

Biotransformación de polisacáridos de subproductos agropecuarios

Mario Monteiro Cuña



Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Universidad Nacional de La Pampa

2007

Tesina para alcanzar el grado de Licenciado en Química de la Universidad
Nacional de La Pampa.

Autor: Mario A. Monteiro Cuña

Director: Dr. Javier D. Breccia

Jurados:

Dr. Jose Camiña

Ing. Horacio Pagella

AGRADECIMIENTOS:

A la Universidad Nacional de La Pampa, donde comencé y finalicé mi carrera.

A mi Director de tesina, Dr. Javier D. Breccia, por sus valiosos aportes científicos, su eterna disposición, flexibilidad e infinita confianza brindada a lo largo de estos dos años.

A Laura Mazzaferro por su valioso aporte en mi formación profesional.

Al personal docente y técnico del Departamento de Química de la FCEyN, por su colaboración desinteresada.

A mis amigos y compañeros, por haber compartido tantas cosas juntos.

A todos aquellos que directa e indirectamente contribuyeron a la realización de este trabajo.

A Ana mi novia por haberme acompañado en todo momento.

A mi familia, a la que le debo todo.

ÍNDICE

RESUMEN	3
1. INTRODUCCIÓN	5
1.1. Polisacáridos de la pared celular vegetal	5
1.2. Xilanasas	7
1.2.1. Aplicaciones de las xilanasas	8
1.3. Alimentos funcionales	9
1.3.1. Oligosacáridos	10
1.3.2. Características de metabolismo de los oligosacáridos	10
2. OBJETIVOS E HIPOTESIS DEL TRABAJO	12
3. MATERIALES Y MÉTODOS	13
3.1. Instrumental y equipos	13
3.2. Caracterización del catalizador: xilanasas Buzyme 2511 [®]	13
3.3. Medición de proteínas	13
3.4. Preparación de los materiales poliméricos	14
3.5. Preparación del sustrato e hidrólisis enzimática	14
3.6. Determinación del pH óptimo de la biotransformación	14
3.7. Determinación de la Temperatura óptima de la biotransformación	14
3.8. Efecto de la agitación sobre el proceso	14
3.9. Determinación del contenido de hemicelulosa en los diferentes materiales	15
3.10. Solubilización termo-alkalina e hidrólisis enzimática	15
3.11. Determinación de los productos de la hidrólisis enzimática	15
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	16
4.1. Actividades enzimáticas presentes en la preparación de xilanasas comerciales Buzyme 2511 [®]	16
4.2. Hidrólisis enzimática de los subproductos agropecuarios	17
4.3. Optimización de los parámetros físico-químicos del proceso de biocatálisis	18
4.4. Extracción de hemicelulosa del orujo de manzana	21

Índice	
4.5.Tratamiento termo-alkalino e hidrólisis enzimática de los subproductos agropecuarios	22
4.6. Caracterización parcial de los productos de reacción de la xilanasa Buzyme 2511®	23
5. CONCLUSIONES	27
ABREVIATURAS	28
REFERENCIAS	29

RESUMEN

Las hemicelulosas son heteropolisacáridos que constituyen la pared celular vegetal y la cadena principal de estos biopolímeros están conformadas por moléculas del monosacárido xilosa unidas entre si por enlaces glucosídicos β -1,4. Los xilo-oligosacáridos, u oligómeros de hemicelulosa, ejercen un efecto benéfico en la salud humana favoreciendo la actividad de bacterias del ácido láctico en la microflora intestinal.

Este estudio se llevó a cabo para: (1) establecer las condiciones físico-químicas para la biotransformación hidrolítica de xilanos, y (2) seleccionar un subproducto vegetal que sujeto a biotransformación genere una solución rica en xilo-oligosacáridos.

Se caracterizó la preparación comercial xilanasa Buzyme 2511[®], registrándose las siguientes actividades enzimáticas en Unidades/ml: endo-xilanasa 14180 ± 1513 , pectinasa 900 ± 509 , celulasa 380 ± 509 , CMCelulasa 80 ± 113 , xilosidasa 0.018 ± 0.005 , galactosidasa 0.01 ± 0.008 , manosidasa 0.005 ± 0.0002 , ramnosidasa 0.012 ± 0.004 , glucosidasa 0.015 ± 0.003 .

Para la biotransformación del sustrato por la preparación Buzyme 2511[®] se determinaron como condiciones óptimas un pH de 6.0 y una temperatura de 50°C. La actividad específica endo-xilanasa fue de 86.4 Unidades/mg.

Se realizó una selección de subproductos agropecuarios como sustratos para lograr una solución enriquecida en xilo-oligosacáridos mediante un proceso enzimático con el biocatalizador xilanasa Buzyme 2511[®]. Luego de un proceso termo-alcalino-enzimático (0.1M NaOH, 121°C, 1h) seguido de una hidrólisis enzimática a 50°C, se obtuvieron soluciones con las siguientes concentraciones de azúcares reductores g/l: 1.7 ± 0.23 álamo (*populus alba*), 3.3 ± 0.01 caña de castilla (*arundo donax*), 8.2 ± 0.96 orujo de uva (*vitis vinifera*), 11.5 ± 1.9 orujo de manzana (*malus domestica*), 9.9 ± 0.18 escobajo de uva (*vitis vinifera*). Considerando solo el paso enzimático del proceso, el escobajo de uva presentó la mayor liberación de azúcares reductores (5 g/l). Los azúcares liberados durante dicho tratamiento comprendieron una fracción minoritaria del monosacárido xilosa ($\approx 3\%$) y una fracción mayoritaria de oligosacáridos (96%).

Considerando que la actividad mayoritaria de la preparación enzimática fue de tipo endo- β -1,4-xilanasa, se infiere que la solución remanente está compuesta por un alto porcentaje de xilooligosacáridos después de un proceso de solo 6 h.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Polisacáridos de la pared celular vegetal

La pared celular vegetal esta constituida mayoritariamente por los siguientes polímeros: celulosa, hemicelulosas, arabinogalactanos, sustancias pécticas y ligninas (Aspinall, 1980; McNeil *et al*, 1984; Darvill *et al*, 1980; Dey y Brinson, 1984; Selvendran, 1985). Estos polímeros, junto a la quitina, son los compuestos orgánicos más abundantes en la naturaleza.

La celulosa consta de cadenas lineales (no ramificadas) de glucosa en uniones β -1,4. Las cadenas de celulosa están ordenadas en fibras y son las responsables de mantener la rigidez de la pared celular. Las hemicelulosas son heteropolisacáridos que constituyen la pared celular solubles en álcalis y estrechamente relacionados a la celulosa (Van Soest,1982). La composición de las hemicelulosas varía según la especie vegetal que se considere. En cereales y maderas duras, los xilanos son el componente mayoritario de las hemicelulosas estando constituidos por una cadena principal de xilosas unidas por enlaces β -1,4, que puede estar substituida con diferentes grupos laterales como L-arabinosa, D-galactosa, acetilos y residuos de ácido glucurónico (Wilkie y Woo, 1977). En la figura 1.1.1 se muestra la estructura típica de los xilanos de maderas duras. En los xilanos de maderas blandas, el esqueleto del polímero es idéntico al de maderas duras, pero los sustituyentes son los grupos 4-O-metilglucurónico unidos por enlaces α -1,2 y restos de arabinosa por enlaces α -1,3 (Figura 1.1.2). Los glucomananos son otro tipo de hemicelulosas que se pueden encontrar, tanto en maderas duras como blandas, cuyas unidades de glucosa y manosa se unen por enlaces β -1,4 (Timell, 1967). Los glucomananos de maderas duras no presentan ramificaciones ni sustituyentes laterales (Figura 1.1.3). Los glucomananos de maderas blandas son el componente mayoritario de las hemicelulosas, son más ricos en manosa que los de madera dura y poseen sustituyentes de dos tipos. Uno de ellos lo constituyen grupos O-acetil unidos por enlaces éster a las posiciones 2 y 3 del esqueleto del azúcar. El otro tipo lo comprenden moléculas de galactosa unidas por enlaces α -1,6, por lo que estos glucomananos se denominan galacto-glucomananos (Figura 1.1.4).

El tercer grupo de polisacáridos de la pared celular son Las sustancias pécticas, las que están formadas por un esqueleto de unidades de ácido galacturónico (GALA) unida por enlaces β -1,4. La cadena de ácido poligalacturónico (PGA) está interrumpida por residuos de ramnosa unidos por enlaces β -1,2. Estos residuos de ramnosa suelen tener unidas largas cadenas laterales de L-arabinosa y D-galactosa.

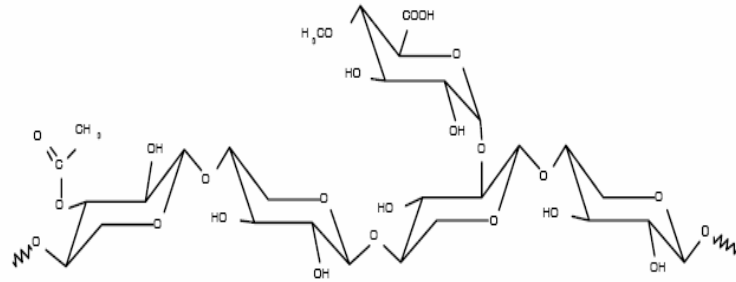


Figura 1.1.1. Estructura del O-acetil-4-O-metilglucuronoxilano.

