

INTRODUCCIÓN

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
Departamento de Ingeniería Química y de los Materiales

CURSO CYTED
VALORIZACIÓN de RESIDUOS, BIOECONOMÍA y ECONOMÍA CIRCULAR

Modelos Cinéticos de la Hidrólisis Enzimática. Tipos y ejemplos

Miguel Ladero Galán

Profesor Titular-Dpto. Ingeniería Química y Materiales- Universidad Complutense de Madrid

INTRODUCCIÓN

CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN
2. FENÓMENOS
3. CLASIFICACIÓN DE MODELOS
4. MODELOS EMPÍRICOS
5. MODELOS FENOMENOLÓGICOS

INTRODUCCIÓN

El punto de partida: la evolución temporal de los compuestos en reacción

La necesidad técnica: diseñar bio/reactores químicos y controlar su operación

La necesidad científica: relacionar estructura y estabilidad/reactividad de compuestos químicos

LOS FENÓMENOS CINÉTICOS

- FLUIDODINÁMICA
- TRANSMISIÓN DE CALOR
- TRANSFERENCIA DE MATERIA
- REACCIÓN QUÍMICA

LAS HERRAMIENTAS DE LA INGENIERÍA QUÍMICA

- ESTEQUIOMETRÍA
- TERMODINÁMICA APLICADA
- CINÉTICA APLICADA

INTRODUCCIÓN

Cinética: velocidad de reacción

La velocidad de reacción se define como la cantidad de reactivo desaparecido o de producto formado por unidad de tiempo dividida por su coeficiente estequiométrico. Considerando el avance de reacción x y una magnitud extensiva X :

Reacción simple: 1 compuesto clave

$$r = \frac{1}{X} \frac{dn_j}{v_j dt} = \frac{1}{X} \frac{d\xi}{dt} > 0$$

Red de reacciones: varios compuestos claves

$$r_i = \frac{1}{X} \frac{dn_{ji}}{v_{ji} dt} = \frac{1}{X} \frac{d\xi_i}{dt} > 0$$

Velocidad de producción, desaparición o evolución de un compuesto j

$$R_j = \frac{1}{X} \frac{dn_j}{dt} = \sum_{i=1}^n v_{ji} r_i$$

$R_j > 0 \Rightarrow$ producto $\therefore R_j < 0 \Rightarrow$ reactivo

X= volumen reactor en sistemas homogéneos

X= peso sólido/fase catalítica en sistemas heterogéneos catalíticos

X=superficie de contacto en sistemas heterogéneos con control en la interfase

X=volumen fase reactiva en sistemas heterogéneos con control en una fase

Coeficiente estequiométrico del compuesto j en la reacción i

Velocidad de la reacción i



Cinética: ¿qué afecta a la velocidad de reacción en las reacciones enzimáticas?

TEMPERATURA

Psicrófilos $T_{opt} < 15\text{ }^{\circ}\text{C}$
 Mesófilos $15\text{ }^{\circ}\text{C} < T_{opt} < 35\text{ }^{\circ}\text{C}$
 Termófilos $35\text{ }^{\circ}\text{C} < T_{opt} < 65\text{ }^{\circ}\text{C}$
 Hipertermófilos $T_{opt} > 65\text{ }^{\circ}\text{C}$

pH

Acidófilos
 Neutrófilos
 Basófilos

$$r_i = \frac{1}{X} \frac{dn_{ji}}{v_{ji} dt} = \frac{1}{X} \frac{d\xi_i}{dt} > 0$$

Además:

- 1) Fuerza iónica
- 2) Concentración

- HONGOS
- PROTOBACTERIAS

- Sustratos
- Inhibidores
- Agentes desactivantes

Lectura: Robinson, P. K. (2015). Enzymes: principles and biotechnological applications. *Essays in biochemistry*, 59, 1-41.
 Lectura: Choi, B., Rempala, G. A., & Kim, J. K. (2017). Beyond the Michaelis-Menten equation: Accurate and efficient estimation of enzyme kinetic parameters. *Scientific reports*, 7(1), 1-11.
 Lectura: Herlet, J., Kornberger, P., Roessler, B., Glanz, J., Schwarz, W. H., Liebl, W., & Zverlov, V. V. (2017). A new method to evaluate temperature vs. pH activity profiles for biotechnological relevant enzymes. *Biotechnology for biofuels*, 10(1), 234.



Componentes de la materia lignocelulósica: accesibilidad, interferencias Estructura interna

Adsorción inespecífica en la lignina Deslignificación

Alcohol p-coumárico Alcohol coniferílico Alcohol sinapílico

Estructura interna

Plantilla: Célula vegetal, Pared celular, Lignina, Hemicelulosa, Celulosa, Lumen, Macrocélula, Microfibrilla (Aprox. 36 cadena: celulosa), Pentosa, Hexosa, Celulosa cristalina.

