez, C., Herrera, S. N., Medina De Perez, V. I., Mejia, M. C., Hoyos, L. M., & Pérez, Y. M. (2009). “Procedimiento para la producción de jarabe azucarado por degradación de materiales amiláceos y lignocelulósicos de la planta de banano”. (n.º de patente 08-055808).
- Serrano-Martínez, Ana, Iuliana Aprodu, Iuliana Banu, Carmen Lucas-Abellán, Pilar Hernández Sánchez, Lucía Guardiola, Estrella Núñez-Delicado, y Vicente M. Gómez-López. «Heat Inactivation of Thermolabile Polygalacturonase down to Single Molecule Level. Systematic Investigation and Molecular Modeling». *LWT* 137 (1 de febrero de 2021): 110385. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.110385>.
- Todisco, S., V. Calabrò, y G. Iorio. «A Kinetic Model for the Pectin Hydrolysis Using an Endo-Acting Pectinase from *Rhizopus*». *Journal of Molecular Catalysis* 92, n.o 3 (13 de septiembre de 1994): 333-46. [https://doi.org/10.1016/0304-5102\(94\)00076-X](https://doi.org/10.1016/0304-5102(94)00076-X).

Conclusiones Generales

- Se logró la clarificación de jarabes glucosados, aumentando la claridad del jarabe en un 15 a 25%, y se modeló este proceso con un porcentaje de error cuadrático medio global menor al 5%, mostrando su buena aproximación a los datos experimentales obtenidos.
- Se usó fibra de maíz para la producción de jarabes glucosados por medio de la metodología empleada por el laboratorio BIOFRUN. Este material presenta 16.35% de celulosa y una concentración de pectina de 0.4%, obteniendo jarabes con una concentración de azúcares de 17 a 31 g/L y una concentración de pectina de 0.05 a 0.13%.

- La metodología empleada para la clarificación de jarabes glucosados por medio de enzimas pectínicas logró mejorar la claridad de los jarabes glucosados producidos a partir de residuos agroindustriales de manera considerable.
- El modelo obtenido presenta una buena capacidad para predecir la concentración de azúcares formados durante el proceso de clarificación, además este puede ser usado para diferentes volúmenes, que podría facilitar procesos de escalado del proceso de clarificación enzimática a partir de modelos.

Recomendación general

- En trabajos posteriores se puede estudiar el desempeño del modelo con jarabes producidos a partir de otras biomásas, en particular se tiene interés en jarabes obtenidos a partir de cáscaras y semillas de fruta, con un porcentaje de pectina mayor, alrededor del 1 al 3% (Baker, 1997; Sulieman et al., 2013; Virk & Sogi, 2004), que generan jarabes con una concentración más alta de pectina, más turbios y opacos, en los que esta metodología debería obtener buenos resultados.

Bibliografía de la recomendación general

- Domínguez, Oscar, Gloria Cruz, Gloria González, y Andira Rentería. «Alternativas para la clarificación del jarabe de glucosa obtenido por hidrólisis enzimática del almidón.» *Ingeniería e Investigación* 55 (1 de septiembre de 2004): 8-21.
- Baker, Robert A. «Reassessment of Some Fruit and Vegetable Pectin Levels». *Journal of Food Science* 62, n.º 2 (marzo de 1997): 225-29. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1997.tb03973.x>.
- Sulieman, Abdel Moneim, Kawther Khodari, y Zakaria Salih. «Extraction of Pectin from Lemon and Orange Fruits Peels and Its Utilization in Jam Making». *International Journal of Food Science and Nutrition Engineering* 5 (1 de enero de 2013): 81-84. <https://doi.org/10.5923/j.food.20130305.01>.
- Virk, B., y Dalbir Sogi. «Extraction and Characterization of Pectin from Apple (Malus Pumila. Cv Amri) Peel Waste». *INTERNATIONAL JOURNAL OF FOOD PROPERTIES* Vol. 7 No. 3 (31 de diciembre de 2004): 693-703. <https://doi.org/10.1081/JFP-200033095>.

