

**Producción de xilooligosacáridos (XOs) mediante hidrólisis enzimática de hemicelulosa  
extraída del pergamino de café**

**Carlos Alfonso Chacón Leal**

**Gabriela Herrera Arias**

**Trabajo de grado para optar al título de Ingeniero Químico**

**Director: Débora Alcida Nabarlatz.**

**Ph.D. en Ingeniería Química y de Procesos**

**Codirector: Rolando Andrés Acosta Fernández.**

**M.Sc. en Ingeniería Química**

**Universidad Industrial de Santander**

**Facultad de Ingenierías Físicoquímicas**

**Escuela de Ingeniería Química**

**Bucaramanga**

**2018**

### **Agradecimientos**

A la profesora Débora y a Rolando por la confianza que depositaron en nosotros, por ser nuestros guías en este proyecto y por motivarnos a hacer las cosas de la mejor manera.

A los miembros del grupo de investigación INTERFASE por la colaboración, el acompañamiento y la mamadera de gallo a lo largo del tiempo que compartimos en el laboratorio.

Al grupo de investigación CICTA por su amable ayuda y generosidad. Sin su colaboración este proyecto no hubiera sido posible.

A Inés Hernández y sus estudiantes del laboratorio de hongos por su entera disposición a ayudarnos con nuestros problemas y dudas.

### **Dedicatorias**

Dedico este proyecto, fruto de todo mi esfuerzo y dedicación, a Dios por ser quien me daba la fuerza cada día para levantarme y continuar así no quisiera.

A mi mamá Claudia, a quien le dedicaré todo lo que consiga en la vida y más, porque es la causante de que hoy sea el hombre que soy.

A mi papá Carlos, quien ha sido mi mentor en la vida y me ha inculcado los valores y principios que hoy me caracterizan.

A mi hermana Fernanda, quien ha sido y será mi mayor ejemplo y apoyo en la vida.

A Ana, Clara, Maritza, Milena, Valentina, Oscar, Dora y demás familiares que me han acompañado a lo largo de mi vida, especialmente en esta etapa universitaria.

A Jully y “Wilfrido”, sin duda los mejores amigos que podría desear. Al negro, José, Jhonchi, a todos Los Que Son, y a mis compañeros del CEIQ, por ser parte de estos años tan maravillosos.

Y a Gaby, mi compañera, de tesis y de vida, por toda la paciencia y amor que me has tenido estos años, y espero no culminen acá. Lo logramos Tipolina!

**Carlos Alfonso Chacón Leal**

A Abraham y Juan que son mi razón de vivir. Este logro es para ustedes, espero que sea un ejemplo de que todo se puede lograr con dedicación.

A mi papá por enseñarme que es lo verdaderamente importante en la vida y a mi mamá por su apoyo incondicional, por ustedes hoy soy ingeniera.

A mi gema Lau, por mostrarme que es tener una hermana y mejor amiga a la vez.

A mama Fanny por estar siempre pendiente de mí y contarme las mejores historias una y otra vez. A mami Luchy por sus constantes oraciones y preocupación.

A mis tíos y primos por ser la mejor familia que una persona puede tener.

A Gaby y Willy por ser verdaderos amigos.

A cada una de las personas que de una u otra forma han contribuido en mi proceso de formación personal y profesional.

Y a Carlos, mi tipolino, porque sin él no hubiera podido con esto, gracias por ayudarme a ser cada día mejor y traer felicidad a mi vida.

**Gabriela Herrera Arias**

**Tabla de contenido**

Introducción ..... 17

1. Estado del arte..... 18

    1.1. Hidrólisis enzimática ..... 20

2. Objetivos..... 26

    2.1. Objetivo general..... 26

    2.2. Objetivos específicos ..... 26

3. Metodología ..... 27

    3.1. Producción del hidrolizado de pergamino de café..... 27

    3.2. Ajustes al protocolo de determinación de la actividad enzimática ..... 28

        3.2.1. Selección del sustrato a utilizar en la medición de la actividad enzimática ..... 28

        3.2.2. Determinación de la actividad enzimática ..... 28

    3.3. Etapa 1: Efecto de las principales variables de reacción ..... 30

        3.3.1. Variación de pH y temperatura ..... 31

        3.3.2. Variación del tiempo de reacción ..... 31

    3.4. Etapa 2: Efecto del incremento del volumen de reacción..... 31

    3.5. Etapa 3: Determinación de la cinética de reacción enzimática..... 32

4. Resultados y análisis ..... 33

    4.1 Determinación de la actividad enzimática. .... 33

        4.1.1. Evaluación de sustratos para la determinación de la actividad enzimática ..... 33

4.1.2 Determinación de la actividad enzimática .....	36
4.2. Efectos de los parámetros de reacción en la producción de XO <sub>s</sub> .....	37
4.3. Evaluación del efecto del incremento del volumen de reacción en la producción de XO <sub>s</sub> . .....	41
4.4 Análisis de la cinética de reacción enzimática.....	42
5. Conclusiones .....	45
Recomendaciones .....	46
Referencias bibliográficas.....	47
Apéndices.....	50

**Lista de tablas**

Tabla 1. Condiciones de producción de XO<sub>s</sub> a partir de diferentes materias primas ..... 22

Tabla 2. Parámetros cinéticos para las diferentes concentraciones de enzima ..... 44

**Lista de figuras**

Figura 1. A) Estructura de xilano con sus posibles ramificaciones y las respectivas enzimas para realizar una hidrolisis completa. B) Formación de monómeros de xilosa mediante la acción de la $\beta$ -xilosidasa.....	21
Figura 2. Resumen de la metodología del proyecto.....	27
Figura 3. a) Comparación de la distribución de peso molecular del xilano comercial de mazorca y el hidrolizado de pergamino de café. b) Efecto del tratamiento con carbón activado (hidrolizado tratado) y del ajuste de pH (hidrolizado pH 5) sobre la distribución de peso molecular del hidrolizado de pergamino de café.....	34
Figura 4. a) Hidrolizado de pergamino de café. b) Hidrolizado tratado con carbón activado en 1 etapa durante 24 horas. c) Hidrolizado tratado con carbón activado en 2 etapas durante 24 y 18 horas respectivamente.....	35
Figura 5. Producción de azúcares reductores para la determinación de la actividad enzimática a pH 4.6, 40°C y 0.1 mg de enzima/mL de reacción, sobre el hidrolizado de pergamino tratado a una relación 9:1 v/v de sustrato:enzima.....	36
Figura 6. Producción de azúcares reductores a diferentes condiciones de pH y temperatura durante 20 min de reacción, usando hidrolizado de pergamino tratado como sustrato a una relación 9:1 v/v de sustrato:enzima.....	37
Figura 7. Comparación de las distribuciones de peso molecular de los productos de las reacciones a pH 5 y diferentes temperaturas durante 20 min. ....	38
Figura 8. Producción de azúcares reductores en función del tiempo de reacción a 40 °C y pH 5, usando hidrolizado de pergamino tratado como sustrato a una relación 9:1 v/v de sustrato:enzima. ....	39

Figura 9. Efecto del incremento del tiempo de reacción en la distribución de peso molecular de los productos de la hidrólisis enzimática a pH 5.0 y 40 °C. .... 40

Figura 10. Producción de azúcares reductores en función de la variación del volumen de reacción a 40°C y pH 5, usando hidrolizado de pergamino tratado como sustrato con relación sustrato:enzima de 9:1 v/v. .... 41

Figura 11. Representación gráfica del modelo de Michaelis-Menten utilizando una concentración enzimática de 1 mg/mL..... 43

Figura 12. Linealización de Lineweaver-Burk para las reacciones a pH 5.0 y 40 °C a diferentes concentraciones de enzima. .... 44

**Lista de Apéndices**

Apéndice A. Enzima Xylanase AN900 .....	50
Apéndice B. Preparación de reactivos para el método DNS .....	52
Apéndice C. Curva estándar de azúcares reductores. ....	53
Apéndice D. Resultados de pruebas por método DNS con xilano comercial de mazorca. ....	55
Apéndice E. Resultados adicionales para la variación de pH y T .....	56
Apéndice F. Soportes del análisis de la cinética de reacción.....	58

### **Lista de siglas**

XO<sub>s</sub>: Xilooligosacáridos

GP: Grado de polimerización

HMF: Hidroximetilfurfural

K<sub>m</sub>: Constante de Michaelis-Menten

V<sub>máx</sub>: Velocidad Máxima

AR: Azúcares Reductores

GPC: Gel Permeation Chromatography

HPLC: High Performance Liquid Chromatography

Mx<sub>T</sub>: Monómeros de Xilosa Totales

Mx: Monómeros de Xilosa

UI: Unidades enzimáticas Internacionales (μmol de AR/min)

**RESUMEN**

**TITULO:** PRODUCCIÓN DE XILOOLIGOSACÁRIDOS (XOs) A PARTIR DE HEMICELULOSA EXTRAÍDA DEL PERGAMINO DE CAFÉ, MEDIANTE HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA. \*

**AUTORES:** CARLOS ALFONSO CHACÓN LEAL, GABRIELA HERRERA ARIAS. \*\*

**PALABRAS CLAVE:** XILOOLIGOSACÁRIDOS, ENDOXILANASA, HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA, GRADO DE POLIMERIZACIÓN, AZÚCARES REDUCTORES.

**DESCRIPCIÓN:** El pergamino de café es un subproducto residual de la industria cafetera del que se producen más de 4,000 ton/mes en Colombia. Debido a su alto contenido de hemicelulosa, se ha propuesto como materia prima para la producción de xilooligosacáridos (XOs), ingredientes alimenticios con propiedades prebióticas, pero el método de extracción empleado (autohidrólisis) genera una mezcla de XOs conteniendo oligómeros de alto peso molecular, monómeros y compuestos indeseados. Es por esto que la hidrólisis enzimática se propone como una segunda etapa de tratamiento para la producción de XOs a partir del hidrolizado de pergamino de café, utilizando una enzima comercial *Xylanase AN900*, encontrando que la mejor producción se da a pH 5.0, 40 °C y 30 min de reacción, con una concentración enzimática de 0.36 UI/mL, indicando una alta efectividad por parte de ésta. El incremento del volumen de reacción de 2 a 100 mL ha permitido verificar que el comportamiento de las reacciones es muy similar para todos los volúmenes, lo que resulta muy prometedor para el incremento de dicho proceso a escalas de mayor magnitud. Finalmente, la cinética de reacción descrita por el modelo de Michaelis-Menten señala una buena afinidad entre la enzima y el sustrato ( $K_m=11.35$  mg/mL y  $V_{m\acute{a}x}=0.146$  mg/mL\*min).

---

\*Trabajo de grado.

\*\*Facultad de ingenierías fisicoquímicas. Escuela de ingeniería química. Directora: Ph.D.

Débora A. Nabarlatz. Codirector: M. Sc. Rolando A. Acosta Fernández.

**ABSTRACT**

**TITLE:** PRODUCTION OF XYLOOLIGOSACCHARIDES (XOS) FROM HEMICELLULOSE EXTRACTED FROM COFFEE PARCHMENT, BY ENZYMATIC HYDROLYSIS. \*

**AUTHORS:** CARLOS ALFONSO CHACÓN LEAL, GABRIELA HERRERA ARIAS. \*\*

**KEYWORDS:** XYLOOLIGOSACCHARIDES, ENDOXYLANASE, ENZYMATIC HYDROLYSIS, POLYMERIZATION DEGREE, REDUCING SUGARS.

**DESCRIPTION:** The parchment coffee is a residual by-product of the coffee industry, which produces more than 4,000 tons/month in Colombia. Due to its high content of hemicellulose, has been proposed as a raw material for the production of xylooligosaccharides (XOs), food ingredients with Prebiotic properties, but the extraction method used (autohydrolysis) generates a mixture of XOs containing high molecular weight oligomers, monomers and unwanted compounds. Is for this reason that the enzymatic hydrolysis is proposed as a second stage of treatment for the production of XOs from the hydrolysate of parchment coffee, using a commercial enzyme Xylanase AN900, finding that the best production occurs at pH 5.0, 40 ° C and 30 min of reaction, with an enzymatic concentration of 0.36 IU/mL, indicating a high effectiveness by this enzyme. The increase in the volume of reaction from 2 to 100 mL has made it possible to verify that the behavior of the reactions is very similar for all volumes, which is very promising for the increase of this process at larger scales. Finally, the reaction kinetics described by the Michaelis-Menten model designates a good affinity between the enzyme and the substrate ( $K_m = 11.35 \text{ mg/mL}$  and  $V_{max} = 0.146 \text{ mg/mL} \cdot \text{min}$ ).

