

Aprovechamiento del olote de maíz mediante la extracción de xilanos y su potencial uso como sustrato para la cuantificación de la actividad enzimática xilanasa

Yamilet Nallely Reyes-Ramírez¹, Tania García-Herrera¹, Enrique Flores-Andrade², Marisol Castillo-Morales² y Rafael Uzárrega-Salazar^{1,*}.

¹ Laboratorio de Bioprocesos y Biotecnología, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Veracruzana, Orizaba, Veracruz, México.

² Laboratorio de Alimentos y Sistemas Agroalimentarios, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Veracruzana, Orizaba, Veracruz, México.

* Autor de correspondencia: ruzarraga@uv.mx

Recibido: 15 de abril de 2021 Aceptado: 10 de mayo de 2021

Resumen: En México, se estima que la cantidad de residuos que se producen por la siembra de los diez principales cultivos es de 45 millones de toneladas de materia seca, aproximadamente, de los cuales poco más de 25 millones de toneladas son de olote de maíz. El olote de maíz contiene grandes cantidades de hemicelulosa, principalmente compuestas por xilanos, los cuales pueden tener diversos usos industriales. Por ello, en el presente estudio se utilizó el olote de maíz, fresco y seco con dos tamaños de partícula: 0.105 mm y 0.42 mm, para realizar una extracción alcalina exhaustiva de xilanos y donde se obtuvieron ocho fracciones de extractos de hemicelulosas. Cada una de las fracciones se sometieron a una hidrólisis enzimática durante ocho horas con una xilanasa comercial (Livanol Devisco 1500) y como control interno se utilizó xilano de beechwood (Sigma Aldrich, X4252), del cual solo se liberaron 6.9 ± 2.25 g/L de azúcares reductores. Se encontró que las fracciones provenientes del tratamiento con vapor y la fracción de la extracción alcalina precipitada con alcohol, ambas para el olote de maíz fresco, se liberó una cantidad de azúcares reductores muy semejante al xilano comercial con 7.10 ± 2.02 y 7.24 ± 0.37 g/L, respectivamente. Finalmente, se logró determinar que, si bien las 8 fracciones obtenidas en el presente estudio pueden ser utilizadas como sustratos para determinar la actividad enzimática xilanasa, la mejor fue la fracción de la extracción alcalina ya que se cuantificaron 0.236 ± 0.03 UI/mL, mientras que para el sustrato comercial (xilano de beechwood) se obtuvo una actividad de 0.287 ± 0.01 UI/mL.

Palabras clave: Residuos agrícolas, extracción alcalina, hemicelulosa, xilanasa, hidrólisis.

Use of corn cob through xylan extraction and its potential use as a substrate for the quantification of xylanase enzymatic activity

Abstract: In Mexico, it is estimated that the amount of residues produced by the planting of the ten main crops is approximately 45 million tons of dry matter, of which just over 25 million tons are corn cob. The corn cob contains large amounts of hemicellulose, mainly composed of xylan, which can have various industrial uses. For this reason, in the present study, fresh and dry corn cob was used with two particle sizes: 0.105 mm and 0.42 mm, to carry out an exhaustive alkaline extraction of xylan and where eight fractions of hemicelluloses extracts were obtained. Each of the fractions were subjected to enzymatic hydrolysis for eight hours with a commercial xylanase (Livanol Devisco 1500) and as internal control, beechwood xylan (Sigma Aldrich, X4252) was used, of which only 6.9 ± 2.25 g/L were released. reducing sugars. It was found that the fractions from the steam treatment and the fraction from the alkaline extraction precipitated with alcohol, both for fresh corn cob, were released a quantity of reducing sugars very similar to commercial xylan with 7.10 ± 2.02 and 7.24 ± 0.37 g/L, respectively. Finally, it was possible to determine that although the 8 fractions obtained in the present study can be used as substrates to determine the xylanase enzymatic activity, the best was the fraction of the alkaline extraction since 0.236 ± 0.03 IU/mL were quantified, while for the commercial substrate (beechwood xylan) an activity of 0.287 ± 0.01 IU/mL was obtained.

Keywords: Extraction, hemicelluloses, xylanase, hydrolysis.

Introducción

El olote de maíz se genera en grandes cantidades durante el proceso de separación del grano de maíz de la mazorca y sus usos actuales van desde utilizarlo como forraje en ganadería, como abono para la tierra o quemado al aire libre ocasionando que la tierra se erosione y contaminando el medio ambiente. Además, ninguno de estos usos presenta algún valor agregado (Córdoba *et al.*, 2013; SAGARPA, 2010). El olote de maíz es uno de los residuos agroindustriales que tiene una gran cantidad de polisacáridos como la lignina, celulosa y hemicelulosas, lo que lo ha convertido en una de las materias primas con más potencial para la producción de energía, calor, combustibles y productos químicos (Velmurugan *et al.*, 2011; Kaliyan y Morey, 2010). El olote de maíz contiene aproximadamente un 34 % de hemicelulosas, las cuales están constituidas principalmente por azúcares de cinco carbonos como la xilosa y arabinosa,

de las cuales el 94 % corresponde a xilanos que es el polisacárido más abundante en la naturaleza después de la celulosa (Pointner *et al.*, 2014).

Se ha demostrado que los xilanos tienen un gran potencial para producir xilooligosacáridos (XOs) por diversas vías y los cuales tienen bastantes aplicaciones biotecnológicas ya son una fuente alternativa de diversos compuestos químicos de interés en varios sectores industriales y de investigación (Córdoba *et al.*, 2013; Biely *et al.*, 1997) ya que los XOs han sido utilizados como edulcorantes para alimentos, como sustratos de enzimas, otros XOs han mostrado tener actividades biológicas como antioxidantes, actividad antitumoral y también se han desarrollado materiales para aplicarse en ingeniería de tejidos, tratamiento de heridas, entre otras (Liu *et al.*, 2016). En otros sectores industriales se han utilizado los XOs como hidrogeles, termoplásticos, recubrimientos, como aditivos en la fabricación de papel y en el sector de cosmetología (Ebringerová y Heinze, 2000).

