

Artículo Original

***OBTENCIÓN DE UN MODELO MATEMÁTICO PARA
DETERMINAR LA VELOCIDAD DE HIDRÓLISIS DE LA
SACAROSA CATALIZADA CON ENZIMA***

***OBTAINING A MATHEMATICAL MODEL TO DETERMINE THE RATE OF
ENZYME-CATALYZED HYDROLYSIS OF SUCROSE***

Sara Mendoza Ferrer^{1*} <https://orcid.org/0000-0002-4468-9052>
Meinardo Lafargue Gámez¹ <https://orcid.org/0009-0000-4778-4453>

¹ Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar (ICIDCA),
San Miguel del Padrón, La Habana, Cuba.

Recibido: Febrero 3, 2025; Revisado: Febrero 18, 2025; Aceptado: Abril 18, 2025

RESUMEN

Introducción:

La producción actual de glucosa en la Unidad Empresarial de Base (UEB) “Chiquitico Fabregat” se lleva a cabo en un proceso discontinuo, donde la materia prima fundamental es el azúcar refino C, la cual se hidroliza utilizando ácido fosfórico como catalizador. Dado las disímiles desventajas que conlleva el empleo del ácido a elevadas temperaturas, se propone sustituir el catalizador por la enzima invertasa termoestable GS115BfrA4X *Pichia pastoris*, siendo necesario estudiar el comportamiento cinético de la reacción catalizado por la misma.

Objetivo:

Definir un modelo matemático que describa la velocidad de reacción, a la cual trabaja la enzima invertasa GS115BfrA4X *Pichia pastoris*, en la etapa de hidrólisis del proceso de obtención de glucosa.

Materiales y Métodos:

Para obtener las constantes cinéticas que caracterizan el modelo matemático se determina la variación de los productos en el tiempo, utilizando el método colorimétrico



Este es un artículo de acceso abierto bajo una Licencia *Creative Commons* Atribución-No Comercial 4.0 Internacional, lo que permite copiar, distribuir, exhibir y representar la obra y hacer obras derivadas para fines no comerciales.

* Autor para la correspondencia: Sara Mendoza, email: sara.mendoza@icidca.azcuba.cu



del ácido 3,5- dinitrosalisílico (DNS), realizando las mediciones en espectrofotómetro VWR UV-3100 PC con un intervalo de medición de 190-1 100 nm y cubetas de vidrio de un centímetro.

Resultados y Discusión:

La predicción de la ecuación de Yoshino & Murakami, (2009) empleada en el estudio de la etapa inhibida de la reacción, presenta un error relativo menor que el 4 % para un reactor de 40 L.

Conclusiones:

Se obtuvo un modelo que permite predecir la velocidad en función de la concentración de sustrato en las etapas no inhibidas e inhibida de la reacción catalizada por la invertasa.

Palabras clave: cinética enzimática; modelo matemático.

ABSTRACT

Introduction:

The current production of glucose in the factory “Chiquitico Fabregat” is carried out in a discontinuous process, where the fundamental raw material is refined sugar C, which is hydrolyzed using phosphoric acid as a catalyst. Given the different disadvantages that come with using acid at high temperatures, it is proposed to replace the catalyst with the thermostable invertase enzyme GS115BfrA4X *Pichia pastoris*, making it necessary to study the kinetic behavior of the reaction catalyzed by it.

Objective:

To define a mathematical model that describes the reaction rate at which the invertase enzyme GS115BfrA4X *Pichia pastoris* works in the hydrolysis stage of the glucose production process.

Materials and Methods:

To obtain the kinetic constants that characterize the mathematical model, the variation of the products over time is determined using the colorimetric method of 3,5-dinitrosalisylic acid (DNS), taking measurements in a VWR UV-3100 PC spectrophotometer with a measurement range of 190-1,100 nm and one-centimeter glass cuvettes.

Results and Discussion:

The prediction of the Yoshino & Murakami, (2009) equation used in the study of the inhibited stage of the reaction presents a relative error of less than 4% for a 40 L reactor.

