



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS FÍSICAS Y MATEMÁTICAS
DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA,
BIOTECNOLOGÍA Y MATERIALES

CARACTERIZACIÓN DE LA HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DE XILANO MEDIANTE
HERRAMIENTAS EXPERIMENTALES Y MODELACIÓN EN EL MARCO DE LA
PRODUCCIÓN DE XILO-OLIGOSACÁRIDOS

MEMORIA PARA OPTAR AL TÍTULO DE INGENIERA CIVIL EN BIOTECNOLOGÍA E
INGENIERA CIVIL QUÍMICA

CONSTANZA VALENTINA HENRÍQUEZ RAMÍREZ

PROFESORA GUÍA:

MARÍA ORIANA SALAZAR AGUIRRE

MIEMBROS DE LA COMISIÓN:

JOSÉ CRISTIAN SALGADO HERRERA

MARÍA ELENA LIENQUEO CONTRERAS

SANTIAGO DE CHILE

2021

CARACTERIZACIÓN DE LA HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DE XILANO MEDIANTE HERRAMIENTAS EXPERIMENTALES Y MODELACIÓN EN EL MARCO DE LA PRODUCCIÓN DE XILO-OLIGOSACÁRIDOS

Actualmente, la industria debe velar por proveer a la población con productos saludables, económicamente accesibles y provenientes de fuentes sostenibles. En este contexto, los residuos lignocelulósicos son prometedores al ser una fuente de xilano. La hidrólisis de este polímero da lugar a los prebióticos xilo-oligosacáridos, los que benefician la salud gastrointestinal, cardiometabólica, mental y ósea, entre otros.

Esta investigación tiene como objetivo caracterizar la hidrólisis de xilano de haya por Cellic HTec2. En primer lugar, mediante el método DNS para la cuantificación de azúcares reductores, se implementó el diagrama de Lineweaver-Burk para determinar los parámetros cinéticos de la fase líquida, se estudió el potencial efecto inhibidor de la xilosa, se construyó la isoterma de Langmuir para estimar los parámetros de equilibrio de adsorción y se estableció la curva de progreso de hidrólisis enzimática. Además, a través de la técnica HPLC se cuantificó la producción de xilosa y xilobiosa. Posteriormente, se implementó un modelo que simulara la hidrólisis enzimática en dos fases, suponiendo que la reacción obedece a la cinética de Michaelis-Menten y que existen 250 xilo-oligómeros distribuidos entre ambas fases. Mediante un ajuste parámetros se obtuvieron las constantes cinéticas de la fase sólida, las constantes de adsorción y desorción y la accesibilidad del sustrato al ataque enzimático. Asimismo, se estableció la dinámica temporal la adsorción enzimática y de la generación de producto en fase líquida y sólida.

Las constantes cinéticas de la fase líquida y sólida son 93,6 [uM] y 1.204,7 [uM]. Las constantes catalíticas de la fase líquida y sólida son 179,9 [1/s] y 2.653,5 [1/s]. Además, se obtuvo una constante de equilibrio de adsorción de 0,739 [1/uM], una adsorción máxima de 17,4 [uM_{Cellic HTec2}/mM_{sustrato}], una constante de adsorción de 23,9 [1/uM·min] y una constante de desorción de 32,4 [1/min]. Además, se concluyó que la xilosa no actúa como inhibidor para las concentraciones de sustrato y enzima utilizadas. Las curvas de progreso indicaron un rendimiento de azúcares reductores del 17,6% a los 150 [min] y rendimientos de xilosa del 0,3% y de xilobiosa del 10,5% a los 180 [min] de reacción. La baja generación de xilosa permite concluir que Cellic HTec2 posee potencialidades para la producción de xilo-oligosacáridos.

Finalmente, se concluye que el modelo cinético caracteriza satisfactoriamente la hidrólisis enzimática de xilano, determinando los parámetros desconocidos del sistema y simulando la dinámica temporal de la adsorción de Cellic HTec2 sobre el xilano insoluble y de la generación de producto en fase líquida y sólida. Así, este estudio entrega antecedentes significativos para la estandarización de la producción industrial de prebióticos xilo-oligosacáridos. No obstante, ya que no se cuenta con datos teóricos y/o experimentales para cada uno de los productos de reacción, el modelo no permite simular fidedignamente cada una de las dinámicas temporales. Se sugiere para investigaciones futuras cuantificar mediante HPLC o HPAEC-PAD la producción de un mayor número xilo-oligosacáridos en vista de una simulación para todos los productos de la hidrólisis.

Dedicatoria

*En memoria de mi abuela Inés González Riveros
y de mi abuelo Heriberto Henríquez Viveros...*

Agradecimientos

En primer lugar, quiero agradecer al Centro de Biotecnología y Bioingeniería (CEBIB) y al proyecto Fondecip EQM160019, por entregarme las herramientas para el desarrollo de esta investigación. Además, agradecer a mi comisión de titulación, en especial a mi profesora guía Oriana Salazar, por estar siempre dispuesta a guiarme y por confiar en mí y en mi trabajo.

Me gustaría agradecer también a mis amigas y amigos que me han acompañado desde mi época escolar. Agradecer al Wali y el Mati, por su amistad, los buenos momentos y las risas compartidas. Agradecer a la Muño, por ser mi compañía durante los primeros 3 años de universidad y por seguirme acompañando a lo largo de todo este proceso. Agradecer también a mi amiga Valeria, que a pesar de la distancia física siempre ha estado ahí para apoyarme y darme su cariño. Por último, agradecer a todas y todos que han sido partícipes de este proceso de crecimiento personal.

Quiero agradecer también a mis amigas y amigos de la Universidad. Agradecer primero a la Caro, por la amistad que hemos cultivado durante estos 6 años y por ser un apoyo fundamental durante este camino. Agradecer a la Feña, por entregarnos de forma incondicional tu alegría y cariño. Agradecer también a la Maca, por ser una compañera y amiga maravillosa. Agradecer también, a mi grupo de amigas IQBTienses, por las alegrías compartidas durante estos 5 años de especialidad. Por último, quiero agradecer al Grupo de Diseño Sustentable, especialmente al Feña y la Jenny, por su cariño y sus sabios consejos.

Por último, quiero agradecer a mi familia. En primer lugar, agradecer a mis abuelas y abuelos, especialmente a mi Bagüi y mi tata Juan, gracias por su amor siempre sincero, por educarme sabiamente y por ayudarme a cumplir todos mis sueños. Agradecer también a mi mamá y mi papá, por amarme y entregarme siempre su apoyo, gracias por otorgarme la posibilidad de estudiar en Santiago a pesar del esfuerzo que eso significaba, y, por último, gracias por educarme de la forma en que lo hicieron. Agradecer también a mi hermana Camila, por ser una hermana incondicional, por sus palabras de aliento en los momentos difíciles, por incentivarme siempre a confiar en mí y en mis capacidades, y por compartir el gusto por el conocimiento. Agradecer también a mis tías, tíos, primas y primos por quererme y acompañarme desde pequeña. Finalmente, quiero agradecer al Pipe, por ser un compañero increíble, por apoyarme física y emocionalmente en todo momento, por tus consejos siempre sinceros, pero por sobre todo por amarme incondicionalmente. A ustedes les debo lo que soy, los amo hoy y siempre.

Tabla de contenido

Capítulo 1	1
1. Introducción.....	1
1.1. Antecedentes	1
1.1.1. Alimentos funcionales.....	1
1.1.2. Residuos lignocelulósicos.....	1
1.2. Motivación	2
1.3. Objetivos	3
1.3.1. Objetivo general.....	3
1.3.2. Objetivos específicos.....	3
Capítulo 2.....	4
2. Marco teórico	4
2.1. Biomasa lignocelulósica.....	4
2.1.1. Industria y revalorización de residuos.....	4
2.1.2. Estructura química.....	4
2.2. Prebióticos xilo–oligosacáridos	6
2.2.1. Estructura química de los xilo–oligosacáridos	7
2.2.2. Beneficios para la salud humana	8
2.2.3. Compañías productoras y certificación	8
2.3. Producción de xilo–oligosacáridos	8
2.3.1. Producción en una etapa: autohidrólisis	9
2.3.2. Producción en dos etapas	9
2.3.2.1. Pretratamientos	10
2.3.2.2. Hidrólisis enzimática.....	11
2.4. Modelación de reacciones de hidrólisis enzimática.....	12
Capítulo 3.....	15
3. Metodología	15
3.1. Revisión bibliográfica	15
3.1.1. Hidrólisis enzimática de xilano.....	15
3.1.2. Metodologías experimentales.....	15
3.1.3. Modelos matemáticos para la simulación de reacciones de hidrólisis enzimática.....	16
3.2. Metodología experimental	16
3.2.1. Caracterización de Cellic HTec2.....	16

3.2.2.	Determinación de los parámetros cinéticos de Michaelis-Menten	18
3.2.3.	Estudio de la existencia de inhibición por xilosa	19
3.2.4.	Ensayo de adsorción de Cellic HTec2 sobre xilano	20
3.2.5.	Curva de progreso de la concentración de azúcares reductores	21
3.2.6.	Cuantificación de xilosa y xilobiosa por HPLC	21
3.3.	Modelación del proceso de hidrólisis enzimática	22
3.3.1.	Elección del modelo matemático	22
3.3.2.	Planteamiento del modelo matemático	22
3.3.3.	Implementación del modelo matemático	27
3.3.4.	Análisis estadístico de los parámetros	28
3.3.5.	Análisis de sensibilidad del modelo frente a los parámetros	29
Capítulo 4	30
4.	Resultados y discusión.....	30
4.1.	Caracterización del preparado enzimático Cellic HTec2	30
4.1.1.	Determinación de la actividad enzimática de Cellic HTec2	30
4.1.2.	Identificación del peso molecular de la endo-1,4-β-xilanasas de Cellic HTec2.....	32
4.1.3.	Análisis cromatográfico de Cellic HTec2 mediante intercambio aniónico ...	33
4.2.	Determinación de los parámetros cinéticos de la hidrólisis de xilano en fase líquida por Cellic HTec2.....	35
4.3.	Evaluación del potencial efecto inhibitor de la xilosa en la hidrólisis de xilano por Cellic HTec2	38
4.4.	Determinación de los parámetros de equilibrio de adsorción de la hidrólisis de xilano por Cellic HTec2	42
4.5.	Cuantificación de la producción de azúcares reductores por la hidrólisis de xilano por Cellic HTec2.....	44
4.6.	Cuantificación de la producción de xilosa y xilobiosa por la hidrólisis de xilano por Cellic HTec2	46
4.7.	Modelación de la hidrólisis de xilano por Cellic HTec2.....	48
4.7.1.	Determinación de los parámetros desconocidos del sistema	48
4.7.2.	Validación estadística de los parámetros determinados	55
4.7.3.	Sensibilidad del modelo frente a perturbaciones en los parámetros.....	56
Capítulo 5	57
5.	Conclusiones.....	57
Capítulo 6	60

6. Proyecciones futuras.....	60
Capítulo 7	61
7. Bibliografía	61
Capítulo 8.....	66
8. Anexos	66
8.1. Metodología: equipos y materiales.....	66
8.1.1. Equipos e implementos	66
8.1.2. Materiales	67
8.2. Metodología: cuantificación de proteínas totales por método de Bradford.....	68
8.2.1. Curva de calibración: método de Bradford	68
8.2.2. Cuantificación de proteínas totales.....	69
8.3. Metodología: ensayo de actividad enzimática.....	70
8.3.1. Curva de calibración: método DNS.....	70
8.3.2. Preparación buffer acetato de sodio	71
8.3.3. Preparación reactivo DNS	71
8.3.4. Cuantificación de la actividad enzimática	71
8.4. Metodología: electroforesis en gel de poliacrilamida.....	73
8.4.1. Composición gel de poliacrilamida	73
8.4.2. Composición buffer de carga denaturante 5X	73
8.4.3. Preparación buffer de corrida Tris-Glicina 10X.....	73
8.4.4. Composición de las soluciones de tinción y destinción	74
8.5. Resultados: curva de calibración método de Bradford	75
8.6. Resultados: curva de calibración de método DNS	76
8.7. Resultados: ensayo de actividad enzimática.....	77
8.7.1. Concentración de Cellic HTec2: 0,25 [ug/ml].....	77
8.7.2. Concentración de Cellic HTec2: 0,5 [ug/ml].....	78
8.7.3. Concentración de Cellic HTec2: 1 [ug/ml].....	79
8.7.4. Curvas de saturación por xilano de haya.....	80
8.8. Resultados: electroforesis en gel de poliacrilamida	81
8.9. Resultados: parámetros cinéticos de Michaelis-Menten para la fase líquida	82
8.9.1. Curva de progreso de azúcares reductores: xilano 2,5 [mg/ml].....	82
8.9.2. Curva de progreso de azúcares reductores: xilano 3,75 [mg/ml].....	83
8.9.3. Curva de progreso de azúcares reductores: xilano 5 [mg/ml].....	84
8.9.4. Curva de progreso de azúcares reductores: xilano 7,5 [mg/ml].....	85

8.9.5.	Datos diagrama de Lineweaver-Burk.....	86
8.10.	Resultados: estudio de inhibición por producto terminal	88
8.11.	Resultados: parámetros de equilibrio de adsorción	90
8.11.1.	Primera toma de muestras: 1:15 [h] de reacción.....	90
8.11.2.	Segunda toma de muestras: 3:45 [h] de reacción	91
8.11.3.	Tercera toma de muestras: 6 [h] de reacción	92
8.12.	Resultados curva de progreso de la concentración de azúcares reductores .	94
8.13.	Resultados: cuantificación de xilosa y xilobiosa por HPLC	96
8.13.1.	Curva de calibración xilosa.....	96
8.13.2.	Curva de calibración xilobiosa.....	97
8.13.3.	Cuantificación de xilosa y xilobiosa	98

Índice de tablas

Tabla 1: Actividad específica de Cellic HTec2.....	32
Tabla 2: Estimación del peso de molecular de la xilanasas de Cellic HTec2.....	33
Tabla 3: Coeficiente de determinación entre curvas experimentales y simuladas para la determinación de los parámetros cinéticos de Michaelis-Menten.	36
Tabla 4: Parámetros cinéticos de la hidrólisis de xilano por Cellic HTec2. ERX: equivalentes reductores de xilosa.	37
Tabla 5: Análisis estadístico por t-student entre curva control y curvas con adición de xilosa 0,2 y 1 [mg/ml].....	41
Tabla 6: Parámetros de equilibrio de adsorción para Cellic HTec2 sobre una concentración de xilano de 7,5 [mg/ml].	43
Tabla 7: Coeficiente de correlación y de determinación entre datos experimentales y simulados.	49
Tabla 8: Parámetros cinéticos de Michaelis-Menten para la fase sólida. ERX: equivalentes reductores de xilosa.	50
Tabla 9: Parámetros de adsorción enzimática fuera del equilibrio.	53
Tabla 10: Parámetro de accesibilidad del sustrato.....	54
Tabla 11: Análisis estadístico para los parámetros ajustados por el modelo cinético. ...	55
Tabla 12: Diluciones seriadas de BSA para la construcción de la curva de calibración del método de Bradford.....	68
Tabla 13: Diluciones seriadas de xilosa para la construcción de la curva de calibración del método DNS.	70
Tabla 14: Composición gel de resolución 12,5%.....	73
Tabla 15: Composición gel de concentración.....	73
Tabla 16: Datos absorbancia 595 [nm] para la construcción de la curva de calibración de Bradford.....	75
Tabla 17: Datos absorbancia 550 [nm] para curva la construcción de calibración de DNS.....	76
Tabla 18: Absorbancias registradas a 550 [nm] para ensayo de actividad con Cellic HTec2 0,25 [ug/ml].....	77
Tabla 19: Resultados ensayo de actividad para Cellic HTec2 0,25 [ug/ml].	77
Tabla 20: Absorbancias registradas a 550 [nm] para ensayo de actividad con Cellic HTec2 0,5 [ug/ml].....	78
Tabla 21: Resultados ensayo de actividad para Cellic HTec2 0,5 [ug/ml].	78
Tabla 22: Absorbancias registradas a 550 [nm] para ensayo de actividad con Cellic HTec2 1 [ug/ml].....	79

Tabla 23: Resultados ensayo de actividad para Cellic HTec2 1 [ug/ml].	79
Tabla 24: Datos curva de saturación por sustrato para Cellic HTec2 0,25 [ug/ml].	80
Tabla 25: Datos curva de saturación por sustrato para Cellic HTec2 0,5 [ug/ml].	80
Tabla 26: Datos curva de saturación por sustrato para Cellic HTec2 1 [ug/ml].	80
Tabla 27: Determinación peso molecular bandas predominantes de SDS-PAGE.	81
Tabla 28: Datos curva de progreso experimental y simulada para xilano de haya 2,5 [mg/ml].	82
Tabla 29: Datos curva de progreso experimental y simulada para xilano de haya 3,75 [mg/ml].	83
Tabla 30: Datos curva de progreso experimental y simulada para xilano de haya 5 [mg/ml].	84
Tabla 31: Datos curva de progreso experimental y simulada para xilano de haya 7,5 [mg/ml].	85
Tabla 32: Datos diagrama de Lineweaver-Burk.	86
Tabla 33: Determinación de los parámetros cinéticos de Michaelis-Menten.	87
Tabla 34: Prueba de t-student entre rectas del diagrama de Lineweaver-Burk.	87
Tabla 35: Comparación curvas de progreso de azúcares reductores para xilano 2,5 [mg/ml] con y sin adición de xilosa.	88
Tabla 36: Comparación curvas de progreso de azúcares reductores para xilano 3,75 [mg/ml] con y sin adición de xilosa.	88
Tabla 37: Comparación curvas de progreso de azúcares reductores para xilano 5 [mg/ml] con y sin adición de xilosa.	89
Tabla 38: Comparación curvas de progreso de azúcares reductores para xilano 7,5 [mg/ml] con y sin adición de xilosa.	89
Tabla 39: Datos experimentales isoterma de Langmuir: 1:15 [h] de reacción.	90
Tabla 40: Datos modelados isoterma de Langmuir: 1:15 [h] de reacción.	90
Tabla 41: Datos experimentales isoterma de Langmuir: 3:45 [h] de reacción.	91
Tabla 42: Datos modelados isoterma de Langmuir: 3:45 [h] de reacción.	91
Tabla 43: Datos experimentales isoterma de Langmuir: 6 [h] de reacción.	92
Tabla 44: Datos modelados isoterma de Langmuir: 6 [h] de reacción.	93
Tabla 45: Absorbancias registradas a 550 [nm] para curva de progreso de la hidrólisis enzimática.	94
Tabla 46: Concentración de azúcares reductores generados durante la curva de progreso de la hidrólisis enzimática.	95
Tabla 47: Datos curva de calibración de xilosa para cuantificación por HPLC.	96
Tabla 48: Datos curva de calibración de xilobiosa para cuantificación por HPLC.	97

Tabla 49: Resultados cuantificación de la xilosa producida por la reacción de hidrólisis enzimática de xilano.....	98
Tabla 50: Resultados cuantificación de la xilobiosa producida por la reacción de hidrólisis enzimática de xilano.....	98

Índice de figuras

Figura 1: Producción anual de paja de carácter agroindustrial en Chile (elaboración propia).....	2
Figura 2: Estructura de biomasa lignocelulósica, xilano y sus principales grupos sustituyentes: a) acetil; b) 4-O-metil- α -D-glucuronopiranosil; c) α -L- arabinofuranosil; d) α -L-arabinocumaroil; e) α -L-arabinosil. Adaptado de Santibañez et al. (2021).	5
Figura 3: Relación precio/dosis de los principales prebióticos. FOS: fructo-oligosacáridos, XOS: xilo-oligosacáridos, GOS: galacto-oligosacáridos, IOS: iso-oligosacáridos. Adaptado de Amorim et al. (2019) [1].....	6
Figura 4: Esquema de la estructura de la xilosa y los xilo-oligosacáridos. Adaptado de Azevedo Carvalho et al. (2013).....	7
Figura 5: Esquema de las estrategias más utilizadas para la producción de xilo-oligosacáridos. a: moléculas con grado de polimerización ≤ 6 ; b: moléculas con grado de polimerización > 6 . Adaptado de Santibañez et al. (2021).	9
Figura 6: Diagrama de la hidrólisis enzimática de xilano en dos fases.	24
Figura 7: Diagrama de flujo del modelo de hidrólisis enzimática de xilano de haya por Cellic HTec2.....	28
Figura 8: Curva de saturación enzimática para Cellic HTec2.....	31
Figura 9: SDS-PAGE para Cellic HTec2.	33
Figura 10: Cromatograma de FPLC de la purificación de la xilanasa de Cellic HTec2: relación conductividad - absorbancia UV.	34
Figura 11: Cromatograma de FPLC de la purificación de la xilanasa de Cellic HTec2: relación absorbancia UV - actividad enzimática.	35
Figura 12: Curvas de progreso de azúcares reductores simuladas para la determinación de los parámetros cinéticos de Michaelis-Menten.....	36
Figura 13: Diagrama de Lineweaver-Burk para la determinación de los parámetros cinéticos de la hidrólisis de xilano de haya por Cellic HTec2. ERX: equivalentes reductores de xilosa.	37
Figura 14: Estudio de inhibición por producto para Cellic HTec2: concentración de xilano 2,5 [mg/ml].....	39
Figura 15: Estudio de inhibición por producto para Cellic HTec2: concentración de xilano 3,75 [mg/ml].....	39
Figura 16: Estudio de inhibición por producto para Cellic HTec2: concentración de xilano 5 [mg/ml].....	40
Figura 17: Estudio de inhibición por producto para Cellic HTec2: concentración de xilano 7,5 [mg/ml].....	40
Figura 18: Isoterma de Langmuir para Cellic HTec2 sobre una concentración de xilano de 7,5 [mg/ml].....	43

Figura 19: Curva de progreso de azúcares reductores para Cellic HTec2 1 [ug/ml] y xilano de haya 7,5 [mg/ml].....	45
Figura 20: Curva de progreso de xilosa y xilobiosa para Cellic HTec2 1 [ug/ml] y xilano de haya 7,5 [mg/ml].....	47
Figura 21: Curva de progreso de la concentración de azúcares reductores generados por la hidrólisis de xilano de haya mediante el preparado enzimático Cellic HTec2.....	49
Figura 22: Simulación de las curvas de progreso de producto en fase líquida.....	51
Figura 23: Simulación de las curvas de progreso de producto en fase sólida: X12 - X74.....	51
Figura 24: Simulación de las curvas de progreso de producto en fase sólida: X75 - X170.....	52
Figura 25: Simulación de las curvas de progreso de producto en fase sólida: X170- X250.....	52
Figura 26: Dinámica temporal de la concentración de Cellic HTec en la fase sólida de la reacción.....	54
Figura 27: Simulación de la dinámica temporal de la generación de producto dentro de la fase líquida y la fase sólida.	55
Figura 28: Curva de calibración de BSA para método de Bradford.....	75
Figure 29: Curva de calibración de xilosa para método DNS.....	76
Figura 30: Curva de progreso de azúcares reductores para xilano 2,5 [mg/l] para la determinación de los parámetros cinéticos de Michaelis-Menten.	82
Figura 31: Curva de progreso de azúcares reductores para xilano 3,75 [mg/l] para la determinación de los parámetros cinéticos de Michaelis-Menten.	83
Figura 32: Curva de progreso de azúcares reductores para xilano 5 [mg/l] para la determinación de los parámetros cinéticos de Michaelis-Menten.	84
Figura 33: Curva de progreso de azúcares reductores para xilano 7,5 [mg/l] para la determinación de los parámetros cinéticos de Michaelis-Menten.	85
Figura 34: Isoterma de Langmuir: 1:15 [h] de reacción.....	91
Figura 35: Isoterma de Langmuir: 3:45 [h] de reacción.....	92
Figura 36: Curva de calibración de xilosa para cuantificación por HPLC.....	96
Figura 37: Curva de calibración de xilobiosa para cuantificación por HPLC.....	97

Capítulo 1

1. Introducción

1.1. Antecedentes

1.1.1. Alimentos funcionales

Actualmente, la población se encuentra en un proceso de concientización sobre como la alimentación repercute en la salud. Por este motivo, las preferencias alimentarias se han desplazado hacia opciones más saludables. En este contexto, el mercado ofrece distintas alternativas, tales como los alimentos funcionales, los cuales además de cumplir un rol nutricional poseen beneficios para la salud humana [1].

Entre los alimentos funcionales más reconocidos se encuentran los prebióticos. Según la definición entregada la ISAPP en 2017 (International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics), estos corresponden a sustratos que pueden ser utilizados selectivamente por los microorganismos hospederos, aportando beneficios a la salud gastrointestinal, inhibiendo la proliferación de microorganismos patógenos y estimulando el sistema inmunológico, y a la salud cardiometabólica, mental y ósea [2]. Además, pueden ser utilizados como reemplazo de azúcar y/o grasa y, para saborizar y/o texturizar alimentos [1], [3].

En relación a la potencialidad de estos productos en el mercado, su valor se avaluó en USD 4.070 millones en 2017 y se espera un aumento hasta USD 7.370 millones para 2023, registrando así una Tasa de Crecimiento Anual Compuesto (CAGR) del 10,4% [1].

Dentro de los prebióticos con mayor potencial comercial se encuentran los xilo-oligosacáridos (XOS), pues son estables frente un amplio rango de pH y temperatura, poseen propiedades organolépticas y efectos benéficos para la salud humana y animal [4]–[6]. Se espera que el mercado de los xilo-oligosacáridos crezca a una Tasa de Crecimiento Anual Compuesto del 5,3%, incrementando así su valor en USD 37 millones desde 2017 al 2023 [1].

1.1.2. Residuos lignocelulósicos

Adicionalmente, la industria alimentaria y/o farmacéutica ha centrado sus objetivos en el diseño de nuevos procesos que promuevan el uso de materias primas provenientes de fuentes sostenibles y la aplicación de tecnologías ambientalmente amigables. En este sentido, los residuos lignocelulósicos representan una gran oportunidad, ya que actualmente corresponden al residuo orgánico más abundante del planeta. Por consiguiente, su reutilización les otorga un importante valor agregado que promueve el desarrollo de una economía circular.

Los residuos lignocelulósicos son una fuente significativa de hemicelulosa, cuyo principal compuesto es un heteropolisacárido denominado xilano. La hidrólisis de esta molécula da lugar a los xilo-oligosacáridos [7].

En este contexto, Chile genera aproximadamente 4 millones de toneladas de residuos lignocelulósicos anuales, los que podrían ser utilizados como materia prima para la producción de prebióticos xilo-oligosacáridos. De esta forma, Chile podría convertirse en un potencial de productor de este alimento funcional [8]. La Figura 1 presenta la producción anual de residuos lignocelulósicos, para los principales cultivos compatibles con la elaboración de XOS.

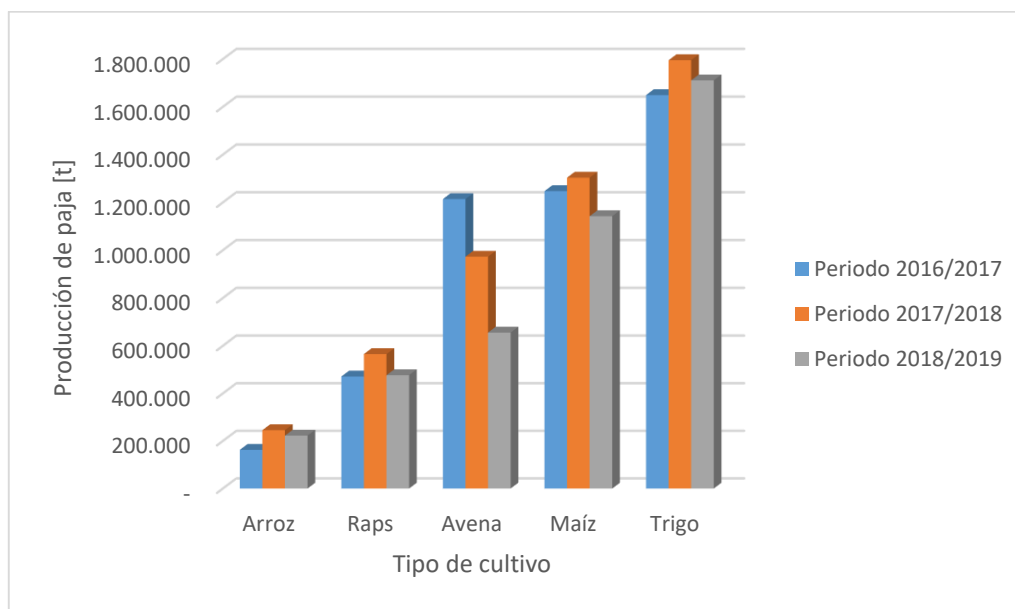


Figura 1: Producción anual de paja de carácter agroindustrial en Chile (elaboración propia).

1.2. Motivación

En base a lo mencionado anteriormente, surge la necesidad por parte de la industria de evaluar y estandarizar la producción de los prebióticos xilo-oligosacáridos, considerando las distintas etapas del proceso y las variables que afectan a cada una de ellas.

Este Trabajo de Memoria de Título se centra en la caracterización de la hidrólisis de xilano de origen lignocelulósico mediante enzimas con actividad endo-1,4- β -xilanasas. De esta forma, se pretenden determinar los parámetros cinéticos que rigen el sistema y la dinámica de producción de xilo-oligosacáridos, en el marco de una potencial implementación de una planta productora de este tipo de prebióticos en Chile.

1.3. Objetivos

1.3.1. Objetivo general

Caracterizar la reacción de hidrólisis enzimática de xilano de haya por Cellic HTec2 mediante herramientas experimentales y modelación.