Si bien la producción de los XOs se ha realizado principalmente a partir del olote de maíz por varios métodos de hidrólisis enzimática directa, hidrólisis enzimáticas parciales y por hidrólisis química (Teng *et al.*, 2010), este es un paso esencial para la creación de distintos productos de una amplia gama de combustibles, biomateriales y químicos. Por ello, se han evaluado bastantes métodos que han resultado efectivos para separar la hemicelulosa de tejidos leñosos y no leñosos. De los métodos más estudiados es la extracción alcalina y se conoce como un método fuerte y eficiente para estos fines (Farhat *et al.*, 2017). Las hemicelulosas tienen una mayor tasa de hidrólisis y solubilidad en medio alcalino que la celulosa (Egüés *et al.*, 2012), ya que los iones hidroxilo provocan un hinchamiento en la celulosa, la hidrólisis del enlace éster y el rompimiento de los puentes de hidrógeno intermoleculares entre la celulosa y la hemicelulosa (Farhat *et al.*, 2017). También se ha utilizado ampliamente el tratamiento con ácidos y ha mostrado ser efectivo y económico para hidrolizar por completo la hemicelulosa en azúcares monoméricos (xilosa, arabinosa, glucosa, galactosa y manosa) (Sun y Cheng, 2005). Finalmente, otro método de extracción de hemicelulosas es aplicándoles vapor de agua a alta presión, el cual es básicamente una autohidrólisis debido a la influencia del agua y vapor (Sun *et al.*, 2005) sobre la estructura molecular de la hemicelulosa. En este trabajo se realizó el aprovechamiento del olote de maíz para obtener xilanos por diversos métodos y se determinó su potencial uso como sustrato para cuantificar la actividad enzimática xilanasa.

Materiales y Métodos

Preparación y acondicionamiento de las harinas de olote de maíz

Se prepararon harinas de olote de maíz fresco (OMF) y seco (OMS) con tamaños de partícula de 0.105mm y 0.42 mm, para esto, se cortaron en trozos de 1-2 cm y se trituraron en una licuadora industrial. Posteriormente, se secaron a 60 °C por 48 horas en una estufa. Se repitió el triturado y las harinas obtenidas se tamizaron para obtener los tamaños de partícula deseados. Finalmente, por diferencia de peso se calculó el rendimiento. De cada harina, se tomaron 35 gr y se les realizó un lavado con 1 L agua desionizada durante 15 minutos a 300 rpm, a temperatura ambiente (25-30°C) para eliminar impurezas solubles y cualquier remanente de azúcares. Pasado el tiempo se filtró con una gasa y la fracción sólida se sometió a un remojo por 12 horas en 1 L de agua desionizada a temperatura ambiente (25-30°C) con una agitación de 300 rpm. Transcurrido el tiempo, se filtró y se desechó el líquido. La fracción sólida se almacenó a 4 °C hasta su uso.

Extracción alcalina de xilano a partir de las harinas de olote de maíz

La extracción alcalina se realizó siguiendo el protocolo de Driss *et al.*, (2014) y Jian-Long *et al.*, (2016) con algunas modificaciones. Para esto, a cada harina acondicionada se le adicionó NaOH al 10 %^P/_V manteniendo una relación sólido-líquido de 1:20 y se incubó a 60 °C por 12 horas. Posteriormente, se separaron las fracciones por decantación, la fracción líquida se centrifugó a 2600 X g durante 10 minutos. Finalmente, se juntaron las fracciones correspondientes obtenidas por decantación y centrifugación provenientes de la misma harina.

Extracción con vapor

La fracción sólida, que se recuperó tras la extracción alcalina de las diferentes harinas, se sometieron a un tratamiento de vapor en autoclave a 120 °C durante 30 minutos. Después, se resuspendió en 100 mL de agua desionizada,

homogenizando con una agitación fuerte a temperatura ambiente por 10 minutos. Finalmente, se dejó reposar por 4 h para la separación de fases y se desechó el sólido.

Recuperación del xilano

Cada fracción líquida, que se obtuvo de la extracción alcalina y del tratamiento de vapor, se acidificaron con CH_3COOH 12 N hasta un pH de 5.0 bajo agitación de 300 rpm. Después, se centrifugó a 2600 X g durante 10 minutos. Las fracciones sólidas se secaron en cajas Petri a 60 °C por 24 horas, removiendo cada 2-3 horas para un secado uniforme. Las fracciones líquidas se precipitaron con etanol frío en una relación líquido-líquido 1:3, dejando reposar 12 horas a 4°C. La separación de fracciones se realizó por filtración y la fracción líquida de este proceso se desechó y la sólida se sometió a un secado. Finalmente, todos los extractos de hemicelulosas obtenidos se trituraron en un mortero y se secaron nuevamente durante 24 horas.

Análisis de las fracciones de hemicelulosas obtenidas

Se mezclaron las hemicelulosas de distinto tamaño de partícula con las que provenían de la misma fase de extracción para olote fresco y el seco, obteniendo así cuatro hemicelulosas provenientes del OMF y cuatro del OMS como se muestra en la Figura 1.