Conclusions:

A model was obtained that allows predicting the speed as a function of the substrate concentration in the uninhibited and inhibited stages of the reaction catalyzed by invertase.

Keywords: enzyme kinetics; mathematical model.

1. INTRODUCCIÓN

La cinética enzimática es un campo fundamental en la bioquímica que estudia las tasas a las que ocurren las reacciones catalizadas por enzimas. Comprender cómo las enzimas aceleran estas reacciones es crucial para diversas aplicaciones, desde el desarrollo de fármacos hasta la biotecnología (Guerrero, 2022). Un modelo matemático que ofrece una descripción detallada de la velocidad de reacción enzimática, es el propuesto por Yoshino & Murakami, (2009).

Este modelo se basa en la relación entre la concentración del sustrato y la velocidad de reacción, incorporando factores como la afinidad de la enzima por el sustrato y la saturación enzimática (Yoshino & Murakami, 2015). A diferencia de modelos más simples, como la ecuación de Michaelis-Menten, que no tiene en cuenta factores que pueden afectar la velocidad de reacción, como la inhibición enzimática (López & García, 2015), la ecuación de (Yoshino & Murakami, 2015) permite un análisis más preciso en condiciones donde las concentraciones de sustrato son elevadas o donde existen múltiples sustratos. Al desarrollar un modelo matemático basado en esta ecuación, se pueden predecir con precisión las tasas de reacción bajo diferentes condiciones operativas. Esto no solo facilita el ajuste de parámetros críticos como temperatura, pH y concentración de sustrato, sino que también permite anticipar el comportamiento del sistema en escalas industriales (Maisincho et al., 2022).

La producción actual de glucosa en la Unidad Empresarial de Base (UEB) “Chiquitico Fabregat”, Villa Clara, Cuba, se lleva a cabo en un proceso discontinuo, donde la materia prima fundamental es el azúcar refino C, la cual se hidroliza utilizando ácido fosfórico como catalizador. Con el propósito de sustituir el ácido por la enzima invertasa GS115BfrA4X *Pichia pastoris*, se realizan estudios de la etapa de hidrólisis, comenzando por el laboratorio, como es el caso de Cortés (2021), que mediante los diseños de experimentos de Plackett-Bürman y Box- Hunter, determina las variables que influyen de manera positiva en el rendimiento de los reductores totales. Además, Mendoza et al., (2021) estudian el efecto de variar la temperatura de reacción, concentración de enzima y brix de la solución sobre el tiempo de inversión, partiendo de un diseño experimental de Box-Behnken de superficie respuesta, a tres niveles para cada uno de los factores. Se realiza el estudio de estos factores a escala de banco y planta piloto (Mendoza & Rodríguez, 2021), en el que se determinó que existe una inhibición por sustrato.

En este sentido, el presente trabajo tiene como objetivo definir un modelo matemático que describa la velocidad de reacción, a la cual trabaja la enzima invertasa GS115BfrA4X *Pichia pastoris*, en la etapa de hidrólisis del proceso de obtención de glucosa.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Materias primas

Se trabajó con una enzima invertasa termoestable, capaz de resistir temperaturas alrededor de los 90 °C. Esta se produce en la UEB Bioprocesos Cuba 10 del ICIDCA, Cuba, a partir del clon GS115BfrA4X de *Pichia pastoris*, del Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB), modificada genéticamente, a diferentes valores de

actividad enzimática.

Se utilizó azúcar refino C, proveniente de la Empresa Agroindustrial Azucarera (EAA) “30 de noviembre”, ubicada en Taco Taco, Artemisa, Cuba.

2.2 Equipamiento

Los experimentos se desarrollaron en un reactor de 1,5 L de capacidad, con recirculación de agua acoplado a un agitador mecánico (IKA), un criostato (WiseCircu) y control de temperatura en el interior del reactor mediante un termómetro debidamente calibrado (figura 1).



