

UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA
Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales



**DISEÑO DE UN REACTOR CONTINUO PARA EL DESLACTOSADO DE
PERMEADO DE LACTOSUERO EN MEDIO SUBCRÍTICO**

**Proyecto Integrador de Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales
de la Universidad Nacional de Córdoba conforme
a los requisitos para obtener el título de Ingeniero Químico**

por

CORREA, Marcos; SANTOS, Maricel

Córdoba, Argentina

2019

Director del Proyecto Integrador

Dr. Alexis Rafael Velez

Profesor Adjunto - Ingeniería Química - FCEFYN-UNC

Co-directora del Proyecto Integrador

Dra. Claudia Albrecht

Profesora Titular - Escuela de Nutrición- UNC

Índice

| | |
|--|----|
| 1. Introducción | 1 |
| 2. Marco Teórico | 4 |
| 2.1. Lactosuero..... | 4 |
| 2.1.1. Generación del Lactosuero | 4 |
| 2.1.2. Composición del lactosuero | 4 |
| 2.1.3. Aprovechamiento del lactosuero | 6 |
| 2.2. Permeado de Lactosuero | 8 |
| 2.3. Lactosa..... | 8 |
| 2.4. Hidrólisis Enzimática..... | 11 |
| 2.5. Hidrólisis en Medio Subcrítico..... | 15 |
| 2.6. Reacciones de la lactosa a altas temperaturas..... | 18 |
| 2.7. Reactor Continuo Isotérmico | 20 |
| 2.8. Intercambiadores de calor | 23 |
| 3. Objetivos..... | 27 |
| 3.1. Objetivos Generales | 27 |
| 3.2. Objetivos Específicos | 27 |
| 4. Materiales y Métodos | 28 |
| 4.1. Hidrólisis Enzimática..... | 28 |
| 4.1.1. Caracterización de la enzima | 28 |
| 4.1.2. Medio de reacción..... | 28 |
| 4.1.3. Influencia de los diferentes parámetros en la hidrólisis enzimática..... | 29 |
| 4.1.4. Construcción de las curvas de resultados | 31 |
| 4.2. Hidrólisis en Medio Subcrítico..... | 32 |
| 4.2.1 Armado del equipo experimental..... | 32 |
| 4.2.2. Medio de reacción experimental..... | 33 |
| 4.2.3. Operación del equipo | 34 |
| 4.2.4. Influencia de los diferentes parámetros en la hidrólisis en medio subcrítico .. | 34 |
| 4.2.5. Construcción de curvas de resultados..... | 34 |
| 4.3. Diseño del Reactor Isotérmico a Escala Piloto..... | 36 |
| 4.4. Diseño de Intercambiadores de Calor..... | 37 |
| 4.4.1. Diseño de Intercambiador de tubos y coraza | 38 |
| 4.4.2. Diseño de Pre calentador..... | 40 |
| 5. Discusión y Resultados | 41 |
| 5.1. Hidrólisis Enzimática..... | 41 |

| | |
|---|----|
| 5.1.1. Influencia de la temperatura | 41 |
| 5.1.2. Influencia del pH | 42 |
| 5.1.3. Influencia de la concentración inicial de enzima | 43 |
| 5.1.4. Evaluación del modelo cinético | 43 |
| 5.2. Hidrólisis en medio subcrítico | 45 |
| 5.2.1 Análisis de hidrólisis a través del seguimiento de glucosa..... | 45 |
| 5.2.2. Descomposición de Lactosa | 46 |
| 5.2.3. Evolución del pH | 48 |
| 5.2.4. Sólidos Totales | 48 |
| 5.3. Comparación del deslactosado por método enzimático y método subcrítico | 49 |
| 5.4. Diseño del Reactor Isotérmico a Escala Piloto..... | 50 |
| 5.4.1. Cálculo de parámetros cinéticos y termodinámicos..... | 50 |
| 5.4.2. Cálculo de volumen y dimensiones del reactor | 51 |
| 5.5. Diseño de Intercambiadores de Calor..... | 54 |
| 5.5.1. Diseño de Intercambiador de Tubo y Coraza | 54 |
| 5.5.2. Diseño de Pre Calentador | 56 |
| 6. Conclusiones | 58 |
| 7. Bibliografía | 62 |

Índice Figuras

| | |
|--|----|
| Figura 1. Comparación de la producción de leches fluidas, leches en polvo, quesos y otros lácteos en Argentina, período 1989-2016..... | 1 |
| Figura 2. Alternativas tecnológicas para el lactosuero..... | 6 |
| Figura 3. Cadena de valor de derivados de lactosuero | 7 |
| Figura 4. Estructura molecular de la lactosa | 9 |
| Figura 5. Esquema de reacción para la hidrólisis enzimática de la lactosa | 12 |
| Figura 6. Constante dieléctrica del agua en función de la temperatura a 20 MPa | 17 |
| Figura 7. Reacciones de la lactosa a alta temperatura..... | 19 |
| Figura 8. Esquema experimental enzimático..... | 30 |
| Figura 9. Sistema experimental en condiciones subcríticas | 32 |
| Figura 10. Diagrama del sistema utilizado para la medición de la lactosa en el efluente del reactor..... | 35 |
| Figura 11. Sistema planteado para la escala piloto | 38 |
| Figura 12. Concentración de glucosa en el tiempo. Variación de la temperatura.. | 39 |
| Figura 13. Concentración de glucosa en el tiempo. Variación del pH..... | 42 |
| Figura 14. Concentración de glucosa en el tiempo.Variación de la concentración inicial de enzima. | 43 |
| Figura 15. Ajuste del modelo cinético sobre las corridas seleccionadas. | 44 |
| Figura 16. Glucosa en función del tiempo de residencia para diferentes temperaturas en condiciones subcríticas. | 45 |
| Figura 17. Conversión de lactosa calculada a través del equivalente de glucosa..... | 46 |
| Figura 18. Fracción remanente de lactosa en función del tiempo de residencia..... | 47 |
| Figura 19. Muestras a 190 °C y tiempo de 3, 5 y 7 mL/min | 47 |
| Figura 20. Evolución del pH con el tiempo de residencia para las diferentes temperaturas ensayadas..... | 48 |
| Figura 21. Porcentaje de recuperación de sólidos con respecto a la temperatura..... | 49 |
| Figura 22. Linealización de la ecuación de Arrhenius para los modelos probados | 51 |
| Figura 23. Disposición del Reactor..... | 53 |

Índice Tablas

| | |
|---|----|
| Tabla 1. Composición de lactosuero dulce y lactosuero ácido | 5 |
| Tabla 2. Grado de dulzura y solubilidad relativa de diversos azúcares. | 10 |
| Tabla 3. Condiciones para la definición de la unidad LAU..... | 28 |
| Tabla 4. Composición del permeado de lactosuero..... | 29 |
| Tabla 5. Ficha técnica de lactosa monohidratada Milkaut | 33 |
| Tabla 6. Buffer recreador | 33 |
| Tabla 7. Resultados de la regresión no lineal mediante el uso de Solver. | 50 |
| Tabla 8. Parámetros de la ecuación de Arrhenius para los modelos probados | 51 |
| Tabla 9. Dimensiones y caudal del reactor..... | 53 |
| Tabla 10. Caudal, calor intercambiado y temperaturas de corriente fría y caliente. | 54 |
| Tabla 11. Resultados de la iteración de variables de diseño y dimensión | 55 |
| Tabla 12. Diámetro externo, interno y espesor del pre calentador. Velocidad del fluido en su sección..... | 56 |
| Tabla 13. Propiedades de la solución y coeficiente de convección interno..... | 56 |
| Tabla 14. Propiedades del fluido calefactor y coeficiente de convección externo..... | 57 |
| Tabla 15. Cálculo de U y área de diseño para pre calentador | 57 |

Resumen

En el presente proyecto integrador se trabajó en el deslactosado del permeado de suero de leche con el fin de estudiar posibles procesos para el aprovechamiento de este subproducto de la industria láctea. La importancia de generar el deslactosado radica, desde el punto de vista nutricional, en que amplía el mercado de productos aptos para personas intolerantes a la lactosa, mientras que como beneficio tecnológico, se reducen los problemas debidos a la escasa solubilidad de éste disacárido, que en esta matriz se encuentra muy concentrado, y además se pueden obtener sustancias de mayor valor agregado, tales como, sus monómeros. Para esto se compararon dos métodos, el tradicional enzimático y, por otro lado, el sometimiento de la solución a condiciones subcríticas, ambos a escala laboratorio. En todos los ensayos se partió de una concentración inicial de lactosa del 13 %. Para el método enzimático se probaron diferentes temperaturas, concentraciones iniciales de enzima y pH en un sistema batch, obteniéndose el mejor resultado con 30 °C, 1,25 mL/L de enzima y pH de 6,7, con un tiempo de ensayo de 135 min. En el método subcrítico se variaron las condiciones de temperatura y tiempo de residencia en un reactor continuo fijando la presión en 70 bar. En este caso se obtuvieron los mejores resultados con una temperatura de 180 °C y un tiempo de residencia en el reactor de 24,86 minutos. Las conversiones obtenidas con estas condiciones fueron similares para ambos métodos, siendo de 72,36 % y 73 % respectivamente. Sin embargo, el método subcrítico reduce el tiempo 5,43 veces y no precisa la utilización de enzima, significando esto una ventaja. Mediante los datos obtenidos con el reactor a escala laboratorio se logró realizar un estudio de la cinética de la reacción, lo que derivó en el diseño de un reactor continuo flujo pistón e isotérmico, que tiene capacidad de producción de 55 L/h. También se diseñaron los intercambiadores de calor necesarios para alcanzar la temperatura de reacción y aprovechar el calor del producto del reactor.

1. Introducción

Actualmente es significativa la importancia que se le da en las industrias al desarrollo sostenible y al cuidado del medio ambiente. Esto se puede apreciar en los esfuerzos que se realizan para tener mejor manejo de las materias primas y energía en los procesos, el aprovechamiento de los subproductos involucrados en los mismos, y en generar menos residuos y efluentes.

En el sector alimenticio, lo anteriormente dicho, se suma a la búsqueda del aprovechamiento de todos los nutrientes involucrados en las materias primas, como respuesta a las nuevas exigencias de los consumidores y a la necesidad de abastecer a una población mundial en constante crecimiento.

Ejemplo de lo expuesto es el caso de la industria quesera, la cual, en nuestra región, se abastece principalmente de leche vacuna y genera como subproducto el suero de leche. Aproximadamente 9 kg de lactosuero resultan de la producción de 1 kg de queso. El mismo presenta una carga considerable de nutrientes y a esto se debe la importancia de buscar métodos para su aprovechamiento y a su vez, evitar la contaminación del medio ambiente debido a su alta demanda biológica de oxígeno (DBO). Por otro lado, es importante considerar que es una industria que ha crecido en los últimos años junto con la capacidad productiva del sector lácteo, como se puede ver en la Figura 1 elaborada por el Ministerio de Producción y Trabajo de la Nación:

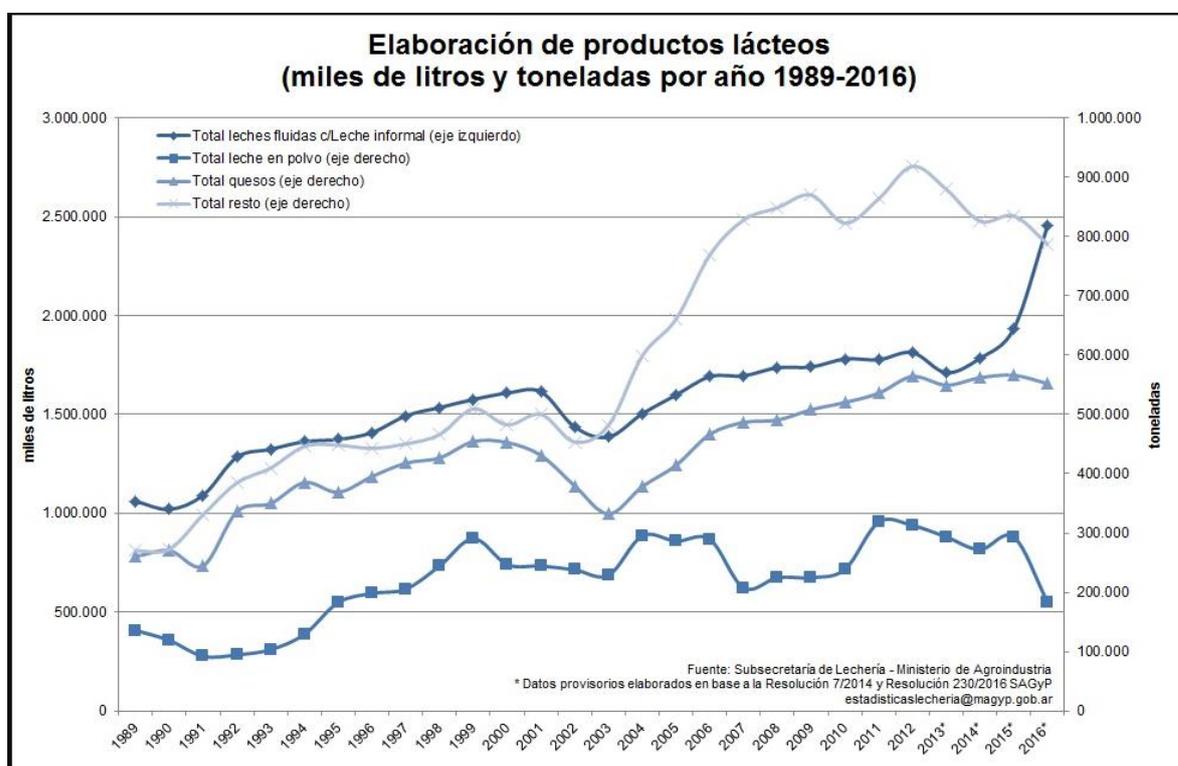


Figura 1. Comparación de la producción de leches fluidas, leches en polvo, quesos y otros lácteos en Argentina, período 1989-2016. (Argentina. Ministerio de Producción y Trabajo)

En el año 2012, la producción de leche en Argentina fue de aproximadamente 11.338 millones de litros, de los cuales el 67 % fue procesado por grandes empresas y el 33 % restante por pymes. El 41 % de la producción de leche se destinó a la elaboración de quesos, generando un total de 4.015 millones de litros de suero por año, de los cuales solamente el 45 % fue procesado para la obtención de productos con valor agregado — fundamentalmente por grandes empresas— mientras que el resto se utilizó para alimentación animal o vertido como efluente líquido (Muset, 2017).

Esto se debe a que sólo las grandes empresas son capaces económicamente de aprovechar el lactosuero en la elaboración de distintos tipos de productos con alto valor agregado, ya que se deben combinar procesos costosos de separación, desmineralización y secado, entre otros.

En el caso de las pymes queseras, el suero generado es comúnmente utilizado para alimentación animal, o bien, desechado como efluente líquido, provocando un incremento de los niveles de contaminación ambiental en las zonas cercanas a las fábricas. En Sudamérica, el 50 % de las queserías son pequeñas y medianas empresas (pymes) que procesan menos de 10 mil litros de leche por día. Específicamente en Argentina, Brasil, Colombia y Uruguay se estima que anualmente se generan alrededor de 17 mil millones de litros de suero provenientes de esta clase de empresas (Muset, 2017). Es por esto que es importante investigar nuevos métodos de aprovechamiento que sean económicos y sustentables para que se encuentren también al alcance de las pequeñas industrias.

Una forma de aprovechamiento de este efluente es su filtración con membranas para la obtención de proteínas de alto valor que conforman la porción retenida, mientras que el permeado de lactosuero resulta nuevamente en un subproducto. Este permeado de lactosuero está compuesto principalmente por lactosa, azúcar objeto de estudio del proyecto. La lactosa es un glúcido dímero formado por la unión de glucosa y galactosa. Estos últimos son fácilmente absorbidos y asimilados por el organismo humano, sin embargo, no sucede lo mismo para la lactosa. Esto genera un problema conocido como “intolerancia a la lactosa”, que es la sensibilidad metabólica más común de la especie humana, afectando a un 60-70 % de la población mundial. De esto se desprende una de las razones para estudiar el deslactosado. Otras razones son la baja solubilidad de la lactosa y el mayor poder endulzante de sus monómeros, lo que permitiría obtener productos más provechosos para la industria (Mammarella, 2001).

Existen varios procesos para lograr la hidrólisis de la lactosa, que es la escisión de la misma en sus monómeros constituyentes. El método más utilizado en la industria es mediante enzimas solubles sin recuperación de las mismas. En este caso se utiliza β -galactosidasa que se obtiene a partir de microorganismos de diferentes géneros. Es simple y no requiere de equipamiento especial. Sin embargo, hay varios factores influyentes a

considerar. Estos incluyen la concentración de sustrato, pH, temperatura, tiempo, la actividad enzimática y el costo.

Como alternativa al método tradicional, puede efectuarse la hidrólisis utilizando fluidos en estado subcrítico. El agua subcrítica ha logrado aumentar su atención en la comunidad científica por su aplicación como solvente ambientalmente amigable y como medio de reacción atractivo para una variedad de aplicaciones. Es barato, no tóxico, no inflamable y no explosivo (King, 2000). Su comportamiento sumamente diferente en comparación al del agua en condiciones ambientales se debe a los cambios que sufren sus propiedades físicas, específicamente, su constante dieléctrica y producto iónico. El producto iónico alto indica que puede actuar potencialmente como un catalizador ácido o básico. Gracias a estas características se ha aplicado ampliamente a diversas reacciones de hidrólisis (Rogalinski *et al.*, 2008).

Debido a las razones mencionadas anteriormente y la ventaja que significa deslactosar este permeado, se estudió la conversión de lactosa comparando el método enzimático con el tratamiento en medio subcrítico, con el fin de evaluar las ventajas y desventajas de esta última alternativa y se llevó a cabo el diseño de un reactor a escala piloto. Este trabajo integrador se enmarcó en los siguientes proyectos: “Valorización de subproductos agroindustriales para la producción de alimentos funcionales como moduladores metabólicos” y “Valorización de la biomasa mediante la aplicación de procesos tradicionales e innovadores” ambos avalados y financiados por la Universidad Nacional de Córdoba, y dirigidos por la Prof. Dra. Claudia Albrecht y el Prof. Dr. Abel López, respectivamente. Debido a esto, también se trabajó interdisciplinariamente con un grupo de estudiantes de Licenciatura en Nutrición que realizaron su trabajo integrador para la obtención de título de grado.

2. Marco Teórico

2.1. Lactosuero

2.1.1. Generación del Lactosuero

Los sueros lácteos se definen como la fracción de la leche, de cualquier especie, que no precipita por la acción del cuajo o por los ácidos, durante el proceso de elaboración de quesos. Constituye el 90 % de la leche y contiene compuestos hidrosolubles. El restante 10 % son los componentes del queso, por lo que para 1 kg de queso se generan aproximadamente 9 kg de lactosuero. En esta solución se encuentran proteínas hidrosolubles, lactosa, vitaminas y sales minerales. El suero es una de las mayores reservas de proteínas de alto valor biológico y una fuente significativa de hidratos de carbono (Cruz Teran *et al.*, 2008).

El lactosuero una vez vertido es un producto fuertemente contaminante del medio ambiente. Esta contaminación se caracteriza por ser de tipo orgánica y biodegradable con una rápida tendencia a la fermentación por la conversión de lactosa a ácido láctico. A modo de ejemplo, mil litros de lactosuero generan aproximadamente 35 kg de demanda biológica de oxígeno (DBO) y cerca de 68 kg de demanda química de oxígeno (DQO). Esta fuerza contaminante es equivalente a la de las aguas negras producidas en un día por 500 personas (Muset, 2017).

2.1.2. Composición del lactosuero

La calidad composicional y sanitaria del lactosuero es un factor fundamental a considerar para su utilización. La leche utilizada, así como su manejo e higiene en la elaboración del queso determinan las características del suero. La composición del mismo varía según:

- Estacionalidad de la leche.
- Prácticas de manejo de la vaca: involucra etapas de lactación, alimentación, sanidad y raza.
- Proceso de elaboración del queso: incluye el tipo de tratamiento térmico aplicado a la leche, el uso de cloruro de calcio, el empleo de cultivos bacterianos (mesófilo o termófilo), el tipo de coagulación (ácida, enzimática o mixta), el coagulante utilizado (microbiano, pepsina/quimosina, quimosina, entre otros) y el uso de aditivos. Técnicamente se pueden distinguir dos tipos de suero de queso según cuál es el proceso que se lleva a cabo para la obtención de la cuajada: suero dulce o suero ácido.

El suero dulce se obtiene como subproducto de los quesos duros, semiduros y frescos. Es procedente de procesos donde se aplica la coagulación enzimática por medio del uso de lo que se conoce como cuajo. Es decir, es el resultado de la acción proteolítica de enzimas coagulantes sobre las micelas de caseína de la leche. El suero dulce es el más empleado por la industria y tiene una composición química más estable, lo que permite estimar los valores medios de composición, posee mejores aptitudes para el procesamiento y obtención de subproductos con valor agregado. El suero dulce contiene baja concentración de calcio ya que éste queda unido al complejo de caseína que se coagula. El pH es mayor a 5,8, próximo al de la leche de la cual procede.

El suero ácido resulta del proceso de fermentación con agregado de ácidos orgánicos o minerales para coagular la caseína, disminuyendo el valor del pH por debajo de su punto isoeléctrico (pH 4,6). Esto conlleva la desmineralización y la pérdida de su estructura micelar. El suero ácido es muy mineralizado, tiene un alto contenido de calcio, debido a que el ácido láctico formado en la fermentación reacciona con el calcio iónico presente y progresivamente produce la desmineralización de las micelas de caseína. Este suero contiene más del 80 % de los minerales de la leche de partida, por lo que para la mayoría de sus aplicaciones debe neutralizarse, además su contenido en lactosa se ve reducido a causa de la fermentación láctica (Villarreal Arizpe, 2017).