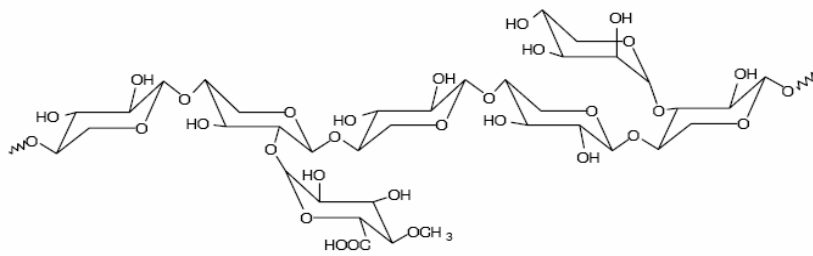


Figura 1.1.2. Estructura del arabino-4-O-metilglucuronoxilano

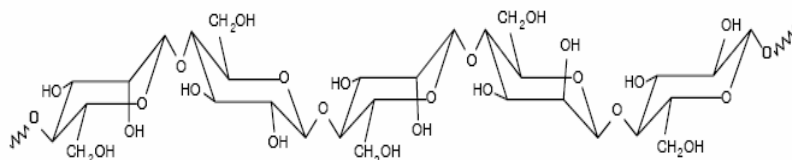


Figura 1.1.3. Estructura del glucomanano.

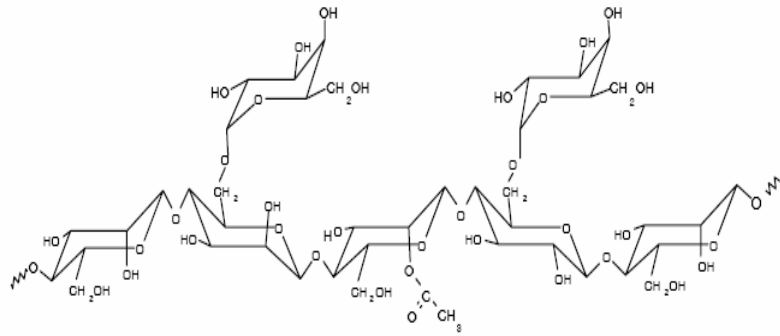


Figura 1.1.4. Estructura del O-acetil-galactoglucanano.

1.2. Xilanasas

Bajo el nombre de β -xilanasas se encuentran todas las enzimas involucradas en la degradación de los xilanos que, dada la heterogeneidad de los mismos son numerosas. Un mecanismo general de acción de las β -xilanasas postula que las endo- β -1,4-D-xilanasas cortan el polímero y los productos de esta hidrólisis son los oligosacáridos de xilosa, que son sustrato de las β -xilosidasas, cuya función es liberar monómeros de xilosa desde sus extremos. Las otras enzimas involucradas en la degradación de los xilanos tienen una acción desramificante, cuya función es escindir las uniones de los sustituyentes de la cadena principal del polímero (Breccia *et al.*, 1998).

En la figura 1.2.1 se esquematiza un sustrato hipotético del xilano y los lugares de corte de las diferentes enzimas xilanolíticas. Se conocen muchos microorganismos que producen distintas hidrolasas del xilano.

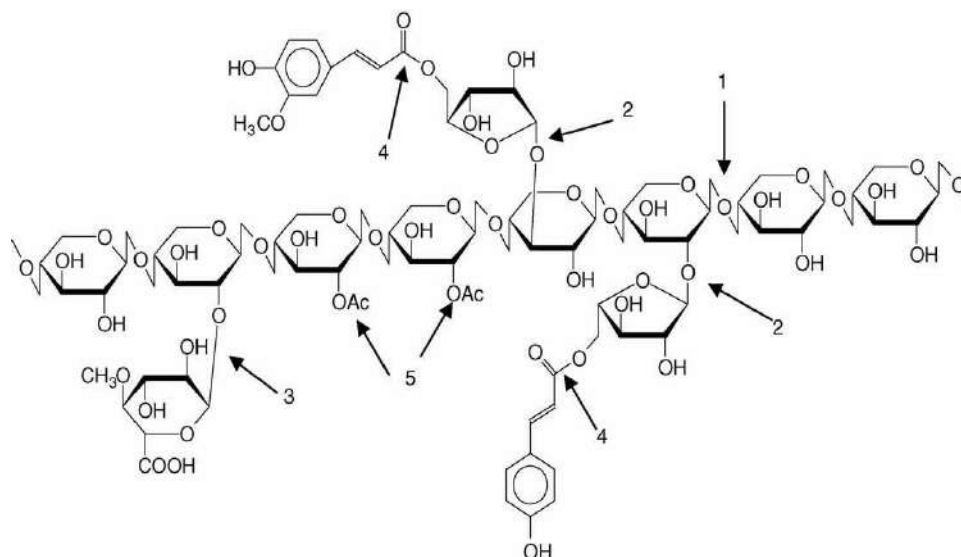


Figura 1.2.1. Esquema de acción de las diferentes enzimas xilanolíticas sobre una hemicelulosa hipotética. 1: endo-xilanasas; 2: α-L-arabinofuranosidasas; 3: α-D-glucuronidasas; 4: feruloil y coumaroil estererasas; 5: acetilesterasas.

La figura 1.2.1 muestra un fragmento de unidades de β-1,4-xilopiranosas, con una variedad de sustitutos ligados a la cadena principal por uniones glucosídicas o éster (Joseleau *et al.*, 1992). Estos sustitutos son principalmente acetato, glucuronato metílico y residuos de la L-arabinofuranosa, y la cantidad de cada uno depende de la fuente del xilano (Gregory *et al.*, 1998). La biodegradación del xilano requiere así un sistema de estererasas y de glicanasas. Estas enzimas son producidas por bacterias y hongos y son generalmente extracelulares (Sunna y Antranikian, 1997).

1.2.1. Aplicaciones de xilanasas

1) En la industria papelera la hemicelulosa y la lignina son los principales desechos biológicos. Una fracción de los mismos coprecipita junto a las fibras de celulosa después del proceso de Kraft (calentamiento de madera molida en hidróxido de sodio, para separar la lignina de la celulosa (Stanley, 1996)). La producción de residuos halogenados como consecuencia del blanqueo de la pulpa de Kraft con compuestos clorados ha sido la principal causa de investigación en busca de métodos alternativos para obtener pulpa de celulosa de alta calidad sin la co-producción de compuestos tóxicos. Viikari *et al.* (1986), introdujeron la idea del uso de xilanasas para el pre-blanqueo de la pulpa de Kraft. Desde 1989 han sido descritos, con éxito, ensayos en industrias usando xilanasas para blanquear la pulpa de Kraft. Es importante que las

preparaciones de β -xilanasas no contengan celulasas debido a que la presencia de éstas disminuye la viscosidad, cantidad y calidad de la pulpa (Breccia *et al.*, 1997).

2) En panadería, el agregado de β -1,4-D-xilanasas a la masa, genera un aumento del volumen específico de los panes, sin tener un efecto negativo sobre la maleabilidad de la masa. Esta práctica tiene mayor frecuencia cuando se usan harinas de trigo de baja calidad (Maat *et al.*, 1992). En la industria de la panificación las xilanasas, especialmente la endo-1,4- β -xilanasas, se adicionan a la masa para mejorar su calidad, obteniéndose productos de panadería con mejor textura y sabor. El efecto de las xilanasas es incrementar el volumen específico de los panes, sin provocar un efecto colateral negativo en el manejo de la masa. Este efecto sobre el mejoramiento del volumen del pan puede atribuirse a la distribución de agua de la fase del pentosano presente hacia la del gluten, resultando eventualmente en un mejor horneado (Maat *et al.*, 1992). Asimismo, se ha publicado recientemente que las arabinasas, β -L-arabinofuranosidasas y esterases juegan un papel importante en la textura, calidad y propiedades sensoriales de los productos de panificación (Poutanen, 1997).

3) En la crianza de pollos para asar alimentados con centeno, la velocidad de ganancia de peso y eficiencia de conversión del alimento, se ven reducidas comparado con el trigo. Esto es debido a un incremento de la viscosidad del alimento en el intestino, lo que afecta al movimiento de nutrientes y disminuye la asimilación de los mismos. El aumento de la viscosidad esta relacionado a arabinoxilanos que se encuentran en el endosperma del grano de centeno. Preparaciones enzimáticas, capaces de degradar a los arabinoxilanos, adicionadas a las dietas de los pollos, producen un incremento de la velocidad de ganancia de peso y de la eficiencia de conversión del alimento (Bedford y Clasen, 1992).