Bloqueo por hemicelulosas Hidrólisis ácida/enzimática

- > Lumen: poros 50-100 nm
- > Poros/grietas: 50 nm
- > Pared celular: 5-20 nm

Control difusional interno Necesita incremento porosidad

Fuente: Meng y Ragaukas. Recent advances in understanding the role of cellulose accessibility in enzymatic hydrolysis of lignocellulosic substrates. *Current Opinion in Biotechnology* 2014, 27:150-158



Fenómenos que producen limitación/desaceleración en la sacarificación

Fenómenos físicos y químicos limitantes desacelerantes

- a) Transferencia de materia externa (agitación)
- b) Transferencia de materia interna (porosidad, tamaño de partícula)
- c) Fenómenos de partición (deslignificación)
- d) Interferencia superficial (hidrólisis HC)
- e) Reactividad celulosa (amorfización)
- f) Accesibilidad celulosa (amorfización)
- g) Obstáculos superficiales (deslignificación, hidrólisis HC)
- h) Adsorción inespecífica (deslignificación)
- i) Inhibición (ultra/nanofiltración, adsorción, extracción)
- j) Desactivación reversible (introducción sustrato fresco: readsorción)

Fuente: Bansal et al. Modeling cellulase kinetics on lignocellulosic substrates. *Biotech. Adv.* 2009 27:833-848



Modo de acción de las celulasas

Sistemas no complejados

- a) Microfibrilla de celulosa
- b) Glucosa
- c) Celobiosa
- d) Oligosacáridos
- e) Endoglucanasa con módulo de anclaje (CBM)
- f) Celobiohidrolasa extr. reductor
- g) Celobiohidrolasa extr. no reductor
- h) Beta-glucosidasa

Sistemas complejos o celulosomas

- i) Celobiosa/celodextrina fosforilasa
- j) Módulo con homología a hoja S
- k) Módulo de anclaje a celulosa (CBM)
- l) Proteína de anclaje 1 (Dokerina-cohesina I)
- m) Proteína de anclaje 2 (Dokerina-cohesina II)

Además, en el celulosoma hay endoglucanastas y exoglucanastas (celobiohidrolastas)

Fuente: Zang et al. Cellulases: Characteristics, Sources, Production, and Applications. En "Bioprocessing Technologies in Biorefinery for Sustainable Production of Fuels, Chemicals, and Polymers" Ed. Yang, Eil-Enshasy, Thongchul. Ed. Wiley (2013).

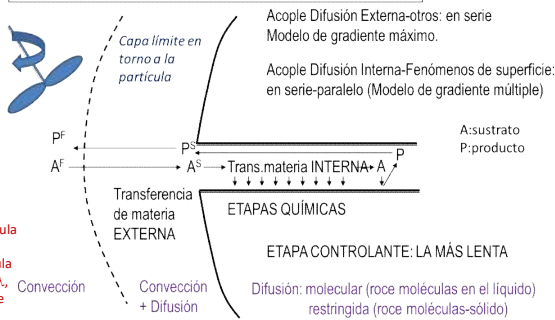


FENÓMENOS ¿Qué pasa antes y después de los fenómenos de reacción? Transferencia de materia

Transferencia de materia externa (capa límite)

- No hay reacción en la zona
- Flujo de enzimas (J_e)=Velocidad de quimisorción (R_s)
- **Término convectivo:** depende de la energía cinética
- **Término difusivo:** cumple la ley de Fick
- Ambos se recogen en un coeficiente volumétrico de transferencia de materia (k_a)

VARIABLES QUE AFECTAN A LA TRANSFERENCIA DE MATERIA: ASPECTOS PRÁCTICOS



Transferencia de materia interna (poros)

- Acople difusión (Ley de Fick)-reacción en poros
- Por cada posición radial: $J_r = R_r$
- Depende del tamaño de poro, tortuosidad tamaño de la enzima...
- **Difusividad molecular ($D_{m,i}$):** roce entre la molécula que se mueve y las que la rodean.
- **Difusividad restringida (D_r):** roce entre la molécula que se mueve y la pared del poro. Depende de λ , el cociente entre el diámetro de la molécula que se mueve y el diámetro del poro (cambiante).



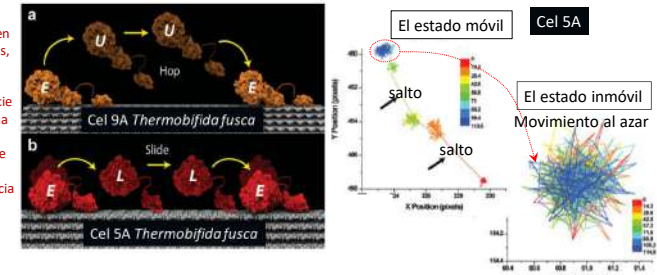
INTRODUCCIÓN ¿Qué pasa antes y después de los fenómenos de reacción? Fenómenos de superficie

Difusión superficial

Tres estados:

- 1) **Enzimas inmóviles:** movimientos cortos y brownianos (al azar)
- 2) **Deslizamientos (slide):** hasta 100 nm
- 3) **Salto (hop):** largo alcance >100 nm

- Este fenómeno considera la difusividad restringida, cercana a la superficie del sólido, y la adsorción (específica y no específica)
- Las enzimas procesivas (exoglucanasas y varias endoglucanasas) se mueven a lo largo de las microfibras, liberando celobiosa y celooligosacáridos.
- Hay obstáculos en superficie (lignina, hemicelulosa, zona cristalina de la celulosa)
- La difusión superficial se ve afectada por estos obstáculos y por la presencia de muchas enzimas y proteínas juntas (overcrowding, jamming)



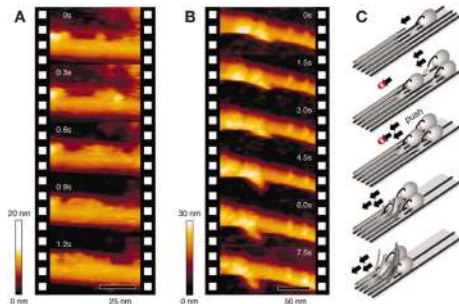
Fuente: Moran-Mirabal et al. (2013) *Thermobifida fusca* cellulases exhibit limited surface diffusion on bacterial micro-crystalline cellulose. Biotechnology and bioengineering, 110(1), 47-56.