Figura 1. Instalación experimental utilizada a nivel de laboratorio en la hidrólisis enzimática de la sacarosa para determinar los valores de K' si y la relación K'/k de la ecuación de Yoshino & Murakami, (2009)

2.3 Técnicas analíticas

La determinación de azúcares reductores se realizó por el método colorimétrico del ácido 3,5- dinitrosalisílico (DNS), (Lorenz-Miller, 1959).

Con el objetivo de definir un modelo que describa la velocidad a la cual trabaja la enzima invertasa en el reactor, se asumió que el comportamiento de la misma se ajusta a la cinética de Michaelis & Menten, (1913) (ecuación 1). En este sentido, primeramente, se definieron las dos etapas en las cuales trabaja el preparado enzimático. La primera de ellas fue la asociada a su comportamiento en ausencia de la inhibición de su sustrato $[S]$ (Acosta-Solares et al., 2023). Esta etapa permitió definir las constantes cinéticas de la enzima K_M y $V_{m\acute{a}x}$.

$$v \approx \frac{V_{m\acute{a}x} * [S]}{K_M + [S]} \quad (1)$$

Primeramente, se estableció el ploteo de las velocidades desarrolladas por la enzima a diferentes concentraciones de sacarosa, para lo cual se empleó un tampón de reacción que simulaba las condiciones a las cuales se desarrollaría la reacción en el reactor. Para ello se preparó el buffer adecuado al pH óptimo de trabajo de la enzima (pH = 5,5) (Echemendía, 2010), y se adicionaron cantidades variables del sustrato (sacarosa) para obtener un rango variable del mismo en el buffer, comprendido en el intervalo de 0 a 200 g/L (0 a 555 mmol/L).

Seguidamente se adicionó una cantidad de enzima de 1 U/mL al tampón de reacción y a los 15 minutos, luego de la adición, se procedió a determinar la velocidad (ecuación 2) a

través de la transformación del poder reductor generado (glucosa y fructosa), en unidades de actividad enzimática empleando el método del DNS.

$$V = \frac{(\Delta DO * 5 * 1000 * FD)}{(2 * (\Delta T * 180 * m))} \quad (2)$$

Siendo:

V: Velocidad determinada para la enzima (U/mL).

ΔDO : La variación de DO a 550 nm, (adimensional).

Δt : El tiempo de desarrollo del ensayo de actividad, 15 min.

FD: Factor de dilución empleado, 100 (adimensional).

180: Masa molar de la fructosa (monosacárido empleado para establecer la curva estándar) (g/mol).

m: Coeficiente de extinción molar ($L * g^{-1} * cm^{-1}$).

El coeficiente de extinción fue obtenido empleando una curva estándar de fructosa de 0 a $2,5 g * L^{-1}$.

Los valores obtenidos de actividad enzimática se graficaron versus la concentración de sustrato, obteniéndose la hipérbola rectangular de Michaelis & Menten, (1913), la que se derivó a la ecuación de los dobles recíprocos de Lineweaver & Burk, (1934) (ecuación 3).

$$\frac{1}{v} = \frac{K_M}{V_{m\acute{a}x}} * \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{m\acute{a}x}} \quad (3)$$

Con los valores obtenidos de K_M y $V_{m\acute{a}x}$ se estimaron los valores de velocidad enzimática, pero en la fase de inhibición por sustrato, basada dicha estimación en la ecuación de Yoshino & Murakami, (2009). Esta expresión estima los valores de velocidad de la enzima para la etapa en la cual el sustrato se comporta como su inhibidor, siendo la ecuación (4) que describe el proceso la siguiente:

$$V = \frac{V_{m\acute{a}x} * \left(1 + \frac{[S]}{K'_{Si}} * \frac{K'}{K}\right) * [S]}{[S] * \left(1 + \frac{[S]}{K'_{Si}}\right) + K_M * \left(1 + \frac{[S]}{K'_{Si}}\right)} \quad (4)$$

Siendo:

K, K' y K'si: Constantes de inhibición.