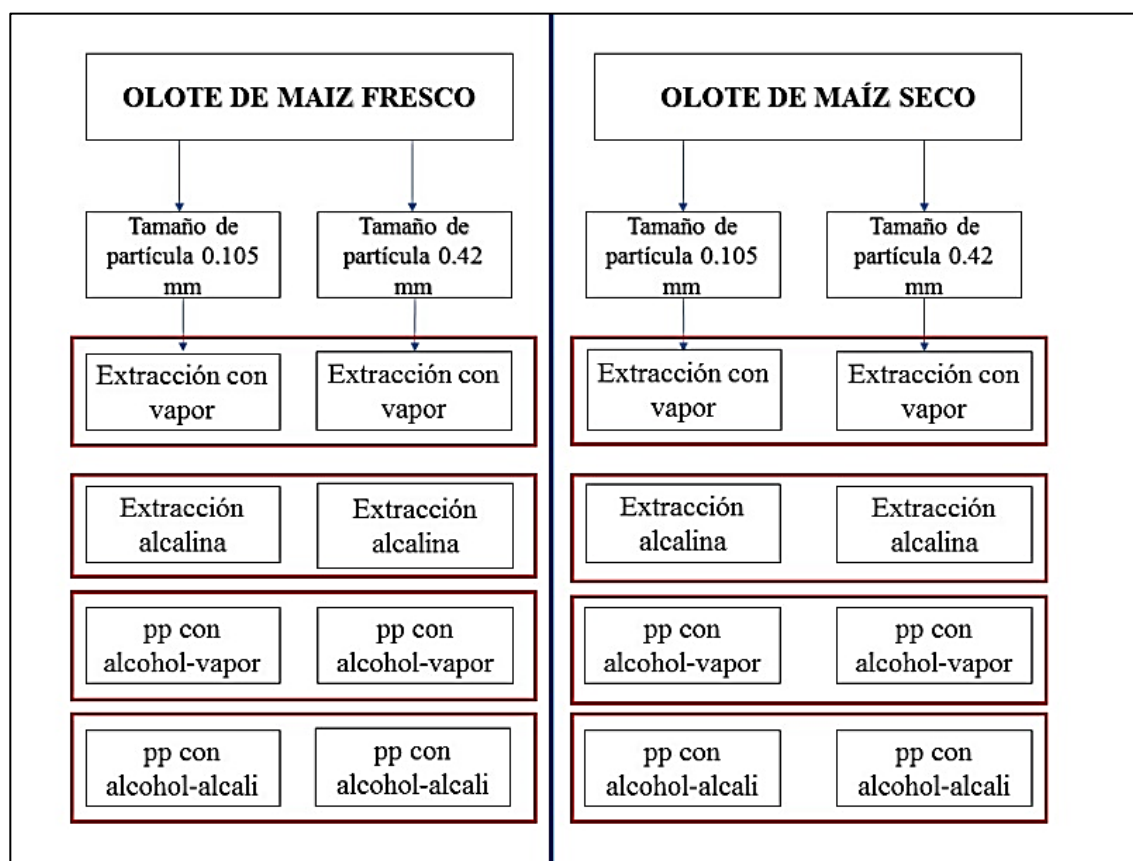


Figura 1. Esquema de las ocho fracciones de hemicelulosas obtenidas durante las extracciones.

Evaluación de la calidad del xilano obtenido mediante una hidrólisis enzimática con una xilanasa comercial

La hidrólisis enzimática se realizó de acuerdo con el protocolo de Driss *et al.*, (2014), con algunas modificaciones. Para esto, se utilizaron las 8 hemicelulosas obtenidas, el OMF y OMS sin ningún tratamiento y con un tamaño de partícula de 0.105 mm y 0.42 mm cada uno. Además, se incluyó un xilano comercial (xylan beechwood Sigma Aldrich, X4252) como control positivo. Todos estos componentes se sometieron a una hidrólisis enzimática con la enzima xilanasa comercial Livanol Devisco 1500. La hidrólisis enzimática se llevó a cabo en un baño seco con agitación en tubos de

ensayo de 9 mL estériles con un volumen de reacción de 2 mL y con los sustratos a una concentración final de 10 %^P/v. La mezcla de reacción se incubó a 50°C durante 8 horas a 1000 rpm. Se realizaron muestreos cada hora y las muestras se almacenaron en congelación a -20°C hasta su uso. Se cuantificaron los azúcares reductores por el método DNS (Miller, 1959) y los datos de cada muestra problema se corrigieron primero restando el valor promedio del control del reactivo y después, restando el valor promedio del tiempo cero de la hidrólisis enzimática.

Cuantificación de la actividad enzimática xilanasa utilizando los xilanos obtenidos como sustrato.

La cuantificación de la actividad enzimática xilanasa se realizó de acuerdo con el protocolo descrito por Saha (2002) con algunas modificaciones, en resumen, todos los sustratos evaluados se prepararon al 1 %^P/v en buffer de acetatos 50 mM, pH 4.8. La mezcla de reacción se preparó en tubos Eppendorf de 1.5 mL al cual se le adicionó 30 µL del sustrato respectivo y 30 µL de la enzima xilanasa. Los tubos se incubaron a 50°C con agitación de 500 rpm durante 40 minutos en un baño seco. Transcurrido el tiempo de reacción, se cuantificaron los azúcares reductores liberados por el método DNS (Miller, 1959). Para esto, se adicionó 120 µL del reactivo DNS a cada uno de los tubos y se incubaron a 95°C por 5 minutos. Una vez terminado el tiempo, se transfirieron 36 µL de cada tubo a una microplaca que contenía 160 µL de agua desionizada en los pozos respectivos. Finalmente, se midió la absorbancia a 492 nm en un lector de microplacas. Los valores de absorbancia de cada muestra problema se corrigieron restándoles el valor promedio de absorbancia obtenido para el control del sustrato. La actividad enzimática xilanasa se expresó en Unidades Internacionales (IU) por mL, donde una unidad de actividad enzimática xilanasa se definió como la cantidad de enzima capaz de liberar azúcares reductores equivalentes a 1 µmol de xilosa por minuto. Para calcular la actividad enzimática xilanasa en IU/mL, se utilizó la ecuación 1 descrita por Saha (2002):

$$\frac{\text{IU}}{\text{mL}} = \frac{\text{Abs m}}{\text{Abs}/\mu\text{g est}} \left(\frac{1\mu\text{g}}{150\mu\text{mol de xil}} \right) \left(\frac{1}{\text{t inc}} \right) \left(\frac{1}{\text{mL dil}} \right) \quad (1)$$

donde, IU/mL es la actividad xilanasa obtenida en la dilución crítica; Abs m es la absorbancia obtenida del ensayo para cada una de las muestras problema; Abs/µg est es la absorbancia en 1 µg de xilosa proveniente de la curva estándar de xilosa; 1 µg/150 µmol de xil es la cantidad de xilosa en 1 µmol; t inc es el tiempo de incubación del ensayo (40 minutos); y mL dil son los mililitros de la dilución crítica utilizada (0.03).