En la Tabla 1 se puede ver el intervalo de concentración de algunos de los componentes principales del lactosuero. Como se mencionó con anterioridad, estos valores son fluctuantes dentro de estos intervalos ya que dependen de multiplicidad de factores.

Tabla 1. Composición de lactosuero dulce y lactosuero ácido (Hernández et al., 2012)

| | Lactosueros dulces (g/kg de lactosuero) | Lactosueros ácidos (g/kg de lactosuero) |
|----------------------------|--|--|
| Materia Seca | 55 – 75 | 55 – 65 |
| Lactosa | 40 – 50 | 40 – 50 |
| Grasa Bruta | 0 – 5 | 0 – 5 |
| Proteína Bruta | 9 – 14 | 7 – 12 |
| Ceniza | 4 – 6 | 6 – 8 |
| Calcio | 0,4 - 0,6 | 6 – 8 |
| Fósforo | 0,4 - 0,7 | 0,5 - 0,8 |
| Potasio | 1,4 - 1,6 | 1,4 - 1,6 |
| Cloruros | 2,0 – 2,2 | 2,0 – 2,2 |
| Ácido láctico | 0 – 0,3 | 7 – 8 |
| pH | > 6,0 | < 4,5 |
| Grados Dornic ¹ | < 20 | > 50 |

¹ Corresponde al volumen de solución de hidróxido de sodio 0,111 N utilizado para titular 10 mL de lactosuero en presencia de fenolftaleína, expresando el resultado en contenido de ácido láctico. Un grado Dornic es equivalente a 0,1 g/L de ácido láctico o 0,01%

2.1.3. Aprovechamiento del lactosuero

Actualmente se estudian y utilizan varios procedimientos para aprovechar el lactosuero de quesería. A continuación, se muestran algunas de estas aplicaciones directas e indirectas (Fig. 2).



Figura 2. Alternativas tecnológicas para el lactosuero (Muset, 2017).

Cada una de estas soluciones al problema del aprovechamiento del lactosuero, se selecciona según las características de la empresa que lo trate. Los factores que debe tener en cuenta son: la calidad del suero que dispone, el volumen diario, la capacidad tecnológica que posee, el conocimiento de los mercados, la capacidad de inversión y su ubicación geográfica, entre otros. Las respuestas a estas cuestiones y la alternativa tecnológica seleccionada para el tratamiento le permitirán posicionarse dentro de la cadena de valor de los derivados de lactosuero que se segmenta de la siguiente manera:

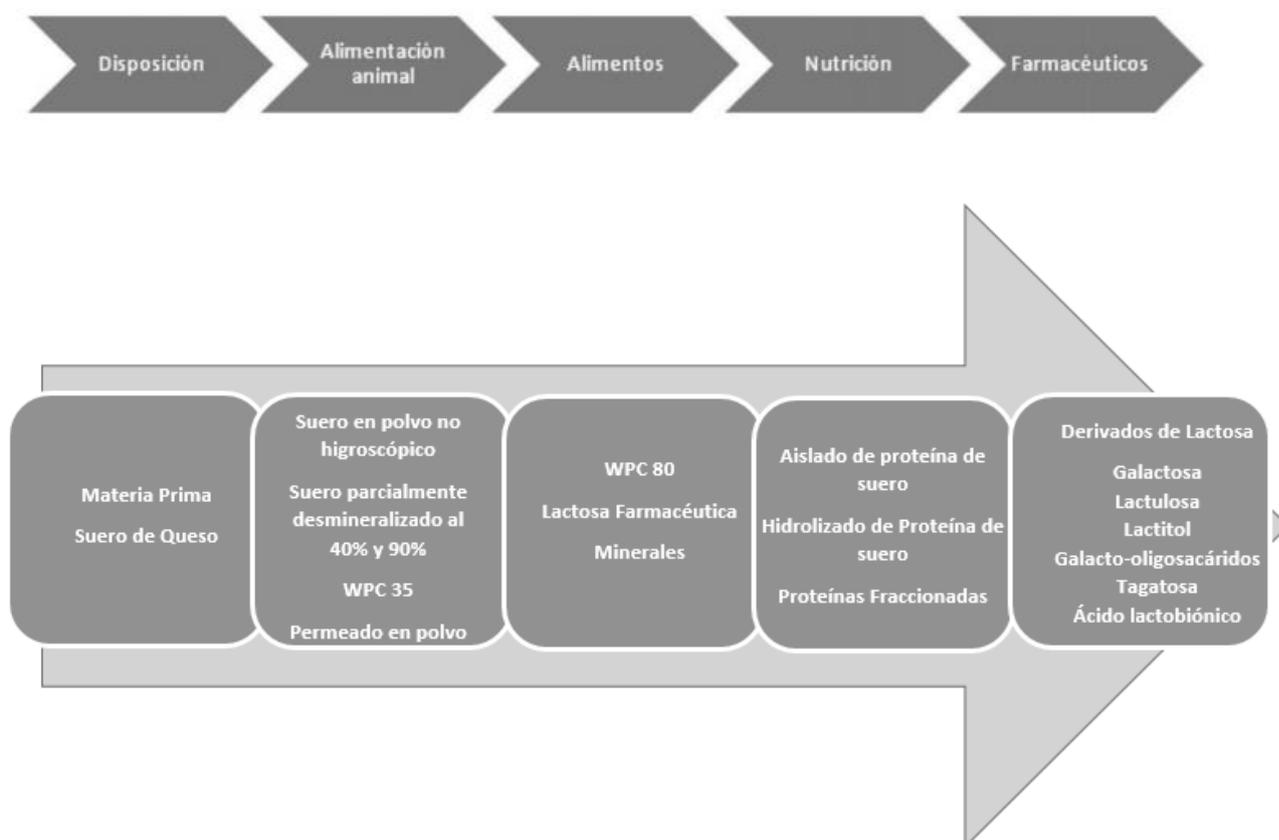


Figura 3. Cadena de valor de derivados de lactosuero (Muset, 2017)

En la actualidad, la principal estrategia utilizada en los países desarrollados es la transformación del lactosuero en ingredientes en polvo para mantener su estabilidad. De esta forma se obtiene un producto con alto valor agregado, sin embargo, la desventaja del método reside en el proceso de secado; el cual sólo resulta rentable a gran escala, por lo que no es una respuesta para pymes, a menos que estas funcionen como proveedores de la materia prima en la cadena.

El suero líquido también puede utilizarse directamente como materia prima en la elaboración de quesos como la Ricota, el queso Brocciu o los quesos marrones, y también en la elaboración de bebidas, conocidas como bebidas a base de suero o lácteas. Esta

última alternativa puede ser factible para las pequeñas queserías y granjas familiares dado que las inversiones necesarias son bajas.

2.2. Permeado de Lactosuero

Uno de los nutrientes más aprovechados en el lactosuero son las proteínas que éste contiene, ya que son de alto valor nutricional; sin embargo, su proceso de separación genera otro subproducto, el permeado de lactosuero, que continúa siendo problemático ambientalmente si no se le da un uso o disposición correcta. Este permeado tiene una alta concentración de lactosa cuyo porcentaje depende del proceso y materia prima de partida. Este azúcar puede ser aprovechado para distintos fines: en la industria alimenticia como aditivo, en la industria farmacéutica como excipiente y para la obtención de sus derivados. Sin embargo, para poder valorizar la lactosa proveniente del permeado de ultrafiltración, se necesitan inversiones complementarias, además de un dominio de la tecnología aplicable a procesos de separación.

Otra opción para el uso del permeado es la producción de bebidas no fermentadas, las cuales se logran a través de procesos conformados por operaciones unitarias simples, donde la pasteurización es la de mayor importancia. La ventaja de esta solución es que no se generan otros subproductos. Este tipo de bebidas generalmente cumplen un rol similar al de los jugos de frutas, pero su contenido adicional de nutrientes genera una imagen positiva en el consumidor. Además, a fin de atender las exigencias de los nuevos mercados, la fortificación con fibra, minerales como el hierro y otros metabolitos de interés nutricional, son igualmente posibles (Castillo Yauri, 2013).

El problema que plantea la utilización del permeado de lactosuero como bebida no fermentada es justamente la alta concentración de lactosa que lo caracteriza. Esto se debe tanto a consideraciones tecnológicas (p.ej. su solubilidad) como nutricionales, debido al alto porcentaje de población que sufre de intolerancia a la misma. Este fenómeno es causa de que la industria láctea este generando cada vez más productos sin lactosa que tienden a cubrir ese mercado.

2.3. Lactosa

La lactosa es el único glúcido libre que existe en cantidades importantes en todas las leches, es un azúcar muy raro en la naturaleza a excepción de la materia láctea. De los componentes de la leche es el más abundante, el de estructura química menos compleja y el que posee una proporción casi constante.

La lactosa con denominación I.U.P.A.C, β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-D-glucosa, es un disacárido de fórmula condensada $C_{12}H_{22}O_{11}$ con peso molecular 342 g/mol. Está formada por la unión de una molécula de β -galactosa y una molécula de glucosa α o β , lo que da lugar a dos formas isómeras, que se diferencian entre sí únicamente por la posición de un grupo OH en el carbono C1 de la glucosa (isomería ciclánica). Además, se conoce la forma hidratada $\alpha C_{12}H_{22}O_{11}\cdot H_2O$. El grupo aldehídico de la galactosa está unido al enlace β -1-4 glicosídico y el de la glucosa está libre, lo que le da la propiedad de azúcar reductor (Mammarella, 2001).

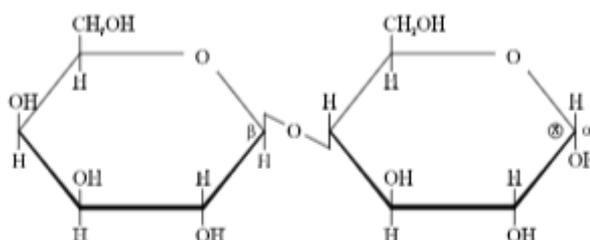


Figura 4. Estructura molecular de la lactosa

Este disacárido cumple funciones biológicas importantes en el cuerpo humano tales como estimular el crecimiento de lactobacilos, y además, para los seres humanos, la lactosa es prácticamente la única fuente de galactosa. Este es un nutriente esencial para la formación de galactooligosacáridos (GOS) que favorecen el crecimiento de micro flora intestinal, a su vez también forma galactolípidos cerebrales que forman partes de las membranas celulares de las neuronas (Hronská, Grosová, y Rosenberg, 2009).

A pesar de estas ventajas nutricionales, como se mencionó anteriormente, este azúcar presenta dos problemas fundamentales. Por un lado, su bajo poder endulzante y, por otro, la escasa solubilidad de la lactosa, que origina muchos problemas al cristalizar durante el almacenamiento, particularmente si está concentrada. Esto limita su uso como ingrediente alimenticio a productos tales como helados, confitería y alimentos para animales. Sin embargo, al hidrolizarse, libera glucosa y galactosa, cuyo poder endulzante combinado es de aproximadamente el 80 % del de la sacarosa. Este hidrolizado es también entre 3 y 4 veces más soluble que la lactosa, adicionalmente, los monosacáridos son absorbidos fácilmente en forma directa por la mucosa digestiva. A continuación, se muestra una tabla comparativa con los grados de dulzura y solubilidad a diferentes temperaturas de los disacáridos sacarosa (habitualmente tomada como elemento de comparación y lactosa junto con los de sus monómeros constituyentes (Recinos Rivas y Saz Guerrero, 2006).

Tabla 2. Grado de dulzura y solubilidad relativa de diversos azúcares (Recinos Rivas y Saz Guerrero, 2006).

| Azúcar | Dulzura Relativa | Solubilidad (gramos/100 gramos de solución) | | |
|--------------------|------------------|---|------|------|
| | | 10°C | 30°C | 50°C |
| Sacarosa | 100 | 66 | 69 | 73 |
| Lactosa | 16 | 13 | 20 | 30 |
| D-galactosa | 32 | 28 | 36 | 47 |
| D-glucosa | 74 | 40 | 54 | 70 |
| D-fructosa | 173 | - | 82 | 87 |

Por otro lado, debido a que la lactosa no puede ser digerida por nuestro organismo como disacárido, debe ser hidrolizada en sus componentes por la acción de la β -galactosidasa intestinal. Sin embargo, una importante porción de la población adulta, casi 75 %, es incapaz de digerir este azúcar debido a la ausencia o deficiencia de esta enzima en su organismo. En algunos individuos se da de forma congénita mientras que en otros la condición se adquiere, ya sea de forma temporal debido a enfermedades del intestino delgado o de forma permanente por antecedentes genéticos. La prevalencia de la intolerancia a la lactosa varía mucho según los grupos étnicos. Los porcentajes más bajos oscilan entre el 2 % para los daneses y aproximadamente el 19 % para los norteamericanos. Sin embargo, las poblaciones nativas de Europa del Este, el Mediterráneo, África, América Latina y Australia muestran una incidencia muy superior, que oscila entre el 60 % (por ejemplo, la India, Israel, indios nativos de Norteamérica y de América Latina) y casi el 100 % (por ejemplo, chinos, japoneses, nigerianos, aborígenes australianos). Se cree que esta diferencia se debe a una mutación genética dominante. Este gen se difundió rápidamente en las zonas en que se criaban animales productores de leche. De hecho, las investigaciones demuestran que los menores porcentajes de deficiencia de lactasa se hallan en poblaciones europeas con una larga historia de ganadería láctea.

No obstante, incluso en esas regiones, la capacidad de digerir la lactosa puede disminuir con la edad. Tradicionalmente, se recomienda a las personas con intolerancia a la lactosa que complementen su dieta con otros alimentos ricos en calcio y con vitamina D, principales nutrientes que aportan los lácteos, para mantenerse sanos, particularmente en cuanto a masa ósea (Daamen y van Erp, 2010).

Debido a lo mencionado anteriormente, es beneficioso buscar una transformación y/o hidrólisis de la lactosa, de manera de aprovechar no sólo su aporte energético y nutricional sino también el de los nutrientes que la acompañan en las matrices lácteas. Actualmente el mercado ofrece principalmente productos reducidos en lactosa, disminuyendo su valor entre 80 y 90 %, pero son muy pocas las marcas que aseguran el 100 % de deslactosado debido

a los costos que el proceso conlleva. Esto es posible porque existen diferentes grados de intolerancia a la lactosa, algunas personas pueden consumir sin presentar síntomas aquellos productos reducidos al 80 %. Sin embargo, los casos más extremos deben dejar de incorporar a su dieta este tipo de alimentos ya que ni siquiera el deslactosado al 100 % les asegura no atravesar malestares. Para lograr estas reducciones se llevan a cabo diferentes estrategias tecnológicas siendo la más difundida y aceptada la hidrólisis enzimática.

2.4. Hidrólisis Enzimática

Las hidrólisis son un tipo de reacción que se caracterizan por la división de una molécula mediante la interacción con una molécula de agua. Una hidrólisis enzimática sucede cuando la reacción es catalizada por una enzima, siendo ésta una proteína que actúa como catalizador de una reacción específica en procesos metabólicos. Es decir que, sin ser consumidas durante el proceso, las enzimas alteran la velocidad a la cual una reacción química tiene lugar, acelerando procesos químicos que de otra manera no se producirían o que sucederían muy lentamente, casi imperceptibles. En principio, este mecanismo podría continuar indefinidamente, pero en la práctica la mayoría de los catalizadores tienen vida limitada dado que en algunas circunstancias su actividad llega a ser tan baja que su empleo no resulta beneficioso. Consecuentemente, la mayoría de las enzimas industriales se usan durante un período limitado y luego son descartadas (Wiseman, 1991).

La enzima que cataliza la hidrólisis de la lactosa es la β -Galactosidasa, también llamada lactasa. Las enzimas son muy específicas en cuanto a qué tipo de reacciones aceleran o compuestos con los que actúan. La β -galactosidasa cataliza la hidrólisis de galactósidos a monosacáridos, es decir un glucósido que contiene galactosa. El mecanismo de acción de la enzima postulado por Wallenfels y Malhorta establece que la enzima transfiere el residuo de D-galactosa de un galactósido a un aceptor con grupos hidroxilos; cuando este aceptor es agua se forma la galactosa; sin embargo, al igual que otras glicosidasas, la transferencia puede hacerse a otros aceptores como azúcares y alcoholes, dando lugar a la formación de oligosacáridos. Se pueden formar los antes mencionados galactooligosacáridos, GOS, en presencia de un medio con lactosa altamente concentrada, ya que se producen por transferencia de los residuos galactósidos a moléculas de lactosa. Los GOS son oligosacáridos no digeribles, los cuales son usados como ingredientes alimenticios probióticos. Su estudio y las posibilidades de su control no han sido objeto de mucha atención, por lo que no se cuenta con información adecuadamente extensa (Jurado et al., 2002).

Las principales fuentes comerciales de donde se obtiene la enzima β -Galactosidasa son los microorganismos: *Kluyveromyces lactis*, *Kluyveromyces fragilis*, *Aspergillus niger* y

Aspergillus oryzae. El origen de la enzima, así como las condiciones en las que se efectúa la reacción, tales como: concentración inicial de lactosa, tiempo de reacción, pH, temperatura e iones inorgánicos, determinan la cinética de la reacción y la posible aparición de los subproductos anteriormente mencionados. En definitiva, controlando estas variables se puede determinar las condiciones óptimas para su utilización.

Las lactasas de *Kluyveromyces* funcionan bien en un rango de temperatura de 4 a 40 °C y pH 6,6-7,3. Las leches tienen un pH similar, por lo que son muy útiles en el tratamiento de dicho medio alimenticio y de sueros no ácidos. De esta enzima se tienen datos acerca de su composición de aminoácidos, lo que permite establecer que la β-Galactosidasa tiene un peso molecular de 117.618,78 Da y un punto isoeléctrico teórico de 5,42 (ExPASy, 1999). La segunda preparación más conocida consiste en una lactasa fúngica derivada del *Aspergillus niger*, cuyas condiciones óptimas de trabajo son de aproximadamente 50 °C y pH de 3,5-4,5. La aplicación de esta lactasa está limitada al suero ácido (Mammarella, 2001).

Cualquiera sea el origen de la enzima, el mecanismo de reacción aceptado considera la formación de un complejo enzima-sustrato a través de la interacción del monómero de galactosa que conforma al disacárido con el sitio activo de la enzima. A partir de esto, se libera primero la glucosa y luego puede separarse la galactosa o producirse la reacción del complejo con un mono o disacárido para producir un di u oligosacárido. A su vez, la galactosa, como producto de hidrólisis, puede interactuar nuevamente con el sitio activo de la enzima, compitiendo por el mismo con la lactosa. Este fenómeno se conoce como inhibición enzimática por producto.

El análisis cuantitativo del efecto de cada uno de los factores que intervienen en la reacción enzimática, es evaluado a través de la expresión de velocidad de reacción. Para describir la cinética de esta reacción se utiliza el modelo de Michaelis-Menten con inhibición competitiva por producto. El análisis se basa en la teoría del estado estacionario que propone la existencia de un estado transiente muy breve (del orden de los micro segundos) y que la concentración del complejo [enzima-sustrato] es constante frente a la concentración de sustrato y producto, dada una concentración alta de sustrato respecto de la concentración presente de enzima en el medio de reacción.

El esquema de la reacción puede representarse de la siguiente manera:

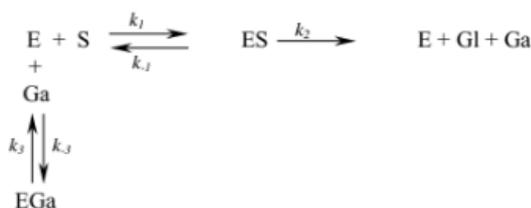


Figura 5. Esquema de reacción para la hidrólisis enzimática de la lactosa

Donde E representa la enzima β -Galactosidasa, S es el sustrato (lactosa), ES es el complejo enzima-sustrato, Gl es la glucosa, Ga es la galactosa y EGa es el complejo enzima-producto, el cual produce la inhibición competitiva frente a la reacción de interés, la hidrólisis de lactosa, y genera galactooligosacáridos al interactuar con lactosa sin hidrolizar (Jurado et al., 2002).

La velocidad de reacción para este fenómeno se desarrolla a continuación:

$$r_s = \frac{d[S]}{dt} = -k_1[S][E] + k_{-1}[ES] \quad (1)$$

$$[E^0] = [ES] + [E] + [EGa] \quad (2)$$

$$\frac{d[EGa]}{dt} = -k_3[EGa] + k_{-3}[E][Ga] = 0 \quad (3)$$

$$[E^0] = [E] \left(1 + \frac{k_1}{k_{-1} + k_2} [S] + \frac{k_{-3}}{k_3} [Ga] \right) = [E] \left(1 + \frac{[S]}{K_M} + \frac{[Ga]}{K_I} \right) \quad (4)$$

$$K_M = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} \quad K_I = \frac{k_3}{k_{-3}} \quad [Ga] \approx [Gl] = [S^0] - [S] \quad (5), (6), (7)$$

$$v = \frac{-k_2[E^0][S]}{K_M \left(1 + \frac{[Ga]}{K_I} \right) + [S]} = - \frac{v_{max}[S]}{K_M \left(1 + \frac{[S^0] - [S]}{K_I} \right) + [S]} = \frac{d[S]}{dt} \quad (8)$$

La constante de Michaelis-Menten, K_M , es una constante característica de la enzima, independiente de la concentración de la misma e indica la afinidad de la enzima por el sustrato en las condiciones del medio de reacción (pH, fuerza iónica, presencia de activadores) y temperatura elegidos (Roberts, 1977).