Anexos

Anexo 1: Código del modelo en MATLAB® para la degradación de la pectina y estimación de la clarificación

```
function [] = Parametrosjarabe3()
```

```
%Funciones de limpieza
```

```
clear all
close all
clc
```

% Se definen los parámetros de manera global para usarlos en las otras funciones:

```
global Cenzima A h Agitacion Diametro Vol pH pHopt pHmin pHmax...
    K Te Ti Topt Tmin Tmax Ea R Cp Ainiaciales tClaridad CClaridad
tAzucares CAzucares...
    Pectinao MS1o DS2o OGS3o OGS4o OGS5o OGS6o to Pendt
ClaridadE AzucaresE
```

%Datos experimentales

```
tClaridad = [0 20 40 60 80 100 120];
% CClaridad = [65.75, 69.05, 73.4, 74.95, 80.1, 83, 88.1]; %Primer Ensayo
% CClaridad = [78.9, 80.7, 82.6, 83.2, 85.7, 87.8, 90.2]; %Segundo Ensayo
CClaridad = [79.35, 80.65, 82.3, 83.3, 83.4, 84.2, 85.05]; %Tercer Ensayo
```

```
tAzucares = tClaridad;
% CAzucares = [17.636, 18.137, 18.878, 19.829, 20.350, 20.661, 20.901];
%Primer Ensayo
% CAzucares = [9.947, 10.886, 11.151, 11.500, 12.198, 12.403, 12.511];
%Segundo Ensayo
CAzucares = [31.346, 32.315, 32.682, 33.349, 33.583, 34.317, 34.217];
%Tercer Ensayo
```

%Calculo pendiente

```
P1 = CClaridad.';
P2 = CAzucares.';
P2 = [ones(length(P2),1) P2];
Pendt = P2\P1;
```

%Parametros del sistema

```
Cenzima = 0.0627; %(mL/100 ml)
Te = 50 + 273.15; %(K)
% Vol = 0.00003; %m3
Vol = 0.0001; %m3
```

$h = 0.105$; %cm espesor de la pared del recipiente
 $\% \text{ Diametro} = 0.101$; %m
 $\text{Diametro} = 0.129$; %m
 $\text{Agitacion} = 265.5$; %rpm
 $\text{pH} = 5.3$;
 $\text{pHopt} = 4.8$;
 $\text{pHmin} = 2.0$;
 $\text{pHmax} = 7.0$;
 $T_i = 27 + 273.15$; %(K) Temperatura promedio Medellín 27/28°C
 $T_{\text{opt}} = 40 + 273.15$; %(K)
 $T_{\text{min}} = 10 + 273.15$; %(K)
 $T_{\text{max}} = 70 + 273.15$; %(K)
 $E_a = 109$; %(Kj/mol)
 $R = 8.314472E-3$; %(kJ/(K mol))
 $K = 0.64060$; % W/(m²*°C)
 $C_p = 4.1813$; %
 $A = \pi \cdot \sqrt{3 \cdot \text{Vol} / (\pi \cdot \text{Diametro})} \cdot (\sqrt{3 \cdot \text{Vol} / (\pi \cdot \text{Diametro})} + \sqrt{(\sqrt{3 \cdot \text{Vol} / (\pi \cdot \text{Diametro})})^2 + \text{Diametro}^2})$; %Area cilindro más media esfera
 $\% \text{ Ainiciales} = 17.636$; % (g/L) Primer Ensayo
 $\% \text{ Ainiciales} = 9.947057039$; % (g/L) Segundo Ensayo
 $\text{Ainiciales} = 31.346$; % (g/L) Tercer Ensayo

%condiciones iniciales para las ODE'S:
 $\% \text{ Pectinao} = 3.9245$; %[Micromoles/L] Primer Ensayo
 $\% \text{ Pectinao} = 3.140$; %[Micromoles/L] Segundo Ensayo
 $\text{Pectinao} = 3.9245$; %[Micromoles/L] Tercer Ensayo
 $\text{MS1o} = 0$; %[Micromoles/L]
 $\text{DS2o} = 0$; %[Micromoles/L]
 $\text{OGS3o} = 0$; %[Micromoles/L]
 $\text{OGS4o} = 0$; %[Micromoles/L]
 $\text{OGS5o} = 0$; %[Micromoles/L]
 $\text{OGS6o} = 0$; %[Micromoles/L]

