

Efecto de las condiciones de reacción sobre la actividad enzimática exoglucanasa en dos enzimas comerciales y su potencial uso para el pretratamiento de biomasa vegetal

Abril Pérez Lara ¹, Enrique Flores Andrade², Marisol Castillo Morales², Cesar Antonio Ortiz Sánchez², Gabriel Rafael Hernández Martínez¹, Domancar Orona Tamayo ³ y Rafael Uzárraga Salazar ^{1*}

¹ Laboratorio 111, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Veracruzana, Orizaba, Veracruz, México

² Laboratorio 123, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Veracruzana, Orizaba, Veracruz, México

³ Laboratorio, dirección de soluciones Tecnológicas, CIATEC, León, Guanajuato, México

* Autor de correspondencia: ruzarraga@uv.mx

Desarrollo sustentable (Desarrollo de procesos sustentables). **Ponencia Presencial.**

Recibido: 22 de agosto de 2023

Aceptado: 5 de octubre de 2023

Publicado: 23 de noviembre de 2023

Resumen: El principal componente de la biomasa vegetal es la celulosa, el cual es un polisacárido heterogéneo y para su hidrólisis enzimática se requiere la acción sinérgica de un conjunto de enzimas como la endoglucanasa, exoglucanasa (celobiohidrolasa) y β -glucosidasa. Por ello, el presente trabajo se enfocó en estudiar a la enzima exoglucanasa, para lo cual, primero se montó el ensayo enzimático en microvolúmenes que se realizó en microplacas de 96 pozos utilizando Avicel a 1.25 % P/V como sustrato en un volumen de reacción de 200 μ L. Se determinó que para cuantificar la actividad enzimática exoglucanasa en un microensayo, la temperatura óptima es de 60 °C con un tiempo de incubación de 20 minutos. Por otro lado, al evaluar la hidrólisis enzimática de harinas de bagazo de caña y de olote de maíz empleando dos preparaciones multienzimáticas comerciales (Celluclast y Nutrizyme SFC-061), se encontró que Nutrizyme SFC-061 fue 7.3 veces más rápida que Celluclast 1.5L para hidrolizar el bagazo de caña y 5.4 veces más rápida para hidrolizar el olote de maíz.

Palabras clave: Bagazo de caña, olote de maíz, hidrólisis enzimática, actividad enzimática, exoglucanasa.

Effect of reaction conditions on exoglucanase enzyme activity in two commercial enzymes and their potential use for vegetable biomass pretreatment

Abstract: The main component of plant biomass is cellulose, which is a heterogeneous polysaccharide and for its enzymatic hydrolysis requires the action synergistic of a set of enzymes such as endoglucanase, exoglucanase (cellobiohydrolase) and β -glucosidase. The present study focused on exoglucanase and showed that it is possible to adapt the macroassay, commonly used to quantify this enzyme a microassay performed on 96-well microplates using Avicel at 1.25 % w/v as a substrate at a reaction volume of 200 μ L. In addition, it was found that to quantify exoglucanase enzyme activity in the microassay, the optimum temperature was 60 °C with an incubation time of 20 minutes. On the other hand, when evaluating the enzymatic hydrolysis of cane bagasse and corncob using two commercial multienzyme preparations (Celluclast and Nutrizyme SFC-061), Nutrizyme SFC-061 was found to be 7.3 times faster than Celluclast 1.5L to hydrolyze cane bagasse and 5.4 times faster to hydrolyze corncob.

Keywords: Sugarcane bagasse, corn cob, enzymatic hydrolysis, enzymatic activity, exoglucanase.

Introducción

Desde hace varias décadas se ha estudiado desde diversos enfoques el aprovechamiento de las biomásas vegetales que se generan constantemente como desechos o residuos de las actividades agroindustriales alcanzando una producción global de estimada en el 2020 de más de 5330 millones de toneladas provenientes de cultivos de trigo, tomate, maíz, soya, caña de azúcar, arroz, entre otros (Oleszek et al., 2023). En México, existen diversos cultivos vegetales que producen cantidades importantes de residuos como por ejemplo el bagazo de caña generado por los ingenios azucareros y el olote de maíz, los cuales, el bagazo es quemado para generar energía para el propio ingenio y el olote es utilizado principalmente para alimentación animal. En ambos casos, el uso de dichas biomásas no genera un producto de valor agregado o que provea una alternativa de uso a largo plazo sostenible. Diversos estudios han demostrado ampliamente el potencial biotecnológico que tienen diversas biomásas vegetales debido a su composición química formada principalmente de lignina, hemicelulosa y celulosa (Lee et al., 2014; Kuan-Yeow y Xinxin, 2012). Cada uno de dichos componentes pueden ser degradados a moléculas más sencillas gracias a las enzimas lignocelulolíticas formadas por tres grupos principales denominados ligninasas, celulasas y hemicelulasas (Peralta et al., 2017). Las celulasas han tenido una considerable atención en el área industrial y en la biotecnología debido a su gran capacidad hidrolítica para degradar la celulosa a unidades de glucosa. La capacidad hidrolítica se debe al sinergismo entre los tres

grupos de enzimas encargados de degradar la celulosa; endoglucanasas, exoglucanasas y β -glucosidasas. De estos 3 grupos de enzimas, las exoglucanasas actúan sobre los extremos reductores y no reductores de la celulosa, por lo cual se dividen en celobiohidrolasa I (CBH I) y celobiohidrolasa II (CBH II), siendo las CBH I las enzimas encargadas de actuar sobre los extremos reductores y las CBH II actúan sobre los extremos no reductores de la celulosa. Una vez que las exoglucanasas actúan, se obtienen celobiosas que son dímeros de glucosa unidos por enlaces glicosídicos β -1,4 (Gutiérrez *et al.*, 2015 y Thapa *et al.*, 2020).

En este contexto, de los 3 grupos encargados de desdoblar la celulosa, la exoglucanasa es una de las menos estudiadas y si bien, varios autores han propuesto diversos ensayos para cuantificar la actividad enzimática exoglucanasa, la mayoría lo realiza en grandes volúmenes de trabajo. Por ello, en el presente estudio se evaluó el efecto de diferentes condiciones de reacción como el tiempo de incubación y temperatura con la finalidad de encontrar la mejor combinación de parámetros de reacción para establecer un protocolo en microvolúmenes que permita una cuantificación de la actividad exoglucanasa confiable, reproducible y repetible. Además, se evaluó el potencial de dos enzimas celulósicas comerciales para el pretratamiento de 2 fuentes de biomasa vegetal, el bagazo de caña y el olote de maíz mediante una hidrólisis enzimática, donde se cuantificaron los azúcares totales liberados, así como también se cuantificó la actividad enzimática exoglucanasa.

Materiales y Métodos

En la Figura 1 se muestra el diagrama experimental que incluye las principales fases del presente estudio y posteriormente se describe la metodología que se siguió para desarrollar cada fase.

