

EVALUACIÓN DE ENZIMAS PARA LA HIDRÓLISIS DE RESIDUOS (HOJAS Y COGOLLOS) DE LA COSECHA CAÑA DE AZÚCAR

EVALUATION OF ENZYMES FOR THE HYDROLYSIS OF WASTE (LEAVES AND TOP CANE) FROM THE HARVEST OF SUGAR CANE

JAIRO G. SALCEDO M.

Ph.D. (c), Universidad de Sucre, jairo.salcedo@unisucre.edu.co

JORGE ENRIQUE LÓPEZ GALÁN

Dr. Sci., Universidad del Valle, jorge.lopez@correounivalle.edu.co

LUZ MARINA FLÓREZ PARDO

Dr. Sci., Universidad Autónoma de Occidente, lmflorez@uao.edu.co

Recibido para revisar Diciembre 14 de 2010, aceptado Junio 28 de 2011, versión final Julio 18 de 2011

RESUMEN: El presente trabajo tuvo como objetivo la evaluación de la hidrólisis enzimática de residuos de la cosecha de la caña de azúcar (hojas y cogollos) a partir de la preparación de cuatro sustratos con diferentes pretratamientos, entre los que se encuentran: delignificación organosolvente, delignificación enzimática, delignificación con hidróxido de sodio y clorito de sodio y un sustrato base obtenido directamente de la cosecha. Además, se elaboraron cinco enzimas a partir de mezclas de actividades de enzimas comerciales, que fueron evaluadas en los diferentes sustratos.

Se introduce un criterio para evaluar la eficiencia de las enzimas a partir de curvas de progreso, porcentaje de sacarificación e índice de sacarificación, a este índice se le denominó “índice global de hidrólisis”. Los resultados muestran, que para la hidrólisis con el preparado enzimático E5, que contiene las siguientes actividades enzimáticas: hemicelulasas de 52.75 unidades globales/ml, celulasas total de 27.53 FPU/ml, endoglucanasas de 1782,1 CMC/ml, exoglucanasa de 0.377 UI/ml, betaglucosidasa de 550 pNPG U/ml, xilanasa de 28.23 UI/ml, galactosidasa de 7.1 UI/ml, manasa de 2.76 UI/ml y ranmanasa de 14.63 UI/ml y el sustrato S3, con un contenido de celulosa de 80.53%, hemicelulosa de 13.35, lignina 1.36 y un número de Kappa de 5.85 presenta el mayor índice global de hidrólisis que corresponde a un valor de 117.16. El estudio permite concluir que el preparado enzimático E5 presenta un gran potencial para la hidrólisis de los residuos de la caña de azúcar tratados en este proyecto

PALABRAS CLAVE: Hidrólisis, enzimas, caña de azúcar, residuos, hojas y cogollos

ABSTRACT: The enzymatic hydrolysis of waste (leaves and top cane) from the harvest of sugar cane was evaluated. The substrates were prepared by applying different delignification treatments using enzymes, organic solvents, sodium hydroxide, and sodium chlorite. Wastes with no treatment were used as control. Five mixtures of enzymes were prepared by using the enzymatic activities of the commercial enzymes, and were evaluated in the different substrates.

A criterion for evaluating the efficiency of enzymes from progress curves, percentage saccharification and saccharification index, called “global index of hydrolysis” was introduced. The results shows that the hydrolysis with E5 enzymatic preparation with the following enzyme activities, hemicellulases: 52.75 global units of /ml, total cellulase: 27.53 FPU / ml, endoglucanase: 1782.1 CMC / ml, exoglucanase: 0.377 UI / ml, β -glucosidase: 550 pUPG U / ml, xylanase: 28.23 UI / ml, galactosidase: 7.1 UI / ml, manase: 2.76 UI / ml, and ranmanasa: 14.63 UI / ml, and the S3 substrate with 80.53% of cellulose content, 13.35% of hemicellulose, 1,36 % of lignin, and Kappa Number of 5.85 has the highest overall index of hydrolysis, 117.16. The study concludes that this enzyme preparation, E5, has greatest potential for the hydrolysis the harvest waste of sugarcane used in this study.

KEY WORDS: Hydrolysis, enzymes, sugar cane waste, leaves and tops cane

1. INTRODUCCION

La biomasa representa una fuente renovable de energía, con gran potencial para la producción de biocombustibles, cuyo uso permitiría reducir el consumo de combustibles fósiles y limitar las emisiones

de CO₂, SO_x, NO_x a la atmósfera y la contaminación por metales pesados. Además, de su favorabilidad y sostenibilidad, se encuentra mucho mejor distribuida sobre la superficie de la tierra que los combustibles fósiles y el uranio y pueden ser explotados usando tecnologías más económicas [1]. La disponibilidad

de biomasa en el mundo es de aproximadamente 220 millones de toneladas secas por año o 4500 Exajoule [2].

Dadas las futuras tendencias del uso del bioetanol como un combustible para transporte y su demanda para una producción sostenible de energía, el uso de material lignocelulósico como materia prima para la producción limpia de etanol, parece ser una atractiva solución [3].