%Tiempo de simulacion:
 $t_o = 0$; %min

%Parametros a estimar

```
W0(1:12) = 50*ones(1,12);  
W0(1) = 16122.46895; %KI1  
W0(2) = 670; %KI3  
W0(3) = 0.384; %VmaxOGS3  
W0(4) = 1100; %KmOGS3  
W0(5) = 0.880; %VmaxOGS4  
W0(6) = 430; %KmOGS4  
W0(7) = 0.894; %VmaxOGS5  
W0(8) = 130; %KmOGS5  
W0(9) = 1.540; %VmaxOGS6  
W0(10) = 4.8912652; %KmOGS6  
W0(11) = 19.151; %Vmaxpectin  
W0(12) = 12.796; %Kmpectin
```

```
lb = zeros(1,12);  
% ub = 3000*ones(1,12);  
% ub(1) = 20000*ones(1,1);  
mult = 0.5;  
lb = [W0(1)-mult*W0(1) W0(2)-mult*W0(2) W0(3)-mult*W0(3) W0(4)-  
mult*W0(4) W0(5)-mult*W0(5) W0(6)-mult*W0(6) ...  
W0(7)-mult*W0(7) W0(8)-mult*W0(8) W0(9)-mult*W0(9) W0(10)-  
mult*W0(10) W0(11)-mult*W0(11) W0(12)-mult*W0(12)];  
ub = [W0(1)+mult*W0(1) W0(2)+mult*W0(2) W0(3)+mult*W0(3)  
W0(4)+mult*W0(4) W0(5)+mult*W0(5) W0(6)+mult*W0(6) ...  
W0(7)+mult*W0(7) W0(8)+mult*W0(8) W0(9)+mult*W0(9)  
W0(10)+mult*W0(10) W0(11)+mult*W0(11) W0(12)+mult*W0(12)];
```

%Estimacion

```
[W,S] = fmincon(@Parameters,W0,[],[],[],[],lb,ub);
```

```
disp('Error cuadrado del ajuste')
```

```
disp(S)
```

```
Titulos = ['KI MS1 ' ; 'KI OGS3 ' ; 'Vmax OGS3'; 'Km OGS3 ' ; 'Vmax OGS4';  
'Km OGS4 ' ; 'Vmax OGS5'; 'Km OGS5 ' ; 'Vmax OGS6'; 'Km OGS6 ' ; 'Vmax  
Pect'; 'Km Pect '];
```

```
Titulos = cellstr(Titulos);
```

```

WF = (transpose([W; W0; (W-W0)]));
WF = num2cell(WF);
disp('Parametros nuevos, iniciales y diferencia')
disp([Titulos WF])

```

```

W(1:12) = 50*ones(1,12);
W(1) = 1.6122e+04; %KI1
W(2) = 669.9987; %KI3
W(3) = 0.3831; %VmaxOGS3
W(4) = 1.1000e+03; %KmOGS3
W(5) = 0.8796; %VmaxOGS4
W(6) = 430.0001; %KmOGS4
W(7) = 0.8955; %VmaxOGS5
W(8) = 130; %KmOGS5
W(9) = 1.5951; %VmaxOGS6
W(10) = 4.8582; %KmOGS6
W(11) = 16.2784; %Vmaxpectin
W(12) = 14.7154; %Kmpectin

```

%Modelo

```

[t,C] = ode15s(@(t,C)modelo(t,C,W),[to 120],[Pectinao MS1o DS2o OGS3o
OGS4o OGS5o OGS6o Ti]);

```

```

AzucaresP
=(C(:,2)+C(:,3)*2+C(:,4)*3+C(:,5)*4+C(:,6)*5+C(:,7)*6)*194.139*1000/10000
00+Ainiciales;
Claridad = Pendt(2,1)*AzucaresP+Pendt(1,1);
vc = interp1(t,Claridad,tClaridad);
va
=
interp1(t,(C(:,2)+C(:,3)*2+C(:,4)*3+C(:,5)*4+C(:,6)*5+C(:,7)*6)*194.139*100
0/1000000+Ainiciales,tAzucares);
ClaridadE = vc;
AzucaresE = va;

```

```

S = (((sum(abs(CClaridad-(ClaridadE)).^2))/7)+(sum(abs(CAzucares-
AzucaresE).^2))*100/7)/2;
disp(S)

```

%Graficas

```
AzucaresP =  
(C(:,2)+C(:,3)*2+C(:,4)*3+C(:,5)*4+C(:,6)*5+C(:,7)*6)*194.139*1000/100000  
0+Ainiciales;  
Claridad = Pendt(2,1)*AzucaresP+Pendt(1,1);  
ClaridadP = interp1(t,Claridad,tClaridad);
```

%Desviacion estandar

```
% DSClaridad = [0.07, 0.35, 0.00, 1.20, 1.41, 0.99, 2.55];  
% DSAzucar = [0.127, 0.127, 0.778, 0.396, 0.311, 0.354, 0.042];  
% DSClaridad = [0.71 0.35 0.07 0.99 0.49 1.06 0.21];  
% DSAzucar = [0.270 0.780 0.327 0.469 0.129 0.157 0.639];  
DSClaridad = [1.061, 0.071, 0.283, 0.707, 0.566, 0.283, 0.212];  
DSAzucar = [0.157 0.242 0.384 0.157 0.157 0.582 0.270];
```