Si se compara la ecuación (6) con la ecuación de Michaelis-Menten:

$$\frac{d[S]}{dt} = - \frac{v_{max}[S]}{K_M + [S]} \quad (9)$$

Se observa el efecto de la inhibición como un incremento de K_M en un valor de $[Ga]/K_I$ que dependerá de la concentración de galactosa, pero no afecta a la velocidad máxima, o sea que no interfiere en la velocidad de ruptura del complejo enzima-sustrato. Para conocer estas constantes se puede integrar la ecuación y linealizarla, esto también permite prescindir del cálculo de las velocidades iniciales, que siempre resulta más complicado y utilizar la conversión, tiempo de reacción y concentración de sustrato y enzima. A continuación, se muestra el procedimiento.

$$\int_0^t [E^0]k_2 dt = - \int_{[S^0]}^{[S]} \left\{ \frac{K_M(1 + [S^0] - [S]/K_I) + [S]}{[S]} \right\} d[S] \quad (10)$$

$$\int_0^t [E^0]k_2 dt = - \int_{[S^0]}^{[S]} \left(1 - \frac{K_M}{K_I} \right) + \left(K_M + \frac{K_M[S^0]}{K_I} \right) \frac{1}{[S]} d[S] \quad (11)$$

$$x = \frac{[S^0] - [S]}{[S^0]} \quad [E^0]t = \left\{ \left(\frac{K_I - K_M}{K_I} \right) \frac{[S^0]}{k_2} \right\} x - \left\{ \left(K_M + \frac{K_M[S^0]}{K_I} \right) \frac{1}{k_2} \right\} \ln(1 - x) \quad (12), (13)$$

$$A = \frac{K_M}{k_2} + \frac{K_M}{k_2 K_I} [S^0] = b_1 + a_1 [S^0] \quad (14)$$

$$B = \frac{K_I - K_M}{k_2 K_I} [S^0] = a_2 [S^0] \quad (15)$$

$$\frac{[E^0]t}{x} = B - A \frac{\ln(1 - x)}{x} \quad (16)$$

Algunos estudios que utilizaron este método para comprobar el modelo y calcular las constantes reportaron que el uso de la ecuación (16) no llevó a resultados completamente satisfactorios incitando a reconsiderar el modelo cinético propuesto. Jurado et al., revisaron los diferentes datos disponibles y consideraron que se podía asumir que $K_M = K_I$, esto implica que la enzima tiene casi la misma afinidad por el sustrato que por el producto de la reacción, reformulando el modelo de la siguiente manera.

$$[E^0]t = - \left(\frac{K_M + [S^0]}{k_2} \right) [\ln(1 - x)] \quad (17)$$

$$A' = \left(\frac{K_M + [S^0]}{k_2} \right) \quad (18)$$

$$[E^0]t = -A' \ln(1 - x) \quad (19)$$

Esta ecuación implica una cinética de pseudo primer orden; aunque la constante cinética dependerá de las concentraciones iniciales de lactosa y galactosa. Esto sugiere que la cinética de reacción está determinada por la ruptura del complejo enzima-sustrato, ésta es la etapa limitante, implicando que la constante de Michaels representa la constante de disociación del complejo enzima-sustrato y que la lactosa está unida a la enzima a través del grupo galactosilo. Sólo de esta manera se puede explicar de forma simple que los valores de K_M y K_I son similares.

Entonces se puede decir que el estudio de la cinética de la reacción depende principalmente de K_M y este a su vez de las condiciones del medio de reacción. Esto último se debe principalmente a la naturaleza de las enzimas, que se caracterizan por tener

estructuras terciarias y cuaternarias formadas por enlaces no covalentes. Estos enlaces son más propensos a sufrir cambios ante variaciones del pH, temperatura y presencia de otros iones.

Por una parte, cuando el centro activo está conformado por grupos ionizables puede ser modificado por la presencia de iones o diferencias en el pH, lo que puede llevar a la inactividad de la enzima. Por otro lado, en las reacciones catalizadas por enzimas al igual que en cualquier reacción química, la velocidad aumenta con la temperatura; el aumento de temperatura incrementa la energía cinética de las especies reactivas y se produce un mayor número de colisiones por unidad de tiempo que llevan a acelerar la aparición de los productos. Sin embargo, si la molécula adquiere suficiente energía, los enlaces no covalentes pueden romperse, perdiéndose la configuración de la estructura terciaria (desnaturalización) y, por lo tanto, la actividad catalítica. Por último, dentro de las sustancias que modifican a K_M , los cationes mono y divalentes son los que generalmente producen las mayores alteraciones en las estructuras enzimáticas al interactuar con las zonas iónicas.

Lo anteriormente expuesto demuestra que, si bien se cuenta con importante información sobre la composición de la lactasa, sus condiciones óptimas de funcionamiento y cinética de reacción, resulta indispensable su estudio en relación al medio donde es utilizada, para conocer su actividad y estabilidad en dicho medio de trabajo y poder realizar su caracterización cinética bajo esas condiciones.

2. 5. Hidrólisis en Medio Subcrítico

Como se ha mencionado antes, la hidrólisis es una reacción donde una molécula es escindida por adición de una molécula de agua. La misma no es llevada a cabo sólo mediante el uso de enzimas, también se da según las características del medio, en forma de ataque ácido o básico. En el ataque ácido, el primer paso es dado por un ion hidronio, el cual interacciona con un área electronegativa de la molécula sustrato. Si el ácido tiene la suficiente fuerza, se genera la escisión de esta parte de la molécula con la formación de un carbocatión, que luego por acción del agua se estabiliza con un oxidrilo. Por otro lado, al hablar de hidrólisis básica, se hace referencia al ataque realizado por oxidrilos hacia un área con menor densidad electrónica de la molécula sustrato, en este caso el carbón acetal, produciéndose una sustitución nucleofílica.

Por esta razón es que la hidrólisis de disacáridos también se puede llevar a cabo mediante la utilización de medios con condiciones de pH extremos y temperaturas altas. Sin embargo, esto conduce por un lado a la formación de subproductos coloreados como melanoides y, por otro, a la incorporación necesaria de ácidos y bases, tanto para lograr la reacción como para luego ajustar el pH del producto. La industria aún no ha podido

solucionar el reto de la reducción de costos, por la neutralización del pH y color del fluido resultante, y la corrosividad en estas condiciones. Por lo tanto, no ha sido adoptada comercialmente en ningún grado significativo (Zadow, 1986; Harju et al., 2012).

Una respuesta a este problema es la utilización de agua en estado subcrítico. Durante la pasada década, los fluidos sub y supercríticos han sido ampliamente explorados como solventes y medios de reacción debido a sus propiedades fisicoquímicas únicas. El agua subcrítica es aquella que se encuentra en estado líquido bajo condición presurizada a temperaturas por encima de su punto de ebullición a presión ambiente y por debajo del punto crítico (Krammer y Vogel, 2000). La misma tiene características que difieren de aquellas que presenta el agua en condiciones ambiente (Clifford, 1998). Esto se observa en la constante dieléctrica relativa del agua, la cual es 78,5 bajo condiciones normales y decrece a 27 en estado subcrítico a aproximadamente 225 °C. Esa modificación permite que el agua subcrítica se comporte como un solvente no polar disponible para la extracción de sustancias hidrofóbicas, compartiendo el comportamiento de sustancias como el metanol o la acetona. Por otro lado, el producto iónico del agua en estado subcrítico es de 3 órdenes de magnitud mayor al del agua en condiciones ambientales, esto indica que el agua subcrítica actúa potencialmente como un catalizador ácido o básico.

En la figura 6 se pueden observar como varían los valores de la constante dieléctrica del agua en estado líquido a medida que aumenta la temperatura (agua sobrecalentada o subcrítica), así como las constantes dieléctricas de algunos disolventes orgánicos a temperatura ambiente. Este comportamiento tiene su origen en el cambio de las interacciones moleculares a elevadas temperaturas, especialmente en la modificación de la red de enlaces de puente hidrógeno (Yoshii et al., 2001).

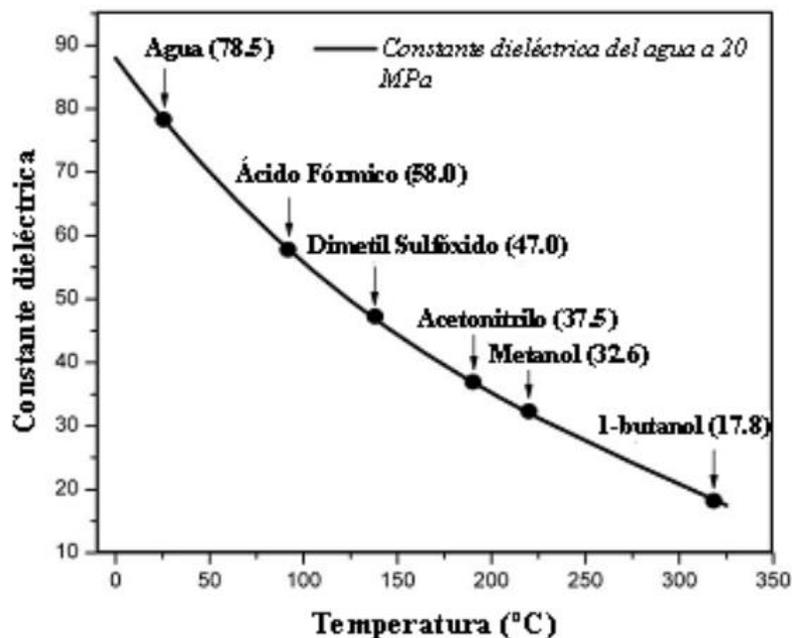


Figura 6. Constante dieléctrica del agua en función de la temperatura a presión constante (20 MPa). Superpuesto al diagrama se presentan las constantes dieléctricas de varios componentes orgánicos; en paréntesis se pueden observar los valores de las constantes de estos disolventes (incluyendo el agua) a 25 °C y 0,1 MPa.

El agua subcrítica ha sido observada como ambos, un solvente eficiente para extracción y un catalizador benévolo para el medio ambiente global y económico respecto a otros. Por estas características, el agua sub o supercrítica ha sido ampliamente aplicada a varias reacciones tales como hidrólisis de ésteres, epimerización y descomposición de glucosa, descomposición de celobiosa, hidrólisis de aceite vegetal y producción de aminoácidos libres por hidrólisis a partir de desechos de entrañas de pescado. No obstante, existen escasos estudios sobre la cinética de descomposición de disacáridos en agua subcrítica. En todos estos estudios se presenta a la reacción con cinética de reacción de primer orden (Yukitaka, 2014).

La ventaja de este método con respecto a la hidrólisis enzimática se ve en la reducción de insumos, ya que se prescinde de reactivos o catalizadores que no sean el agua misma del medio de reacción. No obstante, presenta desventajas con respecto a ésta. Por un lado, el uso de equipos en condiciones severas de temperatura y presión que provocan que el agua tenga una mayor capacidad corrosiva. También la falta de especificidad por la reacción de hidrólisis debida a que la exposición de la lactosa a altas temperaturas puede generar varios subproductos según cuál sea el medio de reacción y los interferentes que estén presente en el mismo. Si bien en la hidrólisis enzimática también existen subproductos, estos son menos y han sido mejor descritos e identificados.

2.6. Reacciones de la lactosa a altas temperaturas

Una de las reacciones secundarias que puede sufrir la lactosa es la de su isomerización. El disacárido formado, es la lactulosa (4-O- β -D-galactopiranosil-D-fructofuranosa) que se produce por la modificación de la glucosa en fructosa. La fructosa y la galactosa siguen estando unidos por un enlace β -1-4 glicosídico y el dímero continúa contando con poder reductor.

Este azúcar tiene un origen sintético, aparece en la leche sólo cuando es sometida a un tratamiento térmico, lo que permite que a través de su medición se realice el control de dichos tratamientos (Delgado Hervas, 1993). Tiene un alto valor agregado como derivado de la lactosa ya que se ha utilizado ampliamente como aditivo alimentario probiótico y como medicamento contra el estreñimiento, la encefalopatía hepática y con efectos anti-endotoxinas. La producción industrial de lactulosa se realiza actualmente mediante isomerización alcalina de la lactosa, que presenta varios inconvenientes, como el alto nivel de subproductos y el alto costo del procesamiento posterior (Soisangwan et al., 2017).

Otro de los cambios importantes que se observan al exponer la lactosa a temperaturas altas es la disminución de pH por formación de productos ácidos. Son varios los ácidos que pueden ser formados, entre ellos ácido fórmico, acético y sacárico. También, al igual que en otros alimentos que presentan glúcidos y son sometidos a tratamientos térmicos, se forma hidroximetilfurfural (HMF). La formación de estas sustancias no sólo depende de la temperatura sino también del pH del medio de reacción (Berg y Van Boekel, 1994).

Una reacción típica de los azúcares sometidos a elevadas temperaturas es la caramelización. Esta es una reacción de oscurecimiento del tipo pirolisis. Ocurre cuando los azúcares se calientan por encima de su punto de fusión; se efectúa tanto a pH ácidos como alcalinos y se acelera con la adición de ácidos carboxílicos y de algunas sales. Los mecanismos que suceden son muy complejos y no se conocen en su totalidad, se llevan a cabo transformaciones por isomerización y deshidratación. La deshidratación genera furfural y sus derivados insaturados que se polimerizan consigo mismos o con otras sustancias semejantes para formar las macromoléculas de pigmentos llamadas melanoidinas. Durante esta transformación también se sintetiza una serie de compuestos que incluyen furanos, furanonas, lactonas, pironas, aldehídos, cetonas, ácidos, ésteres y pirazinas, de bajo peso molecular, muy olorosos, así como otros con dobles ligaduras conjugadas que igualmente absorben la energía radiante y que por lo tanto producen colores (Delgadillo Gonzáles, s.f.).

Los compuestos y reacciones antes mencionados se generan con lactosa pura sometida a ciertas condiciones, debido a su descomposición. No obstante, hay otros productos que pueden aparecer pero que dependen del medio en que se encuentre la lactosa. Por ejemplo, si se somete leche o suero de leche a altas temperaturas ocurrirán las típicas reacciones que llevan al pardeamiento no enzimático, que se encuadran en la

llamada reacción de Maillard. Esta reacción ocurre cuando interaccionan aminoácidos nitrogenados y azúcares a elevadas temperaturas. Por lo que, según sea la composición del medio respecto a proteínas y aminoácidos podrán presentarse este tipo de fenómenos.

En resumen, tendremos principalmente las siguientes reacciones en un medio no nitrogenado. En primer lugar, una reacción en serie para la hidrólisis de la lactosa y posterior descomposición de sus monómeros. Por otro lado, una reacción en paralelo donde se produce su isómero, la lactulosa. Todas ellas pueden ser asumidas como reacciones de primer orden.

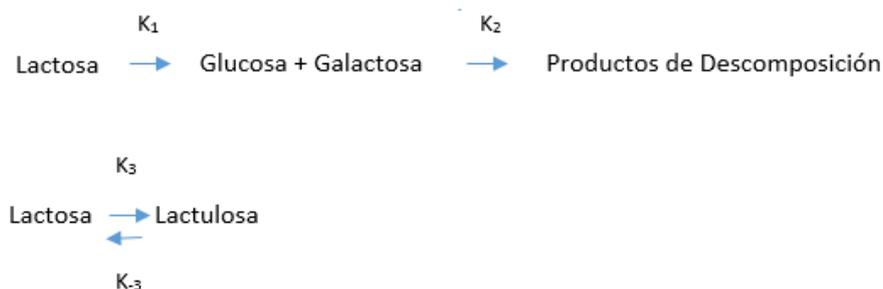


Figura 7. Reacciones de la lactosa a alta temperatura

Los estudios de Soisangwan sobre cinética de la isomerización, determinaron que en agua subcrítica la constante cinética k_1 es mayor que k_3 y que k_{-3} es nula a 200 °C. En base a las velocidades de reacción y parámetros termodinámicos, como la energía de activación, se puede diseñar un reactor que aumente la selectividad por la reacción deseada.

En cuanto a los parámetros termodinámicos, los mismos fueron calculados por Goldberg para la reacción enzimática de la descomposición de la lactosa en sus monómeros, arrojando los siguientes resultados para una temperatura de 298,5 K (Goldberg y Tewari, 1989):

$$G^\circ = -8,72 \pm 0,20 \text{ kJ.mol}^{-1}$$

$$K^\circ = 34 \pm 3$$

$$H^\circ = 0,44 \pm 0,11 \text{ kJ.mol}^{-1}$$

$$S^\circ = 30,7 \pm 0,8 \text{ J.mol}^{-1}.\text{K}^{-1}$$

$$C_p^\circ = 9 \pm 20 \text{ J.mol}^{-1}.\text{K}^{-1}$$

Uno de los datos principales que podemos obtener de estos resultados es que la reacción de hidrólisis del disacárido es levemente endotérmica. Esto es muy importante a la hora de elegir el tipo de reactor.

2.7. Reactor Continuo Isotérmico

Los reactores son equipos especialmente desarrollados para llevar a cabo reacciones químicas, estos se seleccionan y diseñan de forma que los productos deseados presenten un alto rendimiento. El diseño de los mismos implica la elección del tipo, el volumen y la forma de operación.

Una de las principales clasificaciones para los mismos es según el modo de operación del sistema con respecto al flujo de materia. De esta forma se pueden separar en; continuos, semi continuos y discontinuos. Por otro lado, se puede tener en cuenta el sistema en cuanto al flujo de energía y dividirlos en reactores isotérmicos, no isotérmicos y adiabáticos.

Para la elección de un tipo específico de reactor deben tenerse en cuenta diversos factores, desde el tipo de reacciones que se quiere llevar a cabo y todas las posibles reacciones que sufre el/los reactivo/s, como el volumen de producción requerido, condiciones operativas, inversiones económicas, etc.

Los reactores continuos son sistemas abiertos con ingreso y egreso permanente de corriente durante su funcionamiento. Como toda operación continua, tiene la ventaja de evitar tiempos muertos de carga y de descarga, lo que a su vez mejora el aprovechamiento del calor y ofrece producciones más homogéneas.

Dentro de este grupo encontramos al reactor de flujo pistón (RFP), que se constituye por un tubo de determinado diámetro a través del cual fluye la mezcla reactiva. Se caracteriza por ser estacionario, es decir que la composición del sistema no varía con respecto al tiempo. Sin embargo, sí lo hace con respecto al volumen del mismo, esto se debe a que la composición del sistema va variando con el frente de avance de la reacción. Esto implica la necesidad de que exista un flujo turbulento en el reactor para generar una mezcla radial perfecta sin frente parabólico. Si la condición se logra, el reactor tendrá para cada punto del equipo una composición diferente, pero constante en el tiempo. El tiempo de residencia (τ) en este tipo de reactor está dado por el tiempo que tarda un diferencial de masa en atravesar todo el volumen (o longitud) del mismo, por lo cual se puede calcular como el cociente entre el volumen del reactor y el flujo volumétrico.

Si se compara un reactor continuo de mezcla completa (RMC) con el RFP bajo las mismas condiciones operativas, este último presenta la ventaja de que para alcanzar una determinada conversión el reactor flujo en pistón requiere volúmenes considerablemente menores. Esto se cumple generalmente cuando se trata de una reacción isotérmica de orden mayor a cero y se exceptúan las autocatalíticas. La causa de esto es que el RFP comienza trabajando a alta velocidad (alta concentración de reactivo), la cual disminuye gradualmente hasta el extremo opuesto del mismo, mientras que el RMC trabaja siempre a una velocidad menor determinada por la concentración del reactivo que se supone

constante en todo el volumen por la idealización de mezcla completa. Por otro lado, teniendo en cuenta las posibles reacciones de la lactosa, un reactor RFP dará mayor rendimiento para la formación de intermediarios en reacciones en series (en este caso la glucosa) con respecto a un RMC. Mientras que, para las reacciones en paralelo, que serían la hidrólisis e isomerización de la lactosa, al tener ambas el mismo orden de reacción, no depende del reactor elegido la selectividad (Fogler, 2008; Levenspiel, 2004).

Para determinar los parámetros que definen el diseño de un reactor es necesario plantear las ecuaciones que lo definen y ajustarlas a las reacciones que se quieren lograr. Si se considera el balance molar de una especie determinada i , se puede plantear lo siguiente:

$$(Entrada\ de\ i) - (Salida\ de\ i) + (Generación/Desaparición\ de\ i) = (Acumulación\ de\ i)$$

Si tenemos en cuenta que en un RFP la composición varía con el volumen, se toma un diferencial de este y esta ecuación se expresa de la siguiente manera en términos de flujo molar:

$$F_{i|V} - F_{i|V+\Delta V} + r_i \Delta V = 0 \quad (20)$$

En el tercer término aparece r_i , que es la velocidad de reacción en unidades de concentración por unidad de tiempo. Luego, dividiendo por ΔV y reacomodando, se obtiene:

$$\frac{F_{i|V+\Delta V} - F_{i|V}}{\Delta V} = r_i \quad (11)$$

Luego, si se toma límite haciendo que ΔV tienda a cero:

$$\lim_{\Delta V \rightarrow 0} \left[\frac{F_{i|V+\Delta V} - F_{i|V}}{\Delta V} \right] = \frac{dF_i}{dV} \quad (22)$$

Entonces, la ecuación diferencial para el balance molar en estado estacionario de un RFP es:

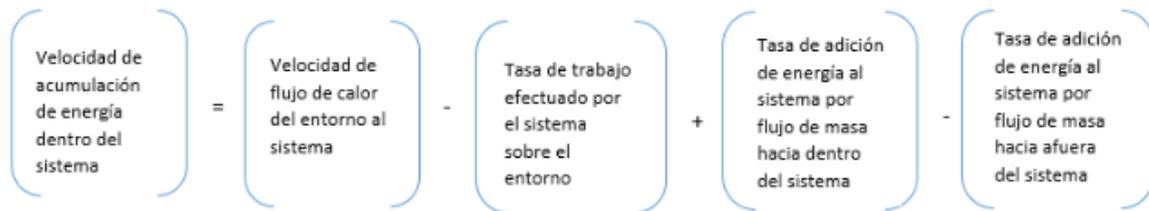
$$\frac{dF_i}{dV} = r_i \quad (23)$$

Por lo tanto, para ser ajustada a la reacción deseada se debe conocer la cinética de reacción de la misma. Para el caso del deslactosado, se puede considerar un modelo simplificado de la descomposición de la lactosa como una única reacción (Haghghat et al., 2005).