Azúcares reductores

La cantidad de azúcares reductores se cuantificó por el método del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS), usando xilosa como estándar. Se adaptó el método de Miller (1959) para microvolúmenes en el cual, se toman 9 µL de la muestra y se le agregaron 171 µL de reactivo DNS (7 g/L de 3,5-ácido dinitrosalicílico, 13.2 g/L de hidróxido de sodio, 207 g/L de tartrato de sodio y potasio, 0.5 %^P/v de fenol y 5.5 g/L de metabisulfito de sodio) y se homogenizó. Esta mezcla se incubó durante 1 minuto a 95 °C en un baño seco. Al finalizar la reacción, se transfirieron 90 µL de la mezcla a los pozos de una microplaca de 96 pozos y se midió la absorbancia a 492 nm. Como blanco se utilizó 90 µL de agua desionizada y como control del reactivo se colocaron 9 µL de agua desionizada y 171 µL de reactivo DNS. Para obtener los azúcares reductores en g/L en equivalentes de xilosa se realizó una curva estándar de xilosa de en un rango de 0 a 20 g/L y la ecuación se utilizó para estimar la concentración de xilosa liberada. Los resultados son reportados en g/L en equivalentes de xilosa obtenidos.

Resultados y Discusión

Evaluación de la pérdida de humedad y rendimiento de la materia prima durante la preparación y acondicionamiento de las harinas de olote de maíz, fresco y seco, con un tamaño de partícula de 0.105 mm y 0.42 mm.

En la Figura 2 se muestran los resultados del olote de maíz que se pudo tamizar en los dos tamaños de partícula requeridos. En la Figura 2A, se muestra el rendimiento del olote de maíz desde su peso inicial. Se puede observar que de todo el OMF que se tuvo para trabajar, es decir, sin pretratamiento o acondicionamiento alguno, el 60 % de todo este material se perdió ya sea por la manipulación propia del acondicionamiento de la materia, al momento del tamizado, transferencia, molienda y de la pérdida de agua durante el secado. Del 40 % restante el 12 % se logró tamizar en un tamaño de partícula de 0.105 mm y el 5 % se tamizó en un tamaño de partícula de 0.42 mm. Finalmente, el 23 %

es considerado residuo, ya que no se pudo reducir su tamaño por la dureza del material. Esto representó poco más de la mitad del olote de maíz que se recuperó tras el secado. En general, más del 80% de todo este olote fue pérdida de humedad y de materiales de desecho (residuos).

En la Figura 2B, se puede observar de igual manera el rendimiento del olote de maíz en este caso, seco. En este caso, se observó que más de la mitad de todo el material se logró tamizar en los dos tamaños de partícula de 0.105 mm y 0.42 mm, 18% y 49 %, respectivamente. Solo 8 % de la materia se perdió tras el secado y un 25% ya no se pudo reducir a un tamaño pequeño de partícula deseado por la dureza del material. Finalmente, se logró recuperar poco más del 65% en los tamizados y solo el 33% se perdió o desechó.

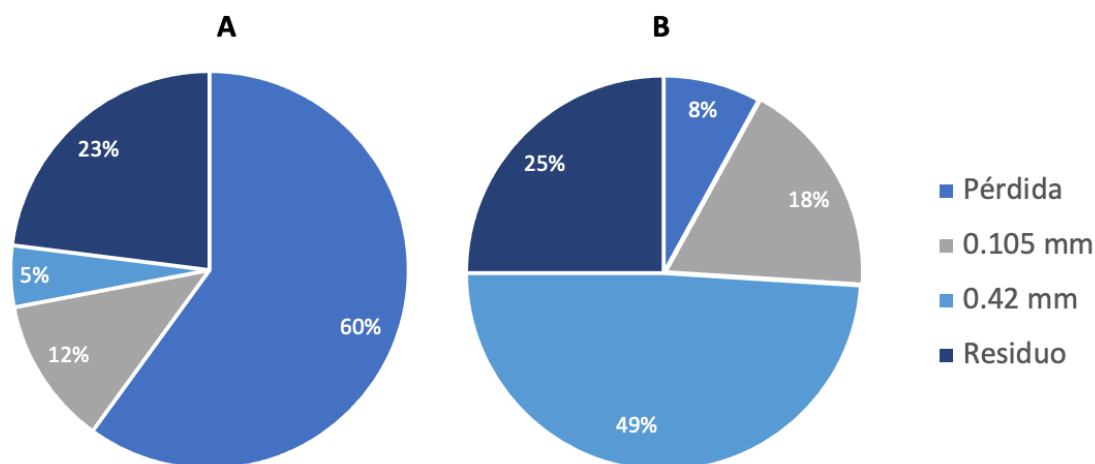


Figura 1. Porcentajes de olote maíz obtenido después de la preparación y acondicionamiento de las harinas. A) Harina del olote de maíz fresco. B) Harina del olote de maíz seco

Extracción y recuperación del xilano para el maíz fresco y seco en los procesos de extracción con vapor y con álcali.

