

Escalado a planta piloto de hidrólisis enzimática de la sacarosa

Sara Mendoza-Ferrer* y Yeider Rodríguez-Molina

Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar (ICIDCA).

Vía Blanca 804 y Carretera Central. San Miguel del Padrón. La Habana, Cuba.

*sara.mendoza@icidca.azcuba.cu

RESUMEN

La necesidad de incrementar la producción nacional de sorbitol para ser utilizado en la formulación de pasta dental, hace necesario mejorar la calidad de su materia prima fundamental, la glucosa. En Cuba se obtiene glucosa a partir de azúcar refino, mediante la hidrólisis (inversión) ácida de la sacarosa. La inversión ácida de la sacarosa se considera un proceso más económico si se compara con la enzimática, debido al alto costo de producción de la enzima. Sin embargo, obtener glucosa por vía enzimática garantiza productos con bajo contenido de cenizas, elimina el mal sabor del producto final; además, minimiza la formación de productos colaterales, el deterioro ambiental y del equipamiento. En el presente trabajo se resumen los principales resultados obtenidos en el escalado a nivel de planta piloto (reactor de 40 L), de la etapa de inversión enzimática, si se tienen en cuenta las relaciones entre las dimensiones lineales de los equipos (factores de escala geométricos), a partir de consideraciones de criterios de semejanza. Se utiliza como catalizador de la hidrólisis, la enzima invertasa GS115BfrA4X *Pichia pastoris*. Se obtuvo en la escala piloto un tiempo de inversión máximo de 4 h, por lo que se logró identificar una combinación óptima de los factores (Temp = 85 °C, °Bx = 75 % y Enzima = 25 + 5 U/g de sacarosa).

Palabras clave: escala piloto, glucosa, hidrólisis enzimática, sacarosa.

ABSTRACT

The need to increase the national production of sorbitol to be used in the formulation of toothpaste, makes it necessary to improve the quality of its fundamental raw material, the glucose. In Cuba, the glucose is obtained from refined sugar, using the acid hydrolysis (inversion) of sucrose. The acid inversion of sucrose is considered a more economical process compared to the enzymatic one, due to the high cost of production of the enzyme. However, obtaining glucose enzymatically guarantees products with low ash content, eliminates the bad taste of the final product, in addition to minimizing the formation of collateral products, environmental deterioration and equipment. In the present work the main results obtained in the scaling at the pilot plant level (40 L reactor) of the enzyme inversion stage are summarized, taking into account the relationships between the linear dimensions of the equipment (geometric scale factors), from considerations of criteria of similarity. The invertase enzyme GS115BfrA4X *Pichia pastoris* is used as a hydrolysis catalyst. A maximum investment time of 4 h was obtained in the pilot scale, which is why it was possible to identify an optimal combination of factors (Temp = 85 °C, °Bx = 75 % and Enzyme = 25 + 5 U / g of sucrose).

Key words: pilot scale, glucose, enzymatic hydrolysis, sucrose.

INTRODUCCIÓN

El sorbitol se utiliza en la fabricación de dentífricos, como agente humectante y en lociones para el cutis. Sus propiedades como inhibidor son valiosas para el blanqueo y desengrasado de tejidos

y para el grabado sobre aluminio. Las resinas de sorbitol se emplean en barnices y lacas, por sus buenas cualidades de adhesividad, flexibilidad y durabilidad (1).