1.3. Alimentos funcionales

Los alimentos funcionales son aquellos que contienen ingredientes activos, los cuales benefician a una o un numero de funciones en el cuerpo proporcionando bienestar y salud, disminuyendo el riesgo de contraer ciertas enfermedades (Roberfroid, 2000) o también se puede definir como aquel alimento que tiene un efecto fisiológico mas allá de su efecto nutricional (Clydesdale, 1997).

Los probióticos son claros constituyentes de alimentos funcionales los cuales pueden modificar positivamente la acción de un determinado alimento, por ejemplo inhibiendo la colonización intestinal por bacterias patógenas y los prebióticos que pueden definirse como compuestos que favorecen la selección en la flora intestinal de los probióticos y bacterias del ácido láctico en desmedro de los microorganismos patógenos (Salminen *et al.*, 1998).

1.3.1. Oligosacáridos

Los oligosacáridos son constituyentes naturales de alimentos de origen vegetal (cebollas, ajo, tomate, raíces de espárragos, azúcar moreno, plátanos, cebada, trigo, centeno), miel, y de la leche de varias especies animales. El término oligosacáridos incluye un grupo de carbohidratos que consisten de 2 a 10 unidades de azúcares monoméricos, y se distinguen según la identidad de estos monómeros, según el tipo de unión entre ellos, según el tipo de estructura de la cadena (lineal o ramificada) y según sus uniones a otras estructuras no hidrocarbonadas (conjugados). Los mejor conocidos y caracterizados son los oligosacáridos de la serie de la rafinosa, los fructo-oligosacáridos (FOS) y los xilo-oligosacáridos (XOS). Los xilo-oligosacáridos (XOS) también han mostrado su selectividad para el crecimiento de bifidobacterias, y también mediante la utilización de xilanasas en la alimentación animal en dietas a base de trigo, además de una disminución de la viscosidad intestinal, se generan oligosacáridos bioactivos que facilitan el crecimiento de la microflora benéfica (Vázquez *et al.*, 2002).

1.3.2. Características de metabolismo de los oligosacáridos

En el intestino delgado los oligosacáridos son resistentes a la acción de las enzimas intestinales y pancreáticas. A nivel del intestino delgado ejercen un efecto osmótico por su capacidad de retención de agua, en el intestino grueso son fermentados por las bacterias anaerobias que componen la flora intestinal. En contraste a estos oligosacáridos, la sacarosa, glucosa o maltosa, son digeridos y/o absorbidos en el intestino delgado y no tienen efecto sobre la microflora intestinal al no alcanzar el intestino grueso (Prosky, 1999). Como consecuencia, la microflora intestinal cambia, es decir, el porcentaje de bacterias beneficiosas

___Introducción

como *Bifidobacterias* y *Lactobacillus* aumentan y el porcentaje de microorganismos perjudiciales como *Clostridium*, disminuye (Benno *et al.*, 1987).

Se demostró que los oligosacáridos inhiben la producción de productos tóxicos (amoníaco, aminas, nitrosaminas, fenoles, cresoles, indol, escatol, ácidos biliares secundarios, estrógenos, agliconas) por parte de la microflora intestinal y aumentan la absorción de Calcio, Magnesio, Fósforo y Hierro (Ohta *et al.*, 1995). Además, disminuyen el estreñimiento, mejoran el perfil lipídico de la sangre (Tomomatsu, 1994).

2. OBJETIVOS E HIPOTESIS DEL TRABAJO

2.1. Optimizar los parámetros fisicoquímicos para una biotransformación de biopolímeros.

2.2. Seleccionar un subproducto agrícola para la obtención por vía enzimática de una solución enriquecida de xilo-oligosacáridos.

2.3. Como hipótesis principal a probar a través de este trabajo, se plantea que un material lignocelulósico es un buen sustrato para obtener, por acción enzimática, un producto de biotransformación rico en xilo-oligosacáridos. Como hipótesis secundaria, se plantea que sustratos con una mayor concentración inicial de oligosacáridos condicionan una menor actividad de xilanasas.

3. MATERIALES Y METODOS

3.1. Instrumental y equipos

Las medidas de pH se llevaron a cabo con un pHímetro Orion modelo 920A.

Las medidas de masa fueron realizadas en balanza analítica Adventurer™ OHAUS.

Las centrifugaciones se llevaron a cabo en microcentrifuga ECyS.

Las medidas de absorbancia fueron realizadas en un espectrofotómetro OceanOptics USB4000.

3.2. Caracterización del catalizador: xilanasa Buzyme 2511®

Las actividades polisacaridasas se determinaron por cuantificación de los azúcares reductores liberados a partir de los siguientes sustratos: xilano de abeto (Sigma, USA), pectina de manzana (Sigma, USA), celulosa macrocristalina (Parafarm, Argentina) y carboximetilcelulosa de baja viscosidad (Sigma, USA), a través de la reducción del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) (Miller, 1959). La determinación se realizó con muestras de 50 µl, incubadas con 450 µl de una solución de 10 g/l de los respectivos sustratos en 50 mM buffer fosfato de sodio, pH 6, durante 30 min a 50°C. La reacción se detuvo por el agregado de 500 µl de una solución de DNS (20 g de DNS disueltos en 700 ml de 1M NaOH y luego llevado a 1L con agua destilada). Las muestras se sometieron a 100°C durante 10 min, luego de enfriarse a 5°C se midió la absorbancia a 540 nm.

Las actividades ramnosidasa, glucosidasa, manosidasa, galactosidasa y xilosidasa se determinaron utilizando los correspondientes p-nitrofenil derivados (Romero et al., 1985). La incubación se realizó en buffer 40 mM fosfato de sodio (pH 7) a 38°C.

Una unidad se define como la liberación de 1 µmol de azúcares desde los respectivos sustratos por minuto. Todas las determinaciones se realizaron en condiciones de velocidad inicial.

3.3. Medición de proteínas

La medición de proteínas se hizo sobre el sustrato xilano de abeto con el método de Bradford (1976), utilizando como estándar lizosima de huevo.

3.4. Preparación de los materiales poliméricos

Los subproductos agrícola: tallo de álamo (*Populus alba*), tallo de caña de castilla (*Arundo donax*), orujo de uva (*Vitis vinifera*), orujo de manzana (*Malus domestica*), escobajo de uva (*Vitis vinifera*) se secaron a 105°C durante 48 horas y luego se sometieron a una molienda con molino de café durante 5 minutos, logrando un polvo medianamente fino para su posterior utilización en los estudios de biocatálisis.

3.5. Preparación del sustrato e hidrólisis enzimática

Se resuspendieron 5 g de cada material en 100 ml de buffer fosfato de sodio 50 mM pH 6, luego se agregó 1 ml de solución de xilanasa Buzyme 2511[®] y se llevó a agitador rotatorio de 250 rpm con 2.5 cm de excentricidad a 30°C durante 27 horas. Se midieron azúcares reductores (como xilosa) en el sobrenadante por la técnica del ácido 3,5-dinitrosalicílico a 540 nm (Miller, 1959).

3.6. Determinación del pH óptimo de la biotransformación

Utilizando hemicelulosa del orujo de manzana como sustrato a los siguientes valores de pH: 4.5 y 5 con 50 mM buffer ácido cítrico/citrato de sodio; pH: 6, 7 y 8 con 50 mM buffer fosfato de sodio y se midió la liberación de azúcares reductores luego de una incubación de 90 min a 28 °C.

3.7. Determinación de la temperatura óptima de la biotransformación

La determinación de la temperatura óptima se realizó utilizando hemicelulosa de manzana como sustrato a pH 6 (50 mM buffer fosfato de sodio), el tiempo de reacción fue de 1 h y luego se cuantificaron los azúcares reductores liberados.

3.8. Efecto de la agitación y el tiempo sobre el proceso

Se realizó la biotransformación con agitación (10 rpm Agitador Vicking modelo Dubnoff) y en forma estática a 50°C. Se tomaron alícuotas a diferentes tiempos y se midió la liberación de azúcares reductores en el sobrenadante por la técnica de ácido 3,5-dinitrosalicílico.

3.9. Determinación del contenido de hemicelulosa en los diferentes materiales

Se resuspendieron 5 g de cada muestra en 100 ml de hidróxido de sodio 0.1 M. Se sometió a 121°C durante una hora en autoclave, para la solubilización de la fracción hemicelulosa. Se precipitaron 750 µl de sobrenadante con 750 µl de etanol 96°, se dejó precipitar durante 48 h a 5°C y luego se centrifugó (10000 rpm, 10 min) y se descartó el sobrenadante. El precipitado considerado como la fracción hemicelulósica del material, se secó durante 96 h a 105°C y se cuantificó gravimétricamente (Breccia et al., 1995).

3.10. Solubilización termo-alkalina e hidrólisis enzimática

Se resuspendieron 5 g de cada muestra en 100 ml de hidróxido de sodio 0.1 M, pH 13, se sometió a 121°C durante una hora, para la solubilización de la fracción hemicelulosa. Luego se neutralizó con ácido clorhídrico 0.1 M, hasta pH 6.8-7, se agregó 5 ml de buffer fosfato de sodio 1 M, pH 6, luego se adicionó 1 ml de solución de xilanasa Buzyme 2511® y se incubó a 50°C por 96 h. Se tomó una muestra de 1 ml, se centrifugó y se midieron azúcares reductores (como xilosa) en el sobrenadante por la técnica del ácido 3,5-dinitrosalicílico (Miller, 1959).