1.3.2. Objetivos específicos

1. Determinar los parámetros cinéticos de la hidrólisis enzimática de xilano en fase líquida por Cellic HTec2 mediante el modelo cinético de Michaelis-Menten.
2. Investigar la existencia de potenciales fenómenos de inhibición por xilosa dentro del proceso de hidrólisis enzimática de xilano por Cellic HTec2.
3. Cuantificar los parámetros de equilibrio de adsorción de Cellic HTec2 sobre xilano en fase sólida por medio de la isoterma de Langmuir.
4. Determinar a través de herramientas de modelación los parámetros cinéticos de la hidrólisis enzimática de xilano en fase sólida por Cellic HTec2, las constantes de adsorción y desorción y el rendimiento y, la concentración de xilano accesible al ataque enzimático
5. Establecer por medio de modelamiento matemático, la dinámica temporal del proceso de adsorción enzimática sobre el sustrato en fase sólida y de la generación de producto en fase líquida y sólida.

Capítulo 2

2. Marco teórico

2.1. Biomasa lignocelulósica

2.1.1. Industria y revalorización de residuos

Actualmente, la industria alimentaria y/o farmacéutica enfrenta grandes desafíos, debiendo velar por proveer a la población productos saludables y económicamente accesibles. Además, la crisis medioambiental existente ha obligado a la industria a impulsar la investigación y desarrollo de nuevas tecnologías medioambientalmente amigables y la utilización de fuentes sostenibles para la elaboración de los productos [7].

Bajo este contexto, los residuos agroindustriales, tales como las biomásas lignocelulósicas, se destacan notablemente debido a su alta disponibilidad, siendo el residuo orgánico más abundante del planeta. En la actualidad, estas son mayoritariamente descartadas, desperdiándose billones de toneladas, y con ellas, la oportunidad de revalorizarlas [7]. A pesar de su potencialidad, se debe tener en consideración que, el uso de residuos lignocelulósicos implica múltiples desafíos, los cuales incluyen variabilidad en su composición, estacionalidad y riesgo de deterioro durante el periodo de almacenamiento, por lo que es necesario desarrollar tecnologías que permitan combatir este tipo de dificultades [1].

2.1.2. Estructura química

La biomasa lignocelulósica se encuentra principalmente constituida por 3 macromoléculas: celulosa, hemicelulosa y lignina. La distribución de estos polímeros varía de acuerdo al tipo de biomasa, sin embargo, se ha establecido que los rangos fluctúan entre un 30 – 50% p/p de celulosa, 20 – 40% p/p de hemicelulosa y 15 – 25% p/p de lignina [9], [10].

La hemicelulosa, correspondiente al segundo polisacárido más abundante del planeta, desempeña un rol fundamental en la mantención de la integridad estructural de la pared celular de las plantas [11]. Esta posee una estructura altamente ramificada y se compone mayoritariamente de pentosas (xilosa y arabinosa), hexosas (manosa, fructosa, glucosa y galactosa) y azúcares ácidos [9].

Se estima que la hemicelulosa se compone entre un 60 – 90% p/p de xilano, heteropolisacárido que varía su estructura en función de la fuente. No obstante, las moléculas que preponderan en la estructura del xilano son moléculas de D-xilosas, las cuales se encuentran unidas principalmente mediante enlaces β -(1→4) [3], [10], [12]. Asimismo, el xilano presenta un grado de polimerización entre 75 y 250 [13].

Los polímeros de xilano se clasifican según los tipos de grupos sustituyentes y/o cadenas laterales presentes en su estructura [10], [14], [15]. A continuación, se enseñan las diferentes subclases establecidas:

1. Homoxilanos: son polisacáridos de estructura lineal, compuestos por residuos de D-xilanopiranosil (XylP) unidos por enlaces β -(1→3), enlaces β -(1→4) y una mezcla de enlaces β -(1→3,1→4).
2. Glucuronoxilanos (GX): son polisacáridos de xilano con cadenas laterales de ácido α -D-glucurónico (GA) y/o su derivado 4-O-metil (MeGA) unidas a XylP en su posición 2. Las maderas duras, como el abedul o la haya, se encuentran principalmente constituidas por 4-O-metil-glucuronoxilano (MGX).
3. Arabinoxilanos (AX): son polisacáridos de xilano con residuos α -L-arabinofuranosil (α -Araf) unidos a XylP en su posición 2 y/o 3 (mono o disustitución). Además, pueden poseer ácidos fenólicos, principalmente ácido ferúlico y ácido p-cumárico, esterificados a α -Araf. Los AX se encuentran típicamente en cereales, tales como trigo, maíz, arroz, entre otros.
4. Arabino-glucuronoxilanos (AGX): son polisacáridos GX altamente sustituidos por MeGA, que además cuentan con residuos α -Araf unidos a XylP en su posición 3.
5. Glucurono-arabinoxilanos (GAX): son polisacáridos AX altamente sustituidos por α -Araf, que además cuentan con residuos MeGA unidos a Xylp en su posición 2.
6. Heteroxilanos (HX): son polisacáridos altamente sustituidos por diferentes tipos de monosacáridos y oligosacáridos.

La Figura 2 presenta la estructura de las biomazas lignocelulósicas, haciendo énfasis en el xilano y sus principales grupos sustituyentes [10].

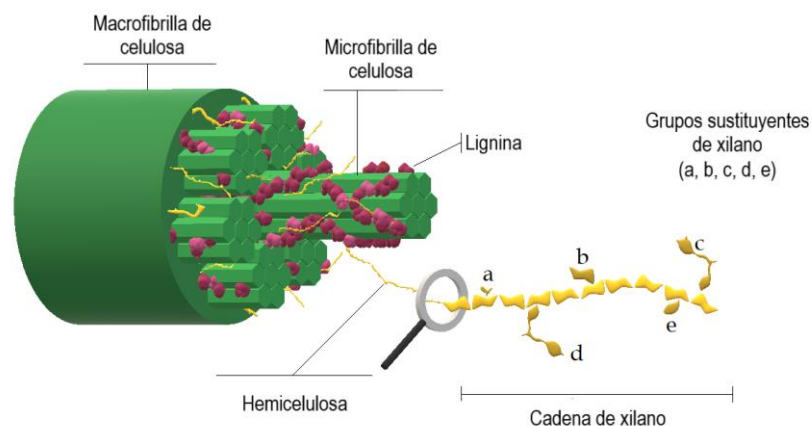


Figura 2: Estructura de biomasa lignocelulósica, xilano y sus principales grupos sustituyentes: a) acetil; b) 4-O-metil- α -D-glucuronopiranosil; c) α -L-arabinofuranosil; d) α -L-arabinocumaroil; e) α -L-arabinosil. Adaptado de Santibañez et al. (2021).

2.2. Prebióticos xilo–oligosacáridos

Los prebióticos, según la última actualización entregada por la ISAPP (International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics) en 2017, corresponden a “sustratos que son utilizados selectivamente por microorganismos hospedadores otorgando un beneficio para la salud”, entendiendo que el huésped puede ser un humano o un animal [1], [2]. Los beneficios de los prebióticos sobre la salud aún se encuentran en estudio, sin embargo, a la fecha, ya se han demostrado efectos positivos para el tracto gastrointestinal, salud cardiometabólica, mental y ósea, entre otros [2].

Debido al gran número de estudios que validan su status prebiótico, los oligosacáridos más utilizados son la inulina, los fructo-oligosacáridos (FOS) y los galacto-oligosacáridos (GOS). No obstante, en la actualidad se investigan nuevas moléculas con potencial prebiótico, como por ejemplo, los xilo-oligosacáridos (XOS) [1].

Los xilo-oligosacáridos, si bien son considerados candidatos prebióticos por la ISAPP (2017), cuentan con múltiples potencialidades [10]. En general, los prebióticos son hidrolizables en condiciones de pH ácido y temperaturas altas, o pierden sus propiedades al ser almacenados por periodos prolongados en condiciones ambientales, sin embargo, los xilo–oligosacáridos son resistentes a rangos de pH entre 2,5 y 8, además de soportar temperaturas superiores a los 100 [°C] [1].

Por otra parte, este tipo de prebiótico requiere de una dosis diaria de aproximadamente 2,8 [g], mientras que, para sus competidores directos, es decir, fructo-oligosacáridos y galacto-oligosacáridos, se recomienda el consumo de dosis superiores a los 10 [g] diarios [1], [16]. La Figura 3, expone lo mencionado anteriormente y además, permite evidenciar que los xilo-oligosacáridos se encuentran dentro de los prebióticos más competitivos del mercado en relación a su razón precio/dosis.

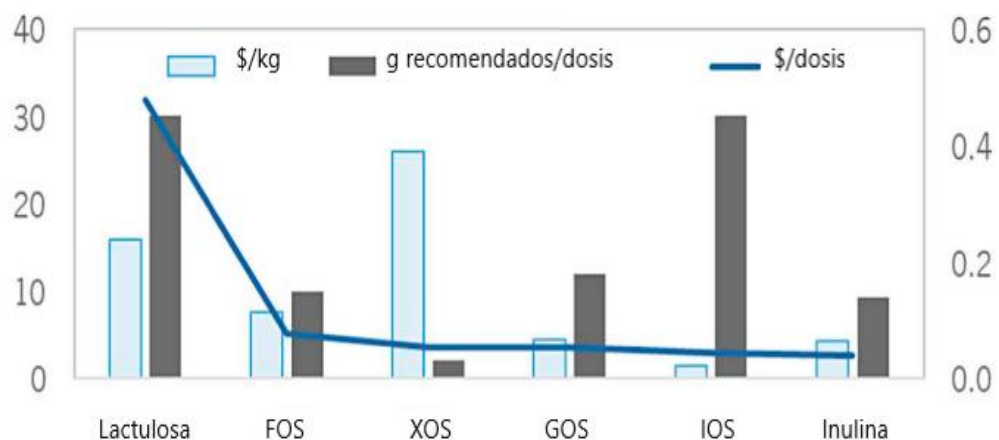


Figura 3: Relación precio/dosis de los principales prebióticos. FOS: fructo-oligosacáridos, XOS: xilo-oligosacáridos, GOS: galacto-oligosacáridos, IOS: iso-oligosacáridos. Adaptado de Amorim et al. (2019) [1].

2.2.1. Estructura química de los xilo-oligosacáridos

Como se mencionó anteriormente, los xilo-oligosacáridos son oligómeros compuestos por moléculas de D-xilosa mediante enlaces β -(1→4)-glicosídicos. Se encuentran naturalmente en alimentos como frutas y vegetales, mientras que industrialmente se producen por medio de la hidrólisis de xilano de origen lignocelulósico [4], [11]. La Figura 4 presenta un esquema de la estructura de la xilosa y los xilo-oligosacáridos, sin embargo, se debe considerar que debido a la variedad de xilanos presentes en la naturaleza, es probable que estos contengan grupos sustituyentes y/o cadenas laterales [7][10].

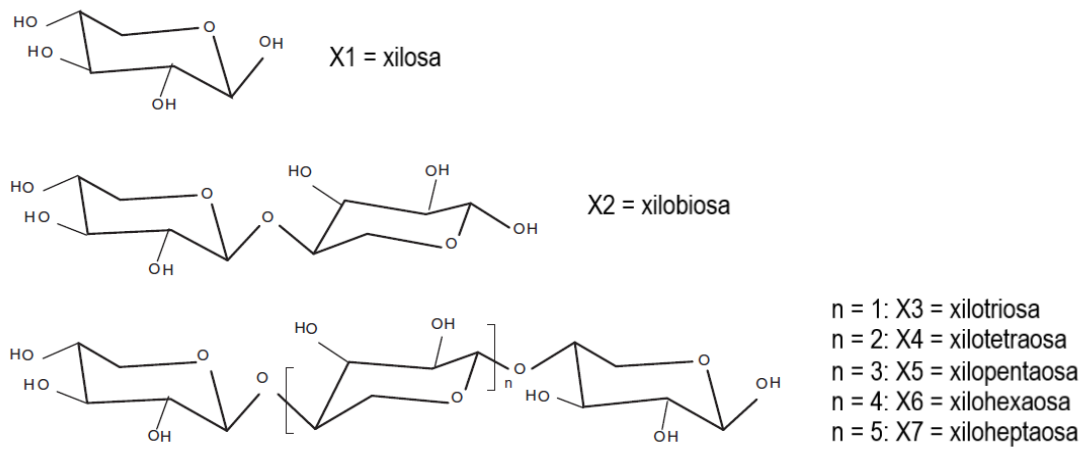


Figura 4: Esquema de la estructura de la xilosa y los xilo-oligosacáridos. Adaptado de Azevedo Carvalho et al. (2013).

Debido a que los xilo-oligosacáridos se producen a partir de la hidrólisis de xilano, se ha generado interés por determinar la biomasa lignocelulósica idónea para la producción de este tipo de prebióticos, considerando factores como la cantidad y tipo de xilano que se encuentra presente en la materia prima. Debido a sus altos niveles de xilano y/o disponibilidad, las especies más relevantes para la producción de xilo-oligosacáridos son: paja de trigo, bagazo de caña de azúcar, mazorca de maíz, xilano de haya y xilano de abedul [10].

Se ha identificado que los xilo-oligosacáridos con grado de polimerización entre 2 y 6 son los que generan un mayor número de efectos beneficiosos para la salud [17]. Además, se ha observado que el tipo y grado de sustitución que estos poseen influyen en su efecto prebiótico, indicándose que los xilo-oligosacáridos no sustituidos y los arabino-xilo-oligosacáridos, son aquellos que fermentan más rápido, comparados con estructuras más complejas como xilo-oligosacáridos acetilados y los xilo-oligosacáridos con grupos ácido 4-O-metil-glucurónico [17][18].

2.2.2. Beneficios para la salud humana

En relación a los beneficios del consumo de xilo-oligosacáridos, estos estimulan selectivamente el crecimiento y/o actividad de bacterias beneficiosas pertenecientes a la microbiota intestinal, tales como *Bifidobacterium* y *Lactobacillus*, promoviendo así, una mejora en la salud humana [7], [11], [19], [20]. Además, el aumento de la población de bacterias beneficiosas conduce a la generación de ácidos grasos de cadena corta, los cuales protegen contra enfermedades cardiovasculares y reducen el riesgo de desarrollar osteoporosis y cáncer de colon [3], [7]. Por otro lado, la proliferación de bacterias del género *Bifidobacterium* suprime la actividad de bacterias enteroputrefactivas, reduce la proliferación de bacterias patógenas y promueve la digestión, mejorando la salud gastrointestinal [4].

Por otra parte, su consumo promueve una mejora del sistema inmunológico. Además, reduce el riesgo de generar enfermedades cardiovasculares, al disminuir los niveles de triglicéridos y colesterol [3], [7], [20]. También, mejora los síntomas de la diabetes mellitus tipo II, al regular el nivel de azúcar en la sangre. Asimismo, posee actividad antioxidante, antiinflamatoria y antialérgica. Igualmente, mejora la absorción de Calcio (aumentando su biodisponibilidad) y previene la formación de la caries dental [3], [6], [7], [21]. Por último, los xilo-oligosacáridos poseen efecto citotóxico sobre las células leucémicas [10].

2.2.3. Compañías productoras y certificación

Actualmente, dentro del mercado de los prebióticos xilo-oligosacáridos, se identifican dos compañías con certificación GRAS (Generally Recognized As Safe). La compañía China Shangdong Longlive Biotechnology, recibió en 2013 la certificación para la producción de XOS a partir de la mazorca de maíz. Por otro lado, Prenexus Health de Estados Unidos, recientemente ha conseguido la certificación para la producción de XOS mediante caña de azúcar [22].

2.3. Producción de xilo-oligosacáridos

Con el objetivo de establecer un proceso de producción que maximice el rendimiento de los xilo-oligosacáridos con los largos de cadena deseados, se han realizado una variedad de estudios, considerando distintas estrategias de producción y purificación. Usualmente la producción de prebióticos xilo-oligosacáridos desde biomásas lignocelulósicas se realiza por medio de dos estrategias principales.

La Figura 5 presenta un diagrama de las metodologías más utilizadas para la producción de prebióticos xilo-oligosacáridos. En esta se visualiza un proceso de una etapa, denominado autohidrólisis y un proceso de dos etapas, que combina una etapa de pretratamiento de la materia prima y una etapa de hidrólisis enzimática.

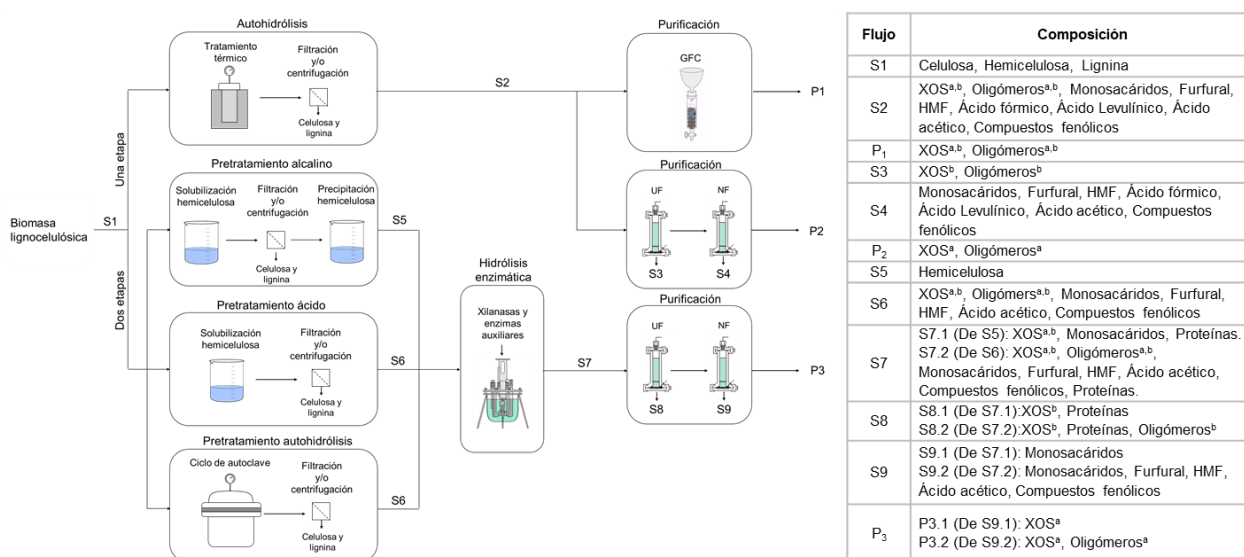


Figura 5: Esquema de las estrategias más utilizadas para la producción de xilo-oligosacáridos. ^a: moléculas con grado de polimerización ≤ 6; ^b: moléculas con grado de polimerización > 6. Adaptado de Santibañez et al. (2021).

2.3.1. Producción en una etapa: autohidrólisis

La autohidrólisis es una metodología de tratamiento térmico con vapor o agua líquida caliente a altas presiones [23]. Bajo estas condiciones de operación, el agua se autoioniza generando iones hidronio, los cuales promueven la despolimerización de la hemicelulosa, dando lugar a los xilo-oligosacáridos [24]. La implementación de este método requiere de condiciones de operación de intensidad media para maximizar la generación de producto [19].

Dentro de las ventajas de la autohidrólisis, se encuentra su bajo o nulo requerimiento de reactivos corrosivos, sin embargo, debido a que esta presenta altos requerimientos energéticos por la aplicación de elevadas temperaturas y presión, la fuente de energía empleada indicará si el proceso será medioambientalmente amigable [9], [10].

La principal desventaja de este proceso es la generación de subproductos no deseados, tales como monosacáridos, furfural, hidroximetilfurfural (HMF), compuestos fenólicos, entre otros [5], [10]. La presencia de estos compuestos conduce a graves dificultades de purificación, y por consiguiente, un aumento de los costos de producción, por lo que no se recomienda para la producción de prebióticos [4].

Otra desventaja de utilizar esta tecnología es que, dado que se emplean altas temperaturas y presiones, se requiere de equipos especializados, generalmente reactores del tipo Parr [3], [5], [10].

2.3.2. Producción en dos etapas

La segunda metodología corresponde a un proceso en dos etapas, combinando generalmente procesos térmicos y/o químicos con reacciones enzimáticas. La primera

etapa es un pretratamiento, donde se extrae el xilano desde la biomasa lignocelulósica y, la segunda etapa es la hidrólisis enzimática de xilano a xilo-oligosacáridos [10].

2.3.2.1. Pretratamientos

Dentro de la biomasa lignocelulósica, la hemicelulosa interactúa con la celulosa y lignina formando redes complejas, las cuales son resistentes a ataques enzimáticos y microbianos [25][26]. Bajo este contexto, se recomienda previo al proceso de hidrólisis enzimática, la implementación de una etapa de pretratamiento de la materia prima, que permita separar la hemicelulosa de los otros compuestos [27].

Si bien hasta la fecha se continúa trabajando en el diseño de un pretratamiento eficiente, económicamente rentable y medioambientalmente amigable, ya se han evaluado extensamente diversas técnicas, las que se detallan en las siguientes secciones [28].

Pretratamiento por autohidrólisis

Este método, al igual que el tratamiento térmico de un solo paso, utiliza vapor o agua caliente a altas presiones, lo que genera un aumento en la acidez del medio, liberando la hemicelulosa de los otros compuestos. Sin embargo, la autohidrólisis como pretratamiento, se diferencia de la metodología de una etapa, ya que esta aplica condiciones de operación más suaves, lo que minimiza la generación de compuestos indeseados y además, se implementa generalmente en equipos de autoclave [9], [10], [21], [22].

Pretratamiento ácido

Este tipo de pretratamiento se basa en la utilización de ácidos para recuperación de la hemicelulosa. Entre de los ácidos inorgánicos más utilizados se encuentran el ácido sulfúrico, nítrico, fosfórico y clorhídrico, mientras que dentro de los ácidos orgánicos se encuentran el ácido acético, fórmico y propiónico.

Este tipo de pretratamiento posee la ventaja de ser rápido y sencillo, sin embargo, su aplicación genera la producción de grandes cantidades de xilosa y compuestos indeseados, lo que dificulta e incrementa las etapas de purificación posteriores. Además, la utilización de ácidos fuertes promueve la corrosión de los equipos. No obstante, la generación de compuestos indeseados y el fenómeno de corrosión puede minimizarse utilizando bajas concentraciones de ácido. Bajo este contexto, se ha recomendado aplicar concentraciones de ácido menores al 10 % v/v, en un rango de temperatura entre 135 – 140 [°C] por 30 [min] [10], [28].

Pretratamiento básico

Los métodos alcalinos se han reconocido como uno de los mejores dentro de los múltiples pretratamientos estudiados [29]. Los compuestos alcalinos escinden los puentes de hidrógeno existentes entre la hemicelulosa y la celulosa, así como también los enlaces

éster que unen la hemicelulosa y la lignina, permitiendo así la solubilización de la hemicelulosa [30]. Posteriormente, esta última puede ser recuperada mediante precipitación con alcoholes [31]. El pretratamiento alcalino generalmente se realiza por medio de Hidróxido de Sodio o Hidróxido de Potasio [10], [28], [29].

Se han evaluado distintas condiciones para este proceso, variando desde soluciones con baja y alta concentración de álcali y con o sin la aplicación de alta temperatura. Los resultados indican que para la recuperación de la hemicelulosa, el uso de altos niveles de reactivos alcalinos y la aplicación de vapor conducen a un mayor rendimiento del proceso [10], [31].

Este método posee la capacidad de aumentar la porosidad y el área superficial de la hemicelulosa, lo que promueve un aumento en el rendimiento de la reacción enzimática. Sin embargo, la aplicación de reactivos básicos tiene desventajas, como la corrosión de los equipos y la contaminación de efluentes de aguas. Por otro lado, la utilización de elevadas temperaturas provoca la generación de compuestos indeseados, aumentando y encareciendo las etapas de purificación [10].

Por último, es importante señalar que los grupos acetil posiblemente presentes en la estructura de la hemicelulosa, también son liberados por este tipo de pretratamiento. Lo anterior, reduce el uso de enzimas auxiliares dentro del proceso de hidrólisis enzimática, sin embargo, la pérdida de estos grupos disminuye la solubilidad de la hemicelulosa, reduciendo el rendimiento de recuperación de xilano en el pretratamiento [10], [15].

2.3.2.2. Hidrólisis enzimática

El proceso de hidrólisis enzimática consiste en la catálisis de los enlaces β -(1→4)-glicosídicos del xilano mediante enzimas con actividad endo-1,4- β -xilanasas (E.C. 3.2.1.8). En primera instancia, la reacción genera xilo-oligosacáridos de alto peso molecular y, posteriormente, produce moléculas pequeñas, tales como xilosa, xilobiosa y xilotriosa [10].

Entre los organismos que producen enzimas con actividad endo-1,4- β -xilanasas se encuentran bacterias, hongos, levaduras, algas marinas, entre otros. No obstante, distintas investigaciones han indicado que los mejores productores de endo-1,4- β -xilanasas corresponden a los hongos filamentosos. Por este motivo, la manufactura de este tipo de enzimas a nivel industrial se realiza mayoritariamente a partir de microorganismos de origen fúngico. Dentro de los hongos filamentosos más utilizados, destacan los géneros *Trichoderma*, *Aspergillus* y *Fusarium* [7], [10].

Las enzimas endo-1,4- β -xilanasas utilizadas para la producción de prebióticos xilo-oligosacáridos deben poseer determinadas características. Primeramente, deben tener alta actividad endo-xilanasas para maximizar la producción de xilo-oligosacáridos con grado de polimerización entre 2 y 6. Además, se espera que cuenten con una baja o nula actividad β -xilosidasa para minimizar la generación de xilosa. Este monómero es un

compuesto indeseado de la reacción, ya que incrementa la cantidad etapas de purificación y, por tanto, el costo asociado al proceso. Conjuntamente, se ha reportado que su acumulación dentro del sistema genera inhibición sobre las enzimas xilanasas, por lo que se debe procurar mantener los niveles de esta molécula al mínimo dentro de la reacción [3], [22].

Por otro lado, según la clasificación CAZy, las enzimas endo-1,4- β -xilanasas forman parte de grupo de las enzimas glicosil hidrolasas (GH). En particular, se ha indicado que están pertenecen mayoritariamente a las familias GH10 y GH11. Las enzimas endo-1,4- β -xilanasas de la familia GH10 generalmente poseen alto peso molecular (> 30 [kDa]) y un bajo punto isoeléctrico ($pI > 5$). Esta familia posee una estructura que facilita su unión a las regiones de xilano sustituidas y es altamente activa frente a moléculas de bajo grado de polimerización, promoviendo la generación de xilosa. Además, se ha reportado que algunas enzimas de la familia GH10 presentan actividad celulasa, además de su actividad xilanasas. Por otra parte, la familia GH11 se caracteriza por poseer un bajo peso molecular (< 30 [kDa]) y un alto punto isoeléctrico ($pI > 9$). Este tipo de enzimas endo-1,4- β -xilanasas atacan preferentemente moléculas de alto grado de polimerización, por lo que se recomiendan para la producción de xilo-oligosacáridos. Sin embargo, no son capaces de catalizar regiones de xilano sustituido, requiriendo de la adición de enzimas auxiliares [10], [32].

Finalmente, se ha determinado que los grupos sustituyentes y cadenas laterales presentes en el xilano, pueden interferir en la reacción de hidrólisis enzimática por endo-1,4- β -xilanasas, disminuyendo el rendimiento de la reacción. Además, la presencia de estas estructuras disminuye el efecto prebiótico, al interferir en la fermentación de los xilo-oligosacáridos por parte de la microbiota intestinal [33]. Por este motivo, para implementar un proceso de elaboración de prebióticos xilo-oligosacáridos, se debe considerar el tipo de biomasa lignocelulósica al momento de escoger las enzimas endo-xilanasas y enzimas auxiliares, con el objetivo de maximizar la producción.

2.4. Modelación de reacciones de hidrólisis enzimática

En relación a los modelos existentes para procesos de hidrólisis enzimática Suga et al. (1975) evidenció que la hidrólisis enzimática de los polisacáridos se da en dos fases, es decir, la concentración inicial de sustrato se encuentra insoluble, y a lo largo de la reacción el producto se va trasladando a la fase soluble de la mezcla [34], [35]. En consecuencia, esta investigación estudió la distribución de peso molecular de los productos a lo largo del tiempo. De esta forma, lograron determinar la fase en la que se encontraba cada uno de los productos de reacción. Este trabajo se basó en la cinética de Michaelis-Menten.

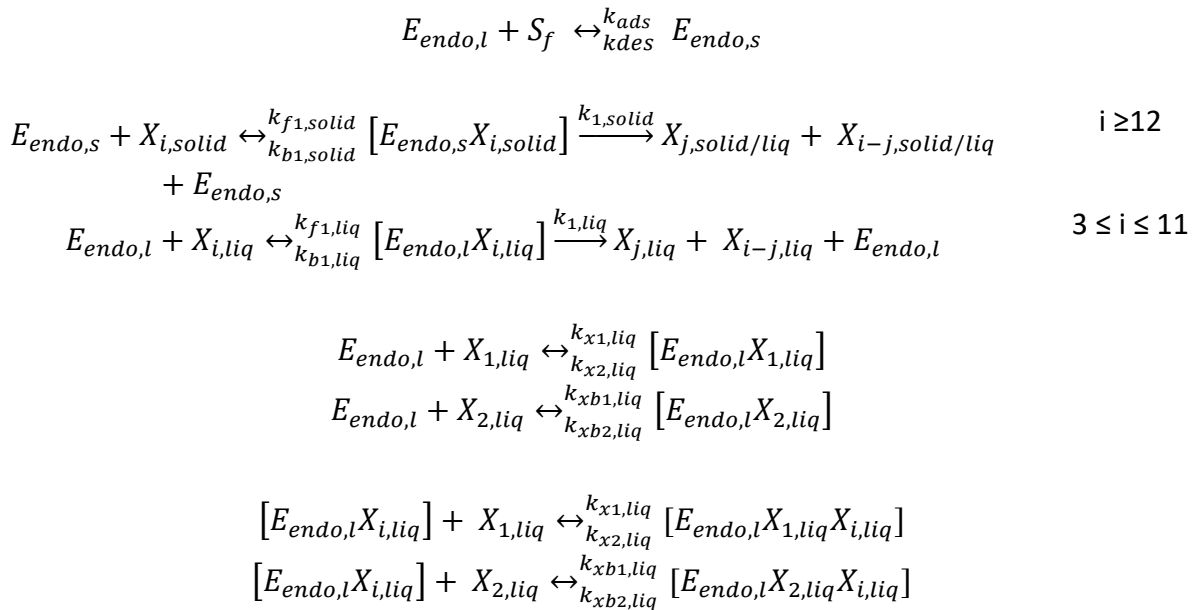
Posteriormente, Dutta et al. (2015) recuperó el modelo de Suga, actualizándolo para la producción de xilo-oligosacáridos, basándose en la cinética de Michaelis-Menten. Éste, al igual que Suga, consideró un proceso de catálisis enzimática en dos fases, precedido

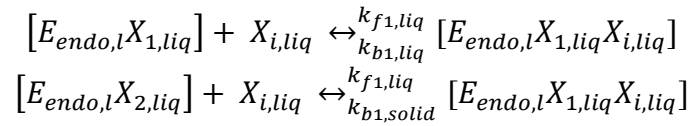
por la adsorción de la enzima en fase soluble al sustrato en fase insoluble. Además, incluyó el fenómeno de inhibición por producto terminal, es decir, xilosa y xilobiosa [13].

