

Mezcla óptima de enzimas comerciales y autóctonas para la hidrólisis en el desarrollo sinérgico de la industria química y las biorrefinerías.

Optimal mixture of commercial and indigenous enzymes for hydrolysis in synergistic development of the chemical industry and biorefineries.

Jenny Serrano Castillo ¹; Carmen A. Salvador Pinos ²; Yaillet Albernas Carvajal ³;
Ronny Pi-baque Sánchez ⁴; Erenio González Suárez ⁵ /*.

1;2 Grupo de la Industria Química, Ministerio de Industrias, Cuba; Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Central del Ecuador

3;4;5 Departamento de Ingeniería Química, Facultad de Química y Farmacia, Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas, Villa Clara, Cuba; Instituto de Microbiología, Universidad San Francisco de Quito, Ecuador; e.

*Correspondence: erenio@uclv.edu.cu.

Available from: <http://dx.doi.org/10.21931/RB/2024.09.02.11>

Resumen:

La industria química requiere materias primas productos de las industrias que se pueden desarrollar como biorrefinerías, como es el etanol. En la producción de etanol, los insumos de enzimas en la hidrólisis enzimática tienen gran incidencia en los costos. La combinación de enzimas en la conversión biotecnológica de la biomasa lignocelulósica busca mejorar su funcionalidad y optimizar su tasa global de conversión. En este trabajo, se evaluaron cocteles enzimáticos provenientes de *Bacillus subtilis* y *Scopulariopsis brevicaulis* aislados en Ecuador como complemento para enzimas disponibles comercialmente. Esto se logró empleando métodos de optimización. Mediante la combinación de diseños factoriales saturados y fraccionarios, se determinaron 6 variables parametrizables para explorar su efecto en la eficiencia de la hidrólisis del bagazo de caña de azúcar. Después del análisis de la eficiencia, se concentró el estudio en las mezclas binarias empleando enzimas bacterianas y comerciales, descartando las fúngicas (*S. brevicaulis*) debido a su pobre desempeño. El porcentaje óptimo de la mezcla fue 63,5% de enzima comercial y 36,5% de cocteles enzimáticos de *Bacillus subtilis* nativo de Ecuador. Se muestra la factibilidad de reemplazar parcialmente las enzimas comerciales por cocteles enzimáticos nativos obtenidas con tecnologías propias, lo que disminuye los altos costos de la hidrólisis.

Palabras clave. Enzimas; hidrólisis; optimización.

Abstract

The chemical industry requires raw materials products from industries that can be developed as biorefineries, such as ethanol. In the production of ethanol, enzyme inputs during enzymatic hydrolysis have a significant impact on cost. The combination of enzymes in the biotechnological conversion of lignocellulosic biomass aims to improve its functionality and optimize its overall conversion rate. In this study, enzyme cocktails from *Bacillus subtilis* and *Scopulariopsis brevicaulis* isolated in Ecuador were evaluated as complementary enzymes to commercially available enzymes. This was achieved using optimization methods. By combining saturated and fractional factorial designs, six parameterizable variables were determined to explore their effects on sugarcane bagasse hydrolysis efficiency. After the efficiency analysis, the study focused on binary mixtures using bacterial and commercial enzymes and excluded fungal enzymes (*S. brevicaulis*) due to their poor performance. The optimal percentage of the mixture was 63.5% commercial enzyme and 36.5% enzymatic cocktails from *Bacillus subtilis*, which is native to Ecuador. The feasibility of partially replacing commercial enzymes with native enzymatic cocktails obtained using proprietary technologies is demonstrated, which reduces the high hydrolysis costs

Keywords. Enzymes; hydrolysis; optimization.

Introducción

El desarrollo de las producciones de la industria de procesos químicos necesita de disponer como materias primas complementarias a las aprovechables de sectores de la minería o de sus producciones propias, en la fabricación de productos de más alto valor agregado, como para el árbol del cloro, de otros que se pueden desarrollar como derivados de la transformación de la biomasa disponible en cada país, como el etanol factible producir de primera, segunda y tercera generación de la industria de la caña de azúcar, favoreciendo un desarrollo sinérgico gracias al encadenamiento productivo entre la industria química y las biorrefinerías ¹.

La producción de etanol de segunda generación se ve limitada por los altos costos de las enzimas comerciales en la etapa de hidrólisis enzimática. La mezcla de extractos de enzimas ha recibido baja atención, pese a que presentan gran potencial para promover la hidrólisis enzimática; el sinergismo encontrado entre los extractos de las enzimas representa una ventaja en la utilización de éstas. Estudios relacionados a esta temática, como el de Bussamra y colaboradores proponen que un buen balance entre las enzimas de un coctel enzimático mediante un diseño experimental de mezclas, constituye una aproximación promisoría para optimizar la hidrólisis, logrando incrementar el rendimiento de glucosa cerca de un 40% en relación a las enzimas comerciales tales como *Celluclast*². Otros estudios como el de da Silva y colaboradores proponen mezclar celulasas producidas en el

laboratorio y comerciales.

Relacionadas a las preparaciones enzimáticas, se encuentran en el mercado algunas mezclas de enzimas comerciales que incluyen el set de enzimas celulolíticas requeridas para la hidrólisis (*Celluclast*, *Novozyme CellicRCTec2*; *Cellulase Aspergillum niger*, Sigma). Sin embargo, estas representan un gran desafío para el uso de la lignocelulosa presente en la materia prima que se usa para la producción de azúcares simples; es necesario llevar a cabo investigaciones para seleccionar enzimas más eficientes y menos costosas.

