

Estudio Cinético de la Hidrólisis Enzimática de la Celulosa del Bagazo de Caña (Parte I)

L. LARA CUÉ

Dpto. de Fermentaciones y Efluentes, Centro Nacional de Investigaciones Científicas, La Habana, Cuba

Recibido: 19 de Junio de 1974

Recibido: 10 de Septiembre de 1975

ABSTRACT. A study was made of the reaction of the enzymatic hydrolysis in a laboratory batch reactor, analyzing the manner in which variations of parameters such as pH, temperature, enzyme concentration and substrate concentration (cellulosic material) alter the reaction rate. It was also studied the stability of the enzyme used and the influence on the hydrolysis velocity of the produced reducing sugars concentration. Lastly, the effects of substrate modification were studied, these being a change in the degree of polymerization and an increase in crystallinity.

RESUMEN. Se hizo un estudio de la reacción de hidrólisis enzimática en un reactor batch de laboratorio, analizándose cómo alteran a la velocidad de reacción las variaciones en los parámetros pH, temperatura, concentración de enzima y concentración de sustrato (material celulósico). Además, se estudió la estabilidad de la enzima empleada, la influencia de la concentración de azúcares reductores producidos sobre la velocidad de hidrólisis y por último los efectos de la modificación del sustrato sometido a hidrólisis, como fueron el cambio en el grado de polimerización y el aumento en la cristalinidad.

INTRODUCCION

De todos los procesos de degradación de materiales celulósicos, la hidrólisis enzimática es quizás, la que en mayor magnitud ocurre en la naturaleza. Suman varios miles los microorganismos que participan en el proceso de degradación de la celulosa hasta convertirla en carbohidratos de menor peso molecular (*Ghose, 1969*).

Los principales géneros se encuentran entre las bacterias y hongos, aunque también se han aislado levaduras con gran capacidad celulolítica.

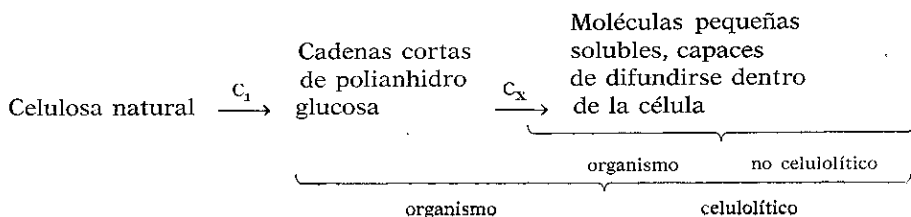
Los microorganismos que poseen esta propiedad de forma específica, se debe a que contienen las enzimas extracelulares que pueden catalizar la hidrólisis de la celulosa.

El mecanismo de ataque de la celulosa es altamente complicado y aún su estudio es incompleto. Casi todos los investigadores coinciden en que son complejos enzimáticos entre los que se destacan dos fracciones fundamentales llamadas celulosa I y celulosa X.

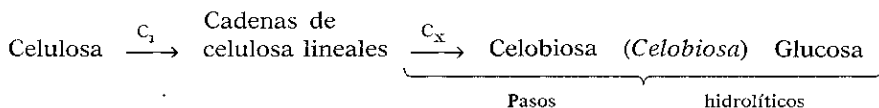
El componente de este complejo enzimático verdaderamente celulolítico es el C_1 , el cual ataca la celulosa natural convirtiéndola en polímeros de cadenas lineales, el otro grupo, las C_x actúan sobre esas cadenas lineales, hidrolizándolas (Reese y cols., 1960; Mandels y Reese, 1964; Li y cols., 1965; Selby, 1963; Reese, 1956; Nisizawa, 1973 y Kolitcina y Koslov, 1969).

Los trabajos de Selby y Maitland, (1967 y 1968) y Wood, (1968) sobre el fraccionamiento de los componentes enzimáticos de la *Trichoderma viride* mediante columnas de Sephadex y columnas de intercambio iónico, corroboró lo antes planteado y el efecto sinérgico entre los componentes.