Los materiales lignocelulósicos presentan una estructura compuesta principalmente por tres componentes (celulosa, hemicelulosa y lignina). En los procesos de degradación de materiales lignocelulósicos se pueden identificar algunos tratamientos comunes (pretratamiento, delignificación e hidrólisis) utilizados para la producción de azúcares fermentables. Estos tratamientos pueden ser físicos, químicos, enzimáticos o con microorganismos. Asimismo, la factibilidad de cada tratamiento depende del consumo de energía, selectividad, costos de procesos y velocidad de degradación [4,5, 6].

La estructura química, el grado de entrecruzamiento de los componentes que forman los materiales lignocelulósicos, la composición de sus componentes principales, están relacionadas con el material de origen del cual proceden. Igualmente, la estructura de los materiales lignocelulósicos determina sus propiedades mecánicas, la resistencia al ataque de microorganismos, enzimas, agentes químicos y establece la dificultad de degradar este tipo de materiales. Por lo se puede asegurar, que la naturaleza del sustrato y el método de pretratamiento usado, influye sobre la eficiencia de degradación del material lignocelulósico cuando se utilizan enzimas [7].

Para la degradación biocatalítica, existe un gran espectro de enzimas degradadoras de polisacáridos que actúan en forma compleja (pectinasas, celulasas, oxidoreductasas y hemicelulasas). La acción de una enzima es restringida por la accesibilidad al sustrato. En el caso de las celulasas, disminuyen su acción sobre la celulosa por la presencia de otros polisacáridos. También, es conocido que la combinación de enzimas degradadoras de polisacáridos actúa sinérgicamente en la degradación de la matriz de la pared celular [8].

La velocidad y extensión de la hidrólisis de sustratos lignocelulósicos se ve influenciada no solamente por la eficiencia de las enzimas, sino también por las características fisicoquímicas y morfológicas, expresada en la heterogeneidad de los sustratos lignocelulósicos. Por esto, se hace necesaria la utilización de sistemas muy selectivos (enzimas), para la degradación de este tipo de materiales. La hidrólisis enzimática puede ser una mejor alternativa que la hidrólisis ácida y tiene un potencial para el desarrollo y mejoras de tecnologías para la producción etanol a partir de biomasa que puede ser competitivo con respecto otros combustibles [9]. Entre los componentes de la pared celular, la lignina es probablemente el compuesto más recalcitrante sintetizado por las plantas y que contribuye a dar firmeza y fortaleza a las plantas. Un complejo enzimático compuesto por enzimas extracelulares, tales como lacasas y peroxidasas, tienen la capacidad de degradar la lignina y otros compuestos tales como moléculas aromáticas simples [10].

En la hidrólisis enzimática de la celulosa, recientemente se ha venido hablando de los celulosomas. Estos son complejos enzimáticos que actúan sinérgicamente para catalizar la hidrólisis de este polisacárido. Estos complejos están formados esencialmente por varios tipos de celulasas que están soportadas en una unidad de estructuración constituida por múltiples cadenas de polipéptidos, cuyo número varía de un microorganismo a otro e incluso difiere entre cepas, con dominios catalíticos muy parecidos a las células libres degradadoras de material lignocelulósico [11]. Actualmente se ha estado trabajando en construcción de celulosomas robustos sintéticos como Rosettazyme que asociadas a celulasas, han presentado una mayor actividad que las enzimas libres [12].

Las actividades enzimáticas que intervienen en el proceso de hidrólisis del material lignocelulósico, son de diversa índole. Las enzimas delignificantes, son secretadas por hongos, son las enzimas oxidativas extracelulares (oxidoreductasas) tales como lignina peroxidasa (LiP), Manganese peroxidasa (MnP), lacasa o monofenil oxidasa (Lac) y oxidasas productoras de H_2O_2 . La actividad de MnP y LiP se incrementa por el uso de alcohol veratrílico mientras que la lacasa, mejora su actividad en presencia de alcohol benzílico y ácido verátrico [13]. La degradación enzimática de la celulosa a glucosa, está acompañada por la acción sinérgica

de tres enzimas: endo- glucanasas, exoglucanasas y β - glucosidasas [14]. En la degradación de los componentes principales de la hemicelulosa (mannanos, xilanos, arabinanos, galactanos), intervienen enzimas como mananasa y xilanasa, de las cuales la β -xilosidasa degrada los xilo- oligosacáridos. La α -arabinosidasa y la α -galactosidasa liberan moléculas de arabinosa y galactosa, mientras la acetil xilan esterasa (AXE) rompe grupos acetil, desde unidades de azúcar de xilanos. La α - glucoronidasa, separa principalmente ácido urónico a partir de (arabino) glucoronoxilanos y la α -arabinofuronosidasa el cual extrae arabinosa de arabino(glucorano) xilanos [15,16]. Compañías como Genecor International® y Novozymes Biotech®, han reportado desarrollos de tecnologías que han reducido los costos de celulasas desde 4,5 dólares por galón de etanol a 20 centavos por galón de etanol (Morreira, 2005) [17].