Por lo manifestado, mediante la colaboración internacional con estudios previos, se evaluó la sustitución de las enzimas comerciales por enzimas nativas del Ecuador. Además, se investigó sobre su uso⁵, y su producción industrial⁶. En aras de disminuir los costos de las enzimas, se apuesta por la producción de las mismas a partir de diferentes microorganismos como hongos y bacterias⁷ con el objetivo de sustituir una parte de enzimas comerciales por las enzimas producidas por los microorganismos estudiados, consiguiendo realizar mezclas enzimáticas que disminuyen los costos en la etapa de hidrólisis y la compra de enzimas comerciales, que presentan elevados precios en el mercado.

La producción de cocteles enzimáticos en el laboratorio no solo presenta ventajas del orden científico técnico, sino que también económico y social. Sin embargo, estos estudios se encuentran en fases de desarrollo, y por lo tanto, el interés mostrado por la industria presenta cuellos de botella⁸. El aislamiento, purificación y manejo de microorganismos productores naturales de cocteles enzimáticos constituye una opción que permitiría mejorar los rendimientos de producción de glucosa y disminuir los costos por su compra. Considerando que el aumento de la eficiencia de la hidrólisis enzimática se encuentra mediante la optimización, en esta investigación se procedió a utilizar cocteles enzimáticos provenientes de organismos aislados en Ecuador para mezclarlos con enzimas comerciales. En esta búsqueda se ha planteado la optimización como el proceso para encontrar en dónde están las mejores condiciones de la hidrólisis enzimática, empleando enzimas comerciales y nativas, para disminuir el costo de producción de la tecnología de producción de etanol a partir de las enzimas en estudio.

El indicador que se seleccionó para optimizar son los costos de producción del proceso tecnológico de la hidrólisis enzimática para una producción de etanol, fijado previamente de acuerdo con la capacidad instalada en una industria de la celulosa empleando una mezcla de celulasas comercial y nativas. Varios son los mecanismos que se pueden emplear para optimizar el proceso de hidrólisis del bagazo, los cuales han buscado el minimizar el costo de la producción de etanol de segunda generación, además deben ser económicos, eficientes y bajos en requerimientos de energéticos. Bajo este marco, el uso y combinación de enzimas apunta como una de las mejores alternativas. Y ésta es

la que se explora en este estudio que tiene como objetivo evaluar, aplicando métodos de optimización, las posibilidades de empleo de los cocteles nativos de enzimas provenientes de *Bacillus subtilis* y *Scopulariopsis brevicaulis* como complemento de las enzimas comerciales.

Material y métodos

La determinación de la composición óptima de mezclas enzimáticas fue realizada mediante un estudio de mezclas aplicando el método de enrejado simplex⁹, que tuvo como criterio de optimización el rendimiento de hidrólisis enzimática. Se estudiaron las posibilidades de mezclar tres compuestos enzimáticos, dos de ellos a partir de un coctel de celulasas de origen bacteriano y fúngico respectivamente (aisladas a partir de microorganismos nativos de Ecuador) y de una enzima comercial *Aspergillus niger* (Sigma 39 IU/g) para hidrolizar bagazo de caña de azúcar en sus condiciones óptimas⁵ de acuerdo con el diseño de mezclas mostrado en la Figura 1.

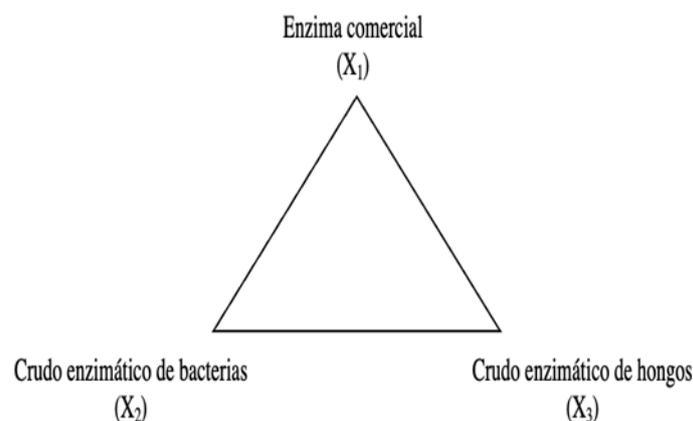


Figura 1. Método de Enrejado Simplex, polinomio de segundo grado.

Para lo que los rendimientos de la hidrólisis se determinan por la ecuación 1:

$$\text{Rendimiento} = \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_1 2X_1 X_2 + \beta_1 2X_1 X_3 + \beta_2 3X_2 X_3 + \dots \quad (1)$$

Donde:

X_1 es (cantidad, concentración, eficiencia) de enzima comercial.

X_2 es (cantidad, concentración, eficiencia) de cruza enzimático de bacterias.

X_3 es (cantidad, concentración, eficiencia) de cruza enzimático de hongos.

β_1 , β_2 y β_3 son sus respectivos parámetros.... (cantidad, concentración, eficiencia).

Para la obtención de las mejores condiciones de conducción de la hidrólisis enzimática, se elaboraron los modelos del proceso tecnológico de la misma para cada uno de los puntos del diseño de las diferentes mezclas de enzimas nativas y comerciales.

En el estudio de la eficiencia de la hidrólisis enzimática se empleó una combinación del diseño experimental de Plackett-Bürman¹⁰ complementándose con el de Box-Hunter¹¹, los que han sido

empleados con éxito por González y colaboradores¹² para minimizar los experimentos en su investigación.