Siendo A el reactivo lactosa y P los productos generados por su descomposición. La cinética de esta reacción se puede conocer a través de los datos de concentración inicial y final luego de someter el disacárido a diferentes condiciones de reacción. El tratamiento de esos datos a través de soluciones analíticas puede dar información acerca del orden de reacción y de las constantes cinéticas en función de la temperatura.

En cuanto al balance de energía, el mismo se puede plantear en términos generales como:



Esta expresión se puede escribir de la siguiente manera:

$$\sum \frac{dU_i N_i}{dt} = UA \cdot \Delta T - \int p \cdot v \cdot n \cdot dA + F \cdot U_{entrada} - F \cdot U_{salida} \quad (24)$$

El primer término determina la velocidad del cambio de energía interna para cada especie i , en el caso de un reactor continuo que opera en estado estacionario, este término es igual a cero al no haber acumulación ni cambio con el tiempo. El segundo término hace referencia al calor que se entrega al sistema; siendo UA el producto entre el coeficiente global de transferencia y el área de transferencia, ambos multiplicados por la diferencia de temperatura entre el sistema y el elemento que transfiere calor. El tercer término representa el trabajo de flujo para hacer que la masa entre y salga del sistema, donde se integra el producto entre la presión y el volumen en el diferencial de área transversal. Los últimos dos términos representan el ingreso y egreso de los flujos molares multiplicados por sus respectivas energías internas.

Debido a que la entalpía es definida en término de energía interna y el producto de la presión y volumen, la ecuación puede ser reescrita de la siguiente forma:

$$UA \cdot \Delta T = F \cdot H_{salida} - F \cdot H_{entrada} \quad (25)$$

Si se desarrolla esta ecuación en función de las especies i que están involucradas y para un reactor flujo pistón donde los cambios suceden con el diferencial del volumen, llegamos a:

$$\frac{dT}{dV} = \frac{UA \cdot \Delta T - \Delta H_r (-r_A)}{\sum F_i C_{p_i}} \quad (26)$$

Entonces, la variación de la temperatura con el volumen dependerá del calor entregado al sistema, la entalpía de la reacción (ΔH_r) y su velocidad; es decir el calor que genera o consume la reacción y el calor específico (C_p) de cada una de las especies involucradas.

Como se mencionó anteriormente la reacción que se quiere priorizar en el reactor a diseñar es la que define el tipo de operación. En este caso la hidrólisis es endotérmica e irreversible, lo que significa que la conversión va a aumentar con la temperatura por lo que se debe diseñar un reactor isotérmico que funcione a la mayor temperatura posible. Que el reactor sea isotérmico significa que el sistema va a recibir calor continuamente para mantener una temperatura constante para la reacción. La cantidad de calor que se necesita entregar se calcula utilizando la ecuación (27) simplificada de la siguiente manera, ya que no hay variación de temperatura con el volumen.

$$UA \cdot \Delta T = \Delta H_r(-r_A) \quad (27)$$

Además de existir un medio que entregue calor al reactor de forma adecuada para lograr la temperatura de trabajo, el fluido debe ingresar a esta temperatura y al egreso descender drásticamente la misma, para detener la reacción. Por esta razón también se aborda el diseño de intercambiadores de calor.

2.8. Intercambiadores de calor

Los intercambiadores de calor son dispositivos que facilitan la transferencia de calor de una corriente de fluido a otra. Los mismos se pueden clasificar según la cantidad de corrientes que varían su temperatura (una corriente/dos corrientes) y su disposición (co-corriente o contracorriente), también por su configuración (placas, tubos, coraza, etc.) y el objetivo del mismo que puede ser calentamiento o enfriamiento de una corriente.

Para el diseño de los mismos, se debe conocer qué cantidad de calor necesita ser transferida, y a través de qué mecanismos se lleva a cabo. El coeficiente global de transferencia de calor, definido por la letra U, permite utilizar un único factor en el cálculo, ya que reúne y considera en qué medida el calor es transferido mediante cada uno de sus componentes: conducción, convección y radiación. De esta forma, el coeficiente global va a depender de los distintos coeficientes particulares, los cuales a su vez se definen en base a las condiciones de los fluidos que participan en el intercambio calórico, a saber:

- T, temperatura
- v, velocidad
- μ , viscosidad
- Cp, capacidad calorífica
- k, conductividad térmica
- ρ , densidad
- α , difusividad térmica
- β , coeficiente volumétrico de expansión térmica

Para calcular el coeficiente global existen diferentes métodos según la configuración que tome el intercambiador.

Para el caso de un fluido circulando por el interior de un tubo cilíndrico, el cual está inmerso en otro fluido y donde la temperatura es lo suficientemente baja para considerar que el intercambio térmico por radiación no es significativo, se utiliza la siguiente expresión:

$$\frac{1}{U p} = \frac{1}{h_i 2\pi r_i} + \frac{\ln\left(\frac{r_e}{r_i}\right)}{2\pi k} + \frac{1}{h_e 2\pi r_e} \quad (28)$$

donde:

- U, es el coeficiente global de transferencia de calor
- p, es el perímetro del tubo por donde fluye el fluido a calentar o enfriar
- h_i , es el coeficiente de convección para el fluido en el interior del tubo
- r_i , es el radio interno del tubo
- h_e , es el coeficiente de convección para el fluido en el exterior del tubo
- r_e , es el radio externo del tubo
- k, es la conductividad térmica del material del tubo

Los coeficientes de convección, h, son los parámetros que presentan una complicación para el cálculo, ya que dependen no solo del fluido sino de la configuración del sistema y la superficie a través de la cual circula. Una de las formas de cómputo es la utilización de un número adimensional, el número de Nusselt, que presenta diferentes correlaciones según la naturaleza y disposición del sistema, y que, a su vez, depende de otros números adimensionales. Estos relacionan las propiedades de los fluidos participantes y de los siguientes elementos del sistema:

- D, el diámetro interior de la tubería por donde fluye el fluido
- g, la aceleración de la gravedad
- T_s , la temperatura de la superficie
- T_∞ , la temperatura del fluido lejos de la superficie
- Lc, una longitud característica

A continuación, se presenta las expresiones que relacionan estas características para conocer los diferentes números adimensionales y su interpretación:

- Número de Nusselt (Nu):

$$Nu = \frac{hLc}{k} \quad (29)$$

Representa la relación entre la transferencia de calor por convección y por conducción que se da entre un fluido y una superficie. Si toma valores superiores a 1, predomina la convección, si es menor a 1 tiene más importancia la conducción. (Para este caso, k es la conductividad térmica del fluido)

- Número de Reynolds (Re):

$$Re = \frac{\rho v D}{\mu} \quad (30)$$

Representa la relación entre las fuerzas convectivas y las fuerzas viscosas de un fluido. Permite caracterizar el movimiento del fluido en flujo laminar y turbulento. Para el caso de un fluido dentro de tubería cerrada se tiene flujo laminar cuando el Re es menor a 2000, flujo en transición hasta un valor de 4000 y flujo con turbulencia totalmente desarrollada cuando Re es mayor a 4000.

- Número de Prandtl (Pr):

$$Pr = \frac{C_p \mu}{k} \quad (31)$$

Representa la relación entre la viscosidad y la difusividad térmica de un fluido. Valores pequeños de este número representan una alta velocidad de difusión de calor respecto a la velocidad del fluido.

- Número de Rayleigh (Ra):

$$Ra = \frac{g \beta}{\nu \alpha} (T_s - T_\infty) L c^3 \quad (32)$$

Representa la relación entre las fuerzas que promueven la transferencia de calor por convección y las que se le oponen. Valores menores a 10000 manifiestan una transferencia de calor fundamentalmente por conducción.

Por otro lado, para dimensionar un intercambiador de tubos y corazas se utilizan otras ecuaciones, aunque el procedimiento es semejante. Se plantea el cálculo de un coeficiente de transferencia global que depende de coeficientes de convección y estos a su vez se calculan por diferentes correlaciones. Entonces para un intercambiador de tubos y corazas:

$$U_c = \frac{h_{i0} h_0}{h_{i0} + h_0} \quad (33)$$

donde, h_{i0} , es el coeficiente de convección en el interior del tubo y h_0 es el coeficiente de convección en el lado de coraza. Estos coeficientes se calculan a través de una correlación gráfica donde a partir del Re y dimensiones L/D se determina el número j_H

$$j_H = \left(\frac{h_i D}{k} \right) \left(\frac{C_p \mu}{k} \right)^{-1/3} \left(\frac{\mu(T^\circ \text{ media})}{\mu(T^\circ \text{ pared del tubo})} \right)^{-0,14} \quad (34)$$

De esta manera queda claro que, para dimensionar un intercambiador es necesario llevar a cabo iteraciones, debido a que los parámetros que necesitamos para calcular el área de transferencia de calor también determinan los coeficientes de transferencia. Por otro lado, a la hora de dimensionar y diseñar un intercambiador de calor, es muy importante conocer las condiciones a las que se quiere que trabaje, dado que las propiedades de los

fluidos involucrados varían con la temperatura del sistema (y en algunos casos también con la presión). Por ejemplo, al trabajar con agua subcrítica pueden surgir ciertas complicaciones si se produce aparición de burbujas de vapor en los límites del sistema. En el peor de los casos, es posible la formación de una película aislante, disminuyendo fuertemente la capacidad de transferencia de calor real del equipo. A este fenómeno se lo denomina crisis de transferencia de calor, y puede verse favorecido en sistemas con flujo pulsante. Para evitar este problema se debe trabajar con presiones lo suficientemente altas para asegurar que el fluido se encuentre en estado líquido durante toda la operación.

Otro factor importante es la configuración del equipo. Para el caso de procesos en condiciones subcríticas, se ha reportado que al trabajar con intercambiadores en forma de espiral se puede mejorar significativamente el intercambio de calor a condiciones cercanas al punto crítico del agua (Brunner, 2014). Las condiciones subcríticas presentan otro desafío, que es establecer las propiedades de las soluciones de trabajo bajo este régimen. En relación a lo anterior, en estudios previos se comprobó que en soluciones de proteína estas condiciones no afectaban significativamente su densidad con respecto al agua, lo que habilita a utilizar los datos del agua para realizar los cálculos necesarios (Casajus y Sandrini, 2018).

3. Objetivos

3.1. Objetivos Generales

- Diseñar un reactor a escala piloto para llevar a cabo el deslactosado de permeado de lactosuero en condiciones subcríticas.

3.2. Objetivos Específicos

- Estudiar las variables que afectan a la reacción enzimática de la β -galactosidasa en el permeado de lactosuero y establecer las condiciones óptimas para obtener un alto grado de conversión de lactosa.
- Construir un reactor continuo tubular a escala laboratorio que permita realizar la reacción de hidrólisis a elevada temperatura y presión.
- Estudiar las variables que afectan la hidrólisis en medio subcrítico del permeado de lactosuero y establecer las condiciones óptimas que aseguren una alta conversión de lactosa.
- Comparar el deslactosado por vía enzimática con el tratamiento subcrítico a través de sus respectivas conversiones y subproductos de reacción.
- Diseñar el reactor a escala piloto con los mejores resultados obtenidos en cuanto a rendimiento y subproductos generados.

4. Materiales y Métodos

4.1. Hidrólisis Enzimática

4.1.1. Caracterización de la enzima

Para todos los ensayos realizados se utilizó la enzima comercializada bajo la marca Maxilact® que es una preparación de lactasa purificada, aislada de una cepa especial de la levadura láctea *Saccharomyces (Kluyveromyces) marxianus var. lactis*. El número internacional de enzima es EC 3.2.1.23. Debido a su procedencia, sus condiciones óptimas de máxima actividad son aproximadamente de un pH de 6,6-6,8 y una temperatura de 35-40 °C, cuando el medio de reacción es leche.

Este catalizador está disponible bajo diferentes presentaciones. En este caso se utilizó en forma líquida de densidad 1,20 g/mL y con una actividad de 5000 LAU/mL. La unidad LAU (número de unidades de lactasa) se define como la cantidad de enzima que es capaz de liberar un μmol de glucosa por minuto bajo las siguientes condiciones consignadas:

Tabla 3. Condiciones para la definición de la unidad LAU

| | |
|------------------|--------------------------|
| Sustrato: | Sol. de lactosa 4,7% p/v |
| pH: | 6,7 |
| Temperatura: | 37 °C |
| Conc. de enzima: | 0,035 – 0,1 LAU/ml |
| Sistema tampón: | Tampón lácteo |

4.1.2. Medio de reacción

Para el estudio de la actividad enzimática se utilizó permeado de lactosuero proporcionado por la empresa La Lacteo S.A., radicada en la ciudad de Córdoba, que se dedica a la producción de diferentes lácteos y derivados, entre ellos, variedad de quesos y WPC, por lo que genera como desecho el permeado empleado.

La composición de dicho permeado es muy variable, ya que, como se mencionó anteriormente, tiene dependencia con varios factores como la estacionalidad de la leche, las prácticas de manejo de la vaca y el tipo de queso producido. La misma empresa proporcionó un análisis de dos muestras de permeado donde esto se puede observar. Los primeros datos fueron recolectados con una muestra del año 2015 analizada por Centro de Química Aplicada (CEQUIMAP), Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba. La segunda muestra fue analizada en 2016 en laboratorios de La Escuela Superior Integral de Lechería, Villa María, Córdoba.

Tabla 4. Composición del permeado de lactosuero

| Composición | CEQUIMAP, 2015 | ESIL, 2016 |
|--------------------------|----------------|------------|
| Hidratos de Carbono (g%) | 18,90 | 13,71 |
| Proteínas (g%) | 0,70 | 0,04 |
| Materia Grasa (g%) | 0,04 | 0,00 |
| Fosforo total (g%) | 0,09 | - |
| Potasio (mg/L) | 831,00 | |
| Sodio (mg/L) | 622,00 | - |
| Humedad (g%) | 79,30 | - |
| Cenizas (g%) | 1,10 | - |
| Sólidos totales (g%) | - | 15,16 |

Como se puede observar el permeado está compuesto principalmente de hidratos de carbono que, debido a su procedencia, en su mayoría se trata de lactosa, contando con una cantidad muy pequeña de proteínas y materia grasa despreciable.

El material proporcionado en forma líquida luego fue conservado a -20 °C hasta su utilización. Antes de realizar los ensayos se sometió a pasteurización para evitar pérdidas de lactosa debida a posible actividad microbiana en el medio durante el desarrollo experimental. El tratamiento térmico se llevó a cabo en baño María a una temperatura de 85 °C constante durante 15 minutos. Este procedimiento sirvió a su vez para la correcta disolución de los cristales de lactosa.

4.1.3. Influencia de los diferentes parámetros en la hidrólisis enzimática.

Se estudiaron los efectos del cambio de temperatura, pH y concentración inicial de enzima en la actividad de la lactasa. Esto se evaluó haciendo reaccionar a la enzima con 400 mL de permeado, incubando la misma durante 150 minutos y con diferentes condiciones según el ensayo correspondiente.

En cada ensayo el permeado fue colocado en un erlenmeyer en baño termostatzado con agitador. El tiempo de reacción se comenzó a contar una vez que se introdujo la enzima, las muestras se tomaron cada un minuto durante los primeros 5 minutos, luego cada 10 minutos hasta completar la primera hora y por último cada 15 hasta llegar a los 150 minutos. Para tomar las muestras se pipeteó cada vez, 10 mL, y se introdujeron en tubos de ensayo que luego fueron sumergidos en agua hirviendo durante 10 minutos para inactivar la enzima. La Figura 8 esquematiza la experimentación en el laboratorio.

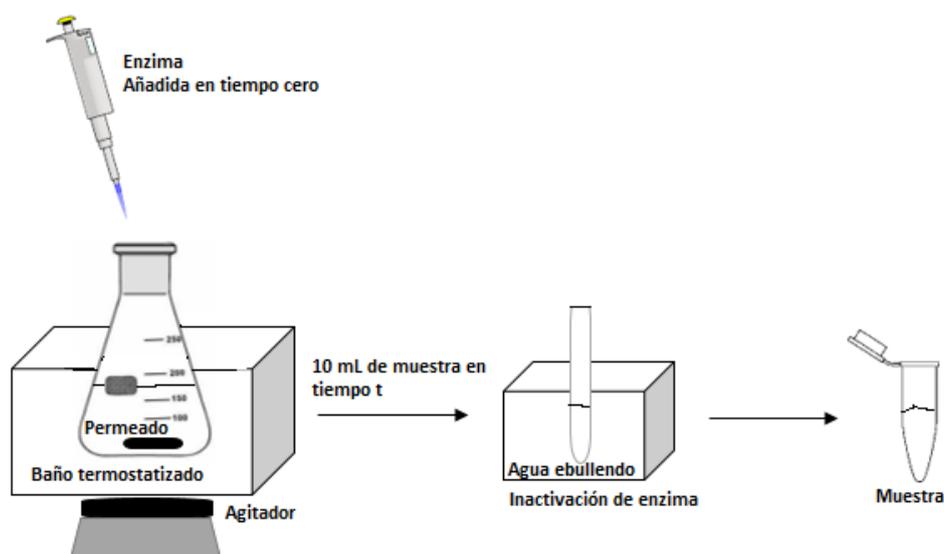


Figura 8. Esquema experimental enzimático

En todos los casos la medición de pH, al igual que en el resto de los ensayos, se realizó mediante la utilización de sensor de electrodo combinado de gel de Ag-AgCl marca PASCO. La resolución del mismo es 0,01 pH y la exactitud ± 0.1 luego de la calibración, con un rango de operación entre -4 y 80 °C.

4.1.3.1. Influencia de la temperatura

Se evaluaron 3 temperaturas diferentes: 30, 40 y 50 °C. Las mismas fueron logradas mediante el uso del baño termostático con monitoreo constante gracias a una termocupla acoplada. En los tres ensayos se tomaron 400 mL de permeado de lactosuero pasteurizado de pH 6, que fueron incubados con 250 μ L de enzima, es decir se utilizó una concentración de 0,625 mL/L de lactasa.

4.1.3.2. Influencia del pH

El efecto del pH en el medio de reacción se evaluó cambiando esta variable en el permeado a través de la utilización de un buffer realizado con NaH_2PO_4 y K_2HPO_4 . Este buffer funciona de forma sinérgica ya que el potasio es uno de los cofactores de la enzima. Se tomaron 300 mL de permeado que fueron mezclados con 100 mL de buffer preparado para llegar a los pH deseados. Se ensayaron los pH de 5,8, 6,7 y 7,15. Para todos se mantuvo una temperatura de 30 °C con la utilización del baño termostático y una concentración de enzima de 1,25 mL/L.

4.1.3.3. Influencia de concentración de enzima

Se realizaron tres ensayos con temperatura de 30 °C y pH 6,00 variando la concentración inicial de la enzima agregada, utilizando los siguientes valores: 2,5 mL/L, 1,25 mL/L y 0,625 mL/L. Es decir que a los 400 mL utilizados se agregaron según correspondía 1000 µL, 500 µL y 250 µL con el uso de micropipeta automática.

4.1.4. Construcción de las curvas de resultados

Los resultados de la hidrólisis se estudiaron a través de la medición de glucosa, producto de la reacción. Es decir que, a mayor cantidad de glucosa, mayor es el porcentaje de hidrólisis. Para lograr esto se utilizó un método colorimétrico-enzimático con lectura UV a 505 nm mediante el uso del kit GOD/PAP de GT Lab. Las mediciones se llevaron a cabo en un espectrofotómetro lector de microplacas "SPECTROstar Nano", BMG LABTECH del Centro de Investigaciones en Nutrición Humana (CenINH, Escuela de Nutrición, Universidad Nacional de Córdoba). Estas mediciones fueron realizadas en colaboración con tesinistas de la Licenciatura en Nutrición.

Luego de analizar los resultados de cada experimento, se seleccionaron aquellos cuya tendencia se correspondió mejor con lo esperado, partiendo de la base fundamental teórica, el modelo utilizado y la bibliografía consultada. Elegidas estas series de datos obtenidos a partir de la actividad experimental, se las procesó con el fin de identificar su comportamiento cinético y su ajuste bajo los supuestos establecidos recopilados de distintos autores. Para esto se construyeron curvas utilizando la ecuación número 19 y se verificó su ajuste a la regresión lineal mediante el análisis de R^2 .