---

\*Bachelor Thesis.

\*\*Facultad de ingenierías fisicoquímicas. Escuela de ingeniería química. Directora: Ph.D. Débora A. Nabarlatz. Codirector: M. Sc. Rolando A. Acosta Fernández.

## Introducción

Los xilooligosacáridos (XOs) son moléculas de bajo peso molecular constituidas por la unión de 2 a 20 unidades monoméricas de xilosa mediante enlaces  $\beta$  1-4 (Hopkins, Cummings, & Macfarlane, 1998). Estas moléculas tienen un gran valor agregado para la industria alimenticia ya que tienen propiedades prebióticas pues son oligosacáridos no digeribles (Voragen, 1998), es decir, son ingredientes alimenticios que no se absorben ni se hidrolizan antes de llegar al intestino, y son un sustrato selectivo que promueve la actividad de bacterias presentes en el colon alterando benéficamente la flora intestinal (G. R. Gibson & Roberfroid, 1995). Estos oligosacáridos se obtienen de la hidrólisis de xilano presente en la hemicelulosa de materiales lignocelulósicos como la biomasa residual de la industria agrícola (Vázquez, Alonso, Domínguez, & Parajó, 2001).

El grupo de investigación INTERFASE ha evaluado el potencial de los residuos de la agroindustria de café para producir XOs, encontrando que el pergamino posee un alto contenido de hemicelulosa (Sanabria, 2016), del cual se produce un hidrolizado en forma líquida conteniendo 12.3 mg de xilano/mL, extraído mediante autohidrólisis a 180°C. Además; se observó que con el incremento de la severidad del proceso (aumento de tiempo y temperatura), los oligómeros se despolimerizan a sus monómeros constituyentes y generan productos de degradación los cuales son indeseados para este proceso (Sandoval & Viviescas, 2017). Este hidrolizado presenta una distribución de peso molecular entre los 0.15 y 800 KDa (Guerrero, 2018), lo que indica que una fracción del xilano extraído no se encuentra dentro del rango mencionado para los XOs (desde 0.28 hasta 2.66 KDa), por lo que se requieren procesos adicionales para incrementar la cantidad de XOs con la distribución de peso deseada.

La hidrólisis enzimática se presenta como una segunda etapa que permite aumentar la cantidad de XO<sub>s</sub> en el hidrolizado de pergamino de café, ya que las enzimas xilanasas despolimerizan la cadena principal de xilano en moléculas con bajo grado de polimerización (GP), el cual indica la cantidad de monómeros que constituyen la molécula. Este proceso tiene múltiples ventajas como el uso de bajas temperaturas de reacción (entre 40 y 70°C), la baja producción de monosacáridos y compuestos indeseados como el furfural, lo que hace al proceso altamente selectivo (Akpınar, Erdogan, Bakir, & Yılmaz, 2010); así mismo, es un proceso no contaminante pues no se requieren reactivos químicos adicionales, por lo que se generan productos con menor impacto ambiental (Khan, 2010).

Las enzimas comerciales son mezclas de diferentes enzimas en las que una de ellas predomina en actividad. El uso de este tipo de enzimas, además de traer beneficios económicos debido a su bajo costo, puede favorecer la hidrólisis ya que la mayoría de reacciones se mejoran con la presencia de otras actividades enzimáticas (Loera, 2002).

Por lo anteriormente mencionado, el objetivo del trabajo fue aumentar la cantidad de xilooligosacáridos presentes en el hidrolizado de pergamino de café, utilizando una etapa de hidrólisis enzimática con una endoxilanasas comercial, analizando los efectos de diferentes variables de reacción y determinando la cinética de la reacción.

## **1. Estado del arte**

Los xilooligosacáridos son moléculas de peso molecular entre 0.28 y 2.66 KDa (GP entre 2 y 20) constituidas por cadenas de xilosa unidas mediante enlaces glucosídicos (Hopkins et al., 1998).

La industria alimenticia presenta un gran interés en estos oligosacáridos debido a que tienen propiedades prebióticas como la reducción de infecciones agudas y reacciones inflamatorias (Isolauri, 2001), la estimulación del sistema inmune (Briet et al., 1997), la disminución de la intolerancia a la lactosa (Kim & Gilliland, 1983) y la reducción del riesgo de adquirir cáncer de colon (G. Gibson & Macfarlane, 1995). Estas características son exclusivas de los oligosacáridos (GP entre 2 y 20) pues los polisacáridos, que son macromoléculas formadas por la unión de muchas unidades de xilosa (GP > 20) y otros monómeros, no son considerados prebióticos ya que sólo promueven la generación de energía, sustratos metabólicos y micronutrientes para su consumidor (Corzo et al., 2015). Además, la dosis mínima requerida de XO<sub>s</sub> para obtener un efecto prebiótico en humanos es de 1 g/día, un valor bajo comparado a otros oligosacáridos como los galactooligosacáridos (10 g/día) o la rafinosa (15 g/día) (Rycroft, Jones, Gibson, & Rastall, 2001).

Los residuos agroindustriales son una fuente de obtención de los XO<sub>s</sub> por lo que se han investigado diferentes materiales lignocelulósicos para ser usados como sustratos en su obtención. Algunas de estas materias primas son los residuos del cultivo de maíz (Teng, Yan, Jiang, Fan, & Shi, 2010), paja de trigo, paja de cebada, cáscaras de arroz, semillas de oliva y cáscaras de almendras (Nabarlatz, Ebringerová, & Montané, 2007), tallos de tabaco (Akpınar et al., 2010) y tallos de algodón (Akpınar, Ak, Kavas, Bakir, & Yilmaz, 2007).

Una de las materias primas colombianas con mayor potencial y novedad para la producción de XO<sub>s</sub> es el pergamino de café debido a su alto contenido de hemicelulosa, principal fuente de oligosacáridos, lo que representa una característica muy llamativa para la investigación y el desarrollo de productos con valor agregado (Sanabria, 2016). En Colombia se producen en promedio 70,970 toneladas de este grano al mes (Federación Nacional de Cafeteros, 2017), de

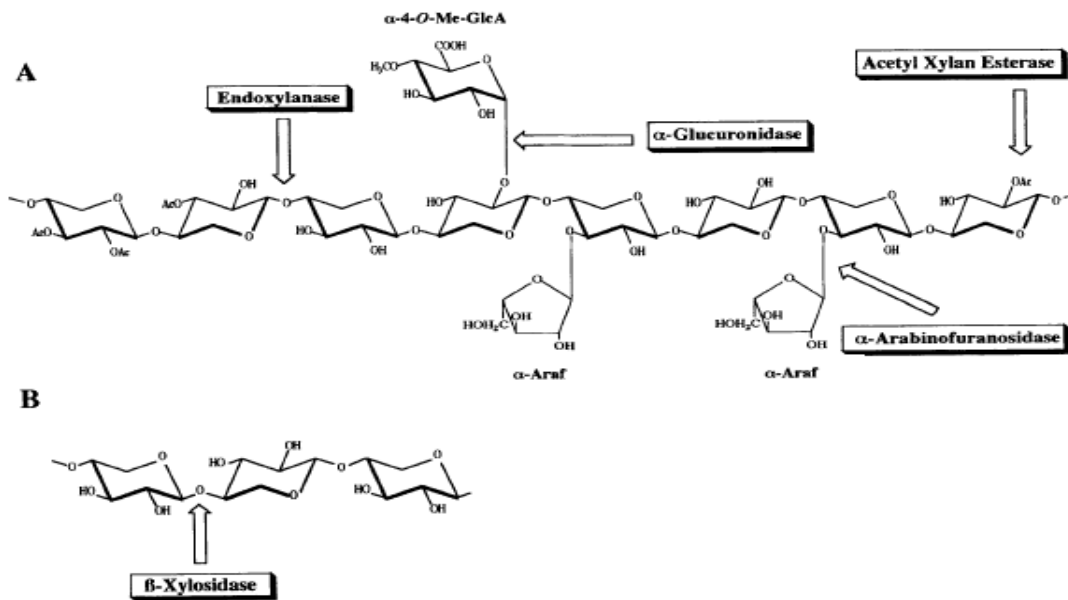
los cuales 4,330 toneladas son pergamino de café, un desecho de la producción, convirtiéndolo en un sustrato económico y disponible.

Dentro de los métodos usados para la producción de XO<sub>s</sub> se encuentran la hidrólisis química, la autohidrólisis y la hidrólisis enzimática. La hidrólisis química consiste en la adición de catalizadores ácidos o básicos para transformar el xilano en productos de menor peso molecular. La implementación de esta técnica trae consigo algunos inconvenientes como el efecto corrosivo en los equipos usados (Khan, 2010) y el requerimiento de grandes cantidades de ácido concentrado para poder alcanzar rendimientos de hidrólisis superiores al 90%, lo que a su vez conlleva a la necesidad de tratamientos de recuperación de dicho ácido, proceso que incrementan el costo del método (Oliva, 2003). Otro inconveniente es la producción de monómeros, furfural e hidroximetilfurfural (HMF) (Pereira, 2003), que son productos indeseados de la hidrólisis, lo que disminuye la pureza del producto. Por otra parte, la autohidrólisis utiliza agua como solvente a altas temperaturas. Este método maneja valores bajos de pH sin la necesidad de adicionar ácidos, por lo que no se requieren procesos de neutralización de los hidrolizados y además no genera corrosión en los equipos. Su principal inconveniente es que los productos presentan un gran contenido de polisacáridos y compuestos indeseados como el ácido acético, ácido fórmico, furfural y HMF (Xiao et al., 2013).

### **1.1. Hidrólisis enzimática**

Los procesos enzimáticos han sido de gran interés debido a su especificidad y la pureza de los XO<sub>s</sub> producidos, sin presencia de furfural y baja concentración de monosacáridos (Akpınar et al., 2010). Además, este tipo de hidrólisis es amigable al ambiente pues no se liberan vapores tóxicos, no se generan productos contaminantes, ni hay presencia de ácidos corrosivos como es el caso de la hidrólisis química (Khan, 2010).

Los XO<sub>s</sub> se obtienen a partir de la hemicelulosa, polímero presente en las estructuras vegetales junto a otros, como la celulosa y la lignina. A diferencia de la celulosa, que sin importar su origen siempre está compuesta únicamente por largas cadenas de monómeros de glucosa, la hemicelulosa está compuesta principalmente por largas cadenas de xilosa con ramificaciones de algunos otros monómeros y varía su composición según la planta que la contenga (Biely, 1985). Es por esto que para realizar una mejor hidrólisis de la hemicelulosa se necesitarían una gran variedad de enzimas con la capacidad de degradar cada uno de los enlaces específicos del sustrato, como se puede ver en la Figura 1.



**Figura 1.** A) Estructura de xilano con sus posibles ramificaciones y las respectivas enzimas para realizar una hidrólisis completa. B) Formación de monómeros de xilosa mediante la acción de la β-xilosidasa. Adaptado de Sunna y Antranikian (1997).

Considerando que la formación de monómeros de xilosa durante la reacción es indeseada, al mismo tiempo que afecta la producción de XO<sub>s</sub> por inhibición competitiva de la enzima, es necesario que el complejo enzimático utilizado para el proceso tenga una baja actividad de exoxilanasas (β-xilosidasas) ya que estas son las responsables de hidrolizar los extremos de las

cadena de xilano y producir monómeros de xilosa (Figura 1.B). Por el contrario, la actividad de endoxilanasas debe ser alta debido a que estas actúan sobre los enlaces β-1,4 de la cadena principal del xilano, produciendo cadenas más cortas hasta alcanzar un GP mínimo de 2.

Además del tipo de enzima usada, las condiciones de operación de este tipo de hidrólisis son fundamentales en la producción de XO<sub>s</sub>. Algunos autores han establecido estas condiciones como parámetros específicos, mientras que otros han analizado el efecto de los cambios en algunas variables sobre los rendimientos del método.