Si bien la biomasa vegetal se encuentra formada principalmente por lignina, celulosa y hemicelulosa, sus proporciones varían dependiendo del tipo de biomasa. Las hemicelulosas del olote de maíz se encuentran principalmente formadas por xilano, el cual se encuentra al interior, mediante interacciones no covalentes y enlaces covalentes, en una matriz formada por la celulosa y lignina (Chapla *et al.*, 2012). En la Tabla 1 se muestran las cantidades, en base seca, de las hemicelulosas obtenidas en las diferentes fracciones, así como el porcentaje de recuperación alcanzado para cada una de las condiciones evaluadas. En general, se puede observar que, a mayor tamaño de partícula, la cantidad extraída de hemicelulosas fue mayor, mientras que el mejor método de extracción fue el alcalino, con 0.42 mm de tamaño de partícula, donde se logró recuperar el 74.1 y 95.8 % de hemicelulosas para el olote de maíz fresco y seco, respectivamente. El porcentaje de recuperación alcanzado en el presente trabajo es bastante alto respecto a otros estudios donde solo obtuvieron un 26 % de recuperación de hemicelulosas cuando utilizaron una extracción con vapor saturado a 155 °C (Yang *et al.*, 2006). Esta diferencia se puede deber a que en el presente estudio solo se buscó realizar una metodología para obtener las hemicelulosas del olote de maíz y aunque pueden contener cierto grado de impurezas como lo describe Sporck *et al.* (2017), no se implementaron otras metodologías de purificación mas exhaustivas por el costo y por los desechos adicionales que representarían.

Tabla 1. Recuperación de hemicelulosas obtenidas a partir del olote de maíz fresco y seco.

	Tamaño de partícula (mm)	Extracción con vapor (g)	Extracción alcalina (g)	Precipitación con alcohol y tratamiento con vapor (g)	Precipitación con alcohol y extracción alcalina (g)	Hemicelulosas totales (gr)	Recuperación n (%)
Olote de maíz fresco	0.105	0.7	8.1	0.37	4.2	13.5	38.5
	0.42	1.5	14.7	2.1	7.2	25.9	74.1
Olote de maíz seco	0.105	0.3	16.1	1.3	9.5	27.3	78.0
	0.42	2.1	20.3	1.8	8.9	33.5	95.8

Hidrólisis enzimática de los extractos de hemicelulosas obtenidas por la extracción química a partir del olote de maíz para la obtención de azúcares reductores.

Como se puede observar en la Figura 3, la hidrólisis de los xilanos tanto del comercial de beechwood como las fracciones de hemicelulosas obtenidas, a las 4 h de reacción los sustratos provenientes de la precipitación con alcohol con tratamiento de vapor, extracción alcalina y el xilano comercial muestran valores de liberación de azúcares reductores en equivalentes de xilosa de 7.10 ± 2.02 , 7.24 ± 0.37 y 6.86 ± 2.25 g/L, respectivamente.

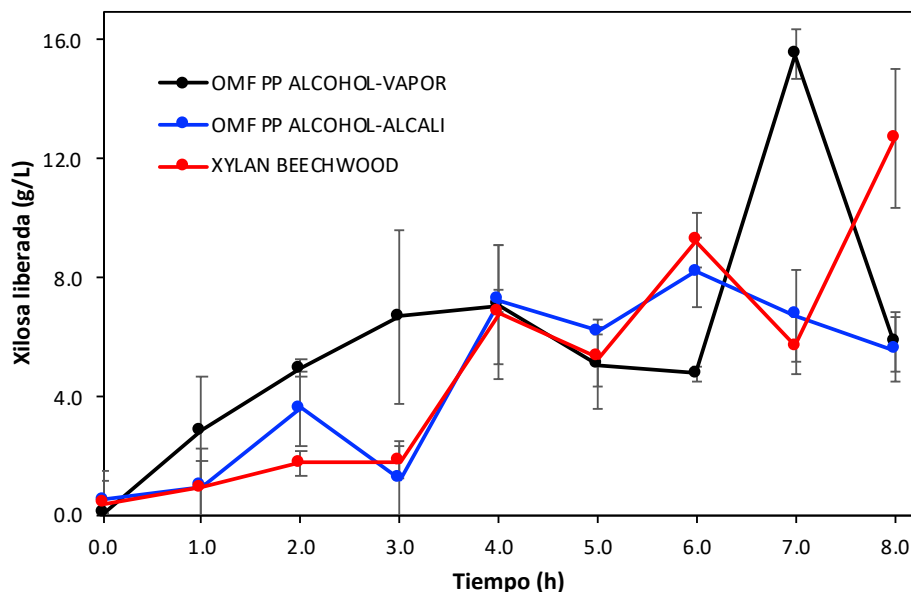


Figura 2. Evolución de los azúcares reductores en equivalentes de xilosa (g/L) durante la hidrólisis enzimática de las fracciones de hemicelulosas provenientes del OMF.

En la Figura 4, se muestran las cinéticas de la hidrólisis enzimática que obtuvieron un perfil semejante al xilano de beechwood y se puede observar que las hemicelulosas provenientes de la precipitación con alcohol del tratamiento con vapor y la extracción alcalina fueron los que presentaron un perfil semejante al xilano comercial. Las hemicelulosas obtenidas con la precipitación con alcohol de la extracción alcalina es el que tiene una semejanza mayor al xilano comercial.

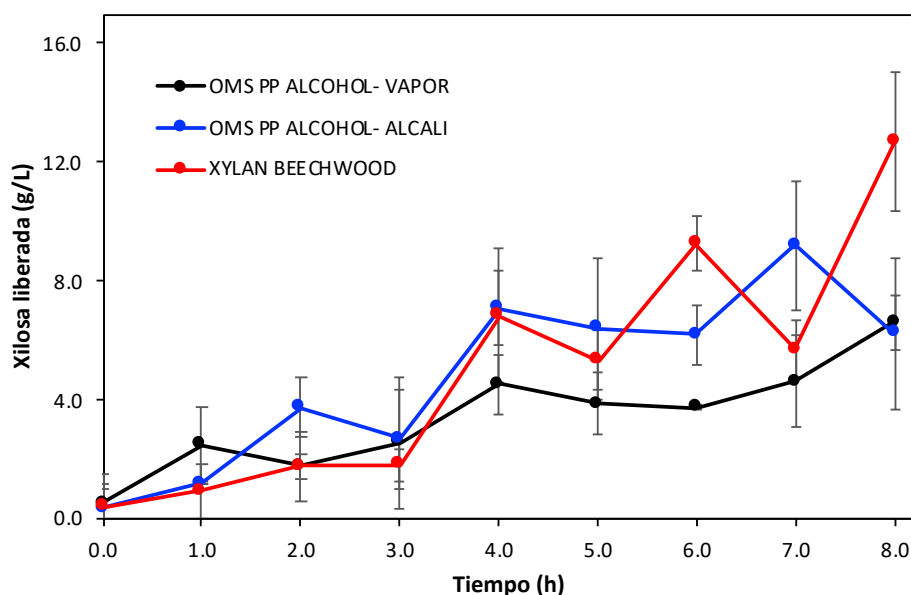


Figura 3. Evolución de los azúcares reductores en equivalentes de xilosa (g/L) durante la hidrólisis enzimática de las fracciones de hemicelulosas provenientes del OMS.

