



SEP

SECRETARÍA DE
EDUCACIÓN PÚBLICA



TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO

Instituto Tecnológico de Orizaba

“2019, Año del Caudillo del Sur, Emiliano Zapata”

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

OPCIÓN I.- TESIS

TRABAJO PROFESIONAL

“DESARROLLO Y EVALUACIÓN DE MEJORAS
REOTECNOLÓGICAS PARA AUMENTAR LA EFICIENCIA
EN LA PRODUCCIÓN DE BIOETANOL A NIVEL
INDUSTRIAL”.

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
DOCTORA EN
CIENCIAS DE LA INGENIERÍA

PRESENTA:

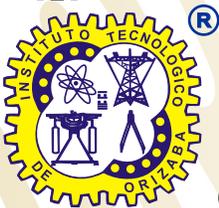
M.C.I.Q. Etna Oropeza de la Rosa

DIRECTOR DE TESIS:

Dr. Denis Cantú Lozano

CODIRECTOR DE TESIS:

Dra. Guadalupe Luna Solano



ORIZABA, VERACRUZ, MÉXICO.

MAYO 2019

DEDICATORIAS

“Mas a Dios gracias, el cual nos lleva siempre en triunfo en Cristo Jesús, y por medio de nosotros manifiesta en todo lugar el olor de su conocimiento”

2 Corintios 2:14

Antes que todo y sobre todas las cosas quiero dar gracias a mi Dios y Señor Jesucristo por haberme otorgado la vida y el privilegio de llegar hasta este momento. Gracias Señor por toda tu divina provisión, ayuda, fortaleza y misericordia a lo largo de este proyecto. Gracias a ti puedo hoy estar alcanzando una meta más en mi vida junto con mi familia. En segundo lugar, quiero dedicar con todo mi corazón éste trabajo a las siguientes personas:

- A mi amado esposo Carlos A. Martínez Carmona por su amor, apoyo, provisión y ayuda. Gracias por haber empezado este proyecto junto conmigo y ahora poder verlo terminado haciendo de este momento una realidad. Gracias por estar conmigo, te amo.
- A mis pequeños hijos, Esdras Asaf y Esteban, por su amor incondicional, sus abrazos, besos, risas y ocurrencias. Este trabajo y esfuerzo es para ustedes y su papá, los amo.
- A mis padres, Francisco Oropeza Domínguez y Olivia de la Rosa Romero, por su dirección, amor incondicional, gran apoyo y por todas las bendiciones recibidas a través de ustedes. Gracias por cuidar de mis niños y de mi familia cuando más lo necesitamos. Gracias por todo, los amamos mucho yo y mi familia. El Señor les llene de bendiciones.
- A mi director de tesis, Dr. Denis Cantú Lozano, por todo este camino recorrido junto a mí para poder llegar a este punto. Gracias por su apoyo y guía en la realización de este proyecto, gracias por su tiempo, ánimos, apoyo y comprensión. Que el Señor le bendiga, le llene de fortaleza, salud y sabiduría.

Y ahora puedo decir nuevamente con gran gozo y alegría “Eben-Ezer”: hasta aquí nos ayudó Jehová.

AGRADECIMIENTOS

Especial agradecimiento y reconocimiento por su valiosa contribución en el desarrollo del presente proyecto a los siguientes:

- A la dirección de tesis de mi asesor el Dr. Denis Cantú Lozano. Gracias por compartir sus conocimientos conmigo y por su apoyo en el ámbito académico y personal.
 - Al apoyo y ayuda de mi coasesor de tesis la Dra. Lupita Luna Solano. Gracias por las importantes aportaciones para la realización de este proyecto, por su confianza hacia mí, por su tiempo y atención prestados durante todo este tiempo.
 - A la División de Estudios de Posgrado e Investigación del Instituto Tecnológico de Orizaba, por facilitarme las instalaciones, laboratorios, equipos y material necesarios para llevar a cabo el estudio realizado.
 - Al Tecnológico Nacional de México por el financiamiento del proyecto "Análisis reológico para aumentar la eficiencia en la producción de bioetanol a nivel industrial" en la Convocatoria de Apoyo a la Investigación Científica, Aplicada, Desarrollo Tecnológico e Innovación 2016 en los Programas Educativos de los Institutos Tecnológicos Federales y Centros del Tecnológico Nacional de México-TecNM. Marzo 2016-febrero 2017. Con clave **5822.16-P** y vigencia 01 de Julio 2016 al 30 de Junio 2017.
 - Al CONACYT por el apoyo económico otorgado a través de la beca con folio **383226**, con la cual fue posible la realización del proyecto de investigación.
 - Un especial agradecimiento a la empresa Alimentos Especiales Tenerife S.A de C.V. que facilitó las muestras y la información necesaria para la realización de este proyecto.
-

RESUMEN

El acelerado agotamiento de recursos fósiles, el continuo incremento de precio de combustibles y la creciente preocupación ambiental han impulsado la búsqueda de nuevas alternativas sostenibles de fuentes renovables de energía.

De aquí que la producción de biocombustibles en México, como el bioetanol, ha cobrado mayor importancia. El incremento en la demanda de biocombustibles obliga a acelerar la construcción de nuevas plantas y a implementar mejoras tecnológicas en el proceso.

Dentro del Grupo Báltico, la empresa Tenerife Alimentos Especiales S.A. de C.V. que se encuentra en el municipio de Orizaba Veracruz produce 40,250,000 litros en promedio de bioetanol anualmente. Su producción de bioetanol es a partir de melaza de caña y en temporadas a partir también de sorgo. No obstante, la destiladora como muchas otras, presenta diferentes problemáticas dentro de su proceso que minimizan su potencial de producción. Uno de estos problemas son la generación de lodos y su incrustación dentro de las columnas de destilación en el proceso a partir de melaza. Esto se traduce en pérdidas para la empresa por el tiempo muerto utilizado para el raspado y limpieza de estos. Al ser mecánica la limpieza origina un desgaste y maltrato en la columna. Mas aún, la presencia de gomas es considerada un aspecto importante puesto que provocan algunas desventajas, destacando las pérdidas de azúcar, taponamiento e incrustaciones en equipos, así como incremento de viscosidad.

Además de lo anterior, y aún de mayor importancia, no existe información clara sobre las mejores condiciones para la degradación de este tipo de gomas en la industria del bioetanol.

El presente proyecto surge de la necesidad de mejorar el proceso de destilación llevado a cabo en la producción de bioetanol; encontrando, evaluando y dando seguimiento reológico a alternativas de solución, así como su análisis de costos.

ABSTRACT

The accelerated depletion of fossil resources, the continuous increase in fuel prices and growing environmental concerns have driven the search for new sustainable alternatives to renewable energy sources.

Hence, biofuels production in Mexico, such as bioethanol, has become more important. The increase in biofuels demand makes it necessary to accelerate the construction of new plants and implement technological improvements in the process.

Within Baltic Group, the company Tenerife Alimentos Especiales S.A. de C.V., located in the municipality of Orizaba, Veracruz produces an average of 40,250,000 liters of bioethanol annually. Its bioethanol production is from sugarcane molasses and, some seasons, from sorghum. However, the distillery like many others, presents different problems within its process that minimize its production potential. One of these problems is sludge generation and its embedding inside distillation columns in the process from molasses. This translates into losses for the company due to dead time used for scraping and cleaning columns. Because the cleaning is mechanical, it causes attrition and mistreatment to the column. Moreover, the presence of gums is considered an important aspect since they cause some disadvantages, such as sugar losses, clogging and incrustations in equipment, as well as increased viscosity.

In addition to the above, and even more important, there is no clear information on the best conditions for this type of gums degradation in the bioethanol industry.

This project arises from the need to improve distillation process in bioethanol production; finding, evaluating and rheologically monitoring solution alternatives, as well as their cost analysis.

PRODUCTOS ACADÉMICOS

El presente proyecto de tesis contó con el financiamiento por el proyecto "Análisis reológico para aumentar la eficiencia en la producción de bioetanol a nivel industrial" en la Convocatoria de Apoyo a la Investigación Científica, Aplicada, Desarrollo Tecnológico e Innovación 2016 en los Programas Educativos de los Institutos Tecnológicos Federales y Centros del Tecnológico Nacional de México-TecNM. Marzo 2016-febrero 2017. Clave: 5822.16-P. Vigencia: 01 de Julio 2016 al 30 de Junio 2017.

A partir de los resultados obtenidos mediante el desarrollo del proyecto, se alcanzaron los siguientes productos académicos:

PUBLICACIONES

- 2019** E. Oropeza-De la Rosa, L.G. López-Ávila, G. Luna-Solano, G.R. Urrea-García, D. Cantú-Lozano. Dextran hydrolysis and its rheology in mashes from bioethanol production process. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*. 2 (2019) 543-554.
- 2017** E. Oropeza-De la Rosa, L.G. López-Ávila, G. Luna-Solano, D. Cantú-Lozano. Bioethanol production process rheology. *Industrial Crops and Products*. 106 (2017) 59-64.

PRESENTACIONES EN CONGRESOS

- 2018** Hidrólisis enzimática de dextrana presente en mosto fermentado de melaza de caña. Coloquio Internacional Multidisciplinario. 22 y 23 de noviembre, Orizaba, Veracruz, México.
- 2016** Efecto reológico por presencia de hidrocoloides en el proceso de producción de bioetanol a partir de melaza. XXXVII Encuentro Nacional de la AMIDIQ. 3 al 6 de mayo, Puerto Vallarta, Jalisco, México.
-

2016 Bioethanol production process rheology. ECO-BIO 2016. 6 al 9 de marzo, Rotterdam, Holanda.

DESARROLLOS TECNOLÓGICOS

2019 Optimización de hidrólisis enzimática de dextrana en mosto fermentado para aumentar la eficiencia en la producción de bioetanol a nivel industrial. 27 Páginas. Reporte entregado a la empresa TENERIFE Alimentos Especiales S.A. de C.V. del Grupo Báltico. Orizaba, Veracruz, México.

ÍNDICE

| Contenido | Página |
|---|--------|
| Lista de figuras | v |
| Lista de tablas | viii |
| Nomenclatura | x |
| Introducción | 1 |
| CAPITULO 1 FUNDAMENTOS TEÓRICOS | |
| 1.1 Etanol | 5 |
| 1.2 Producción de etanol a partir de melazas | 7 |
| 1.3 Destilación de etanol | 8 |
| 1.4 Hidrocoloides | 9 |
| 1.4.1 Microorganismos en la caña de azúcar | 10 |
| 1.4.2 Gomas presentes en la caña de azúcar | 10 |
| 1.5 Constante de equilibrio | 12 |
| 1.6 Enzimas | 13 |
| 1.6.1 Dextranasa | 15 |
| 1.7 Reología | 17 |
| 1.7.1 Parámetros reológicos | 17 |
| 1.7.2 Clasificación de fluidos | 19 |
| 1.7.3 Modelamiento | 20 |
| 1.7.4 Fluidos no newtonianos | 21 |
| 1.7.5 Corte oscilatorio de amplitud pequeña (SAOS) | 22 |
| 1.7.5.1 Elasticidad y los modelos viscoelásticos lineales | 23 |

| | |
|---|----|
| 1.7.5.2 El modelo de Maxwell | 24 |
| 1.7.5.3 El modelo de Jeffreys | 24 |
| 1.7.5.4 El modelo de Maxwell generalizado | 25 |
| 1.7.6 Corte oscilatorio de amplitud larga (LAOS) | 26 |
| 1.7.6.1 Análisis de Fourier y Chebyshev | 28 |
| 1.7.6.2 Análisis SD y SPP | 29 |
| 1.7.6.3 Funciones materiales basadas en modelos constitutivos | 30 |

CAPITULO 2 METODOLOGÍA

| | |
|---|----|
| 2.1 Obtención de muestras | 33 |
| 2.2 Caracterización de muestras | 33 |
| 2.2.1 Caracterización fisicoquímica | 34 |
| 2.2.2 Caracterización reológica | 35 |
| 2.2.2.1 Flujo en estado estacionario | 35 |
| 2.2.2.2 Flujo en estado dinámico | 36 |
| 2.2.2.3 Energía de activación | 38 |
| 2.2.3 Caracterización microbiológica | 39 |
| 2.2.3.1 Dilución en serie | 39 |
| 2.2.3.2 Preparación de medios de cultivo y siembra | 40 |
| 2.2.3.3 Recuento y pruebas microbianas específicas | 41 |
| 2.2.3.4 Tinción Gram | 41 |
| 2.2.3.5 Coloración de capsula | 42 |
| 2.3 Identificación y cuantificación de Dextrana | 43 |
| 2.4 Desarrollo y evaluación de alternativas de solución a nivel laboratorio | 45 |
| 2.4.1 Recuperación de Dextrana vía punto isoeléctrico | 45 |
| 2.4.2 Eliminación de Dextrana vía enzimática | 46 |
| 2.5 Seguimiento reológico de alternativas a nivel laboratorio | |

| | |
|--|----|
| 2.6 Optimización de hidrólisis enzimática de Dextrana | 47 |
| 2.6.1 Metodología de superficie de respuesta (MSR) | 47 |
| 2.6.1.1 Diseño central compuesto (DCC) | 48 |
| 2.6.2 Análisis estadístico | 50 |
| 2.7 Seguimiento reológico en optimización de hidrólisis enzimática de Dextrana | 51 |
| 2.8 Validación de alternativas a nivel piloto | 52 |
| 2.8.1 Empleo de infraestructura ya existente | 52 |
| 2.8.2 Disminución de escala de columna industrial a nivel piloto | 52 |
| 2.8.2.1 Diseño de la columna de destilación | 53 |
| 2.9 Análisis preliminar de costos a nivel industrial | 53 |

CAPITULO 3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

| | |
|---|----|
| 3.1 Muestras obtenidas | 55 |
| 3.2 Caracterización de muestras | 56 |
| 3.2.1 Caracterización fisicoquímica | 56 |
| 3.2.2 Caracterización reológica | 58 |
| 3.2.2.1 Flujo en estado estacionario | 58 |
| 3.2.2.2 Flujo en estado dinámico | 67 |
| 3.2.2.3 Energía de activación | 73 |
| 3.2.3 Caracterización microbiológica | 74 |
| 3.3. Identificación y cuantificación de Dextrana | 81 |
| 3.3.1 Cuantificación de Dextrana mediante HPLC | 82 |
| 3.3.2 Cuantificación de Dextrana mediante NMX-F-476-SCFI-2011 | 84 |
| 3.3.3 Cuantificación de Dextrana mediante AOAC Official Method 988.12 | 86 |
| 3.3.4 Comparación de técnicas utilizadas para cuantificar Dextrana | 87 |
| 3.3.5 Experimentación preliminar para clarificación de mostos | 90 |
| 3.3.5.1 Diseño experimental fraccionado para clarificación de mostos | 94 |

| | |
|---|------------|
| 3.4 Desarrollo y evaluación de alternativas de solución a nivel laboratorio | 101 |
| 3.4.1 Recuperación de Dextrana vía punto isoeléctrico | 101 |
| 3.4.2 Eliminación de Dextrana vía enzimática | 102 |
| 3.4.3 Seguimiento reológico de degradación enzimática de Dextrana | 106 |
| 3.5 Optimización de hidrólisis enzimática de Dextrana | 108 |
| 3.5.1 Reocinética | 108 |
| 3.5.2 Superficies de respuesta y gráficos de contorno | 112 |
| 3.5.3 Determinación de parámetros reológicos estacionarios y dinámicos | 115 |
| 3.5.3.1 Análisis en flujo estacionario | 115 |
| 3.5.3.2 Análisis en flujo dinámico | 118 |
| 3.6 Correlaciones reocinéticas | 122 |
| 3.7 Validación de alternativas de solución | 123 |
| 3.7.1 Empleo de infraestructura existente | 123 |
| 3.7.2 Disminución de escala de columna industrial | 126 |
| 3.7.2.1 Cálculo y diseño de la columna de destilación | 129 |
| 3.8 Análisis preliminar de costos a nivel industrial | 131 |
| 3.8.1 Tasa mínima aceptable de rendimiento (TMAR) | 132 |
| 3.8.2 El valor presente neto (VPN) | 133 |
| 3.8.3 Información sobre costos | 134 |
| | |
| CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES | 138 |
| REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 143 |

LISTA DE FIGURAS

| Figura | Página |
|---|--------|
| 1.1 Estructura química del etanol | 6 |
| 1.2 Estructura química de Dextrana | 11 |
| 1.3 Reacción catalizada enzimáticamente | 14 |
| 1.4 Perfil de velocidades para un fluido entre placas paralelas | 18 |
| 1.5 Curvas típicas de comportamiento | 20 |
| 1.6 Figuras de Lissajous-Bowditch | 28 |
| 2.1 Metodología del proyecto de investigación | 32 |
| 2.2 Reómetro y geometrías utilizadas | 38 |
| 2.3 Dilución en serie y extensión en placa de muestra | 39 |
| 2.4 Tinción de Gram | 42 |
| 2.5 Colorímetro HunterLab | 45 |
| 2.6 Diseño central compuesto con centros en las caras para 3 factores | 49 |
| 3.1 Muestras obtenidas de la empresa | 55 |
| 3.2 Placa de incrustación problema | 56 |
| 3.3 Comportamiento de melaza e incrustación a 25 °C | 58 |
| 3.4 Comportamiento de mostos y bioetanol impuro a 25 °C | 58 |
| 3.5 Viscosidad aparente de melaza a 25 °C y 35 °C | 60 |
| 3.6 Viscosidad aparente de mosto fermentado a 25 °C y 90 °C | 63 |
| 3.7 Comportamiento del bioetanol impuro a 25 °C y 90 °C | 66 |
| 3.8 Barrido de amplitud de muestra de incrustación a 25 °C | 68 |
| 3.9 Barrido de frecuencia de muestra de incrustación a 25 °C | 68 |
| 3.10 Barrido de amplitud LAOS | 70 |
| 3.11 Barrido de frecuencia | 70 |
| 3.12 Respuesta de onda resultante a una frecuencia de 1 rad/s | 71 |

| | |
|--|-----|
| 3.13 Respuesta de onda resultante a una frecuencia de 10 rad/s | 71 |
| 3.14 Respuesta de onda resultante a una frecuencia de 25.12 rad/s | 72 |
| 3.15 Respuesta de onda resultante a una frecuencia de 50.12 rad/s | 72 |
| 3.16 Respuesta de onda resultante a una frecuencia de 79.43 rad/s | 73 |
| 3.17 Correlación entre la viscosidad aparente y el inverso de la temperatura absoluta para obtener los parámetros de Arrhenius | 74 |
| 3.18 Bacterias aisladas en medio MSE | 81 |
| 3.19 Cromatograma de referencia (Dextrana) | 82 |
| 3.20 Cromatograma de incrustación (Dextrana). | 83 |
| 3.21 Filtrado previo de la muestra de mosto fermentado | 84 |
| 3.22 Muestra de incrustación después del pretratamiento y dilución | 85 |
| 3.23 Kit de filtración a vacío Millipore utilizado en las muestras | 87 |
| 3.24 Parámetros de color | 91 |
| 3.25 Mosto fermentado clarificado al finalizar la técnica AOAC Official Method 988.12 | 94 |
| 3.26 Cuantificación de Dextrana en los tratamientos | 97 |
| 3.27 Reograma de comportamiento reológico en estado estacionario | 98 |
| 3.28 Barrido de amplitud de Experimento 1 y 2 | 99 |
| 3.29 Barrido de frecuencia de Experimento 1 y 2 | 100 |
| 3.30 Curvas de titulación en medio ácido de soluciones de Dextrana a 1% y 6% m/v | 101 |
| 3.31 Curvas de titulación en medio básico de soluciones de Dextrana a 1% y 6% m/v | 102 |
| 3.32 Degradación de dextrana con respecto al tiempo de hidrólisis enzimática, en nivel alto de temperatura | 105 |
| 3.33 Dextranasa y uno de los tratamientos de degradación de Dextrana | 110 |
| 3.34 Gráfico de probabilidad normal de residuales | 112 |
| 3.35 Superficies de % de degradación | 113 |

| | |
|---|-----|
| 3.36 Gráficos de contornos de % de degradación | 113 |
| 3.37 Comportamiento de tratamientos a 30°C | 115 |
| 3.38 Comportamiento de tratamientos a 35°C | 116 |
| 3.39 Comportamiento de tratamientos a 40°C | 116 |
| 3.40 Barrido de amplitud de EXP 1 y 2, a 30°C | 119 |
| 3.41 Barrido de amplitud de EXP 7 y 9, a 40 y 35°C | 119 |
| 3.42 Barrido de frecuencia de EXP 1 y 2, a 30°C | 120 |
| 3.43 Barrido de frecuencia de EXP 7 y 9, a 40 y 35°C | 120 |
| 3.44 Barrido de amplitud de EXP 1 a 30°C | 121 |
| 3.45 Correlación reocinética de degradación de Dextrana | 122 |
| 3.46 Columna intercambiable | 124 |
| 3.47 Columna de destilación instantánea | 125 |
| 3.48 Columna de destilación | 126 |
| 3.49 Esquema general de la columna de destilación | 127 |
| 3.50 Esquema de la sección de calotas | 131 |

LISTA DE TABLAS

| Tabla | Página |
|--|--------|
| 1.1 Ecuaciones para modelos de fluidos no Newtonianos | 21 |
| 2.1 Parámetros determinados para caracterización fisicoquímica | 34 |
| 2.2 Condiciones para pruebas en estado estacionario | 35 |
| 2.3 Parámetros utilizados en pruebas oscilatorias de LVE | 36 |
| 2.4 Parámetros utilizados en pruebas LAOS | 37 |
| 2.5 Diseño experimental para clarificación | 44 |
| 2.6 Diseño experimental para eliminación enzimática | 47 |
| 2.7 Tratamientos, factores y niveles utilizados en diseño experimental | 50 |
| 2.8 Condiciones para pruebas en estado estacionario y dinámico | 52 |
| 3.1 Parámetros determinados para caracterización fisicoquímica | 57 |
| 3.2 Modelos experimentales y validación | 67 |
| 3.3 Pruebas bioquímicas de muestras | 75 |
| 3.4 Pruebas bioquímicas de la tina 4 | 77 |
| 3.5 Pruebas bioquímicas de la tina 5 | 78 |
| 3.6 Pruebas bioquímicas de la tina 7 | 79 |
| 3.7 Pruebas bioquímicas de la tina 10 | 80 |
| 3.8 Área de los picos resultantes de la solución problema | 83 |
| 3.9 Contenido de dextrana en mosto fermentado | 84 |
| 3.10 Contenido de dextrana en incrustación | 85 |
| 3.11 Contenido de Dextrana en mosto fermentado e incrustación | 86 |
| 3.12 Contenido de Dextrana determinada con diferentes técnicas | 88 |
| 3.13 Lecturas obtenidas en el colorímetro | 91 |
| 3.14 Contenido de Dextrana en muestras clarificadas mediante NMX-f-476-SCFI- 2011 | 92 |

| | |
|--|-----|
| 3.15 Contenido de Dextrana en muestras clarificadas mediante AOAC Official Method 988.12 | 93 |
| 3.16 Factores y niveles del diseño experimental fraccionado | 95 |
| 3.17 Fracción utilizada (U = 1) | 96 |
| 3.18 ANOVA de diseño experimental fraccionado | 97 |
| 3.19 Parámetros reológicos obtenidos en muestras | 99 |
| 3.20 Contenido de Dextrana después del tratamiento enzimático | 103 |
| 3.21 ANOVA con respecto al contenido de Dextrana | 104 |
| 3.22 Valores de viscosidad en hidrólisis enzimática | 107 |
| 3.23 Tratamientos y resultados obtenidos en cuanto a degradación de Dextrana | 109 |
| 3.24 ANOVA de hidrólisis enzimática de Dextrana en mosto fermentado | 110 |
| 3.25 Modelos experimentales obtenidos de cada tratamiento | 117 |
| 3.26 Especificaciones de columna intercambiable | 124 |
| 3.27 Especificaciones de columna de destilación | 125 |
| 3.28 Datos obtenidos de la columna en la empresa | 127 |
| 3.29 Datos de similitud geométrica | 129 |

NOMENCLATURA

| Símbolo | Definición | Unidades |
|----------|--|---------------------------|
| A | Sustrato | [–] |
| B | Relación enzima-sustrato | [mL] |
| C | Temperatura | [°C] |
| C_0 | Concentración inicial de Dextrana | [ppm] |
| C_f | Concentración final de Dextrana | [ppm] |
| E_a | Energía de activación | [$cal/g\ mol$] |
| G' | Módulo de almacenamiento | [Pa] |
| G'' | Módulo de pérdida | [Pa] |
| MF | Mosto fermentado | [–] |
| M | Mosto fresco | [–] |
| K | Índice de consistencia | [$Pa\ s^n$] |
| K_{HB} | Índice de consistencia de Herschel-Bulkley | [$Pa\ s^n_{HB}$] |
| K_1 | Constante modelo Ellis | [$Pa\ s$] ⁻¹ |
| K_2 | Constante modelo Ellis | [$Pa\ s$] ⁻ⁿ |
| m | Exponente modelo de Cross | [–] |
| n | Índice de comportamiento reológico | [–] |
| n_{HB} | Índice de comportamiento reológico de Herschel-Bulkley | [–] |
| R^2 | Coeficiente de determinación | [–] |
| v | Volumen | [mL] |
| w | Peso | [g] |
| X_i | Variables estudiadas de polinomio de segundo orden | [–] |
| X_1 | Variable temperatura | [°C] |
| X_2 | Variable relación | [mL] |
| X_3 | Variable tiempo | [h] |

| | | |
|-----------------------|--|--------------------|
| Y | Variable de respuesta | [%] |
| Letras griegas | | |
| α | Exponente del modelo de Carreau | [-] |
| β_0 | Coeficiente constante de polinomio de segundo orden | [-] |
| β_i | Coeficiente lineal de polinomio de segundo orden | [-] |
| β_{ii} | Coeficiente cuadrático de polinomio de segundo orden | [-] |
| β_{ij} | Coeficiente de interacción de polinomio de segundo orden | [-] |
| γ | Amplitud | [%] |
| ω | Frecuencia | [Rad/s] |
| $\dot{\gamma}$ | Tasa de corte o de deformación | [s ⁻¹] |
| η | Viscosidad | [Pa s] |
| η_{ap} | Viscosidad aparente | [Pa s] |
| η_0 | Viscosidad cero | [Pa s] |
| η_∞ | Viscosidad en el infinito | [Pa s] |
| λ | Constante modelo de Cross | [s ^m] |
| σ | Esfuerzo de corte | [Pa] |
| σ_0 | Esfuerzo de corte inicial | [Pa] |
| σ_{HB} | Esfuerzo de corte inicial de Herschel-Bulkley | [Pa] |

INTRODUCCIÓN

Debido al incremento en la demanda de combustibles, a los exagerados precios del petróleo y a la creciente conciencia ambiental de la población, la alternativa de los biocombustibles ha adquirido mayor relevancia (Marriaga *et al.*, 2009).

La bioenergía tiene una importante participación en satisfacer las necesidades energéticas mundiales futuras. La bioenergía podría ofrecer de forma sostenible un cuarto y un tercio del suministro mundial de energía primaria en el año 2050 (Naveen *et al.*, 2014).

México destaca a nivel mundial por ser uno de los países con las metas más ambiciosas en materia de generación de energía mediante fuentes no fósiles. La Ley para el Aprovechamiento de las Energías Renovables y el Financiamiento de la Transición Energética, establece que para el año 2024 la participación de las fuentes no fósiles en la generación de electricidad será del 35% (SENER, 2015). De aquí que la producción de biocombustibles en México, como el etanol, ha cobrado mayor importancia. El incremento en la demanda de biocombustibles obliga a acelerar la construcción de nuevas plantas y a implementar mejoras tecnológicas en el proceso.

La demanda actual del país se ha incrementado y se requieren 2680 millones de litros del biocombustible al año para abastecerla. Actualmente México produce 305 millones de litros de etanol e importa 265 millones de litros al año (ZAFRANET, 2016). La producción de etanol en el país es, en su mayoría, a partir de melaza de caña. No obstante, las destiladoras, presentan diferentes problemáticas dentro de su proceso que minimizan su potencial de producción. Uno de estos problemas son la generación de lodos y su incrustación dentro de las columnas de destilación en el proceso a partir de melaza. Esto se traduce en pérdidas debido al tiempo muerto utilizado para el raspado y limpieza mecánica de éstos, originando un desgaste y maltrato en la columna.

Las industrias que involucran caña de azúcar en sus procesos, como la producción de bioetanol, presentan diferentes problemas operacionales dentro del proceso debido a la presencia de hidrocoloides, principalmente Dextrana, minimizando su potencial de producción: aumento de viscosidad de fluidos, generación de obstrucciones, problemas de incrustación de equipos, pérdida de energía, entre otros (Abraham *et al.*, 2016; Bashari, *et al.*, 2013; Chou, 2000; Gibriel *et al.*, 2014; Khalikova *et al.*, 2005; Ninchan *et al.*, 2017; Rodríguez-Jiménez, 2005; Trost y Steel, 2002). Los hidrocoloides, como la Dextrana, modifican la reología del sistema, que incluye dos propiedades básicas: comportamiento del flujo (viscosidad) y propiedades mecánicas (Sánchez-.Paz *et al.*, 2018).

Debido a las características poliméricas de adhesividad, afinidad química al material de las columnas, altos pesos moleculares, niveles de concentración y su resistencia a altas tasas de corte en las columnas, es necesario el conocimiento de las propiedades reológicas de la incrustación. Así mismo, se hace necesaria la realización de experimentación con el propósito de conocer las mejores condiciones para llevar a cabo la recuperación y/o hidrólisis enzimática de Dextrana, esto dentro de las alternativas de solución propuestas.

La hidrólisis de Dextrana mediante enzimas es un método prometedor y a menudo utilizado para minimizar los problemas de procesamiento descritos (Abraham *et al.*, 2016). Sin embargo, en muchos casos, no se dispone de información clara sobre su manipulación (Bashari *et al.*, 2013; Rodríguez-Jiménez, 2005). Existe confusión sobre qué dextranasa utilizar y cómo y dónde añadir la dextranasa (Bashari *et al.*, 2013; Eggleston *et al.*, 2011; Eggleston *et al.*, 2009). Desafortunadamente, no se han encontrado muchos resultados publicados sobre su aplicación industrial (proceso del azúcar y proceso de destilación) (Bashari *et al.*, 2013; Eggleston *et al.*, 2009; Eggleston y Monge, 2005; Fadel *et al.*, 2016; Rodríguez-Jiménez, 2005, Zhao *et al.*, 2014). Algunos investigadores están trabajando en la optimización de la aplicación de dextranasa en la fabricación de azúcar (Bashari *et al.*, 2013; Eggleston *et al.*, 2011; Eggleston *et al.*, 2009; Zhao *et al.*, 2014), pero no así en el proceso de producción de bioetanol.

Dentro del contexto anteriormente descrito, es evidente la necesidad de desarrollo de mejoras reo-tecnológicas en el proceso de producción de etanol para aumentar la eficiencia el mismo. La resolución de la problemática presente se traduce en el aumento de la producción de bioetanol en las plantas destiladoras, contribuyendo de esta manera a la disminución del deterioro ambiental, teniendo repercusiones positivas tanto en la región como a nivel nacional.

OBJETIVO GENERAL

Desarrollar y evaluar un sistema de mejoras reo-tecnológicas en el proceso de destilación de etanol en una industria alcoholera.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar fisicoquímica, reológica y microbiológicamente melaza, mostos y destilado.
- Obtener mediante el flujo oscilatorio, información sobre la viscoelasticidad, de la lineal a no lineal, a través de las amplitudes de corte oscilatoria pequeña (SAOS) y larga (LAOS) y los modelos constitutivos dinámicos correspondientes.
- Identificar y cuantificar el material incrustante en las columnas de destilación utilizadas en el proceso de etanol a partir de melaza.
- Desarrollar y evaluar alternativas de solución y su determinación de parámetros reológicos estacionarios y dinámicos a nivel laboratorio.
- Disminución de escala y diseño de la columna de destilación A100 ubicada en la industria, a escala piloto.
- Llevar a cabo un análisis preliminar de costos a nivel industrial para la toma de decisiones en la empresa.

CAPÍTULO 1

1. FUNDAMENTOS TEÓRICOS

1.1 Etanol

A nivel mundial, aproximadamente 90% de la energía consumida proviene de fuentes no renovables, por lo que estos recursos fósiles se están agotando aceleradamente y su tasa de disminución es cada vez mayor (Becerra-Pérez, 2009).

La bioenergía es el actor principal en satisfacer las futuras necesidades energéticas mundiales. La bioenergía podría ofrecer de forma sostenible un cuarto y un tercio del suministro mundial de energía primaria para el año 2050. La bioenergía es la única fuente renovable que puede sustituir a los combustibles fósiles en todos los mercados energéticos para la producción de calor, electricidad y combustibles para el transporte (Naveen *et al.*, 2014). La creciente necesidad de ampliar de modo sostenible el uso de fuentes renovables de energía, para proporcionar mayor seguridad al suministro energético y reducir los impactos ambientales asociados a los combustibles fósiles, encuentra en el bioetanol de caña de azúcar una alternativa económicamente viable y con significativo potencial de expansión (BNDES, 2008).

El etanol (Figura 1.1) es un líquido incoloro, volátil, con un olor característico y sabor picante. También se conoce como alcohol etílico. Sus vapores son más pesados que el aire. Se obtiene, principalmente, al tratar etileno con ácido sulfúrico concentrado y posterior hidrólisis. Algunas alternativas de síntesis son: hidratación directa de etileno en presencia de ácido fosfórico a temperaturas y presiones altas y por el método Fischer-Tropsch, el cual consiste en la hidrogenación catalítica de monóxido de carbono, también a temperaturas y presiones altas. De manera natural, se obtiene a través de fermentación, por medio de levaduras a partir de frutas, caña de azúcar, maíz, cebada, sorgo, papas y arroz entre otros, generando las variadas bebidas alcohólicas que existen en el mundo. Después de la fermentación puede llevarse a cabo una destilación para obtener un producto con una mayor cantidad de alcohol (UNAM, 2016).

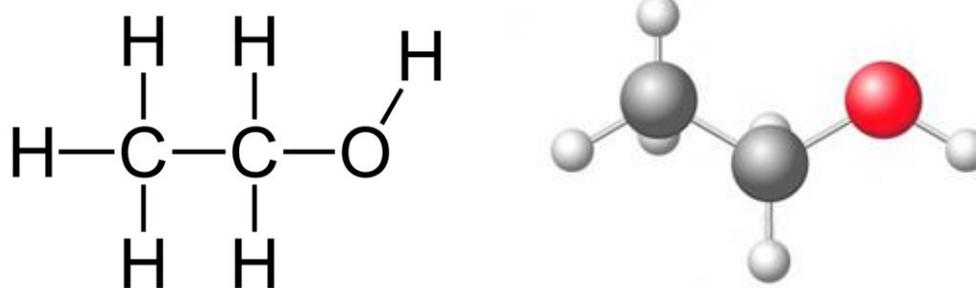


Figura 1.1 Estructura química del etanol.

El etanol es un alcohol que se utiliza en las industrias química, farmacéutica, cosmética y de bebidas alcohólicas. También es utilizado en el sector transporte, ya sea como combustible directo en los vehículos denominados Flex-fuel, como oxigenante o como componente en la formulación de gasolinas, para lo cual se requiere que el etanol sea anhidro, es decir, con muy bajo contenido de agua y una pureza del 99.5% al 99.9% (SENER, 2015). El etanol presenta algunas diferencias importantes con relación a los combustibles convencionales, derivados de petróleo. La principal de ellas, es la elevada concentración de oxígeno, que representa cerca del 35% de la masa de etanol. En general, las características del etanol permiten una combustión más limpia y un mejor desempeño de los motores (ciclo *Otto*), lo que conlleva a la reducción de las emisiones contaminantes. Para el uso de etanol hidratado puro (con cerca del 5% de agua), se necesita adaptar los motores, pero, cuando se trata de mezclas con concentraciones de hasta 10% de etanol, se pueden utilizar los motores convencionales a gasolina sin cualquier ajuste. En los motores flexibles (flex-fuel vehicle – FFV), con gran penetración en el mercado brasileño, se pueden utilizar mezclas con cualquier concentración de etanol. En comparación a la gasolina pura, un análisis detallado de los aspectos más relevantes del uso de las mezclas gasolina/etanol, como octanaje, volatilidad, desempeño, separación de fases, compatibilidad de materiales (elastómeros y metales) y emisiones de gases de escape (incluyendo monóxido de carbono, óxidos de nitrógeno, de azufre y aldehídos), muestra como este biocombustible puede ser utilizado sin problemas de orden técnico y ambiental (BNDES, 2008).

1.2 Producción de etanol a partir de melazas

El proceso de elaboración de alcohol a partir de melaza, está basado en las propiedades que tienen algunos microorganismos de metabolizar azúcares y producir como residuo, alcohol etílico. Como el alcohol que se produce es de baja graduación, es necesario eliminar el agua por destilación. Para efectuar este proceso biológico, en una planta industrial a partir de melaza de caña, es necesario efectuar varias operaciones que se resumen en tres secciones: preparación de mostos, fermentación continua y destilación-rectificación.

Las mieles agotadas o melazas de caña son los residuos resultantes de la cristalización final del azúcar, del cual no puede extraerse más sacarosa por métodos convencionales. Se presenta como un líquido viscoso, denso, rico en azúcares reductores y aproximadamente 60 % de los sólidos está compuesto por sacarosa, glucosa y fructuosa, además de otras sustancias de origen orgánico como aminoácidos, ácidos carboxílicos, alifáticos y olefínicos, vitaminas, proteínas y fenoles, entre otros. La melaza está constituida por una fracción de origen mineral de gran importancia en la que se encuentran más de 20 metales y no metales en distintas proporciones. La composición de la miel es en extremo variable, pues depende de factores agrícolas e industriales como variedad, grado de madurez, clima, condiciones de cultivo, tipo de corte, eficiencia industrial, etc. Debido a su alto contenido de azúcares, tiene un considerable precio en el mercado internacional; actualmente, constituye un producto importante de la industria azucarera por su empleo como material o substrato, al ser un co-producto de bajo costo capaz de ser modificado por la acción de los elementos vivos para la transformación en procesos biotecnológicos en productos o derivados finales útiles al hombre.

El proceso para la producción de alcohol desde las melazas de la caña de azúcar es en esencia el mismo que partiendo desde el almidón. La diferencia principal es que el azúcar contenido en las melazas es la sacarosa. La sacarosa es un disacárido constituido por una molécula de glucosa y una de fructuosa mientras que la maltosa (producida desde el almidón) está formada por dos moléculas de glucosa. La enzima invertasa es la que se usa para desdoblar la molécula

de sacarosa y la zimasa para convertir los azúcares simples obtenidos, en dióxido de carbono y etanol.

La fermentación es inhibida por su producto final, el etanol, por lo que no es posible obtener por este método rendimientos mayores de 10 a 15% de alcohol. Para lograr concentraciones mayores, la mezcla final debe ser sometida a la destilación fraccionada al igual que en el proceso de producción a partir de almidones. Para llevar a cabo la fermentación se diluye la melaza con agua hasta una concentración de un 11-12% de sacarosa, se agrega la levadura y la solución se abandona a la fermentación a temperatura entre 30 y 35°C. El proceso debe realizarse de forma anaeróbica; si hay oxígeno presente el etanol continúa su transformación y se oxida a ácido acético y en todo caso, al final, a dióxido de carbono y agua. Usualmente la fermentación termina entre 7 y 10 días.

Saccharomyces cerevisiae es la especie de levaduras utilizada por excelencia para la obtención de etanol a nivel industrial debido a que es un microorganismo de fácil manipulación y recuperación, no es exigente en cuanto a su cultivo, no presenta alto costo, tolera altas concentraciones de etanol, en la fermentación produce bajos niveles de subproductos, es osmotolerante, capaz de utilizar altas concentraciones de azúcares, presenta alta viabilidad celular para el reciclado y características de floculación y sedimentación para el procesamiento posterior (Fajardo-Castillo *et al.*, 2007).