Un esquema simplificado de lo antes expuesto es el planteado por Reese y cols., (1960) sobre la forma de ataque del complejo enzimático celulosa.



Otro esquema más detallado publicado por Katz y Reese, (1968) es el siguiente:



Todo este esquema de ataque será más efectivo en la medida que podamos determinar las causas que lo alteran.

El presente trabajo tiene como objetivo el estudio a escala de laboratorio de los factores fundamentales involucrados en la hidrólisis enzimática de la celulosa del bagazo de caña, utilizando para ésto, enzimas libres de células obtenidas por cultivo sumergido de *Trichoderma Viride*.

MATERIALES Y METODOS

Equipos utilizados y condiciones de las reacciones

Todas las reacciones de hidrólisis enzimática fueron realizadas en un reactor de 2 litros de capacidad, con suficiente agitación (300 ± 20 rpm), control de temperatura ($50 \pm 0.1^\circ\text{C}$) y un pH de 5 ± 0.1 (buffer acetato de sodio 0.2 M) (Figs. 1, 2, 3 y 4).

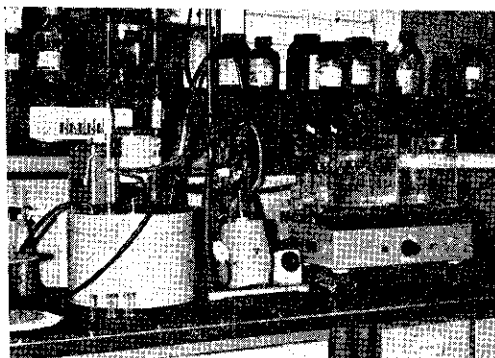


Fig. 1. Vista general de las instalaciones donde se realizaron los experimentos.

El promedio de duración de las corridas fue de 30 horas.

Se sacaron muestras del reactor, para seguir la velocidad de reacción por los azúcares formados en la hidrólisis, a diferentes intervalos, partiendo de 0.25 horas durante la etapa inicial y aumentando el intervalo de tiempo a medida que iba decreciendo la velocidad de reacción en la hidró-

lisis, buscando extraer el número de muestras imprescindibles para minimizar el error por no reposición de la solución. Las muestras eran conservadas congeladas en tubitos plásticos de 2 ml de capacidad para su posterior análisis.

Los ensayos de laboratorio realizados para comprobar la variación con el tiempo de las muestras así preservadas no mostraron diferencias significativas en los resultados analíticos a lo largo de todo el intervalo de tiempo estudiado (240 horas).

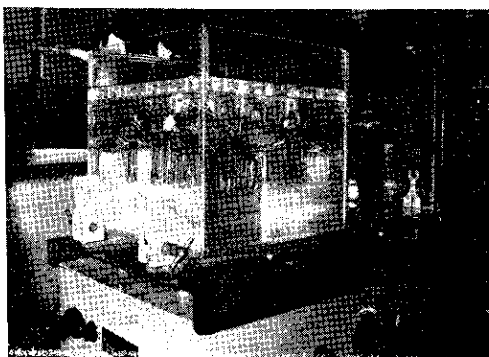


Fig. 2. Reactor utilizado en las reacciones de hidrólisis enzimática, desmontado para que se puedan apreciar sus diferentes aditamentos.

Preparación del sustrato

El bagazo de caña es sometido a un proceso de oxidación alcalino con hidróxido de sodio al 10%, a temperaturas entre 170 y 180°C durante una hora, de acuerdo al procedimiento descrito por Dunlap, (1969), con el cual se logra eliminar una gran parte de la lignina unida a las moléculas de celulosa, disminuir la longitud promedio de las fibras, el número de moléculas fuertemente ordenadas y regularmente orientadas y así poder realizar un ataque enzimático más efectivo. Antes del tratamiento: 50.20 \pm 1.10% de celulosa, 26.00 \pm 2.03% de pentosanos, 20.50 \pm 0.90% de lignina, el grado de polimerización fue 1200 y el índice de cristalinidad 64 \pm 1%. Después del tratamiento: 75.10 \pm 1.06% de celulosa, 11.00 \pm 1.30% de pentosanos, 11.10 \pm 0.95% de lignina, 879 de grado de polimerización y el índice de cristalinidad fue de 42.00 \pm 1.00%.