La utilización del diseño de Box-Hunter¹¹ requiere definir, según los resultados, los contrastes entre las variables y sus interacciones y generar relaciones para el mezclado de los efectos de las variables¹³. Los experimentos fueron planteados para determinar el tipo de dependencia del parámetro de respuesta Y (Rendimiento de glucosa en gramos /100 gramos de materia prima) de las variables independientes en los rangos que se definen como mínimos (-) y máximos (+):

X₁: temperatura 35 (-) y 50 (+); °C

X₂: carga enzimática 10 (-) y 25(+); UPF/g

X₃: velocidad de agitación 150 (-) y 200 (+); rpm

X₄: tiempo 15 (-) y 24 (+); horas

X₅: porcentaje de sólidos (-) 4 y 8 (+); %

X₆: Tween 0,1 (-) y 0,2 (+); %

A partir de la información y modelos generados en la etapa experimental para analizar la hidrólisis enzimática con los diferentes cocteles de enzimas nativas y comerciales, como ha sido presentada⁵ se aplicó el modelo factorial obtenido del diseño de Box- Hunter¹¹, para explorar todas las posibles variantes a realizar en el laboratorio con el coctel enzimático. De esta forma se busca la posibilidad de la existencia de condiciones de la hidrólisis con un rendimiento mayor al obtenido en los experimentos realizados, explorando, con ayuda del modelo las ocho probabilidades de un diseño factorial completo 2^k, que no se incluyeron en los ocho ensayos ejecutados a nivel experimental a través del diseño Plackett Búrman¹⁰.

Después de determinar mediante el diseño factorial el ensayo con el mejor rendimiento de glucosa en gramos /100 gramos de materia prima (Y), se empleó el método de optimización directa en el que se aplicó la función real modelada a partir del costo en función del porcentaje de enzima comercial y nativa; se obtuvo el gráfico de la dependencia de costos totales de producción (USD) vs por ciento (%) de mezcla y se ajustaron los resultados.

Utilizando los tres puntos más bajos de la curva, se obtuvo una ecuación mediante el método de los mínimos cuadrados: La derivada de la ecuación permitió determinar el punto de mezcla en el que los costos de la etapa de hidrólisis son mínimos.

Una vez obtenido el mejor rendimiento de las mezclas de enzimas, mediante el método de optimización empleado, se procedió a determinar la cantidad de las materias primas a emplear en la hidrólisis enzimática, considerando las condiciones del mejor ensayo. Para establecer los equipos que intervienen en el proceso tecnológico, varios son los detalles que deben tomarse en cuenta para la inclusión de biomasa en el proceso de producción de etanol de una destilería común. En relación a

esto, un análisis exhaustivo debe ser realizado para la integración de biomasa en la obtención de productos de interés¹⁴. Sin embargo, para simplificación de este análisis se utilizará como referencia parámetros que garanticen una producción 500 hL de etanol al día, basado en un estudio previo de una destilería de etanol cubana¹⁴. Además de este estudio, Blanco¹⁵ reportó que las capacidades instaladas en países azucareros como Cuba oscilan entre 370 y 2000 hL/día, por lo que se consideró oportuno realizar el estudio para una instalación de 500 hL/día.

Resultados

Determinación de los componentes de la mezcla

Partiendo de los resultados obtenidos para las mezclas de enzimas comercial y cocteles celulolíticos nativos analizados, bajo las condiciones experimentales que mejores resultados brindaron en los respectivos estudios de hidrólisis enzimática⁶ de los elementos puros y mezclados del plan experimental, se obtienen los resultados que se muestran en la Tabla 1. Se determinaron los coeficientes del modelo de mezclas de enzimas comerciales y nativas.

Tabla 1. Rendimiento de glucosa/100 g materia prima para el diseño mezclas de enzimas nativas y comerciales.

<i>Puntos</i>	<i>Enzima Comercial (X1)</i>	<i>Enzima Bacteria (X2)</i>	<i>Enzima Hongos (X3)</i>	<i>RE HE (g_g/100 g_{mp})</i>
1	1	0	0	25,9
2	0	1	0	11,96
3	0	0	1	0,53
4	0,5	0,5	0	15,64
5	0,5	0	0,5	1,34
6	0	0,5	0,5	0,09

RE HE*: Rendimiento de la hidrólisis enzimática gramos de glucosa/100 g materia prima (g_g/100 g_{mp})

Para determinar los coeficientes de la ecuación 1, se emplearon las pautas generadas^{16,17} que son las siguientes:

$\beta_1 = Y_1$: Rendimiento del componente puro 1 (Enzima comercial).

$\beta_2 = Y_2$: Rendimiento del componente puro 2 (cocteles enzimáticos nativos de origen bacteriano del Ecuador).

$\beta_3 = Y_3$: Rendimiento del componente puro 3 (cocteles enzimáticos nativos de origen fúngicos).

$$\beta_{12} = 4Y_{12} - 2Y_1 - 2Y_2 \tag{2}$$

$$\beta_{13} = 4Y_{13} - 2Y_1 - 2Y_3 \tag{3}$$

$$\beta_{23} = 4Y_{23} - 2Y_2 - 2Y_3 \tag{4}$$

Siendo el modelo de mezclas:

$$Rendimiento = 25,9X_1 - 11,965X_2 - 0,53X_3 - 13,6X_1X_2 - 47,5X_1X_3 - 24,5X_2X_3 \quad (5)$$

Estos resultados demuestran que la contribución de las enzimas de origen fúngico, en el caso en estudio, no aportan de forma significativa en la acción enzimática del hidrolizado del bagazo. Esta situación para enzimas de origen fúngico, contrario a lo esperado, se debe al comportamiento exitoso de los hongos en sustratos sintéticos e ineficientes en relación con sustratos naturales como el bagazo de caña de azúcar.

Por lo anterior, se decidió reducir la investigación al caso de una mezcla binaria de dos componentes: enzima comercial y coctel de enzimas de origen bacteriano. De acuerdo con esto la ecuación 5 se reduce a la ecuación 6 de dos variables independientes, a saber:

$$Rendimiento = 25,9X_1 - 11,965X_2 - 13,6X_1X_2 \quad (6)$$

Determinación de las mejores condiciones de operación de la hidrólisis enzimática.

Para determinar las mejores condiciones de operación de la hidrólisis enzimática, en el diseño de Plackett – Búrman¹⁰, se utilizó un plan de ocho ensayos y siete variables independientes, una de ellas falsa variable, como se muestra en la Tabla 2.