1.3 Destilación de etanol

Los sistemas de destilación de alcohol utilizados son muy variados y pueden constar desde 2 columnas, 6 o más, en dependencia del grado de rectificación que se desee. En el caso de sistemas de destilación de 3 columnas, las unidades básicas la constituyen: columnas destiladora, depuradora y rectificadora. Las diferencias de este sistema con otros de más columnas consisten en:

1. La operación de la columna depuradora con lavado de agua a contracorriente.
2. La adición de una columna para concentrar y separar el aceite de fusel.
3. El reposo del alcohol rectificado en una columna donde se separan los compuestos de punto de ebullición muy próximos al etanol.

Otro ejemplo interesante es el utilizado en los sistemas de destilación de 5 columnas, con la finalidad de obtención de alcohol absoluto.

Los residuales del proceso de producción de alcohol, a partir de mieles finales de caña presentan, por lo general, una DBO (demanda bioquímica de oxígeno) alta, pudiendo llegar (en dependencia del grado de recuperación) a 60 000 ppm o más, con 10-12 °Brix, un contenido de alrededor de 7 g/L de materia orgánica, estos efluentes se producen mayoritariamente por el fondo de la columna destiladora. Es decir, una destilería que descargue 1000 m³/d de líquidos residuales con un DBO de 35 000 ppm, su contaminación sería equivalente a las de una población de 625 000 habitantes (Gómez-Estévez *et al.*, 2011).

1.4 Hidrocoloides

Los hidrocoloides o gomas pueden ser definidos en términos prácticos como moléculas de alto peso molecular con características o hidrofílicas o hidrofóbicas que, usualmente, tienen propiedades coloidales, con capacidad de producir geles al combinarse con el solvente apropiado. De este modo, el término goma se aplica a una gran variedad de sustancias con características gomosas. Sin embargo, es más común la utilización del término goma para referirse a polisacáridos o sus derivados, obtenidos de plantas o por procesamiento microbiológico que, al dispersarse en el agua fría o caliente, producen soluciones o mezclas viscosas (Pasquel, 2001).

Se ha detectado la presencia de hidrocoloides o gomas en el procesamiento de la caña de azúcar, considerándose como un aspecto relevante puesto que provocan algunas desventajas,

destacando las pérdidas de azúcar, taponamiento e incrustaciones en equipos, así como incremento de viscosidad. Es importante mencionar algunas de las aplicaciones de dichas gomas, principalmente en la industria farmacéutica, alimentaria y petrolera.

1.4.1 Microorganismos en la caña de azúcar

De acuerdo con estudios realizados, Bevan y Bond aislaron aproximadamente 50 diferentes microorganismos, de la caña verde y 17 de la superficie de la caña quemada. Además de la bien conocida especie productora de polisacáridos, *Leuconostoc mesenteroides*, hay géneros de levaduras (*Saccharomyces*, *Torula* y *Píchia*) que también se encuentran luego en el jugo y no contienen invertasa, otras que causan una destrucción activa de los azúcares reductores, bacterias (*Pseudomonas*) y bacilos del suelo (*Bacillus cereus*) así como *Penicillium sp.* y otros hongos (*Actinomyces*), el hongo productor de ácidos *Streptomyces* y otros que causan fuerte inversión, activas tanto en los jugos como en las meladuras y los que constituyen agentes más activos de la deterioración de los azúcares crudos. Los microorganismos crecen rápidamente en la superficie de la caña quemada, incluso tan pronto como 10 minutos después de la quemadura. Estos organismos son principalmente bacilos tales como *Xanthomonas*, *Bacterium*, *Corynebacterium* y *Bacillus*. Después de 24 horas de la quema, en la caña en pie se encuentran otros organismos tales como los hongos *Rhizopus* y *Aspergillus*, y las levaduras coloreadas *Rhodotorula* y *Candida*. *Leuconostoc mesenteroides* es muy común en la caña quemada y su número aumenta considerablemente después del quemado. En la caña cortada se han encontrado infecciones masivas hasta de 6 pulgadas a partir del extremo cortado después de 2 horas de almacenamiento. Los organismos productores de material muciforme como *Leuconostoc mesenteroides*, *Xanthomonas* y *Aerobacter*, predominan y producen ácidos y materiales semejantes a las dextranas.

1.4.2 Gomas presentes en la caña de azúcar

- **Dextrana**

La dextrana es un polisacárido neutral y ramificado, compuesto de una cadena lineal principal de enlaces glicosídicos α -1,6 con algunas ramificaciones de α -glucopiranosas en las posiciones 0-2, 0-3 o 0-4 (Iqbal *et al.*, 2017) (Figura 1.2). Este polímero biodegradable es sintetizado principalmente por bacterias ácido lácticas pertenecientes al género *Leuconostoc* (Abraham *et al.*, 2016; Gibriel *et al.*, 2014; Kasaai, 2012; Zarour *et al.*, 2017). Además, es un exopolisacárido único que tiene una alta tasa de cizallamiento y solubilidad en agua (Iqbal *et al.*, 2017).

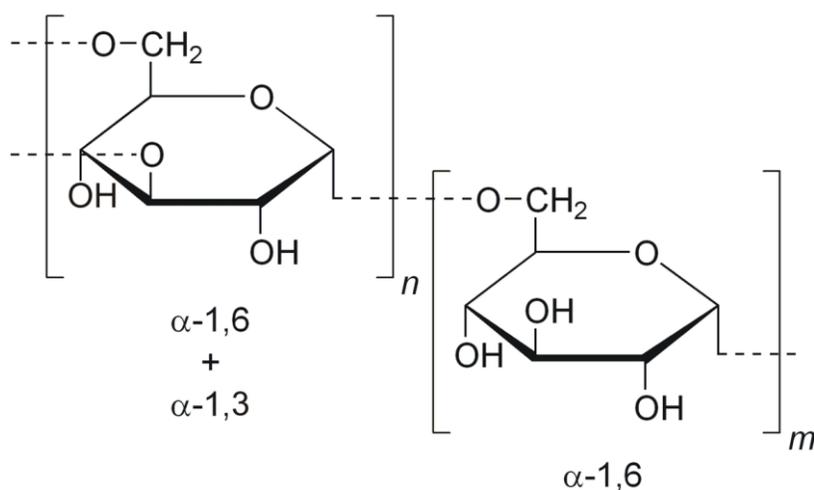


Figura 1.2 Estructura química de Dextrana.

No son verdaderos productos naturales, se descubrieron en la fabricación del azúcar al observar masas que obturaban los filtros. Se forman por fermentación de la sacarosa en presencia de bacterias, que tienen un contenido de enzima específico: *Leuconostoc mesenteroides*. Esta rompe el enlace entre glucosa y fructosa de la sacarosa, uniéndose las unidades de glucosa, polimerizándola y dando dextranas. Las dextranas que se obtienen por fermentación de la sacarosa son de peso molecular mayor de 75000, 40000 y 10000 Daltons.

Esta goma, que es un enemigo muy molesto para el fabricante de azúcar, es el producto de varias fermentaciones (como la producida por el *Leuconostoc*), y ocurre con frecuencia en cañas dañadas por heladas o por ataques de insectos. La formación de esta goma viscosa,

convierte rápido la caña en inservible para la molienda. Su alta rotación específica (+200), tres veces mayor que la de la sacarosa, introduce un serio error en la polarización de los productos, de caña, a menos que la goma se elimine previamente tratándola con alcohol.

Las industrias que involucran procesos de caña de azúcar, como la producción de bioetanol, presentan diferentes problemas operacionales dentro del proceso debido a la presencia de hidrocoloides, principalmente dextrana, dentro de los cuales podemos encontrar: pérdidas de azúcar, incremento de viscosidad de fluidos, generación de lodos, taponamiento de equipos, problemas de incrustación en equipos, pérdida de energía y calor, generación de residuos, entre otros (Abraham *et al.*, 2016; Bashari *et al.*, 2013; Chou, 2000; Gibriel *et al.*, 2014; Khalikova *et al.*, 2005; Ninchan *et al.*, 2017; Rodríguez-Jiménez, 2005; Trost y Steel, 2002). El efecto de la dextrana sobre la viscosidad se ha estudiado y se ha descubierto que aumenta con el incremento del peso molecular y disminuye con el incremento de ramificaciones (Kaur y Kaler, 2008).

La dextrana es usada en diferentes ámbitos, como el médico (es usado como antiplaqueta o para reducir la viscosidad de la sangre), el farmacéutico o en la industria agricultora. También se puede encontrar en abundancia en la placa dental (Naessens *et al.*, 2005).

1.5 Constante de equilibrio

La constante de equilibrio está definida por K_a , mejor conocida como constante de disociación, la cual también es expresada como pK_a , mostrada en la ecuación (1), debido a sus bajos niveles de concentración.

$$pK_a = -\log K_a \quad \text{Ec. (1)}$$

La relación entre la disociación de un grupo y el pH del medio, está dada por la ecuación (2) de *Henderson-Hasselbalch*.

$$pH = pK_a + \log \frac{[forma\ disociada]}{[forma\ no\ disociada]} \quad \text{Ec. (2)}$$

Por medio de la ecuación (2), es posible obtener las curvas representativas de pK_a .

El punto isoeléctrico (pI), está definido como el pH en el cual las cargas positivas igualan a las cargas negativas y no existe movimiento en un campo eléctrico. A este valor de pH la solubilidad de la sustancia es casi nula. Experimentalmente el punto isoeléctrico, pI , está determinado por un único valor de pH donde se tiene una carga neta cero y no existe atracción por ningún polo si se somete a un campo eléctrico, matemáticamente se expresa como en la ecuación (3) (Mathews *et al.*, 2000).

$$pI = \frac{(pK_{a1} + pK_{a2})}{2} \quad \text{Ec. (3)}$$

1.6 Enzimas

Un catalizador es una sustancia que disminuye la energía de activación de una reacción y, por consiguiente, aumenta la velocidad de una reacción. La energía de activación es la cantidad de energía que se necesita para llevar todas las moléculas de una reacción química a un estado reactivo. Los catalizadores facilitan las reacciones, pero ellos mismos no se consumen ni se modifican durante la reacción. Es importante destacar que los catalizadores no intervienen en la energía o en el equilibrio de una reacción, sino que afectan sólo a la velocidad a la que esas reacciones ocurren.

En los organismos vivos, la mayoría de las reacciones no tendrían lugar a una velocidad apreciable sin los catalizadores. Los catalizadores de las reacciones biológicas son proteínas llamadas enzimas. Las enzimas son muy específicas para las reacciones que catalizan. Es decir, cada enzima cataliza solamente un único tipo de reacción química o, en el caso de algunas

enzimas, una clase de reacciones estrechamente relacionadas. Esta especificidad se debe a la estructura tridimensional de la molécula de la enzima. En una reacción catalizada enzimáticamente, la enzima se combina temporalmente con el reaccionante, que se denomina sustrato (S) de la enzima, para formar un complejo enzima-sustrato. Luego, cuando ocurre la reacción, el producto (P) se libera y la enzima (E) vuelve a su estado original (Figura 1.3):



Por lo general, la enzima es mucho más grande que el sustrato y la combinación enzima-sustrato suele depender de enlaces débiles tales como puentes de hidrógeno, fuerzas de Van der Waals e interacciones hidrofóbicas. La pequeña porción de la enzima que se une al sustrato constituye el sitio activo de la enzima (Madigan *et al.*, 2004).



Figura 1.3 Reacción catalizada enzimáticamente.

Como todos los catalizadores, las enzimas funcionan disminuyendo la energía de activación ΔE_a [J/gmol] de una reacción, de forma que se acelera sustancialmente la tasa de reacción. Las enzimas no alteran el balance energético de las reacciones en que intervienen, ni modifican, por lo tanto, el equilibrio de la reacción $\Delta G^+ = 0$, pero consiguen acelerar el proceso incluso millones de veces. Una reacción que se produce bajo el control de una enzima, o de un catalizador en general, alcanza el equilibrio mucho más deprisa que la correspondiente reacción no catalizada. La actividad de las enzimas puede ser afectada por otras moléculas. Los

inhibidores enzimáticos son moléculas que disminuyen o impiden la actividad de las enzimas, mientras que los activadores son moléculas que incrementan dicha actividad. Asimismo, gran cantidad de enzimas requieren de cofactores para su actividad.

Las velocidades de las enzimas dependen de las condiciones de la solución y de la concentración de sustrato. Aquellas condiciones que desnaturalizan una proteína, como temperaturas elevadas, pHs extremos o altas concentraciones de sal, dificultan o impiden la actividad enzimática, mientras que elevadas concentraciones de sustrato tienden a incrementar la actividad. Para encontrar la máxima velocidad de una reacción enzimática, la concentración de sustrato se incrementa hasta que se obtiene una tasa constante de formación de producto. La saturación ocurre porque, cuando la concentración de sustrato aumenta, disminuye la concentración de enzima libre, que se convierte en la forma con sustrato unido o complejo $ES[gES/L]$. A la máxima velocidad $V_{m\acute{a}x}[gS/Lh]$ de la enzima, todos los sitios activos de dicha enzima tienen sustrato unido, y la cantidad del complejo $ES[gES/L]$ es igual a la cantidad total de enzima. Sin embargo, V_{max} es solo una de las constantes cinéticas de la enzima. La cantidad de sustrato necesario para obtener una determinada velocidad de reacción también es importante. Este parámetro viene dado por la constante de Michaelis-Menten $K_M[gS/L]$, que es la concentración de sustrato necesaria para que una enzima alcance la mitad de su velocidad máxima $K_M = \frac{1}{2}V_{max}[gS/L]$. Cada enzima tiene un valor de $K_M[gS/L]$ característico para un determinado sustrato, el cual puede decirnos cómo de afín es la unión entre el sustrato y la enzima. Otra constante útil es $K_{cat}[mol S/s]$, que es el número de moléculas de sustrato procesadas por cada sitio activo por segundo (Grisham *et al.*, 1999; Smith *et al.*, 1997).

1.6.1 Dextranasa

Las enzimas se denominan según el sustrato al que se unen o según la reacción que catalizan, con la desinencia *-asa*. Así, la *celulasa* es una enzima que degrada la celulosa, la glucosa

oxidasa cataliza la oxidación de la glucosa y la ribonucleasa descompone ácido ribonucleico (Madigan *et al.*, 2004).

La dextranasa (α -D-1,6-glucano-6-glucanohidrolasa) es la enzima encargada de realizar la hidrólisis enzimática de las dextranas, ya que es específica para los enlaces α -1,6, mayormente presentes en el polisacárido, los cuales rompe al formar moléculas de oligosacáridos de menor tamaño (fracciones de menor peso molecular) (Ninchan *et al.*, 2017; Bashari *et al.*, 2013; Rodríguez-Jiménez, 2005; Zohra *et al.*, 2015; Zohra *et al.*, 2013). Las dextranasas tienen aplicaciones industriales importantes dado que estas enzimas pueden despolimerizar varios problemáticos depósitos de Dextrana microbiana (Bashari *et al.*, 2016; Khalikova *et al.*, 2005; Rodríguez-Jiménez, 2005). La hidrólisis de Dextrana mediante enzimas es un método prometedor y frecuentemente utilizado para disminuir los problemas de procesamiento antes descritos (Abraham *et al.*, 2016; Purushe *et al.*, 2012). La hidrólisis enzimática de Dextrana mediante dextranasa es el método más aplicable en la industria azucarera hasta hoy, su uso fue argumentado hace más de 40 años. Muchos han sido los preparados enzimáticos disponibles en el mercado, varias las compañías que los han producido y diversas las fuentes de enzima que se han utilizado, desde que en 1972 Inkerman y James presentaron sus resultados preliminares tras el empleo de la dextranasa para mejorar el procesamiento de la caña deteriorada en los centrales de Queensland. En estos estudios iniciales de aplicación industrial, se utilizó el preparado enzimático Glucanase D-1, producido por la compañía Phizer Chemicals para la hidrólisis de elevadas concentraciones de dextranas en el jugo mezclado. Durante la década de los años 80, las compañías productoras de enzimas industriales comenzaron a producir preparados de dextranasa para su empleo en el proceso azucarero, sin embargo en muchos casos, no aparece información disponible sobre su empleo (Bashari *et al.*, 2013; Rodríguez-Jiménez, 2005). Existe confusión sobre qué dextranasa usar y cómo y dónde añadir la dextranasa (Bashari *et al.*, 2013; Eggleston *et al.*, 2011; Eggleston *et al.*, 2009). Desafortunadamente, no son muchos los resultados publicados acerca de su aplicación industrial (proceso del azúcar y proceso de destilación) (Bashari *et al.*, 2013; Eggleston *et al.*,

2009; Eggleston y Monge, 2005; Fadel *et al.*, 2016; Rodríguez-Jiménez, 2005; Zhao *et al.*, 2014). Algunos investigadores han trabajado en la optimización de la aplicación de dextrana en la fabricación de azúcar Bashari *et al.*, 2013; Eggleston *et al.*, 2011; Eggleston *et al.*, 2009; Zhao, *et al.*, 2014) pero no es así para el proceso de producción de bioetanol.

1.7 Reología

El uso de la palabra “Reología” por primera vez es acreditado a Eugene C. Bingham (alrededor de 1928). Actualmente, la Reología está establecida como la ciencia de la deformación y fluido de la materia: es el estudio de la manera en la cual los materiales responden a un esfuerzo aplicado y a una deformación. Las propiedades reológicas fundamentales son independientes del instrumento en el cual son medidas, por lo tanto, diferentes instrumentos producirán los mismos resultados (Steffe, 1996).

1.7.1 Parámetros reológicos

Para resolver la dificultad que supone la casi infinita diversidad de productos, existen puntos de referencia constituidos por sustancias ideales. Al sólido ideal se le llama sólido de Hooke, en memoria de Robert Hooke, un arquitecto e investigador inglés. El líquido ideal deriva su nombre de Sir Isaac Newton, eminente matemático y naturalista inglés. El sólido de Hooke, al igual que el líquido de Newton, constituye auténticos límites del comportamiento reológico. Combinando estos dos modelos reológicos, se obtienen otros intermedios. La Figura 1.4 muestra un fluido sometido a una deformación simple entre dos platos paralelos. El plato inferior es estacionario, mientras que el plato superior se mueve a una velocidad v como consecuencia de una fuerza F aplicada al mismo.

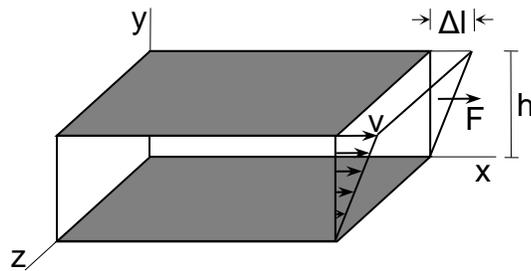


Figura 1.4 Perfil de velocidades para un fluido entre placas paralelas.

El movimiento del plato establece un gradiente de velocidad en el fluido. Esta geometría puede ser usada para definir algunos parámetros reológicos tales como:

Esfuerzo de corte σ [Pa]: Se define como la fuerza por unidad de área necesaria para alcanzar una dada deformación, se le conoce como ley de Newton, ecuación (5).

$$\sigma_{yx} = -\mu \frac{dv_x}{dy} \quad \text{Ec. (5)}$$

Tasa de Corte $\dot{\gamma}$ [s^{-1}]: Se define como el cambio de velocidad v a través de la distancia h entre los dos platos. La velocidad de corte se incrementa a medida que la velocidad del plato superior aumenta y la distancia entre los dos platos se hace más pequeña.

$$\dot{\gamma} = \frac{dv}{dh} \quad \text{Ec. (6)}$$

Viscosidad η [Pa s]: Se define como la relación entre el esfuerzo de corte aplicado y la velocidad de corte adoptada por el fluido.

$$\eta = \frac{\sigma}{\dot{\gamma}} \quad \text{Ec. (7)}$$

1.7.2 Clasificación de fluidos

Un fluido se define como una sustancia que se deforma continuamente bajo la aplicación de esfuerzos cortantes. Las características reológicas de un fluido son uno de los criterios esenciales en el desarrollo de productos en el ámbito industrial. Frecuentemente, éstas determinan las propiedades funcionales de algunas sustancias e intervienen durante el control de procesos, control de calidad, los tratamientos (comportamiento mecánico), el diseño de operaciones básicas como bombeo, mezclado y envasado, almacenamiento y estabilidad física, e incluso en la aceptación de un producto (textura) (Müller, 1973). Existen 3 tipos de fluidos:

- **Newtoniano** (proporcionalidad lineal entre el esfuerzo cortante y la velocidad de deformación).
- **No newtoniano** (no hay proporcionalidad lineal entre el esfuerzo cortante y la velocidad de deformación).
- **Viscoelásticos** (se comportan como líquidos y sólidos, presentando propiedades de ambos).

Un gráfico de esfuerzo de corte o viscosidad en función de la velocidad de corte se conoce como reograma. El reograma para un fluido Newtoniano es una línea recta cuya pendiente es la Viscosidad. La mayoría de los materiales con alguna significancia industrial son no Newtonianos. Existen varios tipos de comportamientos no Newtoniano como se muestra en la Figura 1.5.

- **Flujo Dilatante:** la viscosidad disminuye a medida que aumenta la tasa de corte a la cual es sometido el fluido.
- **Flujo Pseudoplástico:** la viscosidad aumenta a medida que aumenta la tasa de corte sobre el fluido.
- **Flujo de Bingham:** el producto presenta un valor umbral de esfuerzo de corte τ_0 , el cual es necesario sobrepasar para que el fluido se ponga en movimiento.

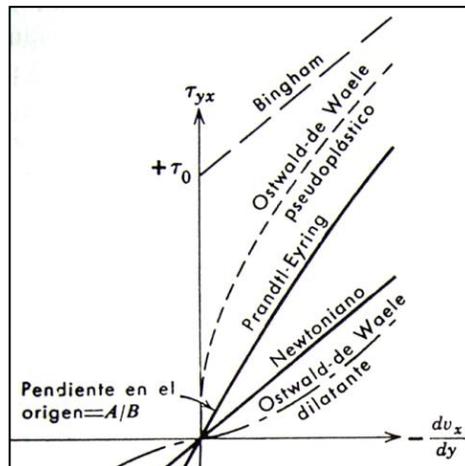


Figura 1.5 Curvas típicas de comportamiento (Bird *et al.*, 1960).

1.7.3 Modelamiento

El modelamiento provee un medio para representar una gran cantidad de datos reológicos en términos de una simple expresión matemática. Numerosos factores influyen la selección del modelo reológico usado para describir el comportamiento de flujo de un fluido en particular. Muchos modelos, además de la Ley de Potencia, el modelo plástico de Bingham y el modelo Herschel-Bulkley, han sido utilizados para representar el comportamiento de flujo de fluidos no Newtonianos. Los modelos de Cross, Reiner-Philippoff, Van Wazer y Powell-Eyring son útiles modelando comportamientos pseudoplásticos sobre rangos bajos, medios y altos de velocidad de corte. Algunas de las ecuaciones, tales como la de Casson modificada y la generalizada Herschel-Bulkley, se han mostrado útiles en el desarrollo de modelos matemáticos para resolver problemas de ingeniería incluyendo rangos amplios de velocidad de corte.

En la Tabla 1.1 se describen ecuaciones constitutivas para modelos de fluidos no Newtonianos en régimen estacionario (Steffe, 1996).

Tabla 1.1 Ecuaciones para modelos de fluidos no Newtonianos (Steffe, 1996).

| Modelo (Fuente) | Ecuación |
|--|--|
| Casson (Casson, 1959) | $\sigma^{0.5} = (\sigma_0)^{0.5} + K_1(\dot{\gamma})^{0.5}$ |
| Casson Modificada (Mizrahi y Berk, 1972) | $\sigma^{0.5} = (\sigma_0)^{0.5} + K_1(\dot{\gamma})^{n1}$ |
| Ellis (Ellis, 1927) | $\dot{\gamma} = K_1\sigma + K_2(\sigma)^{n1}$ |
| Harschel - Bulkley generalizada (Ofoli et al., 1987) | $\sigma^{n1} = (\sigma_0)^{n1} + K_1(\dot{\gamma})^{n2}$ |
| Serie de Potencias (Whorlow, 1992) | $\dot{\gamma} = K_1 \sigma + K_2(\sigma)^3 + K_3(\sigma)^5 \dots$ $\sigma = K_1 \dot{\gamma} + K_2(\dot{\gamma})^3 + K_3(\dot{\gamma})^5 \dots$ |
| Carreau (Carreau, 1968) | $\eta = \eta_\infty + (\eta_0 - \eta_\infty)[1 + (K_1\dot{\gamma})^2]^{(n-1)/2}$ |
| Cross (Cross, 1965) | $\eta = \eta_\infty + \frac{\eta_0 - \eta_\infty}{1 + K_1(\dot{\gamma})^{n1}}$ |
| Van Wazer (Van Wazer, 1963) | $\eta = \frac{\eta_0 - \eta_\infty}{1 + K_1\dot{\gamma} + K_2(\dot{\gamma})^{n1}} + \eta_\infty$ |
| Powell-Eyring (Powell and Eyring, 1944) | $\sigma = K_1 \dot{\gamma} \left(\frac{1}{K_2} \right) \sinh^{-1}(K_3\dot{\gamma})$ |
| Reiner-Philippoff (Philippoff, 1935) | $\sigma = \left(\eta_\infty + \frac{\eta_0 - \eta_\infty}{1 + \left(\frac{\sigma}{K_1} \right)^2} \right) \dot{\gamma}$ |

1.7.4 Fluidos no newtonianos

El modelo de fluido newtoniano describe con precisión todos los gases y todos los líquidos compuestos de "pequeñas" moléculas (hasta pesos moleculares aproximados de 5000). Los fluidos no newtonianos son fluidos estructuralmente complejos que incluyen soluciones de polímeros, polímeros fundidos, soluciones jabonosas, suspensiones, emulsiones, pastas y algunos fluidos biológicos. Debido a que estos líquidos contienen moléculas de alto peso molecular con muchos grados de libertad internos, el comportamiento de las soluciones de

polímeros y de los polímeros fundidos es cualitativamente diferente del de los fluidos newtonianos. Sus viscosidades dependen fuertemente de los gradientes de velocidad, además pueden presentar "efectos elásticos" pronunciados. También en el flujo cortante estacionario simple entre dos láminas paralelas hay esfuerzos normales desiguales y diferentes de cero (σ_{xx} , σ_{yy} y σ_{zz}) que no se presentan en los fluidos newtonianos. Para caracterizar a los fluidos no newtonianos es necesario medir no sólo la viscosidad, sino también los esfuerzos normales y las respuestas viscoelásticas.

1.7.5 Corte oscilatorio de amplitud pequeña (SAOS)

Un método normal para medir la respuesta elástica de un fluido es el experimento cortante oscilatorio de pequeña amplitud, donde la lámina superior se mueve de un lado a otro en forma sinusoidal con una pequeña amplitud. El esfuerzo cortante necesario para mantener el movimiento oscilatorio es periódico en el tiempo y, en general, de la forma:

$$\sigma_{yx} = -\eta' \dot{\gamma}^0 \cos \omega t - \eta'' \dot{\gamma}^0 \sin \omega t \quad \text{Ec. (8)}$$

donde η' y η'' son las componentes de la viscosidad compleja, $\eta^* = \eta' - i\eta''$, que es una función de la frecuencia. El primer término (en fase) es la "respuesta viscosa", y el segundo término (fuera de fase) es la "respuesta elástica". Los químicos en polímeros usan las curvas de $\eta'(\omega)$ y $\eta''(\omega)$ (o los módulos de almacenamiento y pérdida $G' = \eta''(\omega)$ y $G'' = \eta'(\omega)$) para "caracterizar" a los polímeros, debido a que se conoce mucho sobre la relación entre las formas de estas curvas y la estructura química.

Los módulos clásicos de almacenamiento y pérdida G' y G'' constituyen funciones materiales que pertenecen a los experimentos de SAOS strain (deformación SAOS), cuya onda de entrada es $\gamma = \gamma_\alpha \sin \omega t$, donde la amplitud de deformación γ_α y la velocidad de deformación $\gamma_\alpha \omega$ se mantienen muy pequeños para asegurar la linealidad. El módulo está definido por:

$$\sigma = G' \gamma + \frac{G''}{\omega} \dot{\gamma} = \gamma_{\alpha} \{G' \sin \omega t + G'' \cos \omega t\} \quad \text{Ec. (9)}$$

Las pruebas en flujo de corte oscilatorio de amplitud pequeña proporcionan dos cantidades dependientes de la frecuencia, que son los coeficientes de la onda de salida. Un coeficiente pertenece al término que está en fase (G'') con respecto a la onda de entrada, y el otro pertenece al término que está fuera de fase (G') (Bird *et al.*, 2006; Thompson *et al.*, 2015).

1.7.5.1 Elasticidad y los modelos viscoelásticos lineales

Los modelos viscoelásticos lineales se utilizan en particular para describir flujos en estado no estacionario en sistemas con gradientes de desplazamiento muy pequeños y principalmente los han usado los químicos interesados en comprender la estructura de los polímeros. Empezamos por escribir la expresión de Newton para el tensor de esfuerzo de un líquido viscoso incompresible junto con la expresión análoga de Hooke para el tensor de esfuerzo de un sólido elástico incompresible:

Newton:

$$\sigma = -\mu(\nabla v + (\nabla v)^+) \equiv -\mu \dot{\gamma} \quad \text{Ec. (10)}$$

Hooke:

$$\sigma = -G(\nabla u + (\nabla u)^+) \equiv -G \gamma \quad \text{Ec. (11)}$$

En la segunda de estas expresiones, G es el módulo elástico, y u es el "vector desplazamiento", que proporciona la distancia y la dirección de un punto en el sólido que se ha movido respecto a su posición inicial como resultado de los esfuerzos aplicados. La cantidad γ se denomina "tensor de deformación infinitesimal". El tensor de velocidad de la deformación y el tensor de deformación infinitesimal están relacionados por $\dot{\gamma} = \partial \gamma / \partial t$. El sólido hookeano tiene una

memoria perfecta; una vez que se retiran los esfuerzos impuestos, el sólido regresa a su configuración inicial. La ley de Hooke es válida sólo para gradientes de desplazamiento muy pequeños, ∇u . Ahora queremos combinar las ideas contenidas en las ecuaciones anteriores para describir fluidos viscoelásticos.

1.7.5.2 El modelo de Maxwell

La ecuación más simple para describir un fluido que es tanto viscoso como elástico constituye el siguiente modelo de Maxwell:

$$\sigma + \lambda_1 \frac{\partial}{\partial t} \sigma = -\eta_0 \dot{\gamma} \quad \text{Ec. (12)}$$

Aquí λ_1 es una constante de tiempo (el tiempo de relajación) y η_0 es la viscosidad cero de velocidad de corte. Un experimento simple que ilustra el comportamiento de un líquido viscoelástico puede realizarse con plastilina "boli-goma". Este material fluye con facilidad cuando se aprieta lentamente entre las palmas de las manos, lo cual indica que se trata de un fluido viscoso. Sin embargo, si se le da la forma de una pelota, ésta rebota cuando se le deja caer sobre una superficie dura. Durante el impacto los esfuerzos cambian rápidamente, y el material se comporta como un sólido elástico.

1.7.5.3 El modelo de Jeffreys

El modelo de Maxwell en la ecuación anterior es una relación lineal entre los esfuerzos y los gradientes de velocidad, que implica una derivada respecto al tiempo de los esfuerzos. También podría incluirse una derivada respecto al tiempo de los gradientes de velocidad y aun así seguir teniendo una relación lineal:

$$\sigma + \lambda_1 \frac{\partial}{\partial t} \sigma = -\eta_0 \left(\dot{\gamma} + \lambda_2 \frac{\partial}{\partial t} \dot{\gamma} \right) \quad \text{Ec. (13)}$$

Este modelo de Jeffreys contiene tres constantes: la viscosidad cero de la velocidad de corte y dos constantes de tiempo (la constante λ_2 se denomina tiempo de retardo).

Resulta evidente que es posible agregar términos que contengan las derivada segunda, tercera y superiores de los tensores de esfuerzo y de velocidad de la deformación con constantes multiplicativas apropiadas, a fin de obtener una relación lineal todavía más general entre los esfuerzos y los tensores de velocidad de la deformación. Esto otorga más flexibilidad al ajustar datos experimentales.

1.7.5.4 El modelo de Maxwell generalizado

Otra forma de generalizar la idea de Maxwell es:

$$\sigma(t) = \sum_{k=1}^{\infty} \sigma_k(t) \quad \text{Ec. (14)}$$

Donde

$$\sigma_k + \lambda_k \frac{\partial}{\partial t} \sigma_k = -\eta_k \dot{\gamma} \quad \text{Ec. (15)}$$

Donde hay muchos tiempos de relajamiento λ_k (con $\lambda_1 \geq \lambda_2 \geq \lambda_3 \dots$) y muchas constantes η_k con dimensiones de viscosidad. Se sabe mucho sobre las constantes en este modelo a partir de teorías moleculares de polímeros y de los extensos experimentos que se han realizado sobre líquidos poliméricos.

Debido a que la ecuación (15) es una ecuación diferencial lineal, puede integrarse analíticamente, con la condición de que el fluido esté en reposo en $t = -\infty$. Así, cuando se suman los diversos σ_k según la ecuación (14), se obtiene la forma integral del modelo de Maxwell generalizado:

$$\sigma(t) = \int_{-\infty}^t \left\{ \sum_{k=1}^{\infty} \frac{\eta_k}{\lambda_k} \exp[-(t-t')/\lambda_k] \right\} \dot{\gamma}(t') dt' = - \int_{-\infty}^t G(t-t') \dot{\gamma}(t') dt' \quad \text{Ec. (16)}$$

En esta forma, el concepto de "memoria que se desvanece" está presente de manera evidente: el esfuerzo en el instante t depende de los gradientes de velocidad en todos los instantes pasados t' , pero debido a las funciones exponenciales que hay en el integrando, se otorga mayor peso a los instantes t' próximos a t , es decir, la "memoria" del fluido es mejor para instantes recientes que para instantes más remotos. La cantidad entre llaves se denomina módulo de relajación del fluido y se denota por $G(t-t')$. Algunas veces la expresión integral en la ecuación (16) es más conveniente para resolver problemas de viscoelásticos lineales que las ecuaciones diferenciales en las ecuaciones (14) y (15).

Los modelos de Maxwell, Jeffreys y Maxwell generalizado son todos ejemplos de modelos viscoelásticos lineales, y su uso está restringido a movimientos con gradientes de desplazamiento muy pequeños. Los líquidos poliméricos tienen muchos grados de libertad internos y en consecuencia se requieren muchos tiempos de relajación para describir su respuesta lineal. Por esta razón, el modelo de Maxwell generalizado se ha utilizado ampliamente para interpretar datos experimentales sobre viscoelasticidad lineal (Bird *et al.*, 2006).

1.7.6 Corte oscilatorio de amplitud larga (LAOS)

El flujo de corte oscilatorio de amplitud larga es actualmente considerado como una de las metodologías más prometedoras para investigar el comportamiento de materiales complejos. Los experimentos en LAOS buscan probar el material en el régimen viscoelástico no lineal mientras son exploradas las ventajas del movimiento oscilatorio. Ya que una amplia variedad de procesos industriales involucra grandes deformaciones, la comprensión de cómo estos materiales complejos se comportan bajo estas condiciones es fundamental para fines de

optimización y diseño. La prueba LAOS permite ajustar la amplitud y frecuencia independientemente y es capaz de cubrir un rango amplio de condiciones.

Es común y conveniente presentar resultados de LAOS vía figuras de Lissajous-Bowditch. La forma elástica proporciona la trayectoria de respuesta en el plano esfuerzo-deformación, mientras la forma viscosa representa la respuesta en el plano de tasa de esfuerzo-deformación. Además de las formas obvias esperadas de los materiales Newtonianos y Hookeanos, la respuesta lineal también proporciona figuras simples de Lissajous-Bowditch, es decir orbitas elípticas. De aquí que, el grado de no-linealidad puede ser inferido mediante el grado de “no-elipticidad” de las orbitas (Figura 1.6). Mientras que ésta forma de interpretar datos proporciona perspectivas útiles y aporta al entendimiento del comportamiento del material, cantidades físicamente significativas y matemáticamente bien definidas son necesarias para una descripción exhaustiva e inequívoca.

Durante un flujo oscilatorio de amplitud larga, el esfuerzo varía periódicamente de cero a grandes valores, y el estado microscópico responde a esta variación según propiedades y características desconocidas del material. La información deseada es el comportamiento mecánico, el cual varía con la configuración de las moléculas o con el estado microestructural, y por lo tanto varía periódicamente a lo largo del experimento de manera desconocida. La forma de onda de salida se rige, por supuesto, por la respuesta microscópica a los cambios de tensión, y la tarea de un análisis de datos LAOS es inferir el comportamiento mecánico a partir de la forma de onda de salida.

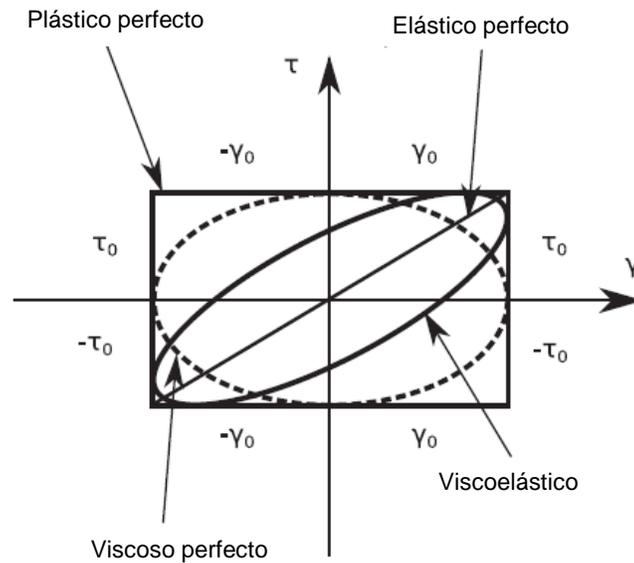


Figura 1.6 Figuras de Lissajous-Bowditch (Ptaszek, 2014).

Numerosos grupos importantes de investigación en todo el mundo han estado dedicados a encontrar cantidades materiales medibles y significativas que puedan conquistar el estatus de contrapartes no lineales de G' y G'' . En el régimen viscoelástico lineal, G' y G'' (o $\eta = G''/\omega$) son consideradas las funciones materiales fundamentales para indicar el comportamiento elástico y viscoso, respectivamente, y por lo tanto ha sido usual buscar funciones materiales con estatus similares para el régimen no lineal también (Thompson *et al.*, 2015).

Esta técnica es una herramienta cómoda y económica, ya que sólo se realiza un tipo de experimento y proporciona información prácticamente completa sobre las propiedades reológicas de la muestra analizada (Ptaszek, 2014).

1.7.6.1 Análisis de Fourier y Chebyshev

Un intento de generalizar las funciones materiales oscilatorias viscoelásticas lineales a respuestas de onda no lineales está basado en las series de Fourier. Es este enfoque, la onda respuesta no lineal es representada por las series de Fourier, y los indicadores de la respuesta

no lineal son los armónicos asociados con las frecuencias mayores que la impuesta (los armónicos de orden superior).

Alternativamente, un conjunto diferente de funciones de base ortogonal puede emplearse para representar la onda de respuesta no lineal. Digno de atención son los polinomios de primer tipo de Chebyshev.

Los análisis de Fourier y Chebyshev generalizan G' y G'' a través de una serie de coeficientes, denominados G'_n y G''_n en el caso del análisis de Fourier, y e_n y v_n en el caso de Chebyshev. En estos análisis, los armónicos de mayor orden desaparecen en el límite del régimen viscoelástico lineal, mientras que los de primer orden se reducen a sus homólogos viscoelásticos lineales. Estas dos metodologías son esencialmente métodos objetivos para representar matemáticamente la respuesta de onda no lineal. En esta relación estos han sido criticados debido a la ausencia de interpretación física para los diferentes armónicos mayores.