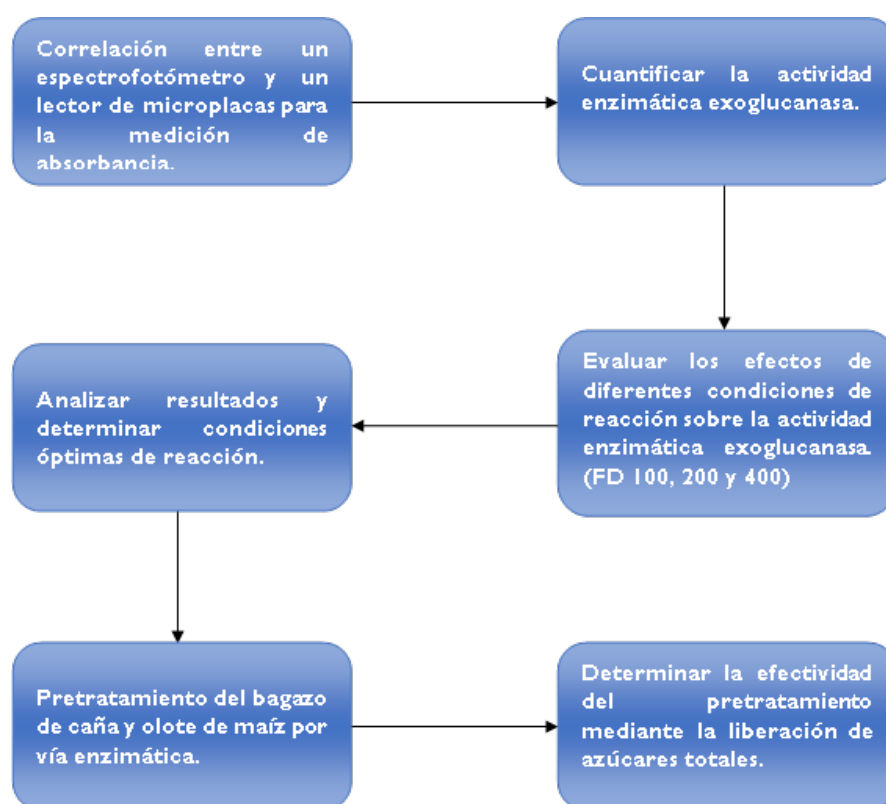


Figura 1. Diagrama estrategia experimental del efecto de las condiciones de reacción para la cuantificación de actividad enzimática exoglucanasa.

Enzimas comerciales

Para la realización del presente estudio se utilizaron dos cocteles comerciales multienzimáticos, los cuales se prepararon a una actividad enzimática de 84 UI de FPU/mL: Celluclast 1.5L (Sigma-Aldrich, C2730) y Nutrizyme SFC-601.

Determinación de la correlación entre las mediciones de absorbancia en un espectrofotómetro y un lector de microplacas.

Para determinar si existe una correlación entre las mediciones de absorbancia en un espectrofotómetro y en un lector de microplacas se realizó una curva estándar de D-glucosa y se cuantificaron los azúcares totales por el método del fenol sulfúrico realizando las lecturas de absorbancia a 490 nm en un espectrofotómetro y a 492 nm en un lector de microplacas. Para esto, se prepararon 2 curvas estándar, una en macrovolúmenes (espectrofotómetro) y otra en microvolúmenes (lector de microplacas), para ambas curvas se trabajaron las mismas concentraciones de glucosa en un rango de 0.00 a 0.08 g/L.

Cuantificación de azúcares totales por el método del fenol-ácido sulfúrico: Macroensayo.

Para la cuantificación de azúcares totales por el método del fenol-ácido sulfúrico en un macroensayo se siguió el protocolo descrito por Zhang (2009). En resumen, el volumen total de las muestras problema fue de 2 mL, las cuales se incubaron durante 2 h a 50 °C, posteriormente, se transfirió 1 mL a otro tubo para centrifugarlo a 13000 rpm por 3 min. Se tomaron alícuotas de 0.7 mL y se les adicionaron 0.7 mL de fenol al 5% P/V y 3.5 mL de ácido sulfúrico, se dejaron enfriar y finalmente se tomó 1 mL de cada tubo para la lectura de absorbancia a una longitud de onda de 490 nm.

Cuantificación de azúcares totales por el método del fenol-ácido sulfúrico: Microensayo.

Para la cuantificación de azúcares totales por el método del fenol-ácido sulfúrico en un microensayo se siguió el protocolo descrito por Zhang et al., (2009) reduciendo proporcionalmente los volúmenes de trabajo por un factor de 10. El volumen total de las muestras problema fue de 200 μ L, las cuales se sometieron a incubación durante 2 horas a 50 °C, posteriormente se procedió a centrifugar a 13000 rpm durante 3 minutos todas las muestras. Se tomaron alícuotas de 30 μ L y se depositaron en una microplaca de 96 pozos de fondo redondo para después, adicionar 30 μ L de fenol al 5% P/V y 140 μ L de ácido sulfúrico, se dejaron enfriar las muestras y finalmente realizó la lectura de absorbancia en un lector de microplacas a una longitud de onda de 492 nm.

Cuantificación de la actividad enzimática exoglucanasa.

Para cuantificar la actividad enzimática exoglucanasa se utilizó el protocolo descrito por Zhang et al., (2009) el cual fue tomado como método de referencia (macroensayo). En resumen, se utilizó como sustrato Avicel PH 101 (Sigma Aldrich, Cat. No. 11365) preparado al 1.25% P/V en buffer de acetatos 0.1 M pH 4.8. La actividad enzimática exoglucanasa se expresó como Unidades Internacionales (UI) donde una UI se define como 1 μ mol de equivalentes en glucosa liberados por minuto bajo las condiciones de reacción utilizadas.

Macroensayo (Protocolo de referencia).

Se utilizó como blanco 1.6 mL de agua desionizada y 0.4 mL de buffer de acetatos 0.1 M pH 4.8 y se le aplicó el mismo procedimiento descrito a continuación para una muestra problema. Primero se adicionaron 1.6 mL de Avicel al 1.25 % P/V a un tubo falcón de 15 mL, 0.4 mL de la muestra problema (enzima) y se homogenizaron en vortex. Después, se incubaron los tubos en baño maría a 50 °C durante 2 horas y al finalizar, la reacción se detuvo introduciendo los tubos en un baño de agua-hielo por 10 min. Posteriormente, se transfirió 1.0 mL a un tubo Eppendorf de 1.5 mL., se centrifugó a 13000 rpm por 3 min y del sobrenadante se transfirió 0.7 mL a un tubo de vidrio de 10 mL, donde se adicionaron 0.7 mL de fenol al 5 % P/V , se homogenizó y se adicionó lentamente 3.5 mL de ácido sulfúrico concentrado. Después se mezcló hasta obtener una solución homogénea y se dejó enfriar a temperatura ambiente (20-25 °C) durante 30 minutos. Finalmente, se transfirió 1 mL de un tubo a una celda para espectrofotómetro y se midió la absorbancia en un espectrofotómetro (Thermo Scientific, Genesys 20) a una longitud de onda de 490 nm.

Microensayo (Protocolo de referencia).