FENÓMENOS ¿Qué pasa antes y después de los fenómenos de reacción? Fenómenos de superficie

Overcrowding/jamming

- Las enzimas procesivas se pueden acumular en la superficie de la celulosa
- La acción sinérgica de las enzimas suaviza y reduce la rugosidad de la superficie de celulosa
- La generación de atascos aumenta la rugosidad de dicha superficie y detiene el proceso (¿desactivación aparente?)



Microscopía rápida de fuerza atómica (HS-AFM)

A) Bloqueo de la enzima TrCel7A en celulosa III

B) Fibrilación tras el bloqueo

C) Posible mecanismo de fibrilación: el bloqueo enzimático explica una desactivación efectiva de la enzima procesiva.

Fuente: Igarashi, K. et al. (2011). Traffic jams reduce hydrolytic efficiency of cellulase on cellulose surface. Science, 333(6047), 1279-1282.



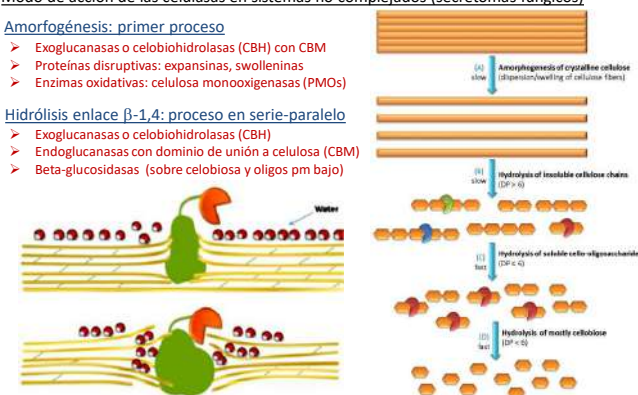
FENÓMENOS Modo de acción de las celulasas en sistemas no complejados (secretomas fúngicos)

Amorfofogénesis: primer proceso

- Exoglucanasas o celobiohidrolasas (CBH) con CBM
- Proteínas disruptivas: expansinas, swolleninas
- Enzimas oxidativas: celulasas monooxigenasas (PMOs)

Hidrólisis enlace β-1,4: proceso en serie-paralelo

- Exoglucanasas o celobiohidrolasas (CBH)
- Endoglucanasas con dominio de unión a celulosa (CBM)
- Beta-glucosidasas (sobre celobiosa y oligos pm bajo)

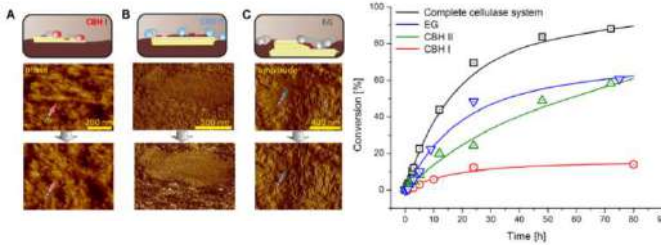


Fuente: Arantes y Sander (2010) Access to cellulose limits the efficiency of enzymatic hydrolysis: the role of amorphogenesis. Biotechnology for Biofuels 2010, 3:4-11



FENÓMENOS
Sinergia entre celulasas en sistemas no complejados (secretomas fúngicos)

- A) La celobiohidrolasa I (CBH I) de *T. reesei* degrada fibras cortas desde un extremo del cristal de celulosa
- B) La celobiohidrolasa II (CBH II) de *T. reesei* elimina celulosa amorfa sobre un cristal de celulosa
- C) Las endoglucanasas (EG) de *T. reesei* atacan la celulosa amorfa liberando extremos para la CBH II

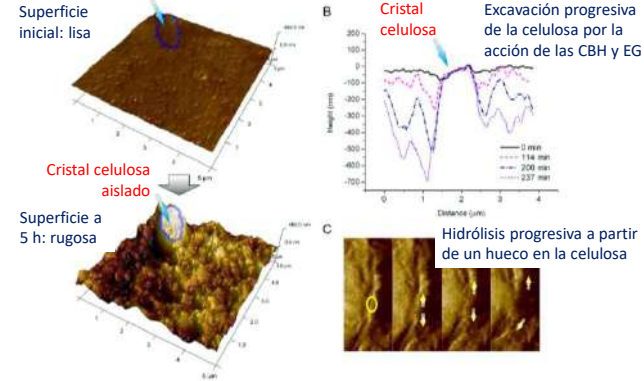


- > Se aprecia la sinergia de acción de las enzimas:
- > CBH I opera a baja velocidad y queda bloqueada fácilmente
- > CBH II opera sobre celulosa amorfa, en tanto en cuanto ahí.
- > Las endoglucanasas son muy activas, generan zonas de ataque, pero se bloquean en espacios estrechos.

Fuente: Ganner, T., Bubner, P., Eibinger, M., Mayrhofer, C., Plank, H., & Nidetzky, B. (2012). Dissecting and reconstructing synergism in situ visualization of cooperativity among cellulases. *Journal of Biological Chemistry*, 287(52), 43215-43222.
Fuente: Eibinger, M., Bubner, P., Ganner, T., Plank, H., & Nidetzky, B. (2014). Surface structural dynamics of enzymatic cellulose degradation, revealed by combined kinetic and atomic force microscopy studies. *The FEBS journal*, 281(1), 275-290.



FENÓMENOS
Sinergia entre celulasas en sistemas no complejados (observaciones por AFM)



- > Se aprecia la sinergia de acción de las enzimas:
- > Las enzimas actúan mejor sobre la materia amorfa
- > Se genera una gran rugosidad en la superficie
- > Los cristales de celulosa van quedando aislados.
- > Las enzimas pueden bloquearse en los "valles" profundos.