El modelo de Dutta et al. posee un enfoque experimental – teórico. En particular, los parámetros cinéticos de la fase líquida se determinaron por medio del diagrama de Lineweaver- Burk, las constantes de equilibrio de adsorción se obtuvieron mediante la isoterma de Langmuir y la constante de inhibición para la xilosa se determinó mediante el gráfico de Dixon. Por otra parte, los parámetros cinéticos de la fase sólida, las constantes de adsorción y desorción y la constante de inhibición para la xilobiosa, se obtuvieron a partir de un ajuste de parámetros del modelo cinético [13].

Dutta et al. declaran que este modelo cinético permite la simulación de la despolimerización de los xilo-oligosacáridos, la dinámica temporal de la formación de xilosa y azúcares reductores y la influencia que poseen las constantes del sistema en el rendimiento de la reacción [13]. Sin embargo, pese a que los autores consideran dentro del sistema el proceso de adsorción enzimática no simulan su dinámica temporal, limitando la caracterización del sistema. Además, el estudio no indica la metodología utilizada para la determinación de la conversión y/o el rendimiento de la reacción, considerando que la cinética de Michaelis-Menten, modelo en que se basa esta investigación, asume conversión completa.

El sistema propuesto por Dutta et al. (2015) indica que la xilosa y los xilo-oligosacáridos con grado de polimerización menor o igual a 11, conocidos como azúcares reductores, se encuentran en fase líquida. Asimismo, los polímeros con grado de polimerización mayor o igual a 12 permanecen dispersos en la fase sólida. Las reacciones que representan el sistema se presentan enseguida [13]:





Donde $E_{endo,s}$ y $E_{endo,l}$ corresponden a la enzima endo-1,4- β -xilanasas libre en la fase s33lida y l33quida respectivamente. Adem33s, $E_{endo,s}X_{i,solid}$, $E_{endo,l}X_{i,liq}$, $E_{endo,l}X_{2,liq}$, $E_{endo,l}X_{1,liq}$, $E_{endo,l}X_{2,liq}X_{i,liq}$, y $E_{endo,l}X_{1,liq}X_{i,liq}$ representan los complejos enzima-su33trato y enzima-su33trato-inhibidor. Por 33ltimo, $k_{f1solid}$, $k_{b1solid}$, k_{1solid} , k_{f1liq} , k_{b1liq} , k_{1liq} , k_{xb1} , k_{xb2} , k_{x1} y k_{x2} corresponden a las respectivas constantes de reacci33n.

Capítulo 3

3. Metodología

3.1. Revisión bibliográfica

En primer lugar, se realizó una revisión bibliográfica a través del buscador Google Académico¹ y del Repositorio Académico de la Universidad de Chile², el que posee acceso a un gran número de bases de datos científicas. En estos se buscaron palabras claves referentes al tema de investigación, tales como: hidrólisis enzimática de xilano, biomasa lignocelulósica, xilano, prebióticos xilo-oligosacáridos, modelación de la hidrólisis enzimática de xilano, entre otros. La búsqueda se realizó para los idiomas español e inglés.

También se consultaron Trabajos de Tesis y artículos científicos relacionados al tema en estudio, los que fueron proporcionados por la académica de la Universidad de Chile, Oriana Salazar [36].

Por medio de la investigación se obtuvo información sobre la dinámica del proceso en estudio, además de las metodologías y los modelos matemáticos que han sido utilizadas para estudiar la hidrólisis de xilano mediante enzimas xilanasas.

3.1.1. Hidrólisis enzimática de xilano

Para comprender la dinámica del proceso de hidrólisis enzimática de xilano y caracterizar los principales agentes involucrados en esta, primeramente, se estudiaron las enzimas xilanolíticas, enfocándose en su mecanismo de acción, estructura química y origen. Seguido a esto, se analizaron los distintos tipos de sustratos disponibles para llevar a cabo esta reacción, haciendo énfasis en su contenido de xilano, estructura y presencia de grupos sustituyentes. Finalmente, se revisó el proceso de hidrólisis para conocer sus principales características y condiciones de operación.

3.1.2. Metodologías experimentales

Se estudiaron las distintas metodologías existentes y actualmente utilizadas para el desarrollo de los objetivos específicos experimentales propuestos, analizándose principalmente su sustento teórico, reactivos requeridos y condiciones de operación.

¹ Google Académico: <https://scholar.google.com/>

² Repositorio Académico de la Universidad de Chile: <http://repositorio.uchile.cl/>

3.1.3. Modelos matemáticos para la simulación de reacciones de hidrólisis enzimática

Finalmente, se investigaron los modelos matemáticos que han sido propuestos para simular este tipo de sistemas, prestándose especial atención a su sustento biológico, químico y matemático, además de sus potencialidades y limitaciones.

3.2. Metodología experimental

Las metodologías experimentales aplicadas para cada uno de los ensayos realizados en este trabajo se detallan enseguida. Los reactivos y equipos utilizados se encuentran en el Anexo 8.1.

3.2.1. Caracterización de Cellic HTec2

La caracterización de Cellic HTec2 se realizó mediante la cuantificación de la concentración de proteínas totales y la actividad enzimática del preparado comercial. Además, se ejecutó una electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones denaturantes y se analizó por cromatografía de intercambio aniónico.

3.2.1.1. *Cuantificación de proteínas totales por método de Bradford*

La estimación de proteínas totales se realizó por triplicado, a través del método de Bradford [37]. Se mezclaron 200 [ul] de reactivo de Bradford, preparado según las indicaciones del proveedor, con 10 [ul] de muestra enzimática debidamente diluida, en microplacas de lectura de 96 pocillos. Se incubó la mezcla por 10 [min] a temperatura ambiente y se registró la absorbancia a 595 [nm] en un lector de microplacas. El blanco de reacción correspondió a 200 [ul] de reactivo de Bradford y 10 [ul] de agua milli-Q.

La cuantificación se realizó en Microsoft Excel[®], por medio una curva de calibración de albúmina de suero bovino, la cual relaciona la concentración de proteínas totales con la absorbancia medida a 595 [nm]. El detalle de la metodología seguida, incluyendo la construcción de la curva de calibración se presenta en el Anexo 8.2.

3.2.1.2. *Ensayo de actividad enzimática*

Para medir la actividad enzimática se utilizó el método del ácido 3,5–dinitrosalicílico (DNS) [38]. Se evaluaron 3 concentraciones de Cellic HTec2 iguales a 0,25, 0,5 y 1 [ug/ml] y 4 concentraciones de xilano de haya correspondientes a 2,5, 5, 7,5 y 10 [mg/ml], entregando un total de 12 experimentos y 3 curvas de saturación por sustrato.

Se combinaron 75 [ul] de solución xilano de haya con 25 [ul] de dilución enzimática en una microplaca de PCR de 96 pocillos. Luego, se selló la microplaca con una lámina de Axygen[®], para evitar la evaporación de las muestras, y se incubaron a 50 °C por 20 [min]. Completado el tiempo, se agregaron 100 [ul] de reactivo DNS a cada pocillo y se incubó nuevamente, pero en esta oportunidad a 99 °C por 5 [min]. Finalmente, se dispusieron

100 [ul] de cada una de las muestras, sobre una microplaca de lectura de 96 pocillos y se midió absorbancia a 550 [nm] en un lector de microplacas. El blanco de reacción correspondió a 25 [ul] de buffer acetato de sodio 50 [mM] pH 5.0 y 75 [ul] de xilano de haya. Este experimento, se realizó por triplicado para cada una de las combinaciones antes detalladas. Las soluciones se prepararon en buffer acetato de sodio 50 [mM] pH 5,0.

Finalmente, en Microsoft Excel® se calculó la concentración de azúcares reductores (AR) generados por cada set de datos, mediante una curva de calibración de xilosa que entrelaza la concentración de AR con la absorbancia medida a 550 [nm]. A partir de estos valores, se construyó la curva de saturación enzimática, graficando la actividad de la enzima [U/l] en función de la concentración de sustrato inicial [mg/ml]. Además, se determinó la actividad específica [U/mg enzima]. Los pormenores de la metodología utilizada, incluyendo la construcción de la curva de calibración se presentan en el Anexo 8.3.

3.2.1.3. Electroforesis en gel de poliacrilamida

En primer lugar, se elaboró un gel de poliacrilamida al 12,5%. Enseguida, se preparó la muestra enzimática, diluyendo Cellic HTec2 en relación 1:80 en agua milli-Q. Posteriormente, se mezclaron 80 [ul] de la solución antes elaborada con 20 [ul] de buffer de carga denaturante 5X, alcanzando una concentración de proteínas totales igual a 1,1 [mg/ml]. La muestra obtenida se calentó por 5 [min] a 100 [°C] y se centrifugó brevemente.

El ensayo se realizó en una cámara de electroforesis vertical (Bio–Rad), previamente cargada con buffer de corrida Tris – Glicina según las indicaciones del proveedor. Se dispusieron sobre el gel 3 [ul] de marcador de peso molecular, seguido de 12, 8, 4, 2 [ul] de dilución enzimática. El procedimiento se ejecutó a temperatura ambiente por 45 [min] a 185 [V].

Posterior a la electroforesis, se tiñó el gel en una solución azul de Coomassie 0,25% por 1 [h] con agitación orbital suave. Después, se trasladó a una solución de destinción, hasta que las bandas de proteínas se diferenciaron correctamente. Finalmente, y debido a la deshidratación que genera el proceso de destinción, se reposó el gel en agua destilada, hasta que este recuperara su tamaño, tardando aproximadamente 20 [min].

Por último, se fotodocumentó el gel de proteínas mediante el equipo Gel Doc EZ (Bio-Rad) y, por medio del software Image Lab, se realizó una cuantificación de la intensidad relativa de las bandas predominantes.

El protocolo de preparación del gel y de las soluciones requeridas en este ensayo se detallan en el Anexo 8.4.

3.2.1.4. Análisis del complejo enzimático por FPLC

Para analizar la composición del concentrado enzimático Cellic HTec2 se separaron sus componentes por medio de una columna de Q-Sefarosa de 8 [ml]. El procedimiento se realizó por medio de una cromatografía líquida de proteínas rápida (FPLC) en el equipo Äkta Avant 25, trabajándose en conjunto con su software Unicorn 5.1.1. Por otra parte, debido a los requerimientos de la columna, el equipo se configuró para operar a una presión de 0,3 [MPa], una temperatura de 11 [°C] y un flujo de 4 [ml/min].

El experimento comenzó equilibrando el sistema con 3 volúmenes de columna (VC) de buffer BisTris-Cl 20 [mM] pH 7,5 preparada en agua milli-Q, previamente filtrado a través de un diámetro de poro de 0,22 [µM] y desairado por sonicación. A continuación, se inyectó la muestra, correspondiente a una dilución 1:80 del concentrado enzimático en buffer BisTris-Cl 20 [mM] pH 7,5. Enseguida, se pasaron 3 VC de buffer BisTris-Cl y finalmente, se eluyó la muestra con 10 VC de buffer BisTris-Cl 20 [mM] – NaCl 0,5 [M] pH 7,5 en agua milli-Q, también filtrado y desaireado. Las muestras purificadas se recolectaron en una placa de 96 pocillos de 2 [ml]. Es importante mencionar que, durante la cromatografía se midió en tiempo real absorbancia 280 [nm] y conductividad eléctrica [mS], las que evalúan la concentración de proteínas y la fuerza iónica de las muestras, respectivamente.

Luego, las fracciones colectadas se diluyeron en relación 1:100 en buffer acetato de sodio 50 [mM] pH 5,0, para cuantificar su actividad xilanasas y celulasas por medio del método DNS, según la metodología detallada en la Sección 3.2.1.2. Se utilizaron como sustratos de reacción xilano de haya y carboximetilcelulosa (CMC), ambos a concentración 7,5 [mg/ml].

3.2.2. Determinación de los parámetros cinéticos de Michaelis-Menten

La estimación de los parámetros cinéticos se realizó por medio del diagrama de Lineweaver-Burk, el que requirió de la construcción de curvas de progreso de la hidrólisis enzimática a diferentes concentraciones de sustrato. Para esto, se realizaron ensayos de actividad por el método de DNS, evaluándose una concentración de Cellic HTec2 igual a 1 [ug/ml] sobre 4 concentraciones de xilano de haya equivalentes a 2,5, 3,75, 5, 7,5 [mg/ml], obteniendo un total de 4 curvas de progreso. Todas las diluciones fueron preparadas en buffer acetato de sodio 50 [mM] pH 5,0 y el sustrato se elaboró bajo las indicaciones del proveedor.

El ensayo de actividad se inició mezclando 225 [ul] de Cellic HTec2 y 675 [ul] de sustrato, debidamente elaborados. Se incubó a 50 °C y se tomaron muestras de 100 [ul] para la evaluación de su actividad enzimática a los 5, 10, 15, 20, 25, 35 y 45 [min]. Las alícuotas se combinaron con 100 [ul] de reactivo DNS, se calentaron a 99 [°C] por 5 [min] y se registró su absorbancia a 550 [nm] por medio de un lector de microplacas. El blanco de reacción fue una mezcla de 225 [ul] de buffer acetato de sodio 50 [mM] pH 5,0 y 675 [ul]

de xilano. Además, el experimento se realizó en triplicado y se repitió para cada una de las concentraciones de sustratos escogidas.

Se calculó la concentración de azúcares reductores [uM] de cada alícuota tomada, mediante la curva de calibración de DNS y el peso molecular de la xilosa (ver Anexo 8.3).

A continuación, utilizando la herramienta Solver de Microsoft Excel® se construyeron las curvas de progreso. Esto se realizó mediante la modelación de ecuaciones cuadráticas basadas en las concentraciones de azúcares reductores experimentales. Las curvas encontradas responden a aquellas que minimizan el error cuadrático medio entre los datos experimentales y los valores simulados.

A partir de los datos simulados, se calculó la velocidad de reacción para cada concentración de xilano en los tiempos de velocidad iniciales, es decir, 5, 10, 15 y 20 [min]. Con estos datos, se graficó el modelo de Lineweaver-Burk, encontrándose así la constante de Michaelis-Menten ($K_{M1,liq}$) y la velocidad máxima de reacción ($V_{máx,liq}$) para la fase líquida. En último lugar, se estimó la constante catalítica de reacción de la fase líquida ($K_{1,liq}$) por medio de la ecuación 1:

$$K_{1,liq} = \frac{V_{máx,liq}}{E_{endo,o}} \quad (1)$$

3.2.3. Estudio de la existencia de inhibición por xilosa

El potencial efecto inhibitor del producto terminal sobre la hidrólisis enzimática de xilano, se investigó mediante la elaboración de curvas de progreso de producto, en presencia de concentraciones variables de xilosa.

La elaboración de las curvas de progreso se realizó de acuerdo al procedimiento descrito en la Sección 3.2.2, manteniendo las cargas de enzima y sustrato estipuladas, pero considerando la adición de concentraciones de xilosa entre 0,2 y 1 [mg/ml]. En esta oportunidad el blanco de reacción, correspondió a buffer acetato de sodio 50 [mM] pH 5,0, sustrato y xilosa en relación 1:1,5:1,5. Se tomaron alícuotas a los 5, 10, 15, 20, 25, 35 y 45 [min] y, debido a la adición de xilosa las muestras debieron diluirse de manera apropiada para encontrarse dentro del rango de medición. Este experimento se repitió para cada una de las concentraciones de sustrato y xilosa establecidas, entregando un total de ocho combinaciones.

A continuación, se elaboraron las curvas de progreso de azúcares reductores, aplicando de la curva de calibración de DNS y el peso molecular de la xilosa (ver Anexo 8.3). Finalmente, se realizó una prueba t-student ($p < 0,05$), para establecer si existe una diferencia significativa entre las curvas control, correspondientes a las construidas en la Sección 3.2.2, y las preparadas con adición de xilosa.

3.2.4. Ensayo de adsorción de Cellic HTec2 sobre xilano

La obtención de la constante de equilibrio de adsorción equilibrio (K_{eq}) y máxima adsorción enzimática ($\Omega_{m\acute{a}x}$) se realizó mediante la isoterma de Langmuir, la cual requirió de ensayos de adsorción de Cellic HTec2 sobre xilano de haya a lo largo del tiempo para su implementación. La adsorción de Cellic HTec2 sobre la superficie sólida de xilano de haya se evaluó para 4 razones enzima – sustrato, iguales a 10, 20, 30 y 40 [μg Cellic HTec2/ mg sustrato], considerando una carga de sustrato de 7,5 [mg/ml]. Todas las soluciones se prepararon en buffer acetato de sodio 50 [mM] pH 5,0 y el xilano se preparó según las indicaciones del proveedor.

Se mezclaron 0,4 [ml] de dilución enzimática con 1,2 [ml] de xilano de haya. Las muestras se incubaron a 4 [$^{\circ}\text{C}$] bajo agitación suave constante. Se tomaron alícuotas a las 1:15 [h], 3:45 [h] y 6 [h], las que cuales se centrifugaron a 11.000 rpm y 4 [$^{\circ}\text{C}$] por 15 [min]. Se separó el sobrenadante, compuesto por enzima soluble, del pellet, que contenía el sustrato y la proteína adsorbida en este. El ensayo se realizó en triplicado para las 4 concentraciones de Cellic HTec2 estipuladas.

Desde la fracción soluble se cuantificó la concentración de azúcares reductores generados durante la incubación a 4 [$^{\circ}\text{C}$]. Para esto se mezcló en relación 1:1, reactivo DNS con sobrenadante previamente diluido, se calentó a 99 [$^{\circ}\text{C}$] por 5 [min] y se registró la absorbancia a 550 [nm] mediante un lector de microplacas. Los azúcares reductores se estimaron usando la curva de calibración de DNS y el peso molecular de la xilosa ((ver Anexo 8.3)). Las concentraciones obtenidas se denominaron azúcares reductores basales (ARb).

Además, el sobrenadante permitió estimar la concentración de enzima soluble. Para esto, se realizó un ensayo de actividad enzimática por el método DNS, utilizando una concentración de xilano de 7,5 [mg/ml] y sobrenadante debidamente diluido. Por otra parte, se ejecutó un ensayo de actividad control, para concentraciones de Cellic HTec2 y xilano de haya, iguales a 1 [$\mu\text{g}/\text{ml}$] y 7,5 [mg/ml], respectivamente. Este experimento permitió relacionar la actividad enzimática [U/l] con la concentración de enzima ofrecida a la reacción de adsorción. Los procedimientos se implementaron de acuerdo con la metodología presentada en la Sección 3.2.1.2, pero considerando un periodo de reacción enzimática de 15 [min].

Posteriormente, por medio de la curva de calibración de DNS, se calculó la concentración de azúcares reductores generados en el ensayo de actividad realizado al sobrenadante, restándole los ARb producidos en la reacción a 4 [$^{\circ}\text{C}$]. A partir del valor obtenido, se estimó la actividad enzimática de la enzima soluble, la cual posteriormente se relacionó con la actividad enzimática y concentración de Cellic HTec2 del experimento control, determinando así la concentración de enzima libre. La cantidad de enzima adsorbida se determinó restando la concentración de enzima libre de la concentración inicial de

enzima. Finalmente, con las concentraciones de enzima libre y enzima adsorbida se construyó la isoterma de Langmuir experimental.

Utilizando, la herramienta Solver de Microsoft Excel®, se modeló la isoterma de Langmuir. Esto se realizó mediante la modelación de una ecuación lineal basada en las isotermas determinadas experimentalmente. La recta modelada responde a aquella que minimiza el error cuadrático medio entre los datos experimentales y los valores simulados. Finalmente, se determinaron los valores de K_{eq} y $\Omega_{m\acute{a}x}$ en función de la pendiente y coeficiente de posición de la recta simulada. En el Anexo 6 se presenta en detalle la metodología aplicada para la obtención de los parámetros de equilibrio de Langmuir.

3.2.5. Curva de progreso de la concentración de azúcares reductores

La implementación del modelo cinético propuesto requirió de la realización de una curva de progreso de la hidrólisis enzimática de xilano de haya. El ensayo se implementó por duplicado para concentraciones de sustrato y Cellic HTec2, iguales a 7,5 [mg/ml] y 1 [ug/ml], respectivamente. Las soluciones se prepararon en buffer acetato de sodio 50 [mM] pH 5,0 y el sustrato se elaboró según las indicaciones del proveedor.

Se mezclaron 0,35 [ml] de solución enzimática y 1,05 [ml] de xilano y se incubaron a 50 [°C]. Se tomaron alícuotas de 100 [ul] para medir el avance de la reacción a los 10, 20, 30, 45, 60, 75, 90, 120, 150 y 180 [min]. Las muestras se mezclaron con 100 [ul] de reactivo DNS, se calentaron por 5 [min] a 99 [°C] y se registró su absorbancia a 550 [nm] mediante un lector de microplacas. Los datos experimentales se trabajaron en Microsoft Excel®, estimándose la concentración de azúcares reductores para cada una de las alícuotas, a través de la curva de calibración de DNS y el peso molecular de la xilosa (ver Anexo 8.3).

3.2.6. Cuantificación de xilosa y xilobiosa por HPLC

Para cuantificar la xilosa y xilobiosa generada durante la hidrólisis enzimática de xilano, se utilizó una columna Aminex HPX-87H (Bio-Rad) y un equipo de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) con un detector de índice de refracción (RI) (Shimadzu). El equipo se configuró a través de su software LabSolutions Shimadzu para operar a un flujo de 0,3 [ml/min], un volumen de inyección de 30 [ul] y una temperatura de 65 °C. Asimismo, se preparó la fase móvil, correspondiente a una solución de ácido sulfúrico 5 [mM] en agua milli-Q, la cual fue filtrada a través de un diámetro de poro de 0,22 [uM] y desaireada por medio de sonicación.

La hidrólisis enzimática se realizó en triplicado usando idénticas concentraciones de enzima y sustrato, que las utilizadas en la Sección 3.2.5. Se tomaron alícuotas para cuantificar la xilosa y xilobiosa a los 30, 60, 90, 120, 180 y 240 [min], hirviéndose inmediatamente a 100 °C por 7 [min] para detener la reacción. Además, se prepararon curvas de calibrado de xilosa y xilobiosa, las que permitieron entrelazar la concentración de producto con el área bajo la curva entregada por el equipo de HPLC. Para esto se

elaboraron diluciones de xilosa entre 1 y 0,0125 [mg/ml] y xilobiosa entre 0,5 y 0,0625 [mg/ml], ambas en agua milli-Q. Todas las muestras se filtraron a través de un diámetro de poro de 0,22 [µM].

Finalizado el ensayo, en Microsoft Excel® se construyeron las curvas de calibrado, graficando el promedio de las áreas medidas por el equipo, en función de la concentración de estándar. A partir de estas, se cuantificó la concentración de xilosa y xilobiosa generadas durante la hidrólisis enzimática.

3.3. Modelación del proceso de hidrólisis enzimática

3.3.1. Elección del modelo matemático

La modelación de la hidrólisis enzimática de xilano por Cellic HTec2 se basó en los modelos propuestos Dutta et al. en 2015 y 2016, los que suponen que el sistema en estudio puede ser representado por la cinética de Michelis-Menten. Además, estos consideran que la reacción de hidrólisis es un proceso de dos fases sólido-líquido simultáneo, es decir, la catálisis enzimática del sustrato soluble e insoluble se da de forma sincrónica. Por último, los modelos incluyen la dinámica de adsorción de las enzimas solubles sobre el sustrato insoluble, previo a la reacción de hidrólisis [13], [39].

De esta forma, el modelo planteado en este Trabajo de Título, recoge todas las etapas del proceso de hidrólisis enzimática, considerando la adsorción de la enzima al sustrato sólido, la formación de los complejos enzima-sustrato, la generación de producto y la solubilización de los xilo-oligosacáridos generados en la fase sólida.

3.3.2. Planteamiento del modelo matemático

Establecido el modelo matemático a implementar, se definieron las especies, reacciones y ecuaciones que rigen la hidrólisis enzimática de xilano en dos fases.

3.3.2.1. Especies presentes en el sistema

Primeramente, se identificaron las especies que tienen lugar durante la hidrólisis enzimática en dos fases. Las especies establecidas se detallan a continuación:

Especies en fase líquida

- Xilo-oligosacárido ($X_{i,liq}$): es el producto de la reacción de hidrólisis enzimática proveniente de la fase líquida y/o sólida. El subíndice i representa el largo de cadena de la molécula, el cual puede variar entre 1 y 11.
- Complejo enzima-sustrato en fase líquida ($E_{endo,i}X_{i,liq}$): es una molécula temporal formada por la asociación de la enzima y el sustrato, ambas en fase líquida, formada previa a la catálisis.
- Enzima en fase líquida ($E_{endo,i}$): es la enzima en fase soluble disponible para catalizar el sustrato en fase líquida.

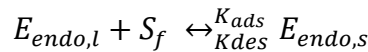
Especies en fase sólida

- Producto de la fase sólida ($X_{i,solid}$): es el producto de la reacción de hidrólisis enzimática proveniente de la fase sólida. El subíndice i representa el largo de cadena del polímero, el cual puede variar entre 12 y 250.
- Complejo enzima-sustrato en fase sólida ($E_{endo,s}X_{i,solid}$): es una molécula temporal formada por la asociación de la enzima y el sustrato, ambos en fase sólida, formada previa a la catálisis.
- Enzima en fase sólida ($E_{endo,s}$): es la enzima en fase insoluble disponible para catalizar el sustrato en fase sólida.

3.3.2.2. Reacciones involucradas en el sistema

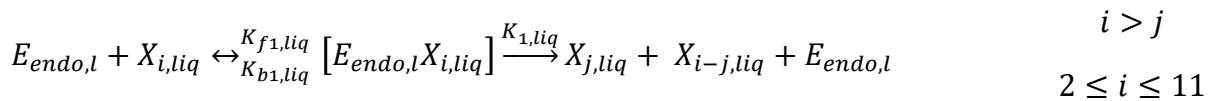
Luego de definir los componentes presentes en el sistema, se procedió a plantear las reacciones involucradas en el proceso de hidrólisis enzimática en dos fases. Las reacciones establecidas se presentan enseguida:

- Reacción de adsorción enzimática



Donde S_f representa los sitios disponibles que posee el sustrato insoluble para la adsorción enzimática, mientras que K_{ads} y K_{des} corresponden a las constantes de adsorción y desorción, respectivamente.

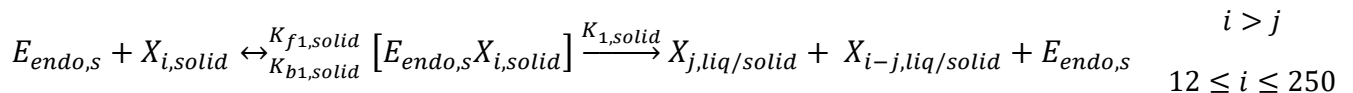
- Reacción de hidrólisis enzimática en fase líquida



Donde $K_{f1,liq}$ y $K_{b1,liq}$ corresponden a las constantes de reacción directa e inversa de la formación del complejo enzima-sustrato en fase líquida y $K_{1,liq}$ representa la constante catalítica de la reacción en fase líquida.

Se debe tener en consideración que al tratarse de una reacción de despolimerización los productos de la reacción $X_{j,liq}$ y $X_{i-j,liq}$ retornarán al proceso como reactivos, donde serán hidrolizados nuevamente. Existe una excepción, correspondiente a X_1 , el cual no puede volver a ser catalizado, ya que corresponde al producto terminal.

- Reacción de hidrólisis enzimática en fase sólida



Donde $K_{f1,solid}$ y $K_{b1,solid}$ corresponden a las constantes de reacción directa e inversa de la formación del complejo enzima-sustrato en fase sólida y $K_{1,solid}$ representa la constante catalítica de la reacción en fase sólida.

Los productos de reacción en fase sólida $X_{j,liq/solid}$ y $X_{i-j,liq/solid}$ pueden ser de carácter soluble o insoluble como lo indican los subíndices de sus nomenclaturas. Por otra parte, al igual que para la reacción en fase líquida, los productos de la reacción en fase sólida $X_{j,liq/solid}$ y $X_{i-j,liq/solid}$ retornarán al proceso como reactivos, donde serán hidrolizados nuevamente. Existe una excepción, correspondiente a X_1 , el cual no puede volver a ser catalizado, ya que corresponde al producto terminal.

Finalmente, se diseñó un diagrama (Figura 6) que describiera en su totalidad el sistema planteado, relacionando entre sí las reacciones antes descritas. La Figura 6 indica la irreversibilidad o reversibilidad de las reacciones mediante flechas simples o dobles, respectivamente. Además, en esta se evidencia que posterior a la hidrólisis enzimática, es decir, al escindirse los complejos enzima-sustrato, las enzimas en fase soluble o insoluble retornan a la solución para efectuar nuevamente su función catalizadora, proceso que se señala mediante flechas amarillas punteadas.