Se preparan controles los cuales fueron: control de sustrato (40 μ L de buffer de acetatos 0.1 M pH 4.8 + 160 μ L de Avicel 1.25 % P/V), control negativo de la enzima (40 μ L de la enzima diluida + 160 μ L de buffer de acetatos 0.1 M pH 4.8) y control positivo de la enzima (40 μ L de la enzima diluida y 160 μ L de Avicel 1.25 % P/V). El blanco del ensayo se

preparó con 40 μL de agua desionizada y 160 μL de buffer de acetatos 0.1 M pH 4.8. Se les aplicó el mismo procedimiento descrito a continuación para una muestra problema. Se colocaron 160 μL de Avicel al 1.25 % P/V en un tubo de PCR de 0.2 mL y se adicionó 40 μL de la muestra problema (enzima) y se homogenizaron por pipeteos. Después, se incubaron los tubos en un baño seco a 50 °C durante 2 horas y al finalizar, la reacción se detuvo introduciendo los tubos en un baño de agua-hielo 5 min. Posteriormente, se centrifugaron a 13000 rpm durante 3 minutos y del sobrenadante se transfirió 30 μL a un pozo de una microplaca de 96 pozos, donde se adicionaron 30 μL de fenol al 5% P/V , se homogenizó y se adicionó 140 μL de ácido sulfúrico concentrado. Después se homogenizó por pipeteos y se dejó enfriar a temperatura ambiente durante 15 minutos. Finalmente, se midió la absorbancia en un lector de microplacas a una longitud de onda de 492 nm.

Evaluación del efecto de temperatura y del tiempo de incubación sobre la actividad enzimática exoglucanasa en microvolúmenes.

Esta parte experimental se realizó utilizando la enzima comercial Celluclast 1.5L la cual se preparó a diferentes factores de dilución (100, 200 y 400). Cada condición experimental se evaluó por triplicado, para esto, primero se adicionaron 160 μL de Avicel 1.25% P/V en un tubo PCR de 0.2 mL y posteriormente, se adicionaron 40 μL del factor de dilución correspondiente. Después, una serie de tubos de cada factor de dilución se sometió a una temperatura de 40 °C, otra serie de tubos a 50 °C y otra a 60 °C. Posteriormente, todos los tubos se incubaron durante 4 horas en un baño seco sin agitación y de cada tubo se realizaron muestreos cada 20 minutos. Los muestreos consistieron en tomar 40 μL de muestra y colocarla en un tubo de PCR de 0.2 mL, todas las muestras se almacenaron en congelación a -20 °C hasta su análisis. Finalmente, se cuantificó la actividad enzimática exoglucanasa a todas las muestras siguiendo el protocolo propuesto para microensayo.

Preparación y acondicionamiento del bagazo de caña y olote de maíz.

La biomasa vegetal (bagazo de caña y olote de maíz) se obtuvo de pequeños productores de la región Orizaba, Ver. donde se recolectaron 10 kg de cada biomasa al momento de ser generada recolectando solo aquella bioamasa que no presentara daños físicos visibles como por ejemplo ataque de insectos.

De cada biomasa se prepararon harinas con un tamaño de partícula de 0.45 mm, para lo cual, primero se cortaron en trozos de 1- 2 cm, se trituraron con una licuadora industrial y se realizaron 3 lavados con agua corriente y un cuarto lavado con agua destilada, prensando cada biomasa entre cada lavado para eliminar los compuestos solubles como azúcares. Posteriormente, se secaron en una estufa a 60°C por 48 horas y se procedió a triturar en un procesador de alimentos para luego ser tamizado y obtener el tamaño de partícula de 0.45 mm.

Evaluación del potencial de dos preparaciones multienzimáticas comerciales (Celluclast 1.5L y Nutrizyme SFC-061) para el pretratamiento de residuos agroindustriales (bagazo de caña y olote de maíz) mediante un proceso de hidrólisis enzimática.

Para realizar la hidrólisis enzimática se utilizaron dos enzimas comerciales (Celluclast 1.5L y Nutrizyme SFC-061) y como residuos agroindustriales, se emplearon harinas de bagazo de caña y olote de maíz. Cada enzima comercial se preparó para tener la misma cantidad de unidades de actividad enzimática Celulasa Total la cual fue de 840 UI/mL. Como control experimental se emplearon controles abióticos para el bagazo de caña y el olote de maíz que consistieron en colocar el bagazo de caña y el olote de maíz en vez de enzima, se adicionó buffer de acetatos a 0.1 mM pH 4.8. La hidrólisis enzimática se llevó a cabo en tubos Falcon® de 15 mL estériles con un volumen total de reacción de 5 mL con 0.2 % P/V del residuo agroindustrial correspondiente, olote de maíz o bagazo de caña. Una vez preparadas las mezclas de reacción, que contenían la enzima comercial respectiva con el residuo agroindustrial, así como los controles abióticos, se procedió a colocar todos los tubos a unos 20° de inclinación sobre la base de un agitador vortex. La hidrólisis enzimática se realizó con una velocidad de agitación de 100-120 rpm y la temperatura de hidrólisis de 50 °C se logró introduciendo los tubos-vortex en una estufa (BINDER®) durante 8 horas. Desde el inicio de la hidrólisis enzimática (tiempo 0) se tomó muestreos esperando a que la estufa llegara a la temperatura establecida y posterior se introdujeron los tubos para comenzar a tomar el tiempo y continuar con los muestreos. Se realizaron muestreos tomando de cada tubo 80 μL cada 30 minutos durante las primeras 2 horas, posteriormente, se tomó cada hora hasta completar el periodo de 8 horas. Cada muestra se centrifugó durante 3 minutos a 13000 rpm en una minicentrífuga

(Labnet International Inc[®], CO160) y de cada muestra se cuantificaron los azúcares totales por el método fenol-ácido sulfúrico (Zhang *et al.*, 2009).

Análisis estadístico

Todos los experimentos se realizaron por triplicado y se utilizó el software Statgraphics[®] Centurion XVI versión 16.1.03 para realizar el análisis estadístico. Para la prueba de rangos múltiples se empleó el método de las diferencias mínimas significativas (LSD) de Fisher para discriminar entre las medias.

Resultados y Discusión

Determinación de la correlación entre las mediciones de absorbancia en un espectrofotómetro y un lector de microplacas.

En la Figura 2 se muestran las curvas estándar de D-glucosa elaboradas para determinar si existe una correlación entre las mediciones de absorbancia en un espectrofotómetro y un lector de microplacas.