4.2. Hidrólisis en Medio Subcrítico

4.2.1 Armado del equipo experimental

Para llevar a cabo la experimentación en condiciones subcríticas se procedió al montaje del siguiente sistema:

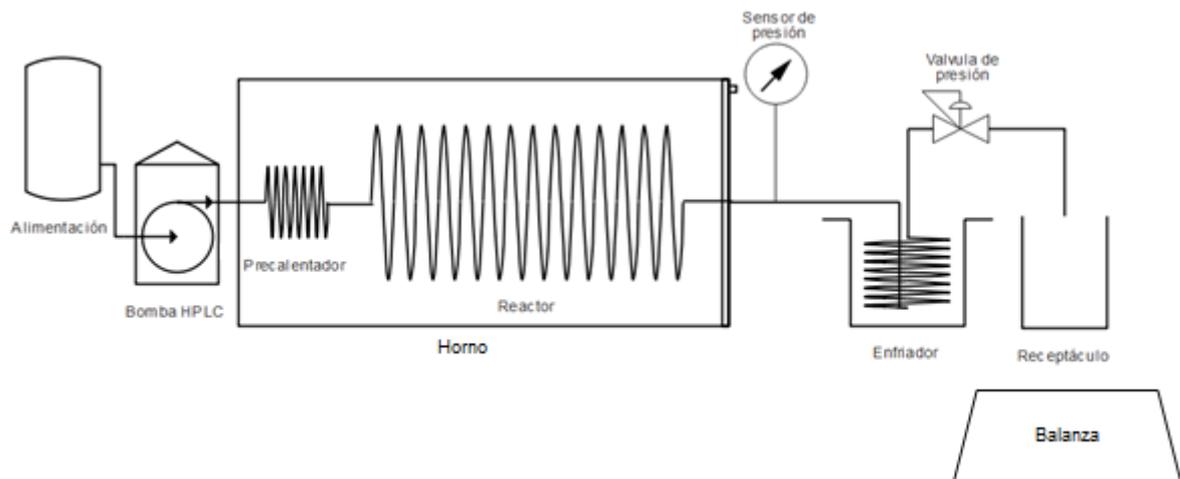


Figura 9. Sistema experimental en condiciones subcríticas

La alimentación fue contenida en un erlenmeyer de 500 mL que se condujo a la bomba a través de una manguera de 4 mm de diámetro. Para el transporte del fluido se utilizó una bomba de pistón proveniente de un HPLC, modelo Waters 501, con presiones operativas de hasta 20 MPa, y capaz de generar flujos dentro de un rango de 0,1 a 9,9 mL/min.

Las altas temperaturas se lograron gracias a la utilización de un horno eléctrico que contenía dentro un pre calentador y al reactor. El mismo fue fabricado por OLR S.A., cuenta con display digital para controlar la temperatura y alcanza un máximo de 1200 °C. El fluido ingresa en primer lugar a un pre calentador para asegurar la temperatura deseada y luego al reactor. A la salida, y por fuera del horno se dispuso otro intercambiador de calor sumergido en agua helada para producir el enfriamiento del fluido para detener la reacción y no afectar la operación de la válvula de presión. Para la construcción de estos equipos se utilizaron tubos de acero inoxidable bajo la norma AISI 316. El alto contenido de cromo y níquel le otorga una excelente resistencia a la corrosión, y la estructura cristalina, sumado al hecho de que las piezas no tienen costuras, hacen que este material sea capaz de soportar muy altas presiones. Se utilizó diámetro de 1/8 plg para los intercambiadores, y de 1/4 para el reactor. El volumen del reactor fue de 52,2 mL. El largo del pre calentador de 2,7 m y el del enfriador de 1,6 m.

La presión del sistema se logró gracias a la utilización de una válvula de presión en el extremo posterior del mismo. La válvula de marca Conflow es capaz de soportar hasta 60 MPa y presenta una gran sensibilidad en el ajuste de la misma. Para conocer la presión el

sistema fue acoplado a un sensor Dynisco TPT463E-10M-6/18 y se procesó la señal con un indicador Dynisco UPR800-1-0-3.

Luego de enfriado el producto de reacción se recolectó en un receptáculo y se midió el caudal másico con la ayuda de una balanza Bumer de Systel SRL. La misma tiene una precisión de $\pm 0,1$ g.

4.2.2. Medio de reacción experimental

Para los ensayos con hidrólisis en medio subcrítico se simuló una solución de permeado de lactosuero al 13 % (concentración mínima reportada). No se pudo utilizar en su forma original debido al gran contenido de cristales de lactosa, que podían entorpecer y obturar el funcionamiento de la bomba disponible.

La solución se preparó con lactosa monohidratada grado alimenticio, 99 % de pureza, producida por Milkaut. La cual presenta los siguientes valores en su ficha técnica de análisis físico-químicos:

Tabla 5. Ficha técnica de lactosa monohidratada Milkaut

| Parámetro determinado | Valor |
|-----------------------|---------|
| Humedad | 0,06 % |
| Proteínas | 0,52 % |
| Cenizas | 0,17 % |
| Acidez | 0,29 mL |

El disacárido fue solubilizado en un buffer ajustado en pH 6,80 preparado con agua obtenida por destilación simple en la planta piloto y conformado de la siguiente manera:

Tabla 6. Buffer recreador

| Sal | Concentración |
|--------------------------------------|---------------|
| K ₂ HPO ₄ | 0,01 M |
| KCl | 0,015 M |
| MgCl ₂ .6H ₂ O | 0,012 M |
| Ácido Cítrico | 0,001 M |

Para preparar la solución se utilizó un agitador magnético calefaccionado DLab MS-H280-PRO, para producir la solubilidad completa de la lactosa se realizó agitación con buzo magnético a 40 °C.

4.2.3. Operación del equipo

Para poner en marcha el equipo se utilizó agua destilada hasta llegar a las condiciones de operación del ensayo en cuestión. Se colocó la alimentación en el erlenmeyer de 500 mL, en el cual fue introducida la manguera ya cebada para el correcto funcionamiento de la bomba. Luego se encendió la bomba permitiendo que entre la alimentación al sistema y se aumentó gradualmente el caudal hasta llegar al objetivo. Posteriormente se encendió el horno configurándolo a una temperatura por debajo de los 100 °C para comenzar a calentar el sistema. Paralelamente se ajustó la válvula y la temperatura progresivamente, llegando a una presión de 70 bar aproximadamente y a la temperatura correspondiente, asegurando de esta manera que el fluido siempre se encuentre en condición de líquido.

Para comenzar el ensayo se cambió la alimentación por la solución de lactosa correspondiente. Luego de tres tiempos de residencia, de forma que el reactor se encuentre operando en estado estacionario, se tomaron muestras por duplicado a la salida del enfriador. Estas muestras luego fueron congeladas para su posterior análisis.

De esa manera se daba por concluida la corrida y se procedía a la limpieza del equipo. Para esto se volvió a cambiar la alimentación por agua destilada ingresando la misma con un caudal medio y a la temperatura de trabajo, durante una hora. Concluida esta etapa de limpieza se procedió a descender la temperatura del horno mientras se hizo circular agua para evitar que el equipo quede presurizado y sin circulación. Una vez estabilizado por debajo de los 100 °C el sistema se apaga.

4.2.4. Influencia de los diferentes parámetros en la hidrólisis en medio subcrítico

Los ensayos se llevaron a cabo a presiones de 70 bar. Se evaluaron 4 temperaturas diferentes: 150, 170, 180 y 190 °C. En cada una de estas temperaturas se ensayaron diversos tiempos de residencia para evaluar la conversión y cinética de reacción. Los tiempos de residencia fluctuaron entre 2 g/min y 9 g/min. En todos los casos se utilizó una solución con concentración inicial de 0,38 M (13 %) de lactosa.

4.2.5. Construcción de curvas de resultados

La reacción de hidrólisis de la lactosa se midió a través de la determinación de la concentración de glucosa en el efluente del reactor. Para lo cual se utilizó el mismo método antes descrito. De esta forma se construyeron curvas de concentración de glucosa en

función del tiempo de residencia y curvas de conversión de lactosa por hidrólisis en función del tiempo, al tomar valores equivalentes a partir de los datos de glucosa.

Por otro lado, teniendo en cuenta que la glucosa puede sufrir descomposición y la lactosa isomerización, se midió indirectamente la descomposición total del disacárido en el reactor. Para esto se tomó una alícuota de cada muestra a la salida del equipo y se las sometió a hidrólisis completa de la lactosa remanente utilizando enzima Maxilact®. Para lograr una hidrólisis del 100 % se debió ajustar el pH de las muestras, con el fin de que la enzima no se desnaturalice y trabaje en condiciones óptimas. Para ello se utilizó una solución de KOH 0,01 N en cantidad suficiente para llegar a un pH de entre 6 y 6,5. Luego se colocó enzima en una concentración de 0,5 % y se llevó a temperatura de heladera durante 24 horas. Estas muestras hidrolizadas fueron sometidas a medición de glucosa y por diferencia de este valor con las muestras sin hidrólisis enzimática, se calculó el equivalente de lactosa que contiene cada corriente efluente medida. Este procedimiento se explica a través del diagrama de la (figura 10) y su correspondiente balance de masa. Los datos obtenidos de esta forma se utilizaron para realizar las curvas de fracción remanente de lactosa en función del tiempo de residencia. A partir de este procedimiento se obtuvo además, el valor de la concentración final de la lactosa en el efluente del reactor para realizar los cálculos de las constantes cinéticas y valores termodinámicos.

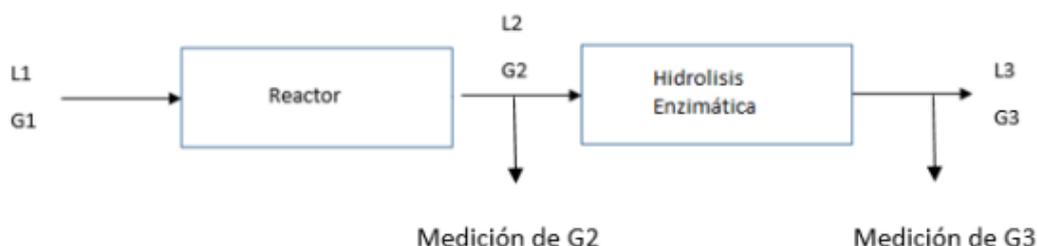


Figura 10. Diagrama del sistema utilizado para la medición de la lactosa en el efluente del reactor

Donde:

L_i : Lactosa (g/L)

G_i : Glucosa (g/L)

PM_L : peso molecular lactosa

PM_G : peso molecular glucosa

Suposiciones:

$G_1 = 0$

$L_3 = 0$ (se logran condiciones de 100 % de hidrólisis)

Balance de masa aplicado:

$$L_2 = (G_3 - G_2) \frac{PM_L}{PM_G} \quad (35)$$

Por otro lado, con el fin de hacer un seguimiento de la formación de productos de descomposición de los azúcares se construyeron gráficas de cambio de pH con la temperatura y tiempo de residencia. El pH fue medido con el phmetro PASCO anteriormente descrito. También, se realizaron mediciones de sólidos totales en función de la temperatura para un tiempo de residencia dado. Para esto se tomaron 5 mL de cada muestra y se llevaron a 105 °C en horno de secado durante 24 horas.

4.3. Diseño del Reactor Isotérmico a Escala Piloto

El diseño del reactor a escala piloto consistió en determinar el volumen, dimensiones, disposición y material del mismo. El cálculo del volumen se realizó a través de la manipulación de la ecuación 23, para la reacción de descomposición de lactosa, sin tener en cuenta intermediarios. Por lo cual se trabajó como si fuera una única reacción, ya que el objetivo en cuestión es deslactosar el producto.

Llevar a cabo esta metodología conlleva conocer previamente parámetros de la cinética de reacción a la temperatura de operación (el orden de reacción y sus constantes) y determinar la cantidad de producción para esta escala. Con respecto a esto último, el caudal de alimentación tiene importancia en las condiciones que aseguran un correcto funcionamiento del reactor flujo en pistón, ya que el régimen turbulento del fluido depende del área transversal y de esta variable a través de la velocidad del fluido. Como se mencionó en la sección 2.7 del marco teórico este régimen es una condición necesaria para el RFP, por lo que el procedimiento se basó en fijar como condición un Reynolds de 3000. De esta forma, conociendo la densidad y viscosidad para la temperatura de operación se puede obtener la velocidad mínima que el fluido debe tener. Luego, estableciendo un diámetro se puede conocer el caudal, y con el caudal y el tiempo de residencia el volumen final del reactor que permite conocer su largo. Por último, también se debe calcular un espesor necesario para que el material con el que se decide construir el reactor soporte la presión del sistema sin colapsar. Para esto se procedió probando diferentes diámetros de reactor hasta llegar a largos, flujo de alimentación y espesores coherentes con una escala piloto.

Por otro lado, para conocer el orden de reacción y su constante de velocidad, se trabajó con los datos experimentales del reactor a escala laboratorio. Conociendo los datos de concentración de lactosa en el efluente del reactor (cuya obtención es explicada en el apartado 4.2.5) y la concentración inicial, los parámetros cinéticos se estimaron usando la herramienta Solver implementada en Microsoft® Excel 2016. Esta herramienta emplea una técnica de regresión no lineal para ajustar los parámetros de las ecuaciones cinéticas minimizando la suma de los residuos al cuadrado, es decir, la diferencia entre los datos de

concentración-tiempo experimentales y teóricos. Se llevó a cabo el ajuste para reacciones de primer orden y orden n, con el fin de comparar qué modelo ajusta mejor.

Otra forma de comprobar el ajuste del modelo es verificar la variación de las constantes cinéticas con la temperatura como plantea la ecuación de Arrhenius, donde:

k(T): constante de velocidad a la temperatura absoluta T

A: factor pre exponencial

Ea: energía de activación de la reacción

R: constante universal de los gases

T: temperatura absoluta

$$k_{(T)} = A e^{\frac{-Ea}{R.T}} \quad (36)$$

Al realizar la linealización de dicha ecuación se obtiene:

$$\ln(k) = \ln(A) + \frac{-Ea}{R.T} \quad (37)$$

De esta forma se graficaron las constantes cinéticas en función de la inversa de la temperatura para comprobar su adecuación con el ajuste lineal. Esto a su vez también permitió calcular la energía de activación de la reacción y el factor pre exponencial.

4.4. Diseño de Intercambiadores de Calor

Una vez obtenida la temperatura que arrojó mejores conversiones y dimensionado el reactor, se planteó el diseño de los intercambiadores que se utilizarían para esta nueva escala. De esta forma, se decidió que tipo de intercambiadores serían necesarios para que la alimentación ingrese a la temperatura necesaria al reactor, y para que una vez que salga de este, se enfríe rápidamente para detener la reacción y asegurar un buen funcionamiento de la válvula de presión. El primer paso fue plantear el sistema teórico para la escala piloto:

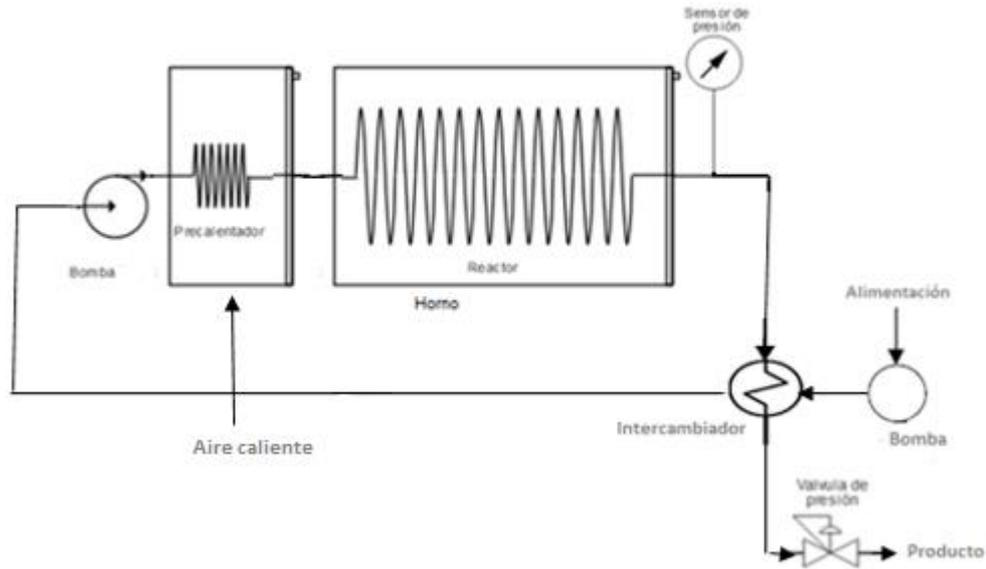


Figura 11. Sistema planteado para la escala piloto

Se decidió mantener la utilización de un horno que albergue al reactor a la temperatura de reacción, mientras que el pre calentador que asegura el ingreso de la solución a dicha temperatura se separó de esta unidad para que el fluido sea calentado mediante el ingreso de aire caliente proveniente de la combustión de gas natural. Que el fluido calefactor sea el aire caliente, permite fácilmente trabajar a temperaturas superiores a los 100 °C y evita el manejo de otros fluidos de alto coste y peligrosidad. Para enfriar el producto se optó por utilizar un intercambiador de tubos y coraza con flujo a contracorriente que permite aprovechar el calor transferido para un primer precalentamiento de la alimentación, agregando una bomba que asegure el caudal necesario para su ingreso al sistema. De esta forma se procedió a calcular en primera instancia el intercambiador de tubos y coraza para determinar a qué temperatura entra la solución al pre calentador en el horno. En todos los casos se utilizaron datos extraídos de NIST para el agua pura en las diferentes condiciones definidas. En este sistema, tanto los tubos del intercambiador como el tubo del pre calentador están sometidos a presión de 70 bar, por lo que es importante tener en cuenta este dato a la hora de determinar un espesor para los mismos.

4.4.1. Diseño de Intercambiador de tubos y coraza

El diseño de este tipo de intercambiadores consiste en varios pasos. En primera instancia se procedió a establecer las condiciones iniciales del sistema, considerando el flujo y temperatura del reactor para el fluido caliente, mientras que para el fluido frío se estableció

el mismo flujo y temperatura ambiente. Partiendo de estos datos se procedió a calcular las temperaturas finales de ambas corrientes mediante cálculos de iteración utilizando la siguiente ecuación, que relaciona la variación de temperatura a través de la igualdad del calor cedido y recibido, donde el subíndice c y f, corresponden al fluido caliente y al frío respectivamente.

$$Q = m_c C p_c \Delta T_c = m_f C p_f \Delta T_f \quad (38)$$

De esta forma se calcula el calor mediante el producto del flujo másico, la capacidad calorífica de la sustancia a la temperatura más caliente o más fría según corresponda y la diferencia de temperatura a la cual se somete.

Conocer el calor que se debe transferir es el primer paso necesario para el cálculo del coeficiente de transferencia, que como se mencionó en el marco teórico, se lleva a cabo mediante iteraciones, debido a que el mismo depende de dimensiones del equipo y a la vez, las dimensiones del equipo dependen de este valor. De esta forma, para calcular una primera área de transferencia fue necesario partir de un valor de U, para lo cual se utilizó la tabulación compilada por Kern, donde el coeficiente es selecto según el tipo de intercambiador y la sustancia utilizada.

Con la primera área calculada y la elección de un diámetro de tubo se determinó el largo del área de transferencia. Luego se definió el arreglo, número de pasos de tubo por coraza y el diámetro de coraza quedando de esta manera determinado el número de tubos necesarios, en una primera aproximación. Por otro lado, se seleccionó un estándar BWG para tubos que caracteriza a los mismos en espesor, propiedades de flujo a través de sección y peso por longitud, entre otros. Con estos datos y en función del valor de Reynolds para los dos sistemas (coraza y tubos) se obtuvo el valor de j_H (ecuación 34) a partir de graficas normalizadas, para luego conocer los coeficientes h que permitieron obtener U_c (ecuación 33). Este coeficiente se comparó entonces con el valor de U_D , el cual representa el coeficiente de transferencia de calor para el área de diseño que tendrá el equipo y que se calcula de la siguiente manera:

$$U_D = \frac{Q}{A \cdot \Delta T_{MLDT}} \quad (39)$$

donde A, es el área de transferencia diseñada que se calcula a partir del producto de la superficie por pie lineal de tubo (coeficiente que se obtiene de la estandarización BWG), el largo y número de tubos elegido. Q es el calor máximo que se debe transferir y ΔT_{MLDT} delta de temperaturas media logarítmica que relaciona temperaturas iniciales y finales de ambas corrientes.

Por último, se iteró modificando el valor de algunas de las dimensiones críticas del equipo hasta que el valor de U_c resultó mayor que el obtenido para U_D . Cuando esto sucede se tiene la certeza de que el área calculada para el intercambiador diseñado asegura la transferencia de calor, minimizando el coeficiente de transferencia necesario.

4.4.2. Diseño de Pre calentador

El pre calentador se diseñó teniendo en cuenta el caudal de ingreso al reactor, una temperatura inicial igual a la de salida de la corriente caliente en el intercambiador tubos-coraza y una temperatura final igual a la de reacción. Además, se estableció para la corriente calefactora el ingreso de aire caliente a 250 °C. Se definió un diámetro de tubo de 0,635 cm y para calcular el coeficiente de convección interno se utilizó la siguiente correlación para el número de Nusselt extraída de compendio de Mills, que se aplica en flujos turbulentos en conductos suaves con hidrodinámica y transferencia de calor, totalmente desarrollados.

$$Nu_{Dh} = \frac{(f/8)(Re_{Dh} - 1000)Pr}{1 + 12,7(f/8)^{1/2}(Pr^{2/3} - 1)} \quad 0,5 < Pr \quad (40)$$

donde $f = (0,79 \ln Re_{Dh} - 1,64)^{-2} \quad 3000 < Re_{Dh} < 10^6 \quad (41)$

Para el coeficiente de convección externo, si bien el tubo del pre calentador se dispondría en forma de espiral, se utilizó la correlación para convección natural sobre un cilindro horizontal por ser la correlación disponible más cercana a dicha configuración. La misma se expresa de la siguiente manera:

$$Nu_D = 0,36 + \frac{0,518Ra^{1/4}}{[1 + (0,559/Pr)^{9/16}]^{4/9}} \quad 10^{-4} < Ra \leq 10^9 \quad (42)$$

Que las expresiones para el número de Nusselt no dependan del largo del sistema, hace que no sean necesarias iteraciones. Sólo la ecuación número 40 depende de un parámetro dimensional que es el diámetro a través del Reynolds, pero se decidió que este fuera un parámetro fijado, por lo que el cálculo resulta simple.