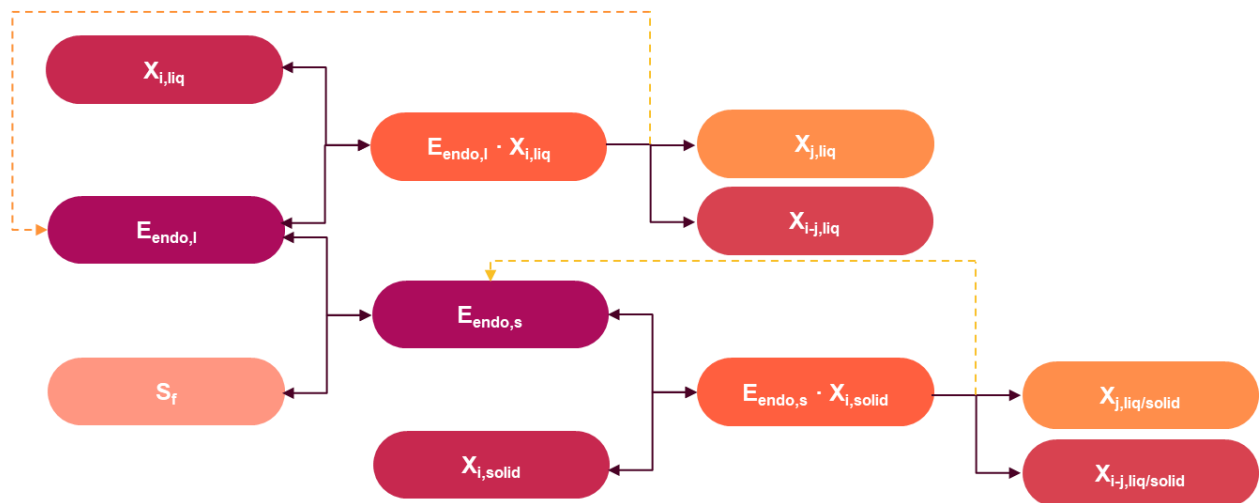


Figura 6: Diagrama de la hidrólisis enzimática de xilano en dos fases.

3.3.2.3. Supuestos y consideraciones

Posteriormente, se definieron los supuestos y consideraciones necesarios para la implementación del modelo cinético [13], [39], [40]:

1. La constante catalítica de reacción en fase sólida ($K_{1,solid}$) se relaciona de manera proporcional con la constante catalítica de reacción en fase líquida ($K_{1,liq}$).
2. La constante de Michaelis-Menten en fase sólida ($K_{M1,solid}$) se relaciona de manera proporcional con la constante de Michaelis-Menten ($K_{M1,liq}$).
3. La constante de adsorción (K_{ads}) y constante de desorción (K_{des}) pueden ser descritas a través de la constante de equilibrio (K_{eq}) y un ponderador γ .

4. Los xilo-oligosacáridos y los productos de la fase sólida se consumen con igual estequiometría para cada uno de sus productos.
5. Debido a la aplicación del modelo cinético de Michaelis-Menten se asumió estado cuasi-estacionario para los intermediarios de la reacción, es decir, los complejos enzima-sustrato.
6. La distribución de la concentración inicial de sustrato en la hidrólisis enzimática se determinó asumiendo que el largo de cadena del xilano distribuye normalmente entre 75 y 250, con un promedio de 170 y una desviación estándar de 29.
7. El modelo de Michaelis-Menten no considera el rendimiento de la reacción dentro de sus bases, por lo que se debió incluir en la simulación un ponderador X , que cuantificara la accesibilidad que tiene la enzima al sustrato.
8. La concentración de azúcares reductores en el modelo se representó mediante la ecuación 2:

$$\text{Concentración azúcares reductores} = \sum_{i=1}^{11} [X_{i,liq}] \quad (2)$$

3.3.2.4. Balances de masa asociados al sistema

En base a las reacciones y supuestos antes planteados, se construyeron los balances de masa para cada una de las especies presentes en el sistema en estudio:

- Concentración de xilo-oligosacáridos

La concentración de xilo-oligosacárido ($[X_{i,liq}]$) se determinó a través de una ecuación diferencial ordinaria (EDO) no lineal, la cual se encuentra compuesta por dos términos. El primero de ellos corresponde a la producción y consumo de $X_{i,liq}$ en la fase líquida, mientras que el segundo representa la generación de $X_{i,liq}$ por parte de los $X_{i,solid}$ en fase sólida. La ecuación 3 presenta la EDO no lineal:

$$\begin{aligned} \frac{d[X_{i,liq}]}{dt} = & \frac{k_{1,liq}}{K_{M1,liq}} [E_{endo,l}] \left(\sum_{j=i+1}^{11} [X_{j,liq}] - (i-1)X_{i,liq} \right) \\ & + \frac{k_{1,solid}}{K_{M1,solid}} [E_{endo,s}] \left(\sum_{j=12}^{250} [X_{j,solid}] \right) \end{aligned} \quad 1 \leq i \leq 11 \quad (3)$$

- Concentración de xilo-oligómeros

La concentración de xilo-oligómero ($[X_{i,solid}]$) se estableció por medio de una ecuación diferencial ordinaria no lineal, en la cual se evidencia la generación y el consumo de los $X_{i,solid}$ en fase sólida. La ecuación 4 presenta la EDO no lineal:

$$\frac{d[X_{i,solid}]}{dt} = \frac{k_{1,solid}}{K_{M1,solid}} [E_{endo,s}] \left(\sum_{j=i+1}^{250} [X_{j,solid}] - (i-1)X_{i,solid} \right) \quad 12 \leq i \leq 250 \quad (4)$$

- Concentración de enzima en fase sólida

La concentración de enzima en fase sólida ($[E_{endo,s}]$) se definió mediante una ecuación diferencial ordinaria no lineal, dentro de la cual se presentan dos términos, uno asociado a la adsorción y otro a la desorción de la enzima del sustrato en fase sólida. La ecuación 5 presenta la EDO no lineal:

$$\frac{d[E_{endo,s}]}{dt} = k_{ads}[E_{endo,l}] \left(\Omega_{max} \sum_{i=12}^n [X_{i,solid}] - [E_{endo,s}] \right) - k_{des}[E_{endo,s}] \quad (5)$$

- Concentración de enzima en fase líquida

La concentración de enzima en fase líquida ($[E_{endo,s}]$) se construyó a partir de un balance de la enzima total presente en la reacción de hidrólisis. La ecuación 6 presenta el balance de masa realizado:

$$[E_{endo,l}] = \frac{[E_{endo,o}] - [E_{endo,s}] \cdot \left(1 + \frac{1}{K_{M1,solid}} \sum_{12}^n (i-1)[X_{i,solid}] \right)}{\left(1 + \frac{1}{K_{M1,liq}} \sum_{12}^{11} (i-1)[X_{i,liq}] \right)} \quad (6)$$

Donde $E_{endo,o}$ corresponde a la concentración inicial de enzima.

3.3.2.5. Ajuste de parámetros desconocidos

Para caracterizar la hidrólisis enzimática de xilano se deben conocer todos los parámetros que controlan el sistema. Las constantes de Michaelis-Menten en fase líquida, la constante de equilibrio de adsorción y la máxima adsorción enzimática, se obtuvieron de forma experimental. Por otra parte, las constantes de Michaelis-Menten en fase sólida, las constantes de adsorción y desorción fuera del equilibrio y la accesibilidad que posee el sustrato, se determinaron mediante la implementación del modelo matemático, específicamente por medio de un ajuste de parámetros.

Previo a ajustar los parámetros desconocidos, se definió cada uno de ellos en función de los parámetros determinados experimentalmente. La definición de cada parámetro se detalla a continuación:

- Constante de Michaelis-Menten en fase sólida:

La constante de Michaelis-Menten en fase sólida ($K_{M1,solid}$) se asumió directamente proporcional a la constante de Michaelis-Menten en fase líquida ($K_{M1,liq}$), determinada de

manera experimental, definiéndose un parámetro α ajustable que cuantifica la relación entre ambas constantes. La ecuación 7 representa la relación planteada:

$$K_{M1,solid} = \alpha \cdot K_{M1,liq} \quad (7)$$

- Constante catalítica de reacción en fase sólida:

La constante catalítica de reacción en fase sólida ($K_{1,solid}$) se supuso directamente proporcional a la constante catalítica de reacción en fase líquida ($K_{1,liq}$) calculada de forma experimental, por lo cual, se estableció un parámetro β ajustable que dimensionara la relación entre ambas constantes. La ecuación 8 representa la relación planteada:

$$K_{1,solid} = \beta \cdot K_{1,liq} \quad (8)$$

- Constantes de adsorción y desorción

La constante de adsorción y desorción se determinó a partir de la constante de equilibrio de Langmuir (K_{eq}), y un parámetro γ ajustable. Las ecuaciones 9 y 10 representan la relación planteada:

$$K_{ads} = \gamma \cdot K_{eq} \quad (9)$$

$$K_{des} = \gamma \quad (10)$$

- Accesibilidad del sustrato

Para caracterizar íntegramente la hidrólisis de xilano por Cellic HTec2, es necesario establecer el rendimiento global de la reacción. La cinética de Michelis-Menten, no considera el rendimiento de las reacciones en su estructura, por lo que dentro del presente estudio se incluyó un ponderador X que cuantificara la concentración de xilano realmente accesible al ataque enzimático por la endo-1,4- β -xilanasas de Cellic HTec2 ($C_{s,accesible}$). La ecuación 11 representa la relación planteada:

$$C_{s,accesible} = X \cdot C_{s,o} \quad (11)$$

Donde $C_{s,o}$ corresponde a la concentración inicial de sustrato.

3.3.3. Implementación del modelo matemático

El modelo matemático propuesto se implementó en el software MATLAB. En este, se simuló numéricamente las ecuaciones descritas en la Sección 3.3.2.4 mediante el integrador ode45, el que requiere para la simulación, además de las ecuaciones, el tiempo de reacción, las condiciones iniciales y los parámetros que describen el sistema.

Para determinar los parámetros desconocidos, se realizó un ajuste de parámetros basado en la minimización del error cuadrático medio (ECM) entre la concentración de azúcares reductores entregada por la simulación (ver Sección 3.3.2.3) y la otorgada por la curva de progreso experimental (ver Sección 3.2.5). La ecuación 12 representa la estructura matemática del ECM:

$$ECM = \frac{\sum_{i=1}^n ([AR_{i,exp}] - [AR_{i,sim}])^2}{n - p} \quad (12)$$

Donde $[AR_{i,exp}]$ y $[AR_{i,sim}]$ corresponden a la concentración de azúcares reductores experimentales y simulados, respectivamente. Por otra parte, n representa el número de datos experimentales y p simboliza el número de parámetros en ajuste.

La minimización se efectuó por medio del optimizador `fmincon`, ya que este permite añadir restricciones al sistema. En este caso, se restringió el valor de los parámetros en ajuste a un número mayor a cero. Por otra parte, para ejecutar la optimización se deben introducir al modelo adivinanzas iniciales para cada uno de los parámetros, utilizándose en esta investigación los valores obtenidos por Dutta et al. en 2015 [13].

Finalmente, se realizó un esquema (Figura 7) que describiera íntegramente el modelo matemático planteado, considerando sus entradas y salidas. En este se evidencia que las principales entradas del sistema son las condiciones iniciales, las constantes determinadas de forma experimental, la curva de progreso de azúcares reductores experimental y las adivinanzas iniciales para cada uno de los parámetros en ajuste. Por otra parte, las salidas del sistema corresponden a los parámetros ajustados, la dinámica temporal de la concentración de enzima en fase sólida y las dinámicas temporales de los productos en fase líquida y sólida. Por último, se identificó que la variable de estado del sistema corresponde a la concentración molar, ya que en base a esta se planteó el modelo cinético.

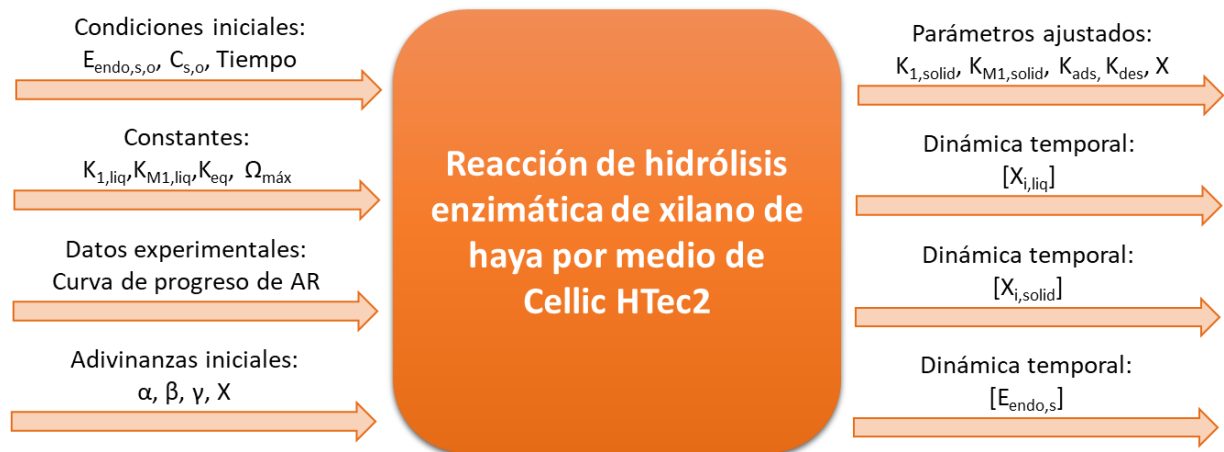


Figura 7: Diagrama de flujo del modelo de hidrólisis enzimática de xilano de haya por Cellic HTec2.

Donde $E_{endo,s,o}$ es la concentración de enzima en fase sólida inicial y $C_{s,o}$ es la concentración de xilano inicial.

3.3.4. Análisis estadístico de los parámetros

Una vez realizada la simulación, se ejecutaron 4 análisis estadísticos a los parámetros ajustados para determinar la validez de la magnitud de este dentro del sistema en estudio. Enseguida, se detallan los análisis implementados:

- Creación de intervalos de confianza al 95% para cada uno de los parámetros ajustados.
- Realización de una prueba de significancia estadística ($p < 0,05$) para cada uno de los parámetros ajustados.
- Estimación del coeficiente de determinación entre los datos experimentales y los valores simulados.
- Determinación del coeficiente de correlación entre los datos experimentales y los valores simulados.

3.3.5. Análisis de sensibilidad del modelo frente a los parámetros

Finalmente, luego de implementar el modelo cinético, se procedió a realizar un análisis sobre la sensibilidad que posee el sistema frente a cada uno de los parámetros ajustados. Para esto se varió de forma independiente la magnitud de cada uno de los parámetros ajustados, lo que permitió cuantificar la incidencia que las magnitudes de estos poseen sobre los resultados de la simulación.

Capítulo 4

4. Resultados y discusión

4.1. Caracterización del preparado enzimático Cellic HTec2

En primer lugar, se realizó una caracterización general del preparado enzimático Cellic HTec2, que fue utilizado en la totalidad de los ensayos experimentales requeridos para el cumplimiento objetivos específicos de esta investigación. A continuación, se enseñan los resultados de la caractización del preparado enzimático, los cuales incluyen la determinación de la actividad xilanasa, el patrón electroforético y un análisis cromatográfico mediante intercambio aniónico.

4.1.1. Determinación de la actividad enzimática de Cellic HTec2

4.1.1.1. *Concentración de proteínas totales*

La concentración de proteínas totales de Cellic HTec2 es de $112,3 \pm 8,4$ [mg/ml], dato que será utilizado para calcular la actividad xilanasa específica del preparado enzimático. Este valor se calculó a partir de los datos de absorbancias obtenidos, los cuales poseen una desviación estándar del 3%, lo que indica una baja dispersión de estos en relación a su media.

Por otra parte, diferentes estudios realizados al preparado enzimático Cellic HTec2, han estimado la concentración de proteínas totales en un rango entre 157 – 243 [mg/ml] [41]– [44]. Lo anterior, permite afirmar que el valor estimado en este Trabajo de Memoria de Título se encuentra dentro del orden de magnitud establecido en investigaciones previas.

Por último, se debe tener en consideración que el valor determinado representa la concentración de proteínas totales del preparado enzimático, es decir, no otorga información sobre la cantidad de enzima endo-1,4-β-xilanasa dentro de Cellic HTec2.

La curva de calibración de BSA construida para la determinación de la concentración de proteínas totales se presenta en el Anexo 8.5.

4.1.1.2. *Caracterización de la actividad enzimática*

En primer lugar, se presentan las curvas de saturación enzimática (Figura 8), las cuales describen el comportamiento de la actividad de Cellic HTec2 en función de la carga inicial de sustrato, considerando distintas concentraciones de proteína total iguales a 0,25, 0,5 y 1 [ug/ml].

En relación a los resultados obtenidos, se esperaba que, al duplicar la concentración de proteínas totales, la actividad se incrementara en igual proporción, sin embargo, al analizar las razones entre las actividades de las curvas de saturación a 0,5 [ug/ml] y 0,25

[ug/ml] y posteriormente, las curvas de saturación a 1 [ug/ml] y 0,5 [ug/ml], se obtuvo que en promedio éstas son 2,2 y 2,6 veces mayores, respectivamente. La primera razón responde dentro del rango de lo deseado, no obstante, la segunda, sobrepasa en un 29,7% lo previsto. Lo anterior, podría deberse a que la curva de saturación construida a partir de una concentración de proteína total de 1 [ug/ml], se realizó posterior a los primeros dos ensayos (los cuales fueron ejecutados en simultáneo), por lo que se debieron preparar nuevamente las diluciones enzimáticas y de sustratos, añadiendo así, una fuente de error que los experimentos anteriores no poseían.

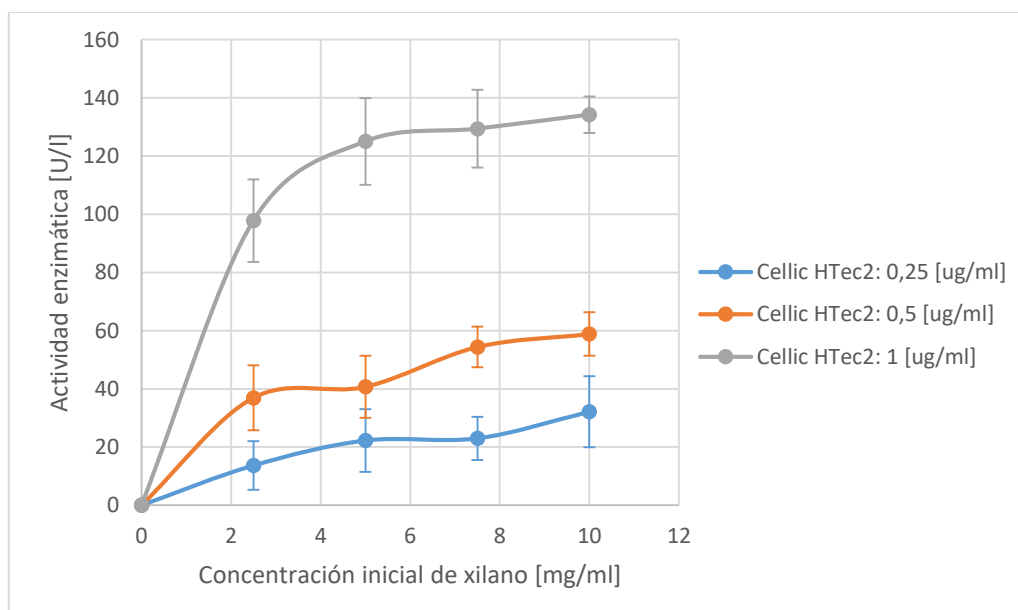


Figura 8: Curva de saturación enzimática para Cellic HTec2.

Por otro lado, la Figura 8 muestra que el preparado enzimático Cellic HTec2 comienza a saturarse por sustrato a partir de una concentración de xilano de 5 [mg/ml], alcanzando la saturación total a una concentración de xilano de 10 [mg/ml]. Lo anterior, también puede ser corroborado por la Tabla 1, en la cual se aprecia que las actividades específicas para una concentración de xilano de 10 [mg/ml] tienden a mantenerse constantes al modificar la concentración de Cellic HTec2, lo que se considera una característica típica de las enzimas saturadas.

Por otra parte, la Tabla 1 indica que los datos de la curva de saturación realizada para una concentración de Cellic HTec2 de 0,25 [ug/ml] poseen altas desviaciones estándar. Este hecho se debe principalmente a que estas muestras tienen bajos valores de absorbancias, por lo que cualquier error de pipeteo perturba de forma considerable la precisión de la medición.

Tabla 1: Actividad específica de Cellic HTec2.

Concentración de xilano [mg/ml]	Concentración de Cellic HTec2 [ug/ml]	Actividad específica [U/mg]
2,5	0,25	54,8 ± 33,6
	0,50	73,9 ± 22,3
	1,00	97,8 ± 14,2
5	0,25	89,1 ± 43
	0,50	81,4 ± 21,3
	1,00	125 ± 14,9
7,5	0,25	92,1 ± 29,7
	0,50	108,8 ± 13,9
	1,00	129,4 ± 13,4
10	0,25	128,5 ± 48,7
	0,50	117,7 ± 15
	1,00	134,2 ± 6,2

Adicionalmente, se debe tener en consideración que los valores de actividad específica obtenidos se encuentran subestimados, ya que su cálculo se realizó en función de la concentración de proteínas totales presentes en Cellic HTec2.

Finalmente, a partir de los resultados obtenidos, se decidió utilizar durante esta investigación una concentración de Cellic HTec2 de 1 [ug/ml], ya que esta registra los mayores valores de actividad enzimática. Por otra parte, la concentración de xilano escogida corresponde a 7,5 [mg/ml], pues a partir de ese valor no se evidencia un incremento importante en el rendimiento de la reacción, de hecho, al incrementar la concentración de sustrato a 10 [mg/ml], el rendimiento de azúcares reductores aumenta sólo en un 3,6%.

El detalle de los resultados obtenidos se presenta en el Anexo 8.6 y el Anexo 8.7.

4.1.2. Identificación del peso molecular de la endo-1,4-β-xilanasasa de Cellic HTec2

La Figura 9 muestra el resultado de la electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) realizada a Cellic HTec2. De izquierda a derecha se presenta un marcador de peso molecular, seguido de diferentes volúmenes de una dilución 1:100 del preparado enzimático, equivalente a una concentración de 1,123 [mg/ml].

Dentro del gel se identificaron dos bandas predominantes, las que en conjunto representan en promedio un 50,7% del contenido total de cada carril. Considerando estos resultados y los entregados en la Tabla 2, se estableció que la enzima con actividad endo-1,4-β-xilanasasa del preparado enzimático corresponde a la banda con mayor abundancia dentro, es decir, la Banda 1. Por otra parte, se supuso que la Banda 2 podría

representar la enzima con actividad celulasa del preparado enzimático. Sin embargo, los supuestos antes planteados deben ser corroborados, por ejemplo, mediante un ensayo de zimografía, el que no pudo ser realizado en esta investigación [45]. Por este motivo, se considera que asumir el peso molecular de la enzima con actividad endo-1,4-β-xilanasas en 65,6 [kDa] constituye uno de los supuestos más importantes del modelo matemático implementado.

El detalle de los resultados obtenidos se presenta en el Anexo 8.8.

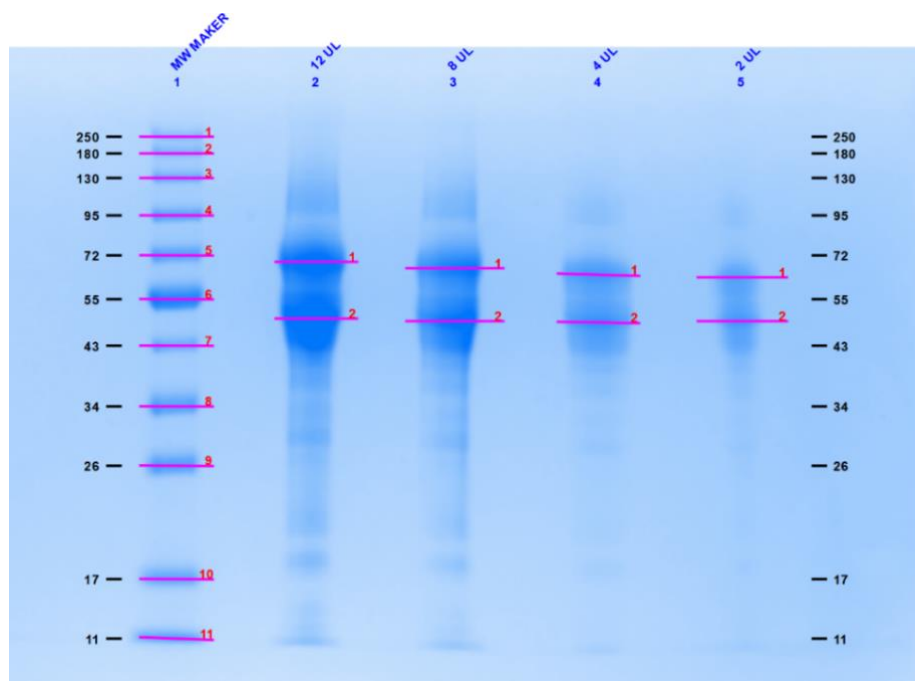


Figura 9: SDS-PAGE para Cellic HTec2.

Tabla 2: Estimación del peso de molecular de la xilanasas de Cellic HTec2.

Banda	Peso molecular promedio [g/mol]	Porcentaje promedio del carril (%)
1	65.646	28,5
2	49.050	22,3

4.1.3. Análisis cromatográfico de Cellic HTec2 mediante intercambio aniónico

La Figura 10 presenta el cromatograma resultante de la separación mediante intercambio aniónico de las proteínas del preparado enzimático Cellic HTec2. En esta se evidencia la elución de proteínas durante el gradiente de NaCl 0,5 [M] pH 7,5, las cuales fueron detectadas mediante mediciones de absorbancia en el rango UV.

Posteriormente, se cuantificó por medio del método DNS, la actividad xilanasas y celulasa de las fracciones con presencia de proteínas. Inicialmente, se esperaba separar la enzima endo-1,4-β-xilanasas de la enzima celulasa y de las otras proteínas que

componen el preparado enzimático. Sin embargo, los resultados de los ensayos de actividad (Figura 11), indicaron que la enzima endo-1,4- β -xilanasas eluye de manera simultánea a la enzima celulasa y por tanto, no son separables por medio de intercambio aniónico. No obstante, también existe la posibilidad de que las enzimas endo-1,4- β -xilanasas y celulasa correspondan a un único conglomerado enzimático con doble actividad catalítica, fenómeno que ya ha sido reportado para enzimas de la familia GH10 [32].

Finalmente, debido a que no se logró la separación de la enzima endo-1,4- β -xilanasas de las otras proteínas presentes en el preparado enzimático, se decidió no continuar con la etapa de purificación, al no conllevar beneficios sustanciales para esta investigación. Sin embargo, en el caso de requerir la separación para estudios más específicos, se sugiere evaluar la aplicación de cromatografías de intercambio catiónico o de interacción hidrofóbica.

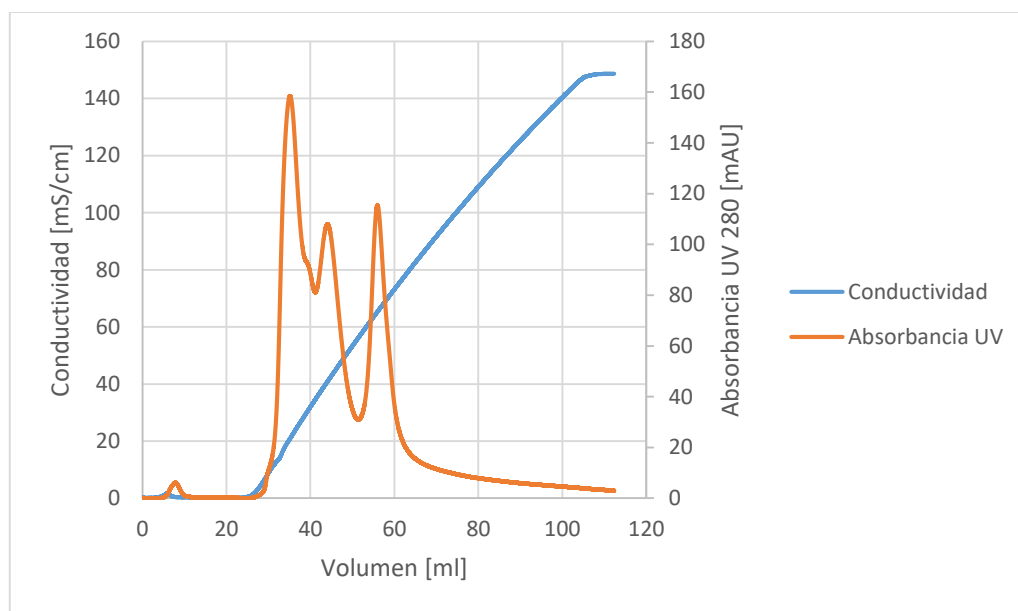


Figura 10: Cromatograma de FPLC de la purificación de la xilanasas de Cellic HTec2: relación conductividad - absorbancia UV.