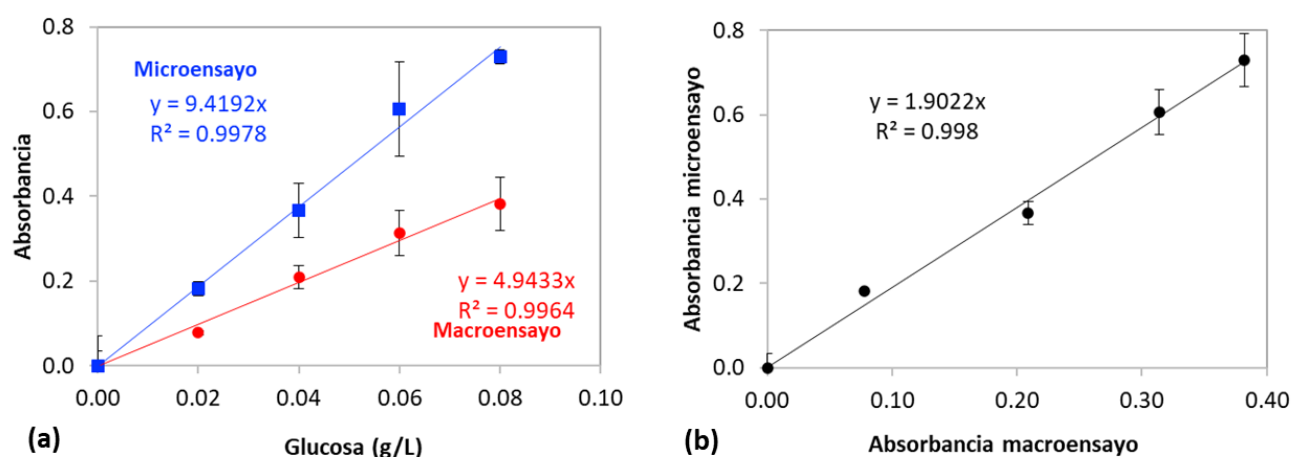


Figura 2. Correlación entre las mediciones de absorbancia en macrovolúmenes y microvolúmenes empleando un espectrofotómetro y un lector de microplacas. (a) Curvas estándar de D-glucosa obtenidas en un macroensayo (rojo) y en un microensayo (azul), (b) Correlación entre los valores de absorbancia entre el macroensayo y microensayo.

En la Figura 2(a) se observa que, en ambas curvas, tanto para el microensayo como para el macroensayo, son lineales y tienen una tendencia marcada a incrementar en sus valores de absorbancia conforme la concentración de glucosa aumenta. Por otro lado, ambas curvas presentaron un alto factor de correlación (R^2) superior al 0.99. En la Figura 2(b) se puede observar que al representar gráficamente los valores de absorbancia del microensayo vs los valores de absorbancia del macroensayo se obtiene una tendencia lineal de las absorbancias de ambos métodos con un coeficiente de correlación de R^2 de 0.998 lo que es un indicativo que existe una correlación lineal entre ambos métodos de medición (espectrofotómetro y lector de microplacas).

Cuantificación de la actividad enzimática exoglucanasa en macroensayo y microensayo.

En la Figura 3 se muestra la actividad enzimática exoglucanasa cuantificada en macroensayo y microensayo, empleando diferentes factores de dilución de la enzima comercial Celluclast 1.5L. Se aprecia como la actividad enzimática exoglucanasa disminuye entre más diluida se encuentre la muestra, aunque no linealmente entre todos los factores de dilución, sin embargo, se observa entre los factores de dilución 100, 200 y 400 una disminución proporcional. Para ambos volúmenes en el factor de dilución 1 presentaron mayor actividad enzimática exoglucanasa siendo de 87.17 ± 15.44 UI/L en macroensayo y 58.71 ± 7.18 UI/L en microensayo. Ghose (1987) menciona que las actividades enzimáticas celulolíticas como la endoglucanasa, celulasa total, exoglucanasa, β -glucosidas, entre otras, no muestran un comportamiento proporcional, es decir, a mayor concentración de enzima, mayor actividad enzimática debido a la

naturaleza intrínseca de este tipo de ensayos, donde es un conjunto de enzimas las que intervienen para poder medir el producto de la reacción de una enzima dada y esto ocasiona esa falta de proporcionalidad.

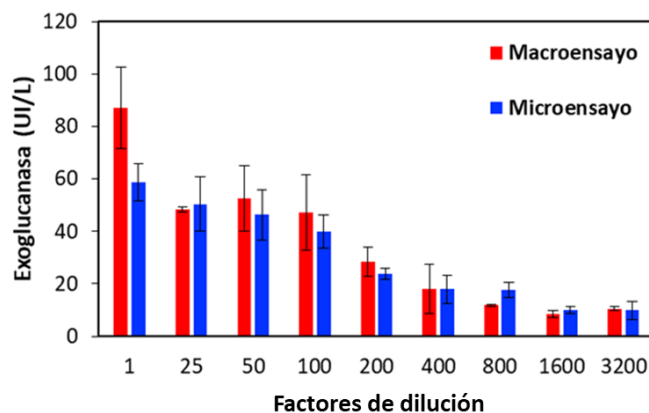


Figura 3. Actividad enzimática exoglucanasa en un macroensayo y microensayo con diferentes factores de dilución.

Evaluación del efecto de la temperatura y tiempo de incubación sobre la actividad enzimática exoglucanasa en un microensayo.

A continuación, se muestran los resultados obtenidos sobre el efecto que tuvo la temperatura y tiempo de incubación sobre la actividad enzimática exoglucanasa cuantificada con el microensayo y donde se utilizaron varios factores de dilución. Además, se muestran los resultados sobre la evaluación del efecto de la temperatura y tiempo de incubación sobre la actividad enzimática exoglucanasa en un microensayo con un factor de dilución de 400 a distintos tiempos de lectura.

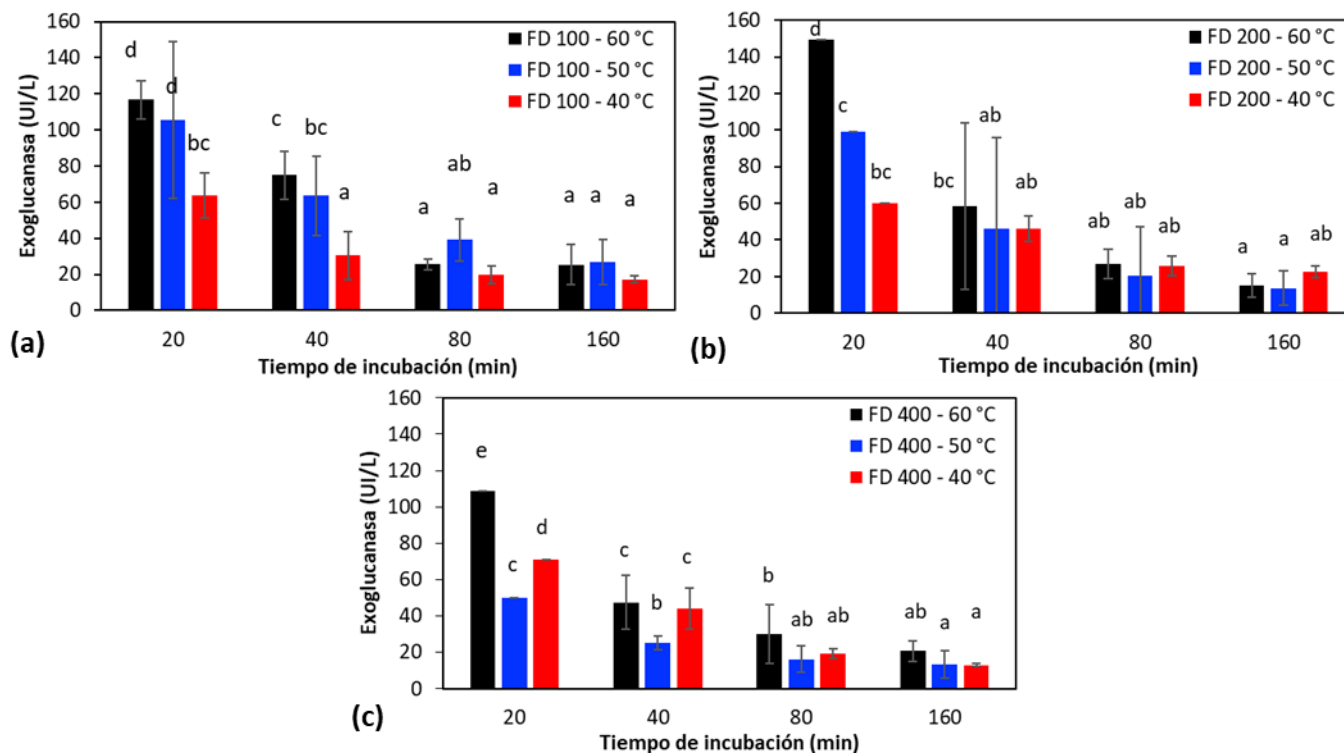
Evaluación del efecto de la temperatura y tiempo de incubación sobre la actividad enzimática exoglucanasa en un microensayo sobre diferentes factores de dilución.

