

## Hidrólisis enzimática de las hemicelulosas del bagazo de la caña de azúcar

B. R. HUNG LLANOS Y L. LARA CUÉ

*Dpto. de Fermentaciones, Centro Nacional de Investigaciones Científicas, Ciudad de La Habana, Cuba*

*Recibido: 28 de septiembre de 1979*

*Recibido: 16 de marzo de 1983*

**ABSTRACT.** An study of the enzymatic hydrolysis of the hemicelluloses obtained from sugar cane bagasse by the nitric-sodium hydroxide technique of Guerra, was done. The contents of pentosans, lignin and cellulose of the hemicellulose obtained by this method was determined. The effects of the starting concentration of substrate on the hydrolysis velocity was analyzed, and the sugars produced in the reaction were analyzed by paper chromatography.

**RESUMEN.** Se realizó el estudio de la hidrólisis enzimática de las hemicelulosas, obtenidas a partir de bagazo de caña según la técnica de nítrico-sosa de Guerra. Se determinó el contenido de pentosanos, lignina y celulosa a la hemicelulosa obtenida por este método. Se analizó el efecto de la concentración inicial de sustrato sobre la velocidad de hidrólisis y se identificaron los azúcares producidos en la reacción por cromatografía de papel.

### INTRODUCCION

La utilización de diversos métodos de tratamiento aplicados a los materiales celulósicos, sus resultados y aplicaciones, han sido objeto de amplios estudios en nuestro país<sup>1-4</sup>. Un ejemplo importante lo constituye la hidrólisis enzimática del bagazo<sup>1</sup> y el empleo de los hidrolizados así obtenidos en procesos de fermentación con el objetivo de obtener proteína unicelular<sup>5</sup>.

Con el fin de optimizar el proceso de hidrólisis se han realizado estudios cinéticos<sup>1</sup> utilizando la celulasa comercial Onozuka SS, obtenida de cultivo sumergido de *T. viride*, encontrándose una disminución de las velocidades iniciales de reacción a partir de concentraciones de sustrato superiores a 10.44% P/V<sup>6</sup>.

La celulasa Onozuka SS está formada por diferentes enzimas, algunas degradan la celulosa y membranas celulares, otras son maceradoras de tejido y también contienen cierta cantidad de hemicelulosa. Por tanto, es necesario estudiar la influencia de los distintos componentes del bagazo actuando como sustratos independientes sobre la actividad enzimática.

Este trabajo consiste en el estudio de la hidrólisis de la hemicelulosa obtenida a partir del bagazo, por la celulasa comercial para determinar o descartar la existencia de acción inhibitoria de la hemicelulosa sobre la enzima. El conocimiento de cuál o cuáles factores producen esta inhibición repercutirá en los rendimientos obtenidos y en el costo del proceso.

## MATERIALES Y METODOS

### *Sustrato*

La hemicelulosa fue obtenida a partir del bagazo de caña según la técnica de nítrico-sosa de Guerra<sup>7</sup>. Se utilizaron en las experiencias los precipitados obtenidos en el proceso de neutralización del extracto alcalino hasta pH 5,0, condiciones en las que se separa la fracción de hemicelulosa A<sup>8</sup>. Se realizaron dos extracciones y en ambos casos las hemicelulosas fueron molidas en un molino vibratorio y tamizadas para lograr un tamaño de partícula menor de 125  $\mu\text{m}$  de diámetro. Se obtuvieron dos precipitados a los cuales se les realizó análisis del contenido de pentosanos por el método espectrofotométrico de Jones<sup>9</sup>, obteniéndose resultados de 72 y 85% respectivamente. El contenido de celulosa determinado por el método gravimétrico de Crampton y Maynard<sup>10</sup>, fue de 1.16% y el % de lignina determinado por el método de Klason no fue detectable<sup>11</sup>.

### *Enzima*

Se utilizó la celulasa comercial del tipo Onozuka SS (All Japan Biochemical, Ltd) obtenida a partir de cultivo sumergido de *T. viride*.