En el Valle del Cauca se siembran 200 mil 210 hectáreas de caña y se cosechan 14 millones de toneladas de caña de azúcar por año [18]. Esta producción genera en el Valle del Cauca abundantes desechos lignocelulósicos, alrededor de 7 millones de toneladas por año (50%), constituidos principalmente por las hojas y cogollos. Esta biomasa se está desaprovechando debido a que posee un gran potencial industrial [19]. Estos desperdicios actualmente se pican y se esparcen sobre el campo de siembra, sin pensar en obtener otros productos de mayor valor agregado o se queman, causando un impacto importante sobre la calidad del aire del área de influencia del cultivo. Por tal motivo, es importante valorizarlos hacia bioetanol de segunda generación, que aumentaría igualmente la competitividad del sector cañero del Valle.

Para una eficiente hidrólisis hasta azúcares simples de la lignocelulosa contenida en los cogollos y hojas de los residuos del cultivo de la caña de azúcar, es posible desarrollar una combinación sinérgica de enzimas capaces de degradar la lignina y de hidrolizar la celulosa y hemicelulosa. Por tal razón, este artículo tiene por objeto mostrar los avances en la investigación en la hidrólisis enzimática de los residuos de cosecha de la caña de azúcar, principalmente hojas y cogollos, etapa fundamental para obtener azúcares simples (de seis y de cinco carbonos) como base para la producción de bioetanol de segunda generación. Se tomó como base para este trabajo el trabajar con cuatro

substratos preparados por diversos pretratamientos y métodos de delignificación, a los cuales se les aplicó cinco cocteles diferentes de enzimas preparados a partir de muestras comerciales. También se desarrolló una nueva metodología para evaluar el proceso de hidrólisis enzimática, a partir del cálculo del índice global de hidrólisis, el cual indicó claramente cual coctel tuvo un mayor efecto sobre la hidrólisis de polisacáridos presentes en los residuos de cosecha de la caña de azúcar.

2. MATERIALES Y METODOS

Los residuos de cosecha de caña de azúcar, hojas y cogollos, fueron suministrados por Cenicaña, procedentes de dos de las variedades colombianas más cultivadas en el Valle del Cauca, CC8475 y CC8592

2.1 Medida de actividad enzimática en enzimas comerciales.

En el proceso de valoración de la actividad enzimática de las enzimas comerciales (Accellerase® 1500, Accellerase® XY, Accellerase® XC, Accellerase® BG, Klerzyme 150®, Celluclast®, Optimash™ BG, Pectinex Ultra, Rapidase® ADEX, Clarex Citrus, Viscozyme® L, Citrozyme® Ultra), se usaron los métodos descritos en la Tabla 1.

Tabla 1. Sustratos y métodos usados en la determinación de la actividad enzimática de enzimas comerciales

Actividad enzimática	Sustrato	Referencia
β - glucosidasa	p- nitrofenil β - maltosa	[20]
Celulasa (FPU)	Papel Whatman No 1	[21]
β -1-4 – endo glucanasa	Carboximetil celulosa	[22]; [23]; [21]
Exocelobiohidrolasas, β -1-4–exo glucanasa	C e l u l o s a microcristalina	[22]; [23]; [21]
Xylanasa	Ensayo de 1-4 β xilanase usando Azo Xilan (S- AXYO)	[24];[25]
Endo – 1- 4 – β -D-galactanasa.	Azogactan (AGALP)	[26]
Endo 1,4- β -D mananasa	Manano P – MANCB	[27]
Endo –rhamnogalacturonasa	A z o - rhamnogalacturonano (AZRH)	[28]
Lacasa	2,2'-azino-bis(3- etilbenzotiazolin-6-sulfónico)(ABTS 0.5mM)	[29]

A partir del espectro enzimático encontrado en cada enzima comercial, se hizo una combinación entre ellas con la ayuda del software Solver de Microsoft Excel®, a fin de preparar cinco cocteles con diferentes actividades celulolíticas expresadas como unidades FPU (Unidades de Papel Filtro). Estos cinco cocteles se codificaron como E1, E2, E3, E4 y E5. Se evaluó el efecto de cada coctel enzimático sobre los diferentes sustratos, con el índice global de hidrólisis.

2.2 Preparación de sustratos.

Se prepararon cuatro sustratos de material lignocelulósico, hojas y cogollos provenientes de los residuos de la cosecha de caña, con el fin de evaluar el efecto o no de cada pretratamiento, sobre la hidrólisis enzimática de los mismos.

El primer sustrato (S1) correspondió al control, al que no se le aplicó ningún tipo de tratamiento.

En la preparación del segundo sustrato (S2), los residuos se sometieron a una delignificación enzimática con la enzima comercial Suberasa® de Novozyme. La delignificación se realizó en un reactor batch de 4 litros en acero inoxidable con control de temperatura y agitación. La temperatura se mantuvo a 40 °C, con una agitación 200 rpm y 10% de sólidos (sustrato seco). La reacción se realizó durante 23 horas en una solución buffer acetato de sodio 50 mM a pH 4,8 [30]. Además, se usó como mediador vainillina en una concentración de 5 mg/ gr de sólido seco. La dosificación de la enzima fue de 0,33 ml/ gr de material seco. La actividad enzimática lacasa (0,83UI/ml) se midió por el método descrito por Jon-Rok *et al* [29].