**Tabla 1.**

*Producción de XO<sub>s</sub> mediante hidrólisis enzimática a partir de diferentes materias primas.*

	Enzima purificada		Enzima comercial	
Materia prima	Madera de mango y caoba.	Residuos del cultivo de maíz.	Populas tomentosa.	Tallos de tabaco.
Método de producción del hidrolizado	Alcalino 0.05N NaOH	Explosión de vapor	Hidrólisis química	Hidrólisis química
Autores	Rajagopalan, Shanmugavelu, & Yang (2017)	Teng et al. (2010)	Yang, Wang, Song, & Xu (2011)	Akpinar et al. (2010)
Parámetros y variables de reacción				
Temperatura [°C]	50	70	40 - 50	30 - 50
pH	5.0	7.0	3.6 – 6.0	4.5 – 6.5
Tiempo [h]	24	0 - 4	2 - 24	2 – 24
Concentración de enzima [UI/mL]	1	2 - 12	15 – 45*	0 - 16.5
Método de análisis	DNS y HPLC	DNS y HPLC	DNS, GPC y HPAEC**	DNS y HPLC
Resultados de la hidrólisis enzimática				
Condiciones óptimas	-	7.5 UI/mL y 2.5 h	50 °C, pH 5.4, 25 UI/g y 14 h	40 °C, pH 5.5, 4.1 UI/mL y 24 h
Producción de XO <sub>s</sub> [g/100 g xilano]	52.7 y 43.4	28.6	36.8	11.4
GP de productos	2 a 3	2 a 3	2 a 4	2 a 3

Nota: \*Concentración de enzima en UI/g de sustrato.

\*\*High Performance Anion Exchange Chromatography

En la Tabla 1 se encuentran las diferentes materias primas con las que han trabajado algunos autores, el método de producción del hidrolizado utilizado como materia prima, las condiciones de reacción enzimática empleadas y los resultados de la misma. De la variación del pH y la temperatura Yang et al. (2011) y Akpinar et al. (2010) obtienen resultados similares, alcanzando la mayor concentración de XO<sub>s</sub> a pHs cercanos a 5.5 y temperaturas entre 40 y 50 °C. Estos valores se asemejan a los seleccionados por Rajagopalan et al. (2017) como parámetros de reacción lo que nos da un indicio de las mejores condiciones de operación para las enzimas xilanasas. En el caso de Teng et al. (2010) los valores de temperatura y pH difieren de los mencionados anteriormente debido a que utilizan una enzima termoestable, característica que permite mantener el procedimiento a altas temperaturas y pH neutro para disminuir el tiempo de reacción sin afectar la producción de XO<sub>s</sub>. Al variar el tiempo de reacción todos los autores reportan diferentes valores óptimos para obtener productos con GP de 2 a 3, pero coinciden en que la concentración de XO<sub>s</sub> aumenta conforme transcurre el tiempo hasta alcanzar la estabilización. Para Akpinar et al. (2010) el hecho de que la hidrólisis del xilano sea más lenta a partir de las 24 h indica que la actividad de la endoxilanasas disminuyó debido a la inhibición por producto final o porque disminuyeron los sitios de hidrólisis disponibles del xilano.

Comparando la hidrólisis con una enzima comercial (Yang et al., 2011) y una purificada (Rajagopalan et al., 2017) a condiciones de reacción similares sobre xilano extraído de maderas duras, se observa que con la enzima comercial se obtienen 36.8 g de XO<sub>s</sub> /100 g de xilano y con la purificada entre 43.4 y 52.7 g de XO<sub>s</sub> /100 g de xilano. Estos resultados no son muy diferentes y la variación de XO<sub>s</sub> producidos se puede deber en parte a la materia prima empleada en ambos casos, por lo que la purificación de la enzima, proceso que incrementa los costos, no se justifica.

La producción de XO<sub>s</sub> se puede analizar de mejor forma si se conoce la cinética de la reacción enzimática. El modelo cinético de Michaelis-Menten (ecuación 1) ha sido el más utilizado a lo largo del tiempo para determinar el comportamiento de las enzimas sobre un sustrato específico, donde los parámetros  $K_M$  (constante de Michaelis-Menten para la reacción) y  $V_{m\acute{a}x}$  (velocidad de reacción máxima) representan la afinidad de la enzima por el sustrato utilizado y la tasa máxima de formación de producto respectivamente, además de indicar posibles inhibiciones durante la reacción. Este modelo analiza el comportamiento de las enzimas cuando la reacción alcanza el estado estacionario, es decir, cuando la formación de productos es constante, para lo cual la concentración de sustrato debe ser mucho mayor que la concentración de la enzima y así asegurar que la totalidad de los sitios activos estén ocupados por sustrato.

$$v_0 = \frac{v_{m\acute{a}x} \times [S]}{K_M + [S]} \quad (1)$$

La cinética de enzimas xilanasas ha sido analizada por Ai et al. (2005) y Dutta y Chakraborty (2015) quienes, utilizando enzimas purificadas y xilano de madera de haya, han obtenido valores de  $K_M$  de 1.42 y 3.93 mg/mL respectivamente. Estos valores se encuentran entre los reportados por Dekker y Richards (1976) quienes establecen que el rango de valores de  $K_m$ , para endoxilanasas obtenidas a partir de hongos, debe estar entre 0.27 y 14 mg/mL. Enzimas comerciales como Rocksoftm Super Ace (celulasa) han sido estudiadas por Acevedo, Granados y Guerrero (2014) usando bagazo de caña como sustrato; encontrando que para estos casos (enzima comercial) es posible que el sustrato utilizado no sea afín a la enzima debido a su composición, considerando un valor de  $K_M$  alto (22.86 mg/mL de reacción) y una  $V_{M\acute{a}x}$  baja (0.12 mg/mL de reacción·min). Debido a la variedad de resultados entre autores, cada vez que se

desea evaluar una nueva fuente de xilano, es necesario analizar el efecto de las condiciones de proceso de reacción para conocer la afinidad entre el sustrato y la enzima.

## 2. Objetivos

### 2.1. Objetivo general

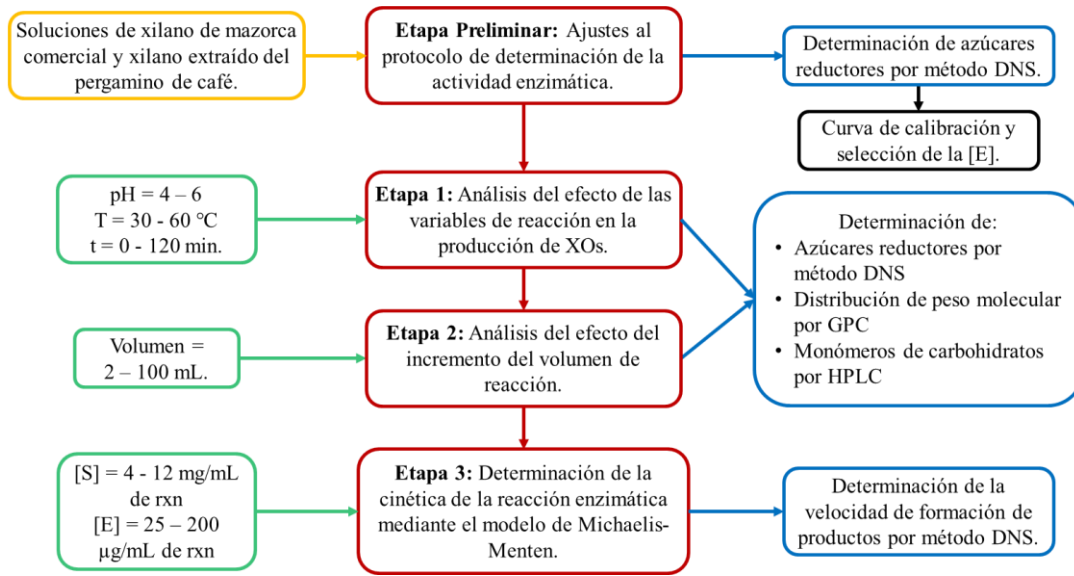
Evaluar la producción de Xilooligosacáridos (XOs) mediante hidrólisis enzimática del xilano presente en el hidrolizado de pergamino de café.

### 2.2. Objetivos específicos

- Identificar las condiciones de reacción favorables (variando temperatura, pH y tiempo de reacción) para la hidrólisis enzimática de xilano de pergamino de café utilizando una endoxilanasas comercial a escala de 2mL.
- Evaluar la hidrólisis enzimática de xilano de pergamino de café al aumentar el volumen de reacción hasta 100 mL.
- Analizar el mecanismo de reacción de la enzima endoxilanasas mediante el modelo cinético de Michaelis-Menten.

### 3. Metodología

La metodología establecida para el desarrollo de esta investigación se resume en el diagrama presentado en la Figura 2.



**Figura 2.** Resumen de la metodología del proyecto

#### 3.1. Producción del hidrolizado de pergamino de café

El hidrolizado de pergamino de café se obtuvo mediante un proceso de autohidrólisis siguiendo los parámetros establecidos por el grupo INTERFASE (Sandoval y Viviescas, 2017), utilizando un reactor Parr 4848 en acero inoxidable de 1 galón. Se adicionaron pergamino de café y agua destilada en una relación 1:8 p/v al reactor y se calentó hasta llegar a 180°C, para luego ser enfriado rápidamente con agua y detener la reacción. Una vez finalizado el proceso, el producto se filtró para desechar el sólido y almacenar el líquido a -23 °C para la posterior hidrólisis enzimática.

### 3.2. Ajustes al protocolo de determinación de la actividad enzimática

**3.2.1. Selección del sustrato a utilizar en la medición de la actividad enzimática.** Para analizar el comportamiento de la enzima endoxilanasas se escogieron como sustratos un xilano comercial en polvo (*Xylan from corncob*, CARBOSYNTH LTD, Berkshire, UK), y el hidrolizado de pergamino de café obtenido en la sección 3.1. Para eliminar las interferencias debido al color en la cuantificación por espectrofotometría UV-Vis, el hidrolizado de pergamino de café debió ser tratado con carbón activado previo a las reacciones. Para esto, se puso en contacto con carbón analítico Merck Ref. 1.02186.1000 en modo batch, a una relación de 20 mg de carbón/mL de hidrolizado a temperatura ambiente y agitación constante (Guerrero, 2018) durante 24 horas, posteriormente el carbón fue reemplazado y se mantuvieron las condiciones durante 18 horas más.

**3.2.2. Determinación de la actividad enzimática.** Para la hidrólisis enzimática, la enzima seleccionada fue la *Xylanase AN900* (PROENZIMAS S.A., Cali, Colombia) y sus características se encuentran en el Apéndice A.

Para obtener la actividad de la enzima, se prepararon soluciones de xilano comercial [10 mg/mL] y enzima [1 mg/mL] en buffer de acetato de sodio 0.1 M al pH requerido (4.6 en este caso), y se ajustó el pH del hidrolizado de pergamino de café en el mismo valor con solución de acetato de sodio 0.5 M o ácido acético 0.5 M. Estas soluciones se precalentaron en tubos de ensayo a 40 °C en un baño MEMMERT ONE 10 con control de temperatura, dentro del cual se dejaron por 5 min, para luego ser mezcladas a una relación 9:1 v/v de sustrato:enzima (McCleary & McGeough, 2015) obteniendo un volumen de reacción de 250 µL. Posteriormente se dejan reaccionar durante 10, 20 y 30 min. Las reacciones se detuvieron sumergiendo los tubos en agua helada por 1 min y en agua hirviendo por 1 min. Todas las pruebas se realizaron por duplicado y

se analizaron por el método DNS. La actividad enzimática, expresada en unidades internacionales de actividad enzimática (UI), referente a la cantidad de enzima necesaria para producir 1  $\mu\text{mol}$  de azúcares reductores (en equivalentes de xilosa) por min a partir de xilano a las condiciones de reacción, fue determinada siguiendo la ecuación 4 presentada en el Apéndice A.