%Figura 1

```
figure(1)  
subplot(3,1,1)  
plot(t,Claridad, 'b')  
xlabel('Tiempo [Minutos]')  
ylabel('Claridad [%T600]')  
title('Claridad vs. Tiempo')  
subplot(3,1,2)  
plot(t,(C(:,2)+C(:,3)*2+C(:,4)*3+C(:,5)*4+C(:,6)*5+C(:,7)*6)*194.139*1000/10  
00000+Ainiciales, 'g')  
xlabel('Tiempo [Minutos]')  
ylabel('Azúcares reductores [g/L]')  
title('Azúcares reductores vs. Tiempo')  
subplot(3,1,3)  
plot(t,C(:,1)/10, 'b')  
hold on  
plot(t,C(:,2)/10, 'g')  
plot(t,C(:,3)/10, 'c')  
plot(t,C(:,4)/10, 'r')  
plot(t,C(:,5)/10, 'm')
```

```

plot(t,C(:,6)/10, 'k')
plot(t,C(:,7)/10, 'y')
hold off
xlabel('Tiempo [Minutos]')
ylabel('Concentración [Micromoles]')
legend('Pectina', 'MS1', 'DS2', 'OGS3', 'OGS4', 'OGS5', 'OGS6')
title('Pectina y oligosacaridos vs. Tiempo')
AzucaresP =
interp1(t,(C(:,2)+C(:,3)*2+C(:,4)*3+C(:,5)*4+C(:,6)*5+C(:,7)*6)*194.139*100
0/1000000+Ainiciales,tAzucares);

```

%Figura 2

```

figure(2)
subplot(2,1,1)
plot(tAzucares, AzucaresP, 'b')
hold on
errorbar(tAzucares, CAzucares, DSAzucar, 'rs')
xlabel('Tiempo [Minutos]')
ylabel('Azúcares reductores [g/L]')
title('Comparación Azúcares')
legend('Simulacion', 'Datos Reales')
subplot(2,1,2)
plot(tClaridad, ClaridadP, 'b')
hold on
errorbar(tClaridad, CClaridad, DSClaridad, 'rs')
hold off
xlabel('Tiempo [Minutos]')
ylabel('Claridad [%T600]')
title('Comparación claridad')
legend('Simulacion', 'Datos Reales')
hold off

```

%Error

```

ClaridadEI = 3.3588;
AzucaresEI = 1.2281;
ClaridadE = abs(ClaridadP-CClaridad)*100/CClaridad;
disp('Error Experimental - Claridad')

```

```

fprintf('Nuevo %1.4f\n',ClaridadE)
fprintf('Viejo %1.4f\n',ClaridadEI)
fprintf('Mejora %1.4f\n',ClaridadEI-ClaridadE)
disp(' ')
AzucaresE = abs(AzucaresP-CAzucares)*100/CAzucares;
disp('Error Experimental - Azúcares')
fprintf('Nuevo %1.4f\n',AzucaresE)
fprintf('Viejo %1.4f\n',AzucaresEI)
fprintf('Mejora %1.4f\n',AzucaresEI-AzucaresE)
disp(' ')

```

%resultado:

```

disp('Concentraciones')
fprintf('La concentracion de Pectina es %1.4f micromoles\n',C(length(C),1))
fprintf('La concentracion de MS1 es %1.4f micromoles\n',C(length(C),2))
fprintf('La concentracion de DS2 es %1.4f micromoles\n',C(length(C),3))
fprintf('La concentracion de OGS3 es %1.4f micromoles\n',C(length(C),4))
fprintf('La concentracion de OGS4 es %1.4f micromoles\n',C(length(C),5))
fprintf('La concentracion de OGS5 es %1.4f micromoles\n',C(length(C),6))
fprintf('La concentracion de OGS6 es %1.4f micromoles\n',C(length(C),7))
AzucaresP=(C(length(C),2)+C(length(C),3)*2+C(length(C),4)*3+C(length(C),
5)*4+C(length(C),6)*5+C(length(C),7)*6)*194.139*1000/1000000+Ainiciales;
fprintf('La concentracion de azúcares reductores es de %1.4f
mg/ml\n',AzucaresP)
end

```

```
function S = Parameters(W)
```

```
global Ti Ainiciales tClaridad CClaridad tAzucares CAzucares...
```

```

Pectinao MS1o DS2o OGS3o OGS4o OGS5o OGS6o to Pendt
ClaridadE AzucaresE

```

```

[t,C] = ode15s(@(t,C)modelo(t,C,W),[to 120],[Pectinao MS1o DS2o OGS3o
OGS4o OGS5o OGS6o Ti]);