El material lignocelulósico (S3), se obtuvo al someter el material (S1) a un proceso de delignificación por organosolvente. La reacción se realizó en un reactor de 6 litros a una temperatura de 150 C° durante 120 minutos, con una relación sólido/ líquido de 1:8 p/v, con una fase líquida compuesta por 45% de etanol, teniendo como catalizador NaOH al 3% [31]. Después, de transcurrido el tiempo de operación se realizó una descompresión súbita del reactor. Seguidamente, el material delignificado se sometió a un lavado con agua por 15 minutos, seguido del secado de la muestra.

En la preparación del sustrato (S4), al material lignocelulósico (S1) se le adicionó alcohol etílico al 70% durante 12 horas, posteriormente se sometió a un lavado con agua. El material resultante se llevó a una cocción a 80 °C con hidróxido de sodio al 4% con una relación líquido/sólido de 4, durante 3 horas. El material se sometió a un lavado con suficiente agua hasta desalojar el NaOH. La muestra resultante se introdujo por 30 minutos en una solución de clorito de sodio al 4% a un pH 3,8, obtenido por la adición de una solución de ácido acético 6 M. A las muestras tratadas se le determinó humedad, Número de Kappa [32] y el contenido de celulosa, hemicelulosa, lignina, extractivos y cenizas por el método Van Soest [33].

2.3 Evaluación de enzimas.

A partir de las mezclas de actividades enzimáticas obtenidas a partir de cinco enzimas comerciales, se obtuvieron curvas de progreso de la reacción a partir de diferentes relaciones enzima/sustrato E/S (0.05, 0.1, 0.2, 0.3) para los sustratos pretratados (S1, S2, S3, S4). La reacción se realizó en soluciones buffer acetato a pH 4.8 con una relación sólido/líquido de 6:100 a una temperatura de 40 °C. Se tomaron muestras a tiempos de reacción de (0, 2, 6, 9, 24 y 28 horas), a las que se les determinó azúcares reductores por el método de DNS [34]. Calculando el porcentaje de sacarificación mediante la ecuación 1. El porcentaje de sacarificación es un indicador de la conversión de la hidrólisis [22].

$$\% \text{ de Sacarificación } f(t) = \frac{\text{Azúcares reduct.} \left(\frac{\text{mg}}{\text{ml}}\right) \cdot 0,9 \cdot 100}{\text{Concentración de sustra.} \left(\frac{\text{mg}}{\text{ml}}\right)} \quad (1)$$

En cada tiempo de muestreo, se evaluó el índice de sacarificación, definido por la pendiente que resulta al graficar el porcentaje de sacarificación contra logaritmo de E/S, (ver ecuación 2).

$$\text{ind. sacarificación } f(t) = \frac{\Delta \% \text{ sacarificación}}{\Delta \log\left(\frac{E}{S}\right)} \quad (2)$$

Como un criterio de evaluar la capacidad de una enzima de degradar un sustrato, se procedió a calcular el producto del índice de sacarificación promedio para las diferentes parejas enzima – sustrato con la conversión promedio durante todo el tiempo de reacción.

3. RESULTADOS Y DISCUSIONES

3.1 Producción de enzimas.

Una vez obtenido el perfil enzimático de cada enzima comercial y utilizando el software Solver de Excel® se seleccionaron cinco preparados o cocteles, los cuales se presentan en la tabla 2 como E1, E2, E3, E4 y E5

Tabla 2. Espectro de Actividades enzimáticas de preparados enzimáticos seleccionados

E	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)	(9)
E1	14	37	2846	0.56	600	2.6	0	0	11.4
E2	129.4	0.07	308	0	2498	23	0	25.8	5
E3	107	18	1174	0.3	183	25	72	5	5
E4	113.1	9.3	766.3	0.176	275	37.6	83.2	72.9	15.3
E5	52.7	27.5	1782	0.377	550	28.2	7.1	2.7	14.6

(E) Enzima, (1) Hemicelulasa UI/ml, (2) Celulosa FPU/ml, (3) Endoglucanasa CMC/ml, (4) Exoglucanasa UI/ml, (5) β Glucosidasa pNPG U/ml, (6) Xilanas UI/ml, (7) Galactosidasa UI/ml, (8) Mananasa UI/ml, (9) Ramnosidasa UI/ml

Se denominó actividad hemicelulasa a la suma de las actividades xilanas, galactosidasa, mananasa y ramnosidasa. De acuerdo a lo establecido en la tabla 2, se produjeron preparados enzimáticos con una alta actividad de papel filtro (E1), baja actividad papel filtro y alta actividad β Glucosidasa y hemicelulasa global (E2), mediana actividad de papel filtro y altas actividades de galactosidasa, xilanas y mananasa (E3 y E4) y actividades enzimáticas equilibradas (E5).

3.2 Caracterización de los sustratos.

El sustrato S1 se sometió a un proceso de reducción de tamaño para garantizar la homogeneidad de la materia prima que sirvió como base para la investigación, cuyo análisis granulométrico se presenta en la tabla 3.