Tabla 2. Plan experimental de Plackett – Búrman para ocho ensayos.

Ensayo	X_1	X_2	X_f	X_3	X_4	X_5	X_6	Y (g/100g _{mp})
1	+	+	+	-	+	-	-	15,65
2	+	+	-	+	-	-	+	10,45
3	+	-	+	-	-	+	+	2,36
4	-	+	-	-	+	+	+	6,27
5	+	-	-	+	+	+	-	6,90
6	-	-	+	+	+	-	+	9,65
7	-	+	+	+	-	+	-	2,16
8	-	-	-	-	-	-	-	6,34

La significación de las variables se analizó de acuerdo a los resultados de la falsa variable y las t de Student, tabuladas al 85 % de probabilidad, considerando la recomendación de Isaccson¹⁶ de utilizar este valor de probabilidad para casos de problemas con precisión experimental.

Se obtuvo que las variables X_3 y X_6 (velocidad de agitación y concentración de Tween) no son significativas para los rangos estudiados y se pueden descartar en los restantes ensayos.

Después de eliminar estas variables, menos significativas en los rangos estudiados, se aplicó el diseño de Box-Hunter 2^{4-1} , que fue complementado con las correspondientes réplicas en cada ensayo aprovechando los resultados ya obtenidos en el experimento del diseño de Plackett – Búrman¹⁰, como se presenta en la Tabla 3.

Tabla 3. Plan experimental de Box–Hunter 2^{4-1} .

<i>Ensayo</i>	X_1	X_2	X_4	X_5	Y_1 (g/100g)	Y_2 (g/100g)	Y_m (g/100g)	$(Y_m - Y_c)^2$
1	+	+	+	-	15,65	17,38	16,52	0,748225
2	+	+	-	-	10,45	11,94	11,195	0,555025
3	+	-	-	+	2,36	3,42	2,89	0,2809
4	-	+	+	+	6,27	5,11	5,19	1,1664
5	+	-	+	+	6,90	5,91	6,405	0,245025
6	-	-	+	-	9,65	7,61	8,63	1,0404
7	-	+	-	+	2,16	2,95	2,555	0,156025
8	-	-	-	-	6,34	5,56	5,95	0,1521
$S(Y^2) = \sum Y_m - Y_c)^2 / n$								3,4637

Las varianzas experimentales se determinaron homogéneas debido a que:

$$\frac{(Y_m - Y_c)^2_{Max}}{(Y_m - Y_c)^2_{Min}} < Ft_{1,1} = 161 \text{ de Juran}^{18} \quad (7),$$

Siendo:

Y_1 : resultado experimental obtenido de los ensayos del diseño original de Plackett- Búrman.

Y_2 : resultado experimental obtenido de los ensayos complementarios del diseño de Box - Hunter 2^k -
 p.

El contraste definido fue:

$$X_5 = -X_1X_2 \quad (8)$$

Y entonces siendo:

$$1 = -X_1X_2X_5 \quad (9)$$

Las mezclas de los efectos se muestran como sigue:

$$b_1 = \beta_1 - \beta_{25} \quad (10)$$

$$b_2 = \beta_2 - \beta_{15} \quad (11)$$

$$b_4 = \beta_4 - \beta_{1245} \quad (12)$$

$$b_5 = \beta_5 - \beta_{12} \quad (13)$$

$$b_{14} = \beta_{14} - \beta_{245} \quad (14)$$

$$b_{24} = \beta_{24} - \beta_{245} \quad (15)$$

$$b_{45} = \beta_{24} - \beta_{124} \quad (16)$$

Lo que reduce las posibilidades de determinar interacciones de las variables. La significación de los factores que influyeron sobre la hidrólisis se muestra en la tabla 4.

Tabla 4. Coeficientes del diseño factorial de Box-Hunter para mezcla de enzima comercial y cocteles enzimáticos de bacteria.

<i>b₀</i>	<i>b₁</i>	<i>b₂</i>	<i>b₄</i>	<i>b₅</i>	<i>b₁₄</i>	<i>b₂₄</i>	<i>b₄₅</i>
7,4725	1,77875	1,50375	1,8375	-3,1	0,37125	0,28875	-0,1625

Pero considerando que $\Delta b_j = + 1,734169$ para una $t_{8,95}$ es de $1,86^{18}$.

El modelo que caracteriza la hidrólisis enzimática para una mezcla de dos componentes, es decir de enzimas comerciales y cocteles enzimáticos de bacterias de *Bacillus subtilis* es al 50% de cada uno, descartando las variables no significativas por ser sus coeficientes menores que $\Delta b_j = + 1,734169$, como sigue:

Rendimiento Yes (g de producto/g de materia prima):

$$Yes = 7,4725 + 1,77875X_1 + 1,50375X_2 + 1,8735X_4 - 3,1X_5 \quad (17)$$

De acuerdo con estos resultados, se realizó la estimación de los valores por el modelo obtenido y comparándolos con los experimentales se hizo la estimación de la varianza de adecuación $S^2(ad)$, donde la ecuación a continuación tiene $f = N - (K + 1)$ siendo N el número de ensayos y K el número de variables, para este caso es 1:

$$S^2_{(ad)} = \sum_{i=1}^n \frac{(Y^I - Y^{II})^2}{f_1} \therefore S^2_{(ad)} = \sum_{i=1}^n \frac{(Yes - Y_m)^2}{f} \quad (18)$$

Esto debido a que, aplicando la prueba de Fisher, siempre que el valor de F_{f_1, f_2} calculada = $S^2_{(ad)} / S^2_{(y)}$ es menor a que la F_{f_1, f_2} tabulada:

Siendo f el número de grados de libertad = $n - (k + 1) = 3$ y $S^2_{(ad)}$: 1,4064