Fuente: Ganner, T., Bubner, P., Eibinger, M., Mayrhofer, C., Plank, H., & Nidetzky, B. (2012). Dissecting and reconstructing synergism in situ visualization of cooperativity among cellulases. *Journal of Biological Chemistry*, 287(52), 43215-43222.



CLASIFICACIÓN
Tipos de modelos cinéticos

Modelos cinéticos

- a) Empíricos
 - a) Interacción entre propiedades (cristalinidad, porosidad...)
 - b) Derivación de curvas y estimación de velocidades
 - c) Optimización de condiciones pretratamiento vs. Y, P, etc.
 - d) Optimización de condiciones sacarificación vs. Y, P, etc.
- b) Basados en Michaelis y Menten
 - a) Válidos con ciertas enzimas (CBH, BG)
 - b) Tienden a sobreestimar rendimientos
- c) Basados en la adsorción
 - a) Usan isoterma Langmuir, ec. cinéticas
 - b) Corrigen adsorción inespecífica y bloqueo
- d) Sobre sustratos solubles (MM)
 - a) Hay pocos, solo sobre DP 6 y menor
 - b) Válidos para los procesos en solución
- e) Michaelis-Menten con desactivación asociada
 - a) Pueden tener en cuenta varias enzimas
 - b) Pueden considerar varios procesos paralelos
 - a) Tienen una etapa al menos en la que el reactivo principal es un sólido
 - b) Tienen etapas posteriores sobre sustratos que quedan en disolución
- f) Basados en varias etapas, incluyendo etapas cinéticas con sólidos reactivos

Fuente: Bansal et al. *Modeling cellulase kinetics on lignocellulosic substrates*. *Biotech. Adv.* 2009 27:833-848
Lectura: Jeoh et al. *Mechanistic Kinetic Models of Enzymatic Cellulose Hydrolysis—A Review*. *Biotech. Bioeng.* 2017 114:1369-1385



MODELOS EMPÍRICOS
Tipo a) Modelo empírico de Ohmine et al. (1983)

$$P = \left(\frac{S_0}{K} \right) \ln(1 + v_0 kt / S_0)$$

P₀=concentración del producto (mol/L)
S₀=concentración del sustrato (mol/L)
v₀=velocidad inicial (mol/Ls)
t= tiempo (s)

- > La concentración de monosacárido es una función compleja del tiempo

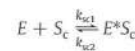
Tipo b) Modelo fenomenológico tipo Michaelis-Menten de Okazaki y Moo-Young (1978)

$$\frac{d[C_i]}{dt} = \frac{k_1[E_1] \left(2 \sum_{j=1}^{i-1} [C_j] - (i-1)[C_i] \right)}{\left(k_{M1} + \sum_{l=3}^i ((i-l)[C_l]) \right) (1 + [C_1]/K_{C1} + [C_2]/K_{C2})} \quad (\text{for } i \geq 3)$$

C_i=concentración del oligómero grado polimerización i
[E₁]=concentración de endoglucanasas

- > La multiplicidad de enzimas implica un número elevado de constantes cinéticas y termodinámicas

Tipo c) Modelo basado en adsorción-desorción (Gan et al., 2003)



$$\frac{dC_{E^*S_c}}{dt} = k_{sc1}C_E C_{S_c} - k_{sc2}C_{E^*S_c} - k_p C_{E^*S_c}$$

E=enzima libre S_c=celulosa
E* S_c=complejo enzima-sustrato

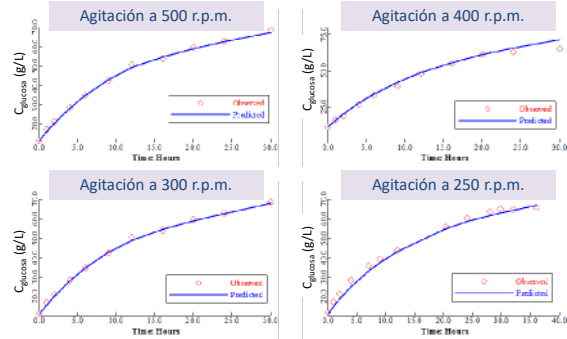
- > Se aplica el modelo de Briggs y Haldane, sin asumir estado estacionario, en principio.



MODELOS EMPÍRICOS

Algunos ejemplos: sacarificación de residuo de maíz a varias agitaciones

Agitación por turbinas entre 250 y 300 r.p.m.



Modelo potencial simple

$$\frac{dC_{glu}}{dt} = k \cdot C_{glu} \Rightarrow t = 0 \Rightarrow C_{glu} = C_{glu0}$$

	valor	error
k	7.02E-04	1.86E-04
n	1.9600	0.0630
F-value	17452	
RMSE	1.6200	
SSQR	120.7000	

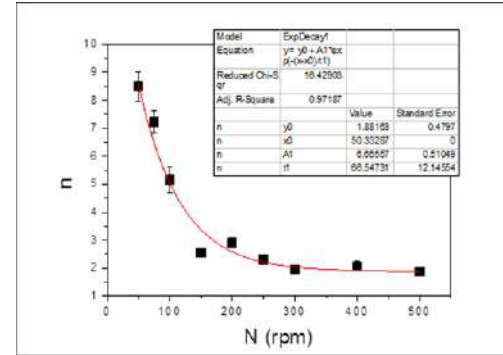
Orden dos aparente ¿Reacción bimolecular?
 El orden dos, si fuera molecularidad, implicaría una reacción entre dos reactivos que no están en exceso: agua y enlaces éter de la celulosa, en condiciones mol a mol.