Tabla 3. Análisis granulométrico del sustrato S1

Tamiz	Diámetro mm	peso g	% (p/p)	% Acumulado
10	2.0	0.6	5.55	5.55
30	0.60	5.3	49.07	54.62
40	0.425	1.2	11.11	65.74
60	0.25	1.4	12.96	78.70
Fondo		2.3	21.29	100

En la tabla 4, se presenta la composición química de los sustratos utilizados. Se observa que el método de delignificación por organosolvente (S3) redujo en mayor proporción el contenido de lignina hasta un 81%, pero a su vez disolvió un 61% de la hemicelulosa de la muestra. Un comportamiento similar se tuvo con el sustrato S4. En cambio, el tratamiento con la Suberasa solo eliminó una parte de la lignina, pero no con la misma efectividad de los métodos químicos. Estos tratamientos originaron sustratos con un contenido de celulosa que varió desde un 36.57% (S1) hasta un 77.53% (S3), y otros, con un contenido de lignina desde un 1,33% (S3) hasta un 21% (S1).

Tabla 4. Composición química de los diferentes residuos de caña de azúcar tratados (base seca)

	S1	S2	S3	S4
Celulosa %	3.36±1.4	44.5±0.98	80.53±0.15	74.7±1.4
Hemicelulosa %	34.6±0.81	37.3±0.41	13.35±0.55	16.43±0.15
Lignina Total %	21.23±0.041	12.46±1.58	1.36±0.36	3.99±1.60
Extractivos %	3.95±0.03	5.13±0.0057	4.22±0.01	5.35±0.04
Humedad %	3.95±0.8	5.1±0.7	4.2±0.4	5.29±0.5
Cenizas %	1.13±0.4	0.66±0.15	0.12±0.028	0.17±0.05
Lignina Residual %*	7.12±0.1	7.18±0.057	0.91±0.1	1.85±0.3
No Kappa	47±0.3	38.56±0.5	5.85±0.3	16.6±0.4

*Lignina residual: Lignina no soluble en extractivos

3.3 Evaluación de las enzimas.

En las figuras 1, 2, 3 y 4 se muestran las curvas de progreso de la hidrólisis de cada uno de los sustratos, S1, S2, S3 y S4 con los preparados enzimáticos seleccionados E1, E2, E3 y E4. En cada gráfica se presenta el progreso de la hidrólisis para las relaciones enzima/sustrato estudiadas: a) E/S = 0.05, b) E/S = 0.1, c) E/S = 0.2 y d) E/S = 0.3. Las figuras 1 y 2 muestran que los sustratos S1 y S2 presentan porcentajes de sacarificación menores del 20% para todos los preparados enzimáticos, teniendo su máxima expresión cuando se realizan combinaciones con la enzima E2. Los sustratos S3 y S4 presentan bajos números de Kappa y porcentajes de hidrólisis mayores del 70% para la enzima E5 y E3 (ver figuras 3 y 4). Las combinaciones sustrato, enzima y relación E/S se rotulan de la siguiente forma: los dos primeros caracteres indican el tipo de sustrato, los dos siguientes el preparado enzimático y el último la relación E/S, donde 1 representa 0.05, 2 a 0.1, 3 a 0.2 y 3 a 0.3.

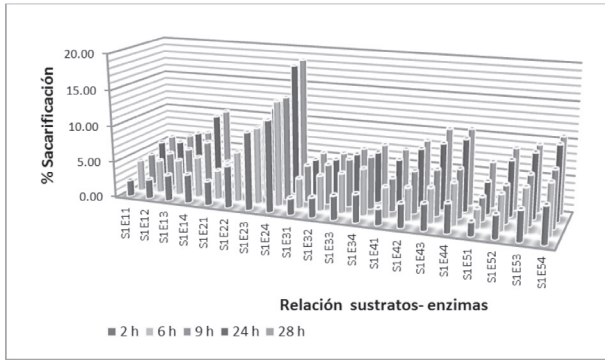


Figura 1. Curva de progreso (2, 6, 9, 24 y 28 horas) para el sustrato S1 y enzimas E1, E2, E3, E4, E5, para relaciones E/S de 0.05, 0.1, 0.2, 0.3

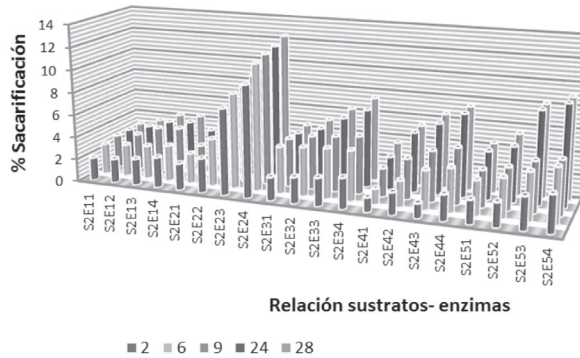


Figura 2. Curva de progreso (2, 6, 9, 24 y 28 horas) para el sustrato S2 y enzimas E1, E2, E3, E4 y E5, para relaciones E/S de 0.05, 0.1, 0.2, 0.3