Finalmente, se puede decir que algunas de las fracciones de hemicelulosas obtenidas muestran cierta semejanza en el perfil de hidrólisis respecto al xilano comercial, se decidió realizar una comparación a las 4 h ya que fue donde, en general, se alcanzó el máximo de liberación de xilosa. De esto, en la Figura 5 se muestran todos los extractos de hemicelulosas obtenidos durante la hidrólisis enzimática a las 4 h de reacción. En la primera barra se puede observar al control positivo del experimento, el xilano de beechwood, y del cual, la enzima xilanasa logró hidrolizarlo y alcanzar una liberación de xilosa de 6.86 ± 2.25 g/L. Dado que este compuesto fue utilizado como control experimental, en la Figura 5, se trazó una línea punteada para resaltar aquellos extractos de hemicelulosa que lograron ser hidrolizados de la misma forma que el xilano comercial y las cuales son la fracción obtenida por precipitación con alcohol con tratamiento de vapor, la fracción obtenida por extracción alcalina para el OMF, mientras que solo la fracción obtenida por extracción alcalina para el OMS fue semejante al control experimental. Al comparar los resultados del presente estudio obtenidos a las 4 h de hidrólisis enzimática se puede ver en términos generales que han obtenido una mayor conversión del xilano como, por ejemplo, Yang *et al.* (2005) realizaron la extracción con vapor de xilooligosacáridos a partir del olote de maíz y lograron liberar 21 g/L de azúcares reductores en 24 h utilizando una xilanasa producida en medio líquido por *Penicillium corylophilum* P-3-31.

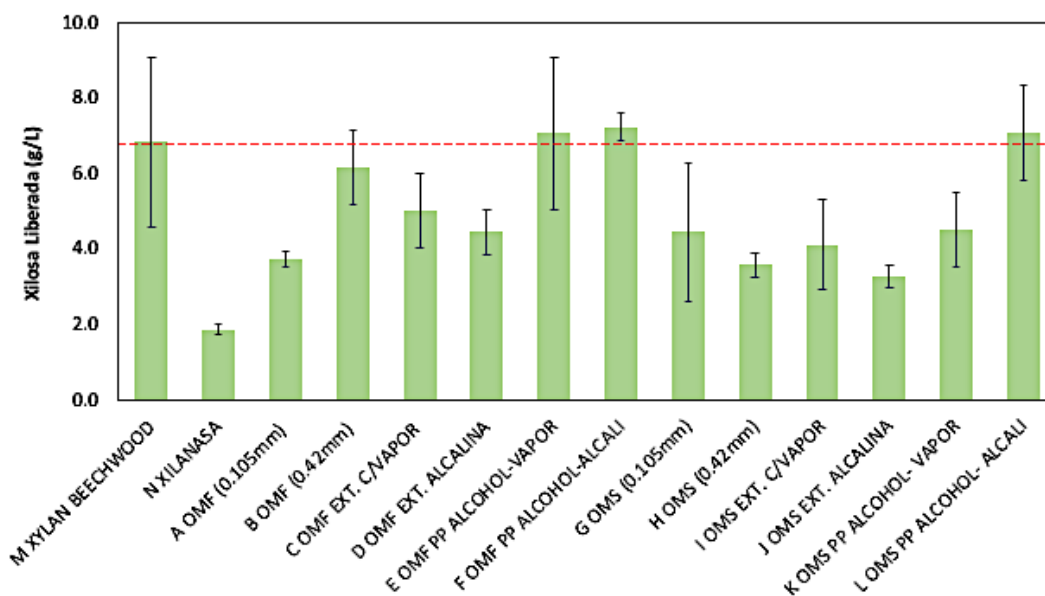


Figura 4. Liberación de equivalentes de xilosa en g/L a las 4 h de reacción para todas las fracciones de hemicelulosas obtenidas en el presente estudio.

Evaluación de los extractos obtenidos del olote de maíz como sustratos para la cuantificación de la actividad enzimática xilanasa.

En los últimos 20 años, se había utilizado el xilano de beechwood y el de birchwood como los sustratos por excelencia para medir la actividad enzimática xilanasa (Sharma *et al.*, 2020). Sin embargo, estos sustratos fueron reemplazados por otros, como el RBB-xilano, que tienen un alto costo en el mercado actual. Por ello, en el presente estudio se evaluaron las hemicelulosas obtenidas durante todo el proceso de extracción y recuperación como sustratos para medir la actividad enzimática xilanasa. Como control experimental se utilizó un xilano comercial de beechwood y poder determinar si alguna de estas fracciones puede funcionar como sustrato para la xilanasa. En la Figura 6, se presentan los resultados para la cuantificación de la actividad enzimática xilanasa y se puede observar, de forma general, que todos los extractos obtenidos en diversos puntos del proceso de extracción, así como del olote de maíz fresco y seco lograron ser utilizados como sustrato para la cuantificación de la actividad enzimática xilanasa. Sin embargo, el xilano comercial, que es el sustrato de referencia para la cuantificación de la actividad de la enzima xilanasa, es el que presentó una mayor actividad enzimática xilanasa con 0.287 ± 0.01 IU/mL. Sin embargo, se puede observar que la fracción de OMF proveniente de la extracción alcalina es un buen candidato para utilizarse como sustrato ya que con este compuesto se obtuvo una actividad enzimática xilanasa de 0.236 ± 0.03 IU/mL. De igual forma, existen otros extractos con potencial de usarse como sustrato, ya que la fracción del tratamiento con vapor del olote de maíz seco la actividad enzimática fue de 0.2 ± 0.04 IU/mL.