3.11. Determinación de los productos de la hidrólisis enzimática

Se realizó una hidrólisis incubando la enzima comercial xilanasa con xilano de abeto (Sigma, USA), escobajo de uva como sustrato en 50 mM buffer fosfato de sodio (pH 6) a 50°C, luego del tratamiento termo-alkalino (0.1M NaOH-121°C por 1h) se precipitaron 750 µl de sobrenadante con 750 µl de etanol 96°, se dejó decantar durante 24 h a 5°C y luego se centrifugó (10000 rpm, 10 min) y se descartó el sobrenadante. El precipitado se secó durante 24 h a 105°C y se cuantificó gravimétricamente. Con el residuo hemicelulósico se realizó una solución al 1% (P/V). Los productos de dicha reacción fueron sometidos a un análisis cromatográfico en capa fina de silicagel 60W (Merck). La fase móvil utilizada fue acetato de etilo:isopropanol:agua (6:4:4) y se reveló con reactivo de antrona (Witham et al., 1971).

Las cromatografías fueron analizadas a partir de densitogramas generados con el programa ImageJ versión 1.38 (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>).

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Actividades enzimáticas presentes en la preparación de xilanasa comercial Buzyme 2511[®]

La xilanasa Buzyme 2511[®] no es una enzima pura, sino una preparación enzimática comercial de xilanasa cuyo principal uso es el blanqueo de la pasta de celulosa, por lo que se realizó una búsqueda de las actividades enzimáticas que integran la misma y así relevar que tipo de glicosidasas se utilizaría en los procesos de biocatálisis.

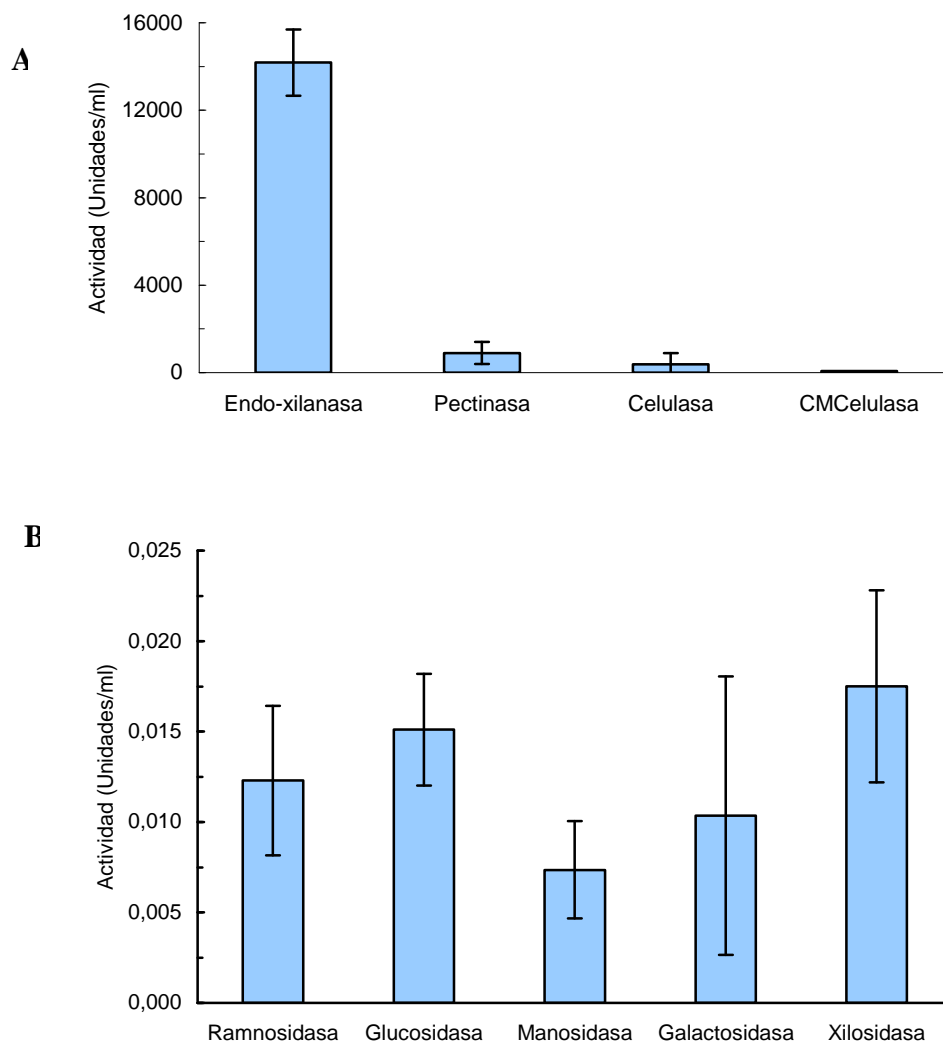


Figura 4.1.1. Actividades enzimáticas presentes en la xilanasa comercial Buzyme 2511[®].

ados y discusión

La actividad mayoritaria de la preparación fue la endo- β -1,4-xilanasa aunque se pueden detectar pequeñas cantidades de otras enzimas depolimerizantes como pectina hidrolasa y β -1,4-glucanasa (Figura 4.1.1.A). En la figura 4.1.1.B se pueden observar niveles muy bajos de actividades las otras glicosidasas que componen los complejos hidrolíticos microbianos. La alta actividad endo- β -1,4-xilanasa (14180 ± 1513 U/ml) y la alta actividad específica de 86.4 Unidades/mg (la actividad específica es el número de unidades de enzima por miligramo de proteína, una unidad enzimática se define como la cantidad de enzima que origina la transformación de una unidad de sustrato por minuto que presentó el preparado), indicaría que este preparado enzimático podría ser eficiente para la hidrólisis de subproductos agrícolas ricos en hemicelulosas.

4.2. Hidrólisis enzimática de los subproductos agropecuarios

Los subproductos agropecuarios que se listan en la figura 4.2.1 fueron seleccionados por su abundancia, bajos costos, y con la idea de poder establecer un fin útil para los mismos a través de un proceso de biotransformación. La hidrólisis enzimática de dichos materiales previamente molidos, se llevó a cabo con el agregado de xilanasa comercial Buzyme 2511[®], en agitador rotatorio a 30°C (Figura 4.2.1).

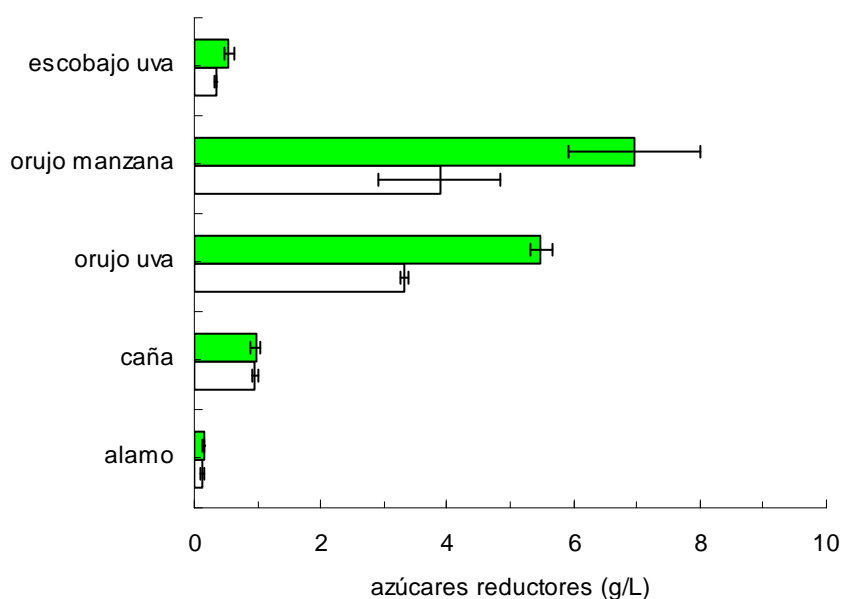


Figura 4.2.1 Concentración de azúcares reductores (xilosa) en g/l, a □ 0 h y ■ 27 h de hidrólisis.

Las muestras con mayor concentración de azúcares reductores iniciales fueron los orujos de manzana y uva. Considerando que los monosacáridos y oligosacáridos están descritos como inhibidores de glicosidasas (Pérez *et al.*, 2007), con dichos sustratos se esperaba a priori una menor actividad de xilanasas. Contrariamente a esta hipótesis aquellos dos sustratos fueron los que mostraron la mayor liberación de azúcares reductores, a niveles de 3.1 y 2.2 g/l respectivamente (Figura 4.2.1). Aunque la biomasa de azúcares liberados fue relativamente baja, la mayor actividad obtenida con los orujos se puede explicar por el grado de hidrólisis previa de estos materiales, donde probablemente el xilano se encuentra más expuesto para la biocatálisis respecto a los otros materiales donde los complejos poliméricos se encuentran en su estado natural, y por lo tanto menos accesibles a la hidrólisis enzimática.