En la búsqueda de una percepción física, autores que han aplicado las expansiones de Fourier y Chebyshev con frecuencia utilizan cantidades individuales cuyas definiciones son independientes del análisis empleado. Estas cantidades son usualmente definidas para un experimento específico, ya sea deformación de LAOS (onda de deformación sinusoidal impuesta) o esfuerzo de LAOS (onda de tensión de coseno impuesta) (Thompson *et al.*, 2015).

1.7.6.2 Análisis SD y SPP

Existen dos análisis disponibles en la literatura que pueden ser usados en lugar de los de Fourier y Chebyshev. Estos son la Descomposición del Esfuerzo “Stress Decomposition” (SD) (Cho *et al.*, 2005) y la Secuencia de Procesos Físicos “Sequence of Physical Processes” (SPP) (Rogers, 2012). Los análisis SD y SPP introducen dos nuevas funciones materiales destinadas a ser interpretadas como módulos dinámicos generalizados: Γ' y Γ'' en el caso de SD, y R' y R''

en el caso de SPP. Estas nuevas funciones materiales son definidas de tal manera que se reducen a los módulos clásicos G' y G'' en el límite del régimen viscoelástico lineal.

Al tener solo dos funciones reológicas -a diferencia de un infinito como en el análisis de Fourier y Chebyshev- parece ser una característica atractiva de los análisis SD y SPP. Sin embargo, mientras que en los análisis de Fourier y Chebyshev los armónicos que surgen no dependen del tiempo, los análisis SD y SPP tienen la desventaja intrínseca de tener funciones materiales que dependen en la amplitud, frecuencia y tiempo.

1.7.6.3 Funciones materiales basadas en modelos constitutivos

Fue demostrado que las funciones materiales usuales que surgen en los análisis de experimentos de deformación SAOS y deformación LAOS están directamente relacionadas con el modelo Kelvin-Voigt, mientras que las que aparecen en el análisis de experimentos de esfuerzo SAOS y esfuerzo LAOS están directamente relacionadas al modelo de Maxwell. Entonces, sería más apropiado usar un marco de referencia para análisis de datos de materiales genéricos que fuera capaz de predecir cualitativamente todo el rango de comportamiento mecánico. El modelo más simple que engloba el espectro entero del comportamiento mecánico es el modelo de Jeffreys, ecuación (17). Este modelo tiene tres parámetros y por lo tanto genera tres funciones materiales, estos son determinados con la ayuda de datos de flujo estacionario.

$$\sigma + \frac{\eta_{J1}}{G_J} \dot{\sigma} = (\eta_{J1} + \eta_{J2}) \dot{\gamma} + \eta_{J1} \frac{\eta_{J2}}{G_J} \ddot{\gamma} \quad \text{Ec. (17)}$$

Es interesante remarcar que esta ecuación no involucra la deformación total γ . Esta es una característica deseable, porque γ no es relevante para líquidos ni necesaria para la descripción del comportamiento mecánico para materiales genéricos (Thompson *et al.*, 2015).

CAPÍTULO 2

2. METODOLOGIA

La Figura 2.1 muestra las etapas que se llevaron a cabo durante el proyecto de investigación con el fin de alcanzar los objetivos propuestos:



Figura 2.1 Metodología del proyecto de investigación.

Durante el desarrollo del presente proyecto se efectuó una constante revisión bibliográfica, con la finalidad de obtener un fundamento teórico-práctico concreto, evitando ambigüedades.

2.1 Obtención de muestras

Las muestras necesarias para la realización de este proyecto fueron proporcionadas por la empresa Grupo Báltico que se encuentra ubicada en Autopista Veracruz – México Km. 271 S/N, Orizaba, Veracruz, México. Se realizaron numerosas visitas a la planta para la obtención de las muestras, cada vez que éstas se necesitaban en el proyecto, siendo éstas:

Melaza: subproducto procedente del proceso de refinería de sacarosa de la caña de azúcar y materia prima principal en el proceso de destilación.

Mosto fresco: melaza diluida (a 20° Brix aproximadamente) y acondicionada (nutrientes y levadura) para llevar a cabo el proceso de fermentación.

Mosto muerto: mosto resultante después del proceso de fermentación, donde la producción de etanol ha sido inhibida por su mismo producto.

Incrustación: material formado e incrustado en la pared interna de la primera columna de destilación, también llamada columna mostera o destrozadora.

Bioetanol impuro: bioetanol de baja graduación (60° GL aproximadamente) resultante de la primera columna de destilación.

2.2 Caracterización de muestras

La primera etapa en este estudio fue la caracterización fisicoquímica, microbiológica y reológica de las diferentes muestras obtenidas durante el proceso de destilación en la empresa. Las muestras fueron debidamente etiquetadas y almacenadas a 4°C para su preservación.

2.2.1 Caracterización fisicoquímica

La caracterización fisicoquímica fue la primera en llevarse a cabo, esto con el propósito de saber la composición de las muestras en cuestión, ya que ésta resulta ser muy variable. Los parámetros que se determinaron son los siguientes:

Tabla 2.1 Parámetros determinados para caracterización fisicoquímica.

| Determinación | Técnica/Instrumento |
|--|--|
| pH | Potenciómetro |
| Humedad | Termobalanza |
| Densidad | Densímetro |
| Viscosidad | Reómetro |
| Proteínas | Kjeldahl |
| Sólidos Suspendido Totales (SS _T) | 2540 D Standar Methods |
| Sólidos suspendidos Volátiles (SS _V) | 2540 E Standar Methods |
| Demanda Química de Oxígeno (DQO _T) | 5220 D Standar Methods |
| Demanda Química de Oxígeno Soluble (DQO _S) | 5220 D Standar Methods |
| Azúcares Reductores | Fehling |
| Color | Colorimétrica |
| Dextrana | HPLC NMX-F-476-SCFI-2011 AOAC Official Method 988.12 |

La caracterización se efectuó utilizando los equipos existentes en el Laboratorio de Procesos: (Estufa de secado APSA modelo E3C, Balanza Analítica OHAUS modelo Explorer, Potenciómetro JENWAY modelo 3310, Reómetro Anton Paar modelo MCR301 y software Rheoplus para captura de datos, Mufla Felisa modelo FE-363, Espectrofotómetro UV/Vis Zeigen modelo 1104, Baño seco Felisa; y en el Laboratorio de Bioprocesos: Microdestilador Kjeldahl, Colorímetro HunterLab y Termobalanza Sartorius. Ambos laboratorios ubicados dentro de las instalaciones del Instituto Tecnológico de Orizaba (ITO).

2.2.2 Caracterización reológica

Debido a las características poliméricas de adhesividad, afinidad química al material de las columnas, altos pesos moleculares, niveles de concentración y resistencia a altas tasas de corte en las columnas, fue necesario el conocimiento de las propiedades reológicas de cada una de las muestras. Para ello se realizaron corridas en flujo estacionario y flujo dinámico en un reómetro Anton Paar modelo Physica MCR301 utilizando el software Rheoplus/32 V2.81 para captura de datos.

2.2.2.1 Flujo en estado estacionario

Para la determinación de comportamiento y parámetros reológicos en estado estacionario se utilizaron diferentes geometrías, éstas dependiendo del tipo de muestra a analizar (Tabla 2.2); control de temperatura con plato Peltier, esto tomando en cuenta las condiciones de temperatura dentro del proceso llevado a cabo en la industria, dentro de un amplio intervalo de corte estacionario de $0 \leq \dot{\gamma} \leq 10^3 s^{-1}$.

Tabla 2.2 Condiciones para pruebas en estado estacionario.

| Muestra | Temperatura (°C) | Geometría |
|--------------|------------------|--------------|
| Melaza | 25 | CP25-2/TG |
| | 35 | |
| Mosto fresco | 25 | ST22-4V-40 |
| | 25 | |
| Mosto muerto | 25 | ST22-4V-40 |
| | 90 | |
| Incrustación | 25 | CP25-2/TG |
| | 90 | |
| Destilado | 25 | CC27/T200/AL |
| | 90 | |

Se aplicaron modelos constitutivos no newtonianos como el de Ostwald De Waele y Cross, y modelos viscoplásticos como el de Bingham y/o Herschel-Bulkley y sus parámetros reológicos estacionarios: índice de consistencia (K) (resistencia a la tasa de corte), esfuerzo de corte inicial (σ_0) (estructura tridimensional) y el índice reológico (n) (comportamiento del flujo).

2.2.2.2 Flujo en estado dinámico

La determinación de parámetros reológicos en estado dinámico se llevó a cabo en la muestra de incrustación solamente. Lo anterior debido a su comportamiento pseudoplástico mostrado en estado estacionario. Para llevar a cabo la determinación se empleó la geometría de cono (CP25-2/TG-SN6614) de 2° de ángulo, con el sistema Plato Peltier. Con el flujo oscilatorio se obtuvo información sobre la viscoelasticidad, de la lineal a no lineal, a través de las amplitudes de corte oscilatorio pequeña (SAOS) y larga (LAOS) y los modelos constitutivos dinámicos de Maxwell, Jeffreys y Giesekus, así como sus respectivas curvas maestras.

- **Región de viscoelasticidad lineal (LVE)**

Las propiedades viscoelásticas de la incrustación dentro de la región viscoelástica lineal (LVE) fueron estudiadas. Fueron llevados a cabo barridos de amplitud y barridos de frecuencia bajo los parámetros mostrados en la Tabla 2.3. Los barridos oscilatorios se efectuaron a una temperatura de 25° C.

Tabla 2.3 Parámetros utilizados en pruebas oscilatorias de LVE.

| Parámetro | Barrido de amplitud | Barrido de frecuencia |
|---------------------------|---------------------|-----------------------|
| Amplitud γ [%] | 0.1-1000 | 10 |
| Frecuencia ω [1/s] | 10 | 0.1-100 |

La región LVE puede ser considerada como una medida de fuerza de gel. En la prueba de amplitud, los geles más fuertes presentan una región LVE de mayor extensión en comparación

con los geles débiles (Naji-Tabasi y Razavi, 2016). A través de los barridos fueron obtenidos valores de G' y G'' . El módulo de almacenamiento (G') y el módulo de pérdida (G'') son ambas funciones de la frecuencia: G' puede ser interpretada como el componente de tensión en fase con respecto a la deformación (comportamiento elástico), G'' puede ser interpretada como el componente de tensión 90° fuera de fase con respecto a la deformación (comportamiento viscoso). El software Rheoplus/32 V2.81 fue empleado para analizar los resultados obtenidos.

- **Región de viscoelasticidad no lineal**

Fueron estudiadas las propiedades viscoelásticas de la incrustación dentro de la región viscoelástica no lineal. El análisis en corte oscilatorio de amplitud larga (LAOS) es considerado una de las metodologías más prometedoras para investigar el comportamiento de materiales complejos. Con el análisis de resultados en LAOS se pretende adquirir un mejor entendimiento del comportamiento del material: información que puede ser útil para predecir el comportamiento del material sometido a un estímulo diferente a LAOS. Altos valores de amplitudes de deformación simulan condiciones de procesos industriales (Thompson *et al.*, 2015; Ptaszek, 2014).

Con el propósito de determinar las propiedades viscoelásticas en LAOS fueron llevados a cabo barridos de amplitud y barridos de frecuencia en altos valores de amplitud. Los parámetros utilizados en las mediciones se muestran en la Tabla 2.4. El software Rheoplus/32 V3.64 fue empleado para analizar los resultados obtenidos.

Tabla 2.4 Parámetros utilizados en pruebas LAOS.

| Parámetro | Barrido de amplitud | Barrido de frecuencia | | |
|---------------------------|---------------------|-----------------------|---------|---------|
| Amplitud γ [%] | 0.0001-1000 | 10 | 100 | 1000 |
| Frecuencia ω [1/s] | 10 | 0.1-100 | 0.1-100 | 0.1-100 |

2.2.2.3 Energía de activación

El efecto de la temperatura sobre la viscosidad aparente fue estudiado mediante la obtención de la energía de activación (E_a). E_a representa la barrera de energía que debe ser superada antes de que el proceso de flujo elemental pueda ocurrir (Astolfi-Filho *et al.*, 2011). Altos valores de E_a indican un cambio más rápido en viscosidad con respecto a la temperatura (Steffe, 1996). La energía de activación fue calculada solamente para el mosto muerto, esto debido a que éste es el material que sufre un mayor cambio de temperatura y entra a la primera columna de destilación. La energía de activación fue calculada utilizando el modelo de Arrhenius, el cual correlaciona la viscosidad aparente (η_a) con la temperatura. Muestras de mosto muerto fueron analizadas a una velocidad de corte de 500 s^{-1} en un rango de temperatura de 20 a 90° C . Se utilizó la geometría ST22-4V-40 para las pruebas.

$$\eta_a = \eta_o \cdot e^{\frac{E_a}{RT}} \quad \text{Ec. (1)}$$

La ecuación resultante fue evaluada mediante análisis de regresión lineal obteniéndose el coeficiente de determinación (R^2). El equipo empleado y las geometrías utilizadas para llevar a cabo los análisis reológicos son mostrados en la Figura 2.2.



Figura 2.2 Reómetro y geometrías utilizadas.

2.2.3 Caracterización microbiológica

Leuconostoc mesenteroides es conocida por producir dextrana a partir del azúcar de caña (Abraham *et al.*, 2016; Gibriel *et al.*, 2014; Khalikova *et al.*, 2005; Zarour *et al.*, 2017). Con el objetivo de conocer la posible presencia de microorganismos formadores de dextrana, fue necesaria la caracterización microbiológica de las muestras obtenidas: melaza, mosto fresco y mosto muerto. Se buscó identificar la bacteria láctica *Leuconostoc mesenteroides*. Esto con la finalidad de conocer si existe algún incremento adicional de dextrana con respecto al que trae consigo desde el proceso anterior. Además de esto, estos microorganismos son consumidores de sacarosa, la cual es materia prima en la producción de bioetanol. Para lograr lo anterior, fueron debidamente etiquetados y esterilizados contenedores de vidrio, los cuales fueron llevados a la industria para la toma de muestras. Inmediatamente después de haber obtenido las muestras, estas fueron transportadas al laboratorio y fueron llevados a cabo los análisis microbiológicos.

2.2.3.1 Dilución en serie

Se realizaron las correspondientes diluciones en serie de cada una de las muestras (Figura 2.3). Agua peptonada al 0.1 % (p/v), previamente esterilizada, fue utilizada para realizar dichas diluciones (Madigan *et al.*, 2004).

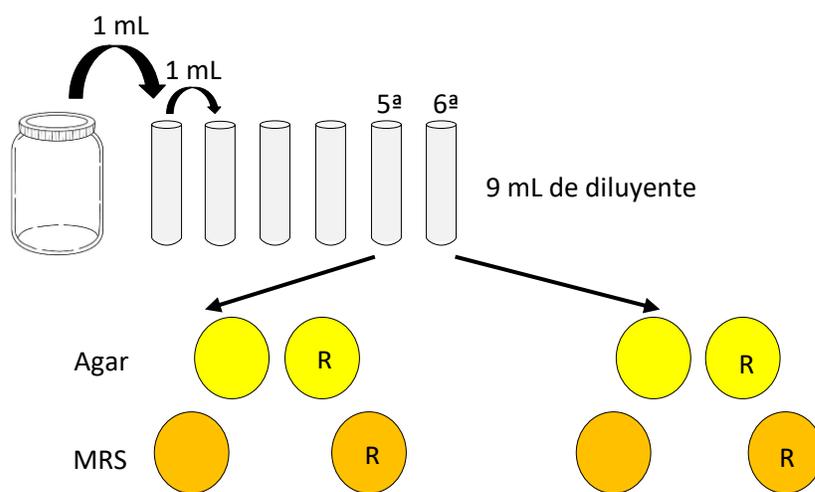


Figura 2.3 Dilución en serie y extensión en placa de muestra.

Para evitar contaminaciones de otros microorganismos, las puntas de pipeta automática y tubos de ensayo utilizados fueron previamente esterilizados utilizando una autoclave.

2.2.3.2 Preparación de medios de cultivo y siembra

Previo a la toma de muestras, se prepararon, esterilizaron y solidificaron diferentes medios de cultivo: Agar Nutritivo para el crecimiento de las bacterias mesofílicas (dentro de las cuales se encuentra *Leuconostoc mesenteroides*), Agar MRS para el crecimiento de bacterias lácticas productoras de exopolisacáridos y medio MSE (Mayeux, Sandine and Elliker), específico para crecimiento del microorganismo y producción de goma.

- **Agar Natural**

De la quinta y sexta dilución se tomaron por duplicado alícuotas de 0.1 mL y se sembraron por extensión en la superficie del agar nutritivo solidificado. Se incubaron las placas invertidas a 37° C por 48 horas, posteriormente se realizó el recuento microbiano (Duarte *et al.*, 1982).

- **Agar Man Rogosa Sharpe (MRS)**

De la quinta y sexta dilución se tomaron por duplicado alícuotas de 0.1 mL y se sembraron por extensión en la superficie del agar MRS adicionado con 20% de sacarosa previamente solidificado. Se incubaron las placas invertidas a 37° C por 48 horas, posteriormente se realizó el recuento microbiano (Cerutti *et al.*, 2000).

- **Agar MSE**

El medio específico para el crecimiento de *L. mesenteroides* se preparó de la siguiente forma: se disolvieron peptona 10 g, extracto de levadura 5g, sacarosa 100g, citrato de sodio 1 g,

glucosa 5 g, gelatina 2.5 g, y agar 15 g en un litro de agua destilada. Posteriormente, el medio se sometió a calentamiento hasta hervir durante aproximadamente 2 minutos y se procedió a esterilizar por calor húmedo en autoclave. Finalmente, se sirvió en cajas de Petri y se solidificó a temperatura ambiente (Cuervo *et al.*, 2010). El aislamiento de las posibles bacterias lácticas presentes se realizó utilizando el método de siembra en superficie por estrías a partir de colonias desarrolladas en medio MRS que mostraban características típicas mostradas por *L. mesenteroides*.

2.2.3.3 Recuento y pruebas microbianas específicas

Se hizo un recuento de las colonias formadas en cada uno de los medios de cultivo. A las colonias formadas se les realizó una caracterización macroscópica (color, forma, aspecto), caracterización microscópica (morfología celular, agrupación, movilidad) y pruebas microbianas específicas que incluían la coloración de Gram, coloración de cápsula y formación de dextrana.

2.2.3.4 Tinción Gram

En general las bacterias se examinan mejor en estado de fijación, y se observan mejor si están coloreados. La coloración de Gram se encuentra entre las más importantes para las bacterias. Para llevar a cabo la diferenciación en las muestras, se tomó una pequeña muestra de cada colonia formada en los medios de cultivo utilizando un asa esterilizada por incandescencia. Se preparó un extendido delgado del material en estudio sobre un portaobjetos, se dejó secar y se fijó. Posteriormente se bañó el portaobjetos con colorante violeta cristal, el cual se dejó por 10 segundos. Se procedió a enjuagar el colorante con la solución de yodo de Gram y dejar el mordiente por 10 segundos. Se enjuagó adecuadamente con agua destilada. Para decolorar se utilizó una solución de alcohol-cetona, con la cual se enjuagó hasta que el solvente apareció incoloro. Finalmente, se contracoloró con safranina durante 10 segundos y se lavó con agua

destilada. Se dejó secar entre dos pliegos de papel y se examinó bajo el microscopio utilizando el objetivo 100X (Figura 2.4) (Rocha-Pimentel, 1994).



Figura 2.4 Tinción de Gram.

2.2.3.5 Coloración de capsula

La cápsula de las bacterias no tiene la misma afinidad por los colorantes que otros componentes de la célula (membrana, flagelos, etc.), y por eso exige el empleo de métodos de coloración especiales. Algunos están destinados a colorear la célula y el fondo, pero no la cápsula, de manera que la envoltura se aprecia por contraste, como lo es el método de Anthony. Este se llevó a cabo preparando un extendido fino y uniforme de las colonias que crecieron en el Agar MSE. La muestra recogida con el asa se mezcló con una cantidad igual de leche desnatada, extendiéndola con ayuda de otro portaobjetos en ángulo recto. Se secó al aire sin fijar con calor. Posteriormente se coloreó con solución de violeta cristal al 1% durante dos minutos. Finalmente se lavó con una solución de sulfato de cobre al 20%. Se dejó secar al aire en posición vertical y se examinó bajo el microscopio utilizando el objetivo 100X (Rocha-Pimentel, 1994).

2.3 Identificación y cuantificación de Dextrana

Se determinó por medios cualitativos la naturaleza del material incrustante en las columnas de destilación. Para tal motivo se tomaron muestras tanto de mosto muerto como de incrustación. La hipótesis formulada argumenta la existencia de dextrana como el material incrustante en las columnas. Se utilizaron técnicas específicas para determinar Dextrana, como la NORMA MEXICANA NMX-F-476-SCFI-2011 y la AOAC Official Method 988.12, como también mediante un equipo de cromatografía líquida de alta rendimiento (HPLC por sus siglas en inglés).

Uno de los principales problemas en la determinación y cuantificación de dextrana es la interferencia del color. Las técnicas utilizadas actualmente no son confiables en cuanto a resultados de muestras complejas como lo son el mosto muerto y la incrustación, debido al color que presentan, ya que éste interfiere en gran manera en la determinación. Con el fin de adecuar las técnicas empleadas para la determinación y cuantificación de dextrana se recurrió a métodos de clarificación que no comprometieran la cantidad de dextrana presente en la muestra. Para la clarificación de muestras de mosto muerto se llevaron a cabo tres metodologías utilizadas en la clarificación de jugos azucarados (NMX-F-267-1991; Godoy-Durán, 2013):

- **Clarificación con subacetato de plomo ($\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot \text{Pb}(\text{OH})_2$)**

Se realizó una adaptación de la norma mexicana NMX-F-267-1991 Industria Azucarera- Muestras De Jugo De Caña De Azúcar Sacarosa Clerget - Método De Prueba. Esta prueba flocula la sacarosa presente en la muestra, para lo cual utiliza dos vías: la polarización directa, donde se utiliza una solución 3.96 N de cloruro de sodio (NaCl) y la polarización invertida, donde se utiliza una solución 6.34 N de ácido clorhídrico (HCl). Esta metodología se basa en el hecho de que el color presente en las melaza y mostos es en parte debido a la presencia de sacarosa, que se ve afectada por reacciones de Maillard. En dicha reacción se producen melanoidinas coloreadas, que van desde un color amarillo claro hasta café oscuro e incluso negro.

- **Clarificación con OCTAPOL**

Para este método se realizaron diferentes dosificaciones hasta encontrar la que proporcionara mejores resultados con respecto a la remoción de color, ya que no existe una cantidad específica de OCTAPOL a agregar para meladuras.

- **Clarificación con cloruro de aluminio (AlCl₃)**

Esta metodología está basada en la floculación de los sólidos suspendidos que pudiesen representar impurezas en los mostos y generen color o turbidez. La cantidad de cloruro de aluminio varía de acuerdo a las características del mosto, al igual que la cantidad de hidróxido de calcio. Estas cantidades se determinan mediante pruebas de dosificación hasta encontrar la mejor combinación que dé resultados satisfactorios. El tiempo de reposo es variable, pero entre más prolongado sea, mayor cantidad de flóculos habrá y la clarificación será mejor.

Con el propósito de conocer la técnica más adecuada para la clarificación de muestras complejas sin comprometer dextrana, se llevó a cabo un diseño experimental de 3 factores y 3 niveles: siendo el tipo de clarificante (subacetato de plomo, OCTAPOL y cloruro de aluminio), tiempo de agitación (10, 20 y 30 min) y tiempo de reposo (15, 30 y 45 min) los factores a analizar (Tabla 2.5). La variable de respuesta fue el color removido, el cual fue evaluado mediante un colorímetro HunterLab (Figura 2.5). La elección de la metodología de clarificación más adecuada se realizó teniendo en consideración la cantidad de Dextrana contenida en las muestras antes y después de la clarificación.

Tabla 2.5 Diseño experimental para clarificación.

| Factor | Niveles del factor | | |
|----------------------------|--------------------|---------|---------------|
| | Bajo | Medio | Alto |
| A: Clarificante | Subacetato de Pb | OCTAPOL | Cloruro de Al |
| B: Tiempo agitación | 10 | 20 | 30 |
| C: Tiempo reposo | 15 | 30 | 45 |

La confiabilidad fue evaluada mediante el análisis estadístico ANOVA con un término de significancia $\alpha = 0.050$.



Figura 2.5 Colorímetro HunterLab.

2.4 Desarrollo y evaluación de alternativas de solución a nivel laboratorio

Una vez que la hipótesis que establecía presencia de Dextrana en las muestras fue confirmada, se desarrollaron a nivel laboratorio, dos alternativas para dar solución al problema de incrustación. Una de las alternativas que se propuso fue la recuperación de dextranas, esto mediante la relación entre la constante de disociación de un grupo y el pH del medio (punto isoeléctrico). La segunda alternativa fue la eliminación selectiva utilizando dextranasa como enzima catalizadora. A continuación, se describe la metodología empleada en cada una de éstas alternativas.

2.4.1 Recuperación de Dextrana vía punto isoeléctrico

Mediante experimentación a nivel laboratorio se buscó encontrar el punto isoeléctrico de la Dextrana contenida en las muestras proporcionadas por la empresa (mosto fresco y mosto muerto). Lo anterior con el propósito de recuperar la Dextrana presente en las muestras, considerando el pH al cual precipitó. Previo a esta determinación, se buscó el punto

isoeléctrico en soluciones estándar de Dextrana al 1 y 6 % (m/v). Para ello se preparó una solución ácida de HCl 0.1 N y una solución base de NaOH 0.1 N, con las cuales se realizaron curvas de titulación, manteniendo agitación constante y variando pH para lograr la precipitación de Dextrana.

2.4.2 Eliminación de Dextrana vía enzimática

La Dextrana es un polímero química y físicamente complejo; su degradación es llevada a cabo por una variedad de endo- y exodextranasas (Zohra *et al.*, 2015). Las dextransas son producidas por varios microorganismos, pero la dextransa fúngica ha atraído mucha atención debido a su mayor actividad enzimática (Bashari *et al.*, 2013). Para llevar a cabo la degradación de Dextrana presente en las muestras, se utilizó la enzima correspondiente para su desnaturalización, siendo ésta Dextransa. La enzima comercial empleada es de origen fungal (Dextranfree de la marca ENMEX), la cual se diluyó con agua a una relación 1:5 (dilución recomendada por el fabricante).

La eficiencia de las dextransas en la industria depende del pH, Brix, temperatura, tiempo de retención, agitación, concentración de Dextrana y dosis empleada (Eggleston *et al.*, 2011; Ninchan *et al.*, 2017). Con el propósito de conocer los factores significativos para la obtención de mejores resultados se llevó a cabo un diseño experimental de tres factores con dos niveles (2^3), donde el sustrato (mosto fresco y mosto muerto), relación sustrato-enzima (1:10 y 1:100) y temperatura (25 y 40° C) fueron los factores a analizar (Tabla 2.6). El diseño se realizó aleatoriamente y con réplica, siendo el contenido de dextrana la variable de respuesta.

Los experimentos se llevaron a cabo manteniendo constante el tiempo de reacción (2 horas) y la agitación (167 rpm). Posteriormente, la cinética enzimática de los mejores resultados (en términos de viscosidad y reducción del contenido de Dextrana) se mantuvo durante un tiempo total de 5 horas.

Tabla 2.6 Diseño experimental para eliminación enzimática.

| Factor | Niveles del factor | |
|-----------------------------|--------------------|--------------|
| | Bajo | Alto |
| A: Sustrato | Mosto Fresco | Mosto Muerto |
| B: [Enzima-Sustrato] | 1:10 | 1:100 |
| C: Temperatura | 25° C | 40° C |

2.5 Seguimiento reológico de alternativas a nivel laboratorio

Durante la evaluación de alternativas de solución a nivel laboratorio, tanto de la eliminación como de recuperación de gomas, se llevó a cabo un seguimiento reológico para la determinación de parámetros reológicos estacionarios importantes. El comportamiento observado se ajustó a los modelos constitutivos correspondientes y se determinó el índice de determinación (R^2).

2.6 Optimización de hidrólisis enzimática de Dextrana

A partir del estudio de escrutinio llevado a cabo, en el cual se determinaron los factores significativos sobre la hidrólisis enzimática, se estudiaron los efectos de la relación enzima-sustrato, temperatura de proceso y tiempo sobre la reducción de Dextrana presente en el mosto fermentado obtenido de la empresa. Esto se llevó a cabo mediante la metodología de superficie de respuesta.

2.6.1 Metodología de superficie de respuesta (MSR)

La metodología de superficie de respuesta (MSR) es una estrategia experimental y de modelación que permite encontrar condiciones de operación óptima de un proceso (Gutiérrez-Pulido y De la Vara-Salazar, 2008). La MSR se utiliza con frecuencia para refinar los modelos después de haber determinado los factores importantes utilizando diseños de cribado o

diseños factoriales, especialmente si se sospecha que existe curvatura en la superficie de respuesta (MINITAB, 2017).

Un diseño de superficie de respuesta es un conjunto de técnicas avanzadas de diseño de experimentos (DOE) que le ayudan a entender mejor y optimizar la respuesta. El propósito inicial de estas técnicas es diseñar un experimento que proporcione valores razonables de la variable respuesta y, a continuación, determinar el modelo matemático que mejor se ajusta a los datos obtenidos. El objetivo final es establecer los valores de los factores que optimizan el valor de la variable respuesta (MINITAB, 2018).

2.6.1.1 Diseño central compuesto (DCC)

Dentro de la MSR se encuentran los diseños centrales compuestos (DCC). Los DCC son un diseño factorial o factorial fraccionado con puntos centrales, ampliado con un grupo de puntos axiales (también denominados puntos de estrella) que permiten estimar la curvatura. Los diseños centrales compuestos son especialmente útiles en los experimentos secuenciales, porque frecuentemente permiten ampliar experimentos factoriales anteriores al agregar puntos axiales y centrales (MINITAB, 2018).

Un diseño experimental, para ajustar un modelo de segundo orden, debe tener por lo menos tres niveles de cada factor. Existen muchos diseños que podrían emplearse para ajustar un modelo de segundo orden, así que elegir un diseño apropiado es útil con objeto de establecer un criterio de diseño. El diseño compuesto central es probablemente el diseño experimental más utilizado para ajustar superficies de respuesta de segundo orden (Montgomery, 1991).

Con el propósito de obtener los mejores resultados de degradación, se utilizó una variante del diseño experimental central compuesto (CCD): diseño central compuesto con centros en las caras. En este diseño los puntos estrella o axiales se localizan en los centros de las caras del cubo (Figura 2.6).

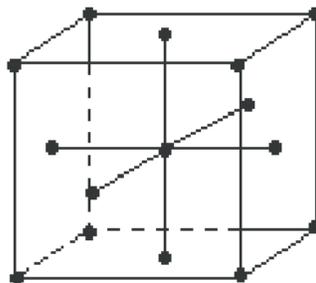


Figura 2.6 Diseño central compuesto con centros en las caras para 3 factores.

Esta variante se emplea cuando se requieren solo 3 niveles de cada factor y en la práctica a menudo es difícil modificarlos (Montgomery, 1991). Esta modalidad de diseño requiere de 3 niveles de cada factor (MINITAB, 2018).

La hidrólisis enzimática de dextrana contenida en las muestras de mosto fermentado se llevó a cabo utilizando la enzima correspondiente para su desnaturalización, siendo ésta dextranasa. La enzima comercial que se empleó es de origen fúngal (Dextranfree de la marca ENMEX), la cual se diluyó con agua destilada a una relación 1:5 (dilución recomendada por el fabricante). Se tomaron en cuenta 3 factores con 3 niveles cada uno, siendo estos los siguientes: temperatura (30, 35 y 40 °C), relación enzima-sustrato (1:250, 1:750 y 1:1250 mL) y tiempo (3, 4 y 5 h). La experimentación se realizó aleatoriamente y con réplica, siendo la degradación de Dextrana (%) la variable de respuesta. Los experimentos se llevaron a cabo manteniendo la agitación constante de 200 rpm.

En la Tabla 2.7 se muestran los quince tratamientos llevados a cabo, combinando los diferentes factores y niveles utilizados en el diseño experimental utilizado, diseño central compuesto con centros en las caras.

Tabla 2.7 Tratamientos, factores y niveles utilizados en diseño experimental.

| Tratamientos. | Variables codificadas | | | Variables naturales | | |
|---------------|-----------------------|------|-----|---------------------|--------|-----|
| | [°C] | [mL] | [h] | [°C] | [mL] | [h] |
| 1 | -1 | -1 | -1 | 30 | 1:250 | 3 |
| 2 | -1 | 1 | -1 | 30 | 1:1250 | 3 |
| 3 | -1 | 1 | 1 | 30 | 1:1250 | 5 |
| 4 | -1 | -1 | 1 | 30 | 1:250 | 5 |
| 5 | 1 | -1 | -1 | 35 | 1:250 | 3 |
| 6 | 1 | 1 | -1 | 35 | 1:1250 | 3 |
| 7 | 1 | 1 | 1 | 35 | 1:1250 | 5 |
| 8 | 1 | -1 | 1 | 35 | 1:250 | 5 |
| 9 | 0 | 0 | -1 | 40 | 1:750 | 3 |
| 10 | 0 | 0 | 1 | 40 | 1:750 | 5 |
| 11 | 0 | -1 | 0 | 40 | 1:250 | 4 |
| 12 | 0 | 1 | 0 | 40 | 1:1250 | 4 |
| 13 | -1 | 0 | 0 | 30 | 1:750 | 4 |
| 14 | 1 | 0 | 0 | 40 | 1:750 | 4 |
| 15 | 0 | 0 | 0 | 35 | 1:750 | 4 |

2.6.2 Análisis estadístico

Dado que la medición de la actividad enzimática de una enzima hidrolizadora de dextrana en ocasiones puede ser difícil debido a la gran variabilidad de los sustratos disponibles y porque el producto de reacción es una mezcla indefinida de polímeros de azúcar, puede ser usado un amplio espectro de métodos (Khalikova *et al.*, 2005). Para el estudio presente, el contenido de Dextrana fue determinado mediante la técnica AOAC 988.12. Los resultados fueron analizados estadísticamente mediante el uso del software NCSS 2007 y MINITAB 2018. La correlación entre las variables independientes (temperatura, relación y tiempo) y la variable dependiente

(% de degradación) fue expresada en función de los términos de un polinomio de segundo orden, como la ecuación 2 lo muestra:

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i X_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i=1}^k \sum_{<j=1}^k \beta_{ij} X_i X_j + \varepsilon \quad \text{Ec. (2)}$$

Donde Y se refiere a la variable de respuesta, β_0 es el coeficiente constante, β_i , β_{ii} y β_{ij} son los coeficientes de interacción, lineales y cuadráticos respectivamente y X_i son las variables estudiadas.

A partir del modelo obtenido de los efectos de los factores sobre la reducción de Dextrana presente en el mosto fermentado se obtuvieron gráficos de contornos y de superficie de respuesta mediante el software MINITAB 2018. Los gráficos obtenidos fueron analizados e interpretados para la obtención de conclusiones.

2.7 Seguimiento reológico en optimización de hidrólisis enzimática de Dextrana

Para la determinación de comportamientos y parámetros reológicos estacionarios y dinámicos (SAOS Y LAOS) importantes, se llevó a cabo un seguimiento reológico durante el desarrollo del diseño experimental de optimización de hidrólisis enzimática de Dextrana (Tabla 2.8). Los análisis se llevaron a cabo utilizando una geometría de paletas (Vane) ST22-4V-40, con control de temperatura mediante plato Peltier, esto tomando en cuenta las condiciones de temperatura a las que se llevó a cabo cada tratamiento en particular. Posteriormente se obtuvieron los modelos constitutivos correspondientes, así como sus respectivas curvas maestras. Los análisis se llevaron a cabo en un reómetro Anton Paar modelo Physica MCR301 utilizando el software Rheoplus/32 en la versión V2.81 y V3.64 para la captura y análisis de datos.

Tabla 2.8 Condiciones para pruebas en estado estacionario y dinámico.

| Parámetro | Estacionario | SAOS | | LAOS | |
|--|---------------------------------|--------------|-------------|-------------|-------------|
| | | Barr. Ampl. | Barr. Frec. | Barr. Ampl. | Barr. Frec. |
| Vel. de corte $\dot{\gamma}$ [s^{-1}] | $0 \leq \dot{\gamma} \leq 10^3$ | - | - | - | - |
| Amplitud γ [%] | - | 0.00001-1000 | 1 | 0.1-1000 | 10 y 100 |
| Frecuencia ω [rad/s] | - | 10 | 0.01-100 | 10 | 0.01-100 |

2.8 Validación de alternativas a nivel piloto

Para poder llevar a cabo la validación de las alternativas de solución antes propuestas, se evaluaron diferentes medios e infraestructura, siendo explorados las siguientes vías:

2.8.1 Empleo de infraestructura ya existente

Se llevó a cabo la búsqueda pertinente del equipo apropiado para llevar a cabo la validación de las alternativas a nivel piloto. Para esto, se indagó en los laboratorios del Instituto Tecnológico de Orizaba en busca de columnas de destilación apropiadas para realizar destilaciones utilizando mosto proveniente de la empresa y mosto tratado. Las columnas tienen que cumplir con ciertos criterios para poder utilizarse: similitud con respecto a la columna ubicada en la industria (A100), ser de acero inoxidable, entre otros.

2.8.2 Disminución de escala de columna industrial a nivel piloto

Para realizar la disminución de escala de la columna A100 fue necesario obtener los siguientes datos: altura de la columna, diámetro de la columna, número de platos, diámetro de los platos, espesor de los platos, distancia existente entre cada plato, barreno del plato, tipo de calota, altura del tubo que soporta la calota, tamaño de calota, número de ranuras presentes en la calota, distancia entre las calotas, distancia que existe entre las calotas y la pared de la

columna, distancia existente entre las calotas y el vertedero, tamaño del bajante, altura del vertedero, distribución de las calotas, número de pasos, plato de alimentación, arreglo de la alimentación, diámetros de tuberías, tipo de válvulas que tiene el proceso, alimentación del mosto y del vapor, eficiencia de la columna de destilación, tiempo de residencia del mosto en cada plato, porcentaje de aguardiente obtenido, cantidad de salida del mosto, temperatura de la olla inferior, temperatura de alimentación del mosto, temperatura de la tapa superior, temperatura del reboiler, densidad del mosto, viscosidad del mosto y grados Brix del mosto. Una vez obtenidos esos datos, se procedió a realizar un escalamiento por similitud.

2.8.2.1 Diseño de la columna de destilación

Una vez concretadas las mejoras en el proceso de destilación, es decir la eliminación y/o recuperación de gomas en los mostos, se realizaron los cálculos pertinentes para la disminución de escala, “*scale down*”, de la columna. Lo anterior, conservando los *criterios de similitud geométrica, cinemática y dinámica* de la columna de destilación A100 (columna mostera) ubicada en la empresa Tenerife Alimentos Especiales S.A de C.V. Se realizó el diseño de la columna utilizando el software SolidWorks 2016, que es un programa de diseño mecánico en 3D.

2.9 Análisis preliminar de costos a nivel industrial

Mediante herramientas de análisis de ingeniería económica se llevó a cabo un análisis preliminar de costos a nivel industrial de las alternativas estudiadas, esto con el fin de tener sentadas las bases para la toma de decisiones dentro de la empresa. Cabe mencionar que no es posible realizar el estudio en su totalidad ya que falta obtener resultados de hidrólisis enzimática y disminución de incrustación a escala piloto, lo cual se resolverá en algún estudio posterior a este. Se entregará un reporte a la empresa en cuestión donde se describirán las alternativas de mejora, así como el análisis preliminar de costos.