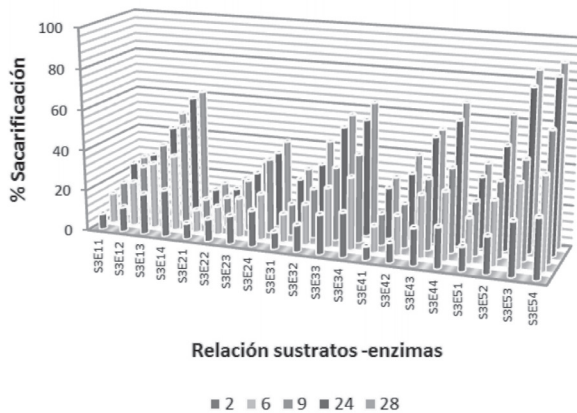


Figura 3 Curva de progreso (2, 6, 9, 24 y 28 horas) para el sustrato S3 y enzimas E1, E2, E3, E4, E5; relaciones E/S de 0.05, 0.1, 0.2, 0.3

El índice de sacarificación es un indicativo de la velocidad de hidrólisis del material lignocelulósico

con respecto al aumento de los sitios activos de la enzima. Un índice de sacarificación alto significa una alta asociación de los sitios activos al sustrato. Para el cálculo del índice de sacarificación se evaluaron pendientes hasta un tiempo de hidrólisis de 24 horas. No se considero el tiempo de 28 horas por presentar % sacarificación mayor del 60% perdiéndose la linealidad de la pendiente que representa el índice de sacarificación. La distribución de los coeficientes de determinación de las 80 pendientes que se utilizaron para la deducción del índice de sacarificación tiene una media de 0.9694 ± 0.02333 , para un nivel de confianza del 95%.

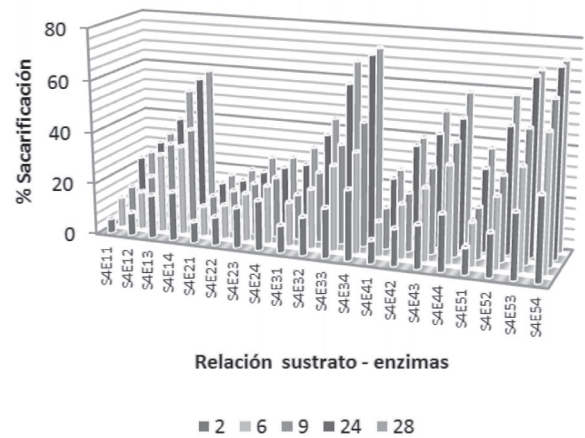


Figura 4. Curva de progreso (2, 6, 9, 24 y 28 horas) para el sustrato S4 y enzimas E1, E2, E3, E4, E5; relaciones E/S de 0.05, 0.1, 0.2, 0.3

Es importante notar el papel de la delignificación [35] sobre la hidrólisis de los residuos de la caña, resultado que coincide por lo investigado por Berlin A *et al* [36] sobre la presencia de enlaces no productivos entre la enzima y la lignina, que afecta la eficiencia catalítica de las enzimas

Los resultados de los índices de sacarificación para 2, 6, 9 y 24 horas de las diferentes parejas enzima – sustrato se presentan en la figura 5. Se observa que a mayor contenido de lignina en los sustratos (S1 y S2) se produce un bajo índice de sacarificación comparado con los sustratos a los cuales se les ha separado la mayoría de lignina presente (S3, S4). En la hidrólisis con enzimas con alta y baja actividad de papel filtro (FPU/ml) se obtuvieron bajos índices de sacarificación para los tiempos de muestreo estudiados. Por el contrario, en la hidrolisis con enzimas con mediana

FPU/ml y relaciones equilibradas de actividades de celulasas y hemicelulasas (E3, E4 y E5) los índices de sacarificación son mayores, indicando que el efecto sinérgico entre las diferentes enzimas presentes es el factor determinante de la hidrólisis y no el exceso de actividad de una de las enzimas. También se observa que la sacarificación se ve influenciada por la mayor relación E/S y por un tiempo, que parece ser cercano a las 24 horas.

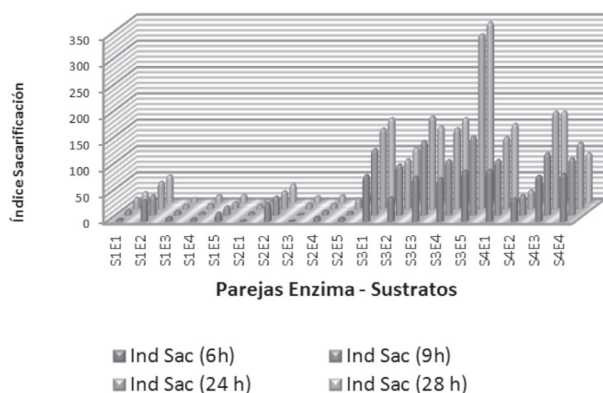


Figura 5. Índice de sacarificación (2, 6, 9, 24 horas)

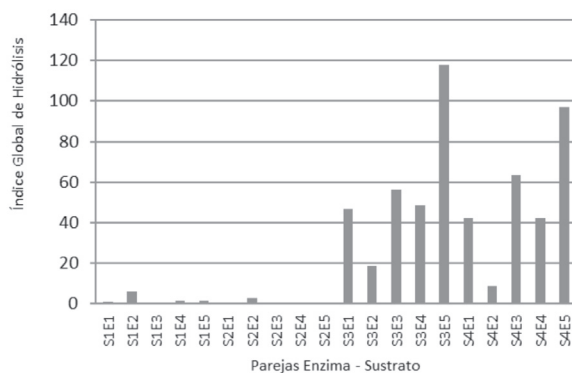


Figura 6. Índice Global de hidrólisis para las diferentes parejas Enzima – Sustrato