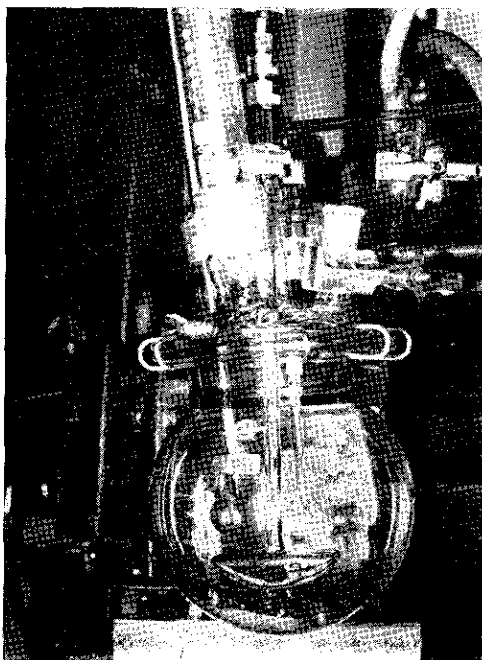


Fig. 3. Detalles del equipo montado en una zaranda donde se realizaron los experimentos usando tubos de ensayos, logrando mantener un buen control de la temperatura y pH.

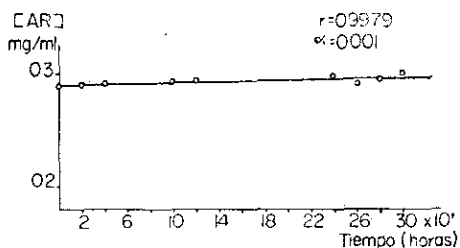


Fig. 4. Prueba para comprobar la inactivación por congelación de las muestras. Se pusieron a congelar las muestras en tubitos plásticos semejantes a los utilizados en la corrida, conteniendo una solución de hidrolizado de pH 5 (buffer acetato 0.2 M) extrayéndose del frío, con determinada periodicidad, para hacerla reaccionar durante una hora a 50°C con papel de filtro Whatman No. 1.

Enzimas empleadas

Se utilizaron enzimas obtenidas a partir de cultivo sumergido de *Trichoderma Viride*, del tipo Onozuka SS (All Japan Biochemical, Ltd) trabajando a una actividad celulolítica de 0.3 mg/ml h de azúcares reductores (0.08% P/V de enzima).

Determinaciones analíticas

Concentración de azúcares reductores (mg/ml): según el método de Somogyi-Nelson modificado.

Actividad celulolítica, (debido a C_1) utilizando como sustrato papel de filtro Whatman No. 1 y actividad enzimática hidrolítica (debido a C_x) utilizándose CMC: fueron determinadas por los métodos empleados por Ghose, (1969), siguiendo la formación del producto por los azúcares reductores.

Contenido de celulosa: según el método gravimétrico de Crampton y Maynard, (1938).

Contenido de pentosanos: por el método espectrofotométrico de Jones, (1961).

Grado de polimerización: método viscosimétrico de Tappi T-230 SM 50 modificación.

Contenido de lignina: Arsenav y Pepper, (1965).

Índice de cristalinidad: por difracción de rayos X, aplicamos la fórmula de Segal-Creely, utilizando 11° para el pico y 9.5° para el fondo del difractograma. Se usaron pastillas, con 0.29 g de muestras sometidas a 10 atm.