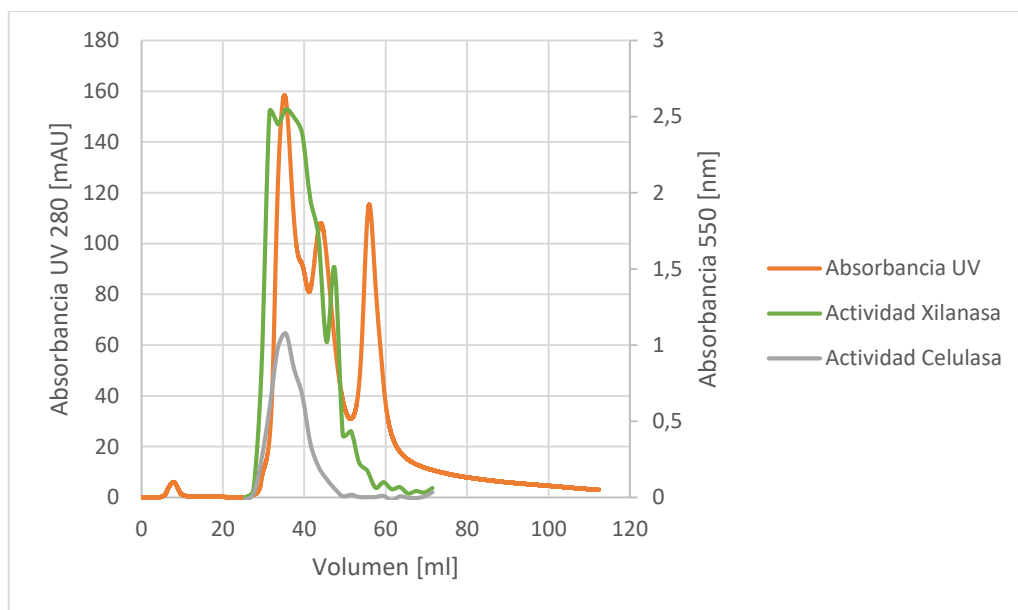


Figura 11: Cromatograma de FPLC de la purificación de la xilanasa de Cellic HTec2: relación absorbancia UV - actividad enzimática.

4.2. Determinación de los parámetros cinéticos de la hidrólisis de xilano en fase líquida por Cellic HTec2

Para determinar los parámetros cinéticos de la reacción se utilizó el modelo de Michaelis-Menten [46]. En primer lugar, se construyeron curvas de progreso de azúcares reductores para cada una de las cargas de sustrato escogidas por un periodo de 45 [min] a pH 5,0 y 50 [°C]. Enseguida, estos datos se procesaron para generar el diagrama de Lineweaver-Burk en los tiempos de velocidad inicial, es decir, hasta los 20 [min] de reacción. Este gráfico entregaría las constantes buscadas, sin embargo, los resultados no fueron satisfactorios, ya que no se evidenció una buena correlación entre las curvas construidas, lo que se debe a que el diagrama de Lineweaver-Burk maximiza los errores experimentales al utilizar para su construcción el inverso recíproco de la velocidad de reacción enzimática.

En consecuencia, se decidió modelar una curva de progreso de azúcares reductores para cada concentración de sustrato seleccionada, en función de los datos empíricos obtenidos, eliminando así las perturbaciones ocasionadas por las mediciones experimentales. La Figura 12 presenta las curvas resultantes, mientras que la Tabla 3 contiene los coeficientes de determinación (R^2) entre los valores experimentales y los simulados.

De la Tabla 3, se deduce que las curvas simuladas representan fidedignamente los valores entregados por los ensayos experimentales al poseer un elevado R^2 . No obstante, el experimento realizado en base una concentración inicial de xilano igual a 2,5 [mg/ml] tiene un coeficiente menor que los obtenidos para las otras concentraciones de sustrato, diferencia que se debe a las bajas absorbancias corregidas que poseen estos datos, por

lo que una perturbación mínima en el volumen sometido a medición repercute de forma importante en los datos obtenidos.

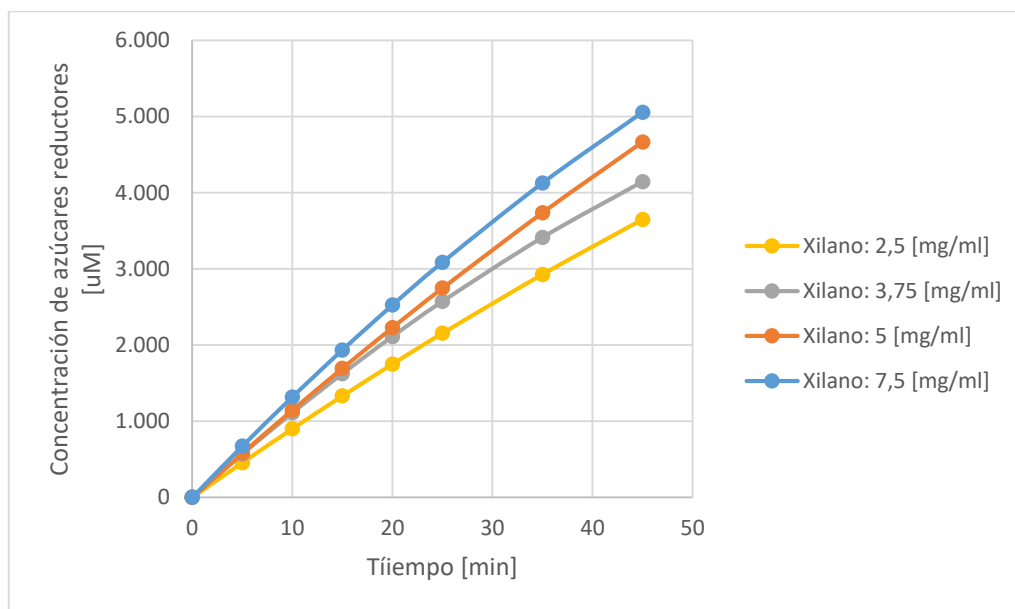


Figura 12: Curvas de progreso de azúcares reductores simuladas para la determinación de los parámetros cinéticos de Michaelis-Menten.

Tabla 3: Coeficiente de determinación entre curvas experimentales y simuladas para la determinación de los parámetros cinéticos de Michaelis-Menten.

Concentración de sustrato [mg/ml]	Coeficiente de determinación (R ²)
2,50	0,9880
3,75	0,9965
5,00	0,9968
7,50	0,9967

Enseguida, a partir de las concentraciones de azúcares reductores simuladas, se implementó nuevamente el diagrama de Lineweaver-Burk, presentado en la Figura 13. En este, se visualiza que las curvas para los distintos tiempos de velocidad inicial parecen no tener una diferencia significativa, lo que fue corroborado por medio de un análisis estadístico por t-student ($p < 0,05$). Lo anterior, indicaría que no existe inhibición dentro de la hidrólisis enzimática de xilano de haya por Cellic HTec2.

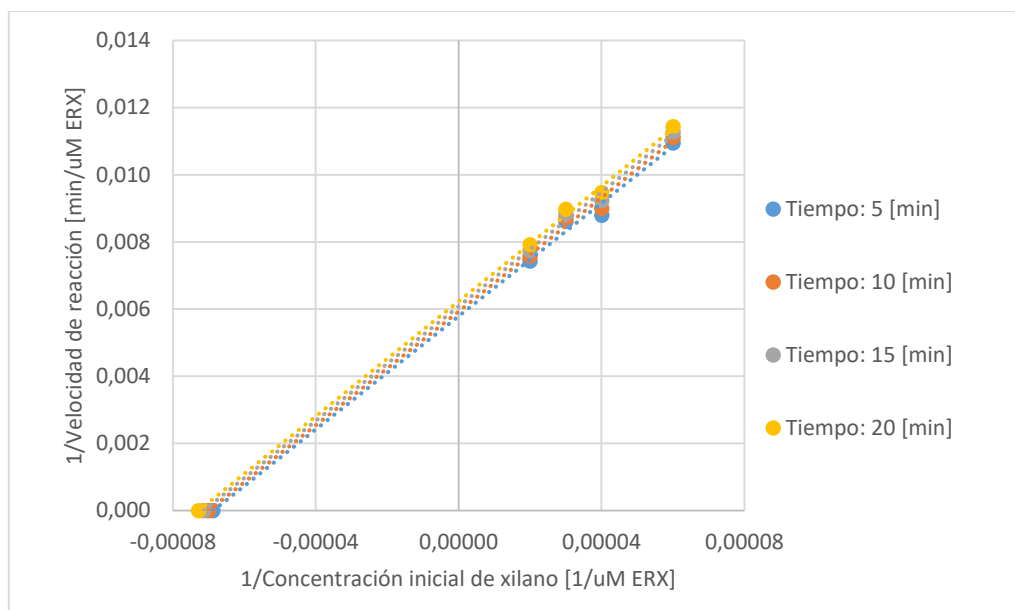


Figura 13: Diagrama de Lineweaver-Burk para la determinación de los parámetros cinéticos de la hidrólisis de xilano de haya por Cellic HTec2. ERX: equivalentes reductores de xilosa.

Posteriormente, mediante la información proporcionada por la Figura 13 y la ecuación 1, se determinaron los parámetros cinéticos de la hidrólisis de xilano de haya por Cellic HTec2. Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 4.

Tabla 4: Parámetros cinéticos de la hidrólisis de xilano por Cellic HTec2. ERX: equivalentes reductores de xilosa.

Parámetros cinéticos	Valor	
$K_{M1,liq}$	14.007,016 [uM ERX]	2,103 [mg xilano/ml]
$V_{máx,liq}$	2,741 [uM ERX/s]	0,0247 [mg xilano/ml/min]
$K_{1,liq}$	179,948 [1/s]	10.796,908 [1/min]

En relación a la constante de Michaelis-Menten ($K_{M1,liq}$), se puede afirmar que el valor estimado se encuentra dentro del orden de magnitud establecido en investigaciones previas. Dentro del portal BRENDA Database se reportan al menos 10 constantes de Michaelis-Menten con valores entre 1,2 – 4 [mg/ml]. Estos datos fueron estimados empleando xilano de haya como sustrato y una variada gama de enzimas xilanasas. Asimismo, las condiciones de pH y temperatura utilizadas se encuentran en un rango entre 5 – 6,5 y 37 – 65 [°C], respectivamente [47].

Por otro lado, la magnitud de la constante catalítica ($K_{1,liq}$) también se encuentra dentro de lo esperado. El portal BRENDA Database reporta una constante catalítica igual a 139,6 [1/s], al utilizar xilano de haya como sustrato y condiciones de operación idénticas a las empleadas en este Trabajo de Memoria de Título. Además, la base de datos informa otras 5 constantes catalíticas con valores entre 80,8 – 268 [1/s] en condiciones de operación de pH y temperatura entre 6 – 7 y 40 – 70 [°C], correspondientemente. No obstante, se debe tener en consideración que el valor de la constante catalítica establecido en este Trabajo de Memoria de Título se encuentra subestimado, ya que para

su determinación no se utilizó la concentración de la enzima endo-1,4-β-xilanasas, sino que la concentración de proteínas totales del preparado enzimático.

Adicionalmente, las constantes cinéticas de Michaelis-Menten obtenidas pueden ser comparadas con un estudio realizado por Dutta et al. en 2015 [13]. En esa investigación se trabajó con xilano de haya como sustrato y bajo condiciones de pH y temperatura iguales a las utilizadas en este Trabajo de Memoria de Título, sin embargo, la enzima empleada correspondió a una endo-1,4-β-xilanasas de *T. longibrachiatum*. Los resultados obtenidos por Dutta señalan que la $V_{máx,liq}$ es igual a 0,0252 [mg/ml/min], valor prácticamente igual al obtenido en este Trabajo de Memoria de Título. Además, la $K_{M1,liq}$ determinada por Dutta et al. es de 3,93 [mg/ml], dato que permite concluir que Cellic HTec2 posee una mayor afinidad por el xilano de haya. Por otra parte, si bien la magnitud de la constante catalítica ($K_{1,liq}$) no es reportada por Dutta, si se indica que la concentración de enzima endo-1,4-β-xilanasas utilizada corresponde a 250 [ug/ml], mientras que en el presente estudio se aplicó una concentración de Cellic HTec2 de 1 [ug/ml], lo anterior permite aseverar que la $K_{1,liq}$ determinada por Dutta, es aproximadamente 250 menor que la establecida en este Trabajo de Memoria de Título (ver ecuación 1), lo que se traduce en una menor eficiencia catalítica por parte de la endo-1,4-β-xilanasas de *T. longibrachiatum*.

Finalmente, se determinó que la enzima endo-1,4-β-xilanasas de Cellic HTec2 posee una constante de especificidad ($K_{1,liq}/K_{M1,liq}$) de $1,923 \cdot 10^6$ [1/M·s], valor que permite concluir que la endo-1,4-β-xilanasas de Cellic HTec2 posee rendimiento promedio en relación al universo de enzimas estudiadas [46], [48].

El detalle de los resultados obtenidos se presenta en el Anexo 8.9.

4.3. Evaluación del potencial efecto inhibitor de la xilosa en la hidrólisis de xilano por Cellic HTec2

Para la construcción del modelo cinético es necesario determinar si existe inhibición por producto terminal dentro del proceso de hidrólisis enzimática. Esta evaluación se efectuó mediante la adición de xilosa exógena a la mezcla de reacción enzimática, imitando así, la acción de la molécula sobre la catálisis. Las concentraciones de monómero escogidas corresponden a 0,2 y 1 [mg/ml], las cuales se testearon sobre 4 concentraciones de xilano de haya, iguales a 2,5, 3,75, 5 y 7,5 [mg/ml] [13]. Por otra parte, se utilizaron curvas de progreso de azúcares reductores experimentales sin adición de xilosa exógena como ensayos control.

Los resultados del experimento se presentan en la Figura 14, Figura 15, Figura 16 y Figura 17, las que muestran las cinéticas de producción de azúcares reductores para cada una de las combinaciones antes descritas.

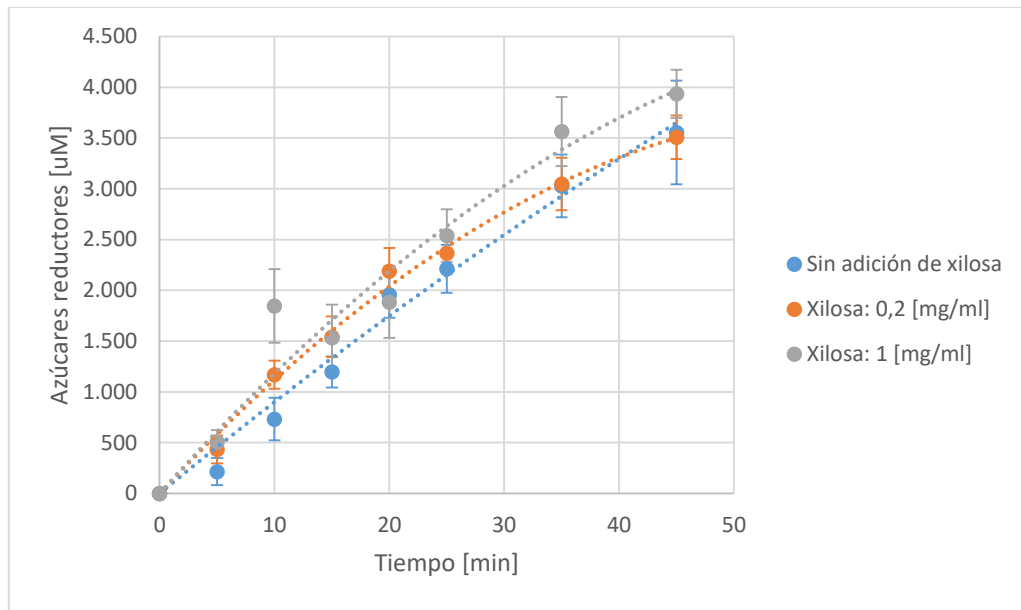


Figura 14: Estudio de inhibición por producto para Cellic HTec2: concentración de xilano 2,5 [mg/ml].

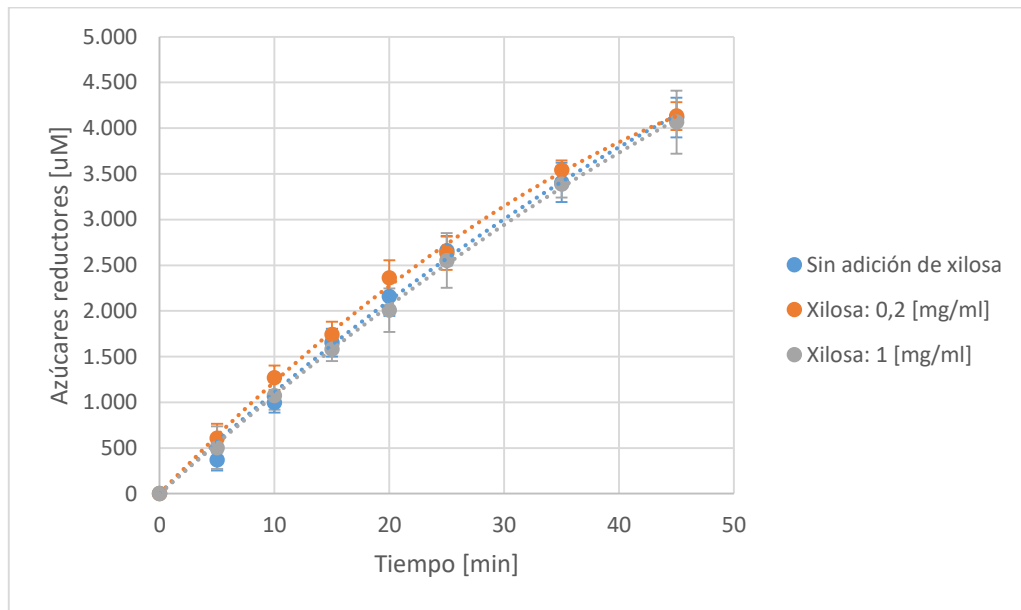


Figura 15: Estudio de inhibición por producto para Cellic HTec2: concentración de xilano 3,75 [mg/ml].

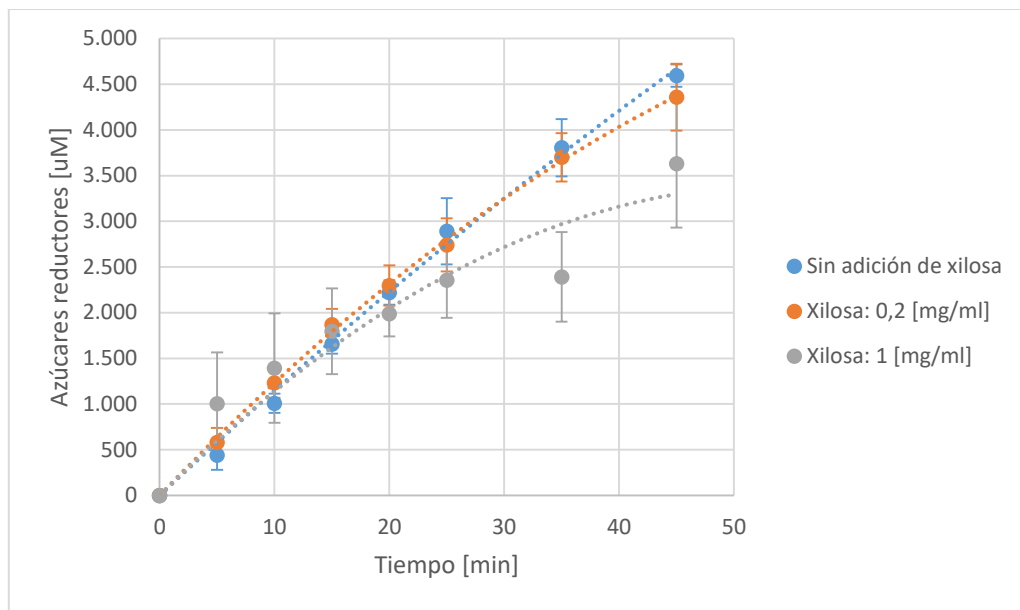


Figura 16: Estudio de inhibición por producto para Cellic HTec2: concentración de xilano 5 [mg/ml].

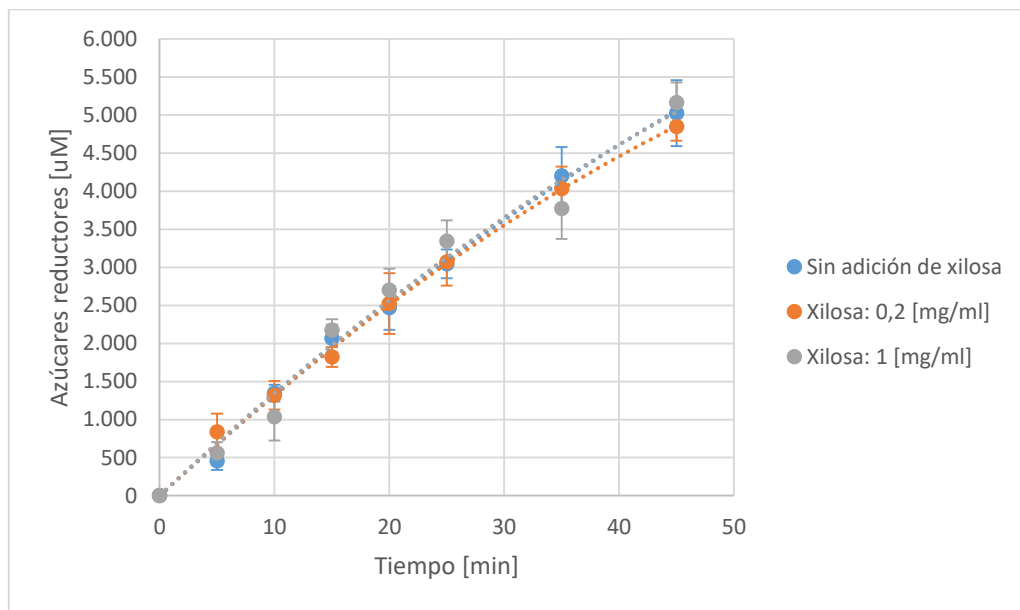


Figura 17: Estudio de inhibición por producto para Cellic HTec2: concentración de xilano 7,5 [mg/ml].

Las figuras antes presentadas, muestran que no existe una diferencia aparente entre la concentración de azúcares reductores generados por las curvas control y las curvas con adición de xilosa exógena. La afirmación antes planteada, fue corroborada por medio de un análisis estadístico por t-student ($p < 0,05$), el que entregó números por sobre el valor p establecido, confirmándose que los datos comparados poseen una discrepancia insignificante. Este resultado permite concluir la inexistencia de inhibición por producto terminal para las concentraciones de sustrato y enzima escogidas. A pesar de lo anteriormente mencionado, se debe en consideración que la implementación de concentraciones más altas de sustrato y/o enzima, puede generar la acumulación de producto terminal, por lo cual se sugiere siempre evaluar la existencia de inhibición para

las cargas iniciales de reactivos a utilizar, con el objetivo de anular o minimizar este fenómeno.

Por otra parte, la Tabla 5 entrega los valores determinados por la prueba de significancia estadística. En esta, se puede apreciar que, pese a que no existe una diferencia significativa entre las curvas contrastadas, si se evidencian datos alejados del promedio, tales como las curvas de progreso asociadas a una concentración de xilano de 2,5 [mg/ml] y la curva de progreso para concentraciones de xilano y xilosa de 5 [mg/ml] y 1 [mg/ml], respectivamente. Este hecho es recurrente para el primer caso, ya que para la mayoría de los experimentos realizados para una concentración de xilano de 2,5 [mg/ml] se obtuvieron elevados errores experimentales, lo que se debe a sus bajos valores de absorbancias, por lo cual una variación mínima en el volumen de medición, impacta sustancialmente en los resultados obtenidos. Por otra parte, el segundo caso posee buen ajuste a la curva control hasta los 20 [min] de reacción, sin embargo, desde ese instante los valores dejan de seguir la tendencia esperada, debido a un incremento en los errores experimentales, que alcanzaron una desviación estándar promedio de un 10,5%. Estos errores son atribuibles a las mediciones registradas para los blancos de reacción, ya que al eliminar del set de datos estos valores, la magnitud del p-value obtenido por el análisis estadístico se incrementa de 0,715 a 0,934.

Tabla 5: Análisis estadístico por t-student entre curva control y curvas con adición de xilosa 0,2 y 1 [mg/ml].

Concentración inicial de sustrato [mg/ml]	p-value	
	Comparación: curva control vs. curva con adición de xilosa 0,2 [mg/ml]	Comparación: curva control vs. curva con adición de xilosa 1 [mg/ml]
2,50	0,791	0,592
3,75	0,874	0,973
5,00	0,980	0,715
7,50	0,982	0,983

Primeramente, la inexistencia de inhibición por xilosa se atribuyó a las concentraciones de xilosa exógena utilizadas, presumiéndose que estas no habían sido lo suficientemente altas como para generar inhibición. Esto se consideró debido a que la adición de este monómero a una concentración de 1 [mg/ml] equivale a un rendimiento de xilosa de tan sólo el 13,3%, cuando la concentración inicial de xilano es de 7,5 [mg/ml]. Sin embargo, mediante HPLC se evaluó la producción de xilosa durante la hidrólisis de xilano, considerando concentraciones de sustrato de 7,5 [mg/ml] y de Cellic HTec2 de 1 [ug/ml], obteniéndose un rendimiento de xilosa del 0,3% a las 3 [h] de reacción. Por otra parte, una investigación realizada por Gao et al. (2014) determinó un rendimiento de xilosa de aproximadamente un 11,5%, utilizando una relación de 3 [ug Cellic HTec2/mg xilano de haya], es decir, 22,5 veces más que lo aplicado en este Trabajo de Memoria de Título [44]. En función de lo anteriormente mencionado, se concluye que el rendimiento de xilosa generado por Cellic HTec2 no superará el 13,3% bajo las condiciones de operación

de este estudio y, por tanto, la concentración de xilosa adicionada no es la responsable de la inexistencia de inhibición por producto.

En relación a la baja generación de xilosa en la reacción de hidrólisis, se cree que esta se debe a una baja o nula presencia de enzimas con actividad β -xilosidasas, las cuales promueven la producción de este monómero. Lo anterior, ya que posterior al lanzamiento de Cellic HTec2, la compañía Novozymes liberó un nuevo preparado enzimático llamado Cellic HTec3, el cual promete aumentar el rendimiento de la producción de xilosa de un 11,3% al utilizar Cellic HTec2, hasta un 78,7% con Cellic HTec3, utilizando una relación para ambos casos de 5,8 [mg Cellic HTec/100 mg xilano]. Según Novozymes esta mejoría se debe a que este nuevo preparado enzimático posee enzimas con actividad β -xilosidasas, lo que permite inferir que Cellic HTec2 contiene una nula o mínima concentración de este tipo de enzima [49], [50].

Es importante mencionar también, que la bibliografía sugiere la existencia de inhibición por xilobiosa, sin embargo, el experimento antes presentando no pudo ser replicado para este dímero. En consecuencia, en base a los resultados obtenidos para la molécula de xilosa, se asumió para el modelo matemático que no existe inhibición por xilobiosa dentro de la hidrólisis de xilano de haya por Cellic HTec2, siendo este uno de los principales supuestos de la simulación implementada [13].

El detalle de los resultados obtenidos se presenta en el Anexo 8.10.

4.4. Determinación de los parámetros de equilibrio de adsorción de la hidrólisis de xilano por Cellic HTec2

La determinación de los parámetros de equilibrio de adsorción, se realizó por medio de un ensayo que evaluó 4 relaciones enzima-sustrato, iguales a 10, 20, 30 y 40 [ug Cellic HTec2/mg xilano de haya]. La reacción se ejecutó a una temperatura de 4 [°C] con el objetivo de minimizar la hidrólisis enzimática, sin embargo, al analizar las muestras se evidenció la generación de producto, alcanzando un rendimiento de azúcares reductores de un 28,8% para la relación de 40 [ug Cellic HTec2/mg xilano de haya]. Si bien, la compañía productora Novozymes señala que la temperatura óptima de operación del preparado enzimático se encuentra entre 45 – 50 [°C], la elevada carga enzimática utilizada en este estudio, permite evidenciar actividad catalítica en condiciones desfavorables [49].

Por medio de las concentraciones experimentales de enzima libre y adsorbida calculadas, se modelaron isoterms de Langmuir a las 1:15 [h], 3:45 [h] y 6 [h] de reacción, evidenciándose que esta última recta era aquella con mayor fidelidad a los datos experimentales, poseyendo un coeficiente de determinación (R^2) de 0,9984. Además, para este tiempo de medición se obtuvieron las menores tasas de error, con una desviación estándar promedio del 3,3%, otorgando fiabilidad a cada uno de los sets de datos.

La Figura 18 presenta la isoterma de Langmuir experimental y simulada para las 6 [h] de reacción. En este se presenta la concentración de xilano inicial sobre la concentración de enzima en fase sólida ($C_{s,i}/E_{\text{endo},s}$ [uM sustrato/uM enzima]) en función del inverso de la concentración de enzima en fase líquida ($E_{\text{endo},l}$ [uM enzima]). Luego, a partir de la curva establecida, se obtuvieron los parámetros de equilibrio de adsorción, detallados en la Tabla 6.

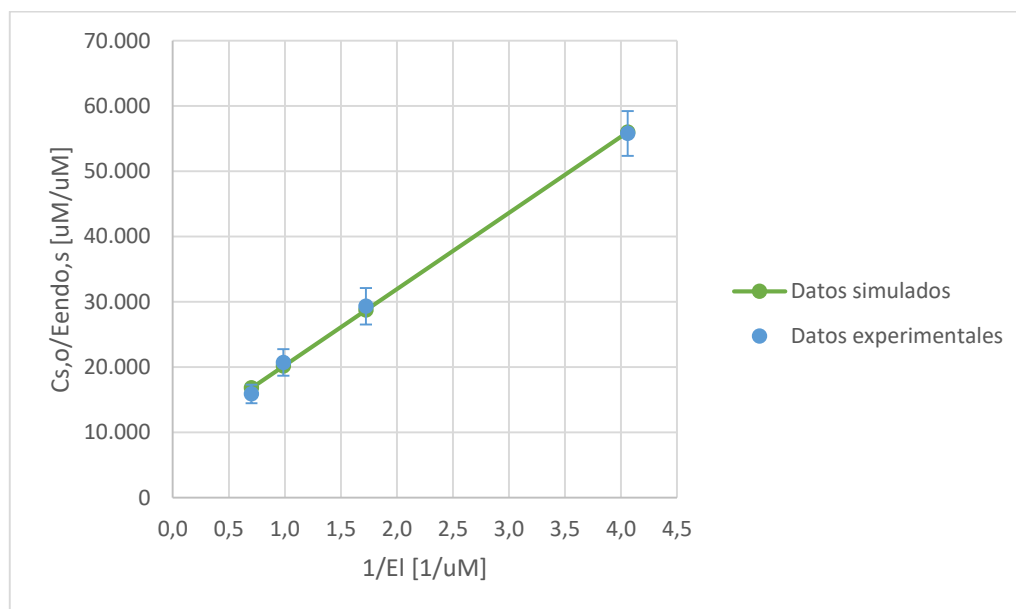


Figura 18: Isoterma de Langmuir para Cellic HTec2 sobre una concentración de xilano de 7,5 [mg/ml].