MODELOS EMPÍRICOS

Algunos ejemplos: sacarificación de residuo de maíz a varias agitaciones

Agitación por turbinas entre 50 y 300 r.p.m.: evolución de n



- El orden baja al aumentar la agitación, o sea, al aumentar la velocidad de transferencia de materia.
- El orden tiende a 2 a valores altos de agitación, cuando la transferencia de materia externa es rápida y, como es probable, la hidrólisis es el fenómeno lento y, por tanto, el que controla la velocidad del proceso.
- Un orden alto (por ejemplo, n=8) implica una elevada dependencia de la concentración de celulosa.
- Un orden alto explica una parada del proceso a tiempos elevados.
- Un orden de dos implica que una molécula de agua reacciona con un enlace éter, aparentemente: el agua no estaría en exceso.



MODELOS EMPÍRICOS

Modelos a partir de fenómenos limitantes o desacelerantes

- Muchos son empíricos, otros son tipo Michaelis-Menten
- Todos tienden a achacar la desaceleración a una sola causa: un fenómeno concreto

Desactivación enzimática irreversible/reversible de orden 1 o de orden 2

Modelo de Lumry-Eyring (1946): $E_a \xrightleftharpoons{K_{eq}} E_d$ Ambas de orden 1

Substrato heterogéneo (dos fases, al menos: amorfa y cristalina)

Modelo de Ryu et al. (1982): Michaelis-Menten por zona f=facción fase cristalina

$$\frac{V_{max}}{K_M} = \left(\frac{V_{max,c}}{K_{M,c}} - \frac{V_{max,a}}{K_{M,a}} \right) \phi + \frac{V_{max,a}}{K_{M,a}} \quad \frac{1}{K_M} = \left(\frac{1}{K_{M,c}} - \frac{1}{K_{M,a}} \right) \phi + \frac{1}{K_{M,a}}$$

Modelo bifásico general con dos reacciones de orden 1 (dos zonas)

$$C_{glu} = C_{glu0} + C_{cel\ fase1} \cdot e^{-k_1 \cdot t} + C_{cel\ fase2} \cdot e^{-k_2 \cdot t}$$

Glucosa procedente de pretratamientos

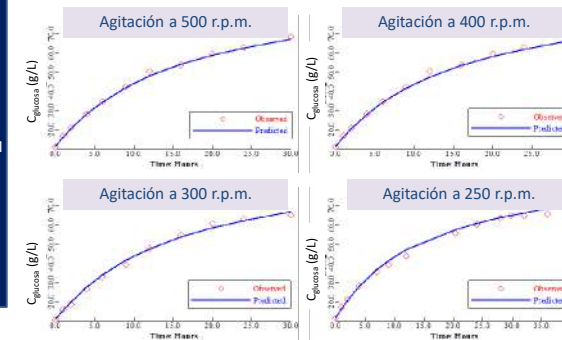
Fuente: Bansal et al. Modeling cellulase kinetics on lignocellulosic substrates. Biotech. Adv. 2009 27:833-848



MODELOS EMPÍRICOS

Modelo bifásico general con dos reacciones de orden 1 (dos zonas)

Agitación por turbinas entre 250 y 300 r.p.m.



$$C_{glu} = C_{glu0} + C_{cel\ fase1} \cdot e^{-k_1 \cdot t} + C_{cel\ fase2} \cdot e^{-k_2 \cdot t}$$

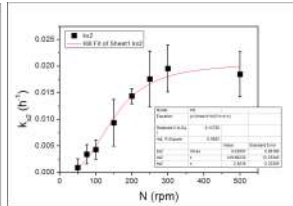
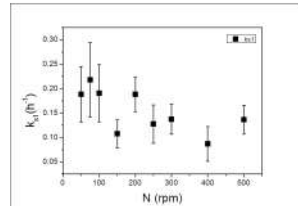
$$A_1 = C_{cel\ amorfa} \quad (1 - A_1) = C_{cel\ cristalina}$$

	valor	error
ks1	1.30E-01	2.05E-02
ks2	0.0165	0.0037
A1	33.87	7.00
F-value	18293	
RMSE	1.2800	
SSQR	75.28	
VE (%)	99.54	



Modelo bifásico general con dos reacciones de orden 1 (dos zonas)

N (rpm)	A1		ks1		ks2		F	RMSE	VE %
	valor	error	valor	error	valor	error			
500	30.98	7.93	0.136	0.029	0.0185	0.0042	12015	0.67	99.9
400	50.00	27.56	0.087	0.035	0.0085	0.0162	4175	1.11	99.7
300	30.49	8.10	0.137	0.030	0.0196	0.0044	11986	0.67	99.9
250	29.55	10.38	0.128	0.039	0.0176	0.0052	6961	1.05	99.7
200	20.00	3.25	0.188	0.036	0.0143	0.0014	8862	0.82	99.8
150	37.14	11.02	0.108	0.029	0.0093	0.0044	6768	1.06	99.7
100	20.00	4.09	0.191	0.059	0.0043	0.0018	1520	1.49	97.7
75	20.00	4.26	0.218	0.076	0.0034	0.0018	1206	1.69	96.7
50	20.00	3.85	0.188	0.057	0.0009	0.0017	1107	1.5	95.5



- El modelo implica dos formas del reactivo con diferente reactividad.
- Uno es muy reactivo (izq.): la agitación apenas afecta, si acaso, negativamente
- Otro es mucho menos reactivo y mejora mucho con la agitación. La transferencia de materia externa es crítica aquí.