CAPÍTULO 3

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Muestras obtenidas

En el transcurso del presente proyecto, las muestras necesarias fueron proporcionadas por la empresa Tenerife Alimentos Especiales S.A. de C.V., dentro del Grupo Báltico, que se encuentra ubicada en Autopista Veracruz – México Km. 271 S/N, Orizaba, Veracruz, México. Las muestras de melaza, mostos y bioetanol impuro fueron posibles de obtener en cualquier momento del año, no así con las de incrustación. Para poder obtener muestras de incrustación se acudió a la empresa en tiempo de “paro de producción”. Este periodo de tiempo es utilizado para el desmonte y limpieza de las columnas de destilación, principalmente la columna A100 o “mostera”. Esta es la columna que presenta mayor problema de incrustación, pues es la primera en la que el mosto muerto o fermentado entra para ser separado del etanol por medio de calor. En la Figura 3.1 se presentan las muestras de melaza, mostos, bioetanol impuro e incrustación que fueron proporcionadas por la empresa. En la Figura 3.2 se muestra una placa de incrustación formada dentro de la primera columna de destilación. Las muestras se obtuvieron y almacenaron en recipientes opacos, limpios y debidamente etiquetados. Se almacenaron a 4° C para su preservación (NMX-AA-003-1980).



Figura 3.1 Muestras obtenidas de la empresa.



Figura 3.2 Placa de incrustación problema.

A simple inspección, la melaza presenta alta viscosidad y resistencia a fluir. La incrustación, presenta características semisólidas y gran cantidad de sólidos de gran tamaño en su composición. Cabe mencionar que la melaza, mostos e incrustación presentan color café oscuro. En la Figura 3.2 podemos observar parte de la placa de incrustación problema formada dentro de la primera columna de destilación. Estas placas se endurecen y engrosan debido a las temperaturas alcanzadas dentro de la columna. El problema dentro de la columna de destilación es mayor en el área de calotas, que son los primeros 6 platos que la conforman.

3.2 Caracterización de muestras

Se llevó a cabo la caracterización fisicoquímica, reológica y microbiológica en cada una de las muestras obtenidas. Éstas se realizaron a diferentes tiempos, de acuerdo a los tiempos de producción y paro de la empresa. Los diferentes análisis realizados se llevaron a cabo en los laboratorios y con los equipos mencionados en el Capítulo 2. Las pruebas se realizaron por duplicado.

3.2.1 Caracterización fisicoquímica

La caracterización fisicoquímica fue realizada con el propósito de conocer la composición de cada una de las muestras, ya que ésta es muy variable. En la Tabla 3.1 se presentan los valores

obtenidos de los parámetros determinados.

Tabla 3.1 Parámetros determinados para caracterización fisicoquímica.

| Parámetros de caracterización | Melaza | Mosto fresco | Mosto muerto | Bioetanol impuro | Incrustación |
|-------------------------------|----------|--------------|--------------|------------------|--------------|
| pH [-] | 5.54 | 5.18 | 5.17 | 4.63 | 5.02 |
| Densidad [g/cm ³] | 1.3516 | 1.0329 | 1.0297 | 0.9013 | 1.2913 |
| Viscosidad [Pa s] | 2.145 | 0.0264 | 0.0195 | 0.0041 | 0.5345 |
| SST [g/L] | 68.86 | 9.13 | 7.66 | 0.152 | 43.37 |
| SSV [g/L] | 59.38 | 5.99 | 4.87 | 0 | 9.44 |
| DQO _t [g/L] | 1133.145 | 114.72 | 114.32 | NA | 485.758 |
| DQO _s [g/L] | 885.056 | 101.03 | 107.39 | NA | 137.42 |
| Proteínas [%] | 3.6763 | 1.0818 | 1.0454 | NA | 0.1977 |
| Humedad [%] | 2.85 | 76.6 | 91.39 | NA | 39.94 |
| Azúcares Red. [g/L] | 220.545 | 46.7742 | 26.4846 | NA | NL |
| Parámetro de color | | | | | |
| L | 5.11 | 0.96 | 1.18 | 21.73 | 12.03 |
| a | 1.71 | 0.35 | 0.63 | - 0.52 | 1.16 |
| b | 1.96 | - 0.10 | - 0.39 | - 3.29 | 1.03 |

De los resultados obtenidos se puede observar lo siguiente: las muestras presentan pH ácido, en un intervalo que va desde 4.63 a 5.54, lo cual fue propicio en la posterior eliminación vía enzimática. Con respecto a la densidad, se observó un decremento de ésta (1.0329 de mosto fresco a 1.0297 g/cm³ de mosto muerto), que junto al valor de Sólidos Suspendedos Totales (SS_T) (9.13 a 7.66 g/L) y valor de azúcares reductores (46.7742 a 26.4846 g/L), refleja la transformación de sólidos (azúcares) a bioetanol durante el proceso de fermentación.

Con respecto a la viscosidad, ésta también decrece al diluir la melaza a mosto fresco (2.145 a 0.0264 Pa s) y después de la fermentación (0.0264 a 0.0195 Pa s) indicando decremento en

sólidos presentes en las muestras. La viscosidad presentada por la incrustación es alta (0.5345 Pa s) considerando su consistencia lodosa a 25° C de temperatura. Se observó también que la incrustación presenta un contenido elevado de SS_T (43.37 g/L) y de Demanda Química de Oxígeno Total (DQO_t) (485.758 g/L) confirmando su alto contenido de material orgánico. La incrustación presentó un 39.94% de contenido de humedad. El bioetanol impuro mostró un valor de 0.152 g/L de SS_T , esto debido a los sólidos disueltos que aún se encuentran en su seno, ya que éste necesita todavía de rectificación.

3.2.2 Caracterización reológica

La caracterización reológica se llevó a cabo tomando en cuenta las condiciones de temperatura dentro del proceso llevado a cabo en la industria. Para ello se realizaron corridas en flujo estacionario y flujo dinámico en un reómetro Anton Paar modelo Physica MCR301 utilizando el software Rheoplus/32 V2.81 para captura y análisis de datos.

3.2.2.1 Flujo en estado estacionario

Las curvas de flujo rotacional (reogramas) de las diferentes muestras a 25° C son mostradas en las Figura 3.3 y Figura 3.4.

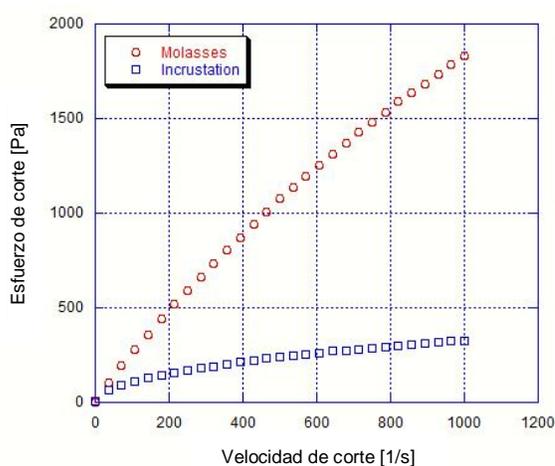


Figura 3.3 Comportamiento de melaza e incrustación a 25 °C.

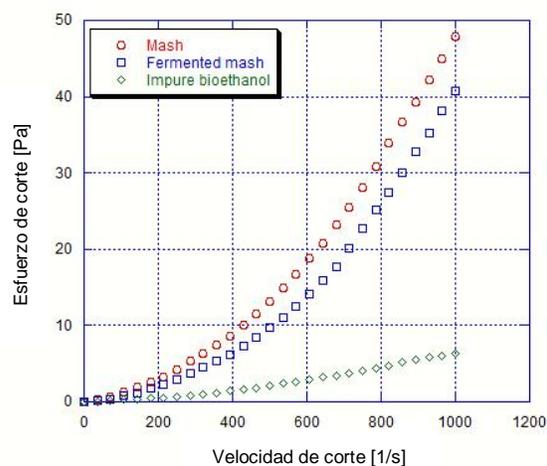


Figura 3.4 Comportamiento de mostos y bioetanol impuro a 25 °C.

- **Melaza**

La melaza a 25°C no presentó proporcionalidad directa entre esfuerzo de corte y la velocidad de corte, significando un comportamiento no Newtoniano. La melaza mostró comportamiento pseudoplástico (shear thinning) ($n < 1$) y sus curvas de flujo se ajustaron adecuadamente ($R^2 = 0.9975$) al modelo de Ostwald-de Waele, mejor conocido como el modelo de Ley Potencia (1).

$$\sigma = K \dot{\gamma}^n \quad \text{Ec. (1)}$$

Dónde σ es el esfuerzo de corte (Pa), K es el índice de consistencia (Pa s^n), $\dot{\gamma}$ es la velocidad de corte (s^{-1}), y n es el índice de comportamiento de flujo (adimensional). El valor de la viscosidad fue de 2.145 Pa s a 25°C, el valor de K 4.999 Pa s^n , y el valor de n 0.863. Este resultado concuerda con los reportados en la literatura (Hasan y Nurhan, 2004; Karaman y Kayacier, 2011; Kaur y Kaler, 2008; Kaur *et al.*, 2002).

La melaza a 35°C presentó comportamiento Newtoniano ($n = 1$), en este caso, η es una constante de proporcionalidad entre el esfuerzo de corte aplicado al fluido y la correspondiente velocidad de corte. Sus curvas de flujo fueron ajustadas adecuadamente ($R^2 = 0.9882$) al modelo Newtoniano (2).

$$\sigma = \eta \dot{\gamma} \quad \text{Ec. (2)}$$

El comportamiento pseudoplástico decrece con el aumento de temperatura tendiendo hacia Newtoniano (Kaur y Kaler, 2008). Así, es inferido que el índice de comportamiento de flujo incrementa y las propiedades de flujo de corte adelgazantes se vuelven más débiles con el incremento de temperatura. El valor de la viscosidad fue de 0.904 Pa s a 35°C y la viscosidad cinemática ($\eta_{\dot{\gamma}}$) fue de 9.0429 cm^2/s .

La viscosidad aparente de la melaza decrece con el incremento de la temperatura y, en el caso de 25°C, decrece con el aumento de la velocidad de corte también, confirmando el comportamiento adelgazante (Figura 3.5).

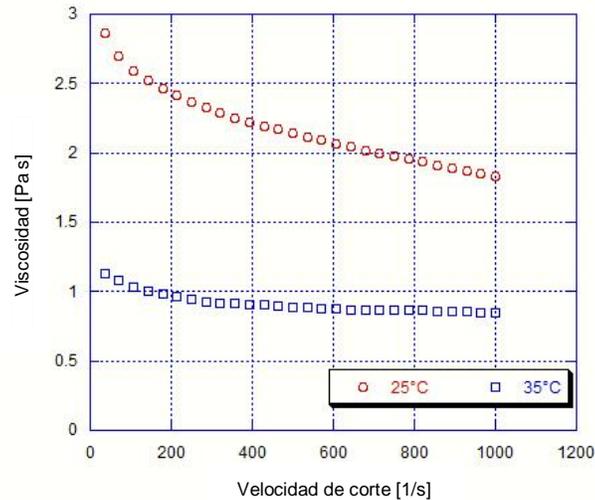


Figura 3.5 Viscosidad aparente de melaza a 25°C y 35°C.

El decremento en la viscosidad aparente con el incremento de velocidad de corte sugiere que el incremento progresivo de la velocidad de corte desenmaraña los arreglos de moléculas de cadena larga y ayuda a vencer la resistencia intermolecular a fluir (Hasan y Nurhan, 2004). Queda claro que las melazas son, reológicamente, altamente afectadas por los cambios en la temperatura y velocidad de corte. El comportamiento de flujo (y sus propiedades reológicas) y la viscosidad son afectadas también. Esto sugiere un mejor manejo de las melazas a mayores temperaturas en la industria y menor resistencia a fluir cuando se trata de tuberías: fluidos con alta viscosidad presentan cierta resistencia a fluir y fluidos con menor viscosidad fluyen más fácilmente.

El comportamiento reológico de las melazas es relevante debido a que provee información acerca de sus propiedades físicas y ayuda en la comprensión de los mecanismos subyacentes de momento y transferencia de calor (Kaur *et al.*, 2002).

- **Mosto fresco**

El mosto fresco a 25° C presentó un comportamiento no Newtoniano. Su índice de comportamiento de flujo mayor a uno ($n > 1$) confirmó su dilatancia (shear thickening), y sus curvas de flujo mostraron un adecuado ajuste ($R^2 = 0.9950$) al modelo de Herschel-Bulkley (3).

$$\sigma = \sigma_0 + K \dot{\gamma}^n \quad \text{Ec. (3)}$$

Donde σ_0 denota el esfuerzo de corte inicial (Pa), el cual se considera como un indicador del valor específico del esfuerzo ejercido en el mosto cuando éste empieza a fluir (Liu *et al.*, 2016). El valor de la viscosidad fue de 0.0263 Pa s a 25°C, el valor de σ_0 0.115 Pa, el valor de K 3.136×10^{-4} Pa sⁿ, y el valor de n 1.719. El comportamiento de corte espesante mostrado por el mosto fresco es debido a su contenido de sólidos suspendidos, lo cual es confirmado por el esfuerzo de corte inicial y el índice de consistencia presentados.

La viscosidad en esta etapa es de gran importancia, esto debido a que se necesita que sea ideal para la fermentación mediante levaduras. Para poder llevar a cabo la función de fermentación, los microorganismos (*Saccharomyces cerevisiae*) necesitan tener condiciones adecuadas de pH, temperatura, viscosidad, nutrientes, agua entre otros (Cantú-Lozano, 1987).

La alta concentración de azúcares de la melaza afecta el proceso de osmosis dentro de la membrana celular. El rango óptimo de concentración de azúcar es de 10 a 18%, ya que a concentraciones de 22% la levadura empieza a tener problemas en su proceso de respiración celular (Ríos *et al.*, 2005). También las melazas son altamente viscosas y su manipulación es difícil en estas condiciones. Por lo tanto, es necesaria la dilución de melazas agregando agua hasta obtener 20° Brix aproximadamente, correspondiendo esto con la viscosidad obtenida en los parámetros reológicos.

- **Mosto muerto (fermentado)**

El mosto fermentado a 25°C se presentó como fluido dilatante (comportamiento de corte espesante) mostrando un comportamiento de flujo mayor a uno ($n > 1$). El modelo de Herschel-Bulkley describió ($R^2 = 0.9860$) la relación esfuerzo de corte-velocidad de corte presentada (3).

El valor de viscosidad obtenido fue 0.0194 Pa s a 25°C, el valor de σ_0 0.072 Pa, el valor de K 1.326×10^{-4} Pa sⁿ, y el valor de n 1.815.

El mosto fermentado a 90°C se comportó como fluido dilatante también, mostrando un índice de flujo mayor a uno ($n > 1$), y presentando esfuerzo de corte inicial, pero mostrando una variación en sus parámetros en comparación con el mosto fermentado a 25°C. El comportamiento se ajustó al modelo Herschel-Bulkley ($R^2 = 0.9900$).

El valor de la viscosidad fue de 0.0127 Pa s a 90°C, el valor de σ_0 0.072 Pa, el valor de K 5.633×10^{-5} Pa sⁿ, y el valor de n 1.882.

Se observó que, la viscosidad aparente del mosto fresco a 25°C (0.0263 Pa s) disminuyó con el proceso de fermentación, terminando con un valor de viscosidad aparente de 0.0194 Pa s del mosto fermentado. Los valores de σ_0 de 0.115 Pa y K de 3.136×10^{-4} Pa sⁿ del mosto fresco disminuyeron a valores de σ_0 de 0.072 Pa y K de 1.326×10^{-4} Pa sⁿ del mosto fermentado. El índice de comportamiento de flujo (n) aumentó de 1.719 a 1.815 significando un incremento en la fluidez del mosto. Esto confirma el decremento en la concentración de sólidos debido a la producción de etanol a partir de sacarosa. En otras palabras, el contenido de azúcar disminuye mientras que el contenido de etanol aumenta, mostrando el efecto reológico correspondiente en los parámetros obtenidos. De esta manera, la interacción entre partículas disminuye.

Este mosto fermentado va a la primera columna de destilación donde la temperatura se eleva a un promedio de 90°C. En esta etapa K tiene un valor de $5.633 \times 10^{-5} \text{ Pa s}^n$, la viscosidad aparente disminuye a 0.0127 Pa s , y n incrementa a 1.882 debido al efecto de temperatura. Esto se relaciona con una incidencia más libre de la interacción molécula- molécula a elevadas temperaturas. La viscosidad de un líquido es una función de las fuerzas intermoleculares que restringen el movimiento molecular. Estas fuerzas dependen del distanciamiento intermolecular el cual determina el volumen libre, y son afectadas por cambios en la temperatura. A mayores temperaturas, la energía térmica de la molécula incrementa con el aumento de las distancias intermoleculares, causando así una reducción en las fuerzas intermoleculares y, en consecuencia, la viscosidad disminuye (Hasan y Nurhan, 2004).

Como se describe en la Figura 3.6, la viscosidad aparente incrementa con el incremento de velocidad de corte, confirmando el comportamiento espesante de la muestra. Esto es evidente en la pared interna de la columna cuando el etanol es evaporado y el lodo es formado e incrustado en ella.

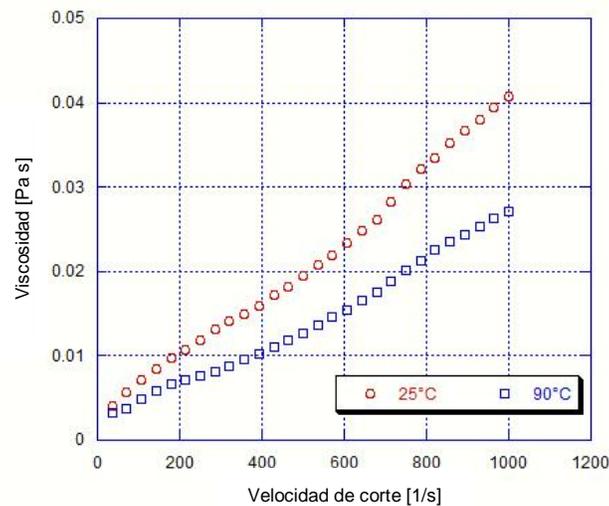


Figura 3.6 Viscosidad aparente de mosto fermentado a 25°C y 90°C.

- **Incrustación en columna de destilación**

La incrustación formada en la pared interna de la primera columna de destilación (columna mostera) exhibió un fuerte comportamiento pseudoplástico, esto de acuerdo al índice de comportamiento de flujo mostrado menor a uno ($n < 1$). Debido a la presencia de esfuerzo de corte inicial, el modelo de Herschel-Bulkley (3) fue utilizado, teniendo buena precisión en los datos experimentales ($R^2 = 0.9375$).

El valor de viscosidad obtenido fue de 0.534 Pa s a 25°C, el valor de σ_0 3.021 Pa, el valor de K 27.591 Pa sⁿ, y el valor de n 0.377.

Se infiere que, este fuerte comportamiento pseudoplástico y alto valor de K presentados, son debidos al alto contenido de goma Dextrana en el material e indican una fuerte resistencia a fluir. K es un indicador de la naturaleza viscosa del sistema: mayores valores de K indican una naturaleza más viscosa y disminución en fluidez. El esfuerzo requerido para deformar la incrustación (σ_0) fue alto, debido al alto contenido de sólidos, especialmente Dextrana. La viscosidad de las melazas y consecutivamente sus transformaciones, varía con la naturaleza y cantidad de materiales no azúcares presentes en ellos. Las características poliméricas de adhesividad de la Dextrana, afinidad química al material de construcción de las columnas, altos pesos moleculares y niveles altos de concentración propician la incrustación dentro de la columna de destilación. Este comportamiento de la Dextrana es mostrado a 25°C cuando aún se presenta como material tipo gel, pero cuando está bajo condiciones de mayor temperatura (90-100°C) la dureza de la incrustación es incluso peor, considerándose en ocasiones como sólido. Este es la mayor problemática en la industria debido a todo lo que implica la limpieza de las columnas.

El efecto de la Dextrana sobre la viscosidad ha sido estudiado y se ha encontrado que, incrementa con el aumento en peso molecular, y disminuye con el incremento en ramificación.

La formación de Dextrana origina no solo pérdidas de azúcar, si no también causa problemas de proceso (Kaur y Kaler, 2008).

Reológicamente, fue demostrado que la Dextrana es un serio problema dentro del proceso de producción de bioetanol, minimizando su potencial de producción. Es necesario encontrar una solución para el incremento de viscosidad causado por el contenido de Dextrana, con el fin de mejorar la eficiencia en el proceso de producción de bioetanol.

- **Bioetanol impuro**

El bioetanol impuro a 25°C desempeñó un comportamiento dilatante (Figura 3.7), mostrando un índice de flujo mayor a uno ($n > 1$). El modelo de Herschel-Bulkley (3) fue apropiado para el ajuste de las curvas de flujo ($R^2 = 0.9990$).

Su valor de viscosidad fue de 0.004 Pa s a 25°C, el valor de σ_0 0.116 Pa, el valor de K 3.915×10^{-5} Pa sⁿ, y el valor de n 1.741.

El bioetanol impuro a 90°C mostró comportamiento Newtoniano ($n = 1$); el modelo Newtoniano (2) fue adecuado para describir su comportamiento de flujo ($R^2 = 0.9765$).

El valor de su viscosidad fue de 0.001 Pa s a 90°C, y la viscosidad cinemática ($\eta_{\dot{\gamma}}$) fue de 0.01385 cm²/s.

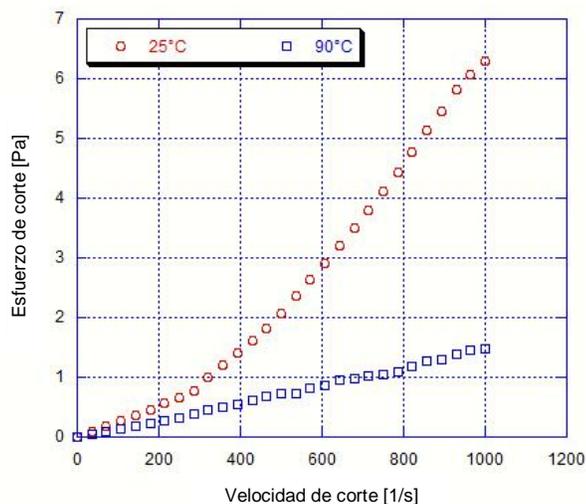


Figura 3.7 Comportamiento del bioetanol impuro a 25°C y 90°C.

El comportamiento reológico y los parámetros del bioetanol fueron afectados por la temperatura (Figura 3.7), cuando ésta es mayor el comportamiento de flujo tiende a Newtoniano y la viscosidad disminuye.

El bioetanol impuro sale de la primera columna de destilación a alta temperatura, y este no presenta esfuerzo de corte inicial (σ_0), significando que impurezas están aún solubilizadas en él. Se infiere que, como bioetanol impuro, aún cuenta con sólidos solubilizados, además de otros compuestos químicos líquidos. Aún necesita la rectificación pertinente.

Todos los casos de estudio demostraron confianza satisfactoria ($95\% < \theta < 99\%$), como se muestra en la Tabla 3.2.

Tabla 3.2 Modelos experimentales y validación.

| Muestra | Temperatura [°C] | Modelo experimental | "t" Prob | "t"* | R ² |
|------------------|------------------|--|-------------------------|--------|----------------|
| Melaza | 25 | $\sigma = 4.999 \dot{\gamma}^{0.863}$ | $<1.000 \times 10^{-4}$ | 9.278 | 0.997 |
| | 35 | $\sigma = 0.904 \dot{\gamma}$ | $<1.000 \times 10^{-4}$ | 7.736 | 0.988 |
| Mosto Fresco | 25 | $\sigma = 0.115 + 3.136 \times 10^{-4} \dot{\gamma}^{1.719}$ | 1.155×10^{-4} | 4.477 | 0.995 |
| Mosto fermentado | 25 | $\sigma = 0.072 + 1.326 \times 10^{-4} \dot{\gamma}^{1.815}$ | 1.330×10^{-4} | 4.425 | 0.986 |
| | 90 | $\sigma = 0.072 + 5.633 \times 10^{-5} \dot{\gamma}^{1.882}$ | 4.833×10^{-1} | 0.710 | 0.990 |
| Incrustación | 25 | $\sigma = 3.022 + 27.591 \dot{\gamma}^{0.377}$ | $<1.000 \times 10^{-4}$ | 12.880 | 0.937 |
| Bioetanol impuro | 25 | $\sigma = 0.116 + 3.915 \times 10^{-5} \dot{\gamma}^{1.741}$ | 9.020×10^{-1} | 0.125 | 0.999 |
| | 90 | $\sigma = 0.001 \dot{\gamma}$ | 2.662×10^{-4} | 4.170 | 0.976 |

"t" = Prueba Student, * 28 grados de libertad. El software KaleidaGraph fue utilizado para el análisis de datos.

3.2.2.2 Flujo en estado dinámico

El análisis reológico y determinación de parámetros en estado dinámico se llevó a cabo en la muestra de incrustación solamente debido al comportamiento pseudoplástico mostrado en estado estacionario.

- **Región de viscoelasticidad lineal (LVE)**

Las propiedades viscoelásticas de la incrustación dentro de la región viscoelástica lineal (LVE) fueron estudiadas mediante barridos de amplitud y barridos de frecuencia. La región LVE puede ser considerada como una medida de fuerza de gel. Los resultados de las pruebas oscilatorias para la muestra de incrustación son mostrados en la Figura 3.8 y Figura 3.9.

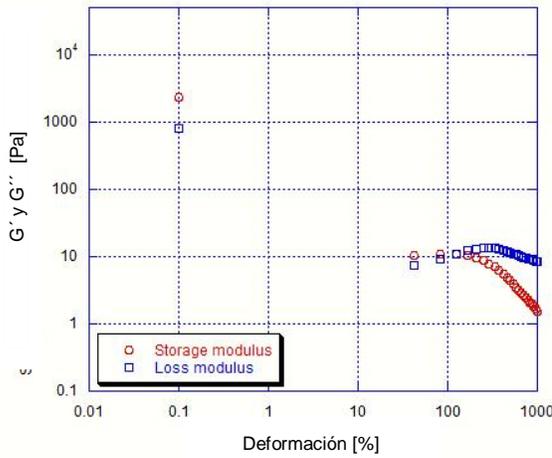


Figura 3.8 Barrido de amplitud de muestra de incrustación a 25°C.

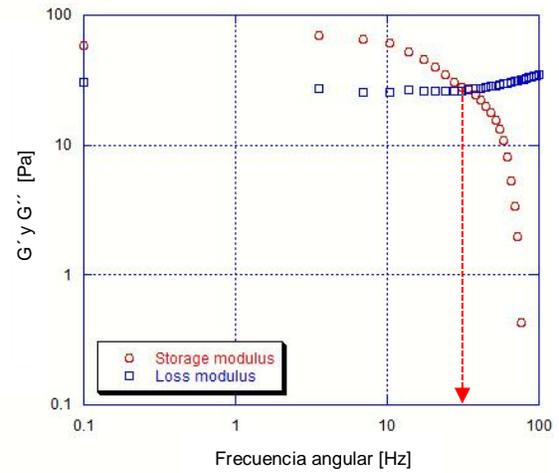


Figura 3.9 Barrido de frecuencia de muestra de incrustación a 25°C.

Las propiedades viscoelásticas de la muestra de incrustación en la región viscoelástica lineal fueron analizadas de acuerdo a la prueba de barrido de frecuencia. El módulo de almacenamiento (G') resultó mayor que el módulo de pérdida (G'') antes del punto de cruce, indicando un comportamiento elástico (estructura tipo sólido) a pequeñas frecuencias y comportamiento viscoso (estructura tipo líquido) después del punto de cruce. Este comportamiento refleja interacciones intermoleculares altas y enmarañamientos antes del punto de cruce. Al incrementar la frecuencia aplicada, los enmarañamientos y ligaduras empezaron a romperse y la estructura se volvió más tipo líquido. El valor mayor del módulo de almacenamiento confirma el alto contenido de Dextrana en el material de incrustación y es posible concluir que la Dextrana juega el papel principal en el comportamiento elástico de la incrustación.

El software Rheoplus/32 V2.81 fue empleado para analizar los resultados de las pruebas de barrido de frecuencia. Es importante resaltar el punto de flujo, donde $G' = G''$ (26.925 Pa), el cual tiene un valor de 38 1/s. A partir del valor del punto de cruce de las curvas G' y G'' se puede obtener el inverso ($1/\lambda_1$) del tiempo de relajación de Giesekus, el cual corresponde a 0.026 s (Rogers y Lettinga, 2012). Este es el tiempo requerido por el material para regresar a

su estado original. La frecuencia del cruce de $\frac{1}{\lambda_1} = 1 \text{ rad} \cdot \text{s}^{-1}$ está indicada en el espectro de relajación lineal como una línea discontinua vertical (Figura 3.9).

Se infiere que el comportamiento viscoelástico fue obtenido de la goma Dextrana contenida en la incrustación, además de una gran cantidad de sólidos. Esto confirma el comportamiento adelgazante (comportamiento pseudoplástico) en los experimentos en estado estacionario. Cuanto mayor sea el contenido de sólidos, más fuertes serán las fuerzas coloidales y la fuerza de la red (Liu *et al.*, 2016).

- **Región de viscoelasticidad no lineal**

Fueron estudiadas las propiedades viscoelásticas de la incrustación dentro de la región viscoelástica no lineal mediante barridos de amplitud y barridos de frecuencia. El software Rheoplus/32 V3.64 fue empleado para analizar los resultados obtenidos.

El flujo de corte oscilatorio de amplitud larga (LAOS) es en la actualidad considerado una de las metodologías más prometedoras para investigar el comportamiento de materiales complejos. Los experimentos en LAOS buscan probar el material en el régimen viscoelástico no lineal. Ya que una amplia variedad de procesos industriales involucra grandes deformaciones, el entender cómo se comportan los materiales complejos bajo estas condiciones es fundamental para propósitos de optimización y diseño.

Como pruebas preliminares se realizaron barridos de amplitud de 0.0001 a 1000 % para encontrar la región viscoelástica no lineal (Figura 3.10).

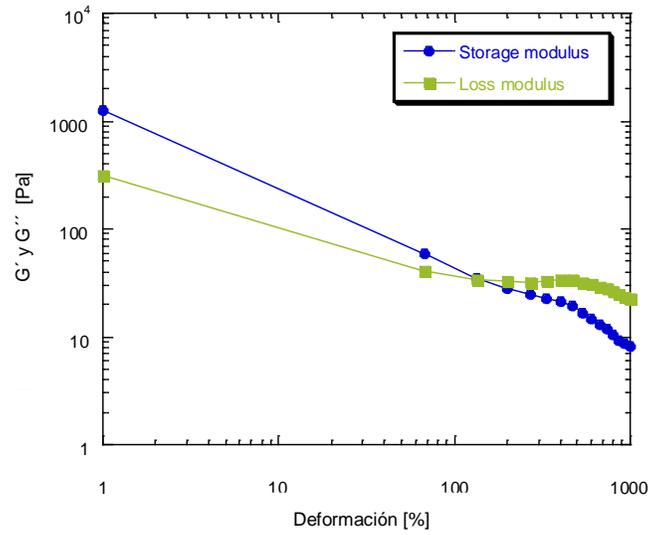


Figura 3.10 Barrido de amplitud LAOS.

Posteriormente se realizó un barrido de frecuencia dentro de la región no lineal, obteniéndose el siguiente reograma (Figura 3.11).

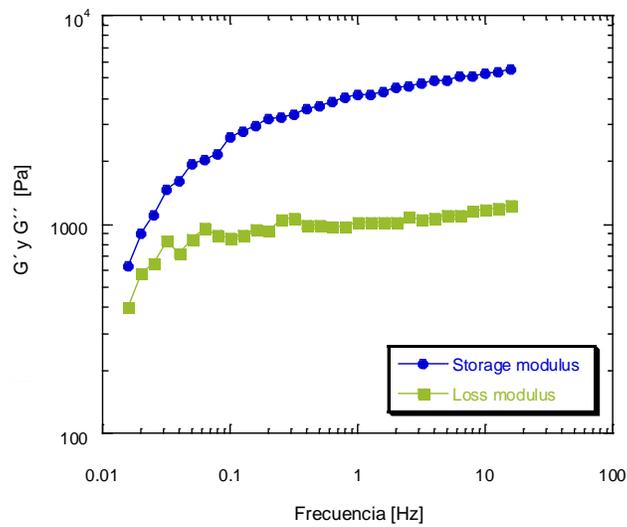


Figura 3.11 Barrido de frecuencia.

A partir de los datos obtenidos, se extrajeron datos puntuales de respuesta de onda a diferente frecuencia angular (a 1% de amplitud) y se representaron mediante las figuras de Lissajous-Bowditch (Figura 3.12 - 3.16).

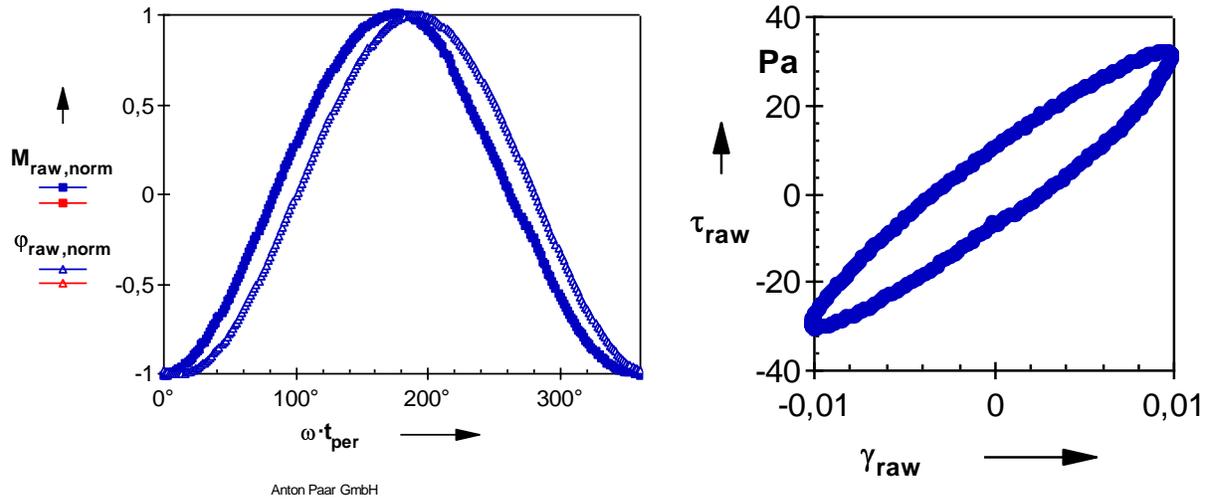


Figura 3.12 Respuesta de onda resultante a una frecuencia de 1 rad/s.

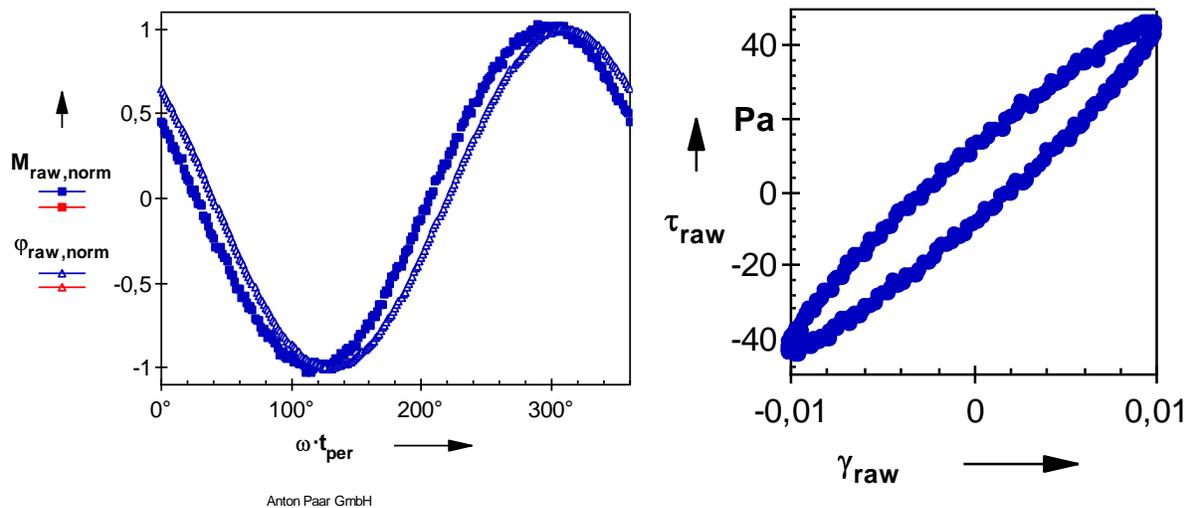


Figura 3.13 Respuesta de onda resultante a una frecuencia de 10 rad/s.

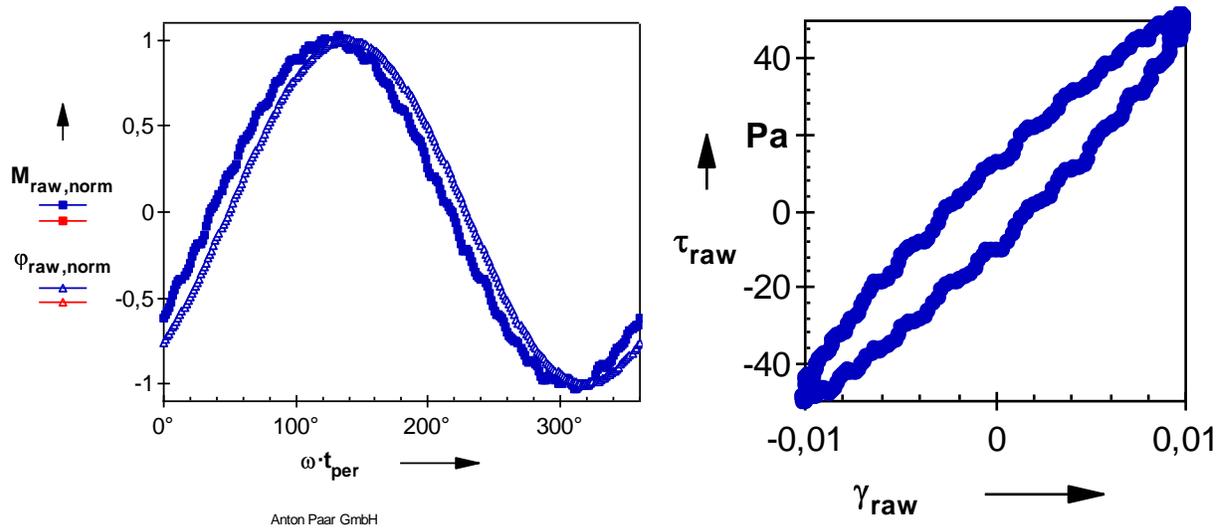


Figura 3.14 Respuesta de onda resultante a una frecuencia de 25.12 rad/s.

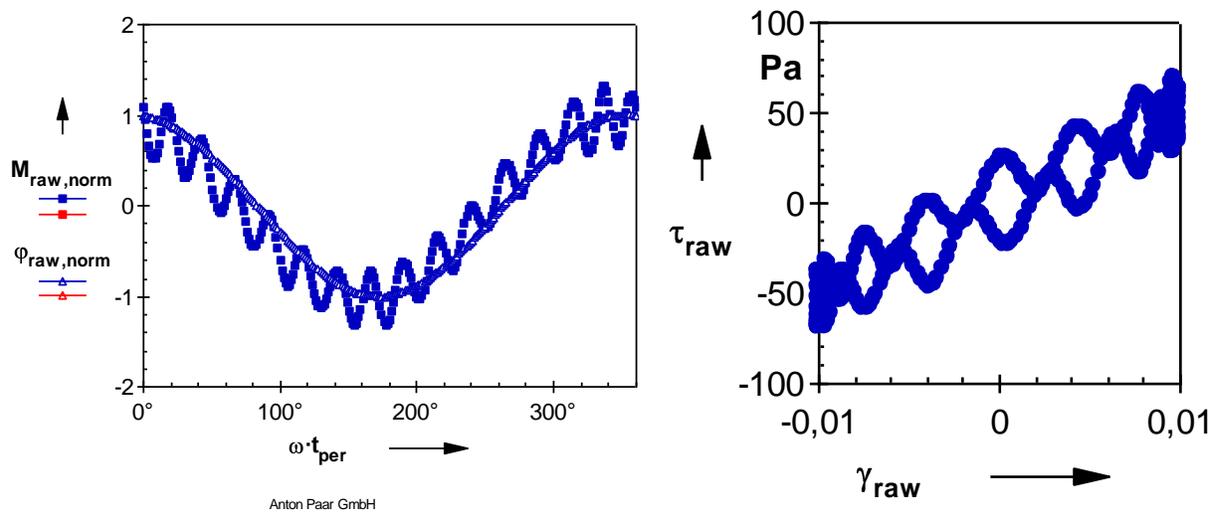


Figura 3.15 Respuesta de onda resultante a una frecuencia de 50.12 rad/s.