### *Condiciones de las reacciones*

Las experiencias fueron realizadas en erlenmeyers de 100 ml de capacidad, conteniendo 10 ml de la mezcla de reacción, formada por el sustrato a la concentración adecuada y la celulasa al 0.08% (P/V) en tam-

pón acetato de sodio 0.2 M, pH 5.0. Los erlenmeyers fueron mantenidos a una temperatura de  $50 \pm 1^\circ\text{C}$  en un vibrotherm, con una agitación constante de  $100 \pm 5$  r.p.m. Las muestras fueron extraídas a intervalos apropiados durante 8 horas y se conservaron congeladas para su análisis posterior. La velocidad de hidrólisis de la hemicelulosa fue calculada determinando los azúcares formados en la mezcla de reacción producto de la conversión del sustrato, para lo cual se aplicó el método de Somogyi-Nelson modificado<sup>12</sup>. La velocidad inicial se obtuvo calculando la pendiente en la parte recta de la curva de azúcares reductores vs tiempo, aplicando el método de los mínimos cuadrados. (Figs. 1 y 2).

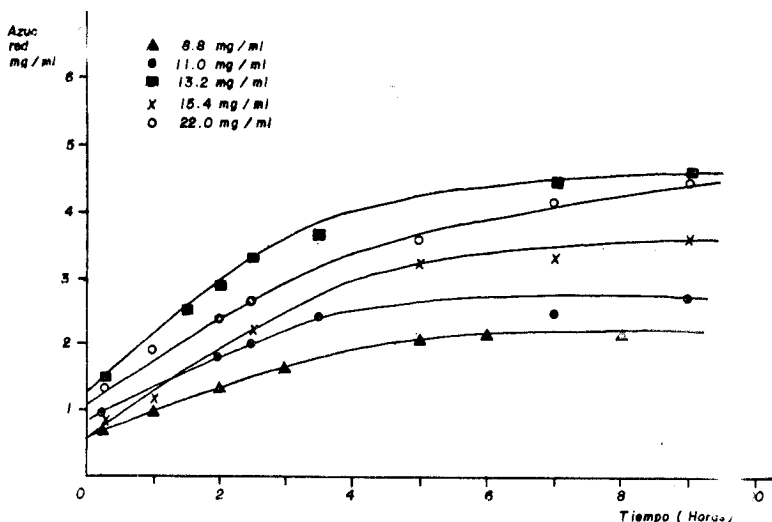


Fig. 1. Curva de formación de azúcares reductores (Hemicelulosa I).

### Cromatografía de papel

La identificación de los azúcares al inicio y al final de la reacción se realizó por cromatografía de papel descendente múltiple en papel Whatman No. 1. Los tiempos de corrimiento fueron de 16 horas. Se utilizó como mezcla de solventes una solución de butanol-benceno-piridina-agua en las proporciones 5:1:3:3 y como revelador se usó phtalato de anilina. Además, se caracterizaron los azúcares presentes durante el transcurso de la hidrólisis enzimática para una concentración inicial de sustrato de 14 mg/ml.

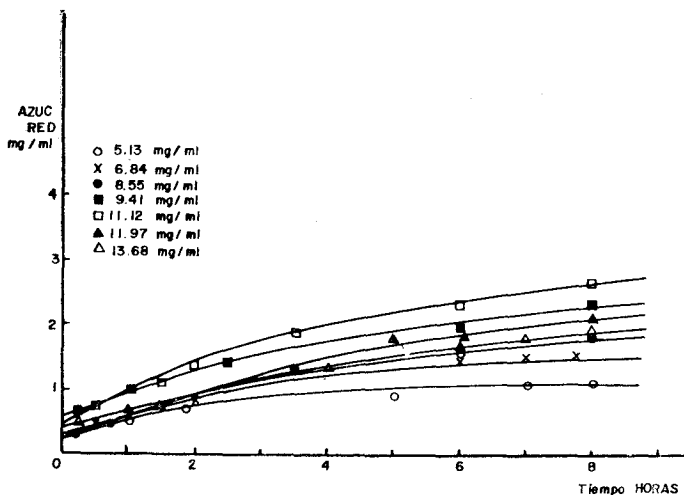


Fig. 2. Curva de formación de azúcares reductores (Hemicelulosa II).