Modelos a partir de fenómenos limitantes o desacelerantes

Reactividad de la celulosa

Modelos fractales: Orden 1 o Michaelis-Menten con corrección de la k catalítica

Modelo de Valiamae et al (2003): fractal empírico

$$C_{glu} = C_{glu0} + C_{cel0} \cdot \exp(-k \cdot t^{1-h})$$

Modelo de Wang y Feng (2010): fractal puro de orden 1

$$C_{glu} = C_{glu0} + C_{ce} \cdot \exp\left(-k \cdot \left(\frac{t^{1-h} - 1}{1-h}\right)\right)$$

Modelo de Xu y Ding (2007): fractal puro MM con exceso de enzima

$$\left(1 - \frac{C_e}{j \cdot C_{cel}}\right) \cdot \frac{k_2 \cdot C_e \cdot t^{1-h}}{1-h} = C_{glu0} - K_m \cdot \ln\left(1 - \frac{C_{glu}}{j \cdot C_{cel}}\right) \quad \text{Factor de atasco} \quad \therefore j \approx 4 \cdot 10^{-4}$$

Fuentes:

Wang y Feng. Fractal kinetic analysis of the enzymatic saccharification of cellulose under different conditions. Biore. Technol. 2010 101:7995-8000
 Souza et al. Kinetics of enzyme-catalyzed hydrolysis of steam-exploded sugarcane bagasse. Biore. Technol. 2013 147:413-426
 Xu y Ding. A new kinetic model for heterogeneous (or spatially confined) enzymatic catalysis: contributions from the fractal and jamming (overcrowding) effects. Appl. Catal. A: General 2007 317:70-81



Modelos a partir de fenómenos limitantes o desacelerantes

Reactividad de la celulosa

- k es función de X o de t: disminuye con X o con t

Modelo de South et al. (1995): Michaelis-Menten con corrección k catalítica

$$k_x = k \cdot (1 - X)^n + c$$

Modelos fractales: Orden 1 o Michaelis-Menten con corrección k catalítica

- El proceso se da en un espacio constreñido (Dimensión<3)
- Solo una acción hidrolítica es determinante (lenta): endo o exoglucanasas
- La primera hidrólisis (t=0) sigue orden 1 (o Michaelis-Menten)

$$0 < t < 1 \rightarrow k_x = k \forall t_{final} \gg 1$$

$$t \geq 1 \rightarrow k_x = k \cdot t^{-h}$$

- h es el exponente fractal o exponente de Hurst: un valor elevado implica una disminución rápida de k.
- La dimensión real o fractal se puede estimar a partir de h: podría ser cambiante

Fuentes:

Bansal et al. Modeling cellulase kinetics on lignocellulosic substrates. Biotech. Adv. 2009 27:833-848
 Kopelman. Fractal kinetics. Science 1988 241:1620-1626



¿Por qué los modelos fractales? La geometría del sustrato sólido

Algunas microfotografías SEM de biomasa en la literatura:



Residuo de maíz

Cáscara de naranja

Madera de eucalipto tratada con agua caliente a presión (LHW)

Se asemejan a fractales puros:

- ❖ Los motivos geométricos se multiplican en todas direcciones
- ❖ Se pueden apreciar varios motivos intercalados, de diverso tamaño, según el residuo
- ❖ ¿Cambian los motivos con el tiempo de sacarificación? SI → Degradación
- ❖ ¿Cambian los motivos con el pretratamiento? SI → Degradación

MODELOS EMPÍRICOS

Algunos ejemplos: sacarificación de residuo de maíz

El efecto de la agitación (de la mezcla)

Valores altos de agitación: transferencia de materia rápida → controla la RQ, más lenta.

Valores intermedios de agitación: régimen mixto. Velocidades TM y RQ similares.

Valores bajos de agitación: la transferencia de materia es lenta y el proceso se frena a pesar de tener la misma cantidad de enzimas. El proceso está controlado por transferencia de materia y las enzimas se desactivan, aparentemente.

Modelo fractal de orden 1 simple

N (rpm)	F-value	VE (%)	RMSE
50	1518	99.61	0.011
75	1611	99.04	0.015
100	1496	99.66	0.017
150	9547	99.71	0.011
200	9174	99.69	0.009
250	6552	99.66	0.012
300	4864	98.71	0.018
400	2449	98.82	0.016
500	5083	97.96	0.012

MODELOS EMPÍRICOS

Algunos ejemplos: sacarificación de residuo de maíz

El efecto de la agitación (de la mezcla)

$$R = \frac{dX/dt}{C_{ceto}} \therefore \frac{dX}{dt} = k_i(1-X) \begin{cases} 0 < t < 1 \rightarrow k_i = k \forall t_{final} \gg 1 \\ t \geq 1 \rightarrow k_i = k \cdot t^{-h} \end{cases}$$

Un valor bajo del exponente fractal h

- Alta accesibilidad y reactividad
- Si es cero, el contacto sustrato-enzima no se frena con el tiempo: no hay fenómenos decelerantes.
- Más agitación implica menor valor de h: la mejor mezcla supone mitigar los fenómenos que inhiben el proceso (por ejemplo, el bloqueo de enzimas)

Un valor elevado para la constante cinética k_i

- Velocidad creciente en la zona en la que este parámetro es función de la agitación.
- Un valor elevado a velocidad máxima (asíntota) implica mayor reactividad