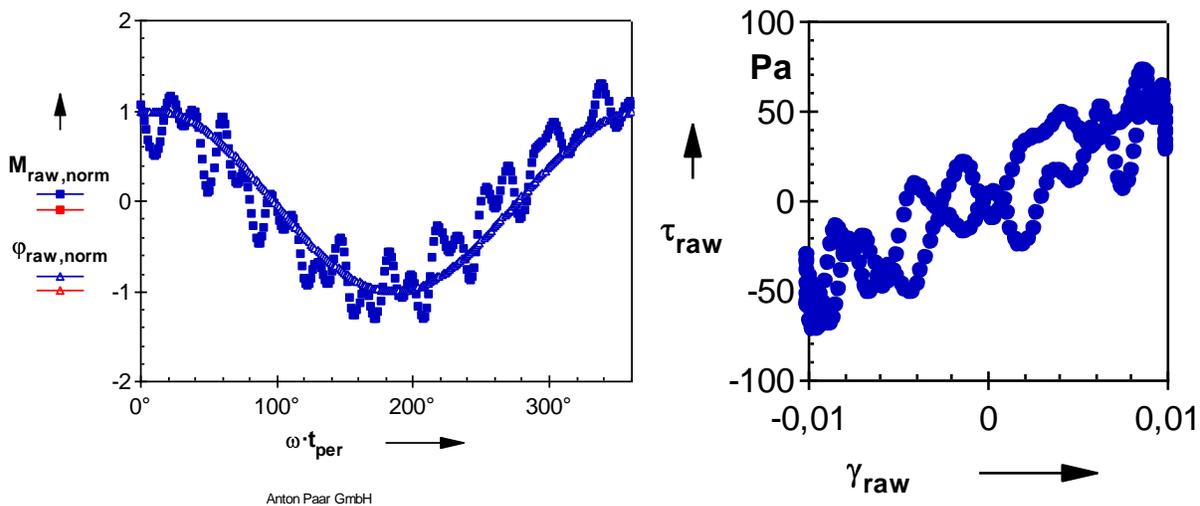


Figura 3.16 Respuesta de onda resultante a una frecuencia de 79.43 rad/s.

Las curvas de Lissajous-Bowditch son un método gráfico para investigar la respuesta no lineal, donde es estudiado el esfuerzo contra la deformación. El comportamiento no lineal del material puede ser identificado a partir de la forma de la curva Lissajous-Bowditch (Khandavalli *et al.*, 2016). El grado de no linealidad puede ser inferido por el grado de “no elipticidad” de las orbitas. Las curvas de Lissajous-Bowditch obtenidas a una deformación de 1 % muestran una forma elíptica apenas distorsionada, lo cual se concluye como un comportamiento viscoelástico no lineal cercano a la transición con la viscoelasticidad en régimen lineal.

3.2.2.3 Energía de activación

La viscosidad aparente del mosto muerto (fermentado) fue expresada en función de la temperatura absoluta a una velocidad de corte constante de 500 s^{-1} , utilizando un modelo tipo Arrhenius (4). Los parámetros resultantes son indicados en la siguiente ecuación:

$$\eta_{ap} = 0.0218 [Pa\ s] e^{\frac{1547.3609 \left[\frac{cal}{gmol} \right]}{1.9872 \left[\frac{cal}{gmol\ K} \right] T}} \quad \text{Ec. (4)}$$

Fue observado un valor pequeño de energía de activación presentado por el mosto fermentado. La energía de activación E_a calculada fue de 1547.3609 cal/g mol. Cuanto mayor sea el valor de la energía de activación, mayor será el efecto de la temperatura sobre la propiedad considerada (Astolfi-Filho *et al.*, 2011).

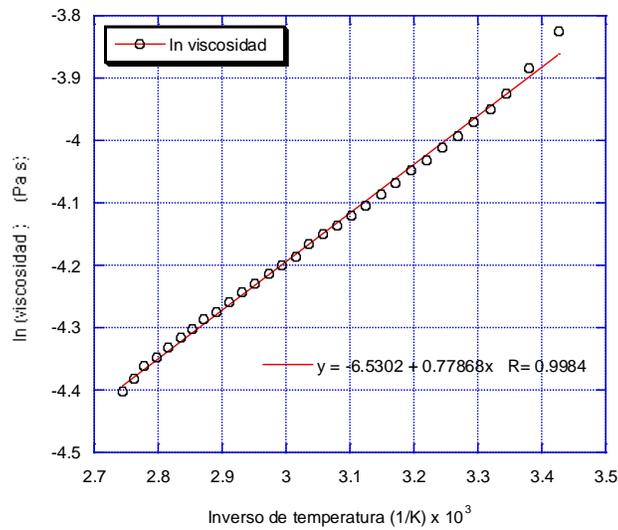


Figura 3.17 Correlación entre la viscosidad aparente y el inverso de la temperatura absoluta para obtener los parámetros de Arrhenius.

En la Figura 3.17 se muestra la gráfica obtenida, observándose un coeficiente de determinación de 0.9984 para la línea de tendencia.

3.2.3 Caracterización microbiológica

Con el objetivo de conocer la presencia de la bacteria láctica *Leuconostoc mesenteroides* en el proceso llevado a cabo en la industria, fue necesario el análisis microbiológico de las muestras obtenidas.

Después de haber obtenido las muestras en la industria, estas fueron debidamente almacenadas y transportadas al laboratorio donde se procedió a su dilución y análisis inmediato.

En la primera caracterización microbiológica realizada se obtuvieron resultados negativos con respecto a la existencia de *Leuconostoc mesenteroides* (bacteria láctica formadora de Dextrana) en la melaza, mosto fresco y mosto muerto. La Tabla 3.3 presenta los resultados de las pruebas bioquímicas.

Tabla 3.3 Pruebas bioquímicas de muestras.

| Prueba bioquímica | Caja MM 5 | Caja MM 6 R | Caja MF 6 |
|--------------------------------------|---|--|---|
| Características macroscópicas | Colonia redonda, pequeña color crema. Apariencia húmeda. Borde regular. | Colonia redonda, pequeña, color banco. Apariencia húmeda. Aspecto cóncavo. | Colonias redondas, pequeñas, color crema. Apariencia húmeda. Borde regular. |
| Morfología celular | cb | c | c |
| Coloración de Gram | - | + | - |
| Agrupación | k | k | k |
| Movilidad | - | - | - |
| Formación Dextrana | - | - | - |
| Crecimiento en: | | | |
| Agar Nutritivo | + | + | + |
| Mayeux | - | + | + |

Las cajas Petri fueron etiquetadas de acuerdo al nombre de la muestra: M (melaza), MF (mosto fresco) y MM (mosto muerto); y a la dilución utilizada para hacer la siembra: 5 (5ª dilución) y 6 (6ª dilución). La réplica del experimento es representada por "R". En cuanto a la morfología, los coco bacilos son representados por "cb" y los cocos son representados por "c". La agrupación en cadena es representada con "k".

El microorganismo *Leuconostoc mesenteroides* es una bacteria Gram positiva, quimiorganotrófica y aerobia facultativa. Su morfología es principalmente esférica y se encuentran en pares o cadenas de cocos. La especie mesenteroides produce glucosiltransferasas extracelulares, las cuales sintetizan Dextrana y polímeros afines por división de la sacarosa y por transferencia del grupo glucosídico a la cadena inicial de polímero, liberando fructosa como subproducto de la síntesis (Rodríguez y Hanssen, 2007).

Solo en tres cajas Petri hubo crecimiento de colonias, siendo estas las cajas MM 5, MM 6 R y MF 6. A partir de las colonias que crecieron en el agar Nutritivo se tomaron asadas de material para sembrarlo por estriado en las cajas de medio MSE (Mayeux, Sandine and Elliker). Después del tiempo de incubación, se observó crecimiento de colonias en la superficie del medio, pero no se observó formación de goma (Dextrana) en ningún caso.

De la información obtenida mediante el crecimiento de colonias y las pruebas bioquímicas realizadas se pudo concluir que, no se encuentra la bacteria láctica investigada en las muestras analizadas.

Se concluyó que es poco factible la existencia de la bacteria en la melaza, la cual presenta un alto contenido de azúcares. Con respecto al mosto fresco, este acaba de ser diluido, acondicionado e inoculado para su fermentación, por lo que tampoco es factible encontrar la presencia de la bacteria. Y finalmente, el mosto muerto (fermentado) tiene ya contenido alcohólico, inhibiendo a la bacteria.

Por lo anterior se tomó la decisión de cambiar los puntos de muestreo y las diluciones ocupadas para la segunda caracterización microbiológica realizada. En esta segunda ocasión, se cambiaron los puntos de muestreo a las tinas de fermentación 4,5,7 y 10, las cuales representan los tiempos medios de la línea de fermentación. Las diluciones tomadas en esta

ocasión fueron la 4ª y 5ª, utilizando como medios agar natural, agar Man Rogosa Sharpe (MRS) y agar MSE (Mayeux, Sandine and Elliker).

Las Tablas 3.4, 3.5, 3.6 y 3.7 presentan los resultados de las pruebas bioquímicas realizadas.

Tabla 3.4 Pruebas bioquímicas de la tina 4.

| Prueba bioquímica | Medio | Características macroscópicas | Morfología celular | Coloración Gram | Agrupación | Formación Dextrana |
|-------------------|--------|--|--------------------|-----------------|------------|--------------------|
| 4/ 4 dil | AN | Múltiples colonias redondas | cb | - | | |
| | | blancas, borde definido | c | + | | |
| 4/ 4 dil R | AN | Múltiples colonias redondas | cb | - | | |
| | | blancas, borde definido | | | | |
| 4/ 4 dil | MRS | 15 colonias redondas, borde | c | + | k | |
| | | definido, café claro | | | | |
| 4/ 4 dil R | MRS | 23 colonias redondas, borde | cb | + | | |
| | | irregular, café medio | | | | |
| 4/ 4 dil R | MRS | 16 colonias redondas, borde | c | + | k | |
| | | definido, café claro | | | | |
| 4/ 4 dil | Mayeux | 21 colonias redondas, borde | cb | + | | |
| | | irregular, café medio | | | | |
| 4/ 4 dil | Mayeux | 8 colonias redondas, blancas, borde regular, opacas | | | | - |
| 4/ 5 dil | AN | - | | | | |
| 4/ 5 dil R | AN | - | | | | |
| 4/ 5 dil | MRS | 3 colonias redondas, café | c | + | k | |
| | | medio, borde irregular | | | | |
| 4/ 5 dil R | MRS | 1 colonia redonda, borde | c | + | k | |
| | | definido, café claro | | | | |
| 4/ 5 dil R | MRS | 3 colonias redondas, borde | cb | + | | |
| | | irregular, café medio | | | | |
| 4/ 4 dil | Mayeux | 8 colonias redondas, borde regular, blancas | | | | - |

Tabla 3.5 Pruebas bioquímicas de la tina 5.

| Prueba bioquímica | Medio | Características macroscópicas | Morfología celular | Coloración Gram | Agrupación | Formación Dextrana |
|-------------------|--------|---|--------------------|-----------------|------------|--------------------|
| 5/ 4 dil | AN | Múltiples colonias muy pequeñas, blancas | cb | - | | |
| 5/ 4 dil R | AN | Múltiples colonias muy pequeñas, blancas 8 colonias redondas, borde definido, café claro | cb | - | | |
| 5/ 4 dil | MRS | 61 colonias redondas, borde irregular, café medio 23 colonias redondas, borde definido, café claro | c cb | + + | k | |
| 5/ 4 dil R | MRS | Múltiples colonias, borde irregular, café medio 6 colonias redondas, borde irregular, café oscuro | cb c | - + + - | k | |
| 5/ 4 dil | Mayeux | - | | | | - |
| 5/ 5 dil | AN | Crecimiento de hongo | | | | |
| 5/ 5 dil R | AN | 5 colonias muy pequeñas, blancas 4 colonias redondas, borde definido, café claro | cb | - | | |
| 5/ 5 dil | MRS | 3 colonias redondas, café medio, borde irregular 4 colonia redonda, borde definido, café claro | c cb | + + | k | |
| 5/ 5 dil R | MRS | 18 colonias redondas, borde irregular, café medio | c cb | + + | k | |
| 5/ 5 dil | Mayeux | 1 colonia redonda, borde definido, blancas, hongo | | | | - |

Tabla 3.6 Pruebas bioquímicas de la tina 7.

| Prueba bioquímica | Medio | Características macroscópicas | Morfología celular | Coloración Gram | Agrupación | Formación Dextrana |
|-------------------|--------|---|--------------------|-----------------|------------|--------------------|
| 7/ 4 dil | AN | Múltiples colonias redondas blancas, borde definido | cb | - | | |
| 7/ 4 dil R | AN | Múltiples colonias redondas blancas, borde definido | cb | - | | |
| 7/ 4 dil | MRS | - | | | | |
| 7/ 4 dil R | MRS | - | | | | |
| 7/ 4 dil | Mayeux | 7 colonias muy pequeñas, blancas, borde definido, | | | | - |
| 7/ 5 dil | AN | 4 colonias muy pequeñas, blancas, borde definido | cb | - | | |
| 7/ 5 dil R | AN | 9 colonias muy pequeñas, blancas, borde definido | cb | - | | |
| 7/ 5 dil | MRS | - | | | | |
| 7/ 5 dil R | MRS | 1 colonia redonda, borde definido, café claro | c | + | | |
| 7/ 5 dil | Mayeux | 7 colonias muy pequeñas, blancas, | | | | - |

Las cajas Petri fueron etiquetadas de acuerdo al número de tina de donde fueron tomadas: 4, 5, 7 y 10; y a la dilución utilizada para hacer la siembra: 4 (4ª dilución) y 5 (5ª dilución). Quedando especificadas de esta manera: # de tina/dilución utilizada. La réplica del experimento es representada por “R”. En cuanto a la morfología, los coco bacilos son representados por “cb” y los cocos son representados por “c”. La agrupación en cadena es representada con “k”.

Tabla 3.7 Pruebas bioquímicas de la tina 10.

| Prueba bioquímica | Medio | Características macroscópicas | Morfología celular | Coloración Gram | Agrupación | Formación Dextrana |
|-------------------|--------|---|--------------------|-----------------|------------|--------------------|
| 10/ 4 dil | AN | 14 colonias muy pequeñas, blancas, borde definido | cb | - | | |
| 10/ 4 dil R | AN | 23 colonias muy pequeñas, blancas, borde definido | cb | - | | |
| 10/ 4 dil | MRS | 23 colonias redondas, borde definido, café claro | C | + | k | |
| | | 20 colonias redondas, borde irregular, café medio | cb | + | | |
| 10/ 4 dil R | MRS | 14 colonias redondas, borde definido, café claro | C | + | k | |
| | | 21 colonias redondas, borde irregular, café medio | cb | + | | |
| 10/ 4 dil | Mayeux | Crecimiento de hongo | | | | - |
| 10/ 5 dil | AN | 5 colonias muy pequeñas, blancas, borde definido | cb | - | | |
| 10/ 5 dil R | AN | 1 colonia muy pequeña, blanca, borde definido | cb | - | | |
| | | 2 colonias redondas, borde definido, café claro | C | + | k | |
| 10/ 5 dil | MRS | 3 colonias redondas, borde irregular, café medio | cb | + | | |
| 10/ 5 dil R | MRS | 4 colonias redondas, borde irregular, café medio | cb | + | k | |
| 10/ 5 dil | Mayeux | Crecimiento de hongo | | | | - |

Dos de las colonias que presentaron características típicas mostradas por *L. mesenteroides*, se aislaron estriándose en medio MSE (Mayeux, Sandine and Elliker), se cultivaron y diferenciaron mediante Gram, obteniendo los resultados mostrados en la Figura 3.18.

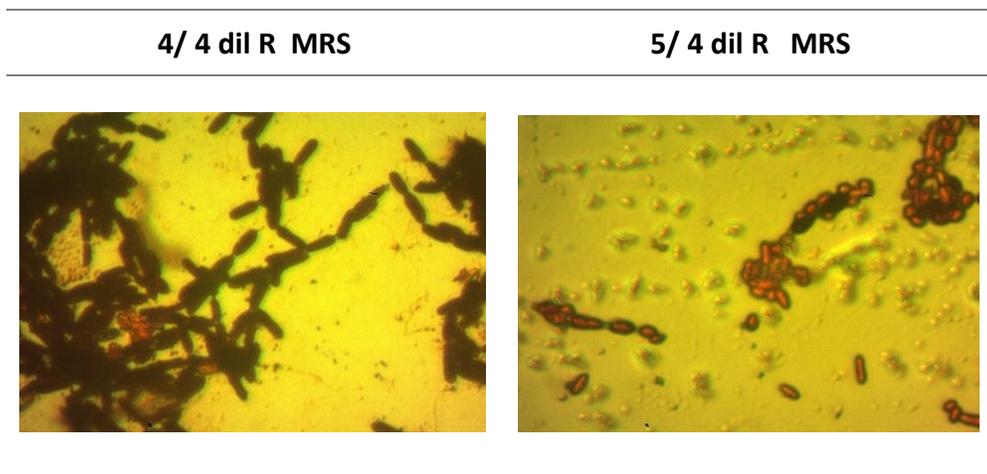


Figura 3.18 Bacterias aisladas en medio MSE.

De estas dos cajas de cultivo, se tomó muestra para hacer la prueba bioquímica de coloración de capsula, dando positivo a una de ellas, la caja 4/ 4 dil R MRS. Una característica típica de *L. mesenteroides* es que posee capsula que rodea la bacteria.

Se concluye que, si existe, aunque en mínima cantidad la bacteria láctica *Leuconostoc mesenteroides* en el mosto en fermentación, aumentando así la cantidad de Dextrana proveniente del proceso anterior y coadyuvando al problema de incrustación.

3.3 Identificación y cuantificación de Dextrana

Para llevar a cabo la identificación y cuantificación de Dextrana presente en las muestras de mosto muerto e incrustación se utilizaron técnicas específicas como la NORMA MEXICANA NMX-F-476-SCFI-2011 y la AOAC Official Method 988.12, como también mediante un equipo de cromatografía líquida de alta rendimiento (HPLC por sus siglas en inglés). Previo a la determinación se elaboraron las curvas patrón correspondientes.

3.3.1 Cuantificación de Dextrana mediante HPLC

Al utilizar esta técnica es necesario el pretratamiento de las muestras, en especial porque son de matriz compleja conteniendo un elevado número de componentes. Se determinó por medios cualitativos (HPLC) y en un laboratorio externo, la naturaleza del material incrustante en el mosto muerto y en las columnas de destilación, obteniéndose un resultado positivo para Dextrana en ambos.

En la evaluación, cada cromatograma fue realizado por duplicado. Se realizó el cromatograma de referencia (Figura 3.19), el cual muestra el pico de la solución estándar de dextrana con un Tiempo de Retención de 4.97 min.

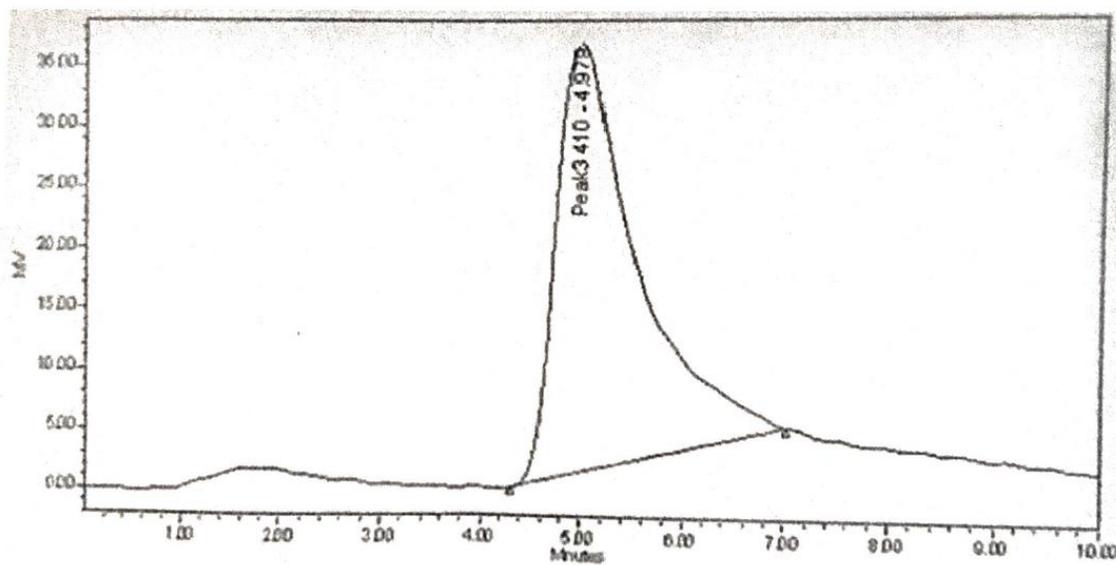


Figura 3.19 Cromatograma de referencia (Dextrana).

Posteriormente se llevó a cabo la evaluación de dextrana en la incrustación, obteniendo el cromatograma mostrado en la Figura 3.20. En el cromatograma se observa el pico resultante correspondiente a la solución problema con un Tiempo de Retención de 4.76 min.

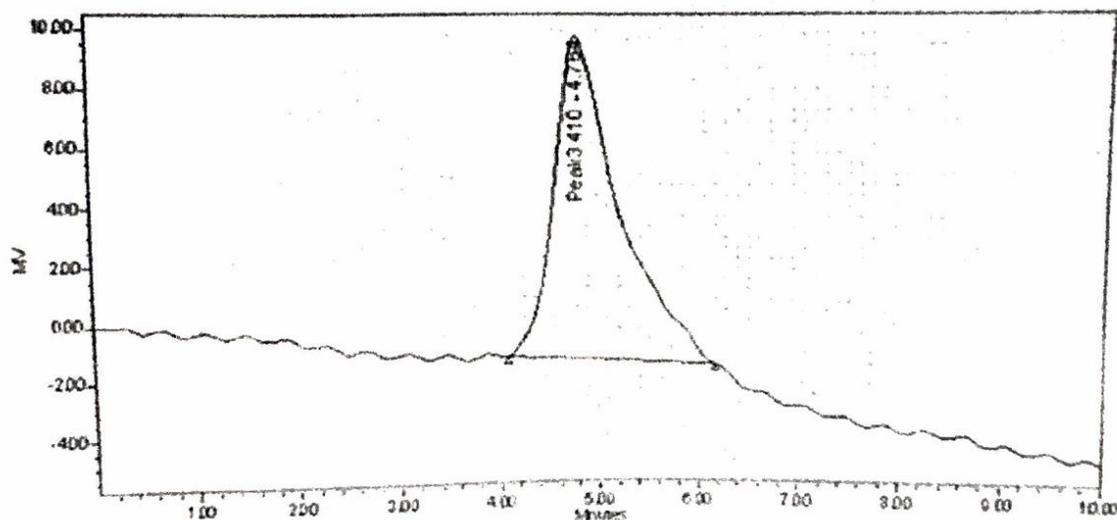


Figura 3.20 Cromatograma de incrustación (Dextrana).

En la Tabla 3.8 se observa el área de los picos resultantes de la solución problema (incrustación), al igual que el promedio correspondiente. De acuerdo a los cálculos para la cuantificación, el resultado para la muestra de incrustación es de 23.552 % de Dextrana que corresponde a 235523.224 ppm.

Tabla 3.8 Área de los picos resultantes de la solución problema.

| Solución | Área 1 | Área 2 | Promedio |
|--------------|--------|--------|----------|
| Incrustación | 418192 | 504474 | 461333 |

Los resultados de cuantificación para el mosto muerto no fueron viables debido al método analítico desarrollado, se encontró que éste no fue el adecuado para la muestra tratada.

Se comprobó la hipótesis formulada que argumentaba la presencia de Dextrana y, debido a su alta concentración, ésta juega un papel importante en las incrustaciones formadas en la pared interna de la columna de destilación.

3.3.2 Cuantificación de Dextrana mediante NMX-F-476-SCFI-2011

Otra técnica utilizada para la identificación y cuantificación de Dextrana fue la NORMA MEXICANA NMX-F-476-SCFI-2011. INDUSTRIA AZUCARERA Y ALCOHOLERA - MÉTODO PARA LA DETERMINACIÓN DE DEXTRANA EN AZÚCARES Y MATERIALES AZUCARADOS. Esta norma mexicana establece el método de prueba para determinar dextranas en muestras de azúcares y materiales azucarados. Se basa en el contenido de dextranas, las cuales se determinan por precipitación de las proteínas, filtración y lectura de turbidez determinado por un espectrofotómetro a una longitud de onda de 720 nm. La Tabla 3.9 muestra los resultados obtenidos en el mosto fermentado.

Tabla 3.9 Contenido de dextrana en mosto fermentado.

| Muestra | Peso (w) | Absorbancia (Abs) | Dextrana (ppm) |
|-----------------|------------|-------------------|-------------------|
| 1 | 8.0459 | 0.072 | 389.445556 |
| 2 | 8.0853 | 0.072 | 387.547772 |
| 3 | 7.9458 | 0.056 | 261.612424 |
| Promedio | 8.02566667 | 0.06666667 | 343.785909 |

Para llevar a cabo la determinación de dextrana en el mosto fermentado se realizó un filtrado previo, ya que éste tiene demasiados solidos suspendidos que no permiten llevar a cabo la determinación correctamente (Figura 3.21).



Figura 3.21 Filtrado previo de la muestra de mosto fermentado.

En cuanto a la incrustación, ésta tiene un aspecto semi sólido, un color café oscuro y opaco, contiene algunas piedrecillas blancas, así como también algunas piedrecillas negras. Esta incrustación fue obtenida de la primera columna de destilación de la empresa, columna denominada “mostera”, durante el paro para la limpieza de dicha columna. La muestra tuvo que ser tratada previamente para poder obtener las características necesarias para llevar a cabo la determinación de Dextrana (Figura 3.22). Este pretratamiento consistió en macerar la muestra para reducir el tamaño de las partículas contenidas en ella, posteriormente se pasó por una coladera con el fin de separar las partículas de mayor tamaño y poder obtener una muestra con características de “puré”.



Figura 3.22 Muestra de incrustación después del pretratamiento y dilución.

La Tabla 3.10 muestra los resultados obtenidos en cuanto a la determinación de dextrana en la incrustación.

Tabla 3.10 Contenido de dextrana en incrustación.

| Muestra | Peso (w) | Absorbancia (Abs) | Dextrana ppm |
|-----------------|------------|-------------------|-------------------|
| 1 | 8.4342 | 0.492 | 12338.7921 |
| 2 | 8.4361 | 0.358 | 6701.59908 |
| 3 | 8.3191 | 0.445 | 10308.8555 |
| Promedio | 8.39646667 | 0.43166667 | 9633.64484 |

Como se puede observar, la incrustación presenta una mayor cantidad de Dextrana en su composición, esto debido a la menor cantidad de agua disponible en la muestra.

3.3.3 Cuantificación de Dextrana mediante AOAC Official Method 988.12

La tercera técnica utilizada para la identificación y determinación de dextrana fue la AOAC Official Method 988.12. Dextran in raw cane sugar. Roberts Copper Method. En la cual todo el material de alto peso molecular (> 100000 daltons) es separado del azúcar por precipitación en 80% de alcohol etílico. El material precipitado se filtra, se lava y luego se redisuelve. Se agrega un agente alcalino de Cu (II), que precipita selectivamente el dextrano de alto peso molecular en soluciones de azúcar de caña en bruto. Este precipitado se filtra y el contenido de dextrano se determina colorimétricamente como carbohidrato mediante reacción de fenol-ácido sulfúrico, que descompone el complejo dextrana en unidades de glucosa y da color con una cantidad proporcional a la cantidad total de dextrano en la muestra. Las muestras de prueba y las mezclas de reacción se deben mantener libres de contaminación por polvo de azúcar y otro polvo que pueda contener hidrato de carbono y reaccione positivamente en la prueba de fenol-ácido sulfúrico.

La Tabla 3.11 muestra los resultados obtenidos en cuanto a determinación de dextrana en el mosto fermentado e incrustación.

Tabla 3.11 Contenido de Dextrana en mosto fermentado e incrustación.

| Muestra | Absorbancia (Abs) | Dextrana ppm |
|------------------|-------------------|--------------|
| Mosto fermentado | 0.096 | 1289535.71 |
| Incrustaciones | 0.52 | 14757441.41 |

Cabe mencionar que para llevar a cabo las curvas de calibración (de ambas técnicas) se utilizó Dextrana estándar de *Leuconostoc spp.* Mr 450000-650000 de la marca Sigma.

La técnica AOAC Official Method 988.12 se dividió en tres etapas para una mayor comodidad, ya que la técnica es muy extensa. En la Figura 3.23 se muestra una de las filtraciones a las que se sometieron las muestras.



Figura 3.23 Kit de filtración a vacío Millipore utilizado en las muestras.

3.3.4 Comparación de técnicas utilizadas para cuantificar Dextrana

Se obtuvieron diferentes resultados en cada una de las técnicas utilizadas. Se infiere que los diferentes resultados obtenidos son debido al nivel de selectividad de cada una de las técnicas llevadas a cabo, además de los diferentes límites de detección.

En cuanto a la determinación de Dextrana mediante HPLC, solo fue viable la obtención de resultados para la muestra de incrustación. Los resultados para el mosto fermentado no fueron viables debido al método analítico desarrollado, se encontró que éste no fue el adecuado para la muestra tratada. Por tal motivo no fue posible realizar una comparación entre técnicas tomando en cuenta este método; pero, más importante aún, se confirmó la presencia de Dextrana en las muestras tratadas, confirmando así la hipótesis propuesta.

El método *Haze* (en el cual está basada la técnica NORMA MEXICANA NMX-F-476-SCFI-2011) es el método de determinación de Dextrana más comúnmente aplicado a la industria azucarera debido a su rápido y fácil procedimiento experimental. La principal desventaja de este método es la limitación a la dextrana de alto peso molecular. Este método no es capaz de determinar dextrana de peso molecular menor a 40 kDa. En contraste, el método de *Robert's Copper* (en el cual está basada la técnica AOAC Official Method 988.12) es más complejo y prolongado. Éste método determina la concentración integral de dextranas mayores a los trisacáridos. Sin embargo, no permite la distinción entre las diferentes fracciones de dextrana (Abraham *et al.*, 2016).

Por lo tanto, ni el método *Haze* ni el método de *Robert's Copper* son capaces de identificar los productos de degradación. No obstante, la combinación de ambas técnicas es útil para determinar la cantidad de dextrana de alto y bajo peso molecular mediante un simple cálculo basado en el conocimiento de los diferentes límites de determinación (Abraham *et al.*, 2016).

En la Tabla 3.12 se muestra el resumen de resultados, los cuales se utilizaron para llevar a cabo los cálculos correspondientes.

Tabla 3.12 Contenido de Dextrana determinada con diferentes técnicas.

| Dextrana (ppm) | HPLC | Haze | Robert's Copper |
|-------------------------|-------------|-------------|------------------------|
| Mosto fermentado | - | 343.785909 | 1289535.71 |
| Incrustaciones | 235523.224 | 9633.64484 | 14757441.41 |

Tomando en consideración los valores de Dextrana obtenidos, se puede decir que de un total de 1289535.71 ppm de Dextrana total (bajos y altos pesos moleculares) encontrada en el mosto fermentado, 343.785909 ppm es de alto peso molecular. Y de un total de 14757441.41

ppm de Dextrana total encontrada en la incrustación, 9633.64484 ppm es de alto peso molecular. Estos resultados de Dextrana y diferenciación de pesos moleculares no son del todo confiables, puesto que la coloración en las muestras constituye una gran interferencia, sobretodo en el método *Haze*.

El color café oscuro de las muestras (que son derivadas de la melaza de caña) se debe en parte a las reacciones de Maillard llevadas a cabo y las melanoidinas presentes en las melazas, además de una gran cantidad de diferentes compuestos. Este color es una gran interferencia en las técnicas de determinación de Dextrana debido a que ésta son técnicas colorimétricas, especialmente en la técnica NORMA MEXICANA NMX-F-476-SCFI-2011. El color no es tan significativo al utilizar la técnica AOAC Official Method 988.12 ya que, al ser muy extensa, el color se va eliminando a través de los diferentes filtrados que se llevan a cabo.

Se confirmó la hipótesis hecha que señala la existencia de Dextrana en las muestras analizadas, además de encontrar una cantidad considerable. Debido a las características poliméricas de adhesividad, afinidad química al material de las columnas, altos pesos moleculares, niveles de concentración y su resistencia a altas tasas de corte en las columnas, la dextrana es considerada uno de los componentes mayoritarios y la principal causante de la incrustación formada en las columnas de destilación.

Se concluyó que las técnicas existentes para la identificación y cuantificación de Dextranas no están diseñadas para muestras complejas que presentan un color tan significativo como en el caso de melazas y mostos provenientes del proceso de producción de bioetanol. Es necesario proponer alternativas de solución para esta problemática, como lo son los métodos de clarificación, que además no afecten el contenido de Dextrana presente en la muestra

3.3.5 Experimentación preliminar para clarificación de mostos

Debido a que el color de las muestras representa una fuerte interferencia para la obtención de resultados confiables, se hizo necesaria la adecuación de las técnicas empleadas. Las técnicas fueron adecuadas utilizando métodos de clarificación que no comprometieran el contenido de Dextrana, para la determinación y cuantificación de ésta. Como material sometido a clarificación se utilizó el mosto muerto (fermentado) obtenido de la empresa.

Para la clarificación de muestras de mosto muerto se llevaron a cabo tres metodologías utilizadas en la clarificación de jugos azucarados: Clarificación con subacetato de plomo, Clarificación con OCTAPOL y Clarificación con cloruro de aluminio.

Se llevó a cabo experimentación preliminar o de escrutinio tomando en cuenta 3 factores y 3 niveles: siendo el tipo de clarificante (subacetato de plomo, OCTAPOL y cloruro de aluminio), tiempo de agitación (10, 20 y 30 min) y tiempo de reposo (15, 30 y 45 min) los factores a analizar. Como variable de respuesta se tomó en cuenta el color removido. La elección de la metodología de clarificación más adecuada se realizó teniendo en consideración la cantidad de Dextrana contenida en las muestras antes y después de la clarificación.

Una vez terminado cada tratamiento, se tomaron lecturas de las muestras ya clarificadas en un colorímetro HunterLab ColorQuestXE (Tabla 3.13), esto para determinar la remoción de color. Los tres parámetros en el modelo (Figura 3.24) representan la luminosidad de color (L^* , $L^* = 0$ rendimientos negro y $L^* = 100$ indica blanca), su posición entre magenta y verde (a^* , valores negativos indican verde mientras valores positivos indica magenta) y su posición entre el amarillo y azul (b^* , valores negativos indican azul y valores positivos indican amarillo).

Las muestras que mayor remoción de color presentaron fueron los tratamientos con subacetato de plomo en los tres niveles y el tratamiento con Cloruro de Aluminio a niveles medios.

Tabla 3.13 Lecturas obtenidas en el colorímetro.

| Muestra | L | a | b | DE | DC | DH |
|------------------------------------|-------|------|-------|-------|-------|-------|
| Mosto Fermentado (blanco) | 0.99 | 0.97 | -0.25 | - | - | - |
| Subacetato de plomo niveles altos | 18.46 | 0.80 | 4.80 | 23.72 | 9.72 | 2.25 |
| Subacetato de plomo niveles medios | 4.69 | 1.02 | 1.13 | 2.46 | 1.42 | 0.64 |
| Subacetato de plomo niveles bajos | 1.21 | 1.42 | -0.03 | 0.18 | 0.16 | 0.07 |
| Cloruro de Aluminio niveles altos | 1.08 | 1.16 | -0.18 | 0.07 | 0.06 | 0.03 |
| Cloruro de Aluminio niveles medios | 1.13 | 1.30 | -0.64 | 0.16 | 0.15 | -0.06 |
| Cloruro de Aluminio niveles bajos | 1 | 1.13 | -0.05 | 0.06 | 0.03 | 0.05 |
| Octapol niveles altos | 0.71 | 1.22 | -0.24 | 0.05 | -0.03 | 0.01 |
| Octapol niveles medios | 0.92 | 1.14 | -0.17 | 0.03 | 0.01 | 0.02 |
| Octapol niveles bajos | 0.87 | 1.13 | -0.55 | 0.06 | 0.02 | -0.05 |

*Nota: DE (diferencia total de color con respecto al blanco), DC (Diferencia de cromaticidad con respecto al blanco) y DH (Diferencia total de tono con respecto al blanco).

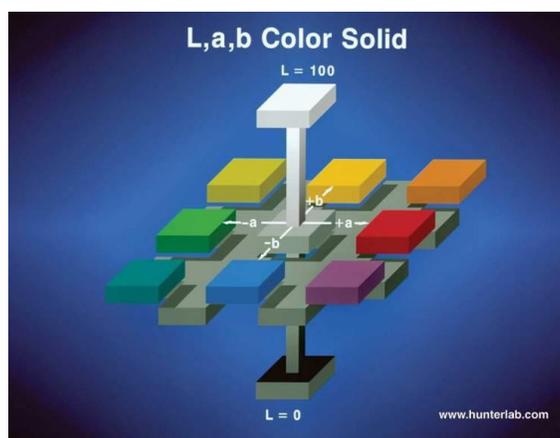


Figura 3.24 Parámetros de color.

Los parámetros tomados en cuenta para la selección de la técnica más apropiada en cuanto a remoción de color en mosto fermentado sin comprometer la dextrana contenida en él, fue la

DE y la cantidad de dextrana misma (ppm). De este modo entre mayor sea DE mayor será la diferencia y remoción de color.

Tabla 3.14 Contenido de Dextrana en muestras clarificadas mediante NMX-f-476-SCFI-2011.

| Muestra | Peso | Abs. | Replica peso | Replica Abs | Prom. peso | Prom. Abs | Dextrana (ppm) | % Removido de Dextrana del mosto fermentado |
|---|--------|-------|--------------|-------------|------------|-----------|----------------|---|
| Subacetato de plomo niveles altos polarización directa | 7.7725 | 0.264 | 7.6672 | 0.365 | 7.71985 | 0.3145 | 11449.3261 | -3230.3651 |
| Subacetato de plomo niveles altos polarización indirecta | 7.748 | 0.003 | 7.805 | 0.005 | 7.7765 | 0.004 | 16.7890439 | 95.1164 |
| subacetato de plomo niveles medios polarización directa | 7.9193 | 0.18 | 7.9207 | 0.18 | 7.92 | 0.18 | 3941.81818 | -1046.5909 |
| subacetato de plomo niveles medios polarización indirecta | 7.9253 | 0.1 | 7.8453 | 0.007 | 7.8853 | 0.0535 | 39.0650958 | 88.6367 |
| subacetato de plomo niveles bajos polarización directa | 7.9015 | 0.07 | 8.0324 | 0.077 | 7.96695 | 0.0735 | 814.068119 | -136.7950 |
| subacetato de plomo niveles bajos polarización indirecta | 8.0049 | 0.008 | 7.9436 | 0.009 | 7.97425 | 0.0085 | 38.6293382 | 88.7635 |
| Cloruro de aluminio al 5% niveles altos | 7.9111 | 0.01 | 7.5262 | 0.011 | 7.71865 | 0.0105 | 43.7540243 | 87.2728 |
| Cloruro de aluminio al 5% niveles medios | 7.955 | 0.014 | 7.8784 | 0.014 | 7.9167 | 0.014 | 50.3078303 | 85.3665 |
| Cloruro de aluminio al 5% niveles bajos | 7.9322 | 0.014 | 7.3987 | 0.015 | 7.66545 | 0.0145 | 46.5788701 | 86.4511 |
| Octapol niveles altos | 7.972 | 0.010 | 7.9363 | 0.01 | 7.95415 | 0.01 | 47.0697686 | 86.3084067 |
| Octapol niveles medios | 8.0401 | 0.010 | 7.9891 | 0.01 | 8.0146 | 0.01 | 46.7147456 | 86.4116753 |
| Octapol niveles bajos | 7.8917 | 0.010 | 8.0237 | 0.01 | 7.9577 | 0.01 | 47.0487704 | 86.3145146 |

La primera técnica utilizada para la cuantificación de Dextrana posterior a la clarificación fue la norma NMX-f-476-SCFI-2011. En general, se observa una disminución aparente de Dextrana en las muestras tratadas con respecto al mosto sin tratamiento; se infiere que esta reducción se debe, más que nada, a la remoción parcial de color. Al ser colorimétricas ambas técnicas, esta remoción parcial influye en la determinación de dextrana.