Tabla 6: Parámetros de equilibrio de adsorción para Cellic HTec2 sobre una concentración de xilano de 7,5 [mg/ml].

Parámetros de adsorción	Valor
Adsorción enzimática máxima ($\Omega_{\text{máx}}$) [uM Cellic HTec2/mM sustrato]	17,354
Constante de equilibrio de adsorción (K_{eq}) [1/uM Cellic HTec2]	0,739

En relación a los parámetros determinados, es complejo realizar un análisis sobre los efectos que estos poseen sobre la hidrólisis enzimática, debido a que no existen estudios previos de la dinámica de adsorción de Cellic HTec2 sobre xilano de haya para comparar. Sin embargo, si es posible observar que la magnitud de los parámetros adsorción obtenidos es similar a otros reportados por literatura.

La adsorción enzimática máxima ($\Omega_{\text{máx}}$) determinada en este trabajo alcanzó un valor de 50,681 [ug Cellic HTec2/mg xilano], mientras que la constante de equilibrio de adsorción (K_{eq}) se estimó 0,089 [mg/ml]. Por otra parte, un estudio realizado por Gao et al. (2014), evaluó la adsorción de rastrojo de maíz pretratado, constituido principalmente por polímeros de glucano, utilizando concentraciones de enzima entre 0 – 2.000 [mg enzima/g sustrato], obteniendo una $\Omega_{\text{máx}}$ y una K_{eq} entre 127 – 239 [ug Cellic HTec2/mg

sustrato] y 0,3 – 2,3 [mg Cellic HTec2/ml], respectivamente. Esta información permite concluir que los valores determinados en este Trabajo de Memoria de Título se encuentran dentro del orden de magnitud estipulado en estudios anteriores [44].

Finalmente, se debe tener en consideración que la accesibilidad de las enzimas a la biomasa lignocelulósica influye directamente en el rendimiento de la reacción enzimática [51]. Por esta razón, se sugiere para estudios futuros, analizar el comportamiento de la adsorción de Cellic HTec2 sobre distintos tipos de xilano, para así determinar si los parámetros encontrados en este estudio favorecen positiva o negativamente la generación de xilo-oligosacáridos.

El detalle de los resultados obtenidos se presenta en el Anexo 8.11.

4.5. Cuantificación de la producción de azúcares reductores por la hidrólisis de xilano por Cellic HTec2

El siguiente experimento consistió en la construcción de una curva de progreso de la producción azúcares reductores generados durante la hidrólisis de xilano de haya por Cellic HTec2. Para esto, se utilizó una concentración de Cellic HTec2 de 1 [ug/ml] y una concentración de xilano de haya 7,5 [mg/ml]. Los datos de la curva de progreso fueron utilizados para la realización del ajuste de parámetros del modelo cinético planteado.

La reacción se estudió por 3 [h], suponiendo que el estado estacionario se alcanzaría durante ese periodo, sin embargo, como se visualiza en la Figura 19, hasta los 150 [min] de reacción la producción de azúcares reductores continuaba incrementándose, mientras que los datos recolectados a los 180 [min], poseen una elevada tasa de error que no permite afirmar si el estado estacionario se ha alcanzado. Considerando lo anteriormente mencionado, se sugiere para experimentos futuros realizar tomas de datos durante un mayor periodo de tiempo. Por otra parte, ya que los datos registrados a los 180 [min] de reacción poseen una desviación estándar considerable, se decidió no utilizarlos para el ajuste de parámetros del modelo matemático.

Por otra parte, la curva de progreso construida permitió determinar el rendimiento de la producción de azúcares reductores, el cual alcanzó un valor del 17,6% a los 150 [min] de reacción. Se estima que este valor no aumentará de forma considerable, debido a que la curva de progreso presenta una disminución importante en su pendiente, lo que indicaría la proximidad del estado estacionario.

En relación al bajo rendimiento de azúcares reductores determinado, se estima que este puede estar causado por múltiples factores. En primer lugar, se debe considerar que el sistema no fue agitado, por no poseer equipos disponibles al momento de realizar el trabajo, cuando diversos estudios sugieren la importancia de mezclar continuamente para mejorar la transferencia de masa y, por tanto, la tasa de catálisis [52]. Además, el sustrato utilizado corresponde a xilano de haya, el cual contiene un 19,2% de grupos sustituyentes

y/o cadenas laterales, donde un 59,4% corresponde a ácido glucurónico, mientras que la fracción restante responde a glucosa, arabinosa y myo-inositol. Estas moléculas generan impedimento estérico, dificultando el alcance del enlace β -1,4-glicosídico por parte de la enzima y por ende, disminuyen la cantidad de producto generado por la hidrólisis enzimática [10], [53]. Otro factor podría estar influyendo, es la posibilidad de que una fracción del sustrato se encuentre en su forma recalcitrante, por lo cual nuevamente la endo-1,4- β -xilanasas de Cellic HTec2 no podrá realizar la reacción catalítica [40], [54]–[56]. También, se debe tener en cuenta que, durante el proceso de hidrólisis, ocurre una pérdida de actividad enzimática, debido a la desactivación natural de una fracción de la enzima entregada a la reacción, lo que colabora en la reducción del rendimiento.

Por otra parte, la reducción del rendimiento podría asociarse a la metodología de preparación del xilano de haya, ya que un estudio realizado por Dutta et al. (2016) indicó que preparar el sustrato con anterioridad, reduce el rendimiento de azúcares reductores desde un 43% a un 9%, tras 5 [h] de remojo de la biomasa en el buffer de reacción. Los autores indican que los iones Na^+ disociados del buffer acetato de sodio interactúan con el xilano, que se encuentra cargado negativamente, lo que disminuye la fuerza de atracción entre enzima – sustrato, restringiendo la adsorción y catálisis enzimática a la superficie externa de la biomasa [39].

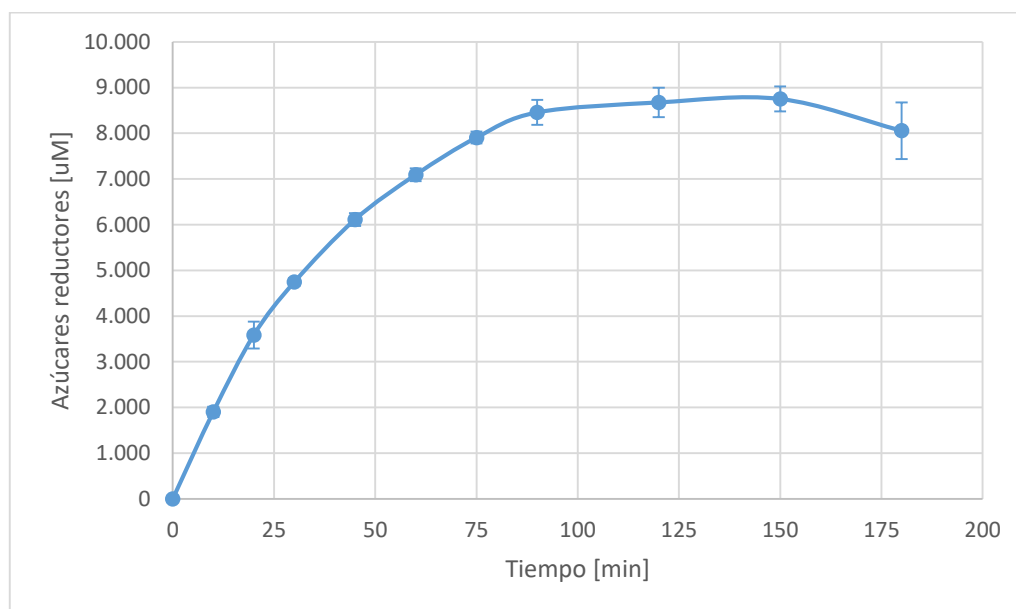


Figura 19: Curva de progreso de azúcares reductores para Cellic HTec2 1 [ug/ml] y xilano de haya 7,5 [mg/ml]

Finalmente, se debe tener en consideración que el método DNS, no es el óptimo para la cuantificación de la concentración de azúcares reductores, debido a que el reactivo DNS da una respuesta de coloración más fuerte para los xilo-oligosacáridos que para la xilosa, correspondiente a la molécula estándar de la medición, generando una sobreestimación de la cantidad de actividad xilanasas y por ende, un error en la estimación de azúcares reductores producidos [10].

El detalle de los resultados obtenidos se presenta en el Anexo 8.12.

4.6. Cuantificación de la producción de xilosa y xilobiosa por la hidrólisis de xilano por Cellic HTec2

La estimación de las concentraciones de xilosa y xilobiosa producidas por la hidrólisis de xilano, se realizó bajo iguales concentraciones de enzima y sustrato que las utilizadas en la Sección 4.5, pero para un periodo de reacción de 4 [h], dentro del cual se tomaron un total de 7 muestras. La cuantificación se efectuó por medio la técnica de HPLC, por lo que debieron construirse curvas de calibración que relacionaran las áreas entregadas por el equipo con las concentraciones de xilosa y xilobiosa generadas por la reacción.

De las 7 muestras en estudio, se determinó que 2 de ellas no seguían tendencia, presentando un valor por sobre lo esperado. Este fenómeno puede deberse a errores experimentales, ya que para cuantificar mediante HPLC se requiere de un volumen de muestra de 1,5 [ml], lo que se traduce en un volumen de reacción de al menos 10,5 [ml], lo cual no era factible, considerando que el laboratorio en ese momento no contaba con un equipo que permitiera mantener tal volumen de reacción a 50 [°C].

El inconveniente debió solucionarse, ejecutando cada muestra por separado, es decir, para cada tiempo a evaluar se contaba con un tubo de 1,5 [ml] de reacción. Así, cada vez que se debía tomar una alícuota, se extraían los tubos necesarios desde la placa calefactora y se sometían por 7 [min] a 100 [°C] para detener la reacción. Sin embargo, se estima que la aplicación de esta metodología pudo haber afectado negativamente la precisión de los datos, ya que, es probable que haya existido una equivocación en el volumen de enzima otorgada a la reacción para algunas muestras, lo que explicaría los datos aberrantes obtenidos a los 60 [min] y 240 [min] de reacción.

La Figura 20 presenta las curvas de progreso de las concentraciones de xilosa y xilobiosa generadas durante la hidrólisis de xilano de haya por Cellic HTec2.

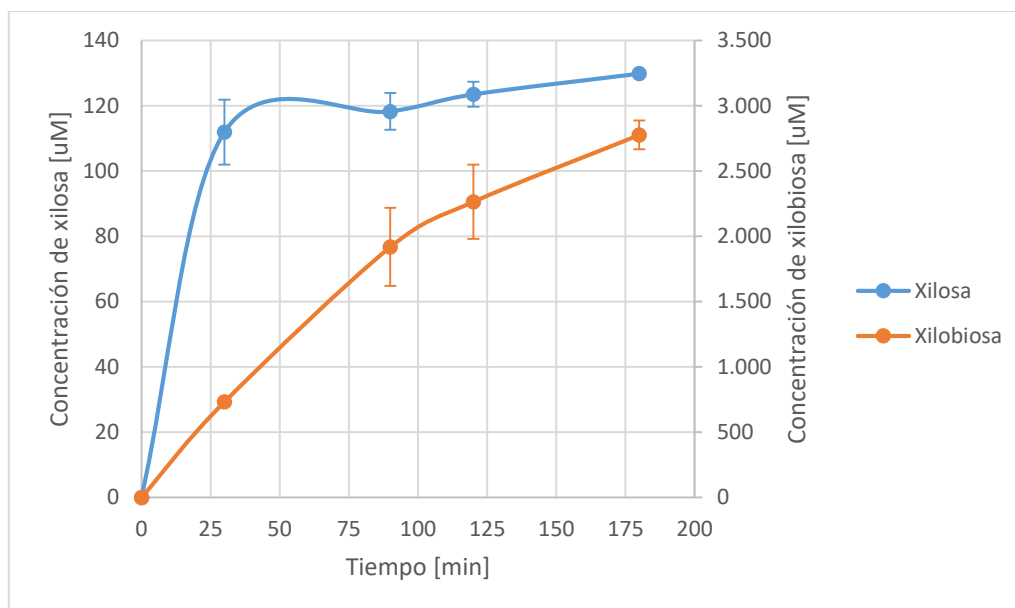


Figura 20: Curva de progreso de xilosa y xilobiosa para Cellic HTec2 1 [ug/ml] y xilano de haya 7,5 [mg/ml].

Las curvas de progreso muestran que la producción de xilobiosa a lo largo de la reacción, es aproximadamente 16 veces mayor que la de xilosa. Además, se estimó que la hidrólisis de xilano por Cellic HTec2, alcanza rendimientos de xilosa del 0,3% y de xilobiosa del 10,5% a los 180 [min] de reacción. Lo anterior, sugiere que el proceso posee una mayor tendencia a la producción de xilobiosa, sin embargo, debido a que no se alcanzó el estado estacionario dentro de las 4 [h], no es posible realizar con certeza tal afirmación.

Por otra parte, debido a que el sistema no alcanzó el estado estacionario, se decidió no incluir estos datos dentro del modelo matemático, ya que no representarían de forma íntegra el proceso de producción de xilosa y xilobiosa. Se sugiere para experimentos futuros, seguir la catálisis por un periodo de 48 – 72 [h], para establecer el rendimiento final de ambos productos. A pesar de lo anteriormente mencionado, este experimento entregó indicios importantes sobre el comportamiento de la reacción de hidrólisis enzimática de xilano, permitiendo explicar fenómenos como la inexistencia de inhibición por producto terminal.

La cuantificación fue realizada por medio de una columna Aminex HPX–87H, la cual se encuentra indicada únicamente para la separación de monosacáridos. Lo anterior, revela que la concentración de xilobiosa estimada podría encontrarse sub o sobreestimada, sumando otro motivo por el cual, estos datos no fueron ser incluidos en la modelación. Se recomienda para próximos estudios, la utilización de una columna Aminex HPX–42A, la que permite la determinación de mono, di y oligosacáridos, con una buena capacidad de resolución hasta moléculas con un grado de polimerización igual a 6 [10]. Además, en caso de contarse con los estándares correspondientes, se sugiere realizar la cuantificación de la mayor cantidad de xilo-oligosacáridos posibles, para conocer en profundidad la dinámica del sistema.

En relación a las magnitudes de los valores estimados, es posible afirmar que estos se encuentran dentro de lo esperado, ya que un estudio realizado para el mismo tipo de sustrato, pero para la enzima recombinante GtXyn10A, proveniente del hongo de la pudrición *Gloeophyllum trabeum*, determinó que los rendimientos de xilosa y xilobiosa eran iguales al 0,33% y 11,77%, respectivamente. La cuantificación se realizó por HPLC para idénticas concentraciones de enzima y sustrato que las utilizadas en este Trabajo de Memoria de Título, no obstante, la toma de muestra fue realizada a las 4 [h] de reacción [36].

El detalle de los resultados obtenidos se presenta en el Anexo 8.13.

4.7. Modelación de la hidrólisis de xilano por Cellic HTec2

4.7.1. Determinación de los parámetros desconocidos del sistema

4.7.1.1. Minimización del error cuadrático medio

Para caracterizar el proceso de hidrólisis enzimática de xilano, se debieron determinar los parámetros desconocidos del sistema, presentados en la Sección 3.3.2.5. La estimación se realizó mediante la implementación de un modelo del proceso de hidrólisis enzimática, en el software Matlab. En este, se efectuó un ajuste de los parámetros desconocidos mediante la minimización del error cuadrático medio (MSE) entre los datos experimentales, correspondiente a la curva de progreso de azúcares, y los resultados de la modelación. La ecuación 12 presentada en la Sección 3.3.3 describe la estructura del MSE implementado.

La Figura 21 presenta la curva de progreso de la concentración de azúcares reductores obtenida tras la aplicación del algoritmo de optimización. Por otra parte, la Tabla 7 enseña los coeficientes de correlación y de determinación entre los datos experimentales y los datos simulados. Estos revelan que los valores otorgados por el modelo matemático son fieles a los datos obtenidos de forma experimental.

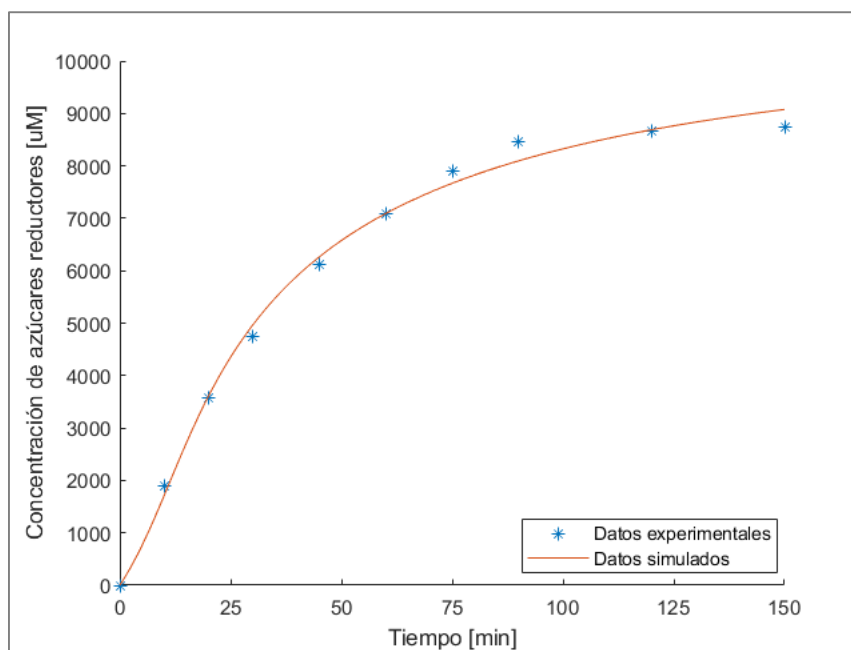


Figura 21: Curva de progreso de la concentración de azúcares reductores generados por la hidrólisis de xilano de haya mediante el preparado enzimático Cellic HTec2.

Tabla 7: Coeficiente de correlación y de determinación entre datos experimentales y simulados.

Coeficiente de correlación (ρ)	0,9975
Coeficiente de determinación (R^2)	0,9940
Coeficiente de determinación ajustado (R^2 ajustado)	0,9910

Además, desde la Figura 21 se observa que la curva de progreso simulada aún posee tendencia al crecimiento a los 150 [min] de reacción, mientras que la curva de progreso experimental, presenta una disminución importante en su pendiente, lo que indicaría la proximidad del estado estacionario y por tanto, sugiere que la producción de azúcares reductores no debería aumentar de forma considerable en lo que resta de reacción. Adicionalmente, al prologar la simulación hasta los 1.000 [min] de reacción, se visualiza un incremento en la concentración de azúcares reductores del 13,1%, en relación a la concentración obtenida a los 150 [min]. Lo expuesto anteriormente, sugiere que el modelo implementado sobreestima la cantidad de producto generado, al ser ajustado por medio de datos experimentales que, al no haber alcanzado el estado estacionario, no permiten establecer la dinámica completa de la reacción. Por tanto, para estudios posteriores, se propone incrementar el tiempo de medición experimental, a fin de alcanzar el estado estacionario y mejorar así la respuesta del modelo matemático.

Por otra parte, como se mencionó en la Sección 0, el ajuste de parámetros se realizó en función de la concentración de azúcares reductores generados durante la reacción. Por este motivo, la curva de progreso de azúcares reductores simulada corresponde a la suma de los xilo-oligosacáridos con largo de cadena entre 1 y 11 (ecuación 2), los que según estudios previos serían las moléculas que el método DNS es capaz de detectar

[13]. Si bien el modelo fue diseñado para responder a la dinámica temporal de todas las especies presentes en la mezcla de reacción (Sección 3.3.2.4), la carencia de datos para cada especie, restringió la respuesta de la simulación a la determinación de los parámetros cinéticos en fase sólida, las constantes de adsorción y desorción y las curvas de generación de productos en fase líquida y sólida (ver Figura 27).

Asimismo, se debe tener en consideración que al no contarse con datos experimentales ni referencias bibliográficas que indicaran la estequiometría de cada una de las reacciones de despolimerización, se supuso que los xilo-oligosacáridos en fase líquida y los polímeros en fase sólida, se consumen con igual estequiometría para cada uno de sus productos, lo que con bastante seguridad no es cierto, en base a los resultados obtenidos por HPLC, presentados en la Sección 4.6. Lo anterior, indica nuevamente que, si bien el modelo simula fielmente el proceso de forma global, no permite establecer correctamente las dinámicas temporales de los productos presentes en la solución, permitiendo visualizar la forma de las curvas, pero no las magnitudes de las concentraciones de cada especie. Sin embargo, lo anterior podría solucionarse generando curvas de progreso para la mayor cantidad de xilo-oligosacáridos posibles. Esto podría realizarse, por ejemplo, mediante un equipo HPLC a través de una columna Aminex HPX-42A, la cual cuantifica con buena resolución xilo-oligosacáridos de largo de cadena hasta 6, o por cromatografía de intercambio aniónico de alto rendimiento con detección amperométrica pulsada (HPAEC-PAD), utilizando columnas del tipo PA1, PA100 o PA200, las que según se ha reportado, permiten la cuantificación de moléculas con grado de polimerización de hasta 30 [10], [26]. La aplicación de este procedimiento podría permitir la implementación de un modelo que incluya el ajuste de parámetros de los coeficientes estequiométricos y, por ende, la simulación de las dinámicas temporales de cada una de las 250 especies de producto presentes en solución.

4.7.1.2. *Parámetros cinéticos de la hidrólisis de xilano en fase sólida por Cellic HTec2*

Mediante el ajuste de parámetros implementado y las ecuaciones 7 y 8, se determinaron los parámetros cinéticos de la hidrólisis de xilano en fase sólida por Cellic Htec2. Los resultados obtenidos se detallan en la Tabla 8.

Tabla 8: Parámetros cinéticos de Michaelis-Menten para la fase sólida. ERX: equivalentes reductores de xilosa.

Parámetro	Valor parámetro	Constante	Valor constante
α	12,878	$K_{M1,solid} [uM_{ERX}]$	180.380
β	14,746	$K_{1,solid} [1/s]$	2.653,5

En relación a la magnitud de la constante catalítica obtenida para la fase sólida ($K_{1,solid}$), se determinó que esta es aproximadamente 14,7 veces mayor que la constante catalítica de la fase líquida ($K_{1,liq}$) obtenida de forma experimental. Lo anterior, se puede evidenciar en la Figura 22, Figura 23, Figura 24 y Figura 25, las cuales señalan que los polímeros

en fase sólida con largos de cadena entre 75 y 250 se consumen dentro de los primeros 50 [min] de reacción, mientras que los xilo-oligosacáridos en fase líquida tardan hasta 1.000 [min].

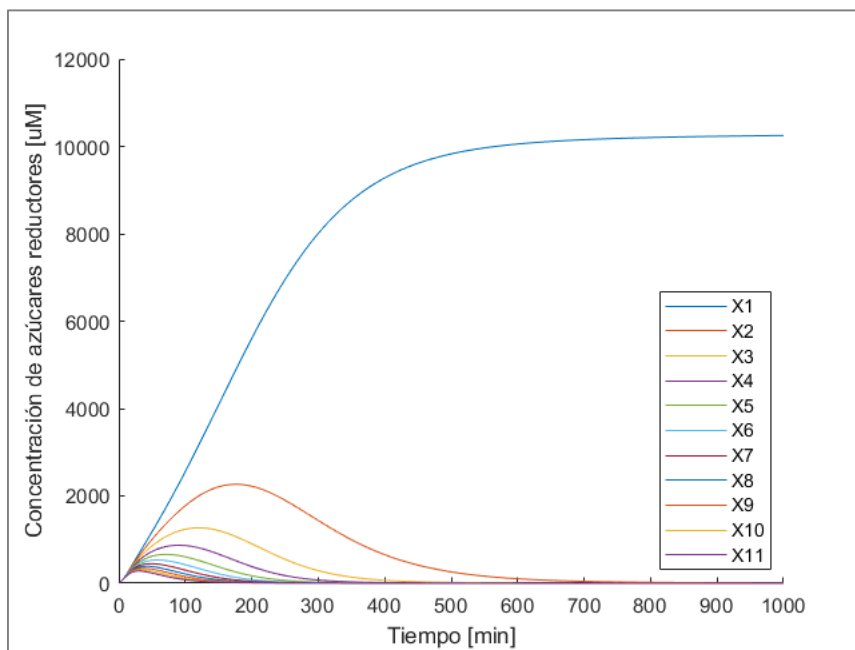


Figura 22: Simulación de las curvas de progreso de producto en fase líquida.

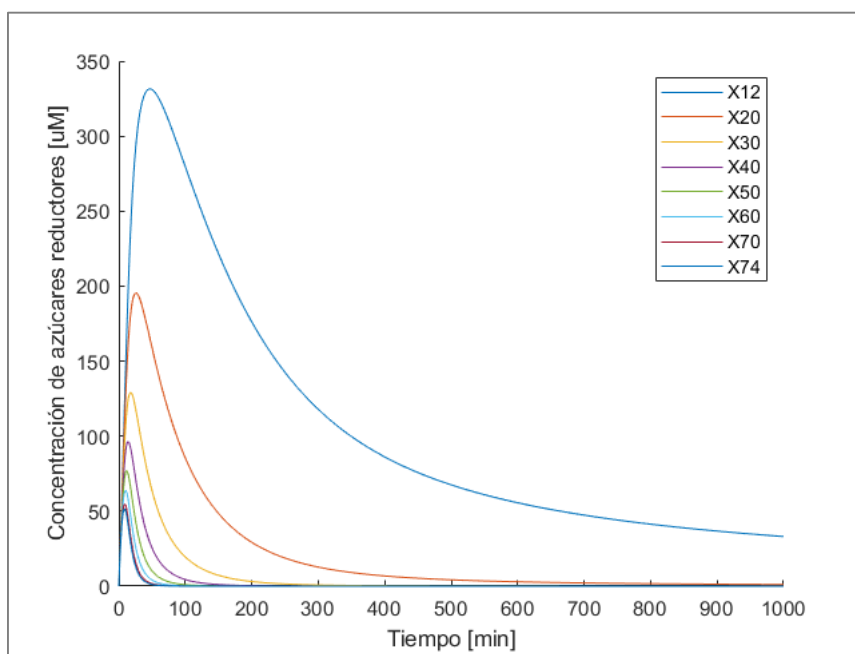


Figura 23: Simulación de las curvas de progreso de producto en fase sólida: X12 - X74.

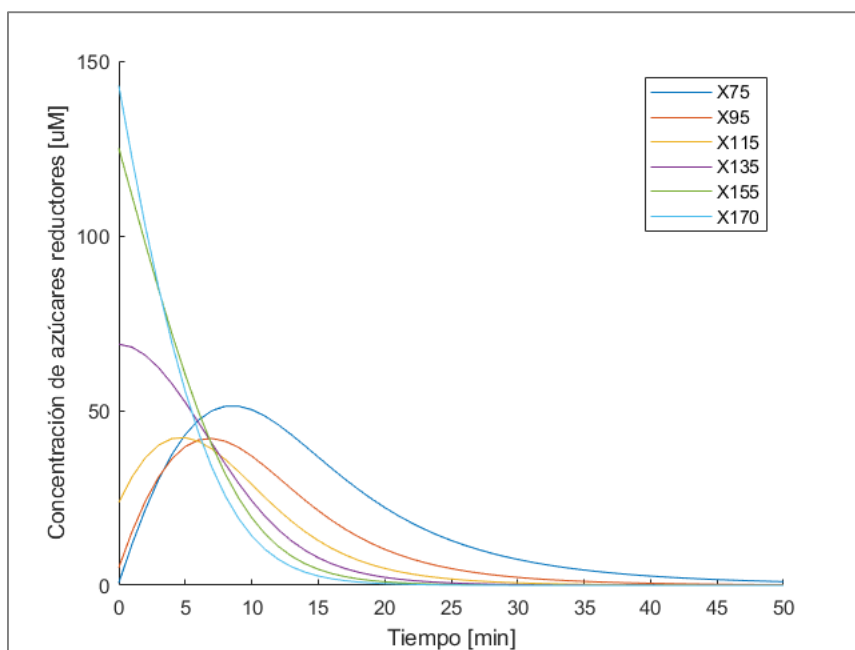


Figura 24: Simulación de las curvas de progreso de producto en fase sólida: X75 - X170.