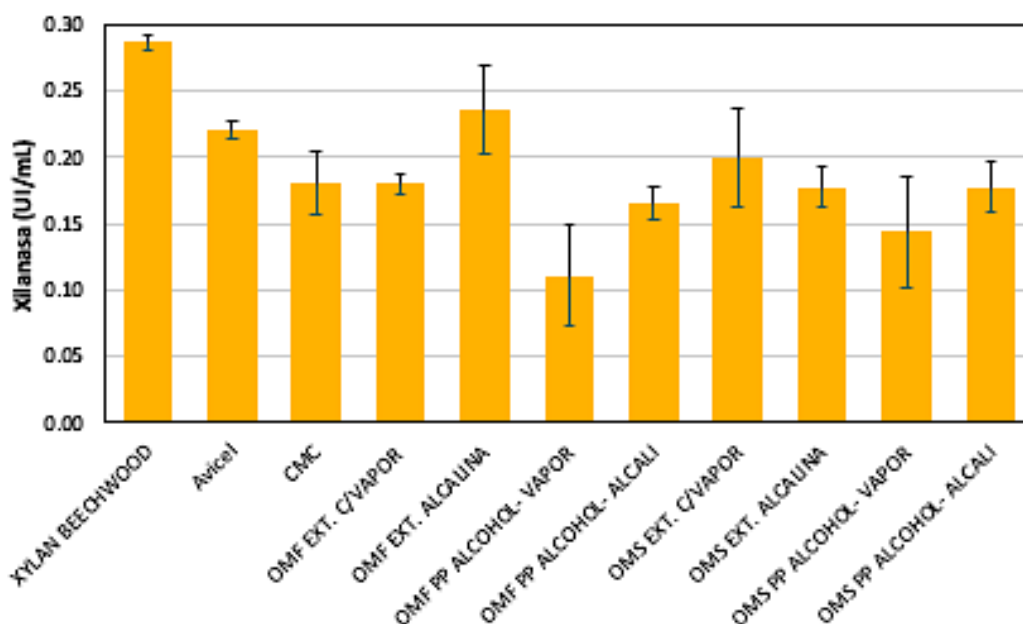


Figura 5. Cuantificación de la actividad enzimática xilanasa en UI/mL utilizando como sustratos los productos obtenidos de la extracción alcalina del olote de maíz fresco y seco.

Sharma *et al.* (2020) demostraron que el xilano extraído del aserrín de acacia puede ser utilizado como sustrato para medir la actividad enzimática xilanasa y encontraron que utilizando el xilano de acacia se obtuvo una actividad enzimática un 12 % mayor que con el xilano de beechwood. De igual manera, Corradini *et al.* (2018) lograron extraer xilano del eucalipto y no encontraron diferencias significativas entre su xilano extraído y el xilano comercial de birchwood en la cuantificación la actividad enzimática xilanasa.

En el presente se provee una alternativa de xilano como sustrato para la xilanasa, ya que se logró determinar que las 8 fracciones de hemicelulosas obtenidas de la extracción del olote de maíz pueden servir como sustratos para la xilanasa, los más prometedores son las hemicelulosas obtenidas con la extracción alcalina del olote de maíz fresco y la obtenida mediante la extracción con vapor del olote de maíz seco. De igual forma, otros estudios han demostrado que los principales productos de la hidrólisis enzimática fueron xilosa, xilobiosa y xilotriosa cuando se sometió el xilano, obtenido por extracción alcalina del olote de maíz, a una hidrólisis enzimática con una xilanasa (Driss *et al.*, 2014). Los resultados mostrados en el presente estudio son promisorios respecto al uso de las hemicelulosas extraídas del olote de maíz como sustratos para medir la actividad enzimática xilanasa, sin embargo, es evidente la necesidad de continuar los estudios sobre estas fracciones de hemicelulosas para determinar su estructura con metodologías analíticas especializadas como la espectrometría de masas y con ello proveer la información necesaria para establecer si las moléculas obtenidas son moléculas semejantes al xilano comercial. Otra parte por realizar en un futuro es el análisis de los productos de la hidrólisis enzimática por cromatografía en capa fina para poder comparar los perfiles de separación de los principales monosacáridos que conforman a estas hemicelulosas con sus respectivos estándares.

Conclusiones

En la preparación y acondicionamiento de las harinas, el olote de maíz fresco registró una pérdida del 60 % tras el secado y manipulación de la materia prima, de la cual, el 52% corresponde a la cantidad de agua eliminada por evaporación y otras sustancias que se pierden tras el secado. Para el olote de maíz seco solo hubo una pérdida del 8 % durante su preparación y se logró recuperar más del 60 % del material inicial.

Se logró realizar una extracción alcalina de xilano a partir de las harinas preparadas y se obtuvieron 8 fracciones de hemicelulosas que, en general, cuando se utilizó la harina del olote de maíz con un tamaño de partícula de 0.42 mm existió una mayor recuperación de los extractos de hemicelulosas tanto para el OMF como para el OMS.

De la hidrólisis enzimática realizada a los ocho extractos de hemicelulosas obtenidos, junto con el xilano comercial, se obtuvo que las hemicelulosas provenientes del tratamiento con vapor y extracción alcalina sometidas a la precipitación con alcohol para ambos tipos de olote de maíz (fresco y seco) tienen un perfil semejante en la liberación de xilosa a la del xilano comercial. También se encontró que la mayoría de las fracciones obtenidas tienden a alcanzar su máxima liberación de xilosa y mantenerse constante alrededor de las 4 h de hidrólisis, donde el xilano comercial presentó una liberación de xilosa de 6.86 ± 2.25 g/L y las dos fracciones de hemicelulosas del tratamiento con vapor y extracción alcalina sometidas a la precipitación con alcohol del OMF presentaron una liberación de 7.10 ± 2.02 y 7.24 ± 0.37 g/L, respectivamente.