4.3. Optimización de los parámetros físico-químicos del proceso de biocatálisis

Con los resultados previos se seleccionó el orujo de manzana como sustrato para optimizar los parámetros físico-químicos de la biocatálisis. Se midió la actividad enzimática a diferentes valores de pH (Figura 4.3.1). Se puede observar que la actividad tiene un óptimo a pH 6 y muestra un alto porcentaje (75%) de actividad a pH 5.

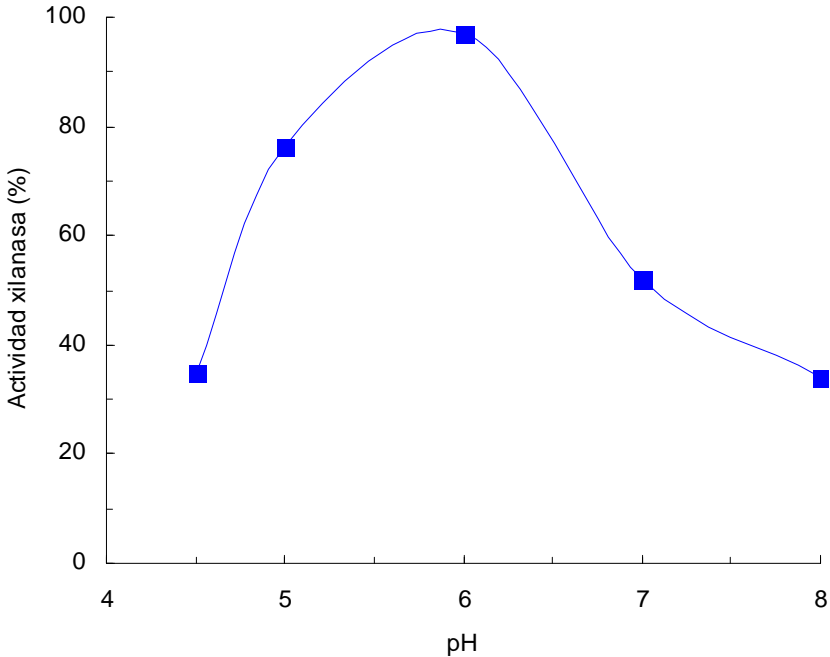


Figura 4.3.1. Actividad xilanasasa a diferentes valores de pH, con orujo de manzana como sustrato.

La determinación de la temperatura óptima del proceso se realizó midiendo la actividad a pH 6 durante 1 h a diferentes temperaturas. En la figura 4.3.2, donde se observa la mayor hidrólisis a una temperatura de 50°C con una abrupta caída a mayores temperaturas obteniendo un valor menor al 50% de hidrólisis a 60°C.

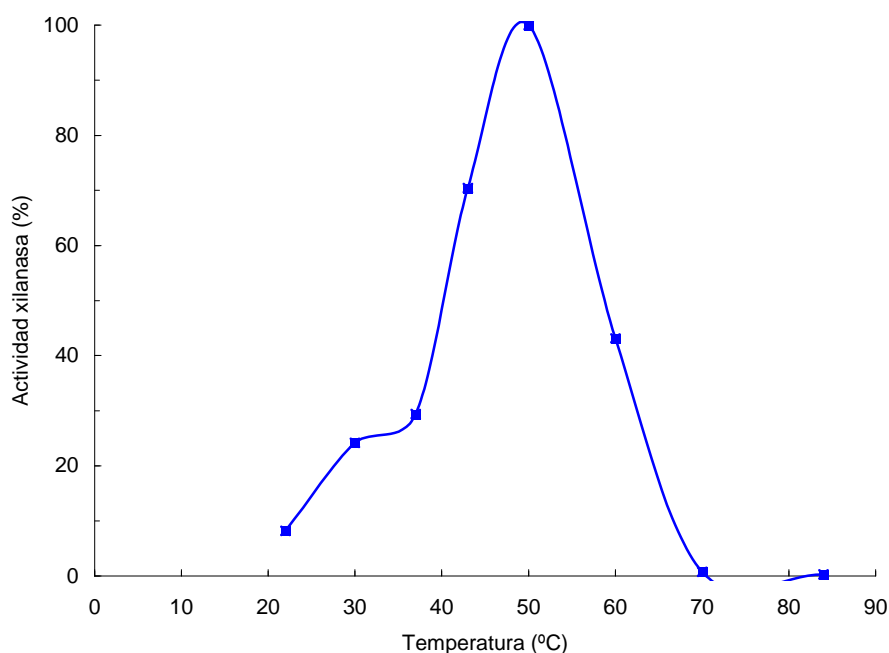


Figura 4.3.2. Efecto de la temperatura sobre la actividad xilanasa utilizando orujo de manzana como sustrato a pH 6.

Los valores de pH óptimo 6 y temperatura óptima 50°C coinciden con los valores encontrados para una xilanasa extracelular producida por el hongo *Fusarium verticillioides* (NRRL 26518) (Saha, 2005).

Debido a que el sustrato tiene una fracción insoluble importante que condiciona una catálisis heterogénea, otro parámetro del sistema que se evaluó fue la influencia de la agitación sobre el proceso de hidrólisis. El efecto de la agitación sobre otros procesos de catálisis heterogénea con lipasas y proteasas sobre fibras de poliamida, resultaron en incrementos de 5 veces superiores respecto al control no agitado (Silva *et al.*, 2007). En este trabajo, no se encontraron diferencias significativas al incluir el efecto de la agitación sobre la hidrólisis enzimática del orujo a pH 6 y 50°C (Figuras 4.3.3.A. y 4.3.3.B). En la figura 4.3.3.B se puede observar que las velocidades iniciales de producción de azúcares reductores fueron prácticamente iguales en

ados y discusión

ambas condiciones. La reacción fue lineal hasta las 6 h de proceso, luego se estabiliza en un plateau y a las 20 h se ve una disminución de la producción de azúcares reductores que podría deberse al crecimiento de algún microorganismo en el caldo de la biotransformación. Este no es un caso aislado de biotransformación con problemas de contaminación microbiana, existen descritos en la literatura varios ejemplos de este fenómeno (Solle *et al.*, 2004).