Respecto a lo anterior, cuando se producen idénticos valores de predicción de los modelos en relación a los valores experimentales la varianza de adecuación es cero y los modelos son adecuados. Por lo anterior, mediante la prueba de Fisher se verificó la adecuación del modelo¹³. La adecuación del modelo correspondiente al parámetro de respuesta de Rendimiento de glucosa /100g de materia prima, para el cual la varianza de adecuación, $S(ad)^2$ se determinó considerando el valor calculado F de $3,8 = 0,66029/0,8692 = 0,75692$, que es menor que el F tabulado $F_{1,8} = 5,32^{18}$, por esto se consideró que el modelo obtenido del diseño de Box-Hunter es adecuado para predecir los resultados. A partir de estos resultados para la mezcla de 50% de enzima comercial y 50% de cocteles enzimáticos nativos de bacteria, se determinan todas las posibles variantes a realizar experimentalmente el coctel enzimático (Tabla 5), para analizar si es posible que haya un rendimiento mayor al obtenido en los experimentos ya realizados. Se buscaron las ocho posibilidades no experimentadas en los ensayos anteriores y en ninguna resultó un estimado más alto que el resultado experimental obtenido en el experimento inicial. Esta segunda etapa de búsqueda del óptimo, en las posibilidades no experimentadas, se realizó mediante la aplicación del método factorial completo.

Tabla 5. Universo de modelo experimental de todas las posibles variables a realizar.

N°	X ₁	X ₂	X ₄	X ₅	Rendimiento de glucosa/100g
1	1	1	1	1	9,49
2	1	1	1	-1	16,52
3	1	1	-1	1	5,81
4	1	1	-1	-1	11,19
5	1	-1	1	1	6,40
6	1	-1	1	-1	12,685
7	1	-1	-1	1	2,89
8	1	-1	-1	-1	9,01
9	-1	1	1	1	5,19
10	-1	1	1	-1	5,69
11	-1	1	-1	1	2,56
12	-1	1	-1	-1	8,46
13	-1	-1	1	1	2,93
14	-1	-1	1	-1	8,63
15	-1	-1	-1	1	-0,48
16	-1	-1	-1	-1	5,95

(En negritas los ensayos experimentales)

Los resultados obtenidos expresan como mejor rendimiento el ensayo 2 (16,52 gramos de glucosa/100g de bagazo), en el que las condiciones son X₁: 50°C; X₂: 25 UPF; X₄: 24 horas y X₅: 5% de bagazo. Se mostraron rendimientos aceptables en el ensayo 6 (12,68 gramos de glucosa/100g de bagazo).

Este trabajo permitió que los ensayos con mezclas de enzimas comerciales y cocteles de enzimas provenientes de *Bacillus subtilis*, en el contexto de por ciento de mezclas, muestren los mejores resultados utilizando el método del paso ascendente¹³, partiendo de los valores iniciales que recomienda el modelo de :

X₁: nivel superior de temperatura 50 °C;

X₂: nivel superior de carga enzimática de 25 UPF/g;

X₃: velocidad de agitación media, por no tener incidencia significativa es de 150 rpm;

X₄: tiempo de bajo de 24 horas;

X₅: % de sólido bajo de 2,5 % (p/v);

X₆: tween medio, por no ser su acción significativa en el intervalo explorado, Tween 80 (2,5 % sobre fibra seca).

El interés en utilizar un porcentaje de coctel enzimático de bacteria autóctona de Ecuador, en el

proceso de hidrólisis enzimática, permite promover la recomendación de implementar nuevas tecnologías para la producción de cocteles enzimáticos. Estudios, como el de da Silva y colaboradores³ utilizan mezclas de celulasas producidas en el laboratorio y comerciales, para mejorar la eficiencia del proceso² muestran que los balances entre las enzimas de cocteles enzimáticos constituyen una aproximación promisorio para optimizar la hidrólisis enzimática².

Aplicación del método de optimización directa en el análisis económico de evaluación de las mezclas.

En este análisis de optimización se planteó optimizar el costo de la tecnología. Para esto se calculó, el modelo de mezclas obtenido (5) y el rendimiento de glucosa /100g materia prima, para diferentes proporciones de mezclas entre enzimas comerciales y nativas como se muestra en la Tabla 6.

Tabla 6. Rendimientos de las diferentes mezclas.

No	<i>Mezcla</i>		<i>Rendimiento gramos de glucosa /100g materia prima</i>
	<i>% Enzima comercial</i>	<i>% Enzimas nativas de Ecuador</i>	
1	70	30	18,954
2	60	40	17,17
3	50	50	15,64
4	20	80	12,64

Después de obtener los rendimientos, se determinó la cantidad de bagazo que se debe emplear en cada mezcla, ver tabla 7, para la obtención de 500 hL/etanol por día.

La cantidad de bagazo fue determinada considerando que en los estudios de laboratorio se emplean 1,13 g de cocteles celulolíticos diluidos en 25 mL de tampón citrato para degradar 1,6 g de bagazo. Por lo tanto, en la industria se requerirán 1 856 000 g de celulasas diluidas en 41 061 946 mL de tampón citrato para degradar 2 605 000 g de bagazo. La cantidad de bagazo de caña de azúcar fue calculada según refiere Mesa¹⁹, determinando que 5,21 kg, de bagazo de caña de azúcar producen 1 L de etanol.

Tabla 7. Cantidad de bagazo necesario para las diferentes mezclas enzimáticas en la hidrólisis.