**3.2.3. Técnicas de caracterización.** La determinación de azúcares reductores (AR) por espectrofotometría UV-Vis o método de Miller utilizando DNS (ácido 3,5 dinitrosalicílico) (McCleary & McGeough, 2015), permite la cuantificación de los AR presentes en una muestra, los cuales hacen referencia a la cantidad de extremos reductores formados por la despolimerización de los polisacáridos (Apéndice B). Se empleó xilosa (ALFA AESAR) de pureza 98% como estándar para realizar la curva de calibración de AR (Apéndice C), entre 0 y 6 mg/mL. Para la determinación de AR en las muestras de hidrólisis enzimática, se mezclan 25  $\mu\text{L}$  de la muestra con 75  $\mu\text{L}$  de reactivo DNS y se llevan a un baño de agua hirviendo por 5 min. Inmediatamente después, se agregan 1.9 mL de sal de Rochelle y se deja enfriar en baño de agua helada por 2 min. Se mide la absorbancia de las muestras a 540 nm utilizando un espectrofotómetro TERMO SCIENTIFIC MULTISKAN y, a partir de la curva de calibración (Apéndice C), se obtiene la concentración de AR en la muestra.

La determinación de la distribución de peso molecular de las muestras se realiza mediante cromatografía por permeación en gel (GPC), para la cual se utiliza una columna SRT-SEC100 (Sepax Technologies) con fase móvil de acetonitrilo:agua 10:90 v/v con flujo de 0.3 mL/min a 30 °C, en un cromatógrafo Thermo Dionex Chromeleon equipado con detector de índice de refracción. Para el análisis, las muestras se depositan en viales de 2 mL, siendo previamente filtradas en filtro de jeringa de 0.22  $\mu\text{m}$ .

La cuantificación de los monómeros de carbohidratos (glucosa y xilosa) se realiza mediante cromatografía HPLC, para la cual se utiliza una columna ZORBAX Carbohydrate (Agilent), con fase móvil de acetonitrilo:agua 70:30 v/v con flujo de 1.2 mL/min a 30 °C, en un cromatógrafo Thermo Dionex Chromeleon equipado con un detector de índice de refracción. Para el análisis, las muestras se depositan en viales de 2 mL, siendo previamente filtradas en filtro de jeringa de 0.22 µm.

Con el fin de cuantificar la concentración total de xilano presente en las muestras se realiza una reacción de poshidrólisis, la cual consiste en el rompimiento de todos los enlaces de un polímero para obtener la totalidad de sus monómeros constituyentes. En este proceso se mezclan 5 mL de muestra con 1 mL de solución 5 N de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y se llevan a 120 °C durante 45 min en autoclave. De esta manera, las muestras se analizan antes y después de la poshidrólisis por HPLC y se determina la concentración de xilano según la ecuación 2.

$$Xilano = Mx_T - Mx \quad (2)$$

Donde:

$Mx_T$  – Concentración de monómeros de xilosa totales (luego de la poshidrólisis).

$Mx$  – Concentración de monómeros de xilosa antes de la poshidrólisis.

### **3.3. Etapa 1: Efecto de las principales variables de reacción**

En esta etapa se analizó el efecto de las variables pH, temperatura y tiempo de reacción, sobre la producción de AR y el GP de los productos, usando el hidrolizado de pergamino de café tratado como sustrato. Este proceso se dividió en 2 partes.

**3.3.1. Variación de pH y temperatura.** Para llevar a cabo esta etapa, se prepararon soluciones de enzima [1 mg/mL] en buffer de acetato de sodio del pH requerido para cada muestra (4, 5 o 6) y se ajustó la temperatura del baño en 30, 40, 50 o 60 °C. Las reacciones se realizaron por duplicado siguiendo el procedimiento de la sección 3.2.2., utilizando un diseño de experimentos factorial completo, manteniendo constante el tiempo de reacción en 20 min, obteniendo un total de 24 experimentos. Las reacciones se realizaron utilizando un volumen de reacción de 2 mL, manteniendo la relación sustrato:enzima en 9:1 v/v. De esta manera, luego de detener la reacción, se extrajeron 1.5 mL de muestra para analizar por cromatografía GPC y 25 µL para analizar por método DNS.

**3.3.2. Variación del tiempo de reacción.** Para la evaluación del efecto del tiempo de reacción se mantuvieron fijos los valores de pH y temperatura seleccionados en la etapa anterior como los más favorables para la producción de XO<sub>s</sub>. Se prepararon 6 muestras de 2 mL, con relación sustrato:enzima 9:1 v/v, y se hicieron reaccionar a tiempos de 0, 10, 20, 30, 60 y 120 min respectivamente, siguiendo el procedimiento de la sección 3.2.2. Las muestras se analizaron mediante método DNS y cromatografía GPC y HPLC.

### **3.4. Etapa 2: Efecto del incremento del volumen de reacción**

Para analizar el efecto del aumento del volumen de reacción en la producción de XO<sub>s</sub>, se realizaron experimentos en volúmenes de 2 y 10 mL utilizando tubos de ensayo, y de 20, 50 y 100 mL utilizando vasos de precipitado, manteniendo la relación 9:1 v/v de sustrato:enzima, al pH y temperatura seleccionados en la sección 3.3.1, con agitación constante. Para cada volumen se toman muestras de 25 µL a los 0, 10, 20, 30 y 60 min de reacción, las cuales fueron analizadas por método DNS para determinación de AR.

### 3.5. Etapa 3: Determinación de la cinética de reacción enzimática

Con el fin de analizar el comportamiento de la enzima, se realizó un estudio de la cinética de la reacción enzimática utilizando el modelo de Michaelis-Menten (ecuación 1). Los parámetros cinéticos ( $K_m$  y  $V_{m\acute{a}x}$ ) se obtuvieron realizando la linealización de Lineweaver-Burk, la cual consiste en la representación gráfica de los recíprocos de la velocidad de formación de producto ( $V_0$ ) y de la concentración de sustrato ( $[S]$ ). De dicha gráfica se obtienen el intersección con el eje Y, que equivale al inverso de la  $V_{m\acute{a}x}$ , y la pendiente, que equivale a  $K_m/V_{m\acute{a}x}$ .

Para determinar los parámetros cinéticos del proceso, se prepararon muestras con concentraciones de sustrato de 3.97, 5.95, 7.93, 9.91 y 11.90 mg de xilano/mL de reacción, diluyendo el hidrolizado de pergamino de café tratado en solución buffer de pH 5, y se realizaron reacciones a 40 °C durante 20 min siguiendo el procedimiento de la sección 3.2.2. Para analizar el efecto del aumento de la relación sustrato:enzima, se planteó una modificación de la relación [sustrato]:[enzima] (Apéndice F) para obtener concentraciones de sustrato de 23.79 y 47.59 mg de xilano/mL de reacción. La velocidad de formación de producto ( $V_0$ ) se determinó mediante los AR producidos en el tiempo establecido, los cuales se cuantificaron mediante el método DNS.

Para establecer las posibles inhibiciones que se pueden presentar en la reacción, se prepararon 4 soluciones de enzima endoxilanasas con concentraciones de 25, 50, 100 y 200  $\mu\text{g/mL}$  de reacción respectivamente, y se determinan los parámetros de Michaelis-Menten a cada una de estas concentraciones, para poder compararlos entre sí y así establecer el tipo de inhibición presente en la reacción (Bisswanger, 2002).

## 4. Resultados y análisis

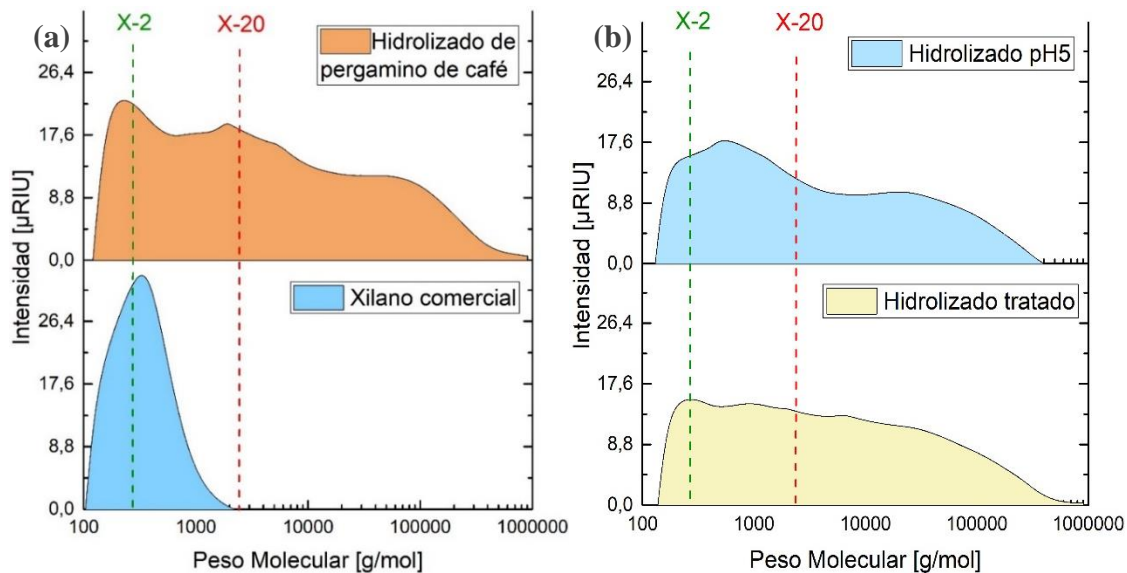
### 4.1 Determinación de la actividad enzimática.

**4.1.1. Evaluación de sustratos para la determinación de la actividad enzimática.** Para analizar el efecto de la enzima sobre un sustrato puro durante la hidrólisis enzimática, se realizaron pruebas utilizando xilano de mazorca comercial [10 mg/mL] a pH 4.6 y 40°C durante 10 min. Los resultados de la cuantificación de AR por método DNS se presentan en el Apéndice D.

Para complementar estos resultados se determinó la distribución de peso molecular del xilano de mazorca mediante GPC la cual se muestra en la Figura 3 (a). De este gráfico se observa que el peso molecular del xilano se encuentra en el rango entre 200 y 400 g/mol, lo que indica que la mayoría de las moléculas están constituidas por entre 2 y 3 monómeros de xilosa (xilobiosas y xilotriosas). Esto afecta la determinación de azúcares reductores mediante el método DNS limitando la distinción entre la muestra inicial y la muestra luego de reaccionar, además de dificultar la actividad de la enzima, debido a que las endoxilanasas actúan en los enlaces internos del xilano y no en los extremos terminales ya que no pueden liberar monómeros de xilosa (Sunna & Antranikian, 1997).

Por tal motivo, se decidió emplear directamente el hidrolizado de pergamino de café como sustrato para analizar la actividad enzimática, establecer las mejores condiciones de reacción y determinar la producción de XO<sub>s</sub>. La caracterización de este hidrolizado muestra una distribución de peso molecular más amplia (Figura 3 (a)), entre 150 y 800,000 [g/mol], indicando la presencia de polisacáridos que requieren ser despolimerizados. Sin embargo, debido a que el método DNS es una técnica colorimétrica que se basa en la determinación de la absorbancia a

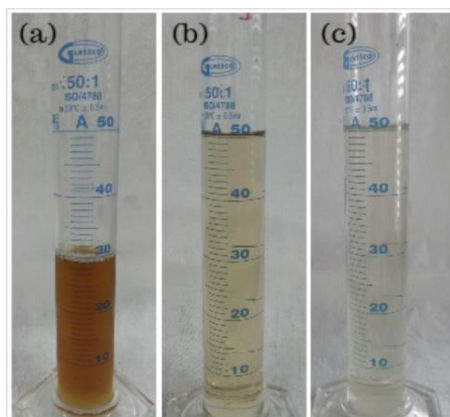
una longitud de onda establecida, el color del hidrolizado es un factor importante en la detección de AR.



**Figura 3.** a) Comparación de la distribución de peso molecular del xilano comercial de mazorca y el hidrolizado de pergamino de café. b) Efecto del tratamiento con carbón activado (hidrolizado tratado) y del ajuste de pH (hidrolizado pH 5) sobre la distribución de peso molecular del hidrolizado de pergamino de café. X-2 = 282.24 g/mol, X-20 = 2660.28 g/mol.