RESULTADOS Y DISCUSION

Análisis de los factores que alteran la velocidad de reacción

Temperatura. Se probó la actividad C_1 a varias temperaturas, desde 30°C hasta 70°C , manteniendo el pH a 5, que fue donde se observó una mayor actividad de la enzima. Los resultados reportados fueron obtenidos después de hacer reaccionar la mezcla enzima-sustrato durante una hora.

Como puede observarse en la Fig. 5, la velocidad de hidrólisis es mayor a 50°C que a 45°C y que a 55°C. Mostrando un proceso de desactivación sumamente rápido después de los 55°C.

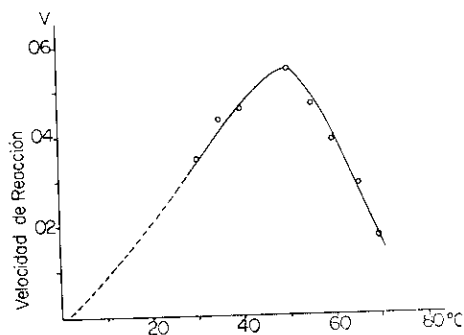


Fig. 5. Afectación de la actividad enzimática de la celulosa con la variación de temperatura, manteniendo los otros parámetros constantes (pH 5, concentración de enzimas 0.08%, concentración de sustrato 10.44% y volumen de solución 1 500 ml).

pH. La concentración de iones hidrógeno tiene un marcado efecto sobre la velocidad de acción de las enzimas. Se comprobó que el rango de pH óptimo, utilizando una temperatura de 50°C, estaba entre 5 y 5.2 y que en los extremos de la curva, es decir por debajo de pH 3 y por encima de pH 7 ocurría un proceso irreversible, (Fig. 6), lo cual pudo comprobarse al restablecerse el pH óptimo y no observarse cambios significativos en las velocidades de reacción de las enzimas en relación al presentado en esas condiciones extremas; esto probablemente se debe a una desnaturalización de las proteínas enzimáticas.

Aunque los resultados varían de acuerdo a la fuente de microorganismo utilizadas y el sustrato empleado (*Halliwel, 1965; Reese, 1956; Selby y Maitland, 1967 y Toyama, 1969*), reportándose valores de pH desde 3.5 a 6 y temperaturas que varían desde 40 hasta 60°C; algunos investigadores han reportado parámetros de pH y temperatura muy semejantes a los obtenidos en este trabajo (*Ghose, 1969; Reese y cols., 1960 y Toyama, 1969*).

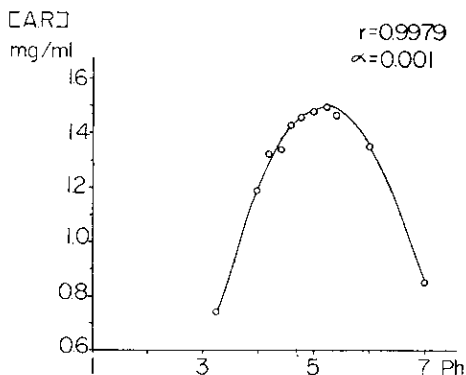


Fig. 6. Curva de actividad de la celulasa a diferentes pH, manteniendo las otras condiciones constantes (temperatura $50 \pm 0.1^\circ\text{C}$, concentración de enzimas 0.08%, concentración de sustrato 10.44% y volumen de solución 1500 ml).

Productos de la hidrólisis. La concentración de azúcares reductores se incrementa de acuerdo al grado de extensión de la hidrólisis (fundamentalmente glucosa y en menor cuantía xilosa). Katz y Reese, (1968), hallaron que la glucosa producida a concentraciones de un 30%, producía efectos inhibitorios de un 40% aproximadamente. Ghose, (1969), probando a diferentes períodos también encontró efectos inhibitorios sobre la hidrólisis, pero más bajos que los reportados por Katz y Reese para una concentración de un 30% de azúcares reductores, en un tiempo de contacto dado por la enzima y el sustrato entre 2 y 48 horas el % de inhibición osciló entre 17 y 29.