Podemos observar en la Tabla 3.14 que con la polarización directa (tanto altos, medios y bajos) el contenido aparente de Dextrana aumentó con respecto a la muestra sin tratar, esto se debe a que el plomo utilizado es muy difícil de retirar. De esta forma el NaCl empleado, más las

filtraciones, no logran retirar significativamente el plomo, lo que causa una interferencia considerable en las lecturas de absorbancia (abs). Por el contrario, en el caso de la polarización indirecta, además de la temperatura aplicada, el HCl ayuda a precipitar el plomo contenido en la muestra y, tras el filtrado, éste queda separado de la muestra.

Posteriormente se cuantificó la cantidad de Dextrana contenida en el mosto fermentado clarificado mediante la técnica AOAC Official Method 988.12. Cabe mencionar que, para ésta técnica, solo se determinaron algunos tratamientos, esto tomando en cuenta la remoción de color y los resultados obtenidos con la anterior técnica.

Tabla 3.15 Contenido de Dextrana en muestras clarificadas mediante AOAC Official Method 988.12.

| Muestra | Abs | Dextrana (ppm) |
|---|-------|----------------|
| Subacetato de Plomo Polarización directa niveles altos | 0.142 | 236022.728 |
| Subacetato de Plomo Polarización directa niveles medios | 0.136 | 225601.976 |
| Subacetato de Plomo Polarización directa niveles Bajos | 0.168 | 281179.316 |
| Subacetato de Plomo Polarización indirecta niveles Altos | 0.146 | 250908.197 |
| Subacetato de Plomo Polarización indirecta niveles Medios | 0.148 | 254495.27 |
| Subacetato de Plomo Polarización indirecta niveles Bajos | 0.154 | 265256.487 |
| Cloruro de Aluminio niveles Medios | 0.043 | 15161.878 |

Los resultados obtenidos mediante esta técnica son contrastantes comparados con los obtenidos con la norma NMX-f-476-SCFI-2011, esto debido a la selectividad de la técnica y a las diferencias en cuanto a límites de detección (El método *Haze* se limita a altos pesos moleculares y el método *Robert´ Copper* determina la concentración integral de Dextranas). Además, la coloración que aún permanecía en las muestras clarificadas fue un interferente

para el método *Haze*. Las diferencias entre tratamientos de un mismo nivel son considerablemente menos notables, obteniéndose aproximadamente una misma remoción (consecuencia de la remoción de color) en todos los casos. Al ser más selectiva la técnica, el contenido de plomo remanente tras la clarificación, fue desechado. En la Figura 3.25 se aprecia el mosto fermentado tratado con Subacetato de Plomo aplicando la técnica AOAC Official Method 988.12.

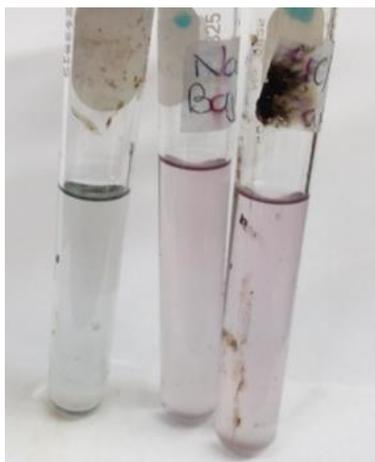


Figura 3.25 Mosto fermentado clarificado al finalizar la técnica AOAC Official Method 988.12

*Nota: De izquierda a derecha: blanco, polarización directa y polarización indirecta.

De acuerdo a las observaciones e inferencias hechas y a su discusión, se decidió descartar las técnicas de clarificación con Octapol y con Cloruro de Aluminio. Se llegó a la conclusión de que la técnica más apropiada para llevar a cabo la clarificación en mosto fermentado es utilizando Subacetato de Plomo con polarización indirecta.

3.3.5.1 Diseño experimental fraccionado para clarificación de mostos

- **Diseño factorial 3^{k-1}**

La fracción más grande del diseño 3^k es la fracción un tercio, que contiene 3^{k-1} corridas. Para construir un diseño factorial fraccionado 3^{k-1} se selecciona un componente de interacción con

dos grados de libertad (generalmente la interacción de orden más alto) y se hace la partición del diseño 3^k completo en 3 bloques. Cada uno de los 3 bloques resultantes es un diseño fraccionado 3^{k-1} y puede seleccionarse cualquiera de los bloques para usarlos. Cada fracción del diseño 3^{k-1} resultante contendrá $3^2 = 9$ combinaciones de tratamientos (Montgomery, 2004).

A partir de los mejores resultados obtenidos con respecto a las técnicas de clarificación de mosto fermentado para la determinación de dextranas, se elaboró un diseño experimental fraccionado 3^{k-1} , donde puede seleccionarse cualquiera de los bloques resultantes para experimentar. La Tabla 3.16 muestra los factores con sus niveles, teniendo como variable de respuesta cantidad de Dextrana en ppm y la diferencia total de color con respecto al blanco (DE). Para la determinación del color se utilizó un colorímetro HunterLab ColorQuestXE y para la determinación de Dextrana se ocuparon las dos técnicas antes mencionadas (NMX-f-476-SCFI-2011 y AOAC Official Method 988.12).

Tabla 3.16 Factores y niveles del diseño experimental fraccionado.

| Factores | Niveles | | |
|--------------------------|----------|-----------|----------|
| | Bajo (0) | Medio (1) | Alto (2) |
| Concentración (C) | 0.5 g | 1 g | 2 g |
| Agitación (A) | 10 min | 20 min | 30 min |
| Reposo (R) | 15 min | 30 min | 45 min |

Previo a la experimentación, se realizaron las curvas patrón correspondientes de ambas técnicas. La Tabla 3.17 muestra la fracción utilizada ($U = 1$) junto con los 9 tratamientos correspondientes, la determinación de color y la cantidad de dextrana cuantificada mediante las dos técnicas. La experimentación se llevó a cabo aleatoriamente y con una réplica.

Tabla 3.17 Fracción utilizada (U = 1).

| Tratamiento | Var. codificadas | | | Var. naturales | | | Color | NMX | AOAC |
|-------------|------------------|---|---|----------------|-----------|--------|-------|----------|----------------------|
| | C | A | R | Concentración | Agitación | Reposo | DE | Dextrana | Dextrana |
| 1 | 1 | 0 | 0 | 1 g | 10 min | 15 min | 0.09 | 131.053 | 4468.391 2595.362 |
| 2 | 1 | 1 | 2 | 1 g | 20 min | 45 min | 0.125 | 102.998 | 3626.981 2510.147 |
| 3 | 2 | 0 | 1 | 2 g | 10 min | 30 min | 0.085 | 102.921 | 2772.531 1714.156 |
| 4 | 0 | 0 | 2 | 0.5 g | 10 min | 45 min | 0.115 | 281.424 | 632.349 1122.318 |
| 5 | 1 | 2 | 1 | 1 g | 30 min | 30 min | 0.085 | 95.380 | 5342.056 3394.126 |
| 6 | 2 | 1 | 0 | 2 g | 20 min | 15 min | 0.13 | 168.507 | 3392.123 3392.123 |
| 7 | 2 | 2 | 2 | 2 g | 30 min | 45 min | 0.115 | 121.408 | 735.797 735.797 |
| 8 | 0 | 1 | 1 | 0.5 g | 20 min | 30 min | 0.105 | 133.899 | 5671.803 5671.803 |
| 9 | 0 | 2 | 0 | 0.5 g | 30 min | 15 min | 0.095 | 32.532 | 9338.576 7908.716 |

En la Figura 3.26 se muestran los 9 tratamientos con sus respectivas réplicas durante la técnica de cuantificación de dextrana AOAC Official Method 988.12. Una vez llevado a cabo los tratamientos de manera aleatoria, se procedió a examinar los datos obtenidos mediante un análisis de varianza (ANOVA) y su interpretación. Para realizar el análisis estadístico mencionado se utilizó el software NCSS 2007, ocupando el procedimiento GLM (General Lineal Model). En la Tabla 3.18 se muestra el ANOVA obtenido con respecto al contenido de Dextrana

en las muestras. Cabe mencionar que solo se utilizaron los datos obtenidos mediante la técnica AOAC Official Method 988.12 por su mayor versatilidad para con el tipo de muestra tratada.



Figura 3.26 Cuantificación de Dextrana en los tratamientos.

Tabla 3.18 ANOVA de diseño experimental fraccionado.

| Término | Grados de libertad | Suma de cuadrados | Media de cuadrados | F ₀ | Nivel de probabilidad | Poder $\alpha = 0.05$ |
|-------------------------|--------------------|-------------------|--------------------|----------------|-----------------------|-----------------------|
| A: Concentración | 2 | 2.583941E+07 | 1.29197E+07 | 8.81 | 0.005209* | 0.911729 |
| B: Agitación | 2 | 1.836219E+07 | 9181095 | 6.26 | 0.015322* | 0.790042 |
| C: Reposo | 2 | 4.144622E+07 | 2.072311E+07 | 14.12 | 0.000916* | 0.988599 |
| S | 11 | 1.614008E+07 | 1467280 | | | |
| Total (ajustado) | 17 | 1.017879E+08 | | | | |
| Total | 18 | | | | | |

* Término significante $\alpha = 0.05$

De acuerdo al ANOVA realizado, los 3 factores estudiados presentan significancia sobre la concentración de Dextrana. De acuerdo a la magnitud del estadístico F₀, su importancia es: factor C (reposo), factor A (concentración) y factor B (agitación). En este caso, como se busca minimizar el contenido de Dextrana (en realidad es disminución de color), se recomienda trabajar con concentración nivel 2, agitación nivel 0 y reposo nivel 2 (2 g de Subacetato de

Plomo, 10 minutos de agitación y 45 minutos de reposo). Se recomienda seguir investigando sobre la técnica de clarificación y variantes, ya que ésta no es del todo eficiente para las muestras de matriz compleja como lo es el mosto fermentado.

Se obtuvieron parámetros reológicos estacionarios y dinámicos de las muestras de mosto fermentado, previo y posterior a la clarificación. En la Figura 3.27 se muestra el reograma resultante del análisis estacionario de las muestras.

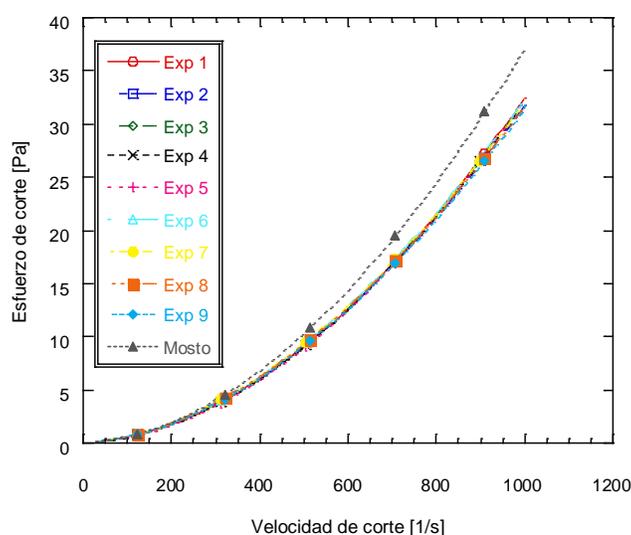


Figura 3.27 Reograma de comportamiento reológico en estado estacionario.

Se observan comportamientos no Newtonianos con características dilatantes (shear thickening), mostrando un comportamiento de flujo mayor a uno ($n > 1$) en cada una de las muestras tratadas analizadas. Un comportamiento muy similar presenta la muestra de mosto fermentado sin tratar. La Tabla 3.19 resume el comportamiento de cada una de las muestras en estado estacionario, el cual se ajustó satisfactoriamente al modelo de Herschel-Bulkley. Se muestran los coeficientes de determinación obtenidos.

Tabla 3.19 Parámetros reológicos obtenidos en muestras.

| Exp. | σ_0 (Pa) | K (Pa s) | n | Modelo | R^2 |
|------|-----------------|-------------|--------|---|---------|
| 1 | 0.0941815 | 0.00008766 | 1.8561 | $\sigma = 0.0941815 + 0.00008766 \dot{\gamma}^{1.8561}$ | 0.99005 |
| 2 | 0.0909515 | 0.00011883 | 1.8088 | $\sigma = 0.0909515 + 0.00011883 \dot{\gamma}^{1.8088}$ | 0.98721 |
| 3 | 0.091106 | 0.00010464 | 1.8293 | $\sigma = 0.091106 + 0.00010464 \dot{\gamma}^{1.8293}$ | 0.98828 |
| 4 | 0.097315 | 0.0000934 | 1.8472 | $\sigma = 0.097315 + 0.0000934 \dot{\gamma}^{1.8472}$ | 0.98824 |
| 5 | 0.0855735 | 0.00007791 | 1.8729 | $\sigma = 0.0855735 + 0.00007791 \dot{\gamma}^{1.8729}$ | 0.99367 |
| 6 | 0.1031495 | 0.00011574 | 1.816 | $\sigma = 0.1031495 + 0.00011574 \dot{\gamma}^{1.816}$ | 0.98628 |
| 7 | 0.093557 | 0.00013143 | 1.7967 | $\sigma = 0.093557 + 0.00013143 \dot{\gamma}^{1.7967}$ | 0.98609 |
| 8 | 0.09426 | 0.0001545 | 1.774 | $\sigma = 0.09426 + 0.0001545 \dot{\gamma}^{1.774}$ | 0.98423 |
| 9 | 0.0998225 | 0.00012214 | 1.8032 | $\sigma = 0.0998225 + 0.00012214 \dot{\gamma}^{1.8032}$ | 0.98623 |
| MM | 0.095801 | 0.000092659 | 1,8678 | $\sigma = 0.095801 + 0.000092659 \dot{\gamma}^{1.8678}$ | 0,99101 |

Dentro de las pruebas en oscilatorio (estado dinámico) llevadas a cabo a las muestras ya clarificadas de mosto, se realizaron barridos de amplitud y de frecuencia. La Figura 3.28 muestra los reogramas de barrido de amplitud obtenidos de los experimentos 1 y 2. El comportamiento mostrado en ambos barridos fue muy similar en todas las muestras analizadas. En general, el comportamiento elástico (G') prevaleció sobre el viscoso (G'') en la región lineal, antes del punto de cruce, que es donde se invierte este comportamiento.

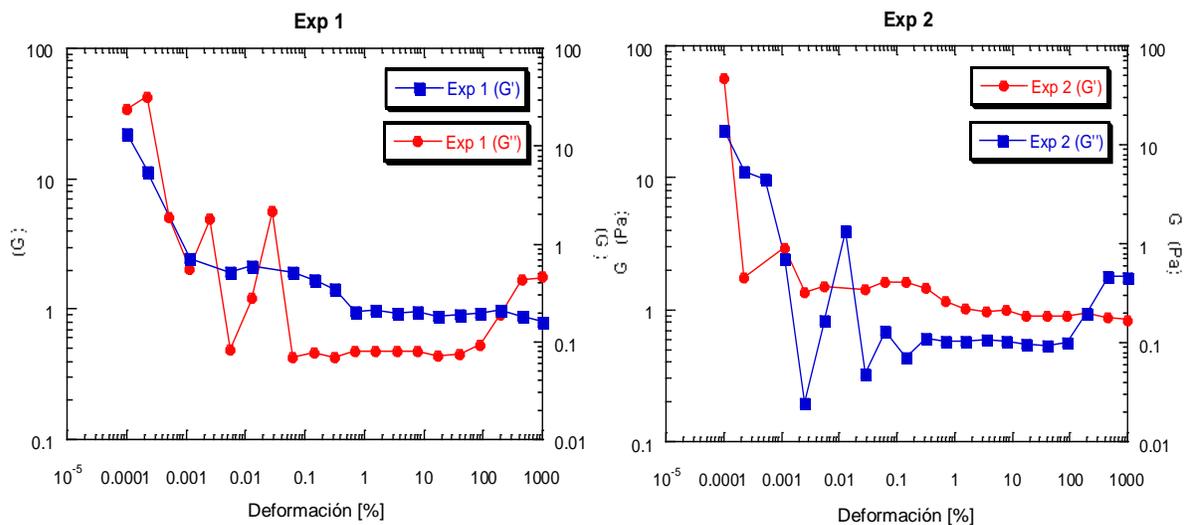


Figura 3.28 Barrido de amplitud de Experimento 1 y 2.

La Figura 3.29 muestra los reogramas de barrido de frecuencia obtenidos dentro de la región viscoelástica lineal de los experimentos 1 y 2.

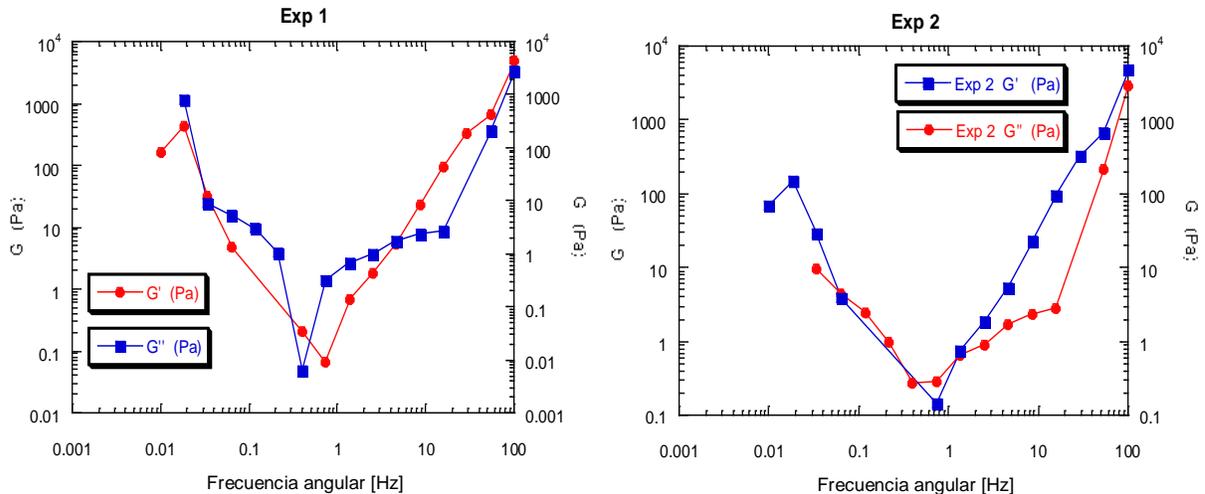


Figura 3.29 Barrido de frecuencia de Experimento 1 y 2.

El comportamiento mostrado en ambos barridos fue muy similar en todas las muestras analizadas. No se observan comportamientos concluyentes, pues durante el barrido cambian los comportamientos de manera continua. Existen diferentes puntos de cruce, el comportamiento de los módulos tiende a disminuir y posteriormente a aumentar.

El análisis reológico en las muestras, antes y después de clarificar, se llevó a cabo para verificar la existencia de algún cambio de comportamiento a partir del tratamiento de clarificación, puesto que era necesario que éste no afectara las muestras y su contenido de dextrana. El estudio estacionario arrojó resultados en cuanto a comportamiento muy similares entre sí, no mostrando evidencia importante en cuanto a cambio de comportamiento. Además, en el estudio dinámico, se comprobó que el comportamiento elástico (G') prevalece sobre el viscoso (G'') en la región lineal, antes del punto de cruce. Lo anterior muestra la estructura tipo sólido (característica conferida por el contenido de Dextrana) en las muestras de mosto fermentado antes y después del tratamiento. Se concluye que el tratamiento de clarificación no afecta el contenido de Dextrana en el mosto fermentado.

3.4 Desarrollo y evaluación de alternativas de solución a nivel laboratorio

Una vez que la hipótesis que establecía presencia de Dextrana en las muestras fue confirmada, se desarrollaron a nivel laboratorio, dos alternativas para dar solución al problema de incrustación.

3.4.1 Recuperación de Dextrana vía punto isoeléctrico

Se buscó encontrar el punto isoeléctrico de la Dextrana contenida en las muestras proporcionadas por la empresa (mosto fresco y mosto muerto) para su precipitación y recuperación. Previo a esta determinación, se investigó el punto isoeléctrico en soluciones estándar de Dextrana al 1 y 6 % (m/v). Para ello se prepararon soluciones ácida de HCl 0.1 N y básica de NaOH 0.1 N, con las cuales se realizaron curvas de titulación, manteniendo agitación constante.

Las curvas de titulación ácida y básica llevadas a cabo se muestran en la Figura 3.30 y Figura 3.31.

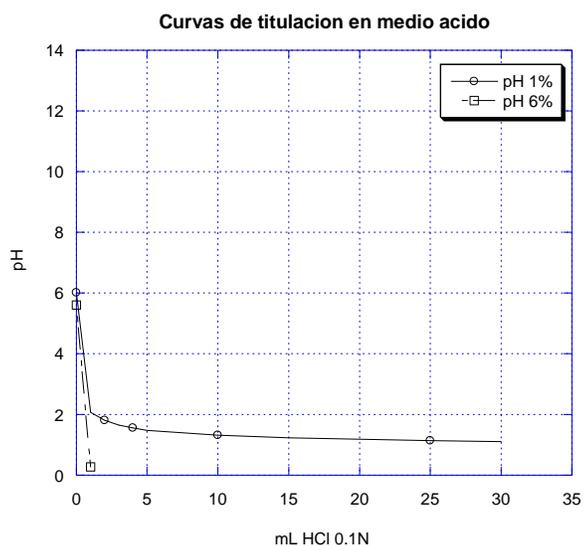


Figura 3.30 Curvas de titulación en medio ácido de soluciones de Dextrana a 1% y 6% m/v.

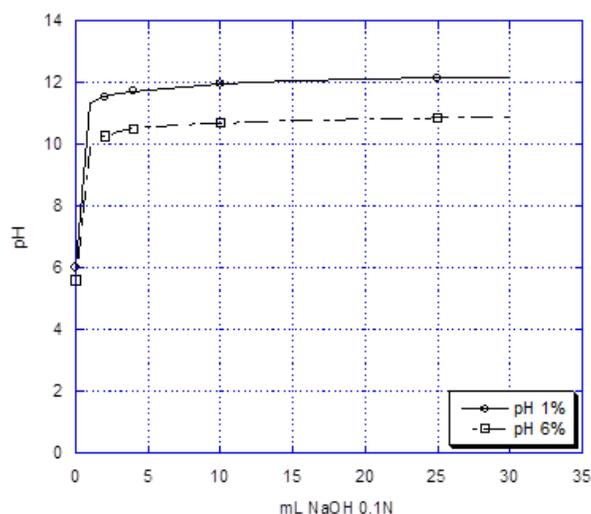


Figura 3.31 Curvas de titulación en medio básico de soluciones de Dextrana a 1% y 6% m/v.

En las diferentes soluciones empleadas de Dextrana y en ambos medios, no se presentó precipitación alguna para su posterior separación. Dicho punto se corroboró con la información consultada en literatura, donde se presenta que la estructura de la dextrana no muestra grupos funcionales ionizables, conllevando a que ésta forme moléculas neutras (Gaonkar *et al.*, 1995). Por lo que se concluyó que ésta alternativa no es viable para el tratamiento del problema propuesto.

3.4.2 Eliminación de Dextrana vía enzimática

Con el propósito de degradar la Dextrana contenida en las muestras, se utilizó la enzima Dextranasa para su desnaturalización. La enzima empleada (Dextranfree de la marca ENMEX), se diluyó con agua destilada a una relación 1:5 (dilución recomendada por el fabricante). Se llevó a cabo un diseño experimental de tres factores con dos niveles (2^3), donde el sustrato (mosto fresco y mosto muerto), relación sustrato-enzima (1:10 y 1:100) y temperatura (25 y 40° C) fueron los factores a analizar. El diseño se realizó aleatoriamente y con réplica, siendo el contenido de dextrana la variable de respuesta. A continuación, se muestran los resultados obtenidos, en términos de reducción de dextrana, de las corridas de hidrólisis enzimática para mosto (M) y mosto fermentado (MF), de acuerdo al diseño experimental planteado. Es

importante señalar que la melaza no fue incluida en el estudio debido a que un alto contenido de azúcares (60° Brix) reduce la actividad enzimática entre un 30 y 40 % y los tiempos de reacción incrementan en comparación con el tratamiento de jugos. La actividad enzimática de la dextrana es estable hasta 25 – 30° Brix. Además, un incremento en Brix hace necesario incrementar la dosis de enzima añadida y disminuye el rendimiento de hidrólisis (Bashari *et al.*, 2013; Eggleston *et al.*, 2011; Rodríguez-Jiménez, 2005). La aplicación en jugos es más eficiente y económico que añadir la dextranasa a la melaza (Gibriel *et al.*, 2014; Eggleston y Monge, 2005). La Tabla 3.20 muestra el contenido de Dextrana después del tratamiento de hidrólisis enzimática.

Tabla 3.20 Contenido de Dextrana después del tratamiento enzimático.

| Exp | Substrato | [E:S] | T [°C] | Dextrana [ppm] ^{DES STD} | Reducción [%] |
|-----|-----------|---------|--------|-----------------------------------|---------------|
| 1 | M | [1:10] | 25 | 325.510 ^{6.265} | 33.792 |
| 2 | MF | [1:10] | 25 | 198.861 ^{11.649} | 43.631 |
| 3 | M | [1:100] | 25 | 309.850 ^{7.077} | 36.977 |
| 4 | MF | [1:100] | 25 | 204.795 ^{7.403} | 41.950 |
| 5 | M | [1:10] | 40 | 248.037 ^{11.012} | 49.550 |
| 6 | MF | [1:10] | 40 | 174.626 ^{6.191} | 64.482 |
| 7 | M | [1:100] | 40 | 230.731 ^{6.942} | 53.070 |
| 8 | MF | [1:100] | 40 | 173.220 ^{11.525} | 64.767 |

Para fines comparativos, se consideraron los valores iniciales de Dextrana obtenidos mediante caracterización físico-química: el mosto presentó 491,650 ppm de contenido de Dextrana, mientras que el mosto fermentado presentó 352,785 ppm.

Es evidente que la temperatura afecta la hidrólisis de Dextrana, alcanzando valores de reducción más altos a 40 °C, lo cual coincide con lo reportado en la literatura (Bashari *et al.*, 2013; Gibriel *et al.*, 2014; Ninchan *et al.*, 2017; Eggleston y Monge, 2005; Rodríguez-Jiménez, 2005; Zhao *et al.*, 2014). De los resultados obtenidos se observa que, las mayores reducciones en el contenido de Dextrana (64%) se logran a 40 °C con mosto fermentado como sustrato.

Posteriormente, se evaluó el efecto del tipo de sustrato, la relación enzimático-sustrato y la temperatura sobre el contenido de Dextrana. La Tabla 3.21 muestra el análisis estadístico (ANOVA) obtenido mediante el software NCSS 2000.

Tabla 3.21 ANOVA con respecto al contenido de Dextrana.

| | Grados de libertad | Suma de cuadrados | Media de cuadrados | F ₀ | Nivel de probabilidad | Poder $\alpha = 0.05$ |
|-------------------------|--------------------|-------------------|--------------------|----------------|---------------------------|-----------------------|
| A: Sustrato | 1 | 32 836.970 | 32 836.970 | 423.380 | 0.000* | 1.000000 |
| B: Relación | 1 | 203.312 | 203.312 | 2.620 | 0.144 | 0.297642 |
| AB | 1 | 352.341 | 352.341 | 4.540 | 0.0656 | 0.466205 |
| C: Temperatura | 1 | 11 267.560 | 11 267.560 | 145.280 | 2.000 x10 ⁻⁶ * | 1.000000 |
| AC | 1 | 2 539.228 | 2 539.228 | 32.740 | 4.430 x10 ⁻⁴ * | 0.998611 |
| BC | 1 | 19.618 | 19.618 | 0.250 | 0.628 | 0.073028 |
| ABC | 1 | 7.473 | 7.473 | 0.100 | 0.764 | 0.058712 |
| S | 8 | 620.477 | 77.560 | | | |
| Total (ajustado) | 15 | 47 846.9 | | | | |
| Total | 16 | | | | | |

*Término de significancia $\alpha = 0.050$

Se concluyó mediante el ANOVA que el factor A (sustrato) y C (temperatura), así como la interacción entre ambos factores, tienen efecto significativo sobre el contenido de dextrana.

Cabe destacar que, por los altos valores del estadístico F_0 , el factor A ($F_0 = 423.38$) tiene el efecto mayormente significativo sobre dicha variable de respuesta.

En la Figura 3.32 se muestra la tendencia de degradación de Dextrana con respecto al tiempo de hidrólisis enzimática, en nivel alto de temperatura.

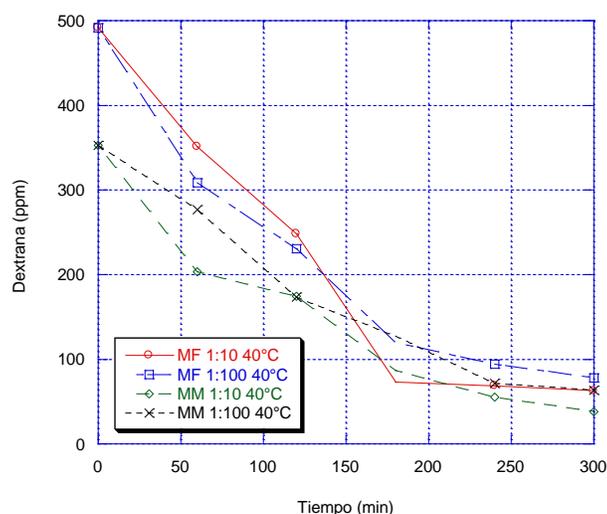


Figura 3.32 Degradación de dextrana con respecto al tiempo de hidrólisis enzimática, en nivel alto de temperatura.

A partir de los datos obtenidos podemos concluir que el sustrato en el que se obtuvo mayor remoción fue el mosto fermentado, lo cual es considerado una ventaja en este estudio, dado que este mosto es el que será tratado antes de entrar a la columna de destilación. Con respecto a la temperatura, el valor alto (40°C) fue el que mostró mayor remoción. Es importante resaltar que, en la industria el mosto fermentado presenta temperaturas similares una vez que ha concluido la fermentación. Como se puede observar en la tabla de resultados, la relación enzima-sustrato no presenta significancia en el estudio. De aquí que, con fines de optimización de recursos, se tomó el valor alto (1:100), donde se ocupa una menor cantidad de enzima en un volumen mayor de sustrato.

Se concluye que el mosto fermentado (MF) es el sustrato más adecuado para llevar a cabo el tratamiento a mayores escalas debido a la mayor remoción lograda (además de su pH óptimo, Brix y temperatura favorable en condiciones de operación industrial). A partir de los mejores resultados obtenidos, se desarrollará un nuevo diseño experimental con el fin de optimizar la cantidad enzima utilizada en el proceso de degradación de Dextrana.

3.4.3 Seguimiento reológico de degradación enzimática de Dextrana

Durante la evaluación de alternativas de solución a nivel laboratorio, se llevó a cabo un seguimiento reológico para la determinación de parámetros importantes. Con respecto a la alternativa de recuperación vía punto isoeléctrico no fue posible el seguimiento reológico, ya que no fue un método viable para el tratamiento de muestras. La alternativa de eliminación de Dextrana vía enzimática fue seguida mediante reología.

Las dextranasas reducen la masa molecular y por lo tanto la viscosidad de los jugos (Abraham *et al.*, 2016; Khalikova *et al.*, 2005; Ninchan *et al.*, 2017). En la Tabla 3.22 se muestran los resultados obtenidos tras el tratamiento enzimático, en términos de viscosidad, para las muestras de mosto y de mosto fermentado, de acuerdo con el diseño experimental propuesto. Se tomaron como valores iniciales los obtenidos en la caracterización físico-química, donde el mosto presentó 0.026 Pa s, mientras que el mosto fermentado presentó 0.019 Pa s de viscosidad.

El efecto de la Dextrana sobre la viscosidad se ha estudiado y se ha descubierto que aumenta con el aumento del peso molecular y disminuye con el aumento de ramificación (Kaur y Kaler, 2008).

El menor valor de viscosidad se obtuvo con el mosto fermentado como sustrato, relación [1:10] y 40°C de temperatura, en conformidad con los tratamientos que obtuvieron la mayor reducción de Dextrana.

Tabla 3.22 Valores de viscosidad en hidrólisis enzimática.

| Exp. | Substrato | [E:S] | T [°C] | Viscosidad [Pa s] | Reducción [%] |
|------|-----------|---------|--------|-------------------|---------------|
| 1 | M | [1:10] | 25 | 0.022 | 15.720 |
| 2 | MF | [1:10] | 25 | 0.019 | 0.256 |
| 3 | M | [1:100] | 25 | 0.024 | 10.985 |
| 4 | MF | [1:100] | 25 | 0.020 | -2.564 |
| 5 | M | [1:10] | 40 | 0.019 | 28.978 |
| 6 | MF | [1:10] | 40 | 0.017 | 12.308 |
| 7 | M | [1:100] | 40 | 0.020 | 25.758 |
| 8 | MF | [1:100] | 40 | 0.018 | 10.000 |

Debido a que el mosto fermentado tiene menos contenido de sólidos debido a la producción de etanol, la interacción entre las partículas disminuye. A mayor temperatura, menor viscosidad; esto está relacionado con la incidencia de una interacción más libre entre moléculas a temperaturas elevadas. La viscosidad de un líquido está en función de las fuerzas intermoleculares que restringen el movimiento molecular. Estas fuerzas dependen del espaciamiento intermolecular el cual determina el volumen libre y se ven afectadas por los cambios de temperatura. A temperaturas más altas, la energía térmica de la molécula incrementa con el aumento de las distancias intermoleculares, causando la reducción de las fuerzas intermoleculares y consecuentemente la viscosidad disminuye (Hasan y Nurhan, 2004; Soto-Caballero *et al.*, 2016).

A través de los análisis fisicoquímicos y reológicos, se concluyó que la degradación del Dextrana se lleva a cabo de manera más eficiente en el mosto fermentado (además de su pH óptimo,

Brix y temperatura favorable en condiciones de operación industrial). Estos resultados son importantes en términos de mejora de la eficiencia a escala industrial.

3.5 Optimización de hidrólisis enzimática de Dextrana

A partir de los resultados de hidrólisis enzimática de Dextrana, obtenidos mediante el análisis de varianza (ANOVA), se llevó a cabo la optimización de la degradación.

3.5.1 Hidrólisis de Dextrana y análisis estadístico

Se estudiaron los efectos de la relación enzima-sustrato, temperatura de proceso y tiempo sobre la reducción de Dextrana presente en el mosto fermentado obtenido de la empresa. Esto se llevó a cabo mediante la metodología de superficie de respuesta, que es una estrategia experimental y de modelación que permite encontrar condiciones de operación óptima de un proceso (Gutiérrez-Pulido y De la Vara-Salazar, 2008). La metodología del diseño de superficie de respuesta se utiliza con frecuencia para refinar los modelos después de haber determinado los factores importantes utilizando diseños de cribado o diseños factoriales, especialmente si se sospecha que existe curvatura en la superficie de respuesta (MINITAB, 2017).

Previamente a la experimentación, se llevó a cabo la determinación de dextrana contenida en el mosto fermentado (mosto muerto) obtenido de la empresa con la que se trabajó. Se encontró la cantidad de 1565.6803 ppm de Dextrana.

En la Tabla 3.23 se muestran cada uno de los tratamientos llevados a cabo, donde pueden observarse los resultados obtenidos en cuanto a degradación de Dextrana mediante hidrólisis enzimática. El porcentaje de degradación fue obtenido en base a la disminución de concentración (ppm) de Dextrana a través del tiempo, mostrado en la ecuación 5.

$$Y(\%) = [(C_0 - C_f)/C_0] * 100 \quad \text{Ec. (5)}$$

Donde Y se refiere al % de degradación, C_0 representa la concentración inicial de dextrana (ppm) en mosto muerto y C_f representa la concentración final (ppm) en cada tratamiento.

Tabla 3.23 Tratamientos y resultados obtenidos en cuanto a degradación de Dextrana.

| Tratamiento | Variables codificadas | | | Variables naturales | | | Dextrana (ppm) | Degradación (%) |
|-------------|-----------------------|------|-----|---------------------|--------|-----|----------------|-----------------|
| | [°C] | [mL] | [h] | [°C] | [mL] | [h] | | |
| 1 | -1 | -1 | -1 | 30 | 1:250 | 3 | 1552.3694 | 0.85017 |
| 2 | -1 | 1 | -1 | 30 | 1:1250 | 3 | 1482.3791 | 5.3204 |
| 3 | -1 | 1 | 1 | 30 | 1:1250 | 5 | 1348.2102 | 13.8898 |
| 4 | -1 | -1 | 1 | 30 | 1:250 | 5 | 1163.8637 | 25.664 |
| 5 | 1 | -1 | -1 | 40 | 1:250 | 3 | 1305.2955 | 16.6307 |
| 6 | 1 | 1 | -1 | 40 | 1:1250 | 3 | 1218.8615 | 22.1513 |
| 7 | 1 | 1 | 1 | 40 | 1:1250 | 5 | 1045.6860 | 33.2120 |
| 8 | 1 | -1 | 1 | 40 | 1:250 | 5 | 839.2084 | 46.3997 |
| 9 | 0 | 0 | -1 | 35 | 1:750 | 3 | 1248.1261 | 20.2821 |
| 10 | 0 | 0 | 1 | 35 | 1:750 | 5 | 1003.8704 | 35.8828 |
| 11 | 0 | -1 | 0 | 35 | 1:250 | 4 | 1118.5917 | 28.5555 |
| 12 | 0 | 1 | 0 | 35 | 1:1250 | 4 | 614.8600 | 60.7288 |
| 13 | -1 | 0 | 0 | 30 | 1:750 | 4 | 1330.3901 | 15.0279 |
| 14 | 1 | 0 | 0 | 40 | 1:750 | 4 | 1466.1586 | 6.3564 |
| 15 | 0 | 0 | 0 | 35 | 1:750 | 4 | 1237.8708 | 20.9371 |

A simple inspección puede observarse que los tratamientos 8 y 12 son los que mejores resultados arrojan en cuanto a degradación de dextrana mediante hidrólisis enzimática. Sin embargo, los datos fueron analizados en el software estadístico NCSS 2007 y MINITAB 2018 para obtener el modelo adecuado a los efectos de los factores sobre la reducción de dextrana presente en el mosto fermentado. A partir de este modelo se obtuvieron los gráficos necesarios para el análisis de los rangos óptimos.

La Figura 3.33 muestra la dextranasa utilizada y uno de los tratamientos de hidrólisis llevados a cabo durante la experimentación.



Figura 3.33 Dextranasa y uno de los tratamientos de degradación de Dextrana.

En la Tabla 3.24 se muestra el análisis de varianza (ANOVA) cuadrático completo incluyendo todos los términos del diseño de superficie de respuesta.