5. Discusión y Resultados

5.1. Hidrólisis Enzimática

5.1.1. Influencia de la temperatura

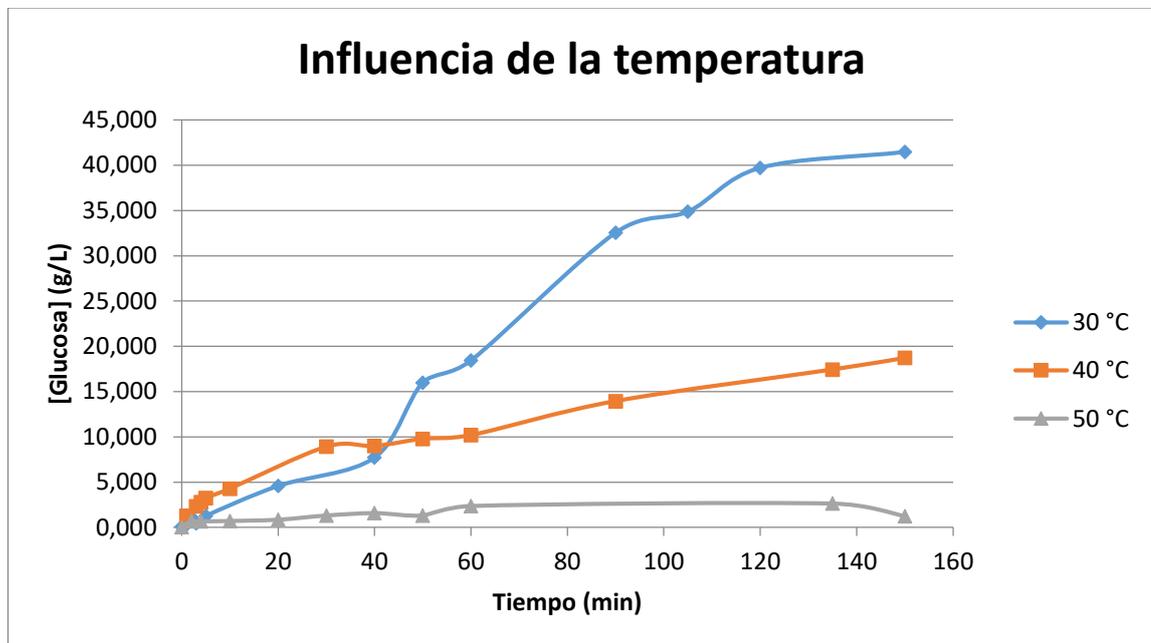


Figura 12. Concentración de glucosa durante el transcurso de la reacción. El pH del medio fue el del propio lactosuero, concentración inicial de enzima de 0,625 mL/L, sólo se vio variada la temperatura del medio de ensayo.

De la Figura 12 se puede observar que la temperatura de 30 °C es aquella que da mejores porcentajes de hidrólisis, coincidiendo con estudios anteriores para la enzima (Mammarella, 2001). A 40 °C no se aprovecha la totalidad de la capacidad de la enzima, mientras que a 50 °C la enzima tiene muy poca actividad. Si tomamos los puntos máximos de las curvas y aplicamos la conversión a lactosa equivalente para conocer el porcentaje de hidrólisis alcanzado (teniendo en cuenta la concentración inicial de lactosa de 130 g/L) tendremos que: con 30 °C se alcanza 60,6 % de hidrólisis, con 40 °C 27,37 % y con 50 °C apenas 3,87 %.

5.1.2. Influencia del pH

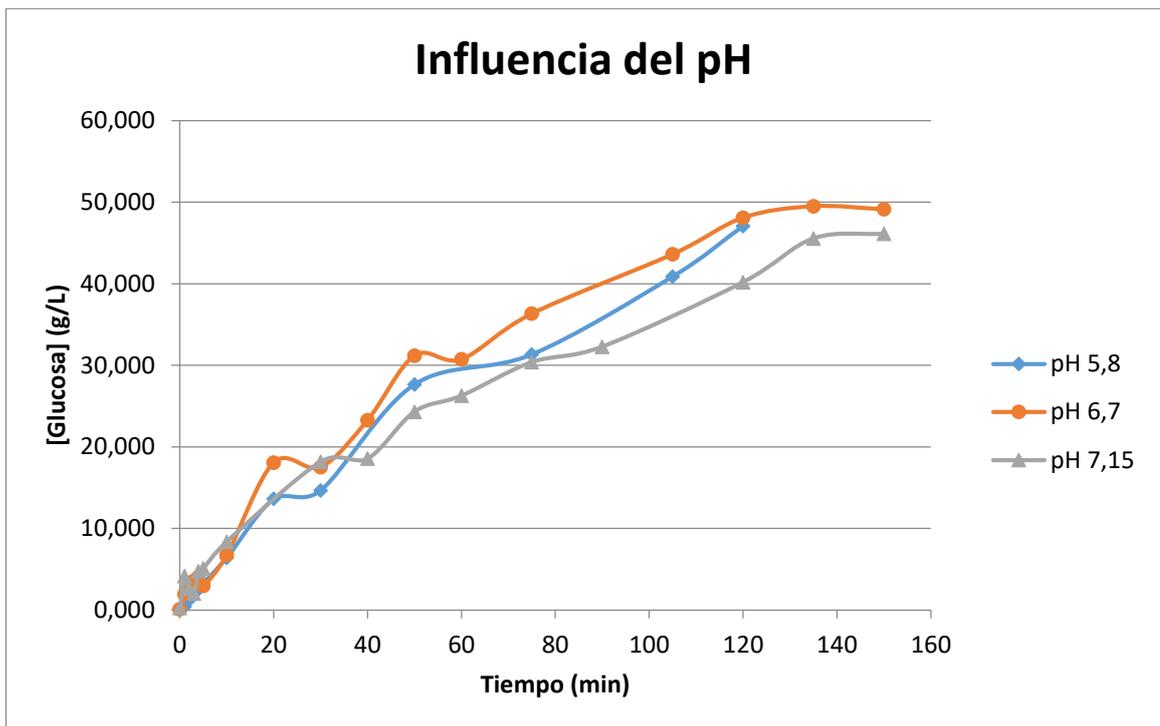


Figura 13. Concentración de glucosa medida en el tiempo de reacción. Se fijó la concentración inicial de enzima en 1,25 mL/L y la temperatura del medio en 30 °C para los tres ensayos, se trabajó modificando el pH del medio de reacción para cada corrida.

Los resultados muestran que el pH óptimo de la enzima para estas condiciones es de 6,7, siendo el grado de hidrólisis alcanzado 72,36 %. Mientras que con un pH de 5,8 (pH natural del permeado) se alcanza 68,83 % y con pH 7,15; 67,44 %. De esta forma se determina que es necesario corregir el pH del permeado para que la actividad enzimática sea mayor. Sin embargo, en caso de no modificarlo y manteniéndolo en 5,8, se pierde un porcentaje de 3,53 % de hidrólisis. Esta pequeña diferencia lleva a considerar si es realmente conveniente modificar el pH, introduciendo un paso más en el proceso y elevando el costo.

5.1.3. Influencia de la concentración inicial de enzima

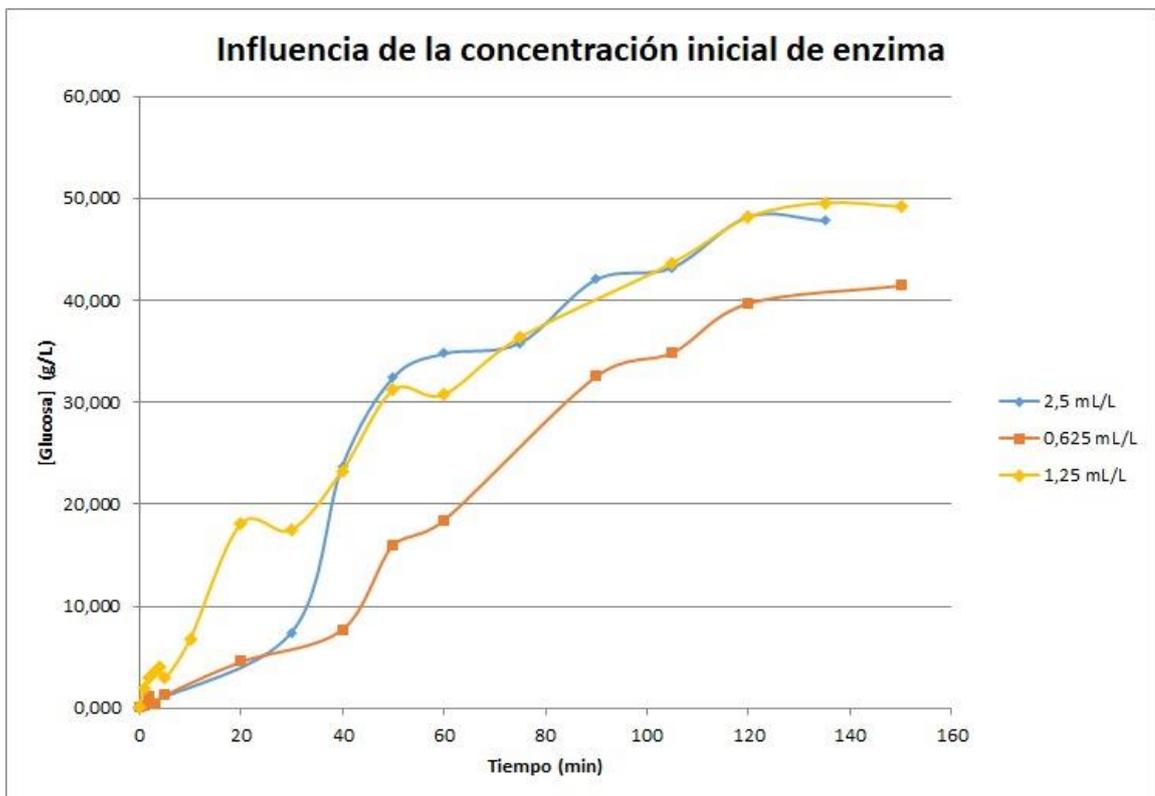


Figura 14. Concentración de glucosa libre en el tiempo. Contraste de datos de ensayos donde se trabajó a 30 °C con variante en la cantidad de enzima inicial utilizada para la hidrólisis de lactosa en permeado.

De la Figura 14 se puede observar que utilizando una concentración de enzima de 0,625 mL/L se obtiene 60,60 % de hidrólisis de lactosa. Duplicando la cantidad de enzima a 1,25 mL/L se obtiene el mayor porcentaje de hidrólisis, siendo esta del 72,36 %. Si se duplica la concentración de enzima a 2,5 mL/L los resultados son similares al valor anterior siendo del 70,54 %. En consecuencia, con una concentración de 1,25 mL/L se consigue la máxima actividad de la enzima para esa cantidad de sustrato, por lo que duplicar su concentración no resulta recomendable.

5.1.4. Evaluación del modelo cinético

Debido a que las pruebas donde se varió el pH y se mantuvieron la temperatura 30 °C y concentración inicial de la enzima en 1,25 mL/L fueron aquellas donde las tres curvas dieron conversiones similares y altas, se utilizaron para someterlas al ajuste del modelo cinético. Se manipularon los datos obtenidos de estas experiencias para graficar la ecuación 19, de la siguiente manera:

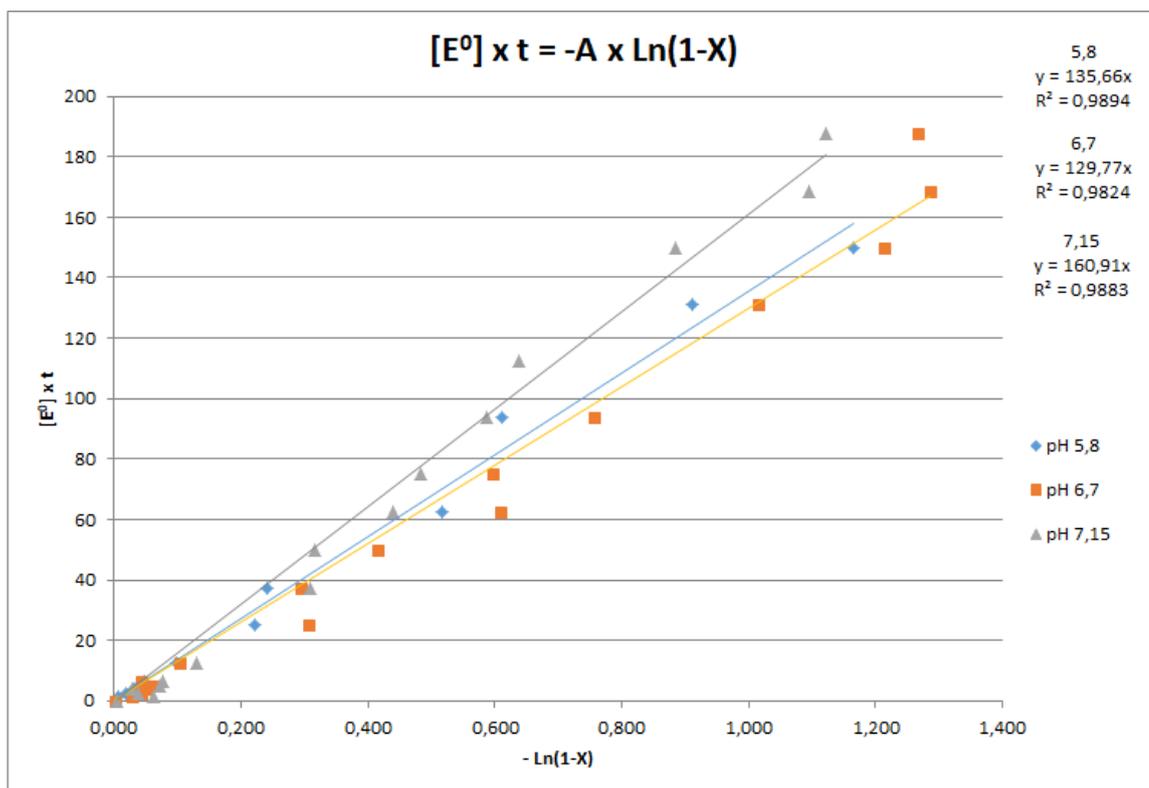


Figura 15. Ajuste del modelo cinético sobre las corridas seleccionadas. En este modelo se asume la relación $K_M = K_I$, la ecuación cinética se muestra en la parte superior del gráfico.

Se observa que los datos se comportan como predijo la teoría consultada, ya que los R^2 son muy cercanos a 1. Se comprueba la presunción de que las constantes cinéticas K_M y K_I presentan el mismo valor para el sistema analizado y que en éste, la enzima presenta afinidad similar tanto para el sustrato como para el producto que la inhibe. Concluyentemente, en estas condiciones la reacción se adapta al supuesto cinético de Michaelis-Melten, siendo importante reconocer que, dada la igualdad entre K_M y K_I , es correcto aseverar que, para la reacción estudiada en el sistema propuesto, la etapa que limita y controla el avance de reacción junto con la velocidad de la misma es el rompimiento del enlace glucosídico dado por la ruptura del complejo enzima-sustrato.

Dadas las condiciones en las que fueron planteados los experimentos y la conducción posterior de su desarrollo, no fue posible determinar los valores de los parámetros cinéticos de la reacción enzimática de hidrólisis. Calcularlos hubiera requerido variar la concentración inicial del sustrato para a través de regresiones poder obtener valores experimentales de los mismos. Sin embargo, el propósito de analizar el comportamiento cinético de las series de datos obtenidos en los ensayos tuvo como único fin, el de corroborar que estas se comporten de acuerdo a la teoría consultada y a las condiciones del postulado cinético de Michaelis-Melten para poder asegurar que los resultados obtenidos fueran fidedignos al momento de compararlos y contrastar los rendimientos de conversión de lactosa con los resultados concluyentes del desempeño del reactor subcrítico.

5.2. Hidrólisis en medio subcrítico

5.2.1 Análisis de hidrólisis a través del seguimiento de glucosa

Las mediciones de la concentración de glucosa en función del tiempo de residencia se agruparon en diferentes curvas según la temperatura de reacción. Arrojando el siguiente gráfico:

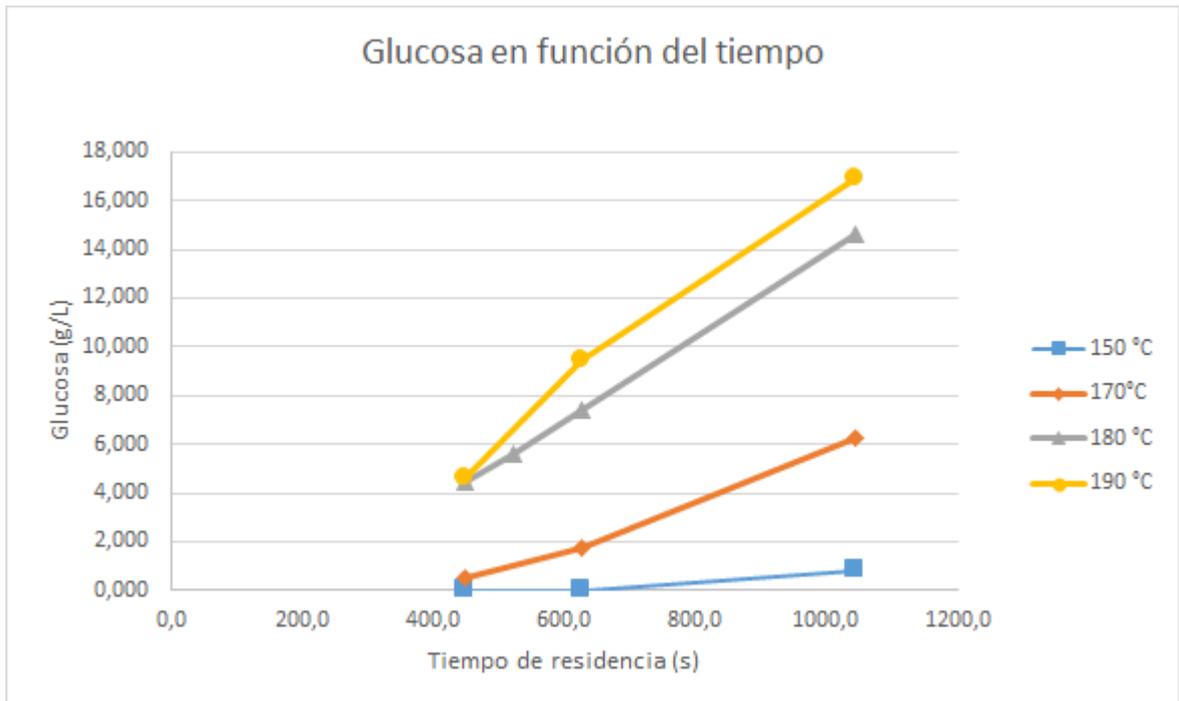


Figura 16. Medición de glucosa en función del tiempo de residencia para diferentes temperaturas en condiciones subcríticas.

Como se puede observar, a mayor temperatura y mayor tiempo de residencia se produce mayor cantidad de glucosa, es decir que se alcanza un mayor grado de hidrólisis, lo que es coincidente con la teoría al tratarse de una reacción endotérmica. Sin embargo, a temperaturas de 180 y 190 °C para un tiempo de residencia de 447,43 segundos, no hay una diferencia notable, esto se puede deber, entre otras cosas, a un error de medición o al hecho de que mientras mayor es la temperatura, mayor es la degradación de la glucosa. También se observa que a 150 °C sólo se logra conversión a tiempos de residencia mayores que 626,4 segundos. Por lo que se concluye que a menores temperaturas no se produciría hidrólisis en estas condiciones y tiempos de residencia.

Con estos datos de concentración de glucosa en el efluente del reactor se construyeron curvas que muestra la fracción de lactosa que logró consumirse a través de la hidrólisis. Las mismas se muestran a continuación:

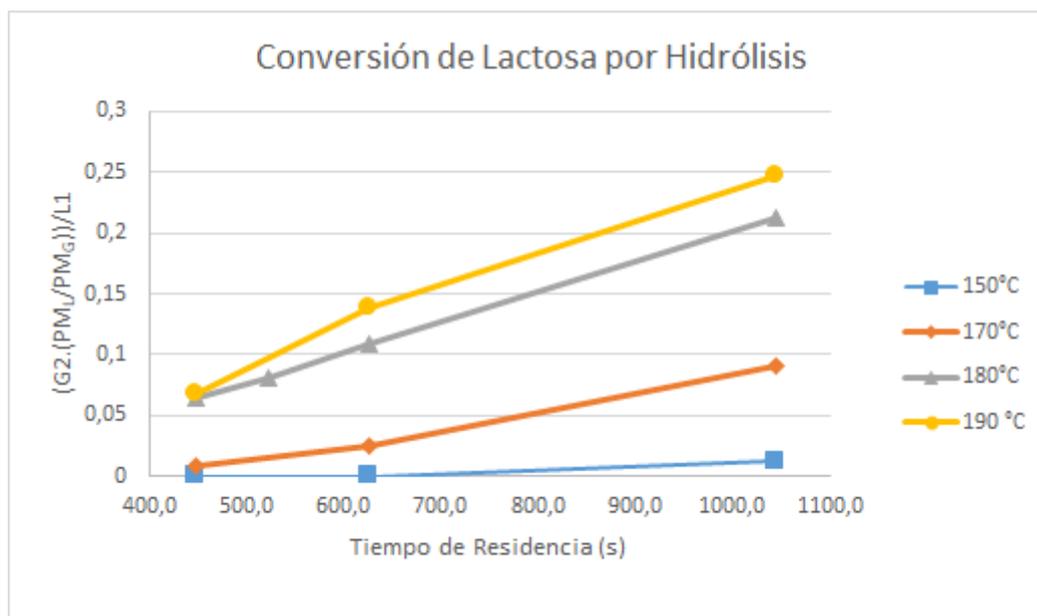


Figura 17. Conversión de lactosa calculada a través del equivalente de glucosa medido

Como se puede ver el mayor porcentaje de conversión alcanzado es del 25 % para 190 °C con un tiempo de residencia de 1044 segundos. Se debe tener en cuenta que este porcentaje podría ser mayor debido a que existen reacciones de descomposición de glucosa. Dado que no se contó con otros métodos para seguir los productos de estas reacciones en serie, no se estaría midiendo realmente cuanta lactosa se descompone por la formación de sus monómeros. Por esta razón es importante analizar la descomposición de lactosa en su totalidad, teniendo en cuenta que el objetivo final es deslactosar el producto y no únicamente lograr la hidrólisis.