La evaluación de los extractos de hemicelulosas como sustratos para medir la actividad enzimática xilanasa, se observó que la fracción que presentó una mayor actividad xilanasa fue la que proviene de la extracción alcalina del OMF con 0.236 ± 0.03 UI/mL. Si bien, aunque se pudo apreciar que los sustratos que en la hidrólisis enzimática presentaron una cinética de liberación de xilosa parecida a la del xilano de beechwood, al usarlos como sustratos presentaron valores más bajos, posiblemente esto se podría atribuir al tamaño de partícula que tienen dichos sustratos, es decir, su molienda fue difícil por la dureza del material.

Bibliografía

- Biely, P., Vršanská, M., Tenkanen, M., & Kluepfel, D. (1997). Endo-B-1,4-xylanase families: differences in catalytic properties. *Journal of Biotechnology*, 151-166.
- Chapla D., Pandit P. and Shah A. (2012). Production of xylooligosaccharides from corncob xylan by fungal xylanase and their utilization by probiotics. *Bioresource Technology* 115: 215–221.
- Cordoba, J., Salcedo, E., Rodriguez, R., Francisco Zamora, J., Manriquez, R., Contreras, H., y Delgado, E. (2013). Caracterización y valoración química del olote: degradación hidrotérmica bajo condiciones subcríticas. *Revista latinoamericana de química*.
- Corradini, F.A.S., Baldez, T.O., Milessi, T.S.S., Tardioli, P.W., Ferreira, A.G., de Campos G.R. and de Giordano, R. (2018). Eucalyptus xylan: An in-house-produced substrate for xylanase evaluation to substitute birchwood xylan. *Carbohydrate Polymers*. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.05.088>.
- Driss, D., Zouari_Ellouzi, S., Chaari, F., Kallel, F., Ghazela, I., Bouaziz, F., Chaabouni, S. (2014). Production and in vitro evaluation of xylooligosaccharides generated from corncobs using. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*.
- Ebringerová, A., Heinze, T. (2000). Xylan and xylan derivatives - biopolymers with valuable properties, 1. Naturally occurring xylans structures, isolation procedures and properties. *Macromolecular Rapid Communications*, 21(9), 542–556.
- Egüés, I., Sanchez, C., Mondragon, I., & Labidi, J. (2012). Effect of alkaline and autohydrolysis processes on the purity of obtained hemicelluloses from corn stalks. *Bioresource Technology*, 103(1), 239–248.
- Farhat, W., Venditti, R., Quick, A., Taha, M., Mignard, N., Becquart, F., & Ayoub, A. (2017). Hemicellulose extraction and characterization for applications in paper coatings and adhesives. *Industrial Crops and Products*, 107, 370–377.
- Jian-Long, X., Shuai, Z., Rui-Ming, L., Xin, Y., Sui-Xin, J., Lin-Hui, S., Qi, Y., Cheng-Jie, D., Jun-Liang, L., Jia-Xun, F. (2016). A biotechnological process efficiently co-produces two high value-added products, glucose and xylooligosaccharides, from sugarcane bagasse. *Bioresource Technology*, 130-133.
- Kalihan, N., y Morey, R. (2010). Densification characteristics of corn cobs. *Fuel Processing Technology*, 91(5), 559–565.
- Liu, J., Chinga-Carrasco, G., Cheng, F., Xu, W., Willför, S., Syverud, K., & Xu, C. (2016). Hemicellulose-reinforced nanocellulose hydrogels for wound healing application. *Cellulose*, 23(5), 3129–3143.
- Miller, G. L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, 31(3), 426-428.
- Pointner, M., Kuttner, P., Obtrlik, T., Jäger, A., Kahr, H. (2014). Composition of corncobs as a substrate for fermentation of biofuels. *Agronomy, Research*, 12(2), 391-396.
- SAGARPA (2010). (Disponible en línea en <https://www.sagarpa.mx>)(Consulta el 15 de marzo de 2019).
- Saha, B. C. (2002). Production, purification and properties of xylanase from a newly isolated. *Fusarium proliferatum*. *Process Biochemistry*, 1279-1289.
- Sharma K., Khaire K.C., Thakur A., Moholkar V.S. and Goyal A. (2020). Acacia xylan as a substitute for commercially available xylan and its application in the production of xylooligosaccharides. *ACS Omega*. 5:13729–13738.
- Sporck D., Reinoso F.A., Rencoret J., Gutiérrez A., del Rio J.C., Ferraz A., and Milagres A.M. (2017). Xylan extraction from pretreated sugarcane bagasse using alkaline and enzymatic approaches. *Biotechnol. Biofuels* 10:296.
- Sun, X. F., Xu, F., Sun, R. C., Geng, Z. C., Fowler, P., Baird, M. S. (2005). Characteristics of degraded hemicellulosic polymers obtained from steam exploded wheat straw. *Carbohydrate Polymers*, 60(1), 15–26.
- Sun, Y. y Cheng, J. (2005). Dilute acid pretreatment of rye straw and bermudagrass for ethanol production. *Bioresource Technology*, 96(14), 1599–1606.
- Teng, C., Yan, Q., Jiang, Z., Fan, G., y Shi, B. (2010). Production of xylooligosaccharides from the steam explosion liquor. *Bioresource Technology*, 101(19), 7679-7682.
- Velmurugan, P., Hur, H., Balachandar, V., Kamala-Kannan, S., Lee, K.-J., Lee, S.-M., Oh, B.-T. (2011). *Monascus* pigment production by solid-state fermentation with corn cob substrate. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 112(6), 590–594.
- Yang R., Xu S., Wang Z. and Yang W. (2005). Aqueous extraction of corncob xylan and production of xylooligosaccharides. *LWT* 38: 677–682.
- Yang R., Zhang C., Feng H. and Yang W. (2006). A Kinetic Study of Xylan Solubility and Degradation during Corncob Steaming. *Biosystems Engineering* 93(4): 375–382.