<i>Mezcla</i>		<i>Bagazo (kg)</i>
<i>% Enzimas comerciales</i>	<i>% Enzimas nativas de Ecuador</i>	
70	30	403 539
60	40	445 373
50	50	488 942
20	80	604 988

A partir de los resultados experimentales obtenidos y de la información generada en los estudios

cinéticos se constata que en el laboratorio se aislaron $7E^{-6}$ g de coctel de celulasas diluidas en agua y suero de leche para degradar 0,001 kg de bagazo de caña de azúcar. Por lo tanto, para degradar 260 500 kg de bagazo de caña de azúcar, se requiere, 1 856 kg de coctel de enzimas celulasas nativas que corresponden a 2 320 L, tomando en cuenta la densidad del coctel calculado en el laboratorio, que es de $0,8 \text{ g/cm}^3$.

En función de los resultados expuestos, en el trabajo de Villavicencio y colaboradores⁵ se realizaron los balances de masa y energía para calcular la cantidad de bagazo y reactores que serían empleados para la hidrólisis enzimática de bagazo de caña de azúcar para la obtención de 500 hL de etanol/día. Basados en las cantidades de bagazo mostradas en la tabla 7, se realizó una estimación del número de reactores que se incluirían en la hidrólisis enzimática, sustentados en la publicación de Batallas²⁰. Además, con el objetivo de ejemplificar la viabilidad financiera, los costos de estos también fueron expuestos en la tabla 8.

Tabla 8. Número y cantidad de reactores con el precio actual.

No	Mezcla		N° reactores	Capacidad (L)	Costo (USD)
	% Enzimas comerciales	% Enzimas nativas de Ecuador			
1	70	30	26	37854,1	2 620 800
2	60	40	27		2 721 600
3	50	50	28		2 822 400
4	20	80	31		3 124 800

En base a la cantidad de bagazo (tabla 7) y el número de reactores (tabla 8) se determinó la cantidad de materiales a emplear en la hidrólisis tanto de enzimas comerciales como de las enzimas nativas del Ecuador. Considerando las mejores condiciones realizadas experimentalmente (tabla 6), se calculó el costo total de producción (CTP) y el capital fijo invertido (CFI), como se puede apreciar en la tabla 9.

Tabla 9. CTP y CFI para una producción de 500 hL/día de etanol.

No	Mezcla		Costo Total de Producción (USD)	Capital Fijo Invertido (USD)
	% Enzimas comerciales	% Enzimas nativas de Ecuador		
1	70	30	9 326 998	5 530,71
2	60	40	9 253 000	5 743,43
3	50	50	9 687 255	5 956,15
4	20	80	10 569 703	6 594,31

Analizando los resultados, se puede observar, como a medida que aumenta el uso de enzimas comerciales disminuye el Costo total de producción y con ello el costo Unitario de Producción en

una producción diaria de 500 hectolitros constante. Sin embargo, en determinado punto, en 60% de las enzimas comerciales en la mezcla, los resultados comienzan a mostrar un incremento. El uso de las enzimas comerciales perjudica los indicadores de costo, por lo que a esos porcentajes de mezclas oportunas, le favorece la utilización de un por ciento de cocteles enzimáticos nativos de Ecuador, por lo que se requiere fijar el punto de inflexión del comportamiento (Figura 2).

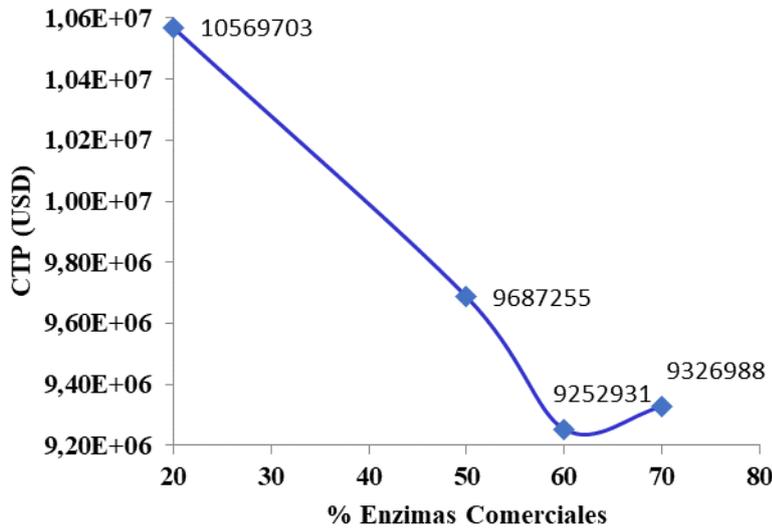


Figura 2. Gráfico del Costo Total de Producción vs % de enzimas comerciales

En la Figura 2 se puede observar que, al emplear el 20% de enzimas comerciales es mayor el CTP, ya que a medida que aumenta el uso de enzimas comerciales, disminuye el CTP, sin embargo, se llega a un punto de inflexión cuando se usa 60% de enzimas comerciales, en el cual vuelve a aumentar el CTP. Por lo tanto, se analiza más detalladamente el gráfico cuando se usan 60 % de enzimas comerciales. Mediante el comportamiento de la figura, se determinó una ecuación cuadrática que representara el comportamiento de la curva que explica el comportamiento, donde se obtuvo la siguiente ecuación:

$$Y = 2541,9X^2 - 323042X + 2E^7 \quad (19)$$

En la ecuación se considera que X es el porcentaje de la enzima comercial y Y los costos de estas enzimas en USD.

La ecuación cuadrática obtenida fue derivada con el objetivo de encontrar el porcentaje óptimo de enzimas comerciales a emplear en la mezcla para trabajar a un mínimo costo.

La función cuadrática de la Figura 2 es:

$$Y = 2541,9X^2 - 323042X + 2E^7 \text{ o}$$

$$Y = 2 * 10^7 - 323042X + 2541,9X^2 \quad (20)$$

Derivando e igualando a cero se tiene que:

$$\frac{dy}{dx} = 2(2541,9)x - 323092 = 0 \quad (21)$$

$x = 63,55$.