MODELOS EMPÍRICOS

Algunos ejemplos: sacarificación de residuo de maíz

El efecto de la concentración de enzima

$$\frac{dX}{dt} = k_i \cdot C_e(1-X) \begin{cases} 0 < t < 1 \rightarrow k_i = k \forall t_{final} \gg 1 \\ t \geq 1 \rightarrow k_i = k \cdot t^{-h} \end{cases}$$

Parámetros cinéticos	valor	error
k	4.2 · 10 ⁻³	1.6 · 10 ⁻⁴
h	0.255	0.0232

Parámetros de bondad de ajuste	valor
F de Fisher	5138
RMSE	0.0235
SRQ	0.0204
VE (%)	98.8

MODELOS EMPÍRICOS

Algunos ejemplos: sacarificación de residuo de maíz

El efecto de la temperatura (45 → 55 °C)

Modelo fractal de orden 1 modificado

$$k_i = \exp[\ln(k_i0) - (Ea_ki/R) \cdot (1/T)]$$

$$k_e = \exp[\ln(kd_0) - (Eakd/R) \cdot (1/T)]$$

$$E \rightarrow D = n = 1 \quad a_R = \exp(k_i \cdot a_R)$$

$$\frac{dX}{dt} = k_i \cdot C_{e0} \cdot a_R(1-X) \begin{cases} 0 < t < 1 \rightarrow k_i = k \forall t_{final} \gg 1 \\ t \geq 1 \rightarrow k_i = k \cdot t^{-h} \end{cases}$$

C _e (mgE/gDS)	valor	error
h	0.144	0.0198
lnk _{i0}	19.27	1.46
Ea _{k_i/R}	8056	470
lnkd ₀	227.5	68.54
Ea _{k_d/R}	75648	22493

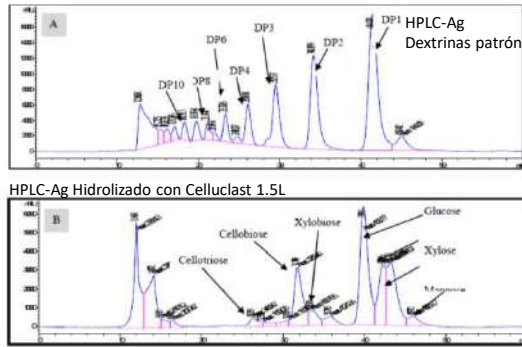
C _e (mgE/gDS)	valor
F-value	20716
RMSE	0.011
SRQ	0.0045
VE (%)	99.7



MODELOS FENOMENOLÓGICOS

Modelos tipo Michaelis-Menten con desactivación "aparente" asociada

- La cromatografía de exclusión iónica permite separar oligosacáridos.
- Se aprecian productos de hidrólisis de celulosa (celotriosa, celobiosa y glucosa).
- Se aprecian productos de hidrólisis de hemicelulosas: xilotriosa, xilobiosa y xilosa (como poco).
- No se aprecian oligosacáridos medios (DP=4-10)
- Se aprecian oligosacáridos muy pesados (DP>10), proteínas y polímeros.

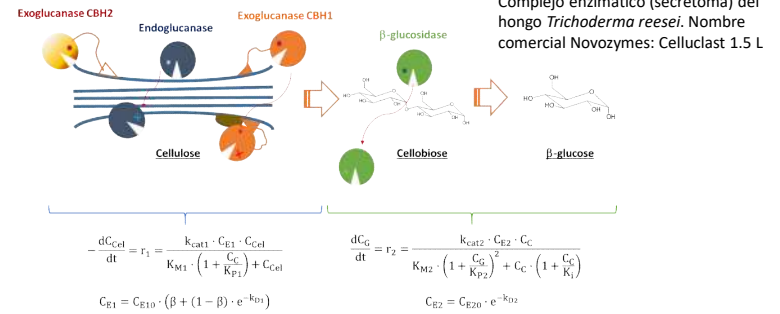


Wojtusik, M., Villar, J. C., Ladero, M., & García-Ochoa, F. (2018). Physico-chemical kinetic modelling of hydrolysis of a steam-explosion pre-treated corn stover: A two-step approach. *Bioresource technology*, 268, 592-598.



MODELOS FENOMENOLÓGICOS

Modelos tipo Michaelis-Menten con desactivación "aparente" asociada



Wojtusik, M., Vergara, P., Villar, J. C., García-Ochoa, F., & Ladero, M. (2019). Thermal and operational deactivation of *Aspergillus fumigatus* β -glucosidase in ethanol/water pretreated wheat straw enzymatic hydrolysis. *Journal of biotechnology*, 292, 32-38.

Wojtusik, M., Villar, J. C., Ladero, M., & García-Ochoa, F. (2018). Physico-chemical kinetic modelling of hydrolysis of a steam-explosion pre-treated corn stover: A two-step approach. *Bioresource technology*, 268, 592-598.



MODELOS FENOMENOLÓGICOS

Modelos tipo Michaelis-Menten con desactivación "aparente" asociada

- Los parámetros cinéticos son significativos: errores bajos
- Los parámetros estadísticos de ajuste del modelo son buenos: valores bajos de SEE, WRSS, RMSE y F, y altos de %VE.
- La despolimerización es más lenta y, por lo tanto, controlante.
- Las glucanasas son más inhibidas por su producto que las beta-glucosidasas.
- Las glucanasas, en apariencia, se desactivan a mayor velocidad que las beta-glucosidasas.