5.2.2. Descomposición de Lactosa

Aplicando el balance de masa descrito en la Figura 9 y ecuación 35, se realizaron curvas para cada temperatura donde se muestra la fracción remanente de lactosa, es decir el cociente entre la concentración final en el efluente y la concentración inicial en la alimentación, en función del tiempo.

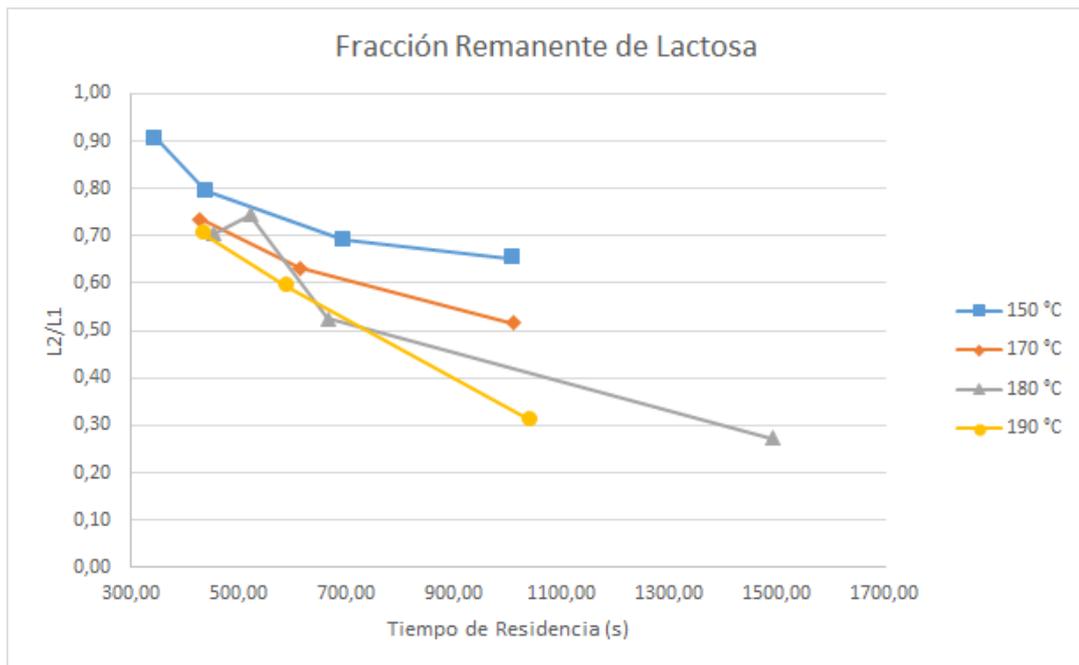


Figura 18. Fracción remanente de lactosa en función del tiempo de residencia.

En la Figura 18, se presenta el porcentaje de lactosa que no pudo ser descompuesta después de su paso por el reactor. El mejor valor alcanzado es de 0,27 con un tiempo de residencia de 1491,43 segundos a 180 °C. Es decir que en esas condiciones se alcanza una conversión del 73 % de la lactosa inicial. Debido a la tendencia de las curvas, si se hubiera ensayado este tiempo de residencia para una temperatura de 190 °C se hubieran logrado conversiones mayores. Sin embargo, empíricamente se observó que a mayor temperatura se producía mayor formación de compuestos sólidos y coloreados debido a reacciones de caramelización, por lo cual existe un límite práctico debido a que esos sólidos producen taponamiento del reactor. Esto se puede apreciar en la Figura 19, la cual muestra el efluente del reactor a 190 °C aumentando de derecha a izquierda el tiempo de residencia.



Figura 19. Muestras extraídas a 190 °C a tiempo de 3, 5 y 7 mL/min

5.2.3. Evolución del pH

Uno de los parámetros fácilmente medibles que dio indicio de las reacciones de descomposición fue la evolución del pH. La misma fue determinada en las muestras a la salida del reactor. Dichas variaciones se graficaron en función del tiempo de residencia para cada temperatura en el siguiente gráfico.

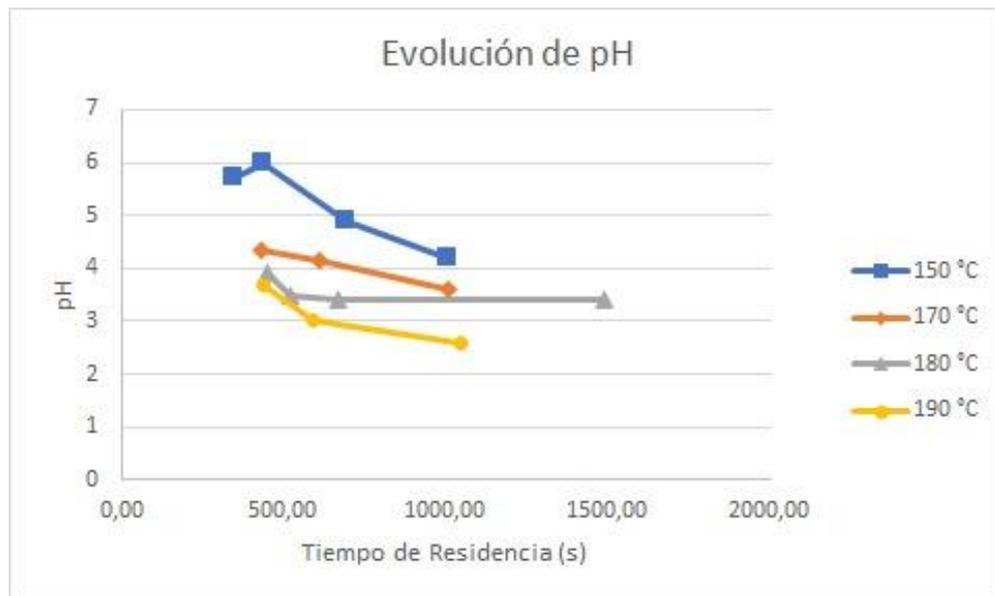


Figura 20. Evolución del pH con el tiempo de residencia para las diferentes temperaturas ensayadas

En concordancia con lo esperado, a mayor tiempo de residencia y mayor temperatura, el pH tiene mayor caída, debido a que se forman compuestos de descomposición ácidos en mayor concentración. El valor más bajo es de 2,5 y se registra a 1044 segundos con 190 °C. Este dato fue muy importante a la hora de hacer la medición indirecta de la lactosa remanente, ya que para lograr las hidrólisis al 100 %, el pH debe ser modificado para una actuación óptima de la enzima.

5.2.4. Sólidos Totales

Otro parámetro fácilmente medible que marca la formación de compuestos de descomposición de los monómeros, son los sólidos totales recuperables. En este caso no se analizan aquellos productos que acidifican el medio, sino aquellos que son volátiles producidos por la caramelización y que se pierden a las temperaturas de reacción.

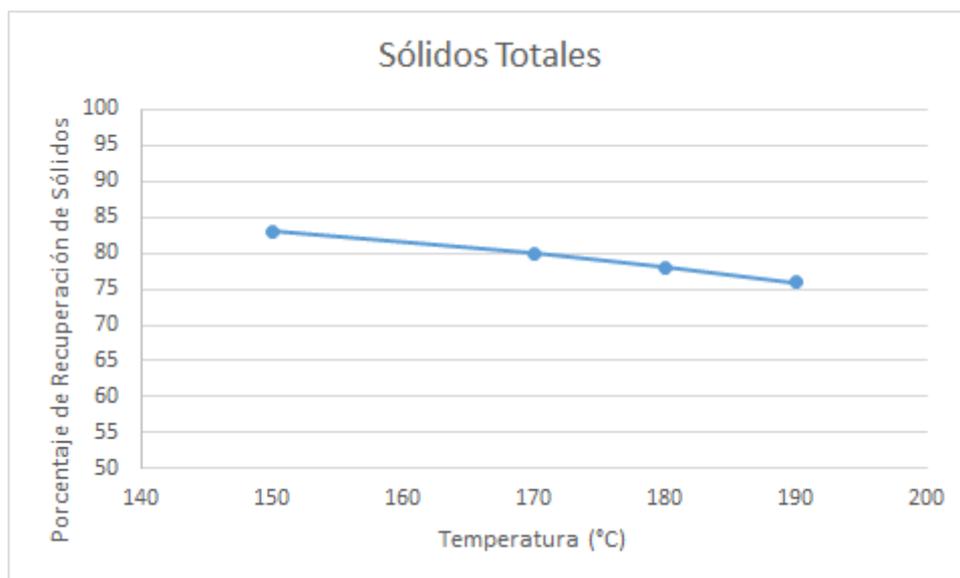


Figura 21. Porcentaje de recuperación de sólidos con respecto a la temperatura

Estos resultados se muestran a un único tiempo de residencia que fue el valor intermedio de los ensayos, es decir 626,4 segundos, ya que no varía el resultado significativamente con el tiempo de residencia, pero sí con la temperatura. Como era de esperarse se pierde mayor cantidad de sólidos al aumentar la temperatura. A 190 °C se recupera 76 % de los sólidos totales, lo que indica que se forma 24 % de compuestos volátiles que no son recuperables.

5.3. Comparación del deslactosado por método enzimático y método subcrítico

Con los resultados anteriormente reportados se puede realizar la comparación de los dos métodos aplicados al medio de estudio, el permeado de lactosuero. Ambas logran similares conversiones de lactosa siendo la mayor conversión alcanzada de 73 % para la descomposición en medio subcrítico y 72,36 % para la hidrólisis enzimática. Sin embargo, se debe tener en cuenta dos puntos claves, el tiempo y los productos secundarios.

Desde el punto de vista del tiempo, el mejor método es el subcrítico ya que estas conversiones se logran en 24,86 minutos (siempre y cuando el reactor está funcionando en régimen estacionario) mientras que la hidrólisis enzimática lo logra en 135 minutos. Además, al tratarse de un proceso continuo, éste se encuentra exento de los tiempos muertos que existen en un sistema en batch. Por otro lado, si se tiene en cuenta la formación de productos de descomposición, como bien se sabe, el método enzimático es muy específico y produce principalmente la disociación en los monómeros constituyentes y posiblemente productos secundarios en muy baja proporción que no se han logrado medir. Sin embargo, el método en condiciones subcríticas genera muchos compuestos secundarios como quedó demostrado a través de la medición indirecta de lactosa remanente, del pH y sólidos totales.

En cuanto a los costos de ambos procesos, se necesita de un estudio más exhaustivo para compararlos con exactitud, pero lo que se puede inferir es que el método enzimático requiere de una constante incorporación de enzima, la cual es muy costosa, y la corrección de pH del permeado a 6,7; mientras que el método subcrítico solo requeriría de una inversión inicial en el equipo. Sin embargo, esta inversión es elevada ya que se trata de un equipo que trabaja a altas temperaturas y presiones, además con agua que tiene propiedades corrosivas, lo que genera la utilización de materiales más costosos. Ambos tienen consumo energético para lograr las temperaturas de reacción, pero, aunque el método subcrítico necesite una temperatura 6 veces mayor (180 °C contra 30 °C), logra el mismo resultado en un tiempo 5,43 veces menor.

5.4. Diseño del Reactor Isotérmico a Escala Piloto

5.4.1. Cálculo de parámetros cinéticos y termodinámicos.

A continuación, se muestra el resultado obtenido mediante la herramienta Solver:

Tabla 7. Resultados de la regresión no lineal mediante el uso de Solver.

| | Orden n | Orden 1 |
|-----------------------------------|----------------------|----------------------|
| n | 0,93 | 1 |
| $k_{150^{\circ}\text{C}}$ | $4,25 \cdot 10^{-4}$ | $4,64 \cdot 10^{-4}$ |
| $k_{170^{\circ}\text{C}}$ | $6,29 \cdot 10^{-4}$ | $6,86 \cdot 10^{-4}$ |
| $k_{180^{\circ}\text{C}}$ | $7,84 \cdot 10^{-4}$ | $8,68 \cdot 10^{-4}$ |
| $k_{190^{\circ}\text{C}}$ | $9,49 \cdot 10^{-4}$ | $1,05 \cdot 10^{-3}$ |
| Suma de cuadrados de los residuos | 0,068 | 0,069 |

Como se puede ver los modelos ajustan de manera muy similar, ya que la suma difiere apenas por una unidad en la milésima. Calculando el n para el orden diferente de uno, da un valor de 0,93 por lo que es cercano a una reacción de primer orden. Por otro lado, los valores obtenidos para las diferentes $k_{(T)}$ calculado como orden 1, son similares a los mostrados en la bibliografía consultada, siendo $8,29 \cdot 10^{-4}$ para 190 °C según Yukitaka *et al.*

No obstante, el modelo de orden n ajusta mejor la linealización de la ecuación de Arrhenius, al obtener un valor de R^2 mayor.

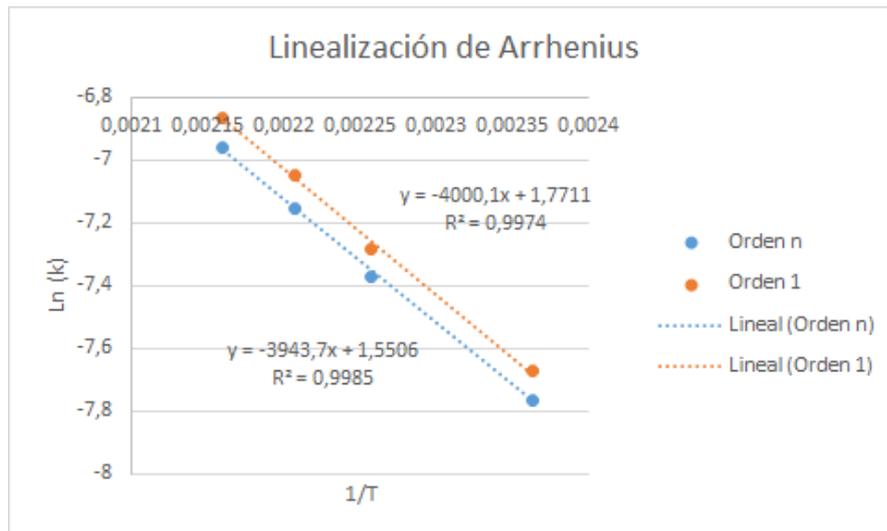


Figura 22. Linealización de la ecuación de Arrhenius para los modelos probados (primer orden y orden n)

De esta regresión se obtienen los siguientes valores para la energía de activación y factor pre exponencial.

Tabla 8. Parámetros de la ecuación de Arrhenius para los modelos probados (primer orden y orden n)

| | A (s^{-1}) | Ea (J/mol) |
|---------|----------------|-------------------|
| Orden n | 4,71 | $3,28 \cdot 10^4$ |
| Orden 1 | 5,88 | $3,33 \cdot 10^4$ |

Dada la situación de no contar con bibliografía que permita contrastar los resultados obtenidos, no se profundizó en detalles de discusión acerca de los valores obtenidos.

5.4.2. Cálculo de volumen y dimensiones del reactor

A partir de los resultados anteriores se decidió trabajar con el mejor ajuste, es decir la velocidad de reacción con orden n. Para calcular el volumen y dimensiones del reactor, en primer lugar, se obtuvo el tiempo de residencia necesario para la temperatura de 180 °C y conversión de 0,73 que fue la máxima alcanzada experimentalmente con una concentración inicial de 0,38 M. Con ese fin se manipuló la ecuación 23 de la siguiente manera, siendo:

- F_A , el flujo molar
- r_A , velocidad de reacción
- C_A , Concentración de la lactosa

- C_{A0} , concentración inicial de la lactosa
- v , caudal volumétrico
- V , volumen del reactor
- k , constante cinética de reacción a 180 °C
- n , el orden de reacción
- τ , tiempo de residencia
- X , conversión

$$\frac{dF_A}{dV} = r_A \quad (45)$$

$$dF_A = v \cdot dC_A \quad (46)$$

$$\frac{vdC_A}{dV} = -kC_A^n \quad (47)$$

$$d\tau = \frac{dC_A}{-kC_A^n} \quad (48)$$

$$C_A = C_{A0} \cdot (1 - X) \quad (49)$$

$$dC_A = -C_{A0}dX \quad (50)$$

$$d\tau = C_{A0} \frac{dX}{kC_{A0}^n(1 - X)^n} \quad (51)$$

$$\int_0^\tau d\tau = \int_0^X C_{A0} \frac{dX}{kC_{A0}^n(1 - X)^n} \quad (52)$$

$$\tau = \frac{C_{A0}^{(1-n)}}{k} \left[\frac{(1 - X)^{1-n} - 1^{1-n}}{n - 1} \right] \quad (53)$$

El tiempo de residencia calculado fue igual a 1491,31 s.

Luego teniendo en cuenta la condición de turbulencia, se fijó un $Re = 3000$ y con la densidad y viscosidad para el agua a 180 °C se fueron probando diferentes diámetros hasta obtener una velocidad que diera flujo, volumen y largo razonables para el reactor. La velocidad está relacionada con el caudal, diámetro, volumen y largo a través de la sucesión de estas ecuaciones que permiten calcularlos:

$$v = v \cdot \pi \cdot \frac{D^2}{4} \quad (54)$$

$$\tau = \frac{V}{v} \quad (55)$$

$$L = \frac{V \cdot 4}{\pi \cdot D^2} \quad (56)$$

Por otro lado, fue necesario tener en cuenta que el caudal no fuera demasiado elevado porque esto llevaría a la necesidad de un intercambio de calor muy grande para los equipos

destinados a este fin. De esta forma se obtuvieron los siguientes resultados, donde cada dimensión esta expresada en la unidad de medida más conveniente a fines prácticos:

Tabla 9. Dimensiones y caudal del reactor

| | |
|---------------|-----------|
| τ | 1491,31 s |
| Re | 3000 |
| Velocidad (v) | 1,34 cm/s |
| Diametro (D) | 3,81 cm |
| Caudal (v) | 55 L/h |
| Volumen (V) | 22,78 L |
| Largo (L) | 19,98 m |

Una vez obtenido estos valores se procedió a decidir de qué material construir el reactor y el espesor del tubo del mismo. Estas variables están relacionadas a través de la siguiente ecuación que relaciona la tensión admisible del material (σ_{adm}) con la presión del sistema (p), el radio (r), espesor del tubo (e) para un cilindro y el correspondiente factor de seguridad (S).

$$\frac{\sigma_{adm}}{S} = \frac{p \cdot r}{e} \quad (57)$$

Se eligió entonces trabajar con un tubo de acero inoxidable AISI 316 sin costura al igual que en la escala laboratorio por sus prestaciones a altas temperaturas y tolerancia a la corrosión. El mismo presenta una tensión admisible de 250 MPa a la temperatura de trabajo. Por lo que para un radio de 1,9 cm, la presión de trabajo de 70 bar y designando un factor de seguridad de 4, se obtiene un espesor de 2,1 mm.

Por otro lado, debido a que el largo es de 19,98 m, es necesario diseñar la disposición del reactor en el espacio. No se puede mantener en forma de espiral debido a que el diámetro del tubo es muy elevado como para producir espiras sin forzar demasiado el material, perdiendo resistencia del mismo. Por esta razón se pensó una disposición en forma de letra 'ese' con 10 tramos de 2 m conectados por codos, como se muestra en la siguiente figura:

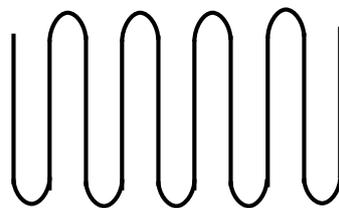


Figura 23. Disposición del Reactor

5.5. Diseño de Intercambiadores de Calor

5.5.1. Diseño de Intercambiador de Tubo y Coraza

En la Tabla 10 se muestra las temperaturas finales que alcanzará cada corriente al fijar las condiciones iniciales respecto a sus temperaturas y caudal, siendo el subíndice E las condiciones de entrada de las corrientes y S las condiciones de salida, mientras que F se refiere a la corriente fría o alimentación y C al fluido calefactor o producto. Además, se presenta el calor calculado que estas corrientes deben intercambiar y en la columna derecha los parámetros obtenidos a partir de relaciones entre las diferentes temperaturas y necesarios para cálculos posteriores. T_c y t_c son el promedio de las temperaturas de entrada y salida de la corriente caliente y fría respectivamente, conocidas como temperatura calórica, con ellas se calculan las propiedades de las corrientes como densidad, capacidad calorífica, etc. Mientras que, R y S son parámetros que determinan al factor de transferencia, F_T , que multiplica al delta de temperaturas medio logarítmico, MLDT. Este último representa el gradiente real de temperatura y dependen de la configuración elegida para el intercambiador.