```



```

AzucaresP
=(C(:,2)+C(:,3)*2+C(:,4)*3+C(:,5)*4+C(:,6)*5+C(:,7)*6)*194.139*1000/10000
00+Ainiciales;
Claridad = Pendt(2,1)*AzucaresP+Pendt(1,1);
vc = interp1(t,Claridad,tClaridad);
va
=
interp1(t,(C(:,2)+C(:,3)*2+C(:,4)*3+C(:,5)*4+C(:,6)*5+C(:,7)*6)*194.139*100
0/1000000+Ainiciales,tAzucares);
ClaridadE = vc;
AzucaresE = va;

S = (((sum(abs(CClaridad-(ClaridadE)).^2))/7)+(sum(abs(CAzucares-
AzucaresE).^2))*100/7)/2;
% disp(S)
end

```

```
function dCdt = modelo(t,C,W)
```

```
global Cenzima A Agitacion Diametro Vol pH pHopt pHmin pHmax...
K Te Topt Tmin Tmax Ea R Cp
```

```
%Parametros a optimizar
```

```

KI1 = W(1);
KI3 = W(2);
VmaxOGS3 = W(3);
KmOGS3 = W(4);
VmaxOGS4 = W(5);
KmOGS4 = W(6);
VmaxOGS5 = W(7);
KmOGS5 = W(8);
VmaxOGS6 = W(9);
KmOGS6= W(10);
Vmaxpectin = W(11);
Kmpectin = W(12);

```

```

dCdt=zeros(8,1);
Pectina = C(1);

```

```

MS1 = C(2);
DS2 = C(3);
OGS3 = C(4);
OGS4 = C(5);
OGS5 = C(6);
OGS6 = C(7);
T = C(8);

```

%Ecuaciones constitutivas:

```

Thau=((T-Tmax)*(T-Tmin)^2)/((Topt-Tmin)*((Topt-Tmin)*(T-Topt)-(Topt-
Tmax)*(Topt+Tmin-2*T)));
Rho=((pH-pHmin)*(pH-pHmax))/((pH-pHmin)*(pH-pHmax)-(pH-pHopt)^2);
if T >=50 + 273.15
% Ki=4.62324E+15*exp(-Ea/(R*T));
Kd=exp(-0.0210*t);
else
Kd=1;
end

```

%Numero de Reynolds

```

Densidad = -0.0037*(T-273.15)^2 - 0.089*(T-273.15) + 1001.7; % Kg/m3
Viscosidad = -1.15742E-05*(T-273.15)+0.001134673; %Pa s
NRe = (Densidad*Agitacion/60*Diametro^2)/Viscosidad;

```

%Numero de Prand

```

NPr = Viscosidad*Cp*1000/K;

```

%Numero de Nussel

```

NNu = 0.023*(NRe^0.8)*(NPr^0.4);
H = NNu*K/Diametro;

```

%Reacciones

```

r1=(Vmaxpectin*Cenzima*Pectina*Kd*Thau*Rho)/(Kmpectin*(1+(MS1/KI1))*
(1+(OGS3/KI3)+Pectina));
r2=(VmaxOGS3*Cenzima*OGS3*Kd*Thau*Rho)/(KmOGS3*(1+(MS1/KI1))+
OGS3);

```

```

r3=(VmaxOGS4*Cenzima*OGS4*Kd*Thau*Rho)/(KmOGS4*(1+(MS1/KI1))*(
3+(OGS3/KI3)+OGS4));
r4=(VmaxOGS5*Cenzima*OGS5*Kd*Thau*Rho)/(KmOGS5*(1+(MS1/KI1))*(
1+(OGS3/KI3)+OGS5));
r5=(VmaxOGS6*Cenzima*OGS6*Kd*Thau*Rho)/(KmOGS6*(1+(MS1/KI1))*(
1+(OGS3/KI3)+OGS6));

```

%Ecuaciones diferenciales:

```

dpectindt=-r1;
dMS1dt=0.35*r5+0.67*r4+r3+r2;
dDS2dt=0.57*r5+0.33*r4+r2;
dOGS3dt=0.25*r1+0.08*2*r5+0.33*r4+r3-r2;
dOGS4dt=0.25*r1+0.57*r5+0.67*r4-r3;
dOGS5dt=0.25*r1+0.35*r5-r4;
dOGS6dt=0.25*r1-r5;
dTdt = H*A*(Te-T)/(Vol*Densidad*1000*Cp);

```

%Matriz de salida de datos:

```

dCdt=[dpectindt dMS1dt dDS2dt dOGS3dt dOGS4dt dOGS5dt dOGS6dt
dTdt]';
end

```