Para evaluar el efecto de la temperatura y tiempo de incubación sobre la actividad enzimática exoglucanasa en microvolúmenes se empleó la solución comercial Celluclast 1.5L preparada con 3 diferentes factores de dilución (100,200 y 400), se cuantificó la actividad exoglucanasa y se graficaron los valores obtenidos de los datos registrados en 3 diferentes gráficas. En la Figura 4 se observa el efecto de la temperatura y tiempo de incubación sobre la actividad enzimática exoglucanasa en los 3 diferentes factores de dilución.

La Figura 4(a) muestra que para el factor de dilución 100 en el tiempo de incubación minuto 20 a una temperatura de 50 °C y 60 °C hay mayor actividad exoglucanasa teniendo valores de 116.7 ± 10.7 UI/L y 105 ± 13.1 UI/L, donde aplicando el método para discriminar entre las medias de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher se encontró que entre estas dos temperaturas no hay una diferencia estadísticamente significativa por lo cual se elige como mejor resultado el valor obtenido a una temperatura de 60 °C. Sin embargo, se aprecia como conforme el tiempo de incubación incrementa la actividad enzimática exoglucanasa disminuye para las 3 diferentes temperaturas, aunque no es un proceso lineal se puede observar con claridad la disminución y llegado un punto se mantiene sin cambios hasta el término del tiempo establecido. Aunque el factor de dilución 200 (Figura 4b) presentó mayor actividad enzimática exoglucanasa en el mismo tiempo y temperatura de incubación que el factor de dilución 100 se encontró un mejor resultado con el FD 200 obteniendo 149.6 ± 45.4 UI/L para 60 °C y 99 ± 49.8 UI/L para 50 °C sí se encontraron diferencias estadísticamente significativas. De igual manera se observó que conforme el tiempo de incubación transcurría la actividad exoglucanasa disminuía hasta llegar estar ligeramente constante sin cambios significativamente importantes.

En la Figura 4(c) corresponde al factor de dilución 400 donde se observa que al igual que los 2 factores de dilución anteriores el tiempo de incubación donde se encontró mayor actividad enzimática exoglucanasa es en el minuto 20, sin embargo, las temperaturas donde se observaron esos incrementos fueron 60 °C y 40 °C obteniendo valores de actividad exoglucanasa de 108.9 ± 14.6 UI/L y 71.1 ± 11.3 UI/L correspondientemente. Se observó que entre las 3 temperaturas en el mismo tiempo de incubación (20 minutos) la actividad exoglucanasa sí presenta diferencias

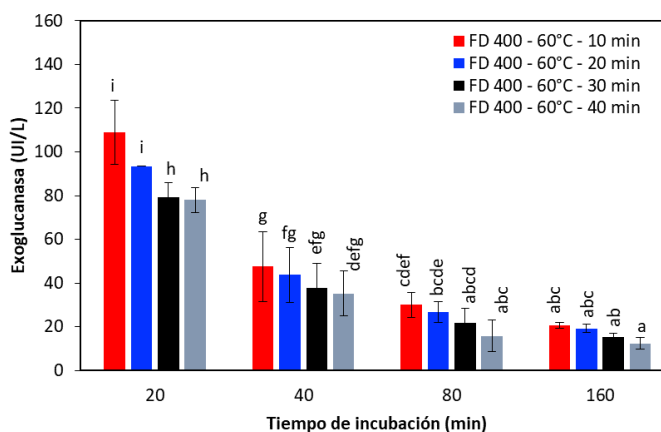
estadísticamente significativas, pero al igual que los otros dos factores de dilución conforme avanza el tiempo de incubación la actividad enzimática disminuye). Por otro lado, Hamada *et al.*, (1999) alcanzó una actividad enzimática exoglucanasa de 24.3 U/L con parámetros de 30 °C y 60 minutos de incubación, sin embargo, en el presente trabajo se obtuvieron mayores resultados de actividad enzimática exoglucanasa donde con la combinación de parámetros de 60 °C de temperatura y 20 minutos de incubación se consiguieron resultados 6 veces mayores en comparación del ensayo elaborado por Hamada y colaborados.



Las letras iguales sobre las columnas indican que no existe una diferencia estadísticamente significativa.

Figura 4. Efecto de la temperatura de incubación y del tiempo de incubación sobre la actividad enzimática exoglucanasa. (a) Factor de dilución 100, (b) Factor de dilución 200, (c) Factor de dilución 400.

Evaluación del efecto del tiempo de incubación y tiempo de lectura sobre la actividad enzimática exoglucanasa en un microensayo con un factor de dilución de 400.



Las letras iguales sobre las columnas indican que no existe una diferencia estadísticamente significativa.

Figura 5. Efecto del tiempo de incubación y tiempo de lectura sobre la actividad enzimática exoglucanasa para un factor de dilución de 400.

Para la evaluación del efecto a distintos tiempos de lectura sobre la actividad enzimática exoglucanasa se utilizó la solución comercial Celluclast 1.5L preparada a un factor de dilución 400 sometida a una temperatura de 60 °C y se cuantificó la actividad enzimática exoglucanasa. En la Figura 5 se muestra los resultados obtenidos de la cuantificación de actividad enzimática exoglucanasa en un factor de dilución 400 a una temperatura de 60 °C a distintos tiempos de incubación, lo que se implementó fue leer la microplaca a distintos tiempos de lectura comenzando por 10 minutos, 20 minutos, 30 minutos y 40 minutos; obteniendo que el tiempo de lectura de las muestras problemas sí afecta la actividad enzimática exoglucanasa. Como se describió en la sección anterior en el minuto 20 del tiempo de incubación se obtuvo una mayor cantidad de actividad enzimática exoglucanasa (108.9 ± 14.2 UI/L) en el tiempo de lectura como se marcó en el protocolo propuesto.

Evaluación de dos preparaciones multienzimáticas comerciales en un proceso de hidrólisis enzimática.

La hidrólisis enzimática se realizó para los sustratos bagazo de caña y olote de maíz, las preparaciones multienzimáticas utilizadas fueron Celluclast 1.5L y Nutrizyme SFC-606 las cuales se prepararon para tener una cantidad de 840 Unidades de actividad celulasa total. La celulosa es el principal objetivo de la hidrólisis enzimática para su posterior conversión a glucosa y poder cuantificar los azúcares totales contenidos en las muestras y que se fueron liberado durante el proceso. En la Figura 6 se muestran los mg de glucosa/L de azúcares totales liberados para ambas preparaciones multienzimáticas comerciales con los dos sustratos previamente seleccionados.