En la Figura 4 (a) se observa el hidrolizado de pergamino de café, el cual posee un color café oscuro lo que dificulta la medición de XO<sub>s</sub> por este método. Este color oscuro es generado por diversos compuestos fenólicos provenientes de la lignina y otras moléculas de bajo peso molecular como el furfural, que adicionalmente puede causar inhibición de la reacción enzimática (Montané, Nabarlantz, Martorell, Torné-Fernández, & Fierro, 2006). Para evitar esto, el licor de pergamino de café fue tratado con carbón activado según lo descrito en la sección 3.2.1., obteniendo una remoción superior al 90% de los compuestos fenólicos presentes en el hidrolizado inicial, medidos usando el reactivo Folin-Ciocalteu mediante la ecuación 3 (Guerrero, 2018), y un tono transparente el cual se puede observar en la Figura 4 (c).

$$\% \text{ remoción de fenólicos} = \left( 1 - \frac{\text{Concentración de fenólicos en hidrolizado tratado}}{\text{Concentración de fenólicos en hidrolizado original}} \right) \cdot 100 \quad (3)$$



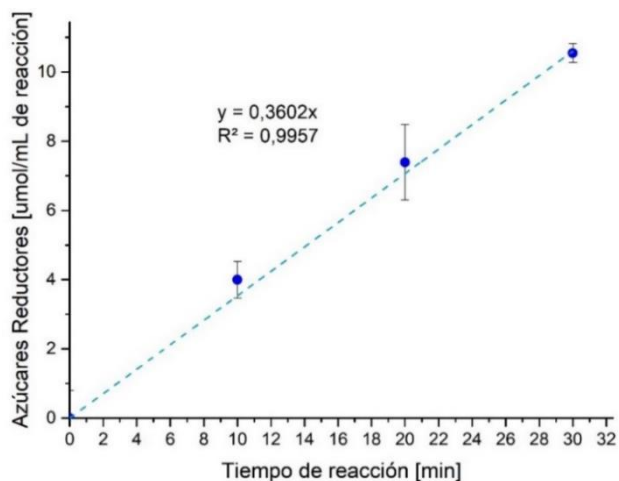
**Figura 4.** a) Hidrolizado de pergamino de café. b) Hidrolizado tratado con carbón activado en 1 etapa durante 24 horas. c) Hidrolizado tratado con carbón activado en 2 etapas durante 24 y 18 horas respectivamente. (Tratamiento con 20 mg de carbón activado/mL de hidrolizado, a temperatura ambiente con agitación constante).

Para asegurar que las características del hidrolizado no varían significativamente con el tratamiento de carbón activado, se analizó la distribución del peso molecular del hidrolizado de pergamino de café mediante cromatografía GPC. En la Figura 3 (b) puede observarse el hidrolizado tratado durante 42 horas con carbón (Hidrolizado tratado), y el hidrolizado tratado al cual posteriormente se le ajustó el pH a 5 (Hidrolizado pH 5) el cual fue tomado como referencia para analizar el comportamiento de las reacciones. Se observa que el tratamiento con carbón no generó cambios significativos en la distribución de peso molecular comparado con el hidrolizado de pergamino de café, aunque se evidencia una leve disminución en la intensidad entre 100 y 1,000 g/mol aproximadamente, lo cual indica la remoción de monómeros de xilosa, así como de otros compuestos de bajo peso molecular (derivados fenólicos, furfural, etc.).

Así mismo, se realizó poshidrólisis a las muestras del hidrolizado original y del hidrolizado tratado con carbón activado para evaluar la concentración de xilano de los mismos por HPLC,

siguiendo la ecuación 2. El resultado de estos análisis indica que el hidrolizado de pergamino de café original tiene una concentración de 13.52 mg de xilano/mL de hidrolizado y 2.36 mg de monómeros de xilosa (MX)/mL de hidrolizado, mientras que el hidrolizado tratado con carbón activado presenta una concentración de 13.21 mg de xilano/mL de hidrolizado y 0.25 mg de MX/mL de hidrolizado. Esto demuestra que el tratamiento con carbón activado solamente está retirando cerca del 2% de las moléculas de xilano, mientras que permite remover alrededor del 90% de los monómeros de xilosa presentes en el hidrolizado original. Por tal motivo, los ensayos de actividad enzimática se realizaron con el hidrolizado tratado con carbón activado.

**4.1.2 Determinación de la actividad enzimática.** Para la determinación de la actividad enzimática se obtienen los datos presentados en la Figura 5, en la que se muestra la producción de AR en función del tiempo de reacción a las condiciones preestablecidas.



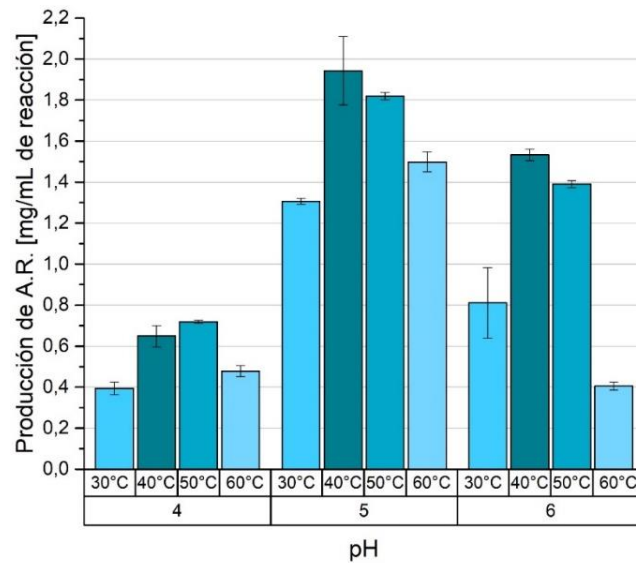
**Figura 5.** Producción de azúcares reductores para la determinación de la actividad enzimática a pH 4.6, 40°C y 0.1 mg de enzima/mL de reacción, sobre el hidrolizado de pergamino tratado a una relación 9:1 v/v de sustrato:enzima.

Como se observa en la pendiente de la gráfica, la actividad enzimática empleada en las reacciones fue de 0.36 UI/mL. Este valor es menor que el utilizado por Teng et al. (2010) (7.5

UI/mL) con una endoxilanasas purificada, y por Akpinar et al. (2010) (4.1 UI/mL) con una xilanasas comercial, lo que indica la alta efectividad de la *Xylanase AN900* ya que se requieren bajas cantidades de enzima para obtener una buena despolimerización de las moléculas de xilano. Además, de la ecuación 4 se obtuvo una actividad específica de 3.6 UI (μmol de AR/min)/mg de enzima, siendo este valor mucho menor al reportado por el proveedor (54 UI/mg de enzima), pues la actividad enzimática se evalúa empleando diferentes sustratos y a condiciones de reacción diferentes.

#### 4.2. Efectos de los parámetros de reacción en la producción de XO<sub>s</sub>

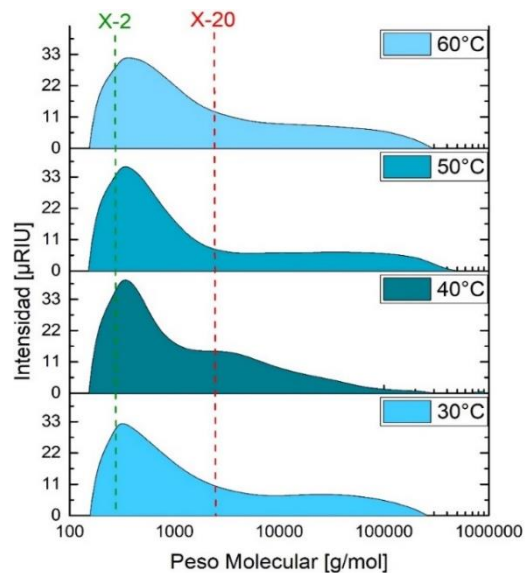
Los resultados de la producción de XO<sub>s</sub> variando el pH y la temperatura de reacción fueron representados mediante la producción de AR (determinados por el método DNS) y se muestran en la Figura 6.



**Figura 6.** Producción de azúcares reductores a diferentes condiciones de pH y temperatura durante 20 min de reacción, usando hidrolizado de pergamino tratado como sustrato a una relación 9:1 v/v de sustrato:enzima.

En ella se observa que a pH 5 se presenta la mayor producción de AR para cada una de las temperaturas evaluadas. También puede observarse que la reacción se ve favorecida hacia la producción de AR a 40 °C, en donde se alcanza una concentración de  $1.943 \pm 0.166$  mg AR/mL, indicando la mayor formación de extremos reductores (máxima despolimerización de los polisacáridos).

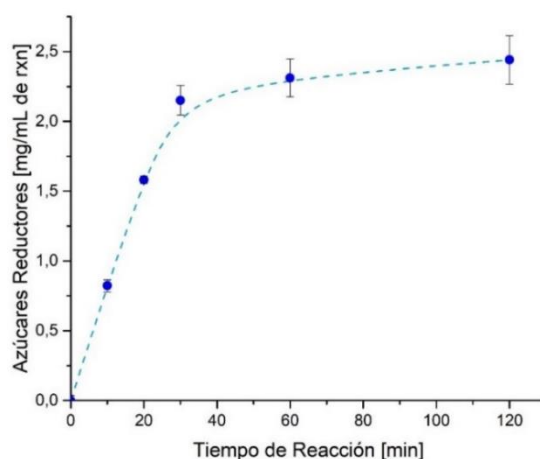
La distribución de peso molecular de los productos de las reacciones a pH 5 se muestra en los cromatogramas presentes en la Figura 7, donde podemos observar que la intensidad de la muestra disminuye (comparado con el blanco mostrado en la Figura 3 (b) (hidrolizado pH 5)) para GP mayores a 20 monómeros de xilosa y aumenta en el intervalo de 2 a 20 con lo que se evidencia la producción de XO<sub>s</sub>. Además, se observa que para el cromatograma de la reacción a pH 5 y temperatura de 40 °C se presenta un pico de mayor intensidad que las demás temperaturas.



**Figura 7.** Comparación de las distribuciones de peso molecular de los productos de las reacciones a pH 5 y diferentes temperaturas durante 20 min.

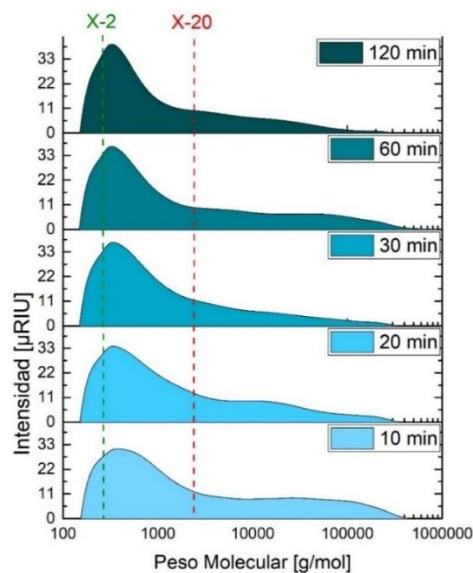
Esto complementa los resultados obtenidos por DNS, concluyendo que a estos valores de pH y temperatura se presenta la mayor producción de XO<sub>s</sub>. Esto concuerda con lo presentado por Dekker y Richards (1976) quienes reportan que las condiciones óptimas para las enzimas endoxilanasas extraídas de *A. Nigger*, se encuentran en pH de 4.5 a 5.5 y temperatura de 40 a 50 °C. Además, autores como Akpinar et al. (2010) y Yang et al. (2011) presentan valores de estas variables similares a los del presente trabajo usando también enzimas comerciales. Los cromatogramas de GPC para pH 4 y 6 se presentan en el Apéndice E.

Una vez establecidas las condiciones de pH y temperatura que favorecen la reacción enzimática se evaluó la influencia del tiempo de reacción y se obtuvo la curva mostrada en la Figura 8. Como puede observarse, a partir de los 30 min de reacción el incremento en la producción de AR es mínimo (12% en 90 min de reacción), y la concentración de AR tiende a estabilizarse en aproximadamente 2.25 mg de AR/mL de reacción, indicando que a partir de este tiempo no se justifica continuar con el proceso. Además, esto demuestra que la cinética de la reacción presenta el perfil requerido para el ajuste del modelo de Michaelis-Menten.



**Figura 8.** Producción de azúcares reductores en función del tiempo de reacción a 40 °C y pH 5, usando hidrolizado de pégamino tratado como sustrato a una relación 9:1 v/v de sustrato:enzima.