Discusión

Este análisis muestra que la región del óptimo para disminuir el costo de la hidrólisis empleando la nueva mezcla de enzima comercial y cocteles enzimáticos de bacteria nativa de Ecuador se alcanza empleando 63,5% de enzima comercial y 36,5% de cocteles enzimáticos nativos.

Varios han sido los estudios que muestran que el uso de enzimas de origen no comercial puede presentar mayor potencial hidrolítico de celulosa con respecto a las enzimas comerciales puras. Uno de estos estudios mostró que el mayor nivel de azúcar producido se logró mediante la integración de enzimas comerciales con cocteles enzimáticos en proporciones equitativas (50%)²¹. Los autores recalcan que la mezcla tuvo mejor rendimiento hidrolítico con respecto al extracto puramente comercial. Observaciones de este tipo también fueron evidentes en un estudio comparando un coctel de *Celluclast*® con uno enzimático de especies no-comerciales, en el que el segundo logra la conversión de celulosa en glucosa en un rango mayor al 40%². La combinación de extractos enzimáticos de especies de *Bacillus* con celulasas comerciales han sido reportados²². La mayoría de estos estudios, sugieren que encontrar la mejor sinergia entre las mezclas enzimáticas es primordial para lograr la reducción de costos de utilización de biomasa.

Conclusiones

La intensificación de las producciones de coproductos químicos en la industria de la caña de azúcar en su desarrollo como biorrefinería hace factible la estratégica sinérgica de desarrollo entre la industria química y los sectores que utilizan la biomasa como materia prima.

La producción de etanol de segunda generación puede hacerse más viable técnica y económicamente mediante una mezcla óptima de enzimas comerciales y mezclas enzimáticas autóctonas.

La región del óptimo para reducir el costo de producción de la etapa de hidrólisis enzimática de bagazo de caña de azúcar empleando la nueva mezcla de enzima comercial y cocteles enzimáticos de bacteria nativa de Ecuador se alcanza empleando 63,5% de enzima comercial y 36,5% de cocteles enzimáticos nativos.

En este estudio de hidrólisis enzimática de bagazo de caña de azúcar empleando un coctel de enzimas comerciales y nativas, se ha logrado optimizar el proceso tecnológico empleando un diseño de mezclas, mediante el enrejado simplex; la aplicación del diseño de Box-Hunter.

El método factorial fraccionado y el método directo de optimización fundamentado en las funciones reales, permitió disminuir los costos de la hidrólisis enzimática de bagazo de caña a partir de la nueva mezcla de celulasas propuesta, lo cual representa un avance hacia la viabilidad de este tipo de

procesos.

Contribución de los autores:

Jenny Serrano Castillo¹, Conceptualización, metodología, análisis formal, preparación del borrador original del escrito, revisión de escritura y edición, visualización, supervisión, administración del proyecto, adquisición de financiamiento; Carmen A. Salvador Pinos², Conceptualización, metodología, validación, investigación, recursos, curación, de datos, preparación del borrador original del escrito, administración del proyecto, adquisición de financiamiento; Yailet Albernas Carvajal³, software, validación, análisis formal, curación de datos; Ronny Pibaque Sánchez⁴, validación, investigación, recursos, curación de datos; Erenio González Suárez^{5*} Conceptualización, metodología, análisis formal, revisión de escritura y edición, visualización, supervisión.

Financiamiento: esta investigación no recibió financiamiento externo

Declaración de la Junta de Revisión Institucional: el estudio no incluyó humanos ni animales.

Declaración de consentimiento informado: no procede por ser innecesario

Declaración de disponibilidad de datos: los datos disponibles están en el texto

Agradecimientos: a las Universidades de Central “Marta Abreu” de Las Villas Cuba y la Central del Ecuador por las oportunidades

Conflicto de intereses: los autores declaran que no hay conflictos de intereses en esta investigación.

Referencias

1. Morales Zamora M, De Armas Martínez AC, González Suárez E, Ley Chong N, Villanueva Ramos G. La sinergia entre las biorrefinerías de azúcar y el desarrollo de la industria química en Cuba. *Revista Universidad y Sociedad*. 2021;13(5):81-91. Disponible en: <https://rus.ucf.edu.cu/index.php/rus/article/view/2213>
2. Bussamra B, Freitas S, da Costa AC. Improvement on sugar cane bagasse hydrolysis using enzymatic mixture designed cocktail. *Bioresource Technology*. 2015;187:173–181. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.03.117>
3. Sant'Ana da Silva A, Fernandes de Souza M, Ballesteros I, Manzanares P, Ballesteros M, Bon EP. High-solids content enzymatic hydrolysis of hydrothermally pretreated sugarcane bagasse using a laboratory-made enzyme blend and commercial preparations. *Process Biochemistry*. 2016;51(10):1561–1567. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2016.07.018>
4. Salvador Pinos CA, Albernas Carvajal Y, Mesa Garriga L, García-Rodríguez A, Villamarín-Barriga E, Pibaque Sanchez RJ, et al. Obtaining the kinetic parameters of the enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse using a new enzyme mixture from commercial *Aspergillus niger* and a local strain of *Bacillus subtilis* (Ba3). *Afinidad*. 2021;78(592):54-61.