Luego de una serie de transformaciones con la expresión de Yoshino & Murakami, (2009) se llega a la siguiente expresión (5) simplificada de la misma:

$$\frac{v}{V_{m\acute{a}x} - v} \approx \frac{K'_{Si}}{1 - \frac{K'}{K}} * \frac{1}{[S]} + \frac{K'/K}{1 - K'/K} \quad (5)$$

Siendo:

v: Velocidad de la enzima en presencia de inhibidor (U/mL).

Para estimar los valores de K'_s y la relación K'/K , se establecieron ocho experiencias en un reactor de 1 L a diferentes concentraciones de sacarosa que se conocen son inhibitorias para la enzima (Mendoza et al., 2021). Dichas concentraciones en el reactor fueron de 52,4; 54,4; 58,1; 62,1; 65,4; 70,6; 75,5 y 80,2 °Bx, con las mismas se procedió a estimar los niveles de velocidad enzimática para cada condición (empleando para ello el cociente entre la diferencia de concentraciones de producto a dos tiempos determinados y la diferencia entre dichos intervalos de tiempo).

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En las figuras 2 y 3 se muestra la hipérbola rectangular de Michaelis-Menten y el gráfico de los dobles recíprocos de Lineweaver-Burk respectivamente, de donde se obtuvieron los valores de K_M de 22,6 mM y $V_{máx}$ de 0,85 mM/min que son muy similares a los obtenidos por Johnson (2013).

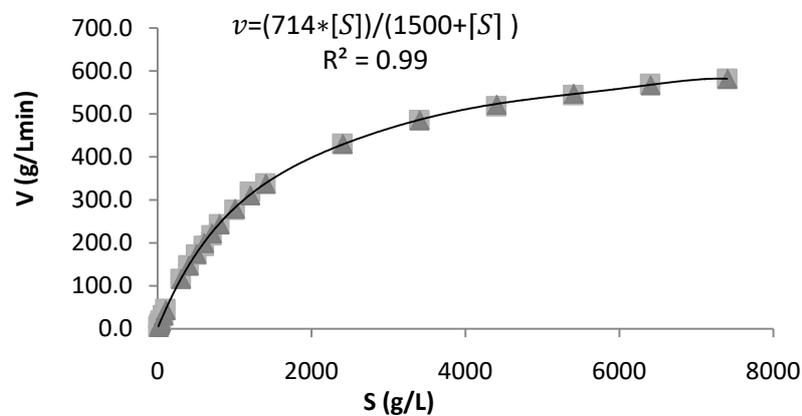


Figura 2. Ajuste de los datos experimentales a la ecuación de Michaelis-Menten para la enzima invertasa

Se muestran los valores obtenidos experimentalmente (\blacktriangle), los valores obtenidos teóricamente según modelo (\blacksquare), el gráfico correspondiente a la hipérbola rectangular esperada y el valor del coeficiente de correlación (R^2) correspondiente al ajuste a la ecuación de Michaelis-Menten.

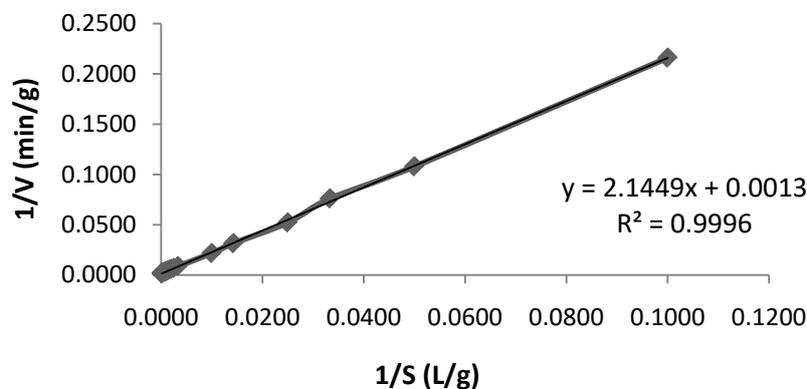


Figura 3. Gráfico de los dobles recíprocos (Lineweaver-Burk) de $1/V$ versus $1/S$ para la enzima invertasa

Se muestran los valores obtenidos experimentalmente (■), el valor del coeficiente de correlación (R^2), el gráfico y la ecuación de regresión lineal.