En nuestro caso se añadieron diferentes concentraciones de glucosa al inicio de la reacción, hasta 2% (concentración por encima de la que estamos obteniendo en la hidrólisis), dando una linealidad altamente significativa, mostrando con estos resultados que no existía inhibición a esos niveles probados (Fig. 7).

Estabilidad de la enzima. Las enzimas en solución sometidas a las condiciones de la reacción, pH 5 y temperatura de 50°C (Fig. 8), sufren al final de las 30 horas de reacción una pérdida por inactivación de un 10%, mostrando una variación lineal con el tiempo.

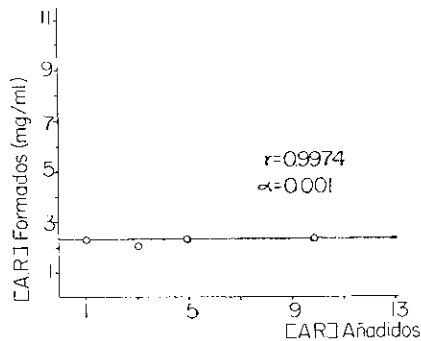


Fig. 7. Se añadieron inicialmente diferentes concentraciones de glucosa, para observar su posible efecto de inhibición por la concentración de glucosa en solución. La pendiente es prácticamente cero.

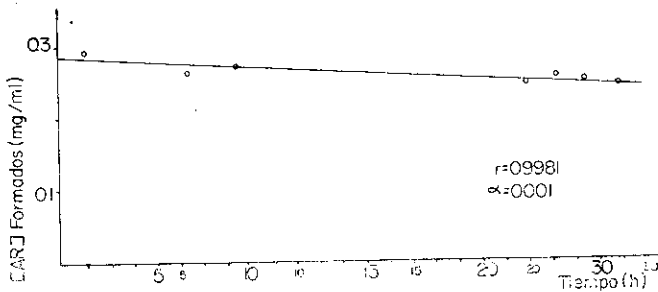


Fig. 8. Efecto de la inactivación con el tiempo de las enzimas sometidas a las condiciones de la reacción (50°C, pH 5).

Cambio de las condiciones en el sustrato. Al hidrolizar enzimáticamente el bagazo pretratado se observó un notable decrecimiento en el grado de polimerización (de 879 a 430) y un aumento en el % de cristalinidad ($40.5 \pm 1 - 71 \pm 1.5$). Cuando ese bagazo residual, después de lavado y secado, otra vez fue sometido a hidrólisis enzimática, con una solución de enzimas frescas, manteniendo las mismas condiciones de temperatura, pH, concentración de enzimas y concentración de sustrato (material celulósico), a pesar de que el grado de polimerización era mucho menor que

en el primer hidrolizado, el grado de extensión de la hidrólisis fue bajo. Mostrando que predominó como factor fundamental el grado de cristalinidad de la celulosa (Fig. 9).

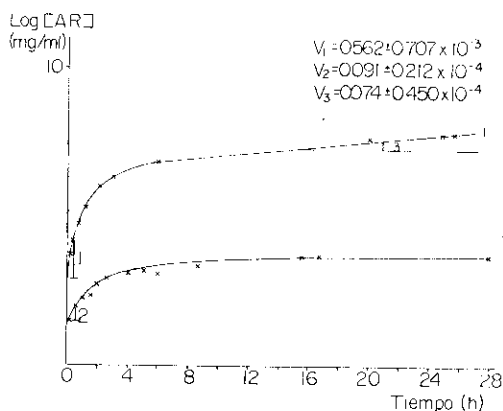


Fig. 9. Curva de extensión de la hidrólisis para comparar las velocidades iniciales V_1 y V_2 . V_1 = velocidad inicial de la reacción I producida al hacer reaccionar la enzima con bagazo tratado alcalinamente. V_2 = velocidad inicial de la reacción II producida al hacer reaccionar la enzima fresca con bagazo hidrolizado enzimáticamente al final de la reacción I. V_3 = velocidad final de la reacción I.