En la Figura 6(a) se muestra la evaluación de la cantidad de azúcares totales liberados en ambas preparaciones multienzimáticas comerciales empleando solamente el sustrato bagazo de caña, como se observa con la preparación Nutrizyme se obtuvieron mayores cantidades de azúcares totales en especial en el minuto 450 con una cantidad de 510.1 ± 103.3 mg de glucosa/L mientras que para la preparación Celluclast en el mismo tiempo de incubación se obtuvo una cantidad de 151.6 ± 96 mg de glucosa/L, sin embargo para Celluclast no fue su valor más elevado, en el tiempo de incubación donde se obtuvieron más azúcares totales para esta preparación multienzimática fue en el minuto 510 con una cantidad de 180.2 ± 98 mg de celulosa/L. Como se observa en la gráfica para la preparación multienzimática Celluclast la cantidad de azúcares totales liberados conforme avanza el tiempo de incubación incrementa con una ligera tendencia constante mientras que con la preparación multienzimática Nutrizyme no hay un incremento lineal, sin embargo, muestra mejores resultados en los minutos 150, 390 y 450 siendo este último el mayor con azúcares totales.

La Figura 6(b) se muestran los resultados obtenidos de la evaluación de la cantidad de azúcares totales liberados en ambas preparaciones multienzimáticas comerciales empleando solamente el sustrato de olote de maíz, en este caso para la preparación multienzimática Celluclast el valor máximo de azúcares totales fue de 63.4 ± 11.1 mg de glucosa/L en el minuto 90 del tiempo de incubación, empleando este sustrato los resultados no presentaron una tendencia a incrementar, en comparación para la preparación multienzimática Nutrizyme aunque los resultados no son lineales no presentaron una tendencia marcada a disminuir, el valor más alto obtenido de azúcares totales corresponde al minuto 270 con una cantidad de 538.6 ± 61.4 mg de glucosa/L.

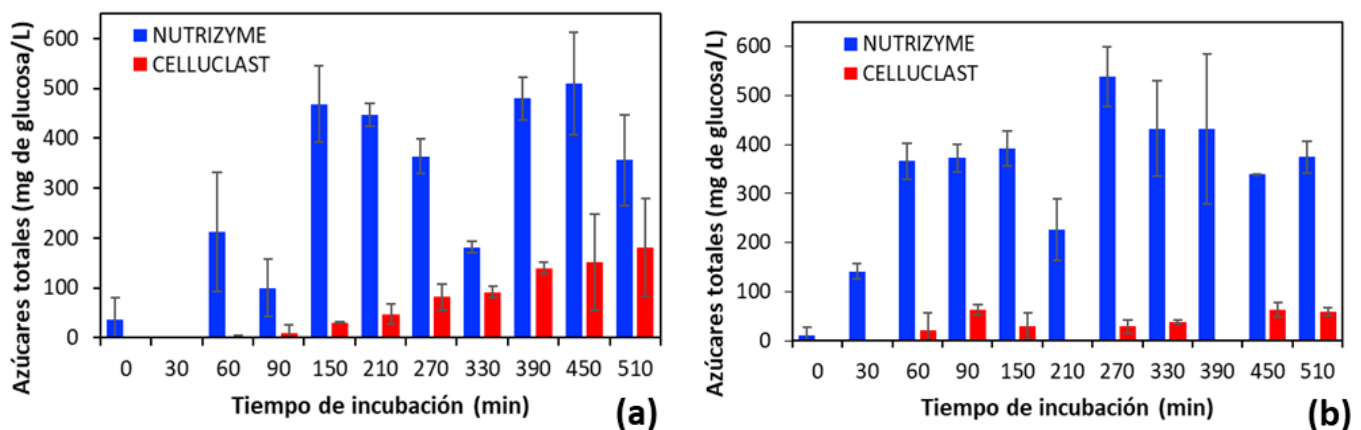


Figura 6. Hidrólisis enzimática mg de glucosa/L obtenidos de azúcares totales a partir de dos preparaciones multienzimáticas comerciales empleando dos sustratos. (a) Bagazo de caña, (b) Olote de maíz.

Cálculo de velocidad de hidrólisis enzimática.

En la Figura 7 se analizaron las distintas velocidades obtenidas durante el proceso de hidrólisis enzimática donde se observó que empleando la preparación multienzimática Nutrizyme con bagazo de caña como sustrato se obtuvo una velocidad 7 veces mayor que en el caso de la preparación multienzimática Celluclast con el mismo sustrato, mientras que con olote de maíz como sustrato al emplear Nutrizyme se obtuvo una velocidad de hidrólisis 5 veces mayor en comparación de la preparación Celluclast.

Así mismo se observó que al utilizar la preparación multienzimática Nutrizyme con ambos sustratos se obtienen mejores resultados en la velocidad de hidrólisis al emplear olote de maíz como sustrato teniendo una velocidad de 5.9 ± 1.4 mg de glucosa $L^{-1} \text{ min}^{-1}$, mientras que con el bagazo de caña como sustrato se obtuvo una velocidad de 2.9 ± 0.7 mg de glucosa $L^{-1} \text{ min}^{-1}$. La eficiencia hidrolítica de preparaciones comerciales multienzimáticas empleadas en la hidrólisis de biomasa celulósica depende de las propiedades individuales de cada enzima tales como eficiencia catalítica y estabilidad a altas temperaturas, así como de sus proporciones dentro de las preparaciones multienzimáticas (Gusakov et al., 2007; Van Dyk y Pletschke, 2012). La mayoría de las preparaciones comerciales multienzimáticas comercializadas para hidrolizar la celulosa provienen de *Trichoderma reesei*, entre las preparaciones más empleadas se encuentra Celluclast 1.5L (Singhania et al., 2010) sin embargo se han encontrado nuevas preparaciones que han demostrado poder competir e inclusive superar los resultados obtenidos con las preparaciones comúnmente empleadas, tal como lo es Nutrizyme, en este trabajo se obtuvieron mejores resultados empleando esta preparación comercial en comparación de una preparación utilizada a gran escala y mayormente reconocida.

Costo del proceso de hidrólisis enzimática

Como se observa en la Figura 8 se realizó un análisis del costo del proceso de hidrólisis enzimática, se obtuvo el precio por 1 mL el cual tuviera 840 U de actividad celulasa, a como se prepararon ambas preparaciones comerciales para llevar a cabo la hidrólisis enzimática.

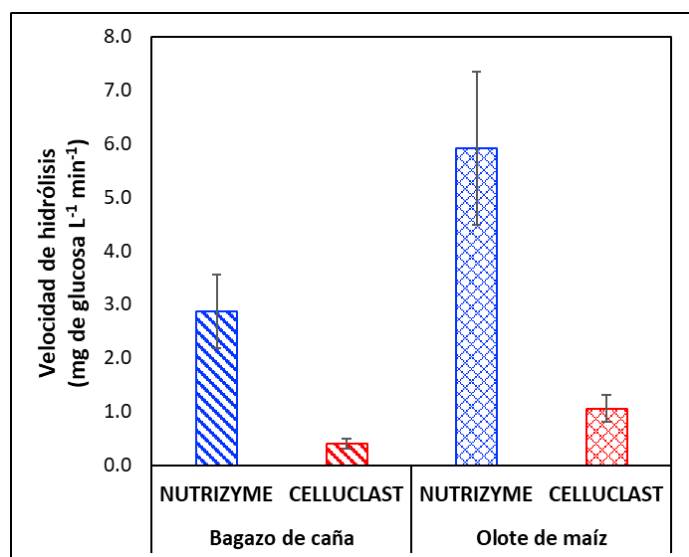


Figura 7. Velocidad de hidrólisis enzimática empleando dos preparaciones comerciales multienzimáticas con diferentes sustratos.