Una vez definidos los valores de velocidad para cada concentración se procedió a establecer el gráfico definido por la transformación de la ecuación de Yoshino & Murakami, (2009), figura 4, graficando el término $v/(V_{m\acute{a}x}-v)$ versus el inverso de la concentración de sustrato. Se obtuvo así la línea recta teórica esperada ($R^2 = 0,9938$), en la cual del valor de intercepto $[K'/K]/[1 - K'/K]$, se estima el valor del cociente K'/K .

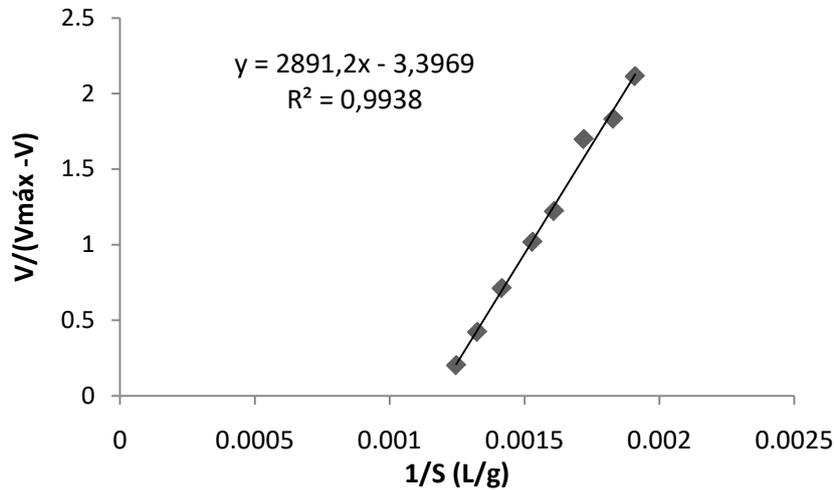


Figura 4. Gráfico de $V/(V_{m\acute{a}x}-v)$ versus $1/S$ derivado de la ecuación de Yoshino & Murakami, (2009) correspondiente a la etapa de inhibición de la enzima invertasa

Se muestran los valores obtenidos experimentalmente (◆), el valor R^2 , coeficiente de correlación el gráfico y la ecuación de regresión lineal.

Con el valor así definido de K'/K y haciendo uso de la pendiente del gráfico, se realiza la determinación de K' si. Los valores obtenidos para las constantes antes citadas fueron de 1,417 para el cociente K'/K (adimensional) y de -1205,63 g/L para el valor de K' si. Con los valores estimados se procedió a definir la ecuación (6) que determina la velocidad a la cual trabaja la enzima en el reactor.

$$v \approx \frac{V_{m\acute{a}x} * (1445595 * \frac{1}{[S]} - 1699)}{1445595 * \frac{1}{[S]} - 1199} \quad (6)$$

Con la definición de la velocidad en función de la concentración de sustrato en las etapas no inhibidas e inhibida de la reacción catalizada por la invertasa y conociendo además, las dimensiones del reactor en las cuales se desarrolla el proceso de inversión, se puede estimar la concentración de producto generado (fructosa + glucosa) en cada intervalo de tiempo en el reactor.

La validez del ajuste de la predicción de la ecuación de Yoshino & Murakami, (2009) empleada en este estudio para la etapa inhibida de la reacción se evidencia en la tabla 1, en la cual se comparan los valores del factor $v/V_{m\acute{a}x}$, obtenidos a partir de las velocidades de la invertasa en un reactor de 40 L y los valores predichos para dicho factor.