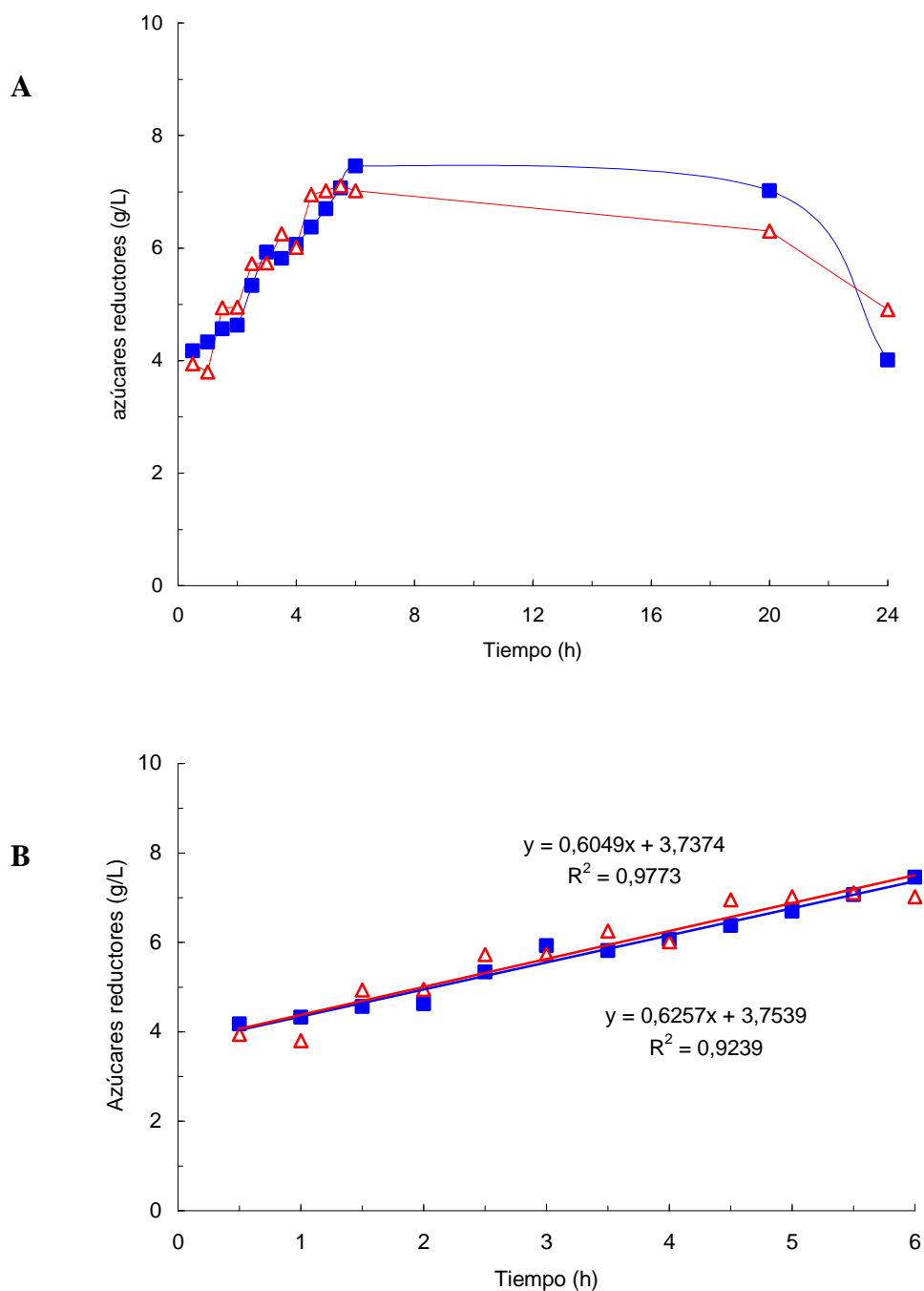


Figura 4.3.3. Efecto de la agitación sobre la hidrólisis enzimática del orujo de manzana (■ agitación, △ control). A. actividad en función del tiempo en ambas condiciones. B. fracción lineal de la biotransformación.

Por otro lado, perfiles de hidrólisis similares con disminuciones del rendimiento luego de las 20 h, fueron descriptos para una preparación enzimática cruda de *B. licheniformes* E-44, aunque la disminución fue atribuida a la inhibición de los biocatalizadores por mono y oligosacáridos (Pérez *et al.*, 2007).

4.4. Extracción de hemicelulosa del orujo de manzana.

Los xilanos, por definición, son los polímeros que se solubilizan a altos valores de pH. En la literatura científica, diferentes autores describieron la necesidad de exponer los biopolímeros a un tratamiento térmico y/o alcalino previo al tratamiento enzimático para aumentar la eficiencia del proceso de hidrólisis (Dien *et al.*, 2005). Por ello, se realizaron ensayos tendientes a hallar la concentración de NaOH óptima para la solubilización de la hemicelulosa del orujo de manzana (Figura 4.4.1). Se observa que en el rango de 0.1 a 1.5 M NaOH las diferencias de la biomasa solubilizada no fueron significativas. Por lo tanto, se seleccionó para el proceso la concentración menor de NaOH (0.1M), en virtud del ahorro de volúmenes de neutralizante (HCl) y la disminución de los volúmenes de trabajo.

En un trabajo similar realizado por Dien *et al.* (2005), donde la sacarificación enzimática de fibras de maíz se realizó tras un tratamiento con vapor de agua a 160°C por 20 minutos, los rendimientos obtenidos fueron superiores a los del orujo de manzana. El agregado de ácido sulfúrico diluido, pH=1-1.5 (Dien *et al.*, 2005), incrementaron aun más el rendimiento de azúcares reductores. Sin embargo, estos resultados no son comparables a los nuestros, dado que un medio ácido para la solubilización de xilanos trae aparejado la degradación parcial de los mismos. Como en este trabajo no se contó con el instrumental para alcanzar tales condiciones de temperatura, y ya que el objetivo perseguido fue desarrollar un método para solubilizar las hemicelulosas y someterlas a la acción enzimática, se aplicó un tratamiento térmico-alcalino a todos los materiales estudiados.

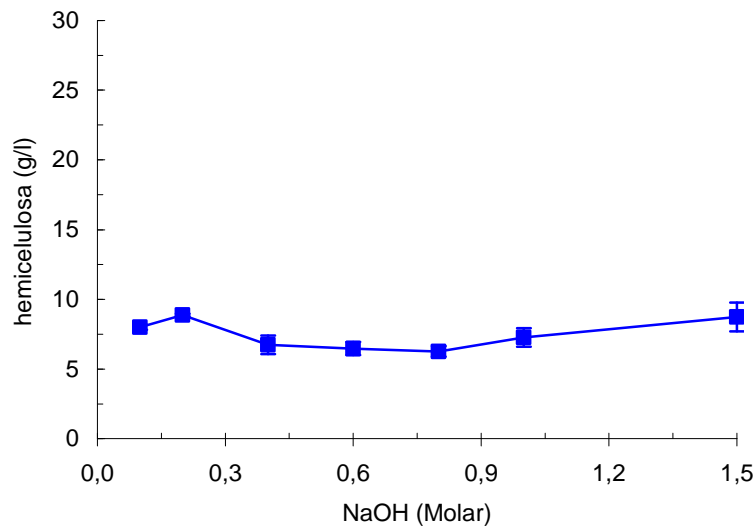


Figura 4.4.1. Hemicelulosa de orujo de manzana solubilizada a diferentes concentraciones de NaOH luego de un tratamiento térmico de 1 h a 121°C.

4.5. Tratamiento térmico-alkalino e hidrólisis enzimática de los subproductos agropecuarios

Los subproductos agropecuarios fueron procesados en condiciones de alta temperatura y en condiciones alcalinas (0.1M NaOH, 121°C, 1h) y luego se los sometió a una hidrólisis enzimática con xilanasa comercial Buzyme 2511[®] (Figura 4.5.1).

Se encontró un aumento significativo para todos los materiales respecto al tratamiento mecánico-enzimático (Figura 4.2.1). Se alcanzó los 11.5 g/l de azúcares reductores para el orujo de manzana aunque el valor de azúcares iniciales fue también relativamente alto (8.2 g/l). Así, la producción porcentual dada específicamente por la biocatálisis fue inferior respecto a la encontrada para otros materiales (caña, álamo y escobajo de uva) que mostraron incrementos significativos respecto al sustrato inicial.

El escobajo de uva mostró la mayor diferencia dada por el tratamiento enzimático, se obtuvo por el tratamiento térmico-alkalino un sustrato con 4.9 g/l de azúcares reductores y 5.0 g/l fueron el producto de la hidrólisis enzimática, llegando a una solución final azúcares reductores de 9.9 g/l (Figura 4.5.1).

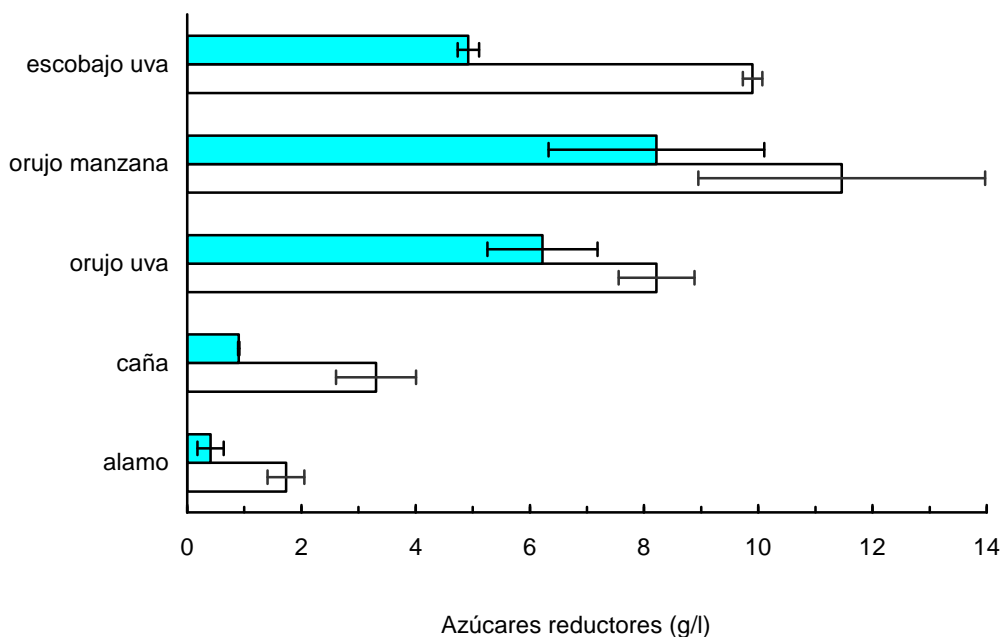


Figura 4.5.1. Concentración de azúcares reductores (xilosa) en g/l, liberados desde los diferentes materiales por el tratamiento térmico-alkalino (■) y luego del proceso de hidrólisis enzimática a pH 6 y 50°C (□).

4.6. Caracterización parcial de los productos de reacción de la xilanasa Buzyme 2511®

Con el objetivo de caracterizar los productos de reacción dados por la actividad xilanas Buzyme 2511® se realizó la catálisis con xilano de abeto y la fracción hemicelulósica del escobajo de uva como sustratos a pH 6, 50°C durante 6 h. Volúmenes conocidos de la reacción se sometieron a un análisis cromatográfico (Figura 4.6.1). La intensidad dada por los píxeles rojos fue utilizada para generar densitogramas con el programa ImageJ versión 1.38 (Figura 4.6.2). La integración de los densitogramas se utilizó para cuantificar dichos productos, y los resultados expresados con unidades de densidad de intensidad óptica (DIO) se muestran en la tabla 4.1.