Tabla 3.24 ANOVA de hidrólisis enzimática de Dextrana en mosto fermentado.

| Fuente | GL | Suma de cuadrados | Media de cuadrados | Valor F | Valor P |
|----------------------------------|----|-------------------|--------------------|---------|----------|
| Modelo | 9 | 1403.416 | 350.854 | 1.98 | 0.236286 |
| Lineal | 3 | 1245.81 | 415.271 | 2.34 | 0.190 |
| X1 | 1 | 409.57 | 409.572 | 2.31 | 0.189 |
| X2 | 1 | 29.59 | 29.592 | 0.17 | 0.700 |
| X3 | 1 | 806.65 | 806.649 | 4.55 | 0.086 |
| Cuadrado | 3 | 1263.29 | 421.097 | 2.37 | 0.187 |
| X1*X1 | 1 | 986.90 | 986.896 | 5.56 | 0.065 |
| X2*X2 | 1 | 530.21 | 530.206 | 2.99 | 0.144 |
| X3*X3 | 1 | 12.45 | 12.450 | 0.07 | 0.802 |
| Interacción de 2 factores | 3 | 159.66 | 53.220 | 0.30 | 0.825 |
| X1*X2 | 1 | 0.02 | 0.016 | 0.00 | 0.993 |
| X1*X3 | 1 | 6.93 | 6.931 | 0.04 | 0.851 |
| X2*X3 | 1 | 152.71 | 152.712 | 0.86 | 0.396 |
| Error | 5 | 886.97 | 177.394 | | |
| Total | 14 | 3555.73 | | | |

Se observa que los factores temperatura y relación no son estadísticamente significativos ($p \geq 0.10$), por el contrario el factor tiempo si lo es ($0.086 \leq 0.10$). El término cuadrado de temperatura muestra también significancia ($0.065 \leq 0.10$) en la reducción de dextrana presente en el mosto fermentado.

El modelo de segundo orden obtenido es mostrado a continuación:

$$y = 28.41365 + 6.399783 X_1 + 1.720223 X_2 + 8.981363 X_3 - 19.59064 X_1^2 + 14.35937 X_2^2 - 2.200335 X_3^2 - 4.539125E - 02 * X_1X_2 + 0.9308087 * X_1X_3 - 4.369091 * X_2X_3$$

Ec. (6)

Donde y es el porcentaje de degradación (%), X_1 es el factor temperatura, X_2 es el factor relación y X_3 es el factor tiempo. El modelo obtenido representa el comportamiento de las variables independientes (temperatura, relación y tiempo) con respecto a la variable independiente (% de Degradación) con un coeficiente de determinación (R^2) de 0.7505. Podemos decir que el 75.05 % de la variación observada en la hidrólisis enzimática es explicada por el modelo obtenido. Se infiere que este valor obtenido fue afectado por la misma técnica de determinación de dextrana utilizada. El valor de R^2 deberá estar por encima del 70 %, valor mínimo para fines de optimización (Gutiérrez-Pulido y De la Vara-Salazar, 2008; Montgomery, 1991).

Es una práctica común utilizar la muestra de residuos para comprobar los supuestos del modelo, ya que, si los supuestos se cumplen, los residuos o también conocidos como residuales se pueden ver como una muestra aleatoria de una distribución normal con media cero y varianza constante (UNAM, 2018). Un análisis adecuado de los residuos proporciona información adicional sobre la calidad del ajuste del modelo de regresión y de esa manera es posible verificar si el modelo es adecuado (Gutiérrez-Pulido y De la Vara-Salazar, 2008). La Figura 3.34 muestra el gráfico de residuales donde se verifica el cumplimiento del supuesto de

normalidad, se observa una tendencia a la linealidad. Se concluye que el supuesto de normalidad es correcto.

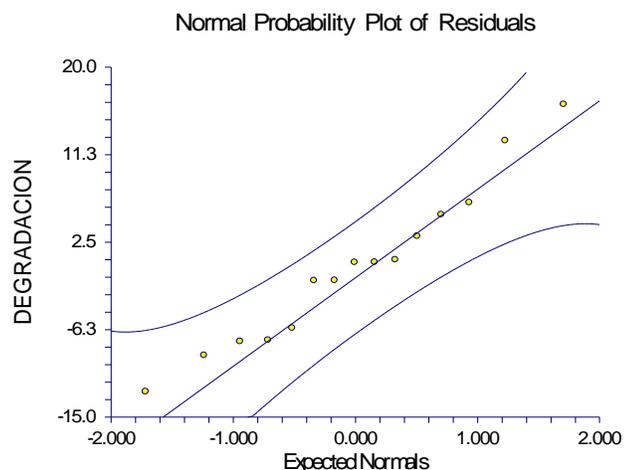


Figura 3.34 Gráfico de probabilidad normal de residuales.

3.5.2 Superficies de respuesta y gráficos de contorno

La metodología de superficie de respuesta representa una técnica de optimización para hacer eficientes los tratamientos experimentales. Esto permite reducir costos en tiempo y experimentación, por lo que actualmente es aplicada ampliamente en diversas áreas con muy buenos resultados (Del Ángel-Sánchez *et al.*, 2015).

A partir de los datos y del modelo de segundo orden obtenido, se procedió a obtener las superficies de respuesta y los gráficos de contorno, los cuales fueron analizados con el fin de encontrar el rango óptimo para la obtención de mejores resultados en la hidrólisis enzimática de dextrana. En la Figura 3.35 y 3.36 se muestran, respectivamente, las superficies de respuesta y los gráficos de contornos obtenidos a partir de dos factores, manteniendo constante el tercer factor.

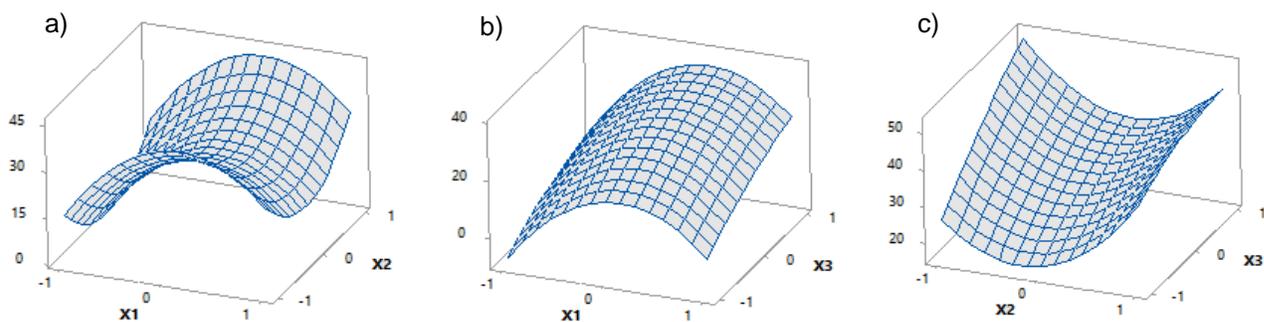


Figura 3.35 Superficies de % de degradación: a) temperatura vs relación, b) temperatura vs tiempo y c) relación vs tiempo.

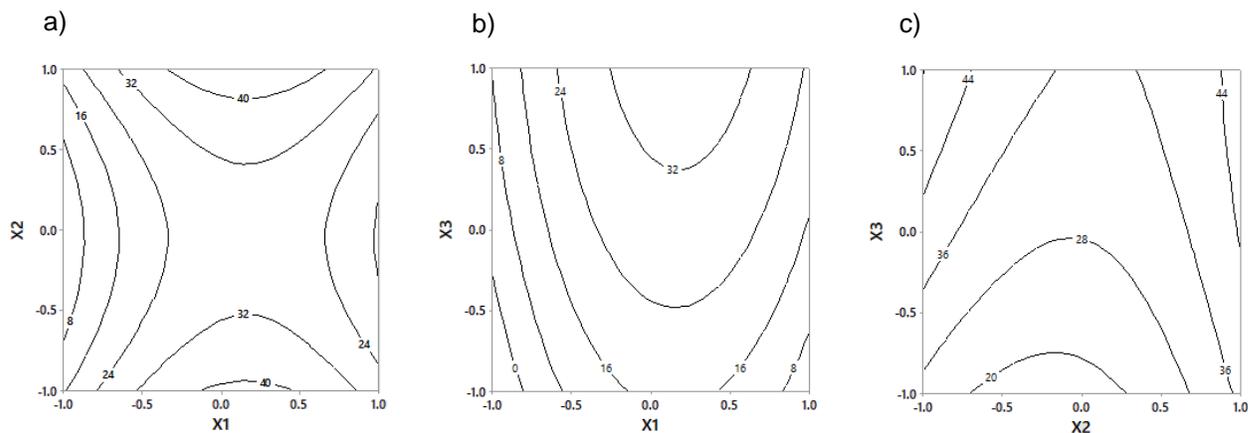


Figura 3.36 Gráficos de contornos de % de degradación: a) temperatura vs relación, b) temperatura vs tiempo y c) relación vs tiempo.

El primer gráfico (a) en ambas figuras muestran la relación entre los factores temperatura y relación. Se observa un punto estacionario (punto de silla) cerca del centro del diseño, a partir del cual al aumentar o disminuir el factor temperatura se produce una disminución en la respuesta, y al aumentar o disminuir el factor relación se produce un aumento en la respuesta. A partir del gráfico de contornos se puede decir que se obtiene una mayor degradación de dextrana a nivel medio de temperatura (35°C) tanto a nivel bajo como alto de relación (1:250 y 1:1250 mL).

En el segundo gráfico (b) en ambas figuras donde se presenta la relación entre los factores temperatura y tiempo, se observa un sistema de cordilleras. En este tipo de sistema no pueden hacerse inferencias acerca del verdadero punto estacionario porque este está fuera de la región de exploración, sin embargo, pueden obtenerse información importante (Montgomery, 2004). Se observa que la mayor reducción de Dextrana se obtiene al mantener la temperatura a nivel medio (35°C) y nivel alto en cuanto a tiempo (5 h). Al aumentar el factor tiempo se produce un aumento en la respuesta, en este caso, la degradación de dextrana. Por causa de restricciones físicas del proceso industrial no es viable extender el tiempo de reacción en los experimentos, por lo que se toma el tiempo alto como recomendable pues mantiene la respuesta en el rango deseado.

En el tercer gráfico (c) de ambas figuras se muestra la relación entre los factores relación y tiempo. Al igual que en el segundo gráfico no se observa un punto estacionario, pero se obtiene información importante. Se observa que al incrementar o disminuir el factor relación (1:250 y 1:1250 mL) se obtiene una mayor respuesta, la cual aumenta al incrementar el tiempo (5 h).

A partir de lo anterior se consideran el nivel medio de temperatura (35°C), nivel alto de tiempo (5 h) y, el nivel alto de relación (1:1250 mL) como recomendables con miras de optimización, ya que la hidrólisis enzimática de Dextrana se lleva a cabo con mejor desempeño. Estos resultados son muy convenientes para la implementación a nivel industrial, ya que la temperatura a la cual está el mosto al final de la fermentación es muy similar a la que arrojó mejores resultados en la experimentación. Para fines de optimización de recursos, la relación que se toma es la del nivel alto, ya que se puede tratar un mayor volumen de mosto con un determinado volumen de enzima.

Cabe destacar que mediante esta optimización se obtuvo una degradación máxima de 60.72 % en una relación enzima-sustrato de 1:1250 mL, muy cercana al 64.767 % a una relación-enzima sustrato de 1:100 mL obtenido en el diseño de escrutinio.

3.5.3 Determinación de parámetros reológicos estacionarios y dinámicos

Previo y posterior a la degradación enzimática llevada a cabo, se realizaron análisis reológicos con el fin de determinar parámetros estacionarios y dinámicos para su estudio y comparación.

3.5.3.1 Análisis en flujo estacionario

En la Figura 3.37 se observan los comportamientos de los tratamientos a 30°C (Exp 1, 2, 3, 4 y 13), comparados con el comportamiento del mosto fermentado (MF) a la misma temperatura. Cabe mencionar que se los reogramas se realizaron tomando en cuenta las mismas temperaturas entre MF y tratamientos. Todos los tratamientos a 30°C presentaron características de fluido dilatante (shear thickening), mostrando un comportamiento de flujo mayor a uno ($n > 1$). El modelo de Herschel-Bulkley describió la relación esfuerzo de corte-velocidad de corte presentada por cada tratamiento.

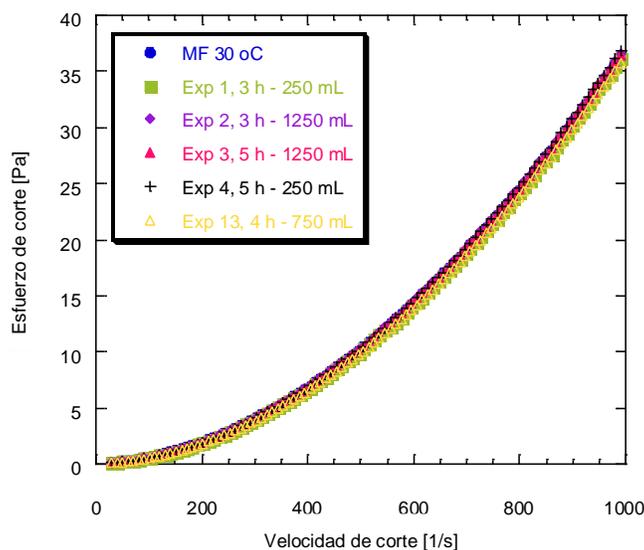


Figura 3.37 Comportamiento de tratamientos a 30°C.

Los tratamientos (Exp 9, 10, 11, 12 y 15) y el MF a 35°C presentaron las mismas características dilatantes (Figura 3.38), mostrando un comportamiento de flujo mayor a uno ($n > 1$). El modelo de Herschel-Bulkley describió de manera satisfactoria el ajuste de curvas de flujo.

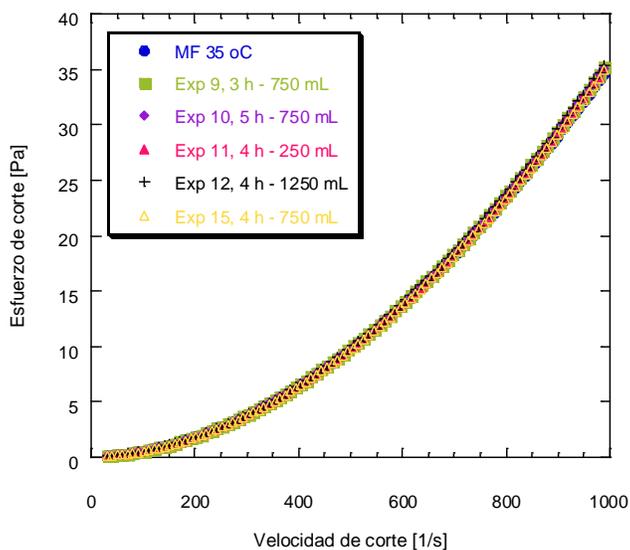


Figura 3.38 Comportamiento de tratamientos a 35°C.

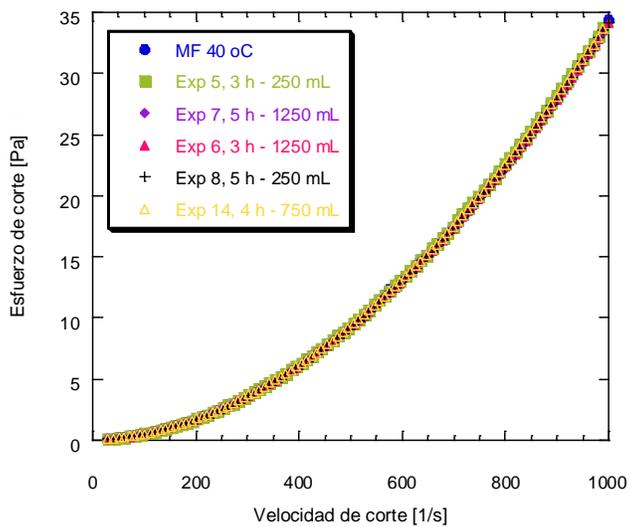


Figura 3.39 Comportamiento de tratamientos a 40°C.

El comportamiento a 40°C, tanto del MF como de los tratamientos (Exp 5, 6, 7, 8 y 14) se muestra en la Figura 3.39. Al igual que los anteriores, se observan comportamientos espesantes mostrando un índice de flujo mayor a uno ($n > 1$). El modelo de Herschel-Bulkley

fue utilizado para describir su comportamiento reológico.

Tabla 3.25 Modelos experimentales obtenidos de cada tratamiento.

| Tratamiento | Temperatura [°C] | Modelo experimental | R ² |
|-------------|------------------|---|----------------|
| MF | 30 | $\sigma = 0.0783 + 9.838 \times 10^{-5} \dot{\gamma}^{1.858}$ | 0.9936 |
| EXP 1 | 30 | $\sigma = 0.0852 + 8.562 \times 10^{-5} \dot{\gamma}^{1.877}$ | 0.9927 |
| EXP 2 | 30 | $\sigma = 0.0687 + 1.015 \times 10^{-4} \dot{\gamma}^{1.854}$ | 0.9917 |
| EXP 3 | 30 | $\sigma = 0.0764 + 9.951 \times 10^{-5} \dot{\gamma}^{1.857}$ | 0.9922 |
| EXP 4 | 30 | $\sigma = 0.0834 + 9.268 \times 10^{-5} \dot{\gamma}^{1.868}$ | 0.9925 |
| EXP 13 | 30 | $\sigma = 0.0676 + 8.322 \times 10^{-5} \dot{\gamma}^{1.88}$ | 0.9942 |
| MF | 35 | $\sigma = 0.0711 + 9.316 \times 10^{-5} \dot{\gamma}^{1.859}$ | 0.992 |
| EXP 9 | 35 | $\sigma = 0.0786 + 8.784 \times 10^{-5} \dot{\gamma}^{1.87}$ | 0.9925 |
| EXP 10 | 35 | $\sigma = 0.0858 + 8.301 \times 10^{-5} \dot{\gamma}^{1.878}$ | 0.9927 |
| EXP 11 | 35 | $\sigma = 0.0891 + 7.967 \times 10^{-5} \dot{\gamma}^{1.883}$ | 0.9933 |
| EXP 12 | 35 | $\sigma = 0.0939 + 8.472 \times 10^{-5} \dot{\gamma}^{1.876}$ | 0.9924 |
| EXP 15 | 35 | $\sigma = 0.0783 + 8.139 \times 10^{-5} \dot{\gamma}^{1.879}$ | 0.9939 |
| MF | 40 | $\sigma = 0.0802 + 8.075 \times 10^{-5} \dot{\gamma}^{1.876}$ | 0.9924 |
| EXP 5 | 40 | $\sigma = 0.0905 + 7.818 \times 10^{-5} \dot{\gamma}^{1.88}$ | 0.993 |
| EXP 6 | 40 | $\sigma = 0.0712 + 7.827 \times 10^{-5} \dot{\gamma}^{1.879}$ | 0.9933 |
| EXP 7 | 40 | $\sigma = 0.0735 + 7.618 \times 10^{-5} \dot{\gamma}^{1.882}$ | 0.9933 |
| EXP 8 | 40 | $\sigma = 0.0916 + 6.984 \times 10^{-5} \dot{\gamma}^{1.896}$ | 0.9941 |
| EXP 14 | 40 | $\sigma = 0.0786 + 7.812 \times 10^{-5} \dot{\gamma}^{1.88}$ | 0.9929 |

La Tabla 3.25 muestra los comportamientos y ajustes al modelo Herschel-Bulkley de cada uno de los tratamientos a las temperaturas correspondientes. También se muestran los índices de determinación (R²) obtenidos. En general el índice de consistencia (K) disminuye al

incrementar la temperatura, llegando a presentar valores menores a 40°C. A esta temperatura la viscosidad de los tratamientos disminuye muy ligeramente en comparación al mosto sin tratar a la misma temperatura. Tanto el esfuerzo de corte inicial (σ_0) como el índice de comportamiento de flujo (n) no presentan cambios muy significativos, se infiere que esto es debido a que la hidrólisis de Dextrana resulta en un decremento gradual en el peso molecular promedio. Por tanto, la Dextrana de alto peso molecular inicial es hidrolizada paso a paso a fragmentos de menor peso molecular, los cuales a su vez son hidrolizados a oligosacáridos, isomaltriosa e isomaltosa (Abraham *et al.*, 2016). Entonces, aunque exista un decremento en altos pesos moleculares, sigue habiendo presencia de compuestos de menor peso molecular.

Además, el método de *Roberts' Copper* utilizado para la cuantificación de Dextrana en esta optimización, no es capaz de monitorear el tamaño de reducción de la Dextrana exceptuando moléculas con tres o menos unidades de glucosa involucradas.

3.5.3.2 Análisis en flujo dinámico

- SAOS

Las posibles propiedades viscoelásticas del mosto fermentado dentro de la región viscoelástica lineal (LVE) fueron estudiadas mediante barridos de amplitud y barridos de frecuencia. Éste análisis de flujo en corte oscilatorio de amplitud pequeña (SAOS) se llevó a cabo en el mosto previo y posterior a los tratamientos llevados a cabo.

Los barridos de amplitud se llevaron a cabo en un intervalo de 0.00001 a 1000 %, a 10 rad/s de frecuencia. Por otra parte, los barridos de frecuencia se llevaron a cabo en un intervalo de 0.01 a 100 rad/s, a 1 % de deformación (de acuerdo a la región LVE en el barrido de amplitud). Las Figuras 3.40 y 3.41 muestran los reogramas de barrido de amplitud obtenidos de los experimentos 1, 2, 7 y 9. El comportamiento mostrado en los barridos fue muy similar en todas las muestras analizadas. En general, el comportamiento elástico (módulo de almacenamiento)

(G') prevaleció sobre el viscoso (módulo de pérdida) (G'') en la región lineal, no se observa punto de cruce.

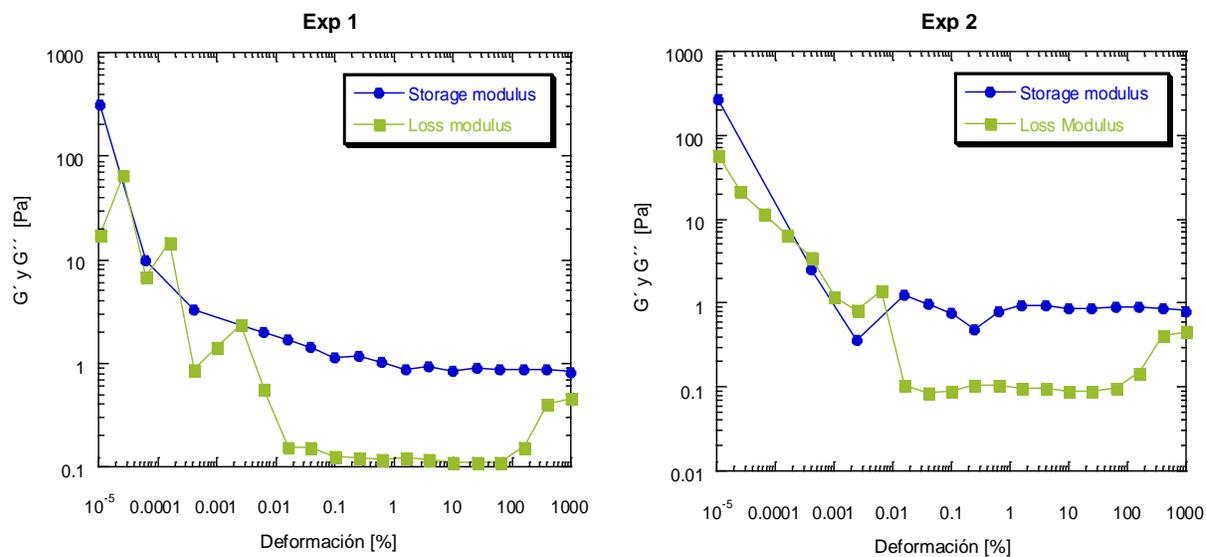


Figura 3.40 Barrido de amplitud de EXP 1 y 2, a 30°C.

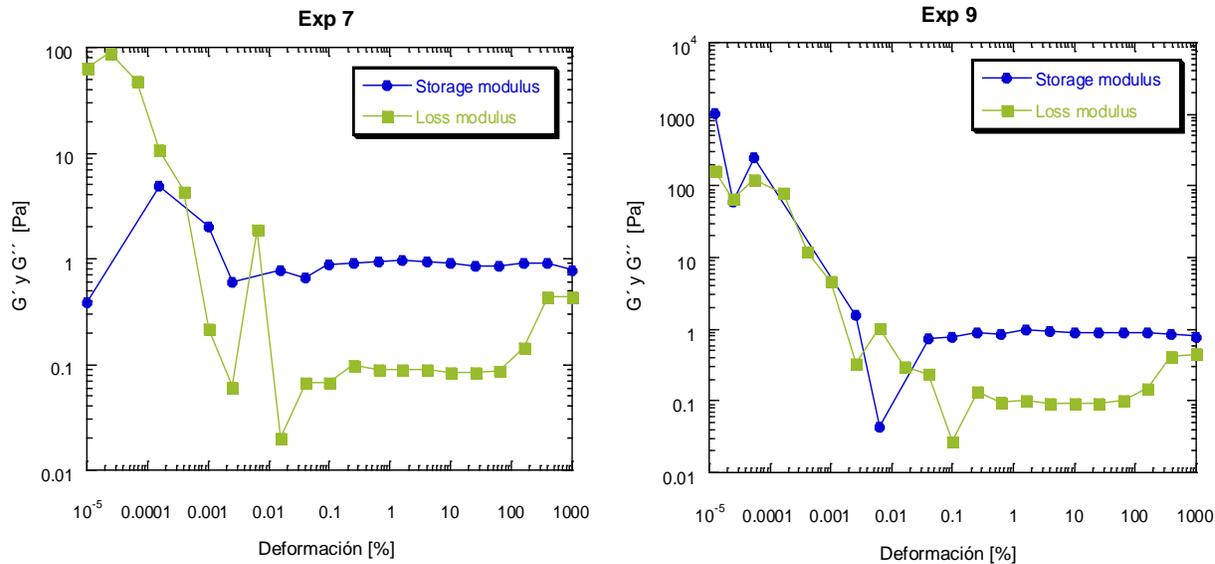


Figura 3.41 Barrido de amplitud de EXP 7 y 9, a 40 y 35°C.

Las Figuras 3.42 y 3.43 muestran los reogramas de barrido de frecuencia obtenidos de los experimentos 1, 2, 7 y 9. El comportamiento mostrado en los barridos fue muy similar en todas las muestras analizadas.

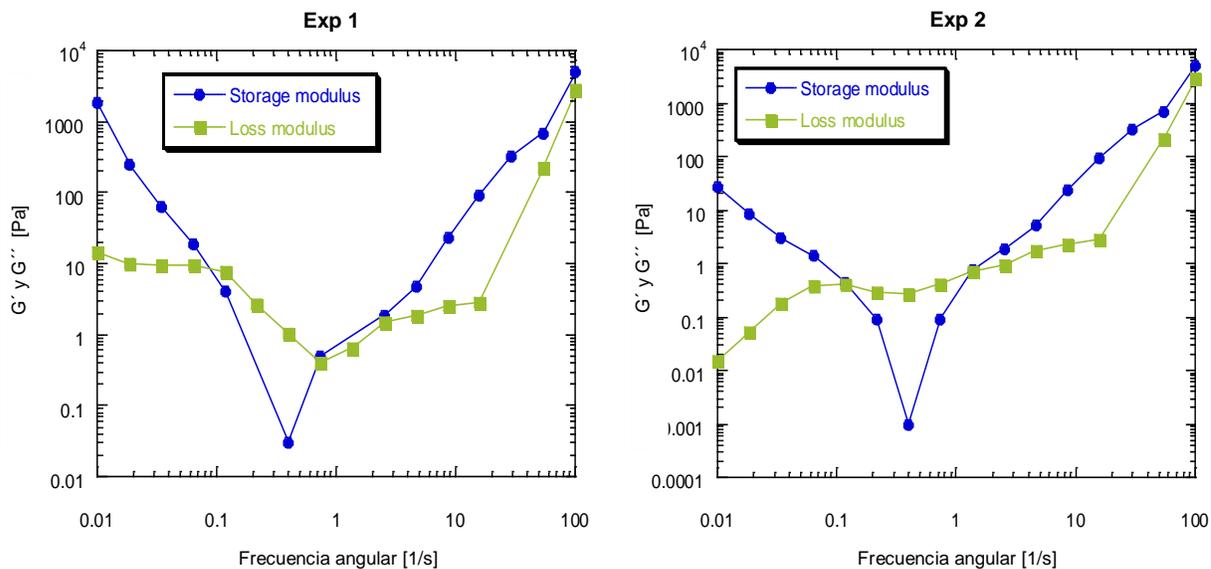


Figura 3.42 Barrido de frecuencia de EXP 1 y 2, a 30°C.

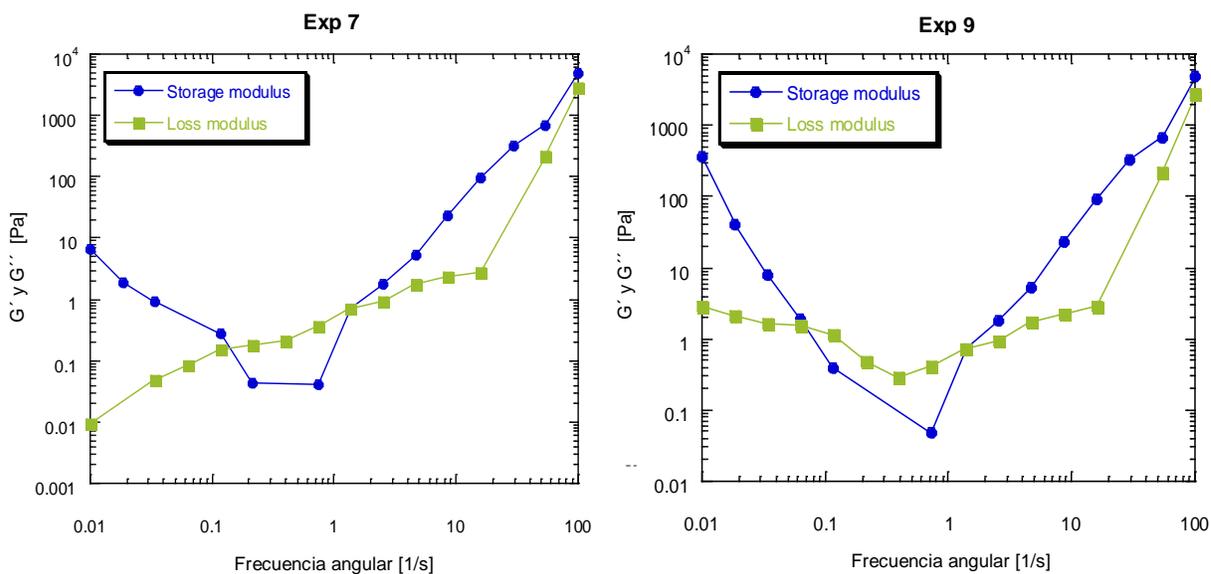


Figura 3.43 Barrido de frecuencia de EXP 7 y 9, a 40 y 35°C.

El comportamiento mostrado en ambos barridos de frecuencia fue muy similar en todas las muestras analizadas. No se observan comportamientos concluyentes, pues durante el barrido cambian los comportamientos de manera continua. Existen dos puntos de cruce: antes del primero, el modulo elástico prevalece sobre el módulo viscoso y después del primer punto de cruce los módulos se intercambian. Posteriormente, después del segundo punto de cruce, el módulo elástico vuelve a prevalecer sobre el viscoso. El comportamiento de los módulos tiende a disminuir y posteriormente a aumentar.

- **LAOS**

Fueron estudiadas las posibles propiedades viscoelásticas del mosto fermentado dentro de la región viscoelástica no lineal mediante barridos de amplitud y barridos de frecuencia. Se realizaron barridos de amplitud de 0.1 a 1000 % a 10 rad/s para encontrar la región viscoelástica no lineal. En la Figura 3.44 se muestra el barrido de amplitud del EXP 1, donde al igual que en el estudio en SAOS, se observa el módulo elástico prevaleciendo sobre el módulo viscoso durante todo el barrido. No se observa punto de cruce. Cabe mencionar que todos los tratamientos mostraron un comportamiento muy similar.

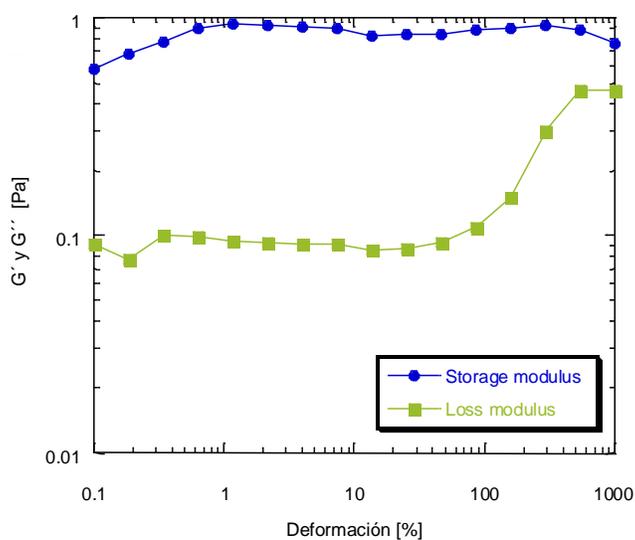


Figura 3.44 Barrido de amplitud de EXP 1 a 30°C.

Posteriormente se realizaron barridos de frecuencia dentro de la región no lineal de 0.01 a 100 rad/s a 10 y 100 % de amplitud, pero no se obtuvieron resultados concluyentes y muchos puntos inválidos. Se infiere que éste comportamiento es debido a la naturaleza de la muestra.

Con todo el estudio llevado a cabo se concluye que el sitio más adecuado dentro de la empresa para realizar la hidrólisis enzimática es en las tinas de mosto fermentado, antes de entrar a destilación. Con respecto al tiempo de residencia, se obtienen mejores resultados cuando éste es mayor, pero se podría realizar el tratamiento 5 horas previo a la destilación. En cuestión de relación de volúmenes enzima-sustrato a nivel industrial, se tratará este tema en el apartado de análisis preliminar de costos.

3.6 Correlaciones reocinéticas

A partir de los datos de degradación de Dextrana obtenidos mediante el diseño de optimización y los parámetros reológicos estacionarios obtenidos, se construyó una gráfica de comparación con el propósito de obtener correlaciones importantes (Figura 3.45).

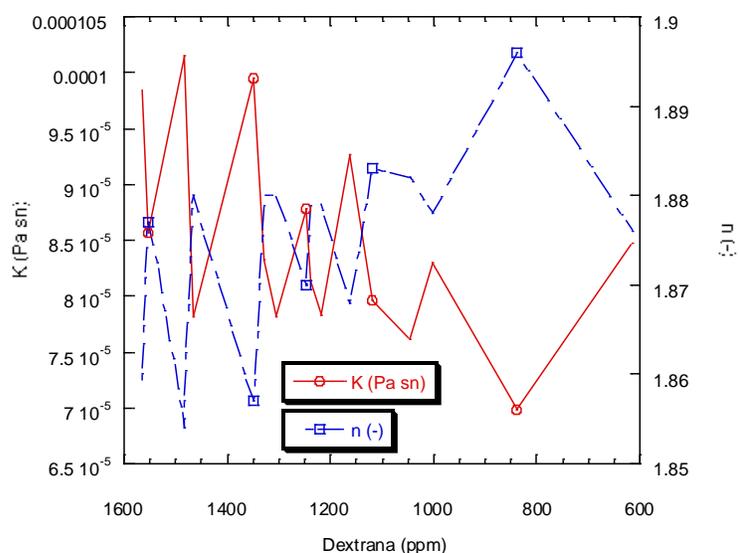


Figura 3.45 Correlación reocinética de degradación de Dextrana.

Se compararon el índice de consistencia (K) y el índice de comportamiento de flujo (n) contra la cinética de degradación del Dextrana en ppm. Cabe mencionar que el eje "X" muestra la degradación de mayor a menor, siendo el punto 1 la Dextrana contenida en el mosto sin tratar y el punto 16 el experimento que obtuvo la mayor degradación.

En general se observa que, a medida que se degrada la Dextrana se muestra una tendencia de reducción de K . Como se vio antes, K es un indicador de la naturaleza viscosa del sistema: menores valores de K indican una naturaleza menos viscosa y aumento de la fluidez. Por otro lado n incrementa en la misma proporción que la disminución de K , se observa el comportamiento antagónico de los dos parámetros reológicos graficados. Se concluye que la correlación reocinética obtenida muestra y corrobora la reducción en la concentración de sólidos contenidos (Dextrana) en el mosto fermentado debido a la hidrólisis enzimática.

Cabe mencionar que no se lograron realizar las correlaciones con los datos dinámicos (SAOS y LAOS) debido a la naturaleza del mosto fermentado (valores muy pequeños de K y altos de n) ya que no presenta un comportamiento viscoelástico contundente. Es necesario llevar a cabo estas pruebas y correlaciones en muestras de incrustación (antes y después del tratamiento de hidrólisis enzimática) a escala piloto.

3.7 Validación de alternativa de solución

Se evaluaron las posibles vías de validación para la alternativa de solución al problema de incrustación. A continuación, se describe cada una de ellas.

3.7.1 Empleo de infraestructura existente

Se llevó a cabo la pesquisa pertinente en cuanto a la existencia de columnas viables para la validación, obteniéndose lo siguiente:

- **Columna intercambiable**

Existe una columna intercambiable (Figura 3.46) en el laboratorio de ingeniería química, con las siguientes especificaciones:

Tabla 3.26 Especificaciones de columna intercambiable.

| | |
|--|-----------------------|
| Material | Vidrio Pyrex |
| Capacidad | 10 L |
| Primera columna | Tubos rasching |
| Segunda columna | Platos perforados (6) |
| Cada plato cuenta con sensor de temperatura | |

Se concluyó que no es factible utilizar esta columna, primeramente, por el tipo de material de ésta. La afinidad de la Dextrana con respecto al vidrio no es igual que con el acero inoxidable. También la composición del empaquetamiento y el número de platos no es la indicada para emular las condiciones de la empresa.



Figura 3.46 Columna intercambiable.

- **Columna de destilación instantánea**

Otra de las columnas existentes en el laboratorio de ingeniería química es una columna de destilación instantánea (Figura 3.47). Esta está construida con acero inoxidable T 304 con una capacidad de 10 L. Se evaluará para su posible uso.



Figura 3.47 Columna de destilación instantánea.

- **Columna de destilación**

Finalmente, existe una columna de destilación de acero inoxidable (Figura 3.48) con las siguientes características:

Tabla 3.27 Especificaciones de columna de destilación.

| | |
|---|--------------------------------------|
| Material | Acero Inoxidable T 304 |
| Capacidad | 200 L |
| Tipos de platos | Calota (21 contando el del hervidor) |
| Altura | 10 m |
| La alimentación se da a través de la caldera | |

A esta columna le hacen falta válvulas y el controlador no funciona. Además de que el volumen de su capacidad es muy alto para los fines que necesitamos. Por lo tanto, se concluyó que no es viable su utilización.



Figura 3.48 Columna de destilación.

3.7.2 Disminución de escala de columna industrial

Fueron obtenidos los datos necesarios provenientes de la columna ubicada en la empresa. La columna está compuesta de 2 columnas en sí, la primera parte consta de 6 platos de calotas y la segunda consta de 18 platos perforados. En la Figura 3.49 se aprecia el esquema general de la columna de destilación existente en la empresa.