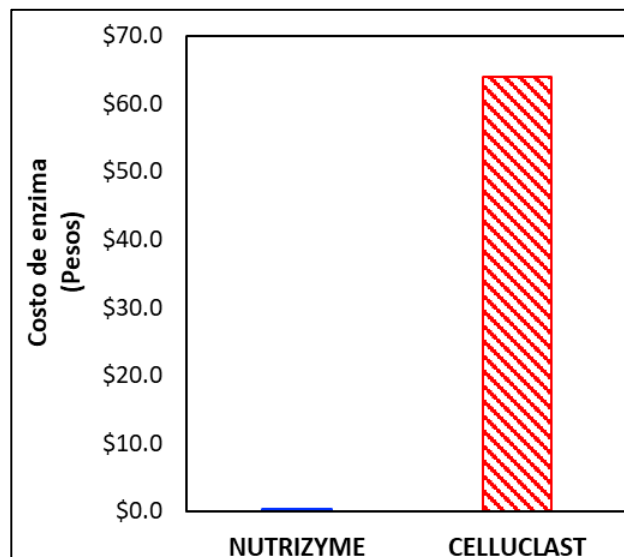


Figura 8. Costo comercial de las preparaciones comerciales multienzimáticas.

Se consideraron las presentaciones que tienen ambas preparaciones comerciales, siendo de 1 kg para Nutrizyme con un costo de \$122.061 y una presentación de 50 mL para Celluclast con un costo de \$3198. En el análisis elaborado el costo por preparación comercial utilizando 1 mL (840U) fue de \$0.4 para Nutrizyme y \$64 para Celluclast. Este último, es una de las preparaciones comerciales multienzimáticas mayormente utilizadas en el proceso de hidrólisis por su capacidad de degradar celulosa, sin embargo, su costo es demasiado elevado a comparación de la preparación comercial Nutrizyme que con la misma cantidad empleada tuvo un costo menor con mejor rendimiento, en este punto

se ven influenciados aspectos como costos de producción, es decir, si bien Celluclast es una preparación más conocida y empleada su presentación viene en menor cantidad y su sistema de producción podría ser a escala piloto debido a su demanda en cambio Nutrizyme es una preparación comercial que apenas está tomando valor en el ámbito industrial, su costo de producción es menor por lo cual es elaborada en grandes cantidades a nivel industrial, dichos factores deben ser tomados en cuenta para poder sacar un costo dentro de un proceso y elegir la mejor opción que brinde un mayor rendimiento a menor costo, como lo fue la preparación comercial Nutrizyme.

Cuantificación de la actividad enzimática exoglucanasa en una hidrólisis enzimática empleando dos preparaciones comerciales.

Para la cuantificación de la actividad enzimática exoglucanasa en una hidrólisis enzimática se emplearon como sustratos bagazo de caña y olote de maíz, las preparaciones multienzimáticas utilizadas fueron Celluclast 1.5L y Nutrizyme SFC-606 las cuales como se mencionó con anterioridad se prepararon para tener una cantidad de 840 Unidades de actividad celulasa total.

En la Figura 9 se muestran los resultados obtenidos de la cuantificación de actividad enzimática exoglucanasa como se indicó en el protocolo propuesto obteniendo que para el sustrato bagazo de caña con ambas preparaciones comerciales multienzimáticas los valores más altos se observaron en los primeros 30 minutos de incubación con valores de 145.9 ± 19.1 UI/L para la preparación comercial Nutrizyme, mientras que para la preparación comercial Celluclast fue de 81.5 ± 3.4 UI/L, así mismo se observó que la tendencia de la actividad enzimática exoglucanasa fue reduciendo conforme el tiempo incrementaba hasta tener un valor 8 veces menor para la preparación comercial Nutrizyme y 18 veces menor para la preparación comercial Celluclast.

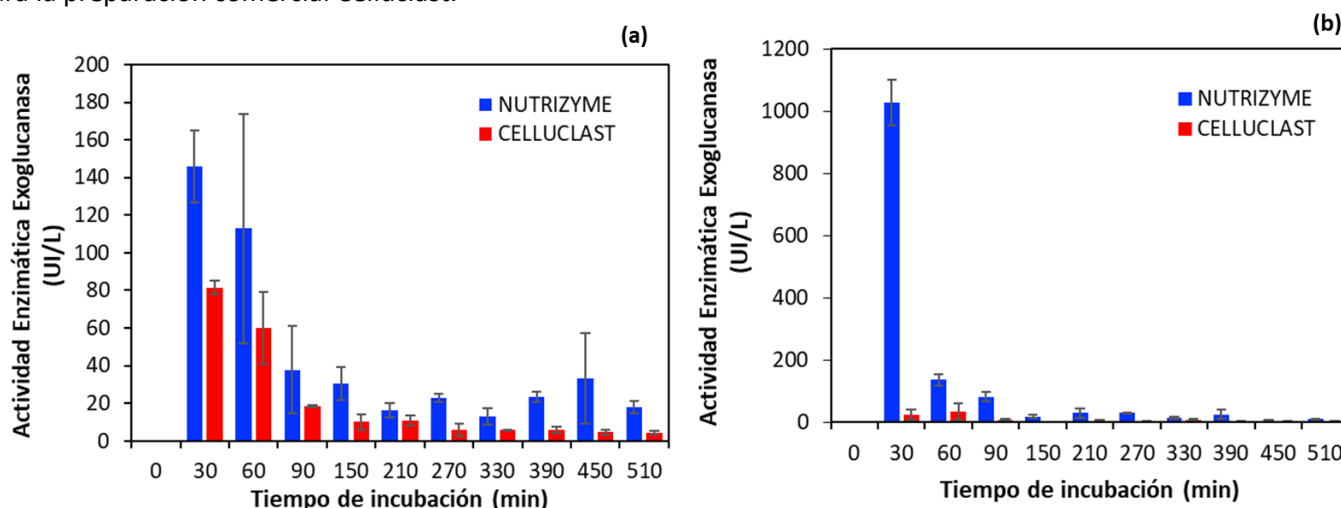


Figura 9. Actividad enzimática exoglucanasa a partir de una hidrólisis enzimática empleando bagazo de caña y olote de maíz como sustratos en dos preparaciones comerciales multienzimáticas. (a) Bagazo de caña, (b) Olote de maíz.

Para el sustrato olote de maíz se observó que los valores más altos de actividad enzimática exoglucanasa se obtuvieron en los primeros 30 minutos para ambas preparaciones comerciales, siendo para Nutrizyme 1027 ± 74.5 UI/L y 23.7 ± 17.6 UI/L para Celluclast, teniendo un resultado 43 veces mayor en la preparación Nutrizyme en comparación de la otra preparación comercial. Así mismo se notó un gran cambio en el valor de la actividad enzimática exoglucanasa en ambas preparaciones comerciales teniendo una tendencia decreciente conforme el tiempo de incubación incrementaba.