Tabla 1. Validación de los resultados obtenidos empleando reactores de diferentes dimensiones

<i>Relación K'/K</i>	<i>Constante K'si</i>	<i>1/S (L/g)</i>		<i>v/(V_{máx}-v)</i>		<i>Error relativo (%)</i>
		<i>Reactor 1 L</i>	<i>Reactor 40 L</i>	<i>Reactor 1 L</i>	<i>Reactor 40 L</i>	
1,417	-1205,6	0,0013	0,0013	0,347	0,337	2,90
		0,0014	0,0014	0,657	0,622	3,08
		0,0015	0,0015	0,923	0,944	2,59

La predicción de la ecuación de Yoshino & Murakami, (2009) empleada para calcular el valor de la velocidad de reacción en función de la concentración de sacarosa en la etapa inhibida, presenta un error relativo menor que el 4 % para un reactor de 40 L. El resultado alcanzado emula en nivel de exactitud en cuanto al ajuste de los datos experimentales con modelos establecidos en ambas etapas, inhibida (Keramat et al., 2015), (Solís-Fuentes et al., 2013) y no inhibida (Keramat et al., 2015), (Ascione et al., 2020), (Santana et al., 2005); cuando se analizan reportes previos en los cuales el uso de la ecuación de Michaelis-Menten ha constituido el basamento teórico para explicar la hidrólisis desarrollada por esta enzima.

En este estudio, se empleó la ecuación de Michaelis-Menten para definir las constantes cinéticas ($V_{máx}$ y K_M) a escala de 1 L. Dichas constantes permitieron modelar la velocidad de hidrólisis enzimática de la sacarosa a la escala antes referida (volúmenes similares se han empleado en trabajos previos, Ascione et al. (2020), para los cuales se han definido las constantes de $V_{máx}$ y K_M). De igual manera, y considerando el mecanismo de inhibición por sustrato que ha sido evidenciado para esta enzima, se establecieron las constantes cinéticas de inhibición (K'/K y $K'si$) para la misma escala de 1 L, tomando como base la ecuación de Yoshino & Murakami, (2009).

4. CONCLUSIONES

1. Los parámetros cinéticos K_M y $V_{máx}$ fueron de 22,6 mM y 0,85 mM/min respectivamente, obtenidos mediante la ecuación de Lineweaver-Burk, en la etapa sin inhibición del sustrato. Teniendo en cuenta la etapa inhibida se determina el valor de $K'si$ y la relación K'/K de la ecuación de Yoshino & Murakami, (2009) siendo estos valores de -1205,63 g/L y 1,417 respectivamente.
2. Se obtuvo un modelo que permite predecir la velocidad en función de la concentración de sustrato en las etapas no inhibidas e inhibidas de la reacción, catalizada por la invertasa y, por tanto, se puede estimar la concentración de producto generado (fructosa y glucosa) en cada intervalo de tiempo en el reactor.