La curva I muestra el comportamiento del experimento con el bagazo pretratado, la velocidad final (V_1) en la hidrólisis fue de 0.562. Al cabo de 28 horas paralizamos la reacción y ese bagazo lavado y secado es sometido de nuevo a hidrólisis enzimática manteniendo todas las condiciones iguales, y nos dio una velocidad inicial (V_2) de 0.092, que si se tiene en cuenta al paralizar la reacción (en la curva I) existía una velocidad de reacción (V_3) de 0.072 al comparar estadísticamente V_2 y V_3 la diferencia nos dio no significativa.

CONCLUSIONES

En el estudio de los parámetros que alteran la velocidad de reacción, se determinó que las variaciones en el pH por encima de 7 y por debajo de 3, producen efectos irreversibles, al igual que las temperaturas altas, por encima de 55°C comienza a observarse su efecto. Estos resultados deben tenerse presente en trabajos posteriores.

Del análisis de la velocidad de hidrólisis con el tiempo de reacción, se puede ver que ésta decrece a medida que progresa la hidrólisis. La explicación que puede darse del comportamiento cinético de las reacciones de hidrólisis de la celulosa del bagazo de caña por ataque de las enzimas producidas por cultivo sumergido de la *Trichoderma viride*, en las condiciones planteadas, es que el grado de extensión de la hidrólisis con respecto al tiempo de reacción, decrece fundamentalmente con el aumento en la cristalinidad de la celulosa.

REFERENCIAS

- ARSENAV D. F. AND PEPPER J. M. The determinations of lignin. *Pulp and Paper Magazine of Canada*, 66, 8, 1965.
- CRAMPTON E. AND MAYNARD L. A. The relation of cellulose and lignin to the nutritive value of animals feeds. *J. Nutrition*, 15, 383, 1938.
- DUNLAP CH. E. Proteins from waste cellulose by Chemical Microbial Processing, Doctoral Thesis, Louisiana State University, USA, 1969.
- GHOSE T. K. Continuous Enzymatic culture filtrates of Saccharif of cellulose with *Trichoderma viride*. *Biotechnology and Bioengineering*, 11, 239, 1969.
- HALLIWELL G. *Biochemical J.*, 95, 270, 1965.
- JONES H. L. The determination of Pentosans by Ultraviolet absorption Spectrophotometry. *Tappi*, 44, 10, 1961.
- KATZ M. AND REESE E. T. *Applied Microbiology*, 2, 419, 1968.
- KUSLITCINA V. P. Y KOSLOV K. A. *Prikladnaya Biojimiya y Mikrobiologiya*, 4, 1, 1968.
- LI L. H., FLORA R. M. AND KING K. W. *Arch. Biochem. Biophys.*, 11, 439, 1965.
- MANDELS M. AND REESE E. T. *Developments Industr. Microbiology*, 5, 5, 1964.
- NISIZAWA K. *J. Ferment. Techn.*, 51, 268, 1973.
- REESE E. T., SIU R. G. AND LEVINSON H. S. *J. Bacteriol.*, 59, 485, 1960.
- REESE E. T. *Applied Microbiology*, 4, 39, 1956.
- SELBY K. Advances in Enzymatic Hidrolisis of cellulase and related materials. 33 Ed. by Reese E. T., Pergamon Press Ltd., London, 1963.
- SELBY K. AND MAITLAND C. C. *Arch. Biochem. Biophys.*, 118, 154, 1967.
- SELBY K. AND MAITLAND C. C. *Biochemical J.*, 104, 716, 1968. Tappi T-230, SM 50 Modification.
- TOYAMA J. *Adv. Chem. Series*, 95, 359, 1969.
- WOOD, T. M. *Biochemical J.*, 109, 217, 1968.