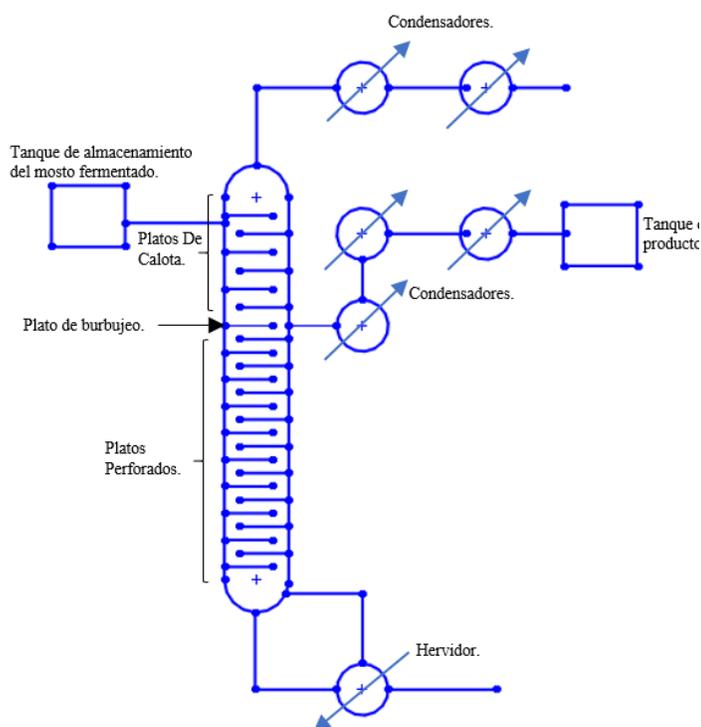


Figura 3.49 Esquema general de la columna de destilación.

En la Tabla 3.28 se muestran los datos recabados para poder realizar la disminución de escala pertinente.

Tabla 3.28 Datos obtenidos de la columna en la empresa.

| Datos de ambas columnas | | | | |
|------------------------------------|------------------------------------|------|----------------------------|--------|
| Especificaciones | Unidades en sistema internacional | | Unidades en sistema inglés | |
| | Altura de las dos columnas juntas. | 17.5 | m | 57.414 |
| Diámetro de las dos columna. | 2.5 | m | 98.425 | in |
| No total de platos | 24 platos | | | |
| Material de construcción | SS T-304 | | | |
| Datos de la primera columna (A100) | | | | |

| | | | | |
|---|---------------------------------|---|-------------|----|
| Altura de la primera columna. | 7.5 | m | 24.606 | ft |
| Diámetro de la primera columna. | 2.5 | m | 98.425 | in |
| No. De Platos | 6 platos. | | | |
| Tipo de platos | Platos tipo calota, de campana. | | | |
| Distribución del plato | Triángulo equilátero. | | | |
| Número de pasos. | 1 | | | |
| Diámetro de los platos | 2.5 | m | 98.425 | in |
| Espesor de los platos | 0.01 | m | 0.3937 | in |
| Barreno de los platos de calota | 0.0635 | m | 2.499995 | in |
| Distancia entre calotas | 0.0635 | m | 2.499995 | in |
| Distancia entre los platos | 1 | m | 39.37 | in |
| Tamaño del bajante. | 0.8 | m | 31.496 | in |
| Altura del vertedero. | 0.0381001 | m | 0.124998808 | ft |
| Datos de la segunda columna (A101) | | | | |
| Altura de la primera columna. | 10 | m | 32.808 | ft |
| Diámetro de la primera columna. | 2.5 | m | 98.425 | in |
| No. De Platos | 18 platos | | | |
| Tipo de platos | Platos perforados | | | |
| Distribución del plato | Triángulo equilátero. | | | |
| Número de pasos. | 2 | | | |
| Diámetro de los platos | 2.5 | m | 98.425 | in |
| Espesor de los platos | 0.01 | m | 0.3937 | in |
| Barreno de los platos perforados | 0.0127 | m | 0.5 | in |
| Distancia entre los barrenos | 0.0635 | m | 2.499995 | in |
| Tamaño del bajante. | 0.8 | m | 31.496 | in |
| Altura del vertedero. | 0.0381001 | m | 0.124998808 | ft |

Una vez obtenidos los datos se procedió a realizar la disminución de escala de la columna de destilación por similitud.

3.7.2.1 Cálculo y diseño de la columna de destilación

Se realizaron los cálculos pertinentes para la disminución de escala, “*scale down*”, de la columna. Lo anterior, conservando los *criterios de similitud geométrica, cinemática y dinámica* de la columna de destilación A100 ubicada en la empresa en cuestión. Se realizó el diseño de la columna utilizando el software SolidWorks 2016, que es un programa de diseño mecánico en 3D. Se realizó el diseño de la columna utilizando el software SolidWorks 2016, que es un programa de diseño mecánico en 3D. En la Tabla 3.29 se presentan los datos de similitud geométrica (1:10).

Tabla 3.29 Datos de similitud geométrica.

| SIMILITUD GEOMETRICA (1:10) | | | | |
|---|--|---|-----------------------------------|----|
| ESCALA 1:10 | | | | |
| Datos de ambas columnas | | | | |
| Especificaciones | Unidades en sistema internacional | | Unidades en sistema ingles | |
| Altura de las dos columnas juntas. | 1.75 | m | 5.7414 | ft |
| Diámetro de las dos columna. | 0.25 | m | 9.8425 | in |
| No total de platos | 24 platos | | | |
| Material de construcción | SS T-304 | | | |
| Datos de la primera columna (A100) | | | | |
| Altura de la primera columna. | 0.75 | m | 2.4606 | ft |
| Diámetro de la primera columna. | 0.25 | m | 9.8425 | in |
| No. De Platos | 6 platos. | | | |
| No. De calotas por plato | 60 calotas | | | |
| Tipo de platos | Platos tipo calota, de campana. | | | |
| Distribución del plato | Triángulo equilátero. | | | |
| Número de pasos. | 1 | | | |
| Diámetro de los platos | 0.25 | m | 9.8425 | in |
| Espesor de los platos | 0.001 | m | 0.03937 | in |

| | | | | |
|---|-----------------------|---|------------|----|
| Barreno de los platos de calota | 0.00635 | m | 0.2499995 | in |
| Distancia entre calotas | 0.00635 | m | 0.2499995 | in |
| Distancia entre los platos | 0.1 | m | 3.937 | in |
| Tamaño del bajante. | 0.08 | m | 3.1496 | in |
| Altura del vertedero. | 0.00381001 | m | 0.01249988 | ft |
| Datos de la segunda columna (A101) | | | | |
| Altura de la primera columna. | 1 | m | 3.2808 | ft |
| Diámetro de la primera columna. | 0.25 | m | 9.8425 | in |
| No. De Platos | 18 platos | | | |
| Tipo de platos | Platos perforados | | | |
| Distribución del plato | Triángulo equilátero. | | | |
| Número de pasos. | 2 | | | |
| Diámetro de los platos | 0.25 | m | 9.8425 | in |
| Espesor de los platos | 0.001 | m | 0.03937 | in |
| Barreno de los platos perforados | 0.00127 | m | 0.05 | in |
| Distancia entre los barrenos | 0.00635 | m | 0.2499995 | in |
| Tamaño del bajante. | 0.08 | m | 3.1496 | in |
| Altura del vertedero. | 0.00381001 | m | 0.01249988 | ft |

Tomando en cuenta los comentarios y observaciones de parte de la empresa, se decidió hacer el escalamiento solo de la primera parte que compone la columna, la porción de calotas. Esto debido a que, en esta parte de la columna es donde el problema de incrustación es más agudo.

En la Figura 3.50 se observa el esquema realizado de la sección de calotas en la columna. Los planos realizados para esta columna se encuentran en resguardo. Se está evaluando la viabilidad de la construcción de la columna de destilación a nivel piloto para estudios posteriores.

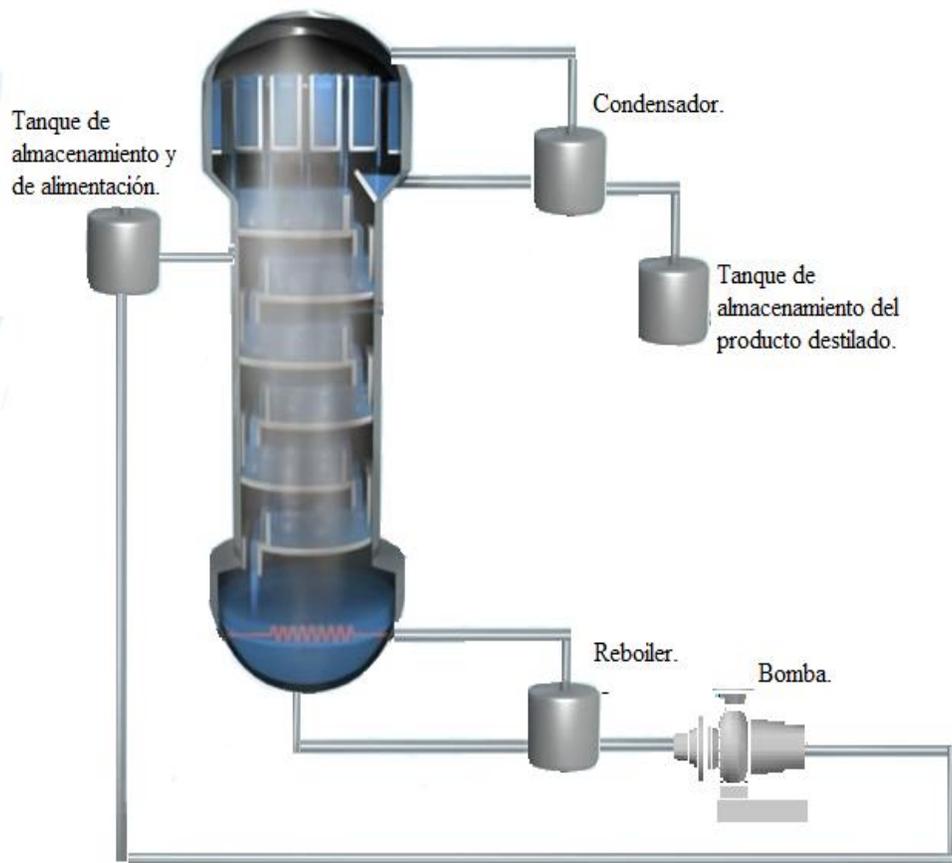


Figura 3.50 Esquema de la sección de calotas.

3.8 Análisis preliminar de costos a nivel industrial

En la práctica empresarial y en el ámbito de cualquier inversionista, el esquema que generalmente se plantea para invertir es el siguiente: dado que se invierte cierta cantidad y que las ganancias probables en los años futuros ascienden a determinada cifra, ¿es razonable hacer la inversión? Lo anterior se puede plantear desde otro punto de vista: el inversionista siempre espera recibir o cobrar cierta tasa de rendimiento en toda inversión, por lo tanto, debe contar con técnicas de análisis que le permiten cuantificar si, con determinada inversión y ganancias probables, en realidad ganará la tasa que él ha fijado como mínima para tomar la decisión de hacer la inversión. La primera regla para tomar decisiones de inversión, como

individuo y como empresa, es que siempre se buscará la mayor ganancia o maximizar la riqueza de los accionistas.

Para tomar la decisión de inversión correcta solo es necesario determinar todos los flujos de efectivo que se esperan del proyecto, así como los ingresos y costos. También en preciso seleccionar adecuadamente la tasa de rendimiento que se desea ganar, que debe ser superior a la tasa mínima vigente en el mercado, ya que se considera sin riesgo.

3.8.1 Tasa mínima aceptable de rendimiento (TMAR)

Todo inversionista deberá tener una tasa de referencia sobre la cual basarse para hacer sus inversiones. La tasa de referencia es la base de la comparación y el cálculo en las evaluaciones económicas que haga. Si no se obtiene cuando menos esa tasa de rendimiento, se rechazará la inversión. La TMAR se puede definir como:

$$TMAR = \textit{tasa de inflación} + \textit{premio al riesgo} \qquad \text{Ec. (7)}$$

El premio al riesgo significa el verdadero crecimiento del dinero, y se le llama así porque el inversionista siempre arriesga su dinero y por arriesgarlo merece una ganancia adicional sobre la inflación. Como el premio es por arriesgar, significa que ha mayor riesgo se merece una mayor ganancia. La determinación de la inflación está fuera del alcance de cualquier analista o inversionista y lo más que se puede hacer es pronosticar un valor, que en el mejor de los casos se acercará un poco a lo que sucederá en la realidad. Lo que sí se puede establecer cuando haga la evaluación económica es el premio al riesgo.

En este caso de estudio (destilería), para calcular el premio al riesgo se puede tomar como referencia lo siguiente: si se desea invertir en empresas productoras de bienes o servicios deberá hacerse un estudio del mercado de esos productos. Si la demanda es estable, es decir,

si tiene pocas fluctuaciones a lo largo del tiempo, y crece con el paso de los años (la demanda del bioetanol ha ido y seguirá en aumento), aunque sea en pequeña proporción, y además no hay una competencia muy fuerte de otros productores, se puede afirmar que el riesgo de la inversión es relativamente bajo y el valor del premio al riesgo puede fluctuar entre 3 y 5%.

La fijación de un valor para el premio al riesgo, y, por lo tanto, para la TMAR es, como su nombre lo indica, el mínimo aceptable. Si la inversión produce un rendimiento muy superior a la TMAR, tanto mejor. La TMAR es una tasa de rendimiento que es fijada por el inversionista que tomó en cuenta las circunstancias y, por lo tanto, es el punto de referencia para decidir sus inversiones.

3.8.2 El valor presente neto (VPN)

El valor presente simplemente significa traer del futuro al presente cantidades monetarias a su valor equivalente. En términos formales de evaluación económica, cuando se trasladan cantidades del presente al futuro se dice que se utiliza una tasa de interés, pero cuando se trasladan cantidades del futuro al presente, como en el cálculo del VPN, se dice que se utiliza una tasa de descuento; por ello, a los flujos de efectivo ya trasladados al presente se les llama flujos descontados.

El VPN se puede utilizar como criterio de selección. Para calcularlo, se trasladan los flujos de los años futuros al tiempo presente y se resta la inversión inicial que ya está en tiempo presente. Los flujos se descuentan a una tasa que corresponde a la TMAR, de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$VPN = -P + \frac{FNE_1}{(1+i)^1} + \frac{FNE_2}{(1+i)^2} + \dots + \frac{FNE_n}{(1+i)^n} \quad \text{Ec. (8)}$$

Donde FNE_n es el flujo neto de efectivo del año n , que corresponde a la ganancia neta después de impuestos en el año n . P se refiere a la inversión inicial en el año cero, e i es la tasa de referencia que corresponde a la TMAR (Baca-Urbina, 2007).

Los criterios para tomar una decisión con el VPN son:

- Si $VPN > 0$, es conveniente aceptar la inversión, ya que se estaría ganando más del rendimiento solicitado.
- Si $VPN < 0$, se debe rechazar la inversión porque no se estaría ganando el rendimiento mínimo solicitado.

3.8.3 Información sobre costos

A partir de las visitas hechas a la empresa en cuestión, se obtuvo la siguiente información:

- Por cada paro por mantenimiento se obtienen 5 toneladas de incrustación de las columnas.
- Diariamente se procesan 1500 toneladas de mosto.
- Cada paro por mantenimiento tiene una duración de 15 días y se hacen en promedio 2 al año.

Puesto que la empresa procesa diariamente 1500 toneladas de mosto se realizaron los cálculos pertinentes para determinar la cantidad en gramos, obteniéndose 1500,000,000 g .

$$1 \text{ ton} = 1000 \text{ kg} = 1,000,000 \text{ g}$$

Posteriormente se obtuvo su valor en mL tomando en cuenta su densidad antes determinada, la cual fue de 1.0297 g/cm^3 , dando un total de $1456,734,971.35 \text{ cm}^3$ de mosto fermentado procesado al día.

De acuerdo a la experimentación llevada a cabo, la relación enzima sustrato que mejor desempeño mostró fue 1:1250 mL, por lo que se toma como referencia para realizar los cálculos a nivel industrial. Cabe mencionar que la enzima se diluyó a una relación 1:5 por recomendación del fabricante, por lo que se tomará la cantidad de dextrana sin diluir para el desarrollo de los cálculos (0.166 mL).

$$mL\ enzima = \frac{0.166\ mL\ enzima\ x\ 1456,734,971.35\ mL\ mosto}{1250\ mL\ mosto} \quad Ec.\ (9)$$

Dando como resultado 193,454.404 mL (193.4544 L) de enzima sin diluir al día.

Por otro lado, se cotizó el precio de la enzima utilizada (ENMEX) para realizar los cálculos respectivos. Los precios de la enzima varían dependiendo de la presentación, pero se tomó como referencia la presentación mínima de 25 kg. El precio es de US\$10.62 + IVA. Como no se especifica la densidad de la enzima, se tomará la del agua como referencia, dando la cantidad de 25 L. Por lo tanto, el costo de inversión por día normal promedio estaría calculado por la siguiente ecuación.

$$costo\ (US\$) = \frac{193.4544\ L\ enzima\ al\ día\ x\ 12.3192\ US\$ \ (IVA\ incluido)}{25\ L\ enzima} \quad Ec.\ (10)$$

Dando como resultado un costo total de 95.3281 US\$ por día normal promedio de procesamiento de mosto, sumando un costo aproximado anual de 34,318.116 US\$.

Cabe mencionar, que el paro aproximado de 30 días al año por mantenimiento de columnas y equipo debido a incrustaciones causa una pérdida aproximada de 3,450,000 L de etanol al año.

Lo que se pretende es reducir, al menos, a la mitad el periodo de paro por manutención (15 días). Para corroborar lo anterior se necesita realizar la validación a nivel piloto y cuantificar la incrustación producida antes y después del tratamiento enzimático. Una vez que se realice éste, se podrán hacer estimaciones y análisis para la toma de decisiones en la empresa.

Con base en la mayor reducción de dextrana obtenida mediante hidrólisis enzimática (60.72 %) se infiere una reducción similar, de al menos 50%, en la incrustación formada en las paredes de la columna. La disminución en la cantidad de dextrana presente en el mosto fermentado conllevaría una reducción en la formación de incrustación y, por ende, una reducción en cuanto a días de paro para el mantenimiento. Con una inversión aproximada de 34,318.116 US\$ al año en dextranasa, la pérdida en cuanto a producción de etanol se reduciría a 1,725,000 L al año. Cabe señalar que aún falta llevar a cabo la validación a escala piloto para poder realizar el análisis VPN correspondiente. Preliminarmente se concluye que se obtiene un beneficio superior a la inversión, aunque aún falta la evaluación económica completa mediante el análisis VPN para averiguar si es conveniente aceptar la inversión, ya que se estaría ganando más del rendimiento solicitado.

De manera general se concluye que, la aplicación de la mejora reo-tecnológica desarrollada en el proceso de producción de bioetanol a nivel industrial es económicamente viable, ya que logra aumentar la eficiencia en la producción además de la obtención de un beneficio económico incrementando los ingresos.

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos en la caracterización fisicoquímica, se concluyó que los mostos presentan el pH (5.18 -5.17) adecuado para llevar a cabo la hidrólisis enzimática. La muestra de incrustación presentó un elevado contenido de sólidos en su composición, SS_T (43.37 g/L), y de DQO_t (485.758 g/L), confirmando su alto contenido de material orgánico.

Diferentes comportamientos reológicos en estado estacionario fueron observados a través del proceso de producción de bioetanol. La melaza y sus transformaciones son claramente afectadas por los cambios de tasa de corte y de temperatura.

A partir del comportamiento reológico en estado estacionario y de las propiedades viscoelásticas obtenidas de la incrustación se confirma el alto contenido de Dextrana en el material de incrustación y es posible concluir que la Dextrana juega el papel principal en el comportamiento elástico de la incrustación y que representa un serio problema dentro del proceso de producción de bioetanol, minimizando su potencial de producción.

Dentro de las propiedades viscoelásticas no lineales (LAOS), se encontró que de acuerdo a las curvas de Lissajous-Bowditch obtenidas a una deformación de 1 %, muestran una forma elíptica apenas distorsionada, lo cual se concluye como un comportamiento viscoelástico no lineal cercano a la transición con la viscoelasticidad en régimen lineal.

En cuanto a la caracterización microbiológica se concluyó que si existe, aunque en mínima cantidad, la bacteria láctica *Leuconostoc mesenteroides* en el mosto en fermentación, aumentando así la cantidad de Dextrana proveniente del proceso anterior y coadyuvando al problema de incrustación.

Se comprobó, fisicoquímica y reológicamente, la hipótesis formulada que argumenta la presencia de Dextrana y debido a su alta concentración (235523.224 ppm), ésta juega un papel importante en las incrustaciones formadas en la pared interna de la columna de destilación.

Se concluyó que las técnicas existentes para la identificación y cuantificación de Dextranas no están diseñadas para muestras complejas que presentan un color tan significativo como en el caso de melazas y mostos provenientes del proceso de producción de bioetanol. Es necesario proponer alternativas de solución para esta problemática, como lo son los métodos de clarificación, que además no afecten el contenido de Dextrana presente en la muestra.

De acuerdo al ANOVA realizado, los 3 factores estudiados presentaron significancia sobre la disminución de color: se recomienda trabajar con concentración nivel 2, agitación nivel 0 y reposo nivel 2 (2 g de Subacetato de Plomo, 10 minutos de agitación y 45 minutos de reposo). A partir del análisis reológico en las muestras, antes y después de clarificar, se concluye que el tratamiento de clarificación no afecta el contenido de Dextrana en el mosto fermentado. Se recomienda seguir investigando sobre la técnica de clarificación y variantes, ya que ésta no es del todo eficiente para las muestras de matriz compleja como lo es el mosto fermentado.

A partir del diseño de experimentos llevado a cabo para hidrólisis enzimática se concluye que el sustrato en el que se obtuvo mayor remoción fue el mosto fermentado, lo cual es considerado una ventaja en este estudio, dado que este mosto es el que será tratado antes de entrar a la columna de destilación. Con respecto a la temperatura, el valor alto (40° C) fue el que mostró mayor remoción. La relación enzima-sustrato no presenta significancia en el estudio. De aquí que, con fines de optimización de recursos, se tomó el valor alto (1:100), donde se ocupa una menor cantidad de enzima en un volumen mayor de sustrato.

Con respecto al estudio reológico, el menor valor de viscosidad se obtuvo con el mosto fermentado como sustrato, relación [1:10] y 40°C de temperatura, en conformidad con los

tratamientos que obtuvieron la mayor reducción de Dextrana.

A partir de las superficies de respuesta y gráficos de contorno construidos, se consideran el nivel medio de temperatura (35 °C), nivel alto de tiempo (5 h) y, el nivel alto de relación (1:1250 mL) como recomendables con miras de optimización, ya que la hidrólisis enzimática de Dextrana se lleva a cabo con mejor desempeño. Estos resultados son muy convenientes para la implementación a nivel industrial, ya que la temperatura a la cual está el mosto al final de la fermentación es muy similar a la que arrojó mejores resultados en la experimentación. Para fines de optimización de recursos, la relación que se toma es la del nivel alto, ya que se puede tratar un mayor volumen de mosto con un determinado volumen de enzima.

Con todo el estudio llevado a cabo se concluye que el sitio más adecuado dentro de la empresa para realizar la hidrólisis enzimática es en las tinas de mosto fermentado, antes de entrar a destilación. Con respecto al tiempo de residencia, se obtienen mejores resultados cuando éste es mayor, pero se podría realizar el tratamiento 5 horas previo a la destilación.

Estos resultados son importantes en cuanto a la originalidad de la información sobre la aplicación de dextranasa a nivel industrial en destilerías para hidrolizar Dextrana.

Se concluyó que la correlación reocinética obtenida muestra y corrobora la reducción en la concentración de sólidos contenidos (Dextrana) en el mosto fermentado debido a la hidrólisis enzimática. Se recomienda llevar a cabo pruebas reológicas y correlaciones en muestras de incrustación (antes y después del tratamiento de hidrólisis enzimática) a escala piloto.

A partir de los cálculos y diagramas desarrollados de la columna de destilación a escala piloto, se recomienda llevar a cabo su construcción y la validación de la alternativa de hidrólisis enzimática tomando en cuenta los resultados obtenidos en este proyecto. Para evaluar la alternativa se propone llevar a cabo pruebas de destilación con mosto fermentado en su forma

original y después del tratamiento de hidrólisis. Durante las pruebas de destilación se deberán tomar 3 muestras de mosto y 3 de incrustado para determinar la respectiva eliminación Dextrana. Al final de cada prueba se deberá cuantificar el material incrustado en la columna y cuantificar cuantitativamente la mejora. De manera concomitante, se deberá realizar el seguimiento reológico pertinente durante las pruebas, esto para la determinación de parámetros reológicos de importancia.

Con base en la mayor reducción de dextrana obtenida mediante hidrólisis enzimática (60.72 %) se infiere una reducción similar, de al menos 50%, en la incrustación formada en las paredes de la columna. La disminución en la cantidad de dextrana presente en el mosto fermentado conllevaría una reducción en la formación de incrustación y, por ende, una reducción en cuanto a días de paro para el mantenimiento. Con una inversión aproximada de 34,318.116 US\$ al año en dextranasa, la pérdida en cuanto a producción de etanol se reduciría a 1,725,000 L al año. Cabe señalar que aún falta llevar a cabo la validación a escala piloto para poder realizar el análisis VPN correspondiente. Preliminarmente se concluye que se obtiene un beneficio superior a la inversión, aunque aún falta la evaluación económica completa mediante el análisis VPN para averiguar si es conveniente aceptar la inversión, ya que se estaría ganando más del rendimiento solicitado.

De manera general se concluye que, la aplicación de la mejora reo-tecnológica desarrollada en el proceso de producción de bioetanol a nivel industrial es económicamente viable, ya que logra aumentar la eficiencia en la producción además de la obtención de un beneficio económico incrementando los ingresos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abraham, K., Hagen, S., Schlumbach, K., Rohde, A., Floter, E. 2016. Dextranase application in sucrose solutions – towards a better understanding. *International Sugar Journal* 118 (1412) 582-588.

AOAC Official Method 988.12. Dextran in Raw Cane Sugar. Roberts Copper Method. First Action 1988. Final Action 1990

Astolfi-Filho Z., Nicoletti Telis V.R., Basilio de Oliveira E., Dos Reis Coimbra J.S., Telis-Romero J. 2011. Rheology and fluid dynamics properties of sugar cane. *Biochemical Engineering Journal*. 53 (2011) 260-265.

Baca-Urbina, G. 2007. Ingeniería Económica. Cuarta edición. Mc Graw Hill, México.

Bashari, M., Jin, Z., Wang, J., Zhan, X. 2016. A novel technique to improve the biodegradation efficiency of dextranase enzyme using the synergistic effects of ultrasound combined with microwave shock. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 35, 125-132.

Bashari, M., Tounkara, F., Abdelhai, M.H., Lagnika, C., Xu, X., Jin, Z. 2013. Impact of dextranase on sugar manufacturing and its kinetic on the molecular weights of remaining dextran. *Sugar Technology* 15(1) 84-93.

Becerra-Pérez, L. A. 2009. La industria del etanol en México. *Economíaunam*. 6 (16).

Bird B.R., Steward W.E., Lightfoot E.N. 2006. Fenómenos de Transporte. Editorial LIMUSA WILEY.

BNDES, CGEE, FAO y CEPAL. 2008. Bioetanol de caña de azúcar: una energía para el desarrollo sostenible. Resumen ejecutivo.

Cantú-Lozano, D. 1987. Caracterización de propiedades reológicas en caldos de fermentación. La Agroindustria en México. Universidad Autónoma Chapingo. México. 2 (1987) 749-761.

Cerutti, G., Michelena, G., Martínez, A., Diez, K., Carrera, E., Legrá, S. 2003. Inhibition by biological methods of *Leuconostoc mesenteroides* in the sugar industry. *Revista ICIDCA Sobre los derivados de la caña de azúcar*. 37 (1): 34 - 38.

Cerutti de Guglielmo, G.I., Diez O.A., Cárdenas, G.J., Oliver, G. 2000. Sucrose utilization and Dextran productions by *Leuconostoc mesenteroides* isolated from Sugar Industry. *The sugar journal*. 62 (10) 36 – 41.

Cho K.S., Hyun K., Ahn K.H., Lee S.J. 2005. A geometrical interpretation of large amplitude oscillatory shear response. *Journal of Rheology*. 49 (2005) 747 - 758

Chou, C.C. 2000. Handbook of sugar refining: a manual for the design and operation of sugar refining facilities. Wiley, New York.

Cuervo-Mulet, R.A., Ledesma, J.A., Durán-Venegas, J.A., Argote-Vega F.E. 2010. Aislamiento y control microbiano de *Leuconostoc mesenteroides*, en un ingenio para optimizar el rendimiento de azúcar y etanol. Facultad de Ciencias Agropecuarias. 8 (2) 31 – 40.

Del Ángel-Sánchez, M.T.; García-Alamilla, P.; Lagunes-Gálvez, L.M.; García-Alamilla, R. y Cabrera-Culebro, E.G. 2015. Aplicación de metodología de superficie de respuesta para la degradación de naranja de metilo con TiO₂ sol-gel sulfatado. *Rev. Int. Contam. Ambie*. 31 (1) 99-106.

Duarte, E., Guillermo A., Polanco, N., López, M. 1982. Análisis microbiológico de productos azucareros. Editorial científico-Técnica. La Habana

Eggleston, G., Dilks, A., Blowers, M., Winters, K. 2011. Successful application of dextranase in sugar beet factories. In: Proceedings of the American Society of Sugarbeet Technologists meeting, March 2-6, 2011, Albuquerque, New Mexico. p. 1-16.

Eggleston, G., Monge, A., Montes, B., Stewart, D. 2009. Application of dextranases in sugarcane factory: Overcoming practical problems. *Sugar Tech* 11 (2) 135-141.

Eggleston, G. and Monge, A. 2005. Optimization of sugarcane factory application of commercial dextranases. *Process Biochemistry* 40, 1881-1894.

Fadel, M., Zohri, A.N.A., El-Dean, A.M.K., Auob, A.H., Deiab, B. 2016. Enhancing ethanol yield from sugar cane molasses fermentation by addition of depolymerising enzymes. *Indian Journal of Applied Research* 6 (8) 291-294.

Fajardo-Castillo E.E. y Sarmiento-Forero S.C. 2007. Evaluación de la melaza de caña como sustrato para la producción de *Saccharomyces cerevisiae*. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias Básicas. *Microbiología Industrial*. Bogotá D.C. Trabajo de grado.

Gaonkar, A. 1995. *Ingredients Interactions. Effects on Food Quality*. Marcel Dekker, Inc. USA.

Gibriel, A.Y., Amin, A.A., Yassien, N. M., El banna, H.A., Khaled, F.M. 2014. Application of immobilized *P. aculeatum* dextranase in sugarcane processing. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences* 3 (9) 1147-1160.

Godoy-Durán, V. 2013. Estudio del impacto de la implementación del proceso de filtrado para reducir los sólidos insolubles presentes en la meladura clarificada en un ingenio azucarero. UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA. Guatemala.

Gómez-Estévez A., Seijo-Santos A., Ramos-Tejera B., Valdés-Cárdenas D. y Cruz-Oruz S. 2011. Recubrimientos anticorrosivos que se requieren en una destilería. Parte I. Propuesta de normalización. ICIDCA Cuba. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar, **45**(3): 38-47, ISSN: 0138-6204 revista@icidca.edu.cu

Grisham C. M. y Reginald H. G. 1999. Biochemistry. Philadelphia: Saunders College Pub. pp. 426–7. ISBN 0-03-022318-0

Gutiérrez-Pulido, H. y De la Vara-Salazar, R. 2008. Análisis y diseño de experimentos. Mc Graw Hill. Segunda edición. México.

Hasan T., Nurhan A. 2004. Mathematical model for prediction of apparent viscosity of molasses. Journal of Food Engineering. 62 (2004) 281-289.

Iqbal, S., Marchetti, R., Aman, A., Silipo, A., Ul Qader, S.A., Molinaro, A. 2017. Enzymatic and acidic degradation of high molecular weight dextran into low molecular weight and its characterizations using novel Diffusion-ordered NMR spectroscopy. International Journal of Biological Macromolecules <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.05.073>

Khalikova, E., Susi, P., Korpela. T. 2005. Microbial Dextran-Hydrolyzing Enzymes: Fundamentals and Applications. *Microbiology Molecular Biology Reviews* 69 (2) 306–325.

Karaman, S. and Kayacier, A. 2011. Effect of temperature on rheological characteristics of molasses: Modeling of apparent viscosity using Adaptive Neuro-Fuzzy Inference System (ANFIS). *LWT-Food Science and Technology*. 44 (2011) 1717-1725.

Kasaai, M. R. 2012. Dilute solution properties and degree of chain branching for dextran. *Carbohydrate Polymers* 88, 273-381.

Kaur, S. and Kaler, R.S.S. 2008. Dextran and its effect on the flow behavior of molasses and crystallization rate. *Journal of Food Engineering*. 86 (2008) 55-60.

Kaur, S., Kaler, R.S.S., Aamarpali. 2002. Effect of starch on the rheology of molasses. *Journal of Food Engineering*. 55 (2002) 319-322.

Liu, J.B., Yu, D., Zhang, J., Yang, M., Wang, Y., Wei, Y., Tong, J. 2016. Rheological properties of sewage sludge during enhanced anaerobic digestion with microwave-H₂O₂ pretreatment. *Water Research* (2016). Doi: 10.1016/j.watres.2016.03.073. In press.

Madigan, M. T., Martinko, J.M., Parker, J. 2004. Brock Biología de la Microorganismos. Décima edición.

Marriaga N. 2009. Indicadores de desempeño de la destilación de Bioetanol. Escuela de Ingeniería Química, Universidad del Valle. 76(159) ISSN 0012-7353

Mathews C.K., Van Holde K.E., Appling D.R., Anthony-Cahill S.J. 2012. Biochemistry. Fourth edition. Prentice Hall. U.S.A.

MINITAB. 2017. Diseños de superficie de respuesta, los diseños centrales compuestos y los diseños de Box-Behnken. <https://support.minitab.com/es-mx/minitab/18/help-and-how->

to/modeling-statistics/doe/supporting-topics/response-surface-designs/response-surface-central-composite-and-box-behnken-designs/

Montgomery, D.C. 1991. Diseño y Análisis de Experimentos. Editorial Iberoamericana. México.

Montgomery, D.C. 2004. Diseño y Análisis de Experimentos. Editorial Limusa Wiley. Segunda edición. México.

Naessens, M., Cerdobbel A., Soetaert W. and Vandamme E. 2005. Leuconostoc dextransucrase and dextran: production, properties and applications. *Chemical Technology and Biotechnology*. 8 (80) 845-860.

Ninchan, B., Vanichsriratana, W., Sriroth, K. 2017. Investigation of the optimized dextran-degrading enzyme conditions on the decomposition of different molecular weights of pure dextran using response surface methodology. *Arch Ind Biotechnol* 1 (1) 8-19.

Naji-Tabasi, S., Razavi, S.M.A. 2016. New studies on basil (*Ocimum bacilium L.*) seed gum: Part III- Steady and dynamic shear rheology. *Food Hydrocolloids* (2016). Doi: 10.1016/j.foodhyd.2015.12.020. In press.

Naveen, K.M., Ravichandra, P., Rama, R.B., Vijai K.G. 2014. Chapter 1- Current Bioenergy Researches: Strengths and Future Challenges. *Bioenergy Research: Advances and Applications*. Pages 1-21. Doi: 10.1016/B978-0-444-59561-4.00001-2.

NORMA MEXICANA NMX-AA-003-1980. Aguas residuales. – muestreo.

NORMA MEXICANA NMX-F-267-1991. Industria azucarera- muestras de jugo de caña de azúcar sacarosa Clerget - método de prueba.

NORMA MEXICANA NMX-F-476-SCFI-2011. Industria azucarera y alcoholera -método para la determinación de dextrana en azúcares y materiales azucarados.

Pasquel, A. 2001. GOMAS: una aproximación a la industria de alimentos. *Revista Amazónica de Investigación Alimentaria*. 1(1): 1 – 8. UNAP, Perú.

Ptaszek, P. 2015. A geometrical interpretation of large amplitude oscillatory shear (LAOS) in application to fresh food foams. *Journal of Food Engineering*, 146 (2015) 53 – 61.

Ríos, C.A., Fajardo, M., Pérez, J.C. 2005. Evaluación de una cepa de levadura para fermentar diferentes concentraciones de miel *Apis mellifera*. Estación experimental apícola Cuba.

Rocha-Pimentel, J.R. 1994. Manual de Microbiología. Facultad de Ciencias Químicas. Universidad Veracruzana.

Rodríguez, O.V. y Hanssen, H. 2007. Obtención de dextrano y fructosa, utilizando residuos agroindustriales con la cepa *Leuconostoc mesenteroides*. *Revista EIA*, 7, p. 159-172. ISSN 1794-1237

Rodríguez-Jiménez, E. 2005. La dextranasa a lo largo de la industria azucarera. *Biotecnología Aplicada*, 22(1) 11-19.

Rogers S.A. 2012. A sequence of physical processes determined and quantified in LAOS: an instantaneous local 2D/3D approach. *Journal of Rheology*. 56 (2012) 1129 – 1151.

Rogers, S.A. and Lettinga, M.P. 2012. A sequence of physical processes determined and quantified in large-amplitude oscillatory shear (LAOS): Application to theoretical nonlinear models. *Journal of Rheology*. 56,1 (2012). Doi: 10.1122/1.3662962

SENER. (2015). Energías limpias. Dirección general de energías limpias. https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/36175/Bolet_n_Energ_as_Limpas_Dos.pdf

Smith A. L. 1997. Oxford dictionary of biochemistry and molecular biology. Oxford [Oxfordshire]: Oxford University Press. ISBN 0-19-854768-4

Soto-Caballero, M.C., Valdez-Fragoso, A., Salinas-López, A.N., Welti-Chanes, J., Verardo, V., Mújica-Paz, H. (2016). Rheological parameters of xanthan gum/pectin solutions as a function of temperature and composition. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 15 (3) 859-868.

Steffe, J.F. 1996. Rheological Methods in Food Process Engineering. Second Edition. Ph. D., P.E. Freeman Press. USA.

Thompson, R.L., Alicke A.A., De Souza Méndez P.R. 2015. Model-based material functions for SAOS and LAOS analyses. *Journal of Non-Newtonian Fluid Mechanics*. 215 (2015) 19 - 32

Trost, L. W. and Steel, F. M. 2002. Review article: Control of microbiological losses prior to cane delivery and during sugar processing. *International Sugar Journal* 104 (1239) 118-123.

UNAM. 2018. Análisis de Varianza.

<http://asesorias.cuautitlan2.unam.mx/Laboratoriovirtualdeestadistica/CARPETA%20%20INFERENCIA%20ESTADISTICA/DOC%20%20INFERENCIA/TEMA%204/11%20ANALISIS%20DE%20VARIANZA.pdf>

UNAM. 2016. Etanol: Hoja de seguridad VII. <https://quimica.unam.mx/wp-content/uploads/2016/12/12etanol.pdf>. Consultado el 11/12/2018

Zhao, Z.G., He, X., Yu, S.J., Atsuya, H. 2014. Optimizing conditions for dextranase application of sugarcane mixed juice using response surface methodology. *International Sugar Journal*, 50-55.

Zohra, R.R., Aman, A., Ansari, A., Haider, M.S., Ul-Qader, S. A. 2015. Purification, characterization and end product analysis of dextran degrading endodextranase from *Bacillus licheniformis* KIBGE-IB25. *International Journal of Biological Macromolecules* 78, 243-248.

Zohra, R.R., Aman, A., Zohra, R.R., Ansari, A., Ghani, M., Ul-Qader, S. A. 2013. Dextranase: Hyper production of dextran degrading enzyme from newly isolated strain of *Bacillus licheniformis*. *Carbohydrate Polymers* 92, 2149-2153.

Zarour, K., Llamas, M.G., Prieto, A., Rúas-Madiedo, P., Dueñas, M.T., Fernández de Palencia, P., Aznar, R., Kihalb, M., López, P. 2017. Rheology and bioactivity of high molecular weight dextrans synthesised by lactic acid bacteria. *Carbohydrate Polymers* 174, 646-657.