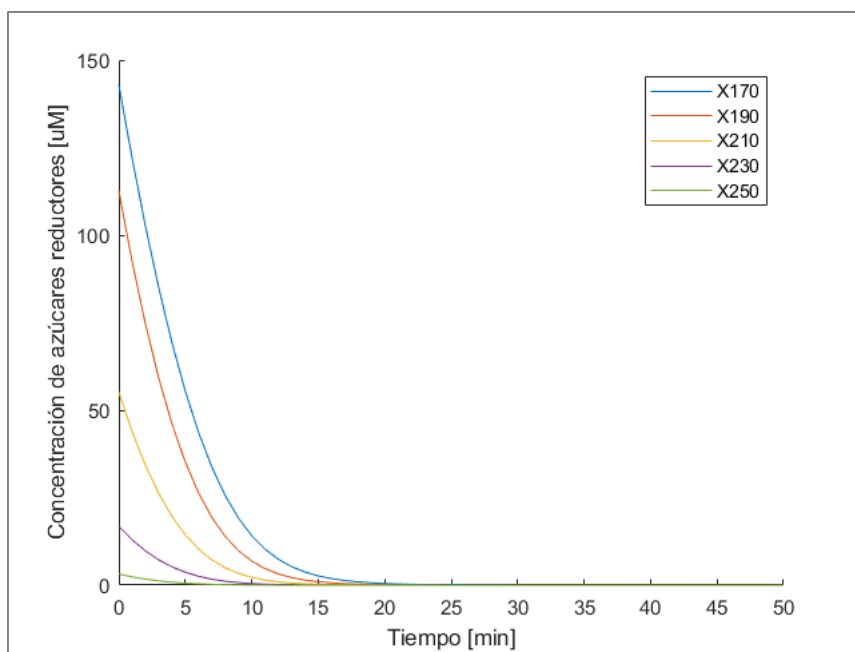


Figura 25: Simulación de las curvas de progreso de producto en fase sólida: X170-X250

Por otra parte, la constante catalítica de Michaelis-Menten para la fase sólida ($K_{M1,solid}$), se determinó que esta posee un valor 12,9 veces mayor que la constante catalítica para la fase líquida de la reacción ($K_{M1,liq}$), alcanzando un valor de 27,1 [mg/ml]. Además, para analizar el impacto que poseen en el sistema las magnitudes de los parámetros estimados, se calculó la constante de especificidad para la fase sólida ($K_{1,solid}/K_{M1,solid}$), la cual entregó un valor de $2,202 \cdot 10^6$ [1/M·s], siendo 14,5% veces mayor que el determinado para la fase líquida, es decir, la enzima endo-1,4- β -xilanasas posee una eficiencia catalítica levemente mayor para la fase sólida.

Finalmente, las constantes estimadas se pueden comparar con un estudio realizado por Dutta et al. (2015) [13], [52]. En ese estudio se determinó una velocidad máxima de reacción para la fase sólida ($V_{\text{máx,sólido}}$) es de 0,0191 [mg/ml/min], es decir, 19,1 veces menos que el obtenido en este Trabajo de Memoria de Título. Lo anterior, sugiere que el proceso estudiado por Dutta posee una tasa catalítica dentro de la fase sólida más baja que la visualizada en el presente estudio. En efecto, los gráficos proporcionados por Dutta señalan que los polímeros en fase sólida se consumen durante los primeros 1.000 [min] de reacción, mientras que en este Trabajo de Memoria de Título las especies en fase sólida se consumen mayoritariamente antes de los 50 [min] de reacción.

4.7.1.3. *Parámetros de adsorción enzimática de la hidrólisis de xilano por Cellic HTec2*

Además, por medio del ajuste de parámetros implementado y las ecuaciones 9 y 10, se determinó la constante de adsorción (K_{ads}) y la constante desorción (K_{des}) de Cellic HTec2 fuera del equilibrio. Los resultados obtenidos se detallan en la Tabla 9.

Tabla 9: *Parámetros de adsorción enzimática fuera del equilibrio.*

Parámetro	Valor parámetro	Constante	Valor constante
γ	32,428	K_{ads} [1/uM·min]	23,978
		K_{des} [1/min]	32,428

Asimismo, la Figura 26 presenta la dinámica temporal de la concentración de enzima en fase sólida. En esta, se puede visualizar un crecimiento acelerado dentro del primer minuto de reacción. Este fenómeno era previsible, debido a que durante los primeros momentos de la reacción, el proceso de adsorción predomina fuertemente por sobre el proceso de desorción.

Por otra parte, desde la Figura 26 se visualiza que la concentración máxima de enzima en fase sólida se alcanza a los 15 [min] de reacción. Este hecho, calza con el agotamiento de los polímeros con largo de cadena entre 170 y 250, correspondientes a una fracción de la concentración inicial de xilano (Sección 3.3.2.3). Posterior, al *peak* antes mencionado, comenzó a decaer la concentración de enzima en fase sólida, lo que indica que la reacción se está desplazando desde la fase sólida hacia la fase líquida.

Finalmente, la adsorción máxima de Cellic HTec2 en la superficie del xilano insoluble, correspondió sólo a un 17,3% de la carga enzimática entregada al sistema. Lo anterior, puede explicarse por la falta de agitación al sistema, lo que disminuye el proceso de transferencia de masa desde la fase líquida a la fase sólida y también, por la presencia de grupos sustituyentes y/o cadenas laterales dentro de la estructura del xilano, los cuales realizan impedimento estérico [10], [53].

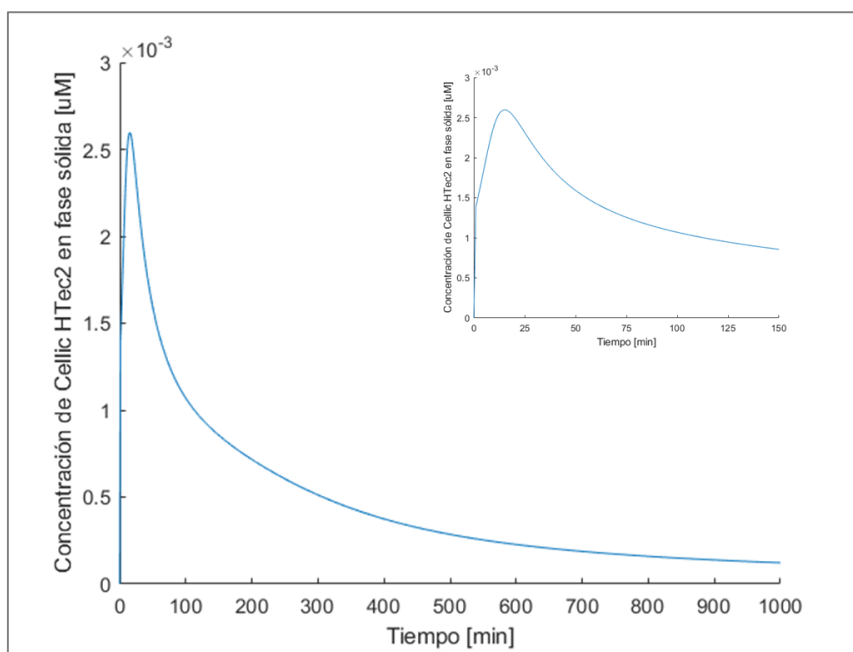


Figura 26: Dinámica temporal de la concentración de Cellic HTec en la fase sólida de la reacción.

4.7.1.4. Análisis del rendimiento de la hidrólisis de xilano por Cellic HTec2

Para caracterizar íntegramente la hidrólisis de xilano por Cellic HTec2, es necesario establecer el rendimiento de la reacción. En la Sección 3.2.5 se indicó que el rendimiento de la catálisis alcanzaba el 17,6% a los 150 [min] de reacción, sin embargo, para ese instante de tiempo, la reacción enzimática aún no ha finalizado, por lo que el valor estimado no corresponde al rendimiento global de azúcares reductores.

La cinética de Michelis-Menten, modelo en el que se basa este Trabajo de Memoria de Título, no considera el rendimiento de las reacciones en su estructura. Por este motivo, dentro del presente estudio se incluyó un parámetro que cuantificara la concentración de xilano realmente accesible al ataque enzimático (ecuación 11). De esta forma, según lo presentado en la Tabla 10, sólo un 20,8% del xilano entregado a la reacción es catalizado por la endo-1,4-β-xilanasas de Cellic HTec2

Sin embargo, la implementación de este parámetro, como se visualiza en la Figura 27, indica que la totalidad de la concentración de sustrato accesible ($C_{s,accesible}$) (ecuación 10) es catalizada por la enzima, lo cual en términos prácticos no es plausible. Por este motivo, se sugiere para futuras investigaciones, diseñar un parámetro que considere dentro de su estructura las distintas variables que determinan el rendimiento de la reacción, tales como la accesibilidad del sustrato, la eficiencia enzimática, entre otras.

Tabla 10: Parámetro de accesibilidad del sustrato.

Parámetro	Valor parámetro	Constante	Valor constante
x	0,208	$C_{s,accesible}$ [mg/ml]	1,560

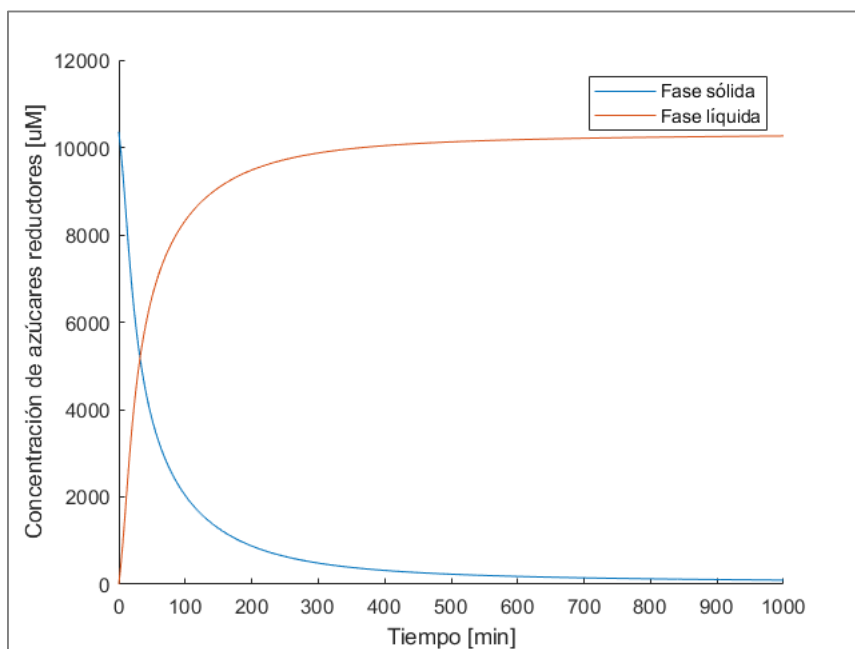


Figura 27: Simulación de la dinámica temporal de la generación de producto dentro de la fase líquida y la fase sólida.

4.7.2. Validación estadística de los parámetros determinados

A continuación, se realizó un análisis estadístico para cada uno de los parámetros ajustados, con el objetivo de validar su magnitud y su significancia dentro del sistema. El resultado de este estudio se presenta en la Tabla 11.

Tabla 11: Análisis estadístico para los parámetros ajustados por el modelo cinético.

Parámetro	Valor parámetro	Intervalo de confianza del 95%		p – value
		Límite inferior	Límite superior	
α	12,878	12,839	12,916	$2,220 \cdot 10^{-16}$
β	14,746	14,707	14,784	0
γ	32,428	32,389	32,466	0
\times	0,208	0,169	0,247	$1,168 \cdot 10^{-5}$

En primer lugar, se construyeron intervalos de confianza al 95%, los cuales indicaron que todos los parámetros determinados se encuentran dentro del rango esperado, coincidiendo, además con el promedio del límite superior e inferior del intervalo, lo que otorga fiabilidad a los valores obtenidos.

Enseguida, se estudió la significancia estadística de los parámetros ($p < 0,05$). Los resultados de la prueba, indicaron que todos los términos son significativos para el sistema en estudio, al poseer un valor de *p – value* por debajo del 5%.

4.7.3. Sensibilidad del modelo frente a perturbaciones en los parámetros

Finalmente, se realizó un estudio sobre la sensibilidad que posee el modelo cinético frente a los parámetros ajustados, variándose cada uno de ellos en un $\pm 15\%$ de forma individual.

Primero, se evaluó el parámetro α , el que se relaciona directamente con la $K_{M1,solid}$, por lo que al incrementar su valor, también aumenta la magnitud de la constante de Michaelis-Menten para la fase sólida. Lo anterior, implicó una disminución en la afinidad de la enzima por el sustrato en fase sólida y, por tanto, una reducción en la concentración de azúcares reductores generados por la reacción enzimática. Sin embargo, incrementar α en un 15%, generó una reducción de la concentración de azúcares reductores a los 150 [min] de reacción de tan sólo un 1,7% lo que sugiere que el sistema posee una baja sensibilidad a este parámetro.

Por otro lado, se analizó la influencia del parámetro β , el cual es directamente proporcional a la $K_{1,solid}$. De esta forma, al incrementar su valor en un 15%, se generó un aceleramiento de la reacción de hidrólisis enzimática, debido a que el sistema en esas condiciones es capaz de hidrolizar un mayor número de moléculas de xilano por unidad de tiempo. No obstante, nuevamente se evidenció una baja sensibilidad del sistema al parámetro, ya que la perturbación realizada disminuyó tan sólo en un 1,8% la concentración de azúcares reductores generados a los 150 [min] de reacción.

En relación al parámetro γ , se determinó que una variación del $\pm 15\%$ en su valor, no genera cambios evidentes en el sistema, lo que podría deberse a su carácter compensatorio. Este parámetro se encarga mayoritariamente de mantener la relación planteada por la constante de equilibrio de adsorción presentada en la 3.3.2.5. Se testeó, además, una disminución del 50% en la magnitud de γ , obteniéndose un aumento del 0,001% en la concentración de azúcares reductores a los 150 [min] de reacción.

Finalmente, se estudió el parámetro X , el que forma parte de las condiciones iniciales del sistema, por lo cual posee mayor impacto en el comportamiento de la simulación. Una variación positiva del 15% en su valor, genera igual incremento en la concentración inicial de xilano disponible, provocando un aumento del 13% en la cantidad de azúcares reductores a los 150 [min] de reacción.

Capítulo 5

5. Conclusiones

En relación a la caracterización de Cellic HTec2 se obtuvo una actividad específica de 129,3 [U/mg] y se determinó que el preparado enzimático se satura a partir de una concentración de xilano de haya de 5 [mg/ml] y alcanza la saturación total con 10 [mg/ml]. Estos resultados permitieron definir las concentraciones de enzima y sustrato a modelar durante este estudio, las cuales corresponden a 1 [ug/ml] y 7,5 [mg/ml], respectivamente. Por otra parte, el patrón electroforético indicó 2 especies predominantes dentro del preparado, por lo que para efectos de este estudio se asumió que la enzima endo-1,4-β-xilanasa corresponde a la banda con mayor representatividad dentro del carril, equivalente a 65,6 [kDa]. Por último, el análisis cromatográfico permite concluir que la enzima endo-1,4-β-xilanasa no puede ser separada de la enzima con actividad celulasa mediante intercambio aniónico.

La determinación de los parámetros cinéticos de Michaelis-Menten se realizó en dos etapas. Los parámetros cinéticos de la fase líquida se determinaron de forma experimental, obteniéndose una constante de Michaelis-Menten ($K_{M1,liq}$) de 93,6 [uM xilano de haya] y una constante catalítica ($K_{1,liq}$) de 179,9 [1/s]. Por otra parte, los parámetros de la fase sólida se obtuvieron mediante el modelo cinético implementado, encontrándose valores para la constante de Michaelis-Menten ($K_{M1,solid}$) y la constante catalítica ($K_{1,solid}$) iguales a 1.204,7 [uM xilano de haya] y 2.653,5 [1/s], correspondientemente. Adicionalmente, se estimó la constante de especificidad (K_1/K_M) para ambas fases, calculándose valores de $1,923 \cdot 10^6$ [1/M·s] y $2,202 \cdot 10^6$ [1/M·s] para la fase líquida y sólida, respectivamente. Este resultado permite concluir que la endo-1,4-β-xilanasa tiene una eficiencia catalítica 14,5% veces mayor para la fase sólida y que posee un rendimiento promedio al compararse con el universo de enzimas existentes.

El estudio de inhibición por producto terminal determinó que no existe diferencia significativa entre las curvas control y las curvas con adición de xilosa entre 0,2 y 1 [mg/ml], lo que permite concluir que la xilosa no actúa como inhibidor de la hidrólisis enzimática para las concentraciones de sustrato y enzima trabajadas en esta investigación, y por tanto, este fenómeno no es considerado dentro del modelo cinético implementado. Además, la bibliografía sugiere la existencia de inhibición por xilobiosa, sin embargo, el experimento no puede ser replicado para esta molécula. Por ende, en base a los resultados obtenidos para la xilosa, se asumió para el modelo matemático que tampoco existe inhibición por xilobiosa. Por último, se debe tener en consideración, que la aplicación de elevadas concentraciones de enzima y/o sustrato, puede provocar una acumulación de producto terminal dentro del sistema, promoviendo el efecto inhibitorio de la molécula. Por tanto, se sugiere para este tipo de proceso realizar siempre un análisis de inhibición por producto de forma de escoger las cargas iniciales de sustrato y enzima, que minimizan o anulan este fenómeno.

La determinación de los parámetros de adsorción de Cellic HTec2 sobre xilano de haya se realizó por medio de dos metodologías. En primer lugar, mediante la construcción experimental de la isoterma de Langmuir se obtuvo una adsorción enzimática máxima ($\Omega_{m\acute{a}x}$) de 17,4 [uM Cellic HTec2/mM sustrato] y una constante de equilibrio de adsorción de (K_{eq}) de 0,739 [1/uM Cellic HTec2]. Posteriormente, a partir del modelo cinético realizado, se determinaron las constantes de adsorción (K_{ads}) y desorción (K_{des}), las cuales poseen valores de 23,9 [1/uM·min] y 32,4 [1/min], respectivamente.

Se efectuó también, una cuantificación de la producción de xilosa y xilobiosa por la hidrólisis enzimática de xilano, obteniéndose un rendimiento a los 180 [min] de reacción, del 0,3% y 10,5%, respectivamente. En relación a la baja generación de xilosa por parte de Cellic HTec2 se concluye que se debe a una baja o nula actividad β -xilosidasas, por lo cual este conglomerado enzimático posee potencialidades para la producción de xilo-oligosacáridos.

Además, se realizó una curva de progreso experimental de la reacción de hidrólisis enzimática de xilano, obteniéndose un rendimiento de azúcares reductores del 17,6% a los 150 [min] de reacción, instante en el que el sistema se encuentra próximo al estado estacionario. Se concluye que este bajo rendimiento puede deberse a múltiples variables, tales como la presencia de grupos sustituyentes en la estructura del xilano, la posible recalcitrancia de una fracción del xilano, la preparación del sustrato con excesiva antelación, la desactivación natural de la enzima durante la hidrólisis y, por último, que el sistema no fue agitado.

La curva de progreso de azúcares reductores construida también se utilizó para el ajuste de parámetros del modelo cinético, sin embargo, ya que esta no alcanzó el estado estacionario, no permite establecer la dinámica completa de la reacción, por lo que se concluye que la concentración de azúcares reductores generada por la simulación se encuentra sobreestimada.

Por otra parte, el modelo matemático planteado para la hidrólisis enzimática de xilano por Cellic HTec2, supuso que la reacción obedece a la cinética de Michaelis-Menten y que existen 250 xilo-oligómeros distribuidos entre la fase líquida y sólida. En relación a los resultados obtenidos, se concluye que la simulación determina satisfactoriamente los parámetros ajustados y las curvas de generación de azúcares reductores y de consumo de xilo-oligómeros en fase sólida. Sin embargo, la carencia de datos experimentales y/o teóricos para cada una de las especies en solución, no permitió establecer la dinámica temporal de cada producto de reacción. Los valores de los parámetros fueron validados por medio de un análisis estadístico, el cual determinó que todos son estadísticamente significativos para el sistema.

Asimismo, al no contarse con datos que indicaran la estequiometría de cada una de las reacciones de despolimerización, se debió suponer que los xilo-oligómeros en fase líquida y sólida, se consumen con igual estequiometría para cada uno de sus productos, lo cual en base a los resultados de la cuantificación de la producción de xilosa y xilobiosa por HPLC no es cierto. De esta forma, se confirma nuevamente que el modelo no establece correctamente las dinámicas temporales de la concentración de los productos.

En vista de que el modelo cinético de Michaelis-Menten no considera un término de rendimiento, se debió incluir dentro del sistema un ponderador que cuantificara la concentración de sustrato susceptible al ataque enzimático por parte Cellic HTec2. De esta forma, se determinó que sólo un 20,8% del xilano entregado a la reacción es catalizado. Sin embargo, se concluye que este valor se encuentra subestimado, ya que se está responsabilizando únicamente a la accesibilidad del sustrato de las bajas en el rendimiento de reacción.

Se realizó un análisis sobre la sensibilidad que posee el modelo frente a los parámetros ajustados. De este estudio se concluye que el ponderador de accesibilidad del sustrato (X) es el parámetro que genera una mayor variación en la respuesta de la simulación. Una variación positiva de su magnitud del 15% se traduce en un incremento en la concentración de azúcares reductores del 13% a los 150 [min] de reacción.

Finalmente, se concluye que la investigación realizada caracteriza satisfactoriamente la hidrólisis de xilano por la enzima con actividad endo-1,4- β -xilanasas de Cellic HTec2. En consecuencia, este estudio entrega antecedentes significativos para la implementación y estandarización de la producción industrial de prebióticos xilo-oligosacáridos. Se estima que un mejoramiento del modelo propuesto permitiría optimizar el proceso de producción de xilo-oligosacáridos con grado de polimerización entre 2 y 6.

Capítulo 6

6. Proyecciones futuras

En primer lugar, se sugiere corroborar mediante una zimografía que el peso molecular de la enzima endo-1,4- β -xilanasas de Cellic HTec2 determinado en este estudio sea el correcto. Además, se recomienda separar por medio de una cromatografía de intercambio catiónico y/o hidrofobicidad la endo-1,4- β -xilanasas de las distintas proteínas que componen Cellic HTec2.

Por otra parte, la bibliografía también sugiere la existencia de inhibición por xilobiosa. Por este motivo, se recomienda repetir la experiencia realizada para la molécula de xilosa.

Además, se recomienda analizar el comportamiento de la adsorción de Cellic HTec2 sobre distintos tipos de xilano, para así determinar si los parámetros encontrados en este estudio favorecen positiva o negativamente la generación de xilo-oligosacáridos.

En relación a las curvas de progreso, se propone incrementar el tiempo de medición experimental con el objetivo de alcanzar el estado estacionario, mejorando así la respuesta de la simulación de la hidrólisis enzimática de xilano.

Se concluyó que el modelo no establece correctamente las dinámicas temporales de la concentración de cada uno de los productos de reacción. Por tanto, se sugiere para experimentos futuros cuantificar mediante HPLC o HPAEC-PAD la producción de un mayor número xilo-oligosacáridos. Se estima que la aplicación de este procedimiento permitiría simular las dinámicas temporales de un mayor número especies.

Por último, se recomienda para futuras investigaciones, diseñar un parámetro de rendimiento que considere dentro de su estructura la accesibilidad del sustrato al ataque enzimático, la eficiencia de la enzima y otros fenómenos que afecten el rendimiento de la reacción.

Capítulo 7

7. Bibliografía

- [1] C. Amorim, S. C. Silvério, K. L. J. Prather, and L. R. Rodrigues, “From lignocellulosic residues to market: Production and commercial potential of xylooligosaccharides,” *Biotechnol. Adv.*, vol. 37, no. 7, 2019, doi: <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2019.05.003>.
- [2] G. R. Gibson *et al.*, “Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics,” *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.*, vol. 14, no. 8, pp. 491–502, 2017, doi: [10.1038/nrgastro.2017.75](https://doi.org/10.1038/nrgastro.2017.75).
- [3] A. K. Samanta *et al.*, “Xylooligosaccharides as prebiotics from agricultural by-products : Production and applications,” *Bioact. Carbohydrates Diet. Fibre*, vol. 5, no. 1, pp. 62–71, 2015, doi: [10.1016/j.bcdf.2014.12.003](https://doi.org/10.1016/j.bcdf.2014.12.003).
- [4] M. J. Vazquez, J. L. Alonso, H. Dominguez, and J. C. Parajó, “Xylooligosaccharides : manufacture and Xylooligo-saccharides: manufacture and applications,” vol. 2244, no. November, pp. 387–393, 2015, doi: [10.1016/S0924-2244\(01\)00031-0](https://doi.org/10.1016/S0924-2244(01)00031-0).
- [5] A. A. Aachary and S. G. Prapulla, “Xylooligosaccharides (XOS) as an Emerging Prebiotic: Microbial Synthesis, Utilization, Structural Characterization, Bioactive Properties, and Applications,” *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.*, vol. 10, no. 1, pp. 2–16, Jan. 2011, doi: [10.1111/j.1541-4337.2010.00135.x](https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2010.00135.x).
- [6] A. A. Aachary and S. G. Prapulla, “Value addition to corncob: Production and characterization of xylooligosaccharides from alkali pretreated lignin-saccharide complex using *Aspergillus oryzae* MTCC 5154,” *Bioresour. Technol.*, vol. 100, no. 2, pp. 991–995, 2009, doi: [10.1016/j.biortech.2008.06.050](https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.06.050).
- [7] A. Flávia, A. Carvalho, P. De Oliva, D. Fernandes, and G. Maria, “Xylo-oligosaccharides from lignocellulosic materials : Chemical structure, health benefits and production by chemical and enzymatic hydrolysis,” *FRIN*, vol. 51, no. 1, pp. 75–85, 2013, doi: [10.1016/j.foodres.2012.11.021](https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.11.021).
- [8] C. Ruiz, “RASTROJOS DE CULTIVOS Y RESIDUOS FORESTALES,” 2015.
- [9] D. O. Otieno and B. K. Ahring, “The potential for oligosaccharide production from the hemicellulose fraction of biomasses through pretreatment processes: Xylooligosaccharides (XOS), arabinooligosaccharides (AOS), and mannoooligosaccharides (MOS),” *Carbohydr. Res.*, vol. 360, pp. 84–92, 2012, doi: [10.1016/j.carres.2012.07.017](https://doi.org/10.1016/j.carres.2012.07.017).
- [10] L. Santibañez, C. Henríquez, R. Corro-Tejeda, S. Bernal, B. Armijo, and O. Salazar, “Xylooligosaccharides from lignocellulosic biomass : A comprehensive review,” *Carbohydr. Polym.*, vol. 251, no. July 2020, 2021.
- [11] B. C. Saha, “Hemicellulose bioconversion,” *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 30,

no. 5, pp. 279–291, 2003.