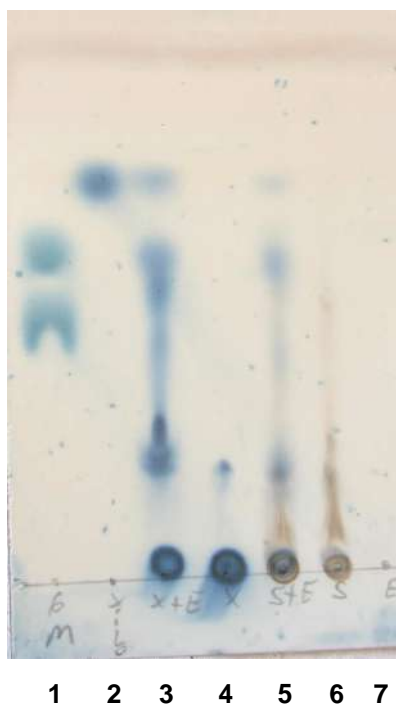


Figura 4.6.1. Cromatografía en capa delgada de los productos de hidrólisis enzimática de xilanasa Buzyme 2511[®]. 1. Estándar de glucosa (superior) y maltosa (inferior), 2. Estándar de xilosa, 3. Xilano tratado con xilanasa, 4. Xilano control con enzima inactivada (10 min–100°C), 5. Escobajo de uva tratado con xilanasa, 6. Escobajo de uva control con enzima inactivada (10 min–100°C), 7. Control enzima sola.

Preparación	xilosa		xilo-oligosacárido		
	DIO	g/l	DIO	g/l (eq. xilosa)	producto de hidrólisis enzimática (g/l)
Patrón Xilosa (50mM)	15111	7,51			
Xilano + E	5256	0,65	79143	19,7	17,8
Xilano + E (inactiva)	ND	ND	7527	1,9	
Escobajo +E	1758	0,15	32050	8,0	4,8
Escobajo + E (inactiva)	ND	ND	12748	3,2	

Tabla 4.1. Análisis de los productos de reacción de xilanasa Buzyme 2511[®] (E). Se analizó los valores de DIO (densidad de intensidad óptica) para cada mancha cromatográfica y se los expreso en g/l de xilosa y g/l xilo-oligosacáridos (equivalentes de xilosa).

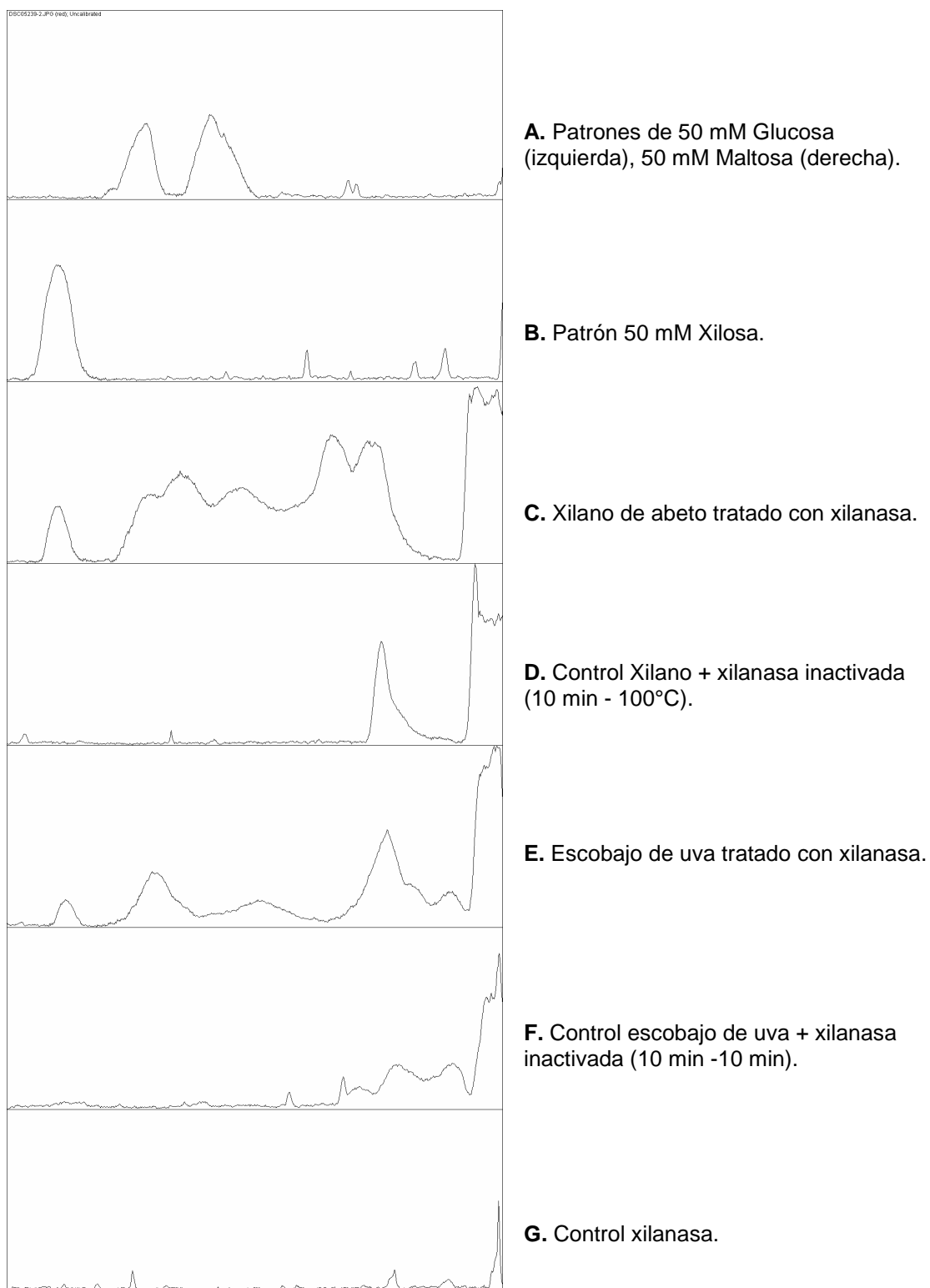


Figura 4.6.2 Densitogramas correspondiente a la cromatografía en capa delgada (Figura 4.6.1).

ados y discusión

Se puede observar que la xilosa fue un producto minoritario de hidrólisis con ambos sustratos, 3,5 y 3% respectivamente, indicando claramente que la xilanasa Buzyme 2511[®] es una endo- β -1,4-xilanasa. La mayor cantidad de productos de reacción de la hidrólisis del xilano comercial y del escobajo, 96 – 97% respectivamente, se pueden observar con valores de Rf, para este sistema de solventes, correspondientes a xilo-oligosacáridos (Debeire *et al.*, 1990). Estos resultados son consistentes con los presentados en la sección 4.1 de este trabajo, donde la actividad xilanasa es la predominante sobre las otras glicosidasas ensayadas.

El escobajo de uva, produjo una cantidad importante de azúcares de bajo peso molecular previamente cuantificados como los azúcares reductores contenidos luego del tratamiento térmico-alkalino 4.9 g/l (Figura 4.5.1). No obstante, se detectaron incrementos significativos en la intensidad de manchas ubicadas en la zona de los xilo-oligosacáridos, cuya cuantificación como equivalentes de xilosa, corresponde a un valor similar al obtenido previamente por la medición de azúcares reductores 5.0 y 4.8 g/l respectivamente (Figura 4.5.1 y Tabla 4.1).

Una importante diferencia cuantitativa podemos encontrar entre los xilo-oligosacáridos producidos por el xilano de abeto y la fracción hemicelulósica de escobajo de uva, (17,8 y 4,8 g/l respectivamente). El hecho de que estos catalizadores son inhibidos por mono y oligosacáridos (Orillo, 2007) y la fracción hemicelulósica del escobajo contiene 4.9 g/l de azúcares reductores, podría explicar el menor rendimiento obtenido.

Si bien no se logró identificar los xilo-oligosacáridos producidos, la comparación de los Rf con los descriptos en la literatura sugieren que se obtuvo como resultado del proceso de biocatálisis, una solución enriquecida de xilobiosa y otros xilo-oligosacáridos de cadena corta de 3 y 4 unidades de xilosa.

5. CONCLUSIONES

En cuanto a los parámetros del proceso se puede concluir que la preparación comercial Buzyme 2511[®] tiene como actividad mayoritaria la endo- β -1,4-xilanasas (14180 Unidades/ml), mientras que otras actividades glicosidasas ensayadas fueron minoritarias. El proceso de catálisis presenta un pH óptimo de 6.0 y una temperatura óptima de 50 °C, mientras que la agitación es una variable no tiene ningún efecto sobre la biotransformación.