La eficiencia hidrolítica de preparaciones multienzimáticas se ve afectada por diferentes aspectos entre los cuales se encuentra la composición de estas, si bien es sabido que Celluclast es una preparación comercial utilizada con mayor frecuencia en procesos de hidrólisis de biomasa celulósica y lignocelulósica, solo es de conocimiento el microorganismo de procedencia (*Trichoderma reesei*) mas no las enzimas que componen dicha preparación comercial así como tampoco la cantidad de su composición. La preparación comercial Nutrizyme se compone de diferentes enzimas de las cuales se sabe la cantidad que contiene la composición de dicha preparación comercial, en los resultados obtenidos en este trabajo dentro de la hidrólisis enzimática tanto en la cuantificación de azúcares totales liberados así como en la cuantificación de la actividad enzimática exoglucanasa se obtuvieron mejores resultados al emplear la preparación

comercial Nutrizyme con olote de maíz como sustrato, una de las enzimas que contiene la preparación Nutrizyme es la Xilanas Kapoor *et al.*, (2016) menciona que dentro de la composición del olote de maíz se encuentra un 38.78 % de hemicelulosa, como se sabe el xilano es el componente mayoritario de la hemicelulosa, la enzima Xilanas podría estar hidrolizando los xilanos presentes en el olote de maíz a lo cual podría deberse la obtención de estos resultados empleando olote de maíz como sustrato en la preparación comercial Nutrizyme.

Conclusiones

Se demostró que existe una correlación lineal entre los métodos de medición de absorbancia de un espectrofotómetro y un lector de microplacas ya que al trazar la correlación entre ambos métodos se obtuvo un coeficiente de correlación (R^2) de 0.998 lo que indica que es posible establecer un protocolo para la cuantificación de la actividad enzimática exoglucanasa en microvolúmenes. Al evaluar en un microensayo el efecto de la temperatura y tiempo de incubación sobre la actividad enzimática exoglucanasa, así como el efecto del tiempo transcurrido para hacer la lectura de absorbancia, se obtuvieron mejores resultados de actividad enzimática exoglucanasa en un tiempo de incubación de 20 minutos a 60 °C para las muestras evaluadas, se determinó que el tiempo ideal para leer las muestras en el lector de microplacas es de 15 min como se estableció en la propuesta del protocolo del microensayo, ya que se encontró que entre más tiempo transcurra para hacer la medición de absorbancia, la actividad enzimática exoglucanasa de las muestras problema disminuye lo que ocasionaría lecturas erróneas debido a una subestimación de los valores reales de absorbancia.

En cuanto velocidad de hidrólisis se observó que al utilizar la preparación multienzimática Nutrizyme con ambos sustratos se obtienen mejores resultados al emplear olote de maíz como sustrato. Con los datos obtenidos, se podría concluir que debido a la composición de la preparación comercial multienzimática Nutrizyme y la composición del olote de maíz, este se hidrolizó de mejor manera. es importante resaltar que, aunque existan preparaciones comerciales que sean de uso recurrente en este tipo de procesos existe la posibilidad de la introducción de nuevas preparaciones comerciales que podrían demostrar mejor eficiencia a un menor costo tanto a escala laboratorio como a escala industrial, optimizando tiempos, condiciones y parámetros de trabajo en un proceso aprovechando así la biomasa vegetal de una mejor manera.

Agradecimientos y financiamiento: Se agradece al Dr. Domancar Orona Tamayo del CIATEC por el apoyo técnico brindado en la realización del presente trabajo y por la donación de la enzima Nutrizyme. Al Dr. Enrique Flores Andrade, responsable del Laboratorio 123 de la FCQ-UV, por sus comentarios en la redacción del presente trabajo.

Bibliografía

- Ghose, T.K. (1987). Measurement of cellulase activities. *Pure and Applied Chemistry*, 59(2), 257-268. <https://doi.org/10.1351/pac198759020257>.
- Gutiérrez, R.I., Moreno, S.N., & Montoya, D. (2015). Mecanismos y regulación de la hidrólisis enzimática de celulosa en hongos filamentosos: casos clásicos y nuevos modelos. *Revista Iberoamericana de Micología*, 32(1), 1-12. <https://doi.org/10.1016/j.riam.2013.10.009>
- Gusakov, A.V., Salanovich, T.N., Antonov, A.I., Ustinov, B.B., Okunev, O.N., Burlingame, R., Emalfarb, M., Baez, M. & Sinityn, A.P., (2007). Design of highly efficient cellulase mixtures for enzymatic hydrolysis of cellulose. *Biotechnology and Bioengineering*, 97: 1028-1038. . <https://doi.org/10.1002/bit.21329>.
- Hamada, N., Ishikawa, K., Fuse, N., Kodaira, R., Shimosaka, M., Amano, Y., Okazaki, M. (1999). Purification, characterization and gene analysis of exo-cellulase II (Ex-2) from the white rot basidiomycete *Irpex lacteus*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 87(4), 442-451. [https://doi.org/10.1016/s1389-1723\(99\)80092-9](https://doi.org/10.1016/s1389-1723(99)80092-9).
- Kapoor, M., Panwar, D., & Kaira, G. S. (2016). Bioprocesses for Enzyme Production Using Agro-Industrial Wastes. *En Elsevier eBooks* (pp. 61-93). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802392-1.00003-4>.
- Kuan-Yeow S. y Xinxin G. (2012). *Industrial waste. Rijeka*, ED. InTech. Croacia. pp.121-122.
- Lee H. V., A. Hamid S. B. y Zain S. K. (2014). Conversion of lignocellulosic biomass to nanocellulose: structure and chemical processes. *The Scientific World Journal* 2014:1-20.
- Oleszek, M., Kowalska, I., Bertuzzi, T., & Oleszek, W. (2023). Phytochemicals Derived from Agricultural Residues and Their Valuable Properties and Applications. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 28(1), 342. <https://doi.org/10.3390/molecules28010342>.
- Peralta, R. M., da Silva, B. P., Côrrea, R. C. G., Kato, C. G., Seixas, F. A. V., & Bracht, A. (2017). Enzymes from basidiomycetes—peculiar and efficient tools for biotechnology. In *Biotechnology of microbial enzymes* (pp. 119-149). *Academic Press*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803725-6.00005-4>.
- Singhania, R.R., Sukumaran, R.K., Patel, A.K., Larroche, C. & Pandey, A., (2010). Advancement and comparative profiles in the production technologies using solid-state and submerged fermentation for microbial cellulases. *Enzyme and Microbial Technology*, 46: 541-549. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.enzymictec.2010.03.010>.

-
- Thapa, S., Mishra, J., Arora, N., Mishra, P., Li, H., Bhatti, S., & Zhou, S. (2020). Microbial cellulolytic enzymes: diversity and biotechnology with reference to lignocellulosic biomass degradation. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 19(3), 621-648. ISSN: 1569-1705.
- Van Dyk, J. & Pletschke, B., I. (2012). A review of lignocellulose bioconversion using enzymatic hydrolysis and synergistic cooperation between enzymes-Factors affecting enzymes, conversion and synergy. *Biotechnology Advances*, 30: 1458-1480. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2012.03.002>.