Parámetros cinéticos		Parámetros estadísticos	
Parámetro	Valor	Parámetro	Valor
k_{cat1} (mol·L ⁻¹ ·h ⁻¹)	(1.2±0.3)·10 ⁻²	WRSS _{cel}	1.8·10 ⁻³
k_{cat2} (mol·L ⁻¹ ·h ⁻¹)	(6±1)·10 ⁻¹	WRSS _{glu}	1.8·10 ⁻⁴
K_{M1} (mol·L ⁻¹)	1.5±0.1	SEE _{cel}	4.9·10 ⁻³
K_{M2} (mol·L ⁻¹)	(3±1)·10 ⁻¹	SEE _{glu}	1.5·10 ⁻³
K_{P1} (mol·L ⁻¹)	(1.1±0.7)·10 ⁻²	% VE _{cel}	98.1
K_{P2} (mol·L ⁻¹)	(2.3±0.8)·10 ⁻²	% VE _{glu}	99.6
K_I (mol·L ⁻¹)	(9±4)·10 ⁻⁵	RMSE	5.0·10 ⁻³
k_{D1} (h ⁻¹)	(8±3)·10 ⁻²	% VE _{TOT}	98.5
k_{D2} (h ⁻¹)	(4±1)·10 ⁻²	F _C / F _T	12810 / 4.2

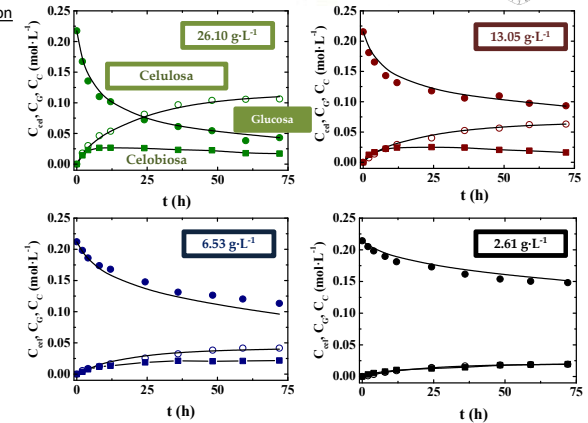
Wojtusik, M., Villar, J. C., Ladero, M., & García-Ochoa, F. (2018). Physico-chemical kinetic modelling of hydrolysis of a steam-explosion pre-treated corn stover: A two-step approach. *Bioresource technology*, 268, 592-598.



MODELOS FENOMENOLÓGICOS

Modelos tipo Michaelis-Menten con desactivación "aparente" asociada

- La baja actividad beta-glucosidasas de Celluclast 1.5 L permite la aparición de celobiosa en el líquido
- El aumento de enzima añadida no implica conversión total del residuo de maíz pretreatado con ácido y explosión por vapor.
- La celobiosa se convierte muy lentamente en glucosa.
- Esto explica la necesidad de añadir secretomas de *Aspergillus* o de *Penicillium*, mucho más ricos en beta-glucosidasas.



Wojtusik, M., Villar, J. C., Ladero, M., & García-Ochoa, F. (2018). Physico-chemical kinetic modelling of hydrolysis of a steam-explosion pre-treated corn stover: A two-step approach. *Bioresource technology*, 268, 592-598.



RESALVALDOR



Algunas lecturas recomendadas más...

Fockink, D. H., Uribe, M. B., Sánchez, J. H., & Ramos, L. P. (2017). Enzymatic hydrolysis of steam-treated sugarcane bagasse: Effect of enzyme loading and substrate total solids on its fractal kinetic modeling and rheological properties. *Energy & Fuels*, *31*(6), 6211-6220.

Wojtusik, M., Zurita, M., Villar, J. C., Ladero, M., & García-Ochoa, F. (2016). Enzymatic saccharification of acid pretreated corn stover: Empirical and fractal kinetic modelling. *Bioresource technology*, *220*, 110-116.

Zhang, H., Chen, L., Lu, M., Li, J., & Han, L. (2016). A novel film-pore-surface diffusion model to explain the enhanced enzyme adsorption of corn stover pretreated by ultrafine grinding. *Biotechnology for biofuels*, *9*(1), 181.

de la Torre, I., Ravelo, M., Segarra, S., Tortajada, M., Santos, V. E., & Ladero, M. (2017). Study on the effects of several operational variables on the enzymatic batch saccharification of orange solid waste. *Bioresource technology*, *245*, 906-915.

Caro, I., Blandino, A., Díaz, A. B., & Marzo, C. (2019). A kinetic model considering the heterogeneous nature of the enzyme hydrolysis of lignocellulosic materials. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, *13*(4), 1044-1056.

Nili, J., & Jeoh, T. (2019). The role of evolving interfacial substrate properties on heterogeneous cellulose hydrolysis kinetics. *bioRxiv*, 691071.

Ahamed, F., Song, H. S., Ooi, C. W., & Ho, Y. K. (2019). Modelling heterogeneity in cellulose properties predicts the slowdown phenomenon during enzymatic hydrolysis. *Chemical Engineering Science*, *206*, 118-133.

Olkiewicz, M., Tylkowski, B., Montornés, J. M., García-Valls, R., & Gulaczyk, I. (2021). 6 Modelling of enzyme kinetics: cellulose enzymatic hydrolysis case. In *Theoretical and Computational Chemistry* (pp. 181-204). De Gruyter.

Zhang, H., Han, L., & Dong, H. (2021). An insight to pretreatment, enzyme adsorption and enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass: Experimental and modeling studies. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, *140*, 110758.

Wojtusik, M., Vergara, P., Villar, J. C., Ladero, M., & García-Ochoa, F. (2020). Enzymatic hydrolysis of several pretreated lignocellulosic biomasses: Fractal kinetic modelling. *Bioresource Technology*, *318*, 124050.