- [12] M. T. Holtzapple, “HEMICELLULOSES,” *Sci. York*, no. 2003, 2003, doi: 10.1006/rwos.2001.0047.
- [13] S. Kanti and S. Chakraborty, “Kinetic analysis of two-phase enzymatic hydrolysis of hemicellulose of xylan type,” *Bioresour. Technol.*, vol. 198, pp. 642–650, 2015, doi: 10.1016/j.biortech.2015.09.066.
- [14] A. Ebringerova, “Structural Diversity and Application Potential of Hemicelluloses,” no. 333, pp. 1–12, 2006, doi: 10.1002/masy.200551401.
- [15] A. Ebringerová and H. Thomas, “Hemicellulose,” no. August, pp. 1–67, 2005.
- [16] S. M. Finegold *et al.*, “Xylooligosaccharide increases bifidobacteria but not lactobacilli in human gut microbiota,” *Food Funct.*, vol. 5, no. 3, pp. 436–445, 2014, doi: 10.1039/c3fo60348b.
- [17] P. Gullón *et al.*, “Assessment on the fermentability of xylooligosaccharides from rice husks,” *BioResources*, vol. 6, no. 3, pp. 3096–3114, 2011, doi: 10.13039/501100004837.
- [18] M. A. Kabel, L. Kortenoeven, H. A. Schols, and A. G. J. Voragen, “In vitro fermentability of differently substituted xylo-oligosaccharides,” *J. Agric. Food Chem.*, vol. 50, no. 21, pp. 6205–6210, 2002, doi: 10.1021/jf020220r.
- [19] A. Moure, P. Gullón, H. Domínguez, and J. C. Parajó, “Advances in the manufacture, purification and applications of xylo-oligosaccharides as food additives and nutraceuticals,” *Process Biochem.*, vol. 41, no. 9, pp. 1913–1923, Sep. 2006, doi: 10.1016/j.procbio.2006.05.011.
- [20] O. Akpınar, K. Erdogan, and S. Bostanci, “Production of xylooligosaccharides by controlled acid hydrolysis of lignocellulosic materials,” *Carbohydr. Res.*, vol. 344, no. 5, pp. 660–666, 2009, doi: 10.1016/j.carres.2009.01.015.
- [21] D. Chapla, P. Pandit, and A. Shah, “Production of xylooligosaccharides from corncob xylan by fungal xylanase and their utilization by probiotics,” *Bioresour. Technol.*, vol. 115, pp. 215–221, 2012, doi: 10.1016/j.biortech.2011.10.083.
- [22] P. Poletto, G. N. Pereira, C. R. M. Monteiro, M. A. F. Pereira, S. E. Bordignon, and D. De Oliveira, “Xylooligosaccharides : Transforming the lignocellulosic biomasses into valuable 5-carbon sugar prebiotics,” *Process Biochem.*, vol. 91, no. September 2019, pp. 352–363, 2020, doi: 10.1016/j.procbio.2020.01.005.
- [23] V. Kumar and T. Satyanarayana, “Generation of xylooligosaccharides from microwave irradiated agroresidues using recombinant thermo-alkali-stable endoxylanase of the polyextremophilic bacterium *Bacillus halodurans* expressed in *Pichia pastoris*,” *Bioresour. Technol.*, vol. 179, pp. 382–389, 2015, doi: 10.1016/j.biortech.2014.12.049.
- [24] G. Garrote, H. Domínguez, and J. C. Parajó, “Autohydrolysis of corncob: study of non-isothermal operation for xylooligosaccharide production,” *J. Food Eng.*, vol. 52, no. 3, pp. 211–218, 2002.
- [25] D. Tarasov, M. Leitch, and P. Fatehi, “Lignin – carbohydrate complexes : properties

- , applications , analyses , and methods of extraction : a review,” *Biotechnol. Biofuels*, pp. 1–28, 2018, doi: 10.1186/s13068-018-1262-1.
- [26] Q. Qing, H. Li, R. Kumar, and C. E. Wyman, “Xylooligosaccharides Production, Quantification, and Characterization in Context of Lignocellulosic Biomass Pretreatment,” *Aqueous Pretreat. Plant Biomass Biol. Chem. Convers. to Fuels Chem.*, pp. 391–415, 2013, doi: 10.1002/9780470975831.ch19.
- [27] J. E. Holladay, J. F. White, J. J. Bozell, and D. Johnson, “Top Value-Added Chemicals from Biomass Volume II — Results of Screening for Potential Candidates from Biorefinery Lignin,” vol. II, no. January, 2016.
- [28] H. Chen *et al.*, “A review on the pretreatment of lignocellulose for high-value chemicals,” *Fuel Process. Technol.*, vol. 160, pp. 196–206, 2017, doi: 10.1016/j.fuproc.2016.12.007.
- [29] J. S. Kim, Y. Y. Lee, and T. H. Kim, “A review on alkaline pretreatment technology for bioconversion of lignocellulosic biomass,” *Bioresour. Technol.*, vol. 199, pp. 42–48, 2016, doi: 10.1016/j.biortech.2015.08.085.
- [30] C. de Freitas, E. Carmona, and M. Brienzo, “Xylooligosaccharides production process from lignocellulosic biomass and bioactive effects,” vol. 18, no. October 2018, 2019, doi: 10.1016/j.bcdf.2019.100184.
- [31] A. K. Samanta, N. Jayapal, and A. Devi, “Production and in vitro evaluation of xylooligosaccharides generated from corn cobs,” *Food Bioprod. Process.*, vol. 90, no. 3, pp. 466–474, 2012, doi: 10.1016/j.fbp.2011.11.001.
- [32] S. Saka and H. Bae, *Secondary Xylem for Bioconversion*. Elsevier Inc., 2016.
- [33] F. M. F. M. F. M. Gírio, C. Fonseca, F. Carvalheiro, L. C. L. C. L. C. Duarte, S. Marques, and R. Bogel-Lukasik, “Hemicelluloses for fuel ethanol: A review,” *Bioresour. Technol.*, vol. 101, no. 13, pp. 4775–4800, Jul. 2010, doi: 10.1016/j.biortech.2010.01.088.
- [34] K. Suga, G. van Dedem, and M. Moo-Young, “Degradation of Polysaccharides by Endo and Exo Enzymes: A Theoretical Analysis,” vol. XVII, pp. 433–439, 1975.
- [35] I. Suga and G. Van Dederi, “Enzymatic Breakdown of Water Insoluble Substrates,” vol. XVII, pp. 185–201, 1975.
- [36] O. Salazar, “Comunicación personal.” 2020.
- [37] N. J. Kruger, “The Bradford Method For Protein Quantitation,” pp. 17–24, 2009.
- [38] M. Bailey, P. Biely, and K. Poutanen, “Interlaboratory Testing of Methods for Assay of Xylanase Activity,” vol. 1656, no. December 2017, 1992, doi: 10.1016/0168-1656(92)90074-J.
- [39] S. K. Dutta and S. Chakraborty, “Pore-scale dynamics of enzyme adsorption, swelling and reactive dissolution determine sugar yield in hemicellulose hydrolysis for biofuel production,” *Nat. Publ. Gr.*, no. November, pp. 1–13, 2016, doi: 10.1038/srep38173.
- [40] Y. Zheng, Z. Pan, R. Zhang, and B. M. Jenkins, “Kinetic Modeling for Enzymatic

- Hydrolysis of Pretreated Creeping Wild Ryegrass,” vol. 102, no. 6, pp. 1558–1569, 2009, doi: 10.1002/bit.22197.
- [41] S. Xue *et al.*, “Sugar loss and enzyme inhibition due to oligosaccharide accumulation during high solids - loading enzymatic hydrolysis,” *Biotechnol. Biofuels*, pp. 1–14, 2015, doi: 10.1186/s13068-015-0378-9.
- [42] A. Sant’Ana da Silva, M. Fernandes de Souza, I. Ballesteros, P. Manzanares, M. Ballesteros, and E. Bon, “High-solids content enzymatic hydrolysis of hydrothermally pretreated sugarcane bagasse using a laboratory-made enzyme blend and commercial preparations,” *Process Biochem.*, vol. 51, no. 10, pp. 1561–1567, 2016, doi: 10.1016/j.procbio.2016.07.018.
- [43] C. Pengilly, D. Diedericks, M. Brienzo, and J. F. Görgens, “Enzymatic hydrolysis of steam-pretreated sweet sorghum bagasse by combinations of cellulase and endo-xylanase,” *FUEL*, vol. 154, pp. 352–360, 2015, doi: 10.1016/j.fuel.2015.03.072.
- [44] X. Gao *et al.*, “Comparison of enzymatic reactivity of corn stover solids prepared by dilute acid, AFEX™, and ionic liquid pretreatments,” *Biotechnol. Biofuels*, vol. 7, no. 1, pp. 1–13, 2014, doi: 10.1186/1754-6834-7-71.
- [45] J. Vandooren, N. Geurts, E. Martens, and P. E. Van Den Steen, “Zymography methods for visualizing hydrolytic enzymes,” vol. 10, no. 3, pp. 211–220, 2013, doi: 10.1038/nmeth.2371.
- [46] D. L. Nelson and M. M. Cox, “Lehninger Principles of Biochemistry,” 2017.
- [47] Brenda, “EC 3.2.1.8 - endo-1,4-beta-xylanase.” <https://www.brenda-enzymes.org/enzyme.php?ecno=3.2.1.8>.
- [48] R. Roskoski, B. Ridge, and H. Shoe, *Michaelis-Menten Kinetics*, no. August 2014. Elsevier Inc., 2015.
- [49] Novozymes, “Cellulosic ethanol: Novozymes Cellic® CTec2 and HTec2 - Enzymes for hydrolysis of lignocellulosic,” pp. 1–8.
- [50] Novozymes, “Cellulosic ethanol: Novozymes Cellic® HTec3,” pp. 3–5.
- [51] R. Kumar and C. E. Wyman, “An improved method to directly estimate cellulase adsorption on biomass solids,” vol. 42, pp. 426–433, 2008, doi: 10.1016/j.enzmictec.2007.12.005.
- [52] S. Kanti and S. Chakraborty, “Mixing effects on the kinetics and the dynamics of two-phase enzymatic hydrolysis of hemicellulose for biofuel production,” *Bioresour. Technol.*, vol. 259, no. January, pp. 276–285, 2018, doi: 10.1016/j.biortech.2018.03.042.
- [53] Megazyme, “XYLAN (Beechwood),” no. L, pp. 1–2, [Online]. Available: https://www.megazyme.com/documents/Data_Sheet/P-XYLNBE-10G_DATA.pdf.
- [54] U. Mais, A. R. Esteghlalian, and J. N. Saddler, “Enhancing the Enzymatic Hydrolysis of Cellulosic Materials,” *Appl. Biochem. Biotechnol.*, no. March 2002, pp. 1–9, 2015, doi: 10.1385/ABAB.
- [55] J. J. Lischeske and J. J. Stickel, “Biotechnology for Biofuels A two - phase substrate

model for enzymatic hydrolysis of lignocellulose: application to batch and continuous reactors,” *Biotechnol. Biofuels*, pp. 1–15, 2019, doi: 10.1186/s13068-019-1633-2.

- [56] L. Viikari, A. Kantelinen, J. Buchert, and J. Puls, “Enzymatic accessibility of xylans in lignocellulosic materials,” *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, pp. 124–129, 1994.

Capítulo 8

8. Anexos

8.1. Metodología: equipos y materiales

Los equipos y materiales utilizados en esta investigación se detallan a continuación:

8.1.1. Equipos e implementos

- Termociclador con función gradiente T960, Hangzhou Jingle Scientific Instrument Co.
- Baño seco MultiBlock[®] Heater 2001-1CE, Equilab
- Lector de microplaca Asys UVM-340
- Fotodocumentador Gel Doc EZ, Bio–Rad
- Sonicador SB–5200 DTD, Ningbo Sklon Lab Instrument Co.
- Agitador magnético con placa calefactora, Equilab
- Centrifuga Heal Force[®]
- Sistema de cromatografía Äkta Avant 25
- Equipo para HPLC con detector de índice de refracción (RI), Shimadzu
- Columna Aminex HPX–87H
- Sistema de electroforesis Mini-PROTEAN Tetra Cell, Bio–Rad
- Bomba de vacío
- Micropipetas P10, P20, P100, P200, P1000 y P5000
- Frasco graduado con tapa rosca Duran[®]
- Placa de PCR de 96 pocillos Axygen[®]
- Cinta de sellado para microplacas Axygen[®]
- Microplaca de lectura de 96 pocillos
- Filtros con diámetro de poro 0,22 [uM]
- Jeringa de 3 [ml]
- Tubos Falcon 10 [ml] y 50 [ml]
- Vasos precipitados

8.1.2. Materiales

- Reactivo de Bradford, Protein Assay Reagent Concentrate #5000006, Bio–Rad
- Albúmina de suero bovino, Sigma–Aldrich
- Acetato de sodio anhidro
- Reactivo DNS
- Xilano de haya, P-XYLNBE-10G, Megazyme
- Cellic HTec2, Novozymes
- Xilosa, Sigma–Aldrich
- Acrilamida – Bisacrilamida 29:1 BM-0100, Winkler Ltda. Chile
- Buffer Tris 1,5 [M] pH 8,8 + SDS 0,4%
- Buffer Tris 0,5 [M] pH 6,8 + SDS 0,4%
- Glicerol 40%
- N, N, N', N'-tetrametiletilendiamina (TEMED), N° CAS 110-18-1 Applichem.
- Persulfato de amonio (PSA) 10%, Gibco
- Buffer de carga denaturante 5X
- Buffer de corrida 10X
- Solución de tinción Azul de Coomassie 0,25% p/v
- Solución de destinción MeOH–HAc
- Marcador de peso molecular Blue Prestained Protein Standard, Broad Range (11-250 kDa), New England BioLabs®
- Buffer BisTris-Cl 20 [mM] pH 7,5
- Buffer BisTris-Cl 20 [mM] – NaCl 0,5 [M]
- Resina de cromatografía Cytiva, Q-Sepharose Fast Flow
- Ácido sulfúrico, Merck

8.2. Metodología: cuantificación de proteínas totales por método de Bradford

8.2.1. Curva de calibración: método de Bradford

Se elaboró el reactivo de Bradford según las indicaciones de proveedor. Luego, se prepararon 10 [ml] de una solución patrón de albumina de suero bovino (BSA) a una concentración de 2 [mg/ml] en agua milli-Q, la cual se continuó diluyendo por etapas, hasta alcanzar una concentración de BSA igual a 0,03125 [mg/ml]. El detalle de las diluciones realizadas se presenta en la Tabla 12:

Tabla 12: Diluciones seriadas de BSA para la construcción de la curva de calibración del método de Bradford.

Dilución	BSA [mg/ml]	Volumen de BSA	Volumen de agua milli-Q [ml]
1	1	1 [ml] BSA 2 [mg/ml]	1
2	0,5	1 [ml] BSA 1 [mg/ml]	1
3	0,25	1 [ml] BSA 0,5 [mg/ml]	1
4	0,125	1 [ml] BSA 0,25 [mg/ml]	1
5	0,0625	1 [ml] BSA 0,0125 [mg/ml]	1
6	0,03125	1 [ml] BSA 0,06125 [mg/ml]	1

A continuación, se procedió a realizar el ensayo, el cual fue ejecutado por triplicado. Primero, se depositaron 10 [ul] de cada una de las diluciones de BSA preparadas, además de 10 [ul] de agua milli-Q, la que cumplió el rol de blanco de reacción, en una microplaca de lectura de 96 pocillos. Después, a cada muestra se le añadieron 200 [ul] de reactivo de Bradford, se mezcló y tras 10 [min] de reacción se midió la absorbancia de las muestras a 595 [nm] por medio de un lector de microplacas.

Finalmente, se procesaron los datos de absorbancias obtenidas en Microsoft Excel®. A continuación, se detalla la metodología aplicada para obtención de la recta:

1. Se calculó la absorbancia promedio de cada set de concentraciones de BSA y del blanco de reacción.
2. Se estimó la absorbancia corregida de las muestras, según la ecuación 13:

$$Abs_{Corregida\ BSA} = Abs_{Muestra\ BSA} - Abs_{Blanco} \quad (13)$$

3. Se graficó la absorbancia corregida de cada set de datos en función de su concentración de BSA.
4. Se insertó en la gráfica una línea de tendencia lineal, la cual entregó la curva de calibrado.
5. Se adicionó el coeficiente de determinación de la recta (R^2), para dilucidar la linealidad de los puntos. En este caso, las concentraciones de BSA 1 y 2 [mg/ml] no se encontraron dentro del rango lineal y, por ende, no fueron incluidas en la curva de calibrado final.
6. Por último, se calculó la desviación estándar y el coeficiente de variabilidad porcentual para cada uno de los conjuntos de datos, con el objetivo de cuantificar la dispersión de estos con respecto a su media.

8.2.2. Cuantificación de proteínas totales

El detalle del proceso de estimación de proteínas totales se presenta enseguida:

1. Se calculó la absorbancia promedio para cada set de muestras, es decir, dilución enzimática y blanco.
2. Se estimó la absorbancia corregida de la muestra de dilución enzimática, a partir de la ecuación 14:

$$Abs_{595} \text{ corregida} = Abs_{595} \text{ muestra} - Abs_{595} \text{ Blanco} \quad (14)$$

3. Se insertó la absorbancia corregida en la ecuación de la curva de calibración. Luego, este valor se multiplicó por el factor de dilución aplicado, obteniéndose así, la concentración de proteínas totales.
4. Se estimó, además, la desviación estándar y el coeficiente de variabilidad porcentual para ambos sets de datos, para medir su dispersión con respecto al promedio.

8.3. Metodología: ensayo de actividad enzimática

8.3.1. Curva de calibración: método DNS

En primer lugar, se prepararon 10 [ml] de una solución stock de xilosa 2 [mg/ml], en agua milli-Q, desde la cual se realizaron diluciones seriadas, hasta conseguir una concentración de xilosa de 0,03125 [mg/ml]. En la Tabla 13 se especifica la composición de cada una de las diluciones efectuadas.

Tabla 13: Diluciones seriadas de xilosa para la construcción de la curva de calibración del método DNS.

Dilución	Concentración xilosa [mg/ml]	Volumen de xilosa	Volumen de agua milli-Q [ml]
1	1	1 [ml] xilosa 2 [mg/ml]	1
2	0,5	1 [ml] xilosa 1 [mg/ml]	1
3	0,25	1 [ml] xilosa 0,5 [mg/ml]	1
4	0,125	1 [ml] xilosa 0,25 [mg/ml]	1
5	0,0625	1 [ml] xilosa 0,0125 [mg/ml]	1
6	0,03125	1 [ml] xilosa 0,06125 [mg/ml]	1

A continuación, se realizó el experimento, desarrollado por triplicado. Se dispusieron 100 [ul] de cada una de las diluciones preparadas, además de 100 [ul] de agua milli-Q, correspondiente al blanco de reacción, en una microplaca de PCR de 96 pocillos. Luego, a cada muestra se le agregó 100 [ul] de reactivo DNS e inmediatamente se incubaron por 5 [min] a 99 °C. Finalizado ese periodo, y una vez que las soluciones alcanzaron la temperatura ambiente, se tomaron 100 [ul] de cada pocillo y se depositaron en una microplaca de lectura para la cuantificar la absorbancia a 550 [nm] en un lector de microplacas.

La construcción de la curva de calibración de DNS se realizó en Microsoft Excel®. El detalle del protocolo seguido se presenta enseguida:

1. Se calculó la absorbancia promedio de cada set de concentraciones de xilosa y del blanco de reacción.
2. Se estimó la absorbancia corregida de las diluciones, a partir de la ecuación 15:

$$Abs_{Corregida\ xilosa} = Abs_{Muestra\ xilosa} - Abs_{Blanco} \quad (15)$$

3. Se graficó la absorbancia corregida de cada conjunto de datos en función de su concentración de xilosa.
4. Se insertó en el gráfico una línea de tendencia lineal, la cual entregó la curva de calibrado.
5. Se adicionó el coeficiente de determinación de la recta (R^2), para dilucidar la linealidad de los puntos. En este caso, la dilución de xilosa 2 [mg/ml] no se encuentra dentro del rango lineal, por tanto, no fue incluida en la curva de calibración.

8.3.2. Preparación buffer acetato de sodio

Para mantener el pH constante durante la reacción enzimática, las diluciones de enzima y sustrato fueron preparadas en buffer acetato de sodio 50 [mM] pH 5.0. Los pasos seguidos para elaborarlo se presentan enseguida:

1. En una balanza analítica, se masaron 0,4102 [g] de acetato de sodio.
2. En un vaso precipitado de 250 [ml] se dispuso el acetato de sodio masado y 80 [ml] de agua milli-Q. La solución se mezcló con un agitador magnético hasta que no se visibilizaron partículas en suspensión.
3. Se ajustó el pH de la solución con ácido acético concentrado.
4. Se agregó agua milli-Q a la solución, hasta alcanzar un volumen de 100 [ml].

8.3.3. Preparación reactivo DNS

Se disolvió completamente bajo agitación magnética y en el orden indicado, los siguientes compuestos:

- 3,53 [g] Ácido 3,5-dinitrosalicílico
- 6,6 [g] Hidróxido de Sodio
- 472 [ml] Agua de destilada
- 102 [g] Tartrato de Sodio Potasio
- 2,53 [ml] Fenol
- 2,77 [g] Metabisulfito de Sodio

8.3.4. Cuantificación de la actividad enzimática

Los pormenores de la metodología utilizada se presentan a continuación:

1. Se calculó la absorbancia promedio de set de muestras y del blanco de reacción.
2. Se estimó la absorbancia corregida de cada set de concentraciones, según la ecuación 16:

$$Abs_{550} \text{ corregida} = Abs_{550} \text{ muestra} - Abs_{550} \text{ blanco} \quad (16)$$

3. Se obtuvo para cada conjunto de datos, la concentración de azúcares reductores [mg/ml] generados durante la reacción, a través de la curva de calibración de DNS.
4. Se determinó la concentración de azúcares reductores (AR) [uM], la actividad enzimática [U/l] y la actividad específica [U/mg] con las ecuaciones 17, 18 y 19.

$$AR [uM] = \frac{AR \left[\frac{mg}{ml} \right]}{PM \text{ xilosa} \left[\frac{g}{mol} \right]} \quad (17)$$

$$Actividad \text{ enzimática} \left[\frac{U}{l} \right] = \frac{AR [uM]}{Tiempo \text{ de reacción} [min]} \quad (18)$$

$$Actividad \text{ específica} \left[\frac{U}{mg} \right] = \frac{Actividad \text{ enzimática} \left[\frac{U}{l} \right]}{Concentración \text{ Cellic HTec2} \left[\frac{ug}{ml} \right]} \quad (19)$$

Finalmente, se obtuvo, la curva de saturación, al graficar la actividad enzimática [U/l] en función de la concentración de sustrato inicial [mg/ml].

8.4. Metodología: electroforesis en gel de poliacrilamida

8.4.1. Composición gel de poliacrilamida

La composición del gel de resolución al 12,5 % y la composición del gel de concentración se presentan en la Tabla 14 y Tabla 15, respectivamente.

Tabla 14: Composición gel de resolución 12,5%.

Gel de resolución 12,5%	
Reactivo	Volumen [ul]
Acrilamida-Bisacrilamida 29:1	1.580
Buffer Tris 1,5M pH 8,8 + SDS 0,4%	950
Glicerol 40%	1.270
TEMED	2
Persulfato de amonio (PSA) 10%	20

Tabla 15: Composición gel de concentración.

Gel de concentración	
Reactivo	Volumen [ul]
Acrilamida-Bisacrilamida 29:1	168,5
Buffer Tris 0,5M pH 6,8 + SDS 0,4%	250
Agua destilada	575
TEMED	1,25
Persulfato de amonio (PSA) 10%	7,5

8.4.2. Composición buffer de carga denaturante 5X

El buffer de carga denaturante 5X se compone de:

- Buffer Tris 60 mM pH 6,8
- Glicerol 25% p/v
- 2-mercaptoetanol 5% p/v
- Azul de bromofenol 0,1% p/v

8.4.3. Preparación buffer de corrida Tris-Glicina 10X

El buffer de corrida Tris-Glicina 10X se compone de:

- 30 [g] de Tris
- 114 [g] de Glicina
- 10 [g] de SDS
- Agua destilada hasta completar 1 [l] de solución

8.4.4. Composición de las soluciones de tinción y destinción

La composición de la solución de tinción de Azul de Coomassie es:

- Azul de Coomassie 0,25% p/v
- Metanol 50% v/v
- Ácido acético 10% v/v
- Agua destilada 40% v/v

Por otra parte, la composición de la solución de destinción es:

- Metanol 50% v/v
- Ácido acético 10% v/v
- Agua destilada 40% v/v

8.5. Resultados: curva de calibración método de Bradford

La Tabla 16 presenta las absorbancias a 595 [nm] obtenidas para la construcción de la curva de calibración para el método de Bradford. Además, se enseña la desviación estándar (σ) y el coeficiente de variabilidad (CV%) de cada set de datos. Por último, se muestra la raíz del error cuadrático medio (RMSE) entre la desviación estándar de la muestra y del blanco, la cual representa el error asociado a cada set de datos.

Tabla 16: Datos absorbancia 595 [nm] para la construcción de la curva de calibración de Bradford.

BSA [mg/ml]	Abs 550 nm			Abs Promedio	Abs Corregida	σ	CV %	RMSE
2	1,236	1,527	1,393	1,385	1,019	0,146	10,514	0,152
1	1,088	1,145	1,161	1,131	0,765	0,038	3,392	0,059
0,5	0,840	0,879	0,884	0,868	0,502	0,024	2,776	0,051
0,25	0,598	0,577	0,661	0,612	0,246	0,044	7,143	0,063
0,125	0,493	0,522	0,513	0,509	0,143	0,015	2,914	0,047
0,0625	0,411	0,439	0,398	0,416	0,050	0,021	5,037	0,049
0,03125	0,416	0,389	0,362	0,389	0,023	0,027	6,941	0,052
Blanco	0,416	0,352	0,330	0,366	0,000	0,045	12,207	-

La curva de calibración de albúmina de suero bovino (BSA) construida se presenta en la Figura 28.

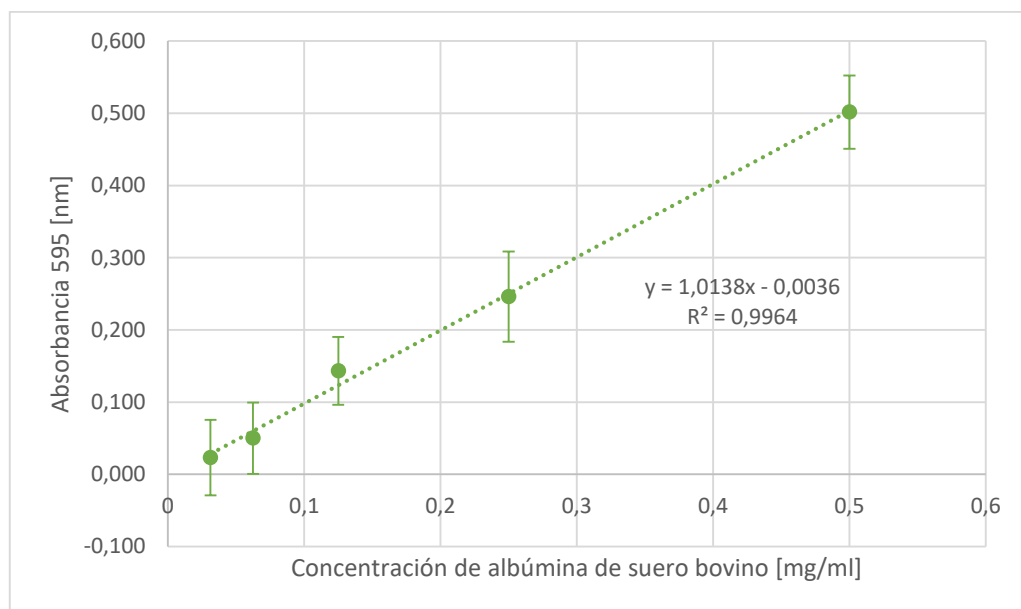


Figura 28: Curva de calibración de BSA para método de Bradford.

8.6. Resultados: curva de calibración de método DNS

La Tabla 17 presenta las absorbancias a 550 [nm] obtenidas para la construcción de la curva de calibración para el método DNS. Además, se enseña la desviación estándar (σ) y el coeficiente de variabilidad (CV%) de cada set de datos. Por último, se muestra la raíz del error cuadrático medio (RMSE) entre la desviación estándar de la muestra y del blanco, la cual representa el error asociado a cada set de datos.

Tabla 17: Datos absorbancia 550 [nm] para curva la construcción de calibración de DNS.

Xilosa [mg/ml]	Absorbancia 550 nm			Abs Promedio	Abs Corregida	σ	CV %	RMSE
	2	2,492	2,306	2,374	2,391	2,310	0,094	3,937
1	1,515	1,549	1,557	1,540	1,460	0,022	1,448	0,024
0,5	0,858	0,871	0,872	0,867	0,787	0,008	0,901	0,011
0,25	0,434	0,440	0,429	0,434	0,354	0,006	1,268	0,009
0,125	0,280	0,268	0,255	0,268	0,187	0,013	4,671	0,015
0,0625	0,118	0,118	0,128	0,121	0,041	0,006	4,758	0,010
0,03125	0,100	0,132	0,103	0,112	0,031	0,018	15,827	0,019
Blanco	0,077	0,075	0,089	0,080	0,000	0,008	9,426	-

La curva de calibración de xilosa construida se presenta en la Figure 29.

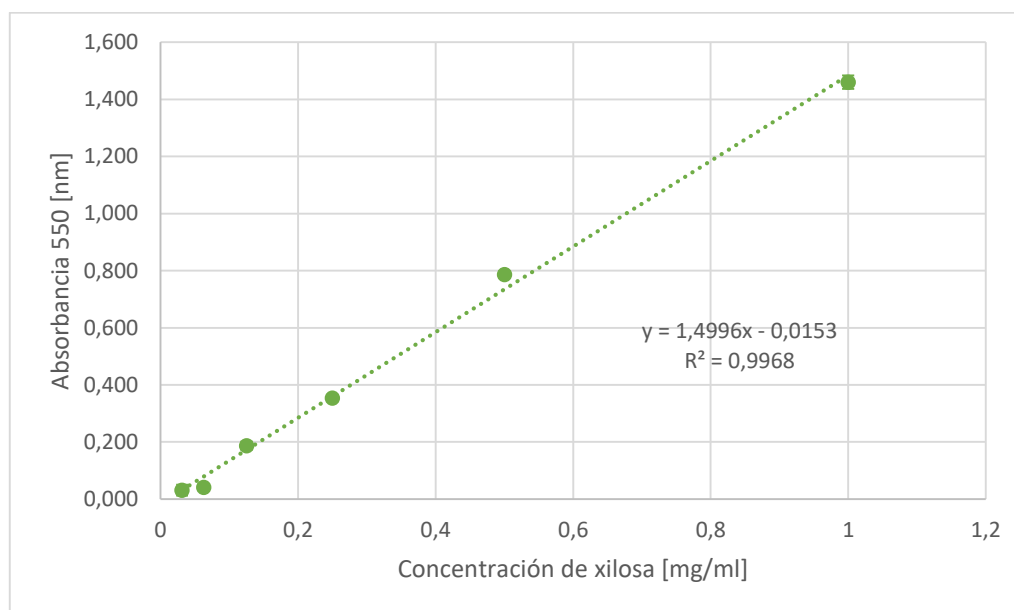


Figure 29: Curva de calibración de xilosa para método DNS.

8.7. Resultados: ensayo de actividad enzimática

8.7.1. Concentración de Cellic HTec2: 0,25 [ug/ml]

La Tabla 18 presenta las absorbancias a 550 [nm] obtenidas para el ensayo de actividad aplicado a una concentración de Cellic HTec2 de 0,25 [ug/ml] y concentraciones de xilano de haya iguales a 2,5, 5, 7,5 y 10 [mg/ml]. Además, se muestran las desviaciones estándar (σ) y los coeficientes de variabilidad de las muestras (CV%).

Tabla 18: Absorbancias registradas a 550 [nm] para ensayo de actividad con Cellic HTec2 0,25 [ug/ml].

Xilano [mg/ml]	Cellic HTec2 [ug/ml]	Abs 550 nm			Abs promedio	Abs corregida	σ	CV %
2,5	0,25	0,136	0,106	0,149	0,130	0,046	0,022	16,920
	Blanco	0,089	0,081	0,082	0,084	0,000	0,004	5,189
5	0,25	0,221	0,163	0,166	0,183	0,085	0,033	17,812
	Blanco	0,092	0,101	0,102	0,098	0,000	0,006	5,601
7,5	0,25	0,197	0,163	0,190	0,183	0,088	0,018	9,793
	Blanco	0,098	0,094	0,093	0,095	0,000	0,003	2,785
10	0,25	0,227	0,197	0,264	0,229	0,129	0,034	14,634
	Blanco	0,123	0,082	0,095	0,100	0,000	0,021	20,952

En base a los datos de absorbancias registrados y las ecuaciones entregadas en la Sección 8.3.4 se calculó la concentración de azúcares reductores generados en reacción, la actividad enzimática y la actividad específica de Cellic HTec2. Estos resultados se enseñan mediante la Tabla 19.

Tabla 19: Resultados ensayo de actividad para Cellic HTec2 0,25 [ug/ml].

Xilano [mg/ml]	AR [mg/ml]	AR [uM]	Actividad [U/l]	Actividad Específica [U/mg]
2,5	0,041	273,8	13,688	54,752
5,0	0,067	445,5	22,276	89,102
7,5	0,069	460,3	23,016	92,063
10,0	0,096	642,4	32,121	128,486

8.7.2. Concentración de Cellic HTec2: 0,5 [ug/ml]

La Tabla 20 presenta las absorbancias a 550 [nm] obtenidas para el ensayo de actividad aplicado a una concentración de Cellic HTec2 de 0,5 [ug/ml] y concentraciones de xilano de haya iguales a 2,5, 5, 7,5 y 10 [mg/ml]. Además, se muestran las desviaciones estándar (σ) y los coeficientