Cinética Enzimática del Bagazo de Caña para la Producción de Glucosa Utilizando la Enzima *Trichoderma longibrachiatum*

Diofanor Acevedo^{(1)*}, Clemente Granados⁽¹⁾ y Eliana M. Guerrero⁽²⁾

(1) Universidad de Cartagena, Facultad de Ingeniería, Departamento de Ingeniería de Alimentos, Avenida el Consulado, Calle 30 No. 48-152. Cartagena, Bolívar-Colombia (e-mail: diofanor3000@gmail.com).

(2) Universidad de San Buenaventura, Facultad de Ingeniería Química, Calle Real de Ternera No. 30-966. Cartagena, Bolívar-Colombia.

* Autor a quien debe ser dirigida la correspondencia

Recibido Ene. 17, 2014; Aceptado Abr. 19, 2014; Versión final recibida May. 21, 2014

Resumen

Se ha estudiado la hidrólisis enzimática del bagazo de caña utilizando la enzima *Trichoderma longibrachiatum*. Siguiendo la cinética de velocidad propuesta por Michaelis-Menten, de los datos de V_0 y S_0 obtenidos a concentraciones de 30, 40 y 50 mg/mL de bagazo de caña con dosificaciones de enzima constante de 0.210, 0.420 y 0.840 mg/mL se calcularon los valores de K_m y V_{max} . A concentración de sustrato de 50 mg/mL y de enzima de 0,840 mL se obtuvo la mayor concentración de glucosa (0.1902 mg/mL). El valor de K_m para la enzima fue de 22.8 mg/mL lo que indica que tiene poca afinidad con el sustrato. Los valores de V_{max} para las diferentes dosificaciones de enzima fueron de 0.08495, 0.1034 y 0.1176 mg/mL·s.

Palabras clave: cinética enzimática, bagazo de caña, *Trichoderma longibrachiatum*, Michaelis-Menten

Enzyme Kinetics of Sugarcane Bagasse for Glucose Production using Enzyme *Trichoderma longibrachiatum*

Abstract

The enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse using enzyme *Trichoderma longibrachiatum* has been studied. Following the kinetic rate proposed by Michaelis-Menten, data of V_0 and S_0 obtained at concentrations of 30, 40 and 50 mg / mL of bagasse with constant dosages of enzyme of 0.210, 0.420 and 0.840 mg/mL, values of K_m and V_{max} were calculated. With substrate concentration of 50 mg/mL and 0.840 mL of enzyme, the greater glucose concentration was obtained (0.1902 mg/mL). The value of K_m for the enzyme was 22.8 mg/mL, indicating that it has little affinity for the substrate. V_{max} values for different enzyme dosages were 0.08495, 0.1034 and 0.1176 mg/mL·s.

Keywords: enzyme kinetics, bagasse, *Trichoderma longibrachiatum*, Michaelis-Menten model

INTRODUCCIÓN

El género *Trichoderma* son hongos saprofitos del suelo y la madera, de crecimiento muy rápido. Las especies de este género se encuentran ampliamente distribuidas por todas las latitudes, y se presentan naturalmente en diferentes ambientes, especialmente en aquellos que contienen materia orgánica o desechos vegetales en descomposición. En los últimos años se han incrementado los estudios de campo para su uso en cultivos de hortalizas y ornamentales. No obstante, la información sobre su empleo en la producción agrícola es insuficiente y dispersa. La capacidad de producir diversos metabolitos y de adaptación a diversas condiciones ambientales y sustratos, confiere a *Trichoderma* la posibilidad de ser utilizado en la industria biotecnológica. Los productos a partir de cepas seleccionadas de *Trichoderma* pueden ser aplicados bajo diferentes condiciones (Martínez *et al.*, 2013). Estudios anteriores han determinado el enorme potencial de los aislados de hongos *T. longibrachiatum* en la degradación de los HAP de alto peso molecular tales como BAA y demás estudios de la industria biotecnológica (Rosales *et al.*, 2013).

En los últimos años, ha habido una tendencia creciente hacia la utilización más eficiente de los residuos agroindustriales, incluyendo el bagazo de la caña de azúcar. Varios procesos y productos han sido reportado que utilizan bagazo de caña como materia prima. Estos incluyen la producción de la disolución de pulpa, pasta de papel, el etanol y energía, además es un material lignocelulósico con potencial para la disolución de la producción de celulosa, especialmente cuando se integra en los procesos de biorrefinería (Wolf, 2011). El bagazo es la fibra residuo restante cuando se presiona la caña de azúcar para extraer el azúcar. El bagazo se compone de fibra y médula, la fibra es de paredes gruesas y relativamente largo (1,4 mm) (Aigbodion *et al.*, 2010). El bagazo es un residuo lignocelulósico abundante se encuentran típicamente en los países tropicales que procesan la caña de azúcar, tales como Brasil, India, Cuba, China y Nigeria (Aigbodion *et al.*, 2010). Las fibras de bagazo (BF) son generalmente gruesas y rígidas. Se utiliza como combustible para calderas por la fábrica de azúcar o como una materia prima para la fabricación de productos de pasta y de papel (Agunsoye y Aigbodion, 2013). Consta de aproximadamente el 40-50% de celulosa y 20-30% de hemicelulosa y 18-25% de lignina. Debido a su bajo contenido en cenizas (1-3%), el bagazo ofrece numerosas ventajas en comparación con otros residuos de los cultivos, tales como paja de arroz, paja de trigo (Freitas y Colodette, 2014). El bagazo de caña de azúcar es un material lignocelulósico con potencial para la disolución de la producción de celulosa, especialmente cuando se integra en los procesos de biorrefinería (Wolf, 2011).

Caspeta *et al.*, (2014) estudiaron la hidrólisis enzimática con cargas de alto contenido en sólidos para la conversión de bagazo de agave a etanol. Estos reportaron un método eficaz que permite la producción de jarabes con concentraciones de glucosa altos, así como los altos rendimientos de biomasa en azúcares-conversión de los residuos de bagazo de agave utilizando hidrólisis enzimática con cargas de alto contenido en sólidos realizados en un biorreactor de peg-mezclador a escala de laboratorio. Y por otro lado Sposina *et al.*, (2013) estudiaron el uso de celulasa-celobiohidrolasa libre de mezcla para la hidrólisis de la celulosa microcristalina y el bagazo de caña de azúcar tratada previamente por molienda, encontrando que los tratamientos previos que alteran la estructura nativa y/o la composición y/o cristalinidad de la pared celular vegetal aumentan la hidrólisis enzimática. En general, 1 tonelada métrica de caña de azúcar genera 280 kg de bagazo de caña, aproximadamente el 50% de este residuo se utiliza en las fábricas de azúcar/destilerías como la fuente de energía mientras que el restante se convierte en abono o utilizan en la industria de papel (Peng *et al.*, 2009).

El principal problema en el uso de celulosa de bagazo es su estructura cristalina que hace que sea difícil para hidrolizar (Panagiotopoulos *et al.*, 2013). Para la hidrólisis enzimática del material lignocelulósico, la mayoría de los estudios utilizaron las enzimas comerciales caros que se suman al coste de la fermentación y por lo tanto limitan la comercialización de la producción de hidrógeno a base de celulosa (Stork *et al.*, 2009). La hidrólisis enzimática y la fermentación se pueden llevar a cabo por diversos enfoques pero con ciertos compromisos y desventajas. Hay varios estudios relacionados con la cinética enzimática de caña de azúcar (Lo *et al.*, 2008, Pattra *et al.*, 2008, Lo *et al.*, 2009 y Fangkum y Reungsang, 2011), pero esta no se ha estudiado utilizando la enzima *T. Longibrachiatum*, como se presenta en este trabajo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materia prima: Cuatro mil cien gramos (4100 gramos) de bagazo de caña proveniente del municipio de Sahagún (Córdoba) fueron triturados con el fin de disminuir su tamaño y así hacer el material mas accesible a la hidrólisis (Sposina *et al.*, 2013). Siguiendo la metodología de Pattra *et al.*, (2008) se almacenó en un medio refrigerado y posteriormente se tamizó obteniendo tamaños de partícula menores de 2,4 mm. Se secó el bagazo en un horno a 80 °C durante 24 horas.

Hidrólisis enzimática: La enzima que utilizada corresponde a un preparado comercial de celulasa ácida suministrado por DYADIC INTERNATIONAL, INC. Con la denominación comercial ROCKSOFT™ SUPER ACE, producto # 120. Es un preparado de celulasa líquida proveniente de una cepa de *T. longibrachiatum*. La enzima fue utilizada en su forma comercial. Los tratamientos enzimáticos sobre el bagazo se realizaron en condiciones óptimas de trabajo para la enzima, correspondiente a la temperatura de 40 °C y pH de 6 (Controlado por pH Indikator papier Universalin dikator pH 1/10 marca Merck), manteniendo agitación constante durante la hidrólisis, para lo que se utilizaron recipientes de 1000ml (Schott Duran), donde se adicionaron 15, 20 y 25 g de bagazo en 500 ml de agua destilada. Este recipiente fue sumergido en un baño termostático a 40 °C para mantener la temperatura constante durante todo el proceso. Cuando se alcanzó la temperatura dentro del recipiente se agregó el complejo enzimático con dosificaciones de 0,210, 0,420 y 0,840 mL a concentraciones de bagazo de 30, 40 y 50 mg/mL con agitación constante durante 5 horas. Las experiencias se efectuaron por duplicado, siendo el resultado final la media de los resultados obtenidos. El seguimiento de la velocidad de la hidrólisis enzimática fue controlado por medio de la determinación del contenido de glucosa soluble producido en el baño residual a diferentes tiempos. Para ello se utilizó GLUCOSA OXIDASA/PEROXIDASA (enzimática-espectrofotométrica), como reactivo sensible. Se empleó glucosa anhidra como reactivo patrón para la obtención de la curva de calibrado del método. Se utilizó un espectrofotómetro Spectronic 20D+ para la lectura de la absorbancia.

Preparación de la curva de calibrado y determinación del contenido de glucosa: La curva de calibrado se determinó tomando como referencia el reactivo anhidro de glucosa. Se prepararon disoluciones con concentraciones conocidas de 0,4 a 0,004 mg de glucosa/mL, determinándose la absorbancia según el procedimiento analítico experimental descrito por Guerrero (2004). Para determinar el contenido de glucosa de las muestras extraídas durante la hidrólisis enzimática, se procedió de la misma forma que para la preparación de la curva de calibrado, aplicando el método de análisis sobre la muestra del baño cada hora durante 5 horas. Las muestras fueron sometidas a filtrados para que no existieran partículas suspendidas con el objetivo de mejorar la lectura en el espectrofotómetro.

Velocidad inicial de reacción (V_0), constante de Michaelis-Menten (K_m) y velocidad máxima de reacción V_{max} : Habiendo obtenido las curvas de concentración de glucosa en función del tiempo se siguió con la obtención de los datos de V_0 para cada una de las concentraciones de sustrato inicial (S_0) conocidas. Para esto se debe tener en cuenta que la medida de la V_0 se debe hacer cuando la reacción enzimática esta en el estado de saturación, en donde los centros activos de la enzima se encuentran llenos de sustrato para evitar el error introducido por el deterioro de la enzima, por lo tanto la V_0 se realizó antes que se consumiera el 10% de sustrato que es la pendiente de la curva de avance a un tiempo menos de 30 minutos. Como la dosificación de enzima es muy pequeña y la S_0 es muy grande al comienzo de la reacción se considera que la concentración de enzima-sustrato es constante para toda la reacción. Siguiendo la cinética de velocidad propuesta por Michaelis-Menten, de los datos de V_0 y S_0 obtenidos a concentraciones de 30, 40 y 50 mg/mL de bagazo de caña con dosificaciones de enzima constante de 0,210, 0,420 y 0,840 mg/mL se calcularon los valores de K_m y V_{max} . Para las representaciones gráficas Michaelis-Menten se utilizó el programa Hiperbolico Regresión Setup.

ANÁLISIS DE RESULTADOS

Curva de calibrado y de avance de la reacción

En la Figura 1 se representa gráficamente la curva de calibrado para los valores medios de la absorbancia. Como se puede observar, la curva de calibrado tiene un comportamiento lineal dentro de los márgenes establecidos experimentalmente. A partir de la Ecuación (1), proveniente del despeje de la concentración de glucosa de la ecuación lineal facilitada por la curva de calibrado se obtuvieron los datos de concentración de glucosa en el proceso de hidrólisis. En la Figura 2 se muestran las curvas de avance de la reacción que representa la velocidad de formación del producto en función del tiempo con dosificación de enzimas de 0,210, 0,420 y 0,840 mL a diferentes concentraciones de bagazo (30, 40 y 50 mg/mL).

$$[Glucosa] = \frac{Abs - 0,004}{0,3084} \quad (1)$$

Fig. 1: Curva de calibrado del método analítico empleado para la determinación de glucosa.

Fig. 2: Avance de reacción del bagazo de caña a una dosificación de enzima del (a) 0,210 ml, (b) 0,420 ml y (c) 0,840 mL.

A través de cada uno de estos diagramas se puede ver claramente como la velocidad de formación del producto en la primera hora es mayor que en las horas siguientes. Esto se debe a que al adicionar la enzima al bagazo los centros activos de esta se encuentran desocupados, y en esos momentos entran en contacto con el bagazo todos los centros activos de la enzima, reaccionando con el sustrato que se encuentra en mayor proporción, provocando que se genere un rápido incremento en la velocidad de formación del producto (Goldbeter, 2013; Tzafirri y Edelman, 2007). Al transcurrir el tiempo la cantidad de sustrato que la enzima puede llegar a degradar va disminuyendo, generando a la vez una reducción en la velocidad de formación de producto. También se observó que al incrementarse la concentración de sustrato, manteniendo la dosificación de enzima constante, la concentración de glucosa o la velocidad de formación de producto aumentan, debido a que existe una mayor cantidad de sustrato que la enzima puede llegar a degradar. Se pudo observar claramente que la mayor concentración de glucosa obtenida se encuentra a una concentración de sustrato inicial $[S_0] = 50$ (mg/mL) y una dosificación de enzima de 0,840 mL con un resultado de 0,1902 mg/mL. También se puede analizar que al incrementar la dosificación de enzima manteniendo la $[S_0]$ constante, la concentración de glucosa va aumentando.

Cálculo De la V_0 de la reacción enzimática y valores de K_m y V_{max} .

Los datos de V_0 obtenidos a concentraciones de 30, 40 y 50 mg/mL con dosificaciones de enzima constante de 0,210, 0,420 y 0,840 mg/mL se muestran en la Tabla 1. A través de estos valores de V_0 y $[S_0]$ se grafica la ecuación de Michaelis-Menten, para el cálculo de los valores de K_m y V_{max} los cuales se observan en la Figura 3. En la Tabla 2 se presentan de forma resumida los datos de K_m y V_{max} para las dosificaciones de enzima según la ecuación de Michaelis-Menten.

Tabla 1: V_0 para una dosificación de enzima de 0,210 ml a diferentes concentraciones es de bagazo.

Bagazo (mg/mL)	V_0 (mg/mL*s)		
	0,210 mg/mL	0,420 mg/mL	0,840 mg/mL
30	0,04799	0,05967	0,06637
40	0,05182	0,06618	0,07556
50	0,05826	0,07196	0,08029

En cada una de las representaciones graficas de la ecuación de Michaelis-Menten en donde se mantiene la dosificación de enzima constante variando la $[S_0]$ de sustrato, se obtiene una curva hiperbólica, en donde al principio un aumento en la concentración de sustrato produce un incremento rápido en la velocidad de reacción, pero si se sigue aumentando la $[S_0]$ la velocidad de reacción comienza a disminuir. La velocidad de reacción que se obtiene a altas $[S_0]$ se define como la V_{max} de la reacción enzimática bajo condiciones específicas de pH y temperatura. El valor de la V_{max} en cada una de las grafica nos indica que los centros activos de la enzima se encuentran saturados de sustrato a altas concentraciones de este (Bajzer y Strehler, 2012). En la Tabla 2 se observa como a una mayor dosificación de enzima la V_{max} es mayor. Esto se debe a que existe una mayor cantidad de sitios activos disponibles que deben saturarse de sustrato (Castro *et al.*, 2013).

Con estas representaciones grafica de la ecuación de Michaelis-Menten se puede hallar los valores de K_m , que representa la concentración de sustrato a la que el 50% de los sitios activos de la enzima están ocupados con sustrato. En estas condiciones, la velocidad observada debe ser igual a la mitad de V_{max} . Al aumentar la concentración de enzima resulta un incremento en la V_{max} por lo tanto las tres curvas son semejantes en su forma, pero a mayor cantidad de enzimas tenemos curvas mas elevadas, esto se debe a que la velocidad solo depende de la concentración de sustrato. Los valores de V_{max} nos indican la velocidad de catálisis cuando la enzima se encuentra saturada de sustrato (Goldbeter, 2013).

El valor de K_m tiene un valor propio para cada enzima siendo así el parámetro que la caracteriza, por lo que este valor no tiene una variación significativa. K_m mide la afinidad de la enzima con el sustrato, así para valores bajos, nos indica que la enzima se une con fuerza al sustrato, saturándose rápidamente el catalizador con pequeñas cantidades de sustrato. Para este análisis los valores de K_m son muy altos lo que indica que la afinidad entre el bagazo y la enzima es baja por lo tanto las concentraciones de glucosa obtenida no son muy altas para este estudio (Goldbeter, 2013).

Fig. 3: Representación gráfica de la ecuación de Michaelis-Menten para el cálculo de K_m y V_{max} a dosificaciones de enzima de (a) 0,210, (b) 0,420 y (c) 0,840 mg/mL.

Tabla 2: Datos de V_{max} y K_m según Michaelis-Menten.

Dosificación de enzima (mL)	V_{max} (mg/mL*s)	K_m (mg/mL)
0,21	0,08495	22,86
0,42	0,1034	22,7
0,84	0,1176	22,86

CONCLUSIONES

Al aumentar la concentración de sustrato $[S_0]$ manteniendo la dosificación de enzima constante, la velocidad de formación del producto [Glucosa] aumenta. Para este estudio de hidrólisis enzimática la dosificación de enzima mas adecuada fue la de 0,840 mL. Según los datos obtenidos se observó que al aumentar la dosificación de enzima, la concentración final de glucosa después de 5 horas aumenta. La afinidad que existe entre la enzima y el sustrato es muy baja debido a los valores altos de K_m que se encontraron.

REFERENCIAS

Agunsoye, J.O. y V.S. Aigbodion, Bagasse filled recycled polyethylene bio-composites: Morphological and mechanical properties study, *Results in Physics*: 3, 187–194 (2013).

Aigbodion, V.S. y otros tres autores, Potential utilization of solid waste (Bagasse Ash), *Journal of Minerals & Materials Characterization & Engineering*: 9, 67–77 (2010).

Bajzer, Z. y E.E. Strehler, About and beyond the Henri-Michaelis–Menten rate equation for single-substrate enzyme kinetics, *Biochemical and Biophysical Research Communications*: 417(3), 982–985 (2012).

Caspeta, L. y otros tres autores, Enzymatic hydrolysis at high-solids loadings for the conversion of agave bagasse to fuel ethanol, *Applied Energy*: 113, 277–286 (2014).

Castro, G.D., Dependencia de la dosis en los mecanismos de toxicidad y la evaluación de riesgo en toxicología. *Acta bioquím. clín. Latinoam*: 47(3), 0-0 (2013).

Cobas, M. y otros cuatro autores, Development of permeable reactive biobarrier for the removal of PAHs by *Trichoderma longibrachiatum*, *Chemosphere*: 91(5), 11–716 (2013).

Fangkum, A. y A. Reungsang, Biohydrogen production from sugarcane bagasse hydrolysate by elephant dung: effects of initial pH and substrate concentration, *Int. J. Hydrogen Energy*: 36, 8687–8696 (2011).

Freitas, M. y J.L. Colodette, Dissolving pulp production from sugar cane bagasse, *Industrial Crops and Products*: 52, 58–64 (2014).

Goldbeter, A., Oscillatory enzyme reactions and Michaelis–Menten kinetics, *Febs Letters*: 587(17), 2778–2784 (2013).

Guerrero, E.M., Cinética enzimática del bagazo de caña para la producción de glucosa utilizando la enzima *Trichoderma longibrachiatum*, Tesis de pregrado, Facultad de ingeniería Química, Universidad de San Buenaventura, Cartagena, Colombia (2004).

Lo, Y.C. y otros cinco autores, Biohydrogen production from cellulosic hydrolysate produced via temperature-shift-enhanced bacterial cellulose hydrolysis, *Bioresour. Technol*: 100, 5802–5807 (2009).

Lo, Y.C. y otros cuatro autores, Dark H_2 fermentation from sucrose and xylose using H_2 -producing indigenous bacteria: feasibility and kinetic studies, *Water Res*: 42(4-5), 827–842 (2008).

Martínez, B., D. Infante, y Y. Reyes, *Trichoderma spp.* y su función en el control de plagas en los cultivos. *Rev. Protección Veg*: 28(1), pp. 1-11 (2013).

Panagiotopoulos, I.A. y otros seis autores, Biodiesel and biohydrogen production from cotton- seed cake in a biorefinery concept, *Bioresour. Technol*: 136, 78–86 (2013).

Patra, S. y otros tres autores, Biohydrogen production from the fermentation of sugarcane bagasse hydrolysate by *Clostridium butyricum*, *Int. J. Hydrogen Energy*: 33, 6058–6065 (2008).

Peng, F. y otros cinco autores, Comparative study of hemicelluloses obtained by graded ethanol precipitation from sugarcane bagasse, *J. Agric. Food Chem*: 57, 6305–6317 (2009).

Rosales, E., M. Pazos y M. Á. Sanromán, Feasibility of Solid-State Fermentation Using Spent Fungi-Substrate in the Biodegradation of PAHs, *CLEAN – Soil, Air, Water*: 41(6), 610–615 (2013).

Sposina, R.T. y otros seis autores, Use of cellobiohydrolase-free cellulase blends for the hydrolysis of microcrystalline cellulose and sugarcane bagasse pretreated by either ball milling or ionic liquid [Emim][Ac], Bioresource Technology: 149, 551–555 (2013).

Stork, J. y otros cuatro autores, Regional examination shows potential for native feedstock options for cellulosic biofuel production, GCB Bioenergy: 1, 230–239 (2009).

Tzafiriri, A.R. y E.R. Edelman, Quasi-steady-state kinetics at enzyme and substrate concentrations in excess of the Michaelis–Menten constant Journal of Theoretical Biology: 245(4), 737–748 (2007).

Wolf, L.D., Organosolv pre-treatment of sugar cane bagasse for ethanol production and xylooligomers obtainment, Master thesis, Federal University of São Carolos, São Carolos, Brasil, 147 pp (2011).