Los productos de reacción se analizaron mediante GPC y los resultados se muestran en la Figura 9. La distribución de peso molecular es coherente con los resultados obtenidos para la concentración de AR mediante el método DNS, donde se hace más notorio que a partir de los 30 min casi la totalidad de los polisacáridos han sido despolimerizados y se han desplazado a la región de los XO<sub>s</sub>. Para los tiempos de 60 y 120 min se observa una mayor intensidad en el pico cercano al peso de la xilobiosa (X-2) y a su vez, una reducción del ancho de la región entre X-2 y X-20, lo que indica que a partir de los 30 min la enzima reacciona con los XO<sub>s</sub> de mayor peso molecular formando XO<sub>s</sub> de bajo GP.



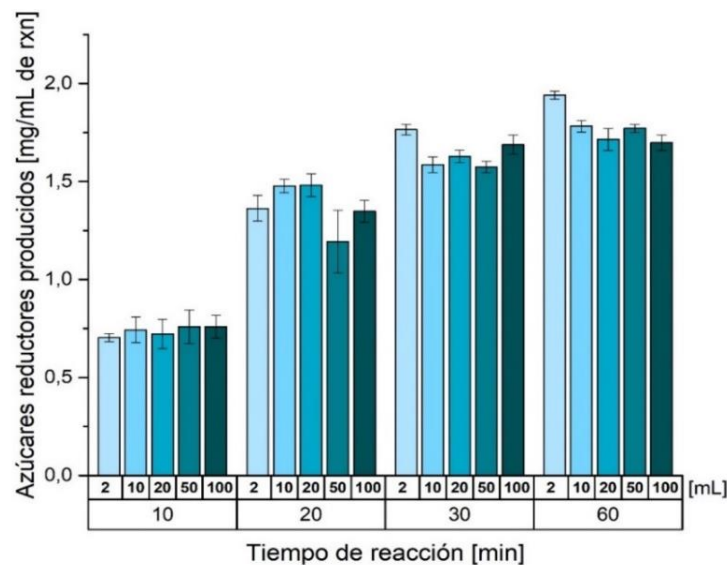
**Figura 9.** Efecto del incremento del tiempo de reacción en la distribución de peso molecular de los productos de la hidrólisis enzimática a pH 5.0 y 40 °C.

Considerando la posible presencia de exo-xilanasas en la enzima comercial utilizada, se determinó la concentración de xilosa en los productos de la reacción utilizando la cromatografía HPLC, teniendo en cuenta que este tipo de enzima degrada el xilano hasta sus monómeros constituyentes. Los resultados indican que durante los primeros 30 minutos la tasa de incremento de la xilosa es de 0.009 mg/mL·min alcanzando en este tiempo una concentración de 0.46 mg de

xilosa/mL de reacción. Este resultado nos indica que la cantidad y/o actividad de enzimas de exo-xilanasas en el complejo enzimático es muy baja, ya que dicha concentración de monómeros es despreciable comparada con la concentración de xilano disponible para hidrolizar (13.21 mg/mL). Adicionalmente, se determinó la presencia de glucosa como monómero en todas las muestras con una tasa de incremento de 0.013 mg de glucosa/mL·min, lo que evidencia la presencia de enzimas celulasas que hidrolizan las trazas de celulosa solubilizada en el proceso de autohidrólisis del pergamino de café.

**4.3. Evaluación del efecto del incremento del volumen de reacción en la producción de XO<sub>s</sub>.**

Al analizar el incremento del volumen de reacción, manteniendo constante el pH, la temperatura y la relación sustrato:enzima en 5.0, 40 °C y 9:1 v/v respectivamente, se observó que la producción de AR (Figura 10) presenta comportamientos muy similares para todos los volúmenes de reacción.

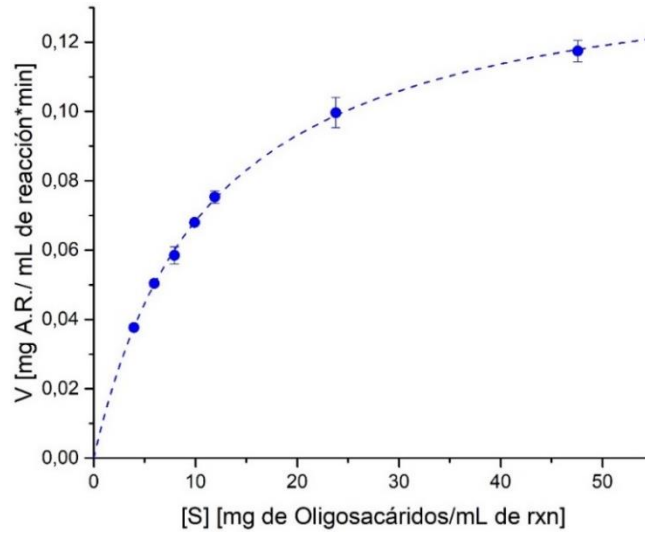


**Figura 10.** Producción de azúcares reductores en función de la variación del volumen de reacción a 40°C y pH 5, usando hidrolizado de pergamino tratado como sustrato con relación sustrato:enzima de 9:1 v/v.

En este sentido, al analizar el incremento de los AR durante los primeros 30 min (antes de que la concentración tienda a estabilizarse), se obtiene que la máxima tasa de formación es de 0.062 mg de AR/mL·min (para la reacción de 2 mL), y la mínima es de 0.056 mg de AR/mL·min (para la reacción de 50 mL), reafirmando la similitud entre las reacciones. Además, estas variaciones de AR producidos entre los diferentes volúmenes analizados pueden deberse a factores como la geometría del recipiente y la agitación, los cuales pueden afectar la interacción entre la enzima y el sustrato. Estos resultados son prometedores si se desea llevar el proceso a una mayor escala para aumentar la cantidad de producto obtenido.

#### **4.4 Análisis de la cinética de reacción enzimática.**

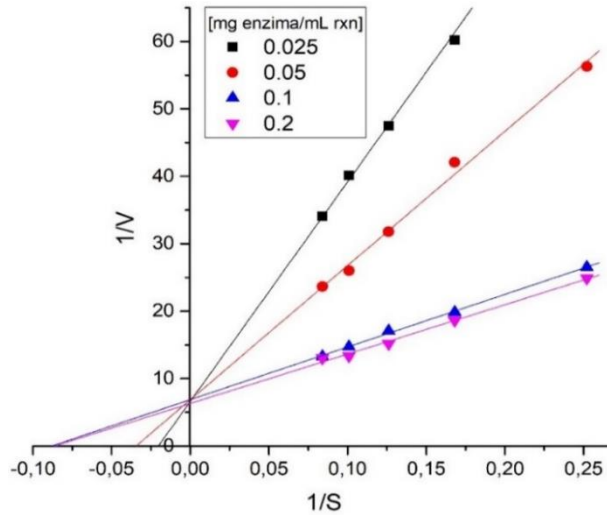
A partir de los resultados de los experimentos usando una concentración de enzima de 1 mg/mL se graficó el modelo de Michaelis-Menten el cual se presenta en la Figura 11. Al realizar la linealización de Lineweaver-Burk se obtuvo un valor de  $K_m = 11.353$  mg/mL y  $V_{m\acute{a}x} = 0.146$  mg/mL·min. Dicho valor de  $K_m$  indica una baja afinidad de la enzima hacia el xilano extraído del pergamino de café, ya que difiere de los datos reportados por Ai et al. (2005) y Dutta y Chakraborty (2015) al usar enzimas purificadas ( $K_m$  1.42 y 3.93 mg/mL respectivamente), aunque se encuentra dentro del rango de valores reportado por Dekker y Richards (1976) para endoxilanasas producidas por hongos ( $K_m$  entre 0.27 y 14 mg/mL). Además, si se compara con la cinética que presentan Acevedo et al. (2014), para una enzima comercial ( $K_m$  de 22.86 mg/mL y  $V_{M\acute{a}x}$  de 0.12 mg/mL·min) se evidencia una actividad aceptable por parte de la *Xylanase AN900*.



**Figura 11.** Representación gráfica del modelo de Michaelis-Menten utilizando una concentración enzimática de 1 mg/mL (● datos experimentales, - - modelo teórico).

Siguiendo lo planteado en la etapa 3, se realizó el análisis de las inhibiciones de la reacción determinando los parámetros cinéticos para cada una de las concentraciones de enzima, para lo cual se realizaron las respectivas linealizaciones presentadas en la Figura 12. Aquí se puede observar como todas las gráficas coinciden en su intersección con el eje Y y varían su pendiente. Esto indica que el valor de la velocidad máxima se mantiene constante sin importar la cantidad de enzima empleada, mientras que la constante de Michaelis-Menten es mayor a bajas concentraciones de enzima, como se puede observar en la Tabla 2, lo que se debe a inhibiciones competitivas en la reacción (Bisswanger, 2002) por la presencia de celulasas u otras enzimas en el complejo enzimático que interactúan con moléculas de xilano impidiendo que la endoxilanasas actúe sobre ellas. Esto indica que, si se desea aumentar la velocidad de producción de AR, es necesario incrementar la cantidad de enzima presente en la reacción para tener más sitios activos disponibles para reaccionar, aunque se debe tener presente que el incremento en la concentración

de enzima aumenta la cantidad de exo-xilanasas que podrían degradar los XO<sub>s</sub> a monómeros de xilosa.



**Figura 12.** Linealización de Lineweaver-Burk para las reacciones a pH 5.0 y 40 °C a diferentes concentraciones de enzima.

**Tabla 2.**

*Parámetros cinéticos obtenidos para las diferentes concentraciones de enzima.*

Concentración de enzima [mg/mL de reacción]	$K_M$ [mg/mL de reacción]	$V_{máx}$ [mg AR/mL de reacción·min]	$R^2$
0.025	49.269	0.151	0.999
0.050	29.030	0.146	0.994
0.100	11.353	0.146	0.998
0.200	11.605	0.158	0.994

## 5. Conclusiones

- La producción de XO<sub>s</sub> a partir de la hidrólisis enzimática del hidrolizado de pergamino de café tratado con carbón activado, utilizando la enzima *Xylanase AN900* es un proceso factible y prometedor que se ve beneficiado cuando se desarrolla a 40 °C y un valor de pH alrededor de 5, requiriendo de aproximadamente 30 min de reacción y pequeñas cantidades de enzima para obtener, en su gran mayoría, productos con características adecuadas para ser probados como prebióticos (GP entre 2 y 20 monómeros de xilosa).
- El incremento del volumen de reacción hasta 100 mL presenta resultados prometedores para la producción de XO<sub>s</sub> a gran escala debido a que las tasas de formación de producto son constantes para todos los volúmenes analizados. Aunque existe una pequeña variación en la concentración de AR producidos para cada volumen, no se asume como una consecuencia del escalado sino de las diferencias en otras variables como la geometría del recipiente o la agitación que no fueron debidamente controladas.
- A partir del modelo cinético de Michaelis-Menten se determinó el valor de  $K_m = 11.35$  mg/mL y  $V_{m\acute{a}x} = 0.146$  mg AR /mL·min. Dicho  $K_m$  indica una baja afinidad de la enzima hacia el xilano extraído del pergamino de café, aunque se encuentra en el rango reportado por otros estudios. Adicionalmente, la constante de Michaelis-Menten tiene un comportamiento inverso a la concentración de enzima por lo que se asume una inhibición competitiva debida a la presencia de diversas enzimas en el complejo enzimático.

### **Recomendaciones**

- Se recomienda adquirir un xilano comercial purificado con una distribución de peso molecular más amplia, que en su mayoría supere el peso equivalente a 20 unidades monoméricas de xilosa, para evaluar la actividad de la enzima sin los posibles inhibidores que contenga el hidrolizado de pergamino de café.
- Se recomienda complementar los resultados con la adquisición de estándares de XO<sub>s</sub> (xilobiosa, xilotriosa, etc) para la correcta cuantificación de estos por cromatografía HPLC.
- Para estudios futuros se recomienda plantear un montaje en donde se logre recuperar la enzima, ya que esta no se ve afectada durante las reacciones y se puede reutilizar.
- Se recomienda hacer un estudio de las propiedades prebióticas de los XO<sub>s</sub> obtenidos.

### Referencias bibliográficas

- Acevedo, D., Granados, C., & Guerrero, E. M. (2014). Cinética enzimática del bagazo de caña para la producción de glucosa utilizando la enzima *Trichoderma longibrachiatum*. *Informacion Tecnologica*, 25(5), 65–72. <https://doi.org/10.4067/S0718-07642014000500010>
- Ai, Z., Jiang, Z., Li, L., Deng, W., Kusakabe, I., & Li, H. (2005). Immobilization of *Streptomyces olivaceoviridis* E-86 xylanase on Eudragit S-100 for xylo-oligosaccharide production. *Process Biochemistry*, 40(8), 2707–2714. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2004.12.006>
- Akpinar, O., Ak, O., Kavas, A., Bakir, U., & Yilmaz, L. (2007). Enzymatic production of xylooligosaccharides from cotton stalks. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(14), 5544–5551. <https://doi.org/10.1021/jf063580d>
- Akpinar, O., Erdogan, K., Bakir, U., & Yilmaz, L. (2010). Comparison of acid and enzymatic hydrolysis of tobacco stalk xylan for preparation of xylooligosaccharides. *LWT - Food Science and Technology*, 43(1), 119–125. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2009.06.025>
- Biely, P. (1985). Microbial xylanolytic systems. *Trends in Biotechnology*, 3(11), 286–290. [https://doi.org/10.1016/0167-7799\(85\)90004-6](https://doi.org/10.1016/0167-7799(85)90004-6)
- Bisswanger, H. (2002). *Enzyme Kinetics Principles and methods*. (L. Bubenheim, Ed.) (Third). Tübingen, Germany.: WILEY-VCH.
- Briet, F., Pochart, P., Marteau, P., Flourie, B., Arrigoni, E., & Rambaud, J. C. (1997). Improved clinical tolerance to chronic lactose ingestion in subjects with lactose intolerance: a placebo effect? *Gut*, 41(5), 632–635. <https://doi.org/10.1136/gut.41.5.632>
- Corzo, N., Alonso, J. L., Azpiroz, F., Calvo, M. A., Cirici, M., Leis, R., ... Clemente, A. (2015). Prebióticos; Concepto, propiedades y efectos beneficiosos. *Nutricion Hospitalaria*, 31(1), 99–118. <https://doi.org/10.3305/nh.2015.31.sup1.8715>
- Dekker, R. F. H., & Richards, G. N. (1976). Hemicellulases: Their occurrence, purification, properties, and mode of action. *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*, 32, 277–352. [https://doi.org/10.1016/S0065-2318\(08\)60339-X](https://doi.org/10.1016/S0065-2318(08)60339-X)
- Dutta, S. K., & Chakraborty, S. (2015). Kinetic analysis of two-phase enzymatic hydrolysis of hemicellulose of xylan type. *Bioresource Technology*, 198, 642–650. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.09.066>
- Federación Nacional de Cafeteros. (2017). Estadísticas históricas: Federación de Cafeteros. Retrieved from <http://federaciondecafeteros.org>
- Gibson, G., & Macfarlane, G. (1995). *Human colonic bacteria : role in nutrition, physiology, and pathology*. Boca Raton, United States: CRC Press.
- Gibson, G. R., & Roberfroid, M. B. (1995). Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *The Journal of Nutrition*, 125(6), 1401–1412. <https://doi.org/10.1079/NRR200479>

- Guerrero, J. M. (2018). *Evaluación de metodologías para la purificación de hidrolizados de biomasa lignocelulósica residual de la agroindustria colombiana*. Universidad Industrial de Santander.
- Hopkins, M. J., Cummings, J. H., & Macfarlane, G. T. (1998). Inter-species differences in maximum specific growth rates and cell yields of bifidobacteria cultured on oligosaccharides and other simple carbohydrate sources. *Journal of Applied Microbiology*, 85(2), 381–386. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.1998.00524.x>
- Isolauri, E. (2001). Probiotics in the prevention and treatment of allergic disease. *Pediatric Allergy and Immunology*, 12(14), 56–59. <https://doi.org/10.1034/j.1399-3038.2001.121413.x>
- Khan, M. A. (2010). *Hydrolysis of hemicellulose by commercial enzyme mixtures*. Lulea University of Technology. Luleå University of Technology. <https://doi.org/1402-1552-ISRNLTU-DUPP--10/040--SE>
- Kim, H. S., & Gilliland, S. E. (1983). Lactobacillus acidophilus as a dietary adjunct for milk to aid lactose digestion in humans. *Journal of Dairy Science*, 66(5), 959–966. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(83\)81887-6](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(83)81887-6)
- Loera, O. (2002). Las xilanasas microbianas y sus aplicaciones. *BioTecnología*.
- McCleary, B. V., & McGeough, P. (2015). A Comparison of Polysaccharide Substrates and Reducing Sugar Methods for the Measurement of endo-1,4-β-Xylanase. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 177(5), 1152–1163. <https://doi.org/10.1007/s12010-015-1803-z>
- Montané, D., Nabarlantz, D., Martorell, A., Torné-Fernández, V., & Fierro, V. (2006). Removal of lignin and associated impurities from xylo-oligosaccharides by activated carbon adsorption. *Industrial and Engineering Chemistry Research*, 45(7), 2294–2302. <https://doi.org/10.1021/ie051051d>
- Nabarlantz, D., Ebringerová, A., & Montané, D. (2007). Autohydrolysis of agricultural by-products for the production of xylo-oligosaccharides. *Carbohydrate Polymers*, 69(1), 20–28. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2006.08.020>
- Oliva, J. (2003). *Efectos de los productos de degradación originados en la explosión por vapor de biomasa de chopo sobre Kluyveromyces marxianus*. Universidad Complutense de Madrid. [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(03\)00220-5.L](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(03)00220-5.L)
- Pereira, L. (2003). The chemistry involved in the steam treatment of lignocellulosic materials. *Química Nova*, 26(6), 863–871. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422003000600015>
- Rajagopalan, G., Shanmugavelu, K., & Yang, K. L. (2017). Production of prebiotic-xylooligosaccharides from alkali pretreated mahogany and mango wood sawdust by using purified xylanase of Clostridium strain BOH3. *Carbohydrate Polymers*, 167, 158–166. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.03.021>
- Rycroft, C. E., Jones, M. R., Gibson, G. R., & Rastall, R. A. (2001). A comparative in vitro evaluation of the fermentation properties of prebiotic oligosaccharides. *Journal of Applied Microbiology*, 91(5), 878–887. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2001.01446.x>

- Sanabria, J. R. (2016). *Caracterización de biomasa residual agrícola para la evaluación de su uso como materia prima en la producción de oligosacáridos*. Universidad Industrial De Santander.
- Sandoval, M., & Viviescas, P. (2017). *Autohidrólisis de residuos lignocelulósicos de la agroindustria colombiana: Análisis del proceso para la producción de xilo-oligosacáridos (XOs)*. Universidad Industrial de Santander.
- Sunna, A., & Antranikian, G. (1997). Xylanolytic Enzymes from Fungi and Bacteria. *Critical Reviews in Biotechnology*, *17*(1), 39–67. <https://doi.org/10.3109/07388559709146606>
- Teng, C., Yan, Q., Jiang, Z., Fan, G., & Shi, B. (2010). Production of xylooligosaccharides from the steam explosion liquor of corncobs coupled with enzymatic hydrolysis using a thermostable xylanase. *Bioresource Technology*, *101*(19), 7679–7682. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.05.004>
- Vázquez, M. J., Alonso, J. L., Domínguez, H., & Parajó, J. C. (2001). Xylooligosaccharides: Manufacture and applications. *Trends in Food Science and Technology*, *11*(11), 387–393. [https://doi.org/10.1016/S0924-2244\(01\)00031-0](https://doi.org/10.1016/S0924-2244(01)00031-0)
- Voragen, A. G. J. (1998). Technological aspects of functional food-related carbohydrates. *Trends in Food Science and Technology*, *9*(8–9), 328–335. [https://doi.org/10.1016/S0924-2244\(98\)00059-4](https://doi.org/10.1016/S0924-2244(98)00059-4)
- Xiao, X., Bian, J., Peng, X. P., Xu, H., Xiao, B., & Sun, R. C. (2013). Autohydrolysis of bamboo (*Dendrocalamus giganteus* Munro) culm for the production of xylo-oligosaccharides. *Bioresource Technology*, *138*, 63–70. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.03.160>
- Yang, H., Wang, K., Song, X., & Xu, F. (2011). Production of xylooligosaccharides by xylanase from *Pichia stipitis* based on xylan preparation from triploid *Populus tomentosa*. *Bioresource Technology*, *102*(14), 7171–7176. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.03.110>

## Apéndices

### Apéndice A. Enzima Xylanase AN900

La enzima AN900 es una Endo-1,4-β-Xilanasas de origen Fungal producida por una cepa del *Aspergillus Niger*, fabricada por ENZYME DEVELOPMENT CORPORATION y distribuida por PROENZYMAS S.A.S, con actividad de 54 UI/mg de enzima determinada sobre un sustrato de xilano de abedul a 50°C y pH de 5.3. Su presentación es un polvo fino biodegradable ligeramente coloreado donde la porción enzimática es soluble en agua y cuando se disuelve en copiosa cantidad de agua, no causa daño a organismos acuáticos y marinos; su almacenamiento debe ser en recipientes cerrados, bajo condiciones secas y refrigerado de 5 a 8 °C para prolongar la vida de almacenamiento y actividad de la enzima.

La actividad enzimática se obtiene a partir de la ecuación 4 y es medida sobre un sustrato de xilano de pergamino de café a 40°C y pH de 4.6. Bajo estas condiciones la enzima presenta una actividad de 3.6 UI/mg de enzima, esta es mucho menor comparada a la reportada por el proveedor pues se emplean diferentes sustratos y es medida a condiciones de reacción diferentes.

(4)

$$[E] = \frac{A \times K \times 10^3}{0.1 \times t \times 150.13} \left( \frac{\text{UI} (\mu\text{mol de xilosa} / \cdot \text{min})}{\text{mg enzima}} \right)$$

Donde:

A - Absorbancia promedio de las muestras analizadas.

K - Constante de absorbancia [mg xilosa/mL de reacción]

10<sup>3</sup> - Coeficiente de conversión entre mg y μg.

0.1 - Concentración de enzima [mg enzima/mL de reacción]

t - Tiempo de reacción [min]

150.13 - Coeficiente de conversión entre  $\mu\text{g}$  y  $\mu\text{mol}$  de xilosa.

**Apéndice B.** Preparación de reactivos para el método DNS

Para la preparación del reactivo DNS se diluyen en 400 mL de agua destilada en constante agitación 5 g de ácido 3,5-dinitrosalicílico, 1 g de fenol redestilado, 0.25 g de sulfito de sodio anhidro y 5 g de hidróxido de sodio. El volumen de la solución se ajusta a 500 mL y se almacena a temperatura ambiente protegido de la luz directa para que sea estable por 2 meses.

Para la dilución de las reacciones con DNS es necesario preparar solución de Sal de Rochelle al 40% p/v para la cual se disuelven 80 g de tartrato de sodio potasio en 120 mL de agua destilada sobre una plancha de calentamiento con agitación, y cuando esté completamente diluido se ajusta el volumen a 200 mL. Almacenar a temperatura ambiente para que su estabilidad sea aproximadamente de un año.

Para la determinación de la cantidad de azúcares reductores presentes en una muestra se extraen 25  $\mu$ L de la muestra y se le añaden 75  $\mu$ L de reactivo DNS, se llevan a un baño de agua hirviendo por 5 min. Posteriormente se agregan 1.9 mL de sal de Rochelle, se deja enfriar en baño de agua helada por 2 min y se mide la absorbancia a 540 nm. A partir de la curva de calibración (Apéndice B) se obtiene la concentración de AR.

**Apéndice C.** Curva estándar de azúcares reductores.

Se prepara una solución de 6 mg/mL de xilosa en buffer de acetato pH 4.60 y se toman diferentes muestras de esta solución para re diluir como se muestra en la tabla C.1.

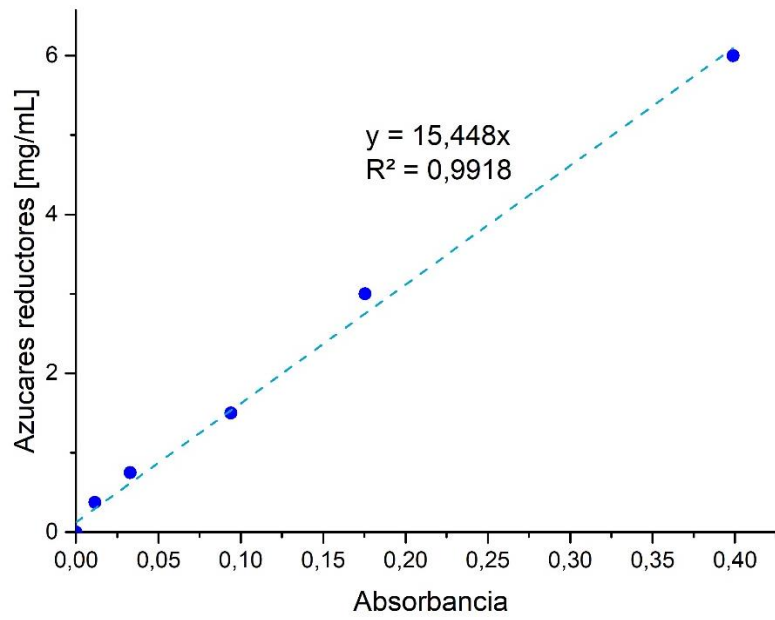
**Tabla C.1.**

*Diluciones de xilosa para la curva estándar de AR.*

Muestra	mL de Xilosa	mL de Buffer	Concentración final de xilosa (mg/mL de reacción)
0	0.00	0.50	0.00
1	0.50	7.50	0.38
2	0.50	3.50	0.75
3	0.50	1.50	1.50
4	0.50	0.50	3.00
5	0.50	0.00	6.00

Se extraen 25  $\mu$ L de cada muestra y se precalientan a 40°C por 5 min. Se adicionan 75  $\mu$ L del reactivo DNS a cada muestra y se mezclan muy bien. Se llevan a agua hirviendo durante 5 min e inmediatamente se agregan 1.9 mL de sal de Rochelle. Se deja enfriar en baño de agua helada por 2 min y se mide la absorbancia a 540 nm.

En la Figura C.1 se observa la relación de la variación de concentración de xilosa respecto a la absorbancia medida por el espectrofotómetro, la constante de absorbancia (K) es igual a 15.448 [mg xilosa/mL de reacción].



**Figura C.1.** Curva estándar de azúcares reductores.

**Apéndice D.** Resultados de pruebas por método DNS con xilano comercial de mazorca.

Siguiendo la metodología planteada se prepara una solución de 10 mg/mL del xilano de mazorca en buffer de acetato pH 4.6 y se detecta la cantidad de AR presentes en la solución previo a la reacción enzimática. Los resultados iniciales de la detección de AR mediante el método DNS arrojaron valores de absorbancia por fuera del rango de medición del detector del espectrofotómetro. Esto indica que la concentración de azúcares reductores en la muestra es muy alta, posiblemente debido a que el xilano utilizado como sustrato también reacciona con el reactivo DNS. Por este motivo se disminuye la concentración de la solución de xilano hasta conseguir una lectura de absorbancia aceptable, encontrándola cuando la concentración de xilano es de 0.63 mg/mL, mostrado en la Tabla D.1.

**Tabla D.1**

*Absorbancia de soluciones con diferente concentración del xilano comercial*

<b>Xilano [mg/mL]</b>	10,00	5,00	2,50	1,25	0,63	0,31
<b>Absorbancia</b>	<del>6,00</del>	3.329 ± 0.021	1.829 ± 0.031	0.999 ± 0.005	0.476 ± 0.001	0.222 ± 0.001

Se procede a determinar la actividad enzimática sobre esta concentración de xilano tal como lo dice la metodología. Se realizan 3 experimentos y se hacen lecturas de la absorbancia de las muestras antes (blanco) y después de las reacciones para analizar el incremento en la formación de AR pero se obtienen como resultado lecturas constantes como se puede ver en la Tabla D.2, lo que indica la ausencia de actividad por parte de la enzima.

**Tabla D.2**

*Absorbancia de las reacciones*

	<b>Muestra 1</b>	<b>Muestra 2</b>	<b>Muestra 3</b>
<b>Blanco</b>	0.503	0.509	0.501
<b>Reacción</b>	0.508 ± 0.005	0.479 ± 0.045	0.487 ± 0.013

**Apéndice E.** Resultados adicionales para la variación de pH y T

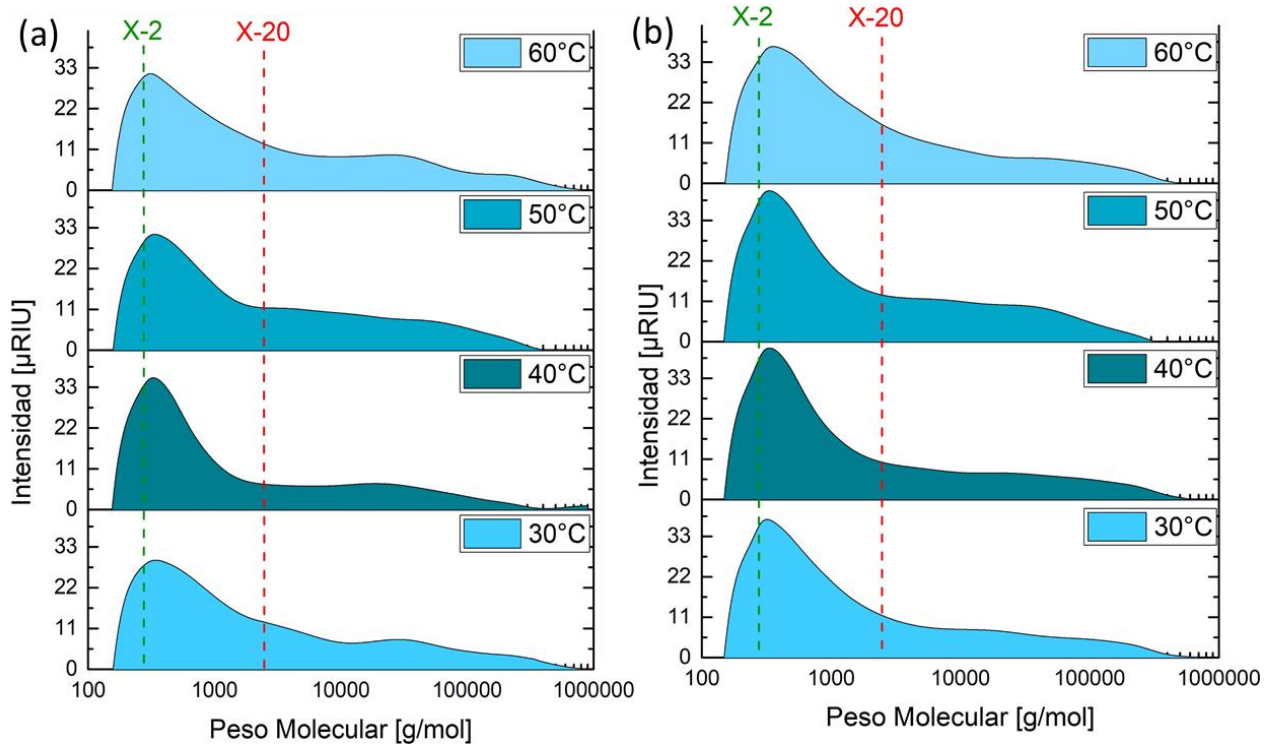
La cantidad de azúcares reductores producidos para todo el diseño de experimentos factorial de variación de pH y temperatura se presentan en la Tabla E.1.

**Tabla E.1**

*Producción de AR [mg/mL] variando el pH y la temperatura de reacción.*

T [°C]	pH		
	4	5	6
30	0.394 ± 0.032	1.305 ± 0.014	0.811 ± 0.172
40	0.649 ± 0.052	1.943 ± 0.166	1.533 ± 0.029
50	0.718 ± 0.008	1.819 ± 0.018	1.390 ± 0.017
60	0.479 ± 0.028	1.498 ± 0.049	0.406 ± 0.019

Los resultados de las cromatografías GPC para pH 4 y 6 variando la temperatura de reacción se muestran en la Figura E.1. En esta se observa una tendencia muy similar a la mostrada por el método DNS en la que para ambos pHs a una temperatura de 40 °C se obtiene la mayor producción de XO<sub>s</sub> pues se observa una mayor área para el intervalo de X-2 y X-20.



**Figura E.1.** GPC para reacciones variando T a (a) pH 4 y (b) pH 6

**Apéndice F.** Soportes del análisis de la cinética de reacción.

Con el fin de realizar un análisis más completo del modelo de Michaelis-Menten para esta reacción, se buscó la forma de examinar el comportamiento de la enzima a concentraciones mayores a las establecidas en la metodología. Debido a que no es factible aumentar la cantidad de azúcar presente en el hidrolizado, puesto que el proceso de concentración de estos requiere de un mayor análisis para determinar si hay algún efecto en las propiedades del sustrato, se decidió realizar un análisis a partir de la relación [sustrato]:[enzima], disminuyendo la concentración de enzima sobre la mayor concentración de hidrolizado, y realizar un ajuste para igualar la concentración teórica de enzima e incrementar la concentración del sustrato. En la Tabla F.1 se presentan los valores de concentración de sustrato y enzima utilizados en el análisis de la cinética de reacción para la concentración de 1 mg de enzima/mL.

**Tabla F.1.**

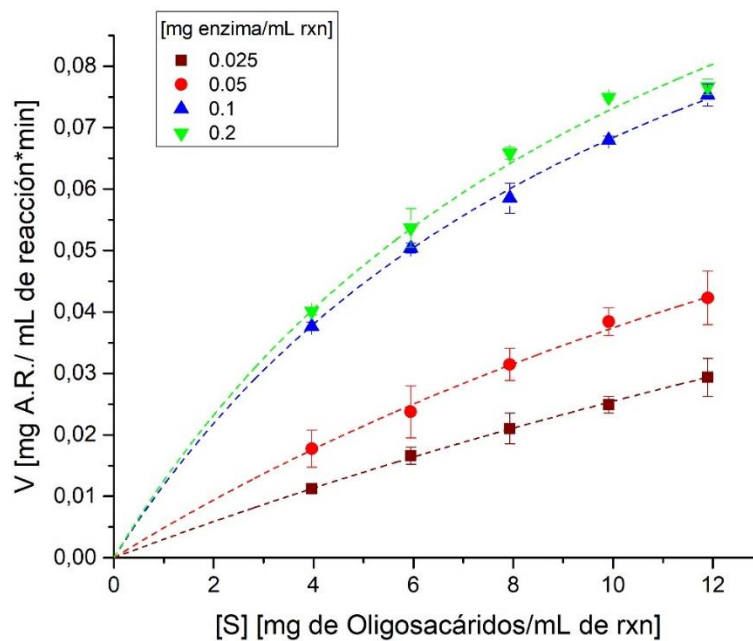
*Relaciones Sustrato:Enzima para análisis de Michaelis-Menten.*

Concentración de Sustrato [mg/mL de reacción]	Concentración de Enzima [mg/mL de reacción]	Factor de Ajuste	Concentración de Sustrato ajustada [mg/mL de reacción]	Concentración de Enzima ajustada [mg/mL de reacción]
3.97	0.1	1	3.97	0.1
5.95	0.1	1	5.95	0.1
7.93	0.1	1	7.93	0.1
9.91	0.1	1	9.91	0.1
11.89	0.1	1	11.90	0.1
11.89	0.05	2	23.79	0.1
11.89	0.025	4	47.59	0.1

En la tabla F.2 se presentan las ecuaciones finales de la cinética de Michaelis-Menten para las diferentes concentraciones de enzima y en la Figura F.1 se muestran las curvas obtenidas experimentalmente por método DNS de las cinéticas y los modelos teóricos.

**Tabla F.2.**  
*Ecuaciones cinéticas.*

Concentración de enzima [mg/mL de reacción]	0.025	0.050	0.100	0.200
Ecuación Michaelis-Menten.	$\frac{0.151*[S]}{49.269+[S]}$	$\frac{0.146*[S]}{29.030+[S]}$	$\frac{0.145*[S]}{11.353+[S]}$	$\frac{0.158*[S]}{11.605+[S]}$
V=				



**Figura F.1.** Representaciones gráficas de la cinética de Michaelis-Menten para las diferentes concentraciones de enzima utilizadas (● datos experimentales, - - modelos teóricos).