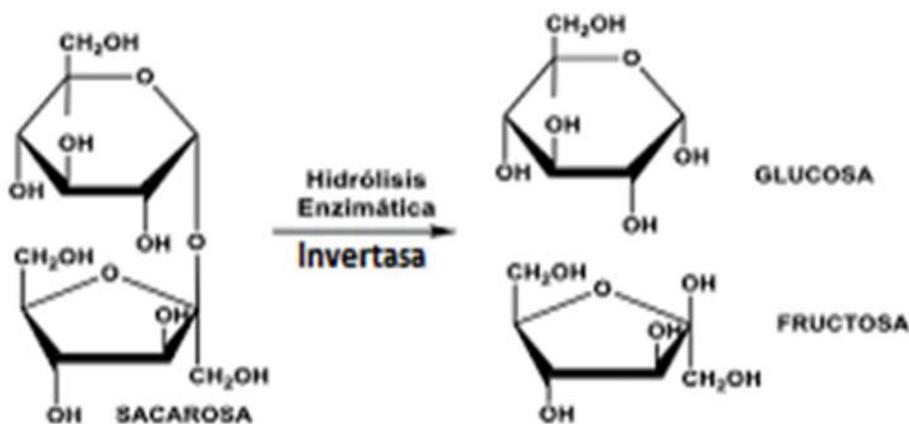
Aunque existen tecnologías patentadas, a partir de la hidrólisis de materiales lignocelulósicos a alta temperatura y presión, el proceso mundial establecido, sin presentar hasta el momento competencia, está basado en la hidrogenación catalítica de la glucosa (2).

El país tiene la necesidad de incrementar la producción nacional de sorbitol para ser utilizado en la formulación de pasta dental. En Cuba existen dos industrias que producen glucosa, a partir de azúcar refino, mediante la hidrólisis (inversión) ácida de la sacarosa (UEB Chiquitico Fabregat, de la provincia de Villa Clara y la UEB Argentina, de la provincia de Camagüey).

La inversión ácida de la sacarosa, a pesar de ser considerada un proceso más económico en comparación con la enzimática, debido al alto costo de producción de la enzima, presenta, según estudios realizados (3 - 7), formación de productos coloreados con presencia de cenizas y subproductos no deseados, como los derivados cíclicos de los monosacáridos, que se producen a pH bajo y elevada temperatura (8).

Sin embargo, obtener glucosa por vía enzimática garantiza productos con bajo contenido de cenizas, elimina el mal sabor del producto final (9, 7); además, minimiza la formación de productos colaterales, el deterioro ambiental y del equipamiento (8).

El presente trabajo tiene como objetivo realizar el escalado a nivel de planta piloto, de la etapa de inversión enzimática, apoyados en el balance de masa y la metodología propuesta por Rosabal (10), como catalizador de la hidrólisis se emplea la enzima GS115BfrA4X *Pichia pastoris*, modificada genéticamente para expresar la invertasa de *Thermotoga maritima*, con un pH óptimo de 5.5 y temperatura óptima de 80 - 90 °C.



MATERIALES Y MÉTODOS

Invertasa

Se empleó la enzima invertasa GS115BfrA4X de *Pichia pastoris*, producida en la UEB Bioprocesos Cuba 10, con una actividad de 155 U/mL.

Sacarosa

Para realizar el escaldo se utilizó azúcar refino procedente de la UEB Chiquitico Fabregat.

Métodos de análisis de la sacarosa

- Color por vía espectrofotométrica (NC 382:2005) (11)
- Ceniza conductimétrica (NC 380:2005) (12)

- Azúcares reductores (NC 383:2005) (13)
- Humedad mediante el método gravimétrico (NC 81:2017) (14)
- Pol (NC 379:2005) (15)

Equipamiento

La hidrólisis enzimática de la sacarosa, a escala piloto, se realizó en un reactor enchaquetado tipo tanque de agitación, con una capacidad de 40 L.

En las escalas de laboratorio y banco se utilizaron reactores enchaquetados, con recirculación de agua, tipo tanque de agitación, de 1 L y 5 L respectivamente.

Tabla 1. Características de los reactores empleados en las diferentes escalas

Factores	Escalas		
	Laboratorio	Banco	Piloto
Volumen total (Vt)	1 L	5 L	40 L
Volumen efectivo (v)	0.5 L	4.75 L	38 L
Velocidad de agitación (n)	80 rpm	150 rpm	250 rpm
Altura total del tanque (H)	13 cm	35 cm	60 cm
Altura de llenado del tanque (h)	7.1cm	23 cm	48 cm
Temperatura del sistema de mezclado (Tr)	85 °C	85 °C	85 °C
Temperatura del medio de intercambio (Tm)	87 °C	90 °C	110 °C

El Brix de la solución se determinó mediante un refractómetro digital (XS) y se utilizó un equipo medidor de pH de marca METTLER TOLEDO.

El avance de la inversión enzimática fue seguido por polarimetría, en un polarímetro de marca Anton Par, que realizó mediciones cada dos horas hasta lograr la máxima inversión.

Para calcular el volumen de la disolución se utilizaron las densidades (ρ) de 1412.20 y 1379.37 kg/m³ para concentraciones de sacarosa de 80 y 75 °Brix respectivamente, estos datos se obtuvieron del ICUMSA (SPS: Especificaciones y Patrones (SPS-4)).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la tabla 2 se muestran las especificaciones para azúcares blancos de la (NC 377:2013) (16) y la repetibilidad y reproducibilidad de los métodos utilizados.

Tabla 2. Especificaciones para azúcares blancos

Métodos	Repetibilidad	Reproducibilidad	Especificaciones para azúcares blancos
Pol	Máximo 0.066 °Z	Máximo 0.094 °Z	Mínimo 99.65 °Z
Humedad	Máximo 0.005 % m/m	Máximo 0.10 % m/m	Máximo 0.10 % m/M
Reductores	0.007 --- 0.022 %	0.015 --- 0.029 %	Máximo 0.10 % m/m
Cenizas	0.00115 % m/m	0.00177 % m/m	Máximo 0.10 % m/m
Color foto colorimétrico	Máximo 3 UI	Máximo 7 UI	Máximo 300 UI

En la tabla 3 se muestran los promedios de los resultados obtenidos en la caracterización del azúcar refino empleado.

Tabla 3. Caracterización del azúcar refinado

	Pol	Humedad	Reductores	Cenizas	Color foto colorimétrico
Resultados promedios	99.80 °Z	0.05 %	0.06 %	0.04 % m/m	290 UI
Repetibilidad	0.052 °Z	0.003	0.015 %	0.00100 % m/m	3 UI
Reproducibilidad	0.040 °Z	0.080	0.020 %	0.00110 % m/m	5 UI

Para el escalado de los reactores se toman en cuenta las relaciones entre las dimensiones lineales de los equipos (factores de escala geométricos), a partir de consideraciones de criterios de semejanza: $(HL/D)_{\text{Modelo}} = (HL/D)_{\text{Prototipo}}$ (10).

Escala de laboratorio

En el escalado a planta piloto se tuvieron en cuenta los resultados obtenidos en el diseño de Box-Behnken de superficie de respuesta, a tres niveles, realizados en un reactor de 1 L de capacidad, que permitió estudiar el efecto de variar la temperatura de reacción, concentración de enzima y °Brix de la solución, sobre el tiempo de inversión de la sacarosa, El menor tiempo predicho por el proceso de optimización es de 4 horas y se alcanza para la siguiente combinación de niveles de los factores (Temp = 85 °C, °Brix = 80 % y Enzima = 23 U/g de sacarosa) (17).

Escala piloto

El factor de escala utilizado es de 40, con respecto al volumen a escala de laboratorio.

Tabla 4. Variables del escalado a planta piloto en un reactor de 40 L

Conc. de sacarosa (°Bx)	Sacarosa (kg)	H ₂ O (L)	Temperatura (°C)	Act. enzimática (U/mL)	Enzima (U/g) de sacarosa	Enzima (L)
80	42.93	7.61	85	316.7	23	3.12

Con las condiciones anteriores no se logró una inversión total de la sacarosa en el tiempo predicho a escala de laboratorio, ya que transcurridas 7 horas, el avance de la reacción era de 2.02 °Z.

Posibles causas de no alcanzar la inversión completa en el tiempo predicho

- Inhibición competitiva: la enzima (E) se asocia reversiblemente al sustrato (S) o al inhibidor (I), pero no hay complejo ternario ESI. El inhibidor compite con el sustrato por el centro activo de la enzima y forma un complejo (EI) que no se convierte en producto.
- Inhibición no competitiva: en este caso el inhibidor se combina con la enzima independientemente del sustrato, sin modificar la afinidad de la enzima por el sustrato, pero dando un complejo ternario inactivo. El inhibidor se fija a la enzima en un sitio distinto del centro activo.
- Inhibición incompetitiva: este tipo de inhibición comparte la formación de un complejo ternario, según un mecanismo secuencial: el inhibidor tiene afinidad solamente por el complejo enzima-sustrato. El complejo ternario ESI es inactivo (18, 19).

Escala de banco

Debido a los resultados anteriores se determinó incorporar al estudio de la hidrólisis enzimática una escala de banco (reactor de 5 L) para lograr un factor de escalada de 8 (20) y, de esta forma, obtener la información experimental necesaria para optimizar los balances de masa.

Se realizaron tres experimentos con tres réplicas, cada uno evidenció que pasadas 2 h la velocidad de la reacción enzimática disminuye (figura 1), por ende se decidió en los ensayos posteriores contrarrestar este efecto y aumentar la dosis de invertasa inicial hasta 25 U/g de sacarosa y, pasadas las 2 h, adicionar 5 U/g de sacarosa, para un total de 30 U/g de sacarosa en los que se logró alcanzar tiempos de inversión de 4 h.

Tabla 5. Variables experimentales del escalado de banco en un reactor de 5 L

Conc. de sacarosa (°Bx)	Sacarosa (kg)	H ₂ O (L)	Temperatura (°C)	Act. enzimática (U/mL)	Enzima (U/g) de sacarosa	Enzima (L)
75	5.65	1	85	316.7	23	0.41
75	5.65	0.98	85	316.7	24	0.43
75	5.65	1.7	85	316.7	19	0.34
75	5.65	0.88	85	316.7	25 + 5	0.45

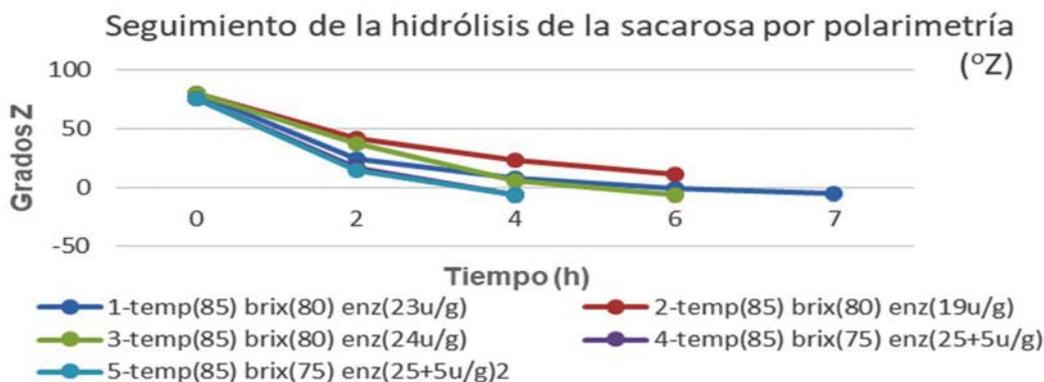


Figura 1. Promedio del tiempo de reacción enzimática (h) de las réplicas realizadas a cada condición experimental.

Escala piloto (prueba 2)

Con la condición experimental óptima (Temp = 85 °C, °Brix = 75 % y Enzima = 25 + 5 U/g de sacarosa) obtenida a escala de banco se realiza un nuevo escalado a planta piloto. En la tabla 6 se muestran las condiciones experimentales.

Tabla 6. Variables experimentales del escalado a escala piloto en un reactor de 40 L

Conc. de sacarosa (°Bx)	Sacarosa (kg)	H ₂ O (L)	Temperatura (°C)	Act. enzimática (U/mL)	Enzima (U/g) de sacarosa	Enzima (L)
75	39.31	5.50	85	155	30	7.61

Se obtuvo como resultado un tiempo de inversión de 4 h trabajando con un factor de escala de 8 con respecto a la escala de banco.

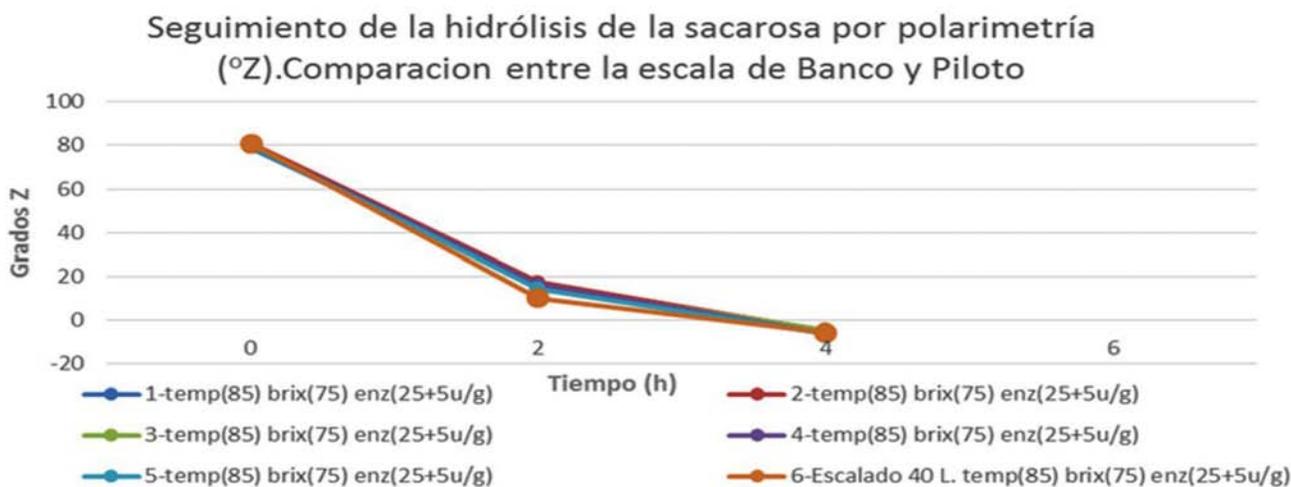


Figura 2. Comparación del tiempo de reacción enzimática (h) entre las réplicas realizadas de la mejor condición experimental, a escala de banco, y el escalado a planta piloto.

CONCLUSIONES

- Se evidenció en el escalado a planta piloto que existe una inhibición enzimática causada por la relación sustrato-producto. Este efecto fue potenciado por el escalado de laboratorio a planta piloto con un factor de escala de 40 sin considerar variables de influencia en el proceso.
- Se demostró que con un factor de escala entre 3 y 15, se obtienen resultados similares a la escala inferior (banco).
- Se obtuvo en la escala piloto (reactor de 40 L) un tiempo de inversión máximo de 4 h, por lo que se logró identificar una combinación óptima de los factores (Temp = 85 °C, °Bx = 75 % y Enzima = 25 + 5 U/g de sacarosa).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Michelena, G.; Santiesteban, C.M.; *et al.* Manual de los Derivados de la Caña de Azúcar. Tercera Edición. Icidca, La Habana, 2000.
2. Gonzaga, B.; Silva, J.; Delgado-Arcaño, Y., *et al.* Aspectos económicos y tecnológicos de la producción de sorbitol por vía química. Revista Cubana de Química. 2019.
3. Gómez, L. Estabilización funcional y operacional de enzimas hidrolíticas de interés industrial [Tesis presentada en opción al Grado Científico de Doctor en Ciencias Técnicas], Centro de Estudios Biotecnológicos, Universidad de Matanzas, Cuba, 2015.
4. Rodríguez, R.A. Propuesta tecnológica para la obtención de glucosa por hidrólisis enzimática a partir del azúcar refino [Tesis de Diploma]: Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas, Cuba, 2016.
5. Paret, A. Propuesta tecnológica para la etapa de hidrólisis enzimática en la producción de glucosa a partir de azúcar refino [Tesis de Diploma]: Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas; 2018.
6. Ruíz, I.C. Propuesta de modificaciones a la producción de glucosa por vía enzimática en la UEB “Chiquitico Fabregat” [Tesis en opción al título de Ingeniero Químico]: Facultad Química y Farmacia, Universidad Central “Marta Abreu” de las Villas, Cuba, 2018.
7. Cortés, M.F.; Ruíz, I.; Alomá, I.; González, L.E. Diseño de intercambiadores de calor para intensificar el proceso de obtención de glucosa en la UEB “Chiquitico Fabregat”, Centro Azúcar, Vol. 47, No. 1, 2020, pp. 10-21.
8. León, V.; Ortega, J.C.; Acosta, R.; Oliva, N.; Hernández, R.; *et al.* Biosíntesis de invertasa recombinante en *Pichia pastoris*., Memorias del XV Congreso Internacional sobre azúcar y derivados, Diversificación 2019, La Habana, Junio 2019 pp. 1-4.
9. Santana, A.C.; Costa, L.; Mendes, A.; Moraes, C.A.; Gomes de Andrade, C.A.; *et al.* Sucrose hydrolysis catalyzed by auto-immobilized invertase into intact cells of *Cladosporium cladosporioides*., Electronic Journal of Biotechnology, Vol. 8, No. 1, 2005, pp. 55-62.
10. Rosabal, J. M., Hidrodinámica y Separaciones Mecánicas., Vol. 2, Editorial Félix Varela, La Habana, 2006, pp. 265-313.
11. NC 382:2005., Determinación del color en una solución de azúcar blanco. Método Fotocolorimétrico., 2005, pp. 4-8.
12. NC 380:2005., Determinación de cenizas en Azúcares Blancos. Método Conductimétrico., 2005, pp. 4-7.
13. NC 383:2005., Determinación de azúcares reductores en azúcares blancos. Método volumétrico de Ofner modificado., 2005, pp. 4-7.
14. NC 81:2017., Determinación de la humedad del azúcar por pérdida en el secado., 2017, pp. 4-7.

15. NC 379:2005., Determinación del Pol en azúcares blancos. Método gravimétrico de la masa normal, 2005, pp. 4-8.
16. NC 377:2013., Azúcares blancos_ especificaciones., 2013, pp. 4-7.
17. Ferrer, S.M.; Molina, Y.R. Optimización del tiempo de inversión en la hidrólisis enzimática de la sacarosa., Centro Azúcar, Vol. 48, No. 4, 2021, pp. 53-62.
18. Martínez, J.L.; Morales, F.G. Caracterización cinética de la hidrólisis de la sacarosa con invertasa libre e inmovilizada., Tesis presentada en opción al de Ingeniero Biotecnólogo, Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología, Instituto Politécnico Nacional, México, 2007.
19. Solís, J.A.; Calleja, K.; Durán de Bazúa, M del C. Desarrollo de jarabes fructosados de caña de azúcar a partir del guarapo., Revista Tecnología, Ciencia, Educación, Vol. 25, No. 1., 2010, pp. 53-62.
20. González, R.C. Principios Básicos del Escalado., Editorial Universitaria, Universidad de Matanzas Camilo Cienfuegos, 2000, pp. 12-16.