## RESULTADOS Y DISCUSION

Para la hemicelulosa obtenida en la primera extracción se efectuaron cinco corridas variando la concentración inicial de sustrato entre 6 y 22 mg/ml. En la Tabla I y Fig. 3, se observan los valores de velocidad inicial calculados en estos casos, reportados con respecto al peso inicial de sustrato y con respecto a la concentración inicial de pentosanos en la mezcla de reacción.

Como puede observarse se obtuvo un máximo de velocidad de hidrólisis para una concentración de 13.2 mg/ml que corresponde a una concentración de pentosanos de 9.5 mg/ml. (Hemicelulosa I). En el análisis cromatográfico de los productos de la reacción se encontró en todos los casos xilosa como componente fundamental, así como arabinosa en menor grado, como puede observarse en la Fig. 4. Se detectó además una mancha que parece corresponder a un disacárido, cuyo valor de  $R_f$  es mayor que el de la celobiosa y menor que el de la galactosa y que no pudo identificarse por la carencia de patrones adecuados.

TABLA I  
*Hemicelulosa I*

Concentración inicial de sustrato (mg/ml)	Concentración inicial de pentosanos (mg/ml)	Velocidad inicial (g/l.h)
8.8	6.34	0.35
11.0	7.92	0.48
13.2	9.50	0.82
15.4	11.09	0.65
22.0	15.84	0.63

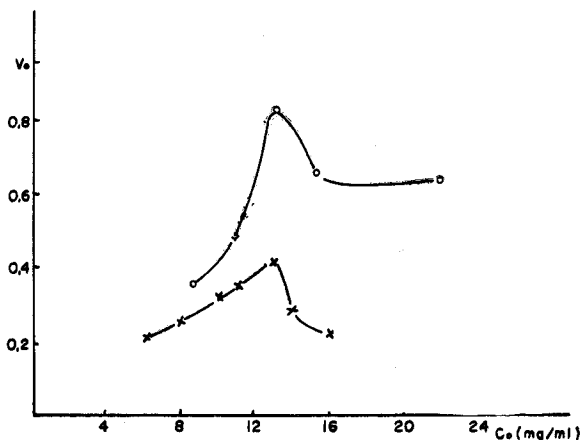


Fig. 3. Efecto de la concentración inicial de sustrato sobre la velocidad inicial de reacción. Símbolos: (o) Hemicelulosa I. (x) Hemicelulosa II.

En la Tabla II y Fig. 3, se muestran los valores de velocidad inicial obtenidos para la hidrólisis enzimática de la hemicelulosa II (segunda extracción). Las experiencias se realizaron variando la concentración de sustrato entre 6 y 16 mg/ml. Los valores de velocidad de hidrólisis fueron menores que los obtenidos para la hemicelulosa I y se encontró un máximo para una concentración inicial de 13 mg/ml, que corres-

ponde a una concentración de pentosanos de 11.12 mg/ml. Sin embargo, este máximo fue menos acentuado que el máximo presentado en el caso de la hemicelulosa I, como puede observarse en la Fig. 3.

TABLA II  
*Hemicelulosa II*

Concentración inicial de sustrato (mg/ml)	Concentración inicial de pentosanos (mg/ml)	Velocidad inicial (g/l.h)
6.0	5.13	0.22
8.0	6.84	0.26
10.0	8.55	0.33
11.0	9.41	0.36
13.0	11.12	0.42
14.0	11.97	0.28
16.0	13.68	0.22

El análisis cromatográfico del producto de la reacción de la hemicelulosa II, sólo detectó xilosa y una mancha no identificada que parece corresponder a un disacárido al igual que en el primer caso (Fig. 4). Para la hemicelulosa II se realizó una experiencia con una concentración inicial de sustrato de 14 mg/ml, en la cual se efectuó la cromatografía de papel a la mezcla de reacción a diferentes intervalos de tiempo durante el transcurso de la hidrólisis hasta las 32 horas.

Los resultados se muestran en la Fig. 5, donde se observa, además de la mancha correspondiente a la xilosa, otra mancha tenue de bajo valor de  $R_f$  (mencionada anteriormente), que primeramente se intensifica y que después parece desaparecer, por lo que pudiera tratarse de un disacárido que se forma como un producto intermediario en la reacción, y que posteriormente sea hidrolizado.

## HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA HEMICELULOSAS

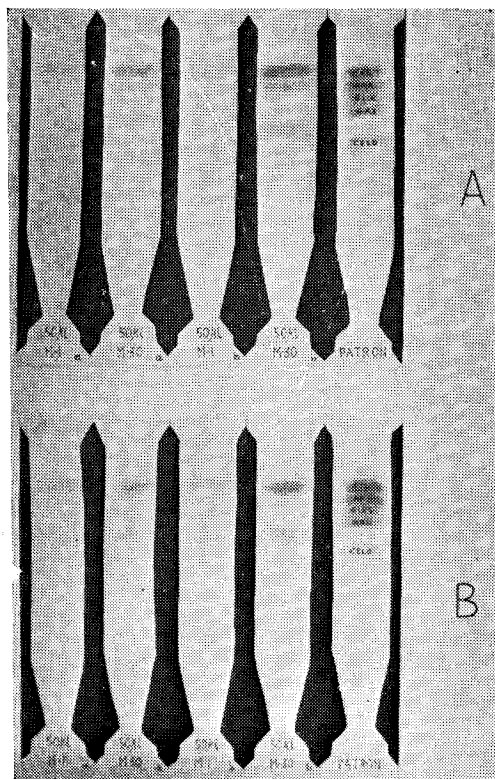


Fig. 4. Cromatografía de papel de los azúcares producidos en la reacción. A. Hemicelulosa I: Resultados para 0 y 8 horas correspondientes a dos concentraciones iniciales de sustrato diferentes: (a) 5.1 mg/ml, (b) 13.2 mg/ml. B. Hemicelulosa II: Resultados para 0 y 8 horas utilizando dos concentraciones iniciales de sustrato: (a) 6 mg/ml (b) 16 mg/ml.

### CONCLUSIONES

Del análisis cromatográfico puede plantearse que las hemicelulosas obtenidas y utilizadas en el presente trabajo, están formadas fundamentalmente por xilosa y arabinosa. En la primera extracción (Fig. 4A) encontramos xilosa y arabinosa en menor proporción, así como la formación de un disacárido cuyo valor de  $R_f$  es mayor que el de la celobiosa.

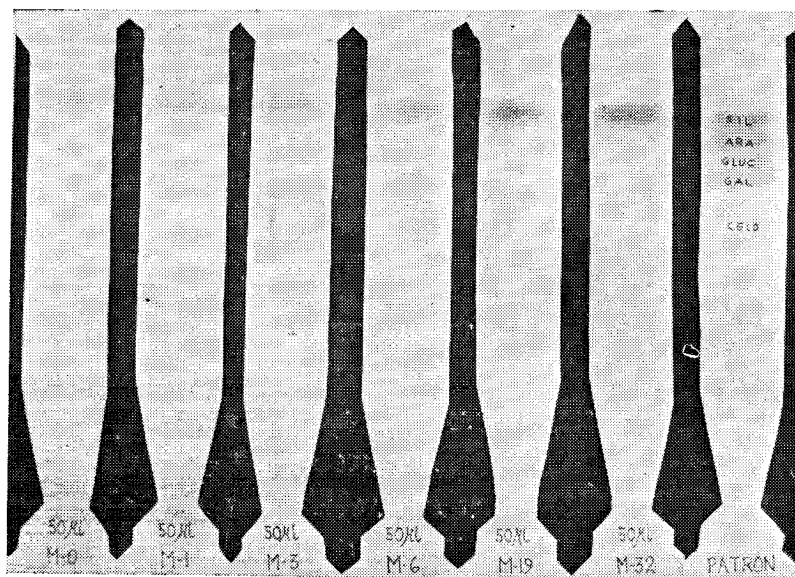


Fig. 5. Cromatografía de papel de los azúcares producidos a diferentes tiempos durante el transcurso de la reacción, hasta las 32 horas. Concentración inicial de sustrato 14 mg/ml, Hemicelulosa II.

En la segunda extracción (Fig. 4B), se encontró xilosa y además un disacárido semejante al anterior. En la Fig. 5 podemos observar que la mancha correspondiente al disacárido aumenta su intensidad a medida que transcurre la reacción y que posteriormente comienza a desaparecer, al mismo tiempo que se produce un aumento en la concentración de los azúcares simples que son el producto final de la reacción.

La aparición de xilosa en el caso de la hemicelulosa II y de xilosa y arabinosa en menor proporción en la hidrólisis de la hemicelulosa I indica que posiblemente en la segunda extracción se eliminó el componente arabinosa. Este componente aparece generalmente en cadenas laterales, por lo cual puede plantearse que la hemicelulosa II debe estar constituida por un polímero aproximadamente lineal, mientras que la I pudiera ser un polímero ramificado, aunque esto no ha sido comprobado.

Se observa de acuerdo a los valores de las Tablas I y II y Fig. 3, que la velocidad de reacción aumenta con la concentración inicial de sustrato

hasta un valor de 13 mg/ml. Este valor corresponde a concentraciones de bagazo mucho mayores que la reportada en la inhibición. Puede afirmarse entonces que no existe inhibición por hemicelulosa en el valor equivalente a la concentración de hemicelulosa que hay en el bagazo cuando la concentración de celulosa si se encuentra en el rango de inhibición (10.44% de bagazo), y por tanto la hemicelulosa no afecta la velocidad a esa concentración de bagazo.

Sin embargo, debe observarse que a partir de 13 mg/ml se aprecia cierta disminución de la velocidad, por lo que creemos que es recomendable realizar trabajos posteriores que permitan un análisis más profundo de los valores obtenidos en estos casos.

### RECONOCIMIENTOS

Agradecemos la colaboración brindada por las compañeras Susana Pérez, Oneida Correa y Lucía Román en la realización de las experiencias y análisis.

### REFERENCIAS

1. LARA CUÉ L. *Revista Cenic, Ciencias Biológicas* 7, 337, 1976.
2. LÓPEZ PLANES R. *Revista Cenic, Ciencias Físicas* 7, 221 1976.
3. LÓPEZ PLANES R. *Revista Cenic, Ciencias Biológicas* 7, 337, 1976.
4. ENRÍQUEZ A. Hidrólisis química de distintos residuos celulósicos. VI Seminario Científico Cenic, La Habana, Cuba, Dic 1977.
5. LARA CUÉ L. Fermentación de hidrolizados enzimáticos de bagazo de caña para la obtención de proteína forrajera. VI Seminario Científico Cenic, La Habana, Cuba, Dic. 1977.
6. LARA CUÉ L. Estudio Cinético de la hidrólisis enzimática en varios materiales celulósicos. VI Seminario Científico CENIC, La Habana, Cuba, Dic. 1977.
7. GUERRA J. Método de extracción de hemicelulosa c.f. Tesis de Candidato a Dr. en Ciencias R. López. La Habana, 1975.
8. BLAKE J. D., MURPHY P. T. AND RICHARDS G. N. *Carbohydrate Research*, 16, 49, 1971.
9. JONES H. L. *Tappi*, 44, 10, 1963.
10. CRAMPTON E. W. AND MAYNARD L. A. *J. Nutrition* 15, 383, 1938.
11. BROWNING B. L. *Methods of Wood Chemistry*. Vol. II. Cap. 34 Interscience Publishers, New York, 1967.
12. SOMOGYI M. *Journal of Biological Chemistry* 195, 19, 1952.