El índice de sacarificación solo, no es un indicador definitivo para definir la actividad de una enzima en un sustrato determinado. Aun cuando, el índice de sacarificación indica que tan rápido se hidroliza, no tiene en cuenta hasta donde puede hidrolizar; por esto, se hace necesario incluir un nuevo criterio que incorpore tanto la velocidad de hidrólisis como el grado de conversión, representado por el producto (interacción) de la media del índice de sacarificación con

la conversión promedio de hidrólisis (% de hidrólisis), que se denominará índice global de hidrólisis. En la figura 6 se presenta el perfil del criterio índice global de Hidrólisis, en el cual se observa que el preparado E5 alcanza el mayor índice en la hidrólisis de los sustratos S3 y S4, los cuales son los sustratos con mayor grado de delignificación producto del tratamiento.

4. CONCLUSIONES

- El índice global de hidrólisis puede ser usado como una prueba preliminar para determinar la eficiencia de los cocteles de enzimas en la hidrólisis de sustratos lignocelulósicos
- La concentración de lignina tiene un efecto sobre la acción de la hidrolítica de las enzimas usadas en la degradación de material lignocelulósico, en este caso los residuos de la caña.
- La acción sinérgica de actividades enzimáticas se refleja en una mejor velocidad de hidrólisis. Es así, como enzimas que presenten una buena distribución de actividades enzimáticas acorde con su composición, caso de la enzima E5; y en caso contrario las enzimas E1 y E2.
- El mayor índice global de sacarificación se muestra en la pareja S3E5, la cual indica el sustrato pretratado por el proceso organosolvente y la enzima con un contenido de FPU de 27.3, que representa 74% de la máxima actividad (FPU) que se puede alcanzar en las muestras enzimáticas propuestas.
- El pretratamiento es un factor importante a tener en cuenta en los procesos de hidrólisis de materiales lignocelulósicos. Estos pretratamientos, facilitan el ataque de las enzimas a la matriz lignocelulósica

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen el soporte financiero dado al proyecto 2007D-3719-346-07 por el Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, la Universidad Autónoma de Occidente (Laboratorio de Bioprocesos) y la Universidad del Valle, lo mismo que a la Agencia de Cooperación Suiza a través del proyecto: EPFL DDC 2009-2012 SCIENTIFIC COOPERATION FUND. También agradecen a Cenicaña por la logística de

disposición de los residuos y a Genencor internacional, Inc por la donación de algunas enzimas.