REFERENCIAS

- Acosta-Solares, A., Pérez-Navarro, O., & Cortes-Falcón, M. F. (2023). Concepción tecnológica y análisis comparativo para la operación de hidrólisis ácida o enzimática de la sacarosa. *Centro Azúcar*, 50(3). http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2223-48612023000300033
- Ascione, B., Apicella, R., & Romano, V. (2020). Mathematical modeling of sucrose hydrolysis with product and substrate inhibition. *Engineering*, 12(4), 280–289. <https://doi.org/10.4236/eng.2020.124023>
- Cortés, M. F. (2021). *Efecto de la extracción del jugo de los filtros en los costos y en la calidad del azúcar crudo y refinado para la producción de glucosa* [Tesis doctoral, Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas].
- Echemendía, F. M. (2010). *Obtención de un biocatalizador termoestable a partir de la levadura Pichia pastoris GS115 TmInv para la producción de azúcares invertidos* [Tesis de grado, Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas]. <http://dspace.uclv.edu.cu/server/api/core/bitstreams/84ca2a51-8a2f-407a-97e9-5e5350d07711/content>
- Guerrero, J. T. (2022). *Enseñanza y aprendizaje de conceptos asociados a la cinética enzimática en el contexto de la bioquímica de alimentos* [Trabajo de grado, Universidad Pedagógica Nacional]. <http://repository.pedagogica.edu.co/bitstream/handle/20.500.12209/18316/%20ASOCIADOS%20A%20LA%20CIN%20c3%89TICA%20ENZIMATICA.pdf>
- Johnson, K. A. (2013). A century of enzyme kinetic analysis, 1913 to 2013. *FEBS Letters*, 587, 2753–2762. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2013.07.012>
- Keramat, A., Kargari, A., Sohrabit, M., Mirshekar, H., & Sanaeepur, H. (2015). A kinetic model for invertase-induced sucrose hydrolysis: Initial time lag. *Chemical Engineering and Technology*, 40(3), 529–536. <https://doi.org/10.1002/ceat.201400389>
- Lineweaver, H., & Burk, D. (1934). The determination of enzyme dissociation constants. *Journal of the American Chemical Society*, 56(3), 658–666. <https://doi.org/10.1021/ja01318a036>
- López, J. M., & García, F. (2015). Los cuatro mosqueteros de la cinética enzimática. *Eubacteria*, 34, 39–43. https://digitum.um.es/digitum/bitstream/10201/48171/1/Los_cuatro_mosqueteros_de_la_cinetica_enzimatica_Eubacteria34.pdf
- Lorenz-Miller, G. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, 31(3), 426–428. <https://doi.org/10.1021/ac60147a030>
- Maisincho, M. P., Delgado, M. H., & Cedeño, C. A. (2022). Una revisión de modelos matemáticos en cinética enzimática. *Centro Azúcar*, 49(1), 115–131. http://centrozucar.uclv.edu.cu/index.php/centro_azucar/article/view/696
- Mendoza, S., Rodríguez, Y., & Ribas, M. (2021). Optimización del tiempo de inversión en la hidrólisis enzimática de la sacarosa. *Centro Azúcar*, 48(4), 53–62. http://centrozucar.uclv.edu.cu/index.php/centro_azucar/article/view/678
-

- Mendoza, S., & Rodríguez, Y. (2021). Escalado a planta piloto de hidrólisis enzimática de la sacarosa. *ICIDCA de los Derivados de la Caña de Azúcar*, 55(3), 61–67. <https://www.revista.icidca.azcuba.cu/wp-content/uploads/2022/02/articulo-8.pdf>
- Michaelis, L., & Menten, M. L. (1913). Die Kinetik der Invertinwirkung. *Biochemische Zeitschrift*, 49, 333–369. https://www.chem.uwec.edu/Chem352_F18/pages/readings/media/Michaelis_& Menton_1913.pdf
- Santana, A. C., Costa, L., Costa, A. M., Moraes, C. A., Gomes, M. A., & Perez, M. de los A. (2005). Sucrose hydrolysis catalyzed by auto-immobilized invertase into intact cells of *Cladosporium cladosporioides*. *Electronic Journal of Biotechnology*, 8(1), 54–63. http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0717-34582005000100009&lng=es
- Solís-Fuentes, J. A., Guzmán-Flores, L. F., & Durán-de-Bazúa, M. C. (2013). Kinetic behavior of invertase in the hydrolysis of sucrose in complex sugarcane juices. *International Sugar Journal*, 115, 34–40. <https://www.researchgate.net/publication/288776824>
- Yoshino, M., & Murakami, K. (2009). A graphical method for determining inhibition constants. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 24(6), 1288–1290. <https://doi.org/10.3109/14756360902829766>
- Yoshino, M., & Murakami, K. (2015). Analysis of the substrate inhibition of complete and partial types. *SpringerPlus*, 4, 2–8. <https://doi.org/10.1186/s40064-015-1082-8>

CONFLICTO DE INTERÉS

Los autores declaran que no existen conflictos de interés.

CONTRIBUCIONES DE LOS AUTORES

- M.Sc. Sara Mendoza Ferrer. Redacción-revisión y edición, investigación, validación.
 - Dr.C. Meinardo Lafargue Gámez. Conceptualización, investigación, metodología.
-