El resultado del proceso de biocatálisis del subproducto agro-industrial, escobajo de uva, entre el tratamiento termo-alcálico y la hidrólisis con endo- β -1,4-xilanasas generó un producto de 9.9 g/l de azúcares reductores, donde 4.9 g/l fueron aportados por el primer paso y los 5.0 g/l restantes fueron aportados por solo 6 h de biocatálisis. Esto nos permite concluir que el producto de la biotransformación es una solución enriquecida en xilo-oligosacáridos que podrían ser incorporados como aditivos (prebióticos) en alimentos funcionales. Así, este proceso podría ser un punto de partida para dar valor agregado a un subproducto agroindustrial de muy bajo o nulo valor comercial.

ABREVIATURAS

α : alfa

β : beta

$^{\circ}\text{C}$: grado centígrado

μl : microlitro

μmol : micromol

$\mu\text{kat/mg}$: microcatal por mililitro

$^{\circ}$: marca registrada

cm: centímetros

CMC: carboximetilcelulosa

DNS: ácido 3,5-Dinitrosalícilico

FCEyN: Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

g: gramos

GALA: ácido galacturónico

g/l: gramos por litro

h: horas

HCl: ácido clorhídrico

IDO: intensidad de densidad óptica

L: litros

M: molar

min: minutos

ml: mililitros

mM: milimolar

mg/l: miligramo por litro

NaCl: cloruro de sodio

NaOH: hidróxido de sodio

nm: manómetro

PGA: ácido poligalacturónico

P_v : peso en volumen

R^2 : coeficiente de regresión

rpm: revoluciones por minuto

s: segundos

REFERENCIAS

Aspinall GO. 1980. Chemistry of cell wall polysaccharides. The biochemistry of plants. Academic Press. Inc. New York. N.Y. 473-500.

Bedford MR y Classen HL. 1992. The influence of dietary xylanase on intestinal viscosity and molecular weight distribution of carbohydrates in rye-fed broiler chicks. Progress in Biotechnology 7. Xylans and xylanases. Ed. Visser J, Beldman G, Kusters-van Someren MA and Voragen AGJ. Elsevier Science, Amsterdam. 361-370.

Benno Y, Endo K, Shiragami N, Sayama K y Mitsuoka T. 1987. Effect of raffinose intake on human fecal microflora *Bifidobacterium*. Am. J. Clin. Nutr.44:59-63.

Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantization of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. Anal. Chem. 72:248-252.

Breccia JD, Baigori MD, Castro GR, Siñeriz F y Hatti-Kaul R. 1998. Purification and characterization of thermostable xylanase from *Bacillus amyloliquefaciens*. Enzyme Microbiology Technology. 21:42-49.

Breccia JD, Bettucci L, Piaggio M y Siñeriz F. 1997. Degradation of sugarcane bagasse by several white-rot fungi. Acta Biotechnologica. 17:177-184.

Breccia JD, Castro GR y Siñeriz F. 1995. Screening of xylanolytic bacteria using a colour plate method. J. Appl. Bacteriol. 78:469-472.

Clydesdale F. 1997. A proposal for the establishment of scientific criteria for health claims for functional food. Nutrition Review. 55: 413-422.

Darvill A, McNeil M, Albersheim P y Delmer DP. 1980. The primary walls of flowering plants. The biochemistry of plants. New York: Academic Press. 91-162.

Referencias

Debeire P, Priem B, Strecker G y Vignon M. 1990. Purification and properties of an endo-1,4-xylanase excreted by a hydrolytic thermophilic anaerobe, *Clostridium thermolacticum*. A proposal for its action mechanism on larchwood 4-O-methylglucuronoxylan .J. Biochem.187:573-580.

Dey PM y Brinson K. 1984. Plant cell wall. Adv. Carbohydr. Chem. and Biochem. 42:265-269.

Dien BS, Li X, Iten LB, Jordan DB, Nichols NN, O'Bryan JP y Cotta MA. 2006. Enzymatic saccharification of hot-water pretreated corn fiber for production of monosaccharides. Enzyme Microbial Technology. 39:1137-1144.

Gregory ACE, O'Connell APO y Boldwell P. 1998. Xylans. Biotechnol. Genet. Eng. Rev. 15:439-455.

Joseleau JP, Comptat J y Ruel K. 1992. Chemical structure of xylans and their interaction in the plant cell walls. Xylans and Xylanases. Ed. Visser J, Beldman G, Kusters-Van Someren MA, Voragen AGJ. Elsevier Science, Amsterdam. 1-15.

Maat J, Roza M, Verbakel J, Stam H, Santos da Silva Mj, Bosse M, Egmond M y Hagemans M. 1992. Xylanase and their application in bakery. Progress in Biotechnology 7. Xylans and Xylanase. Ed. Visser J, Beldman G, Kusters-van Someren MA, Voragen AGJ. Elsevier Science, Amsterdam. 349-360.

McNeil M, Darvill AG, Fry SC y Albersheim P. 1984. Structure and function of the primary cell walls of plants. Annu. Rev. Biochem. 53:625-663.

Miller GL. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. Anal. Chem. 31:426-428.

Ohta A, Ohtsuki M, Baba S, Takuzawa T, Adachi T y Kimura S. 1995. Effects of fructooligosaccharides on the absorption of iron, calcium and magnesium in iron-deficient anemic rats. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* 41: 281-291.

Orillo AG, Ledesma P, Delgado OD, Spagna G y Breccia JD. 2007. Cold-active α -L-rhamnosidase from psychrotolerant bacteria isolated from a sub-Antarctic ecosystem. *Enzyme and Microbial Technology.* 40:236-241.

Pérez M, Piad R, Milian G, Felipe MdG, Ferreira A, Maciel de Mancilha I, Lauréncio M y de Almeida e Silva JB. 2007. Preparation of a crude enzymatic from *Bacillus licheniformes* E-44 and its evaluation in the hydrolysis of *Saccharomyces cerevisiae* cell walls. *Enzyme and Microbial Technology.* 40:452-455

Poutanen K. 1997. Enzymes: an important tool in the improvement of the quality of cereal food. *Trends in Food Science Technology.* 8:300-306.

Prosky L. 1999. Inulin and oligofructose are part of the dietary fiber complex. *J. Assoc. Off. Anal. Chem. Int.* 82:223-226.

Roberfroid MB. 2000. Concepts and strategy of functional food science. The European perspective. *Am. J. Clin. Nutr.* 71:1669-1664.

Romero C, Manjon A, Bastida J y Iborra JL. 1985. A method for assaying the rhamnosidase activity of naringinase. *Anal. Biochem.* 149:566-571.

Saha BC. 2005. Enzymatic saccharification of complex heteroxylan in corn fiber. *Proceedings of the United States-Japan Cooperative Program in Natural Resources.* 184-190.

Salminen S, Bouley C, Boutron-Ruanult MC, Cummings J y Franck A. 1998. Functional food science and gastrointestinal physiology and function. *British Journal of Nutrition.* 80:147-171.

Selvendran RR. 1985. Developments in the chemistry and biochemistry of pectic and hemicellulosic polymers. *J. Cell. Sci.* 2:51-88.

Silva C, Araújo R, Casal M, Gübitz GM y Cavaco-Paulo A. 2007. Influence of mechanical agitation on cutinases and protease activity towards polyamide substrates. *Enzyme and Microbial Technology.* 40:1678-1685.

Solle D, Faurie R, Breccia J, Scheper T y Hitzmann B. 2004. Modelling of an industrial biotransformation process for tryptophan production. 9th International symposium on computer applications in biotechnology. 28-31.

Stanley A. 1996. The environmental consequences of pulp and paper manufacture. *Friends of the Earth.* www.foe.co.uk.

Sunna A y Antranikian G. 1997. Xylanolytic enzymes from fungi and bacteria. *Crit. Rev. Biotechnol.* 17:39-67.

Timell TE. 1967. Recent progress in the chemistry of wood hemicelluloses. *Wood Sc.Technol.* 1:45-70.

Tomomatsu H. 1994. Health effects of oligosaccharides. *Food. Technology.* 48:61-65.

Van Soest PJ. 1982. *Nutritional Ecology of the Ruminant.* 2nd ed. Ithaca. NY. Comstock, Cornell. University Press. 375-384.

Vázquez MJ, Alonso JL, Domínguez, H y Parajó JC. 2002. Enzymatic processing of crude xylo-oligomer solutions obtained by auto-hydrolysis of *Eucalyptus* wood. *Food Biotechnology.* 16: 91-105.

Referencias

Viikari L, Rauna M, Kantelinen A, Linko M y Sundquist J. 1986. Bleaching with enzymes. Proceedings of the 3rd International Conference on Biotechnology in the Pulp and Paper Industry. Stockholm. 67-69.

Wilkie K y Woo S. 1977. A heteroxylan and hemicellulosic materials from bamboo leaves, and a reconsideration of the general nature of commonly occurring xylans and other hemicelluloses. Carbohydrate Research. 57:145-162.

Witham FH, Blaydes DF y Devlin RM. 1971. Experiments in plant physiology. Van Nostrand Reinhold Company. New York. U.S.A. 245-257.