REFERENCIAS

- [1] Satyanarayan, N., Vaibhav, V., Prasant, K., Kathlene, J. and Ajay, K., Characterization of canadian biomass for alternative renewable biofuel. *Renewable energy*, 35, pp. 1624–1631, 2010.
- [2] SURVEY OF ENERGY RESOURCES, World Energy Council. 20th ed. Oxford: Elsevier Ltd; 267 P., 2004.
- [3] Singh, A., Pant, D., Korres, N., Nizami, A., Prasad, S., Jerry, D. and Murphy, J.D., Key issues in life cycle assessment of ethanol production from lignocellulosic biomass: Challenges And Perspectives. *Bioresource Technology*, 101, pp. 5003–5012, 2010.
- [4] Sanchez, C., Lignocellulosic residues: biodegradation and bioconversion by fungi, *Biotechnology Advances* 27, pp. 185-294, 2008.
- [5] Peng, F., Rin, J., Xu, F., Bian, J., Peng, P. and Sun, R., Comparative study hemicellulose obtained by graded ethanol precipitation from sugarcane bagasse. *J. agric. Food chem*, 57, pp. 6305 – 6317, 2009.
- [6] Sun, J.X., Sun, X.F., Zhao, H. Y. and Sun, R. C., Isolation and characterization of cellulose from sugarcane bagasse. *Polym. Degrad.Stab*, 84, pp. 331–339, 2007.
- [7] Singh, R., Singh, S., Trimukhe, K.D., Pandare, K.V., Bastawade, K.B. Gokhale, D.V. and Varma, A.J., Lignin–carbohydrate complexes from sugarcane bagasse: preparation, purification, and characterization, *Carbohydrate Polymers* 62, Issue 1, pp. 17, 57-66, 2005.
- [8] Beldman, G., Rombouts, F.M., Voragen, A.G. and Pilnik, W., Application of cellulose and pectinase from fungal origin for the liquefaction and saccharification of biomass. *Enzyme Micob. Technol*, 6, pp. 503-507, 1984.
- [9] Martin, C. and Thonson, B.A., Next oxidation pretreatment of lignocellulosic residues of sugarcane, rice, cassava and peanuts for ethanol production, *Journal Technol Biotechnol*, 82, pp. 174 – 181, 2007.
- [10] Saparrat, M. Mocchiutti, P. Liggieri, C., Lignolytic enzyme ability and potential biotechnology applications of the white-rot fungus *grammothele subargentea* lpsc no. 436 strain *Process Biochemistry*, 43, pp. 368–375, 2008.
- [11] Santoyo, A., Garcia, H. and Rodríguez, A., Celulosomas: sistemas multienzimaticos. *Journal of the Mexican chemical society*, 3, pp. 137-142, 1999.
- [12] Mitsuzawa, S., Kagawa, H., Li, Y.L., Chan, S.L., Paavola, C. and Trent, J., The rosettazyme: A synthetic celulosome. *Journal of Biotechnology*, 143, pp. 139–144, 2009.
- [13] Lee, H.Y. and Fan, L.T., Kinetic studies of enzymatic hydrolysis of insoluble cellulose: analysis of the initial rates. *Biotechnology and Bioengineering* 24, pp. 2383 -2406, 1982.
- [14] Wyman CE., *Handbook on Bioethanol: production and utilization*. Washinton, DC, Taylor & francis, 1996.
- [15] Margolles-Clark, E., Ilmén, M. and Penttilä, M., Expression patterns of ten hemicellulase genes of the filamentous fungus *Trichoderma reesei* on various carbon sources. *Journal of Biotechnology*, 57, (1-3), pp. 167-179, 1977.
- [16] Kubicek, C.P. and Penttilä, M.E., Regulation of production of plant polysaccharide degrading enzymes by *Trichoderma* and *Gliocladium*, *Biological Control and Commercial Applications*, 2, pp. 49 – 6, 1998.
- [17] Moreira N., Growing expectations: new technology could turn fuel into a bump crop *Sci News Online*, 168 (14), pp. 209-224, 2005.
- [18] CENICAÑA, Indicadores de productividad de la industria azucarera colombiana entre enero y agosto de 2006 - 2007 [Informe]. - Florida Valle del Cauca , 2007.
- [19] Rodriguez de Stouvenel, A. and Sernal, C., Economical Production of Lactic Acid Using Sugar Cane Wastes and Juice (*Saccharum officinarum* L.). *Agricultura Técnica*, 1 : Vol. 67, pp. 29-38, 2007.
- [20] Sterberg, D, Vijaykumar, R. Reese, E.T., *Can. J. Microbiol.*, 1977 pp. 23, 139, citado por Wood M and Bhat M., 1988.
- [21] Mandels, M., Andreotti, R. Rocche, C. *Biothechnol. Bioeng. Symp*, pp. 6- 17, 1976.
- [22] Ghose, T.K., Measure cellulose activities, *Pure & Appl. Chem.*, 59 (2), pp. 257-268, 1987.
- [23] Wood, T. and Bhat, M., Methods for measuring Cellulase activities. *Methods in Enzymology*, 60, pp.. 87 – 112, 1988.
- [24] Bailey, M, Biely, P. and Pountanen, K., Interlaboratory testig of methods for assay of xylanase activity. *Journal of Biotechnology*. 23, pp. 257 – 270, 1992.

- [25] Megazyme International Ireland Limited. Assay 1-4- β xylanase using Azo Xilan (OAT), SAXYO, 2006.
- [26] Megazyme International Ireland Limited Ltda. Assay of endo 1-4- β -D Galactanase using AZO –GALACTAN (AGALP), 2009.
- [27] Megazyme International Ireland Limited. Assay of 1-4- β - endo Mannanase using AZO- CAROB GALACTOMANNAN, 2009.
- [28] Megazine International Ireland Limited, Assay of Rhamnogalacturonanase Using Azo- Rhamnogalacturonan AZRH 11/99), 2009.
- [29] Jong-Rok, J., Murugesan, K., Kim, Y., Kim, E. and Chang, Y., Synergistic effect of laccase mediators on entachlorophenol removal by *Ganoderma lucidum* laccase. *Appl Microbiol Biotechnol*, 81, pp. 783–790, 2008.
- [30] Bourbonnais, R., Paice, M., Freiermuth, B., Bodie, E. and Borneman, S., Eactivities of Various Mediators and Laccases with Kraft Pulpand Lignin Model Compounds. *Applied and Environmental Microbiology*. 63 (12), pp. 4627–4632, 1997.
- [31] Mutis, D., Delignificación de residuos de la caña de azúcar (hojas y cogollos) con procesos químicos, Tesis de grado, Ingeniería Química, Universidad del Valle, 2009.
- [32] Technical Association Of The Pulp And Paper Industry. Kappa number of pulp. T 236 om-99. Canada: TAPPI, 1999.
- [33] Van Soest, P. J., Use of detergents in the Analysis of fibrous feeds. I. Preparation of fiber residues of low nitrogen content. *Journal of the AOAC*, 46(5), pp. 829 – 835, 1983.
- [34] Miller, G.L., Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. *Analytical chemistry*, 31, pp. 426- 426, 1959.
- [35] Hetti, P., Role of lignin in the enzymatic hydrolysis of lignocelluloses. (PhD Thesis). Finland. Helsinki University of Technology, 2004.
- [36] Berlin, A., Gilkes, N., Kurabi, A., Bura, R., Tu, M., Kilburn, D. and Saddler, J., Weak Lignin – Binding Enzymes. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, pp. 121–124, 2005.