Tabla 10. A la izquierda: caudal, calor intercambiado y temperaturas de corriente fría y caliente. A la derecha: parámetros obtenidos a partir de las temperaturas iniciales y finales de las corrientes.

| PROPIEDADES DE FLUIDOS | | | | |
|------------------------|----------|-------------------|--------------|-----------|
| Caudal | 55 | L/h | T_c | 138,82 °C |
| | 1,53E-05 | m ³ /s | t_c | 58,5 °C |
| Q | 4990,19 | W | R | 1,07 |
| $T_{C,E}$ | 180 | °C | S | 0,48 |
| $T_{C,S}$ | 97,65 | °C | F_T | 0,8 |
| $T_{F,E}$ | 20 | °C | MLDT | 144,53 °F |
| $T_{F,S}$ | 97 | °C | MLDT * F_T | 115,62 °F |

Por otro lado, se presentan las tablas que muestran las variables de diseño y dimensión para el equipo obtenidos luego de las iteraciones que aseguran que U_c sea mayor a U_D .

Para su comprensión se describen parámetros que no han sido mencionados con anterioridad:

- $D_{E,T}$ y D_0 , son el diámetro externo de tubo en metros y pulgadas respectivamente
- D_i y D_e , es el diámetro de la coraza y diámetro equivalente de la coraza respectivamente
- P_T , longitud del paso (distancia entre tubos)

- a_s , a'_t , a_t , son área de flujo en coraza, por tubo y de la totalidad de tubos respectivamente
- C' es un factor que depende del diámetro y espesor del tubo y afecta al área del flujo en coraza
- G_s y G_t , velocidad de masa en coraza y tubo
- a'' , superficie por pie lineal de tubo
- R_D , factor de obstrucción que se dimensiona para tener en cuenta el ensuciamiento de tubos.

Tabla 11. Resultados de la iteración de variables de diseño y dimensión

| ARREGLO TRIANGULAR | | | | | | |
|---|----------------------|--------------------------------------|---------------|-------------|---------------|-----------------|
| U_{Tabla} (W/m ² K) | Q_{Max} (W) | Area Transferencia (m ²) | $D_{e,T}$ (m) | Largo (m) | D_i (plg) | Largo Tubo (ft) |
| 1500 | 10369,22 | 0,11 | 0,032 | 1,08 | 12 | 1,8 |
| Espaciado Deflectores B (plg) | Paso por Coraza n | BWG | D_o (plg) | P_T (plg) | Espesor (plg) | N_T |
| 0,5 | 8 | 8 | 1,25 | 1,56 | 0,165 | 20 |

| CORAZA | | | | | | |
|------------|--------------------------|-------------------------------|-------------|--------|-------|----------------------------------|
| C' (plg) | a_s (ft ²) | G_s (lb/h ft ²) | D_e (plg) | Re_s | j_H | h_o (Btu/h ft ² °F) |
| 0,939 | 0,025 | 4906,85 | 0,89 | 317,01 | 11 | 81,23 |

| TUBOS | | | | | | | |
|----------------------------|--------------------------|-------------------------------|---------|------|-------|----------------------------------|----------------------------------|
| a'_t (plg ²) | a_t (ft ²) | G_t (lb/h ft ²) | Re_t | L/D | j_H | h_i (Btu/h ft ² °F) | h_o (Btu/h ft ² °F) |
| 0,665 | 0,012 | 9762,23 | 2108,28 | 17,3 | 15 | 61,38 | 45,17 |

| Coeficiente Global de Transferencia de Calor | | | | | |
|--|-----------------------------|----------------------|-----------|----------------------------------|----------|
| U_c (Btu/h ft ² °F) | a'' (ft ² /ft) | A (ft ²) | Q (Btu/h) | U_o (Btu/h ft ² °F) | R_d |
| 29,03 | 0,327 | 11,78 | 35381,11 | 25,99 | 4,00E-03 |

En resumen, el equipo constaría de 20 tubos de especificación BWG 8, que tienen un largo de 0,549 m, diámetro de 3,2 cm y espesor de 0,42 cm; dentro de una coraza de 30,48 cm de diámetro interno. Los tubos se presentarían en un arreglo triangular con 8 pasos por coraza y la coraza presentaría deflectores cada 1,27 cm. La cantidad de deflectores será elevada debido a la necesidad de establecer una turbulencia constante en el fluido frío que favorezca lo máximo posible a la transferencia calórica. En contraste con este diseño se podría optar por un intercambiador cuya longitud sea la mitad del equipo diseñado, con un diámetro interno de coraza de 39 cm debido a un mayor número de tubos necesarios para la transferencia (90 tubos). Escoger mayor número de tubos implica más elementos que deben ser sellados aumentando la posibilidad de fugas por lo cual no resulta lo más conveniente y se decidió establecer mayor cantidad de deflectores.

Con respecto al espesor de tubo, se utilizó la ecuación 57 para corroborar que el espesor designado bajo la selección del estándar BWG, para tubos de acero AISI 316, cumple con el valor requerido para soportar la presión del sistema, presentando un valor del factor de seguridad de 16,5 con respecto al espesor mínimo calculado.

5.5.2. Diseño de Pre Calentador

En este caso se comenzó definiendo el diámetro interno y externo del tubo a utilizar, y con el caudal determinado por la producción del reactor, se determinó la velocidad del fluido a calentar.

Tabla 12. Diámetro externo, interno y espesor del pre calentador. Velocidad del fluido en su sección.

| | | |
|--------|----------|---------|
| D_e | 0,01448 | m |
| D_i | 0,0127 | m |
| e | 0,089 | cm |
| A | 1,27E-04 | m^2 |
| Caudal | 55 | L/h |
| | 1,53E-05 | m^3/s |
| v | 0,121 | m/s |

Esto permitió calcular el número de Reynolds que junto con el resto de las propiedades del fluido llevaron a determinar el número de Nusselt y el coeficiente de convección. Estos datos se resumen a continuación, donde los subíndices i y f se refieren a las condiciones iniciales y finales del fluido respectivamente:

Tabla 13. Propiedades de la solución y coeficiente de convección interno del tubo

| Propiedades de la solución (lactosuero) | | | | | |
|---|----------|--------------------|-------------|----------|--------------------|
| T_i | 97 | °C | T_f | 180 | °C |
| Cp_i | 4201,3 | J/kg K | Cp_f | 4386,8 | J/kg K |
| ρ_i | 962,75 | kg/m^3 | ρ_f | 890 | kg/m^3 |
| μ_i | 2,92E-04 | Pa s | μ_f | 1,51E-04 | Pa s |
| κ_i | 0,68063 | W/m K | κ_f | 0,6765 | W/m K |
| Re_i | 5046,61 | | Re_f | 9012,23 | |
| Pr_i | 1,804 | | Pr_f | 0,981 | |
| f_i | 0,039 | | f_f | 0,032 | |
| Nu_i | 24,66 | | Nu_f | 32,18 | |
| $h_{i,INT}$ | 1321,80 | W/m ² K | $h_{f,INT}$ | 1714,11 | W/m ² K |

Por otro lado, se procedió de manera semejante para determinar el coeficiente de convección del lado externo del tubo, para lo cual se tuvieron en cuenta las propiedades del aire seco a 250 °C. Los resultados se muestran en la siguiente tabla:

Tabla 14. Propiedades del fluido calefactor y coeficiente de convección externo del tubo

| Propiedades del fluido calefactor (aire seco) | | |
|---|--------------|--------------------|
| T | 250 | °C |
| Cp | 1043 | J/kg K |
| κ | 0,04 | W/m K |
| β | 0,00189 | 1/°C |
| α | 6E-06 | m ² /s |
| μ | 2,76E-05 | Pa s |
| ν | 4,22E-05 | m ² /s |
| ρ | 0,653 | kg/m ³ |
| Pr | 0,71 | |
| L _c | 0,15 | m |
| Ra _f | 26232764,573 | |
| Nu _f | 28,401 | |
| h _{EXT} | 78,456 | w/m ² K |

Entonces con los coeficientes de convección calculados se procedió a aplicar la ecuación 28 que permitió determinar un área de transferencia y con esta un largo para el tubo.

Tabla 15. Cálculo de U y área de diseño para pre calentador

| | | |
|---------------------------|----------|--------------------|
| h_{INT} | 1517,96 | W/m ² K |
| h_{EXT} | 78,456 | w/m ² K |
| κ_{Pared} | 16,3 | W/m K |
| Q_{max} | 9454,724 | W |
| MLDT | 106,146 | K |
| U_{Diseño} | 73,771 | W/m ² K |
| A_{Diseño} | 1,207 | m ² |
| L_{Diseño} | 26,542 | m |

En resumen, el pre calentador tendría un largo de 26,543 m. Debido a que el diámetro del mismo es de media pulgada, este se puede disponer en espiras. Si cada espira tiene un diámetro de 0,75 m, con 40 espiras la longitud se reduce a 0,885 m. Calculando el espesor requerido para la presión de trabajo, se comprobó que el espesor designado para el pre calentador cumple con la especificación necesaria, con un factor de seguridad de 5 cuando se trabaja con acero AISI 316.

6. Conclusiones

Sobre la hidrólisis enzimática

Los ensayos experimentales con la utilización del permeado de lactosuero y la enzima no presentaron mayores dificultades. La mejor conversión se obtuvo para una temperatura de 30 °C, pH 6,7 y una concentración inicial de 1,25 mL/L, siendo esta del 72,36 %. El no haber llegado a una hidrólisis del 100 % lleva a hacer algunas consideraciones. Si bien la enzima puede hidrolizar la lactosa al 100 % en matrices lácteas que presentan hasta 5 % de lactosa, las muestras utilizadas tenían como mínimo una concentración del 13 %. Se podría suponer que no se llega a la totalidad de la hidrólisis debido a una saturación de la enzima, pero esta suposición no resulta avalada por los datos experimentales al haber encontrado que, con el doble de concentración inicial de enzima, se llegó a las mismas conversiones. Por otro lado, se pudo comprobar que los resultados de los ensayos concuerdan con los modelos cinéticos propuestos por estudios anteriores, lo que permite tener confiabilidad en la consistencia de la serie de datos obtenidos.

Otra suposición factible es la estructura (mórfica) en la que se encuentre disponible la lactosa en el medio. Se observó gran presencia de cristales insolubles, que con el calor de la pasteurización se disolvían, pero luego, a pesar de las condiciones de agitación y temperatura, con el paso del tiempo de reacción iban reapareciendo, por lo que, al no estar solubles, no quedan disponibles para la enzima. Es decir, el sistema de reacción presentó interferencias tales que no permitieron mantener su homogeneidad constante.

Sobre el equipo para obtener condiciones subcríticas

Los ensayos con este equipo llevaron más tiempo del esperado debido a diferentes complicaciones. En primer lugar, se intentó trabajar con el permeado, intentando diferentes métodos para solubilizar los cristales de lactosa que el mismo presentaba, y de esta forma no afectar el funcionamiento de la bomba de alimentación. Calentar la solución hasta su dilución no era una opción ya que no se podía alimentar dicho equipo con un fluido a alta temperatura. Se intentó autoclavando el mismo y si bien se logró la solubilización, el medio presentó pardeamiento por lo que se desistió de utilizar este método, ya que se prefirió que todas las reacciones de la lactosa con la temperatura sucedieran en el reactor de forma que fueran controladas por sus condiciones. Finalmente se decidió utilizar un simulante de la solución de la lactosa, ya que en su forma comercial (alfa monohidratada) sí presentaba una solubilidad total al 13 % y a temperatura ambiente. Esto también permitió controlar exactamente la concentración inicial.

Con esta solución se procedió a realizar los ensayos a 3 tiempos de residencia diferentes para cada temperatura, comenzando por la más baja 150 °C hasta llegar a 190 °C. El problema se dio cuando a 190 °C se produjo caramelización y el reactor se obturó por la formación de sólidos aglutinados en el fluido. Luego de que esto sucediera, fue casi imposible volver a operar el reactor manteniendo dicha condición de ensayo y es por esta razón que no se tienen más puntos para las curvas a cada temperatura. Sólo se pudieron conseguir 4 puntos para las temperaturas de 150 °C y 180 °C. La mayor conversión de lactosa lograda con estos ensayos fue del 73 % y se consiguió a 180 °C con un tiempo de residencia de 24,86 minutos.

Sobre la medición de resultados

Se debe tener en cuenta que la concentración final de lactosa fue medida de forma indirecta, con un método que implica una reacción enzimática, donde se confía en la actividad de esta enzima que es informada por su ficha técnica, pero que dista de la confianza que un método analítico verificado y validado puede brindar. Por esto sería ideal que en futuras investigaciones se realicen mediciones directas utilizando métodos cromatográficos, donde también se incluya la medición de los productos y subproductos de reacción.

Sobre el deslactosado con medio subcrítico y su comparación con la hidrólisis enzimática

En el permeado de lactosuero la hidrólisis enzimática llevó a un máximo de 72,36 %, mientras que en el medio simulado se llegó a 73 % de descomposición de lactosa por el sometimiento a condiciones subcríticas. Como se ha mencionado el principal objetivo fue el deslactosado, por lo que, a pesar de no encontrar un buen porcentaje de hidrólisis en condiciones subcríticas, el resultado global es satisfactorio. Más aún, si se consideran los productos reducidos en lactosa disponible en el mercado, que en su mayoría presentan un 80 % de reducción.

Entonces, en comparación se obtiene un porcentaje de deslactosado similar, pero condiciones más favorables para el equipo subcrítico, al llevar menos cantidad de tiempo para lograr el mismo objetivo. Sin embargo, el problema de esta alternativa es la generación de los productos de descomposición. Estas reacciones que se agrupan bajo el concepto de caramelización se utilizan usualmente en la gastronomía, pero se debería realizar un estudio más exhaustivo sobre cuáles y en qué cantidad se generan los subproductos para saber si son compatibles con los límites de ingesta diaria para una persona.

Por otro lado, se puede pensar que para lograr el 100 % del deslactosado, al igual que para realizar las mediciones indirectas de lactosa, el sistema subcrítico puede estar acoplado a un reactor enzimático. Este reactor requeriría de una concentración inicial de lactasa mucho menor que en el caso del permeado, ya que la cantidad de sustrato estaría reducida en un 73 % y de esta manera se reducirían los costos respecto al uso de enzima.

Sobre los parámetros cinéticos

Como se mencionó anteriormente, para cada temperatura se obtuvieron entre tres y cuatro puntos experimentales. Se sabe que con esta cantidad de puntos es poco recomendable hacer estimaciones y buscar parámetros que justifiquen el comportamiento del sistema. Sin embargo, se encontraron valores semejantes a los reportados por otras investigaciones, lo que permitió tomar la decisión de trabajar con las constantes cinéticas propias para el diseño del reactor.

Sobre el diseño del reactor y los intercambiadores

El dimensionamiento de los equipos propuestos tuvo como desafío pensar en la totalidad del sistema al diseñar cada uno de los equipos por separado. Se partió de la condición de cumplir un flujo turbulento en el reactor más el tiempo de residencia necesario para la conversión lograda, determinando así la escala de producción. Esta escala influyó en la dimensión de los intercambiadores de calor, por lo que esto significó realizar varias iteraciones por cada parámetro modificado para que todas las dimensiones fueran acordes y realistas. De esta forma el sistema quedó escalado en 436 veces, lo cual representa un número elevado, pero cumple con el objetivo de mantener condiciones turbulentas.

Por otro lado, en cuanto al reactor, un diseño más completo hubiera surgido de calcular la transferencia de calor necesaria para mantener las condiciones isotérmicas. Sin embargo, esto no fue posible al no poder establecer una entalpia de reacción para el modelo propuesto, donde la lactosa se descompone sin tener en cuenta intermediarios. La entalpia de reacción se podría calcular a través de las entalpias de formación de los productos y reactivos, pero la desventaja en este trabajo es que no se conoce con exactitud qué productos y en qué cantidad se forman.

Conclusiones Generales

Este trabajo consiguió obtener una respuesta favorable al objetivo planteado, ya que con un nuevo método se alcanzaron conversiones de lactosa similares a las obtenidas con el método enzimático tradicional en el permeado de lactosuero. Estos resultados permitieron el diseño de un reactor continuo isotérmico de 22,78 L, que procesa 55 L/h de permeado en condiciones subcríticas, hasta una conversión de 73 % de lactosa, operando a 180 °C y 70 bar. A su vez, fue posible el dimensionamiento de los intercambiadores de calor necesarios para cumplir con los objetivos, tanto del incremento de la temperatura hasta la establecida para la reacción, como el posterior enfriamiento necesario para detenerla. Sin embargo, para determinar si es posible un real aprovechamiento de este subproducto de la industria láctea, a través de su transformación en condiciones subcríticas, es necesario profundizar estudios del efluente del reactor. Sólo de esta forma se podría determinar si es realmente utilizable, ya sea, como bebida en la industria alimenticia o como fuente de insumos farmacéuticos como la lactulosa, siendo estos los posibles productos de mayor valor agregado, que darían mayor rentabilidad. Esta variable económica sólo podrá ser definida luego de realizar el análisis de costos del proceso en cuanto a las inversiones necesarias y los costos de operación, lo que también permitiría tener una comparación más completa entre los métodos analizados.

Entonces podemos concluir que los resultados aquí presentados son el primer paso que permite afirmar que se produce deslactosado en el permeado sometido a condiciones subcríticas y que funda cimientos para subsiguientes estudios que permitan conocer con más detalle el producto, el proceso, la viabilidad económica del mismo, entre otros.

7. Bibliografía

- Berg, H. E. y Van Boekel, M. a. J. S. (1994) *Reactions of lactose during heat treatment of milk*. I. Reaction pathways., Neth Milk Dairy Journal.
- Castillo Yauri, C. N. (2013) *Determinación de parámetros óptimos para la elaboración de una bebida nutricional a base de lactosuero, Maca y Chicuro*. Universidad Nacional del Centro de Perú.
- Cruz Teran, J. et al. (2008) *Características generales sobre el uso del Suero de queso en la Provincia de Santa Fe*, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, p. 21.
- Delgadillo Gonzáles, O. (n.d) *Caramelización*.
- Delgado Hervas, T. (1993) *Contenido en furosin, lactulosa y δ -lactoglobulina como indicadores de calidad en leches líquidas y en polvo*. Universidad Complutense de Madrid.
- DSM Food specialties (1889) *Maxilact® Lactasa: aplicación en leche y suero de leche*.
- E. Jurado*, F. Camacho, G. Luzón, J. M. V. (2002) *A new kinetic model proposed for enzymatic hydrolysis of lactose by a β -galactosidase from Kluyveromyces fragilis*, Enzyme and Microbial Technology, 31, pp. 300–309.
- Fogler, H. S. (2008), *Elementos de Ingeniería de las Reacciones Químicas*, México DF, México: Pearson Educación.
- Goldberg, Robert N, y B Tewari. 1989. *A Calorimetric and Equilibrium Investigation of the Hydrolysis of Lactose*. 264 (17): 9897–9900.
- Haghghat Khajavi, S. et al. (2004) *Decomposition Kinetics of Maltose in Subcritical Water*, Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 68(1), pp. 91–95. doi: 10.1271/bbb.68.91.
- Haghghat Khajavi, S. et al. (2005) *Kinetics on disaccharide decomposition in subcritical water*, LWT - Food Science and Technology, 38(3), pp. 297–302. doi: 10.1016/j.lwt.2004.06.005.
- Hernández, J. C. et al. (2012) *Caracterización fisicoquímica de un lactosuero: potencialidad de recuperación de fósforo*, 22(1), pp. 11–18.
- Hronská, H., Grosová, Z. y Rosenberg, M. (2009) *Hydrolysis of lactose in milk by Kluyveromyces lactis β -galactosidase immobilized in polyvinylalcohol gel*, 48(2), pp. 87–91.
- Illanes, A., Wilson, L. y Tomasello, G. (2001) *Effect of modulation of enzyme inactivation on temperature optimization for reactor operation with chitin-immobilized*

- lactase*, in Journal of Molecular Catalysis - B Enzymatic. doi: 10.1016/S1381-1177(00)00023-0.
- Kees Daamen y Ardy van Erp (2010). *Entender la intolerancia a la lactosa en América Latina*. Revista Énfasis Alimentación. Disponible en: <http://www.alimentacion.enfasis.com/articulos/16347-entender-la-intolerancia-la-lactosa-america-latina> (Acceso: 10 marzo 2019)
 - Kern, D. Q. (1979) *Procesos de Transferencia de Calor*. Primera edición. México CECSA.
 - King J. W, *Advances in critical fluid technology for food processing*. Food science and technology today 14 (2000)
 - Levenspiel, O. (2004), *Ingeniería de las reacciones químicas*, México DF, México: Limusa Wiley.
 - Mammarella, E. J. (2001) *Estudio del sistema de inmovilización de enzimas para la hidrólisis de lactosa*. Instituto de Desarrollo Tecnológico para la Industria Química (UNL-CONICET).
 - Mills, A. F. (1991), *Transferencia de calor*, Los Ángeles, EEUU: McGraw-Hill.
 - Ministerio de Agroindustria (2018). Elaboración de Productos Lácteos. Recuperado: https://www.agroindustria.gob.ar//sitio/areas/ss_lecheria/estadisticas/_02_industrial/_archivos/PI003G.jpg
 - Muset, Graciela Castells, M. L. (2017) *Valorización del lactosuero*. Disponible en: <https://www.inti.gob.ar/lacteos/pdf/lactosuero.pdf> (Acceso: 15 August 2018).
 - Recinos Rivas, L. A. and Saz Guerrero, O. A. (2006) *Caracterización del suero lácteo y diagnóstico de alternativas de sus usos potenciales en el salvador*. Universidad de El Salvador.
 - Rogalinski, T. et al. (2008) *Hydrolysis kinetics of biopolymers in subcritical water*, 46, pp. 335–341. doi: 10.1016/j.supflu.2007.09.037.
 - Soisangwan, N. et al. (2017) *Production of lactulose from lactose in subcritical aqueous ethanol*, pp. 2–7. doi: 10.1111/jfpe.12413.
 - Villarreal Arizpe, B. (2017) *Desarrollo en planta piloto de una bebida de lacto suero y fruta natural para adultos mayores*. Universitata Autònoma de Barcelona.