- <https://raco.cat/index.php/afinidad/article/view/385612>
5. Villavicencio Montoya J, Salvador Pinos CA, Batallas Merino F, Pérez Martínez A, Mesa Garriga L, González Suárez E. Use of native cellulolytic enzymes from Ecuador, in the enzymatic hydrolysis for the ethanol production. *Centro Azúcar*. **2018**;45(3):91–100. Disponible en: http://centroazucar.uclv.edu.cu/index.php/centro_azucar/article/view/75
 6. Salvador C. Obtención y uso de enzimas nativas del Ecuador para la producción de etanol de segunda generación. [Tesis Doctoral]. Universidad Central "Marta Abreu" de las Villas; **2018**.
 7. Adsul M, Sandhu SK, Singhania RR, Gupta R, Puri SK, Mathur A. Designing a cellulolytic enzyme cocktail for the efficient and economical conversion of lignocellulosic biomass to biofuels. *Enzyme and Microbial Technology*. **2020**;133:109442. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0141022919301802?via%3Dihub>
 8. de Paula RG, Antoniêto ACC, Ribeiro LFC, Srivastava N, O'Donovan A, Mishra PK, et al. Engineered microbial host selection for value-added bioproducts from lignocellulose. *Biotechnology Advances*. **2019**;37(6):107347. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S073497501930014X?via%3Dihub>
 9. Scheffé H. Experiments with Mixtures. *Journal of the Royal Statistical Society: Series B (Methodological)*. **1958**;20(2):344–360. Disponible en: <https://www.semanticscholar.org/paper/Experiments-with-Mixtures-Scheffé/6541e378aa3e5f84ff212449aa2d4ea1d130b985>
 10. Plackett RL, Burman JP. The Design of Optimum Multifactorial Experiments. *Biometrika*. **1946**;33(4):305–325. <https://www.jstor.org/stable/2332195>
 11. Box GEP, Hunter JS. The 2 k-p Fractional Factorial Designs Part I. *Technometrics*. **2000**;42(1):28–47. <https://doi.org/10.2307/1271430>
 12. González E, Ramos F, Ribot L, Peralta L. Combinación de los métodos de diseño experimental en la minimización de los ensayos de una investigación. *Tecnología Química*. **1986**;11:17–21. Disponible en: <https://www.google.com/search?client=firefox-b-d&q=Gonz%C3%A1lez%2C+E.%2C+Ramos%2C+F.%2C+Ribot%2C+L.+%26+Peralta%2C+L.+%281986%29.+Combinaci%C3%B3n+de+los+m%C3%A9todos+de+dise%C3%B1o+experimental+en+la+minimizaci%C3%B3n+de+los+ensayos+de+una+investigaci%C3%B3n.+Tecnolog%C3%ADa+Qu%C3%ADmica%2C+11%2C+17%E2%80%9321>
 13. Adler IUP, Markova EV, Granolovsky Y. *The Design of Experiments to Find Optimal Conditions: A Programmed Introduction to the Design of Experiments*. MIR Publishers; **1975**.

14. González E, Miño JE. *Aspectos de la estrategia de procesos para el aprovechamiento de la biomasa - Como fuentes de productos químicos y biocombustibles*. Editorial Universitaria de Misiones; **2014**.
15. Blanco G. La producción de alcohol a partir de la industria química y sus posibilidades. *ICIDCA*. **1987**;21(2):12–18. Disponible en: <https://catalogosiidca.csuca.org/Record/UNANL.2168>
16. Isaacson W. Statistical Analysis for multivariable Systems. *Chemical Engineering*. **1970**;6:69–75.
17. Akhnazarova S, Kafarov VV. *Experiment Optimization in Chemistry and Chemical Engineering*. MIR Publishers; **1982**. <https://doi.org/10.1002/pol.1984.130220614>
18. Juran JM, Gryna FMJ, Bingham RSJ. *Quality Control Handbook*. McGraw Hill Book Company; **1974**.
19. Mesa Garriga L. "Estrategia investigativa para la tecnología de obtención de etanol y coproductos del bagazo de la caña de azúcar" [Tesis Doctoral]. Universidad Central "Marta Abreu" de las Villas; **2010**.
20. Batallas Merino F, Salvador Pinos CA, Villavicencio Montoya J, González Gavilán H, González Suárez E. Hidrólisis enzimática del bagazo de caña para la obtención de etanol empleando enzimas nativas y comerciales. *Centro Azúcar*. **2018**;45(4):90-100.
21. Maeda RN, Serpa VI, Rocha VAL, Mesquita RAA, Anna LMMS, De Castro AMH, et al. Enzymatic hydrolysis of pretreated sugar cane bagasse using *Penicillium funiculosum* and *Trichoderma harzianum* cellulases. *Process Biochemistry*. **2011**;46(5):1196–1201. <https://www.sciencedirect.com>
22. Thite, V.S. & Nerurkar, A.S. (2020). Crude Xylanases and Pectinases from *Bacillus* spp. Along with Commercial Cellulase Formulate an Efficient Tailor-Made Cocktail for Sugarcane Bagasse Saccharification. *BioEnergy Research*, 13(1), 286–300. <https://pubag.nal.usda.gov/catalog/6904744>
23. Thite VS, Nerurkar AS. Crude Xylanases and Pectinases from *Bacillus* spp. Along with Commercial Cellulase Formulate an Efficient Tailor-Made Cocktail for Sugarcane Bagasse Saccharification. *BioEnergy Research*. **2020**;13(1):286–300. Disponible en: <https://pubag.nal.usda.gov/catalog/6904744>

/ **Received:** 23 May 2024 | **Accepted:** 7 June 2024 | **Published:** 15 June 2024 |

Citation: Serrano Castillo J, Salvador Pinos CA, Albornas Carbajal Y, Pidaque Sánchez R, González Suárez E. Mezcla óptima de enzimas comerciales y autóctonas para la hidrólisis en el desarrollo

sinérgico de la industria química y las biorrefinerías. *Bionatura*. 2024;9(2). DOI:
<http://dx.doi.org/10.21931/RB/2024.09.02.11>

Peer review information: Bionatura thanks the anonymous reviewers for their contribution to the peer review of this work using <https://reviewerlocator.webofscience.com/>.

All articles published by Bionatura Journal are freely and permanently accessible online immediately after publication, without subscription charges or registration barriers.

Publisher's Note: Bionatura stays neutral concerning jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Copyright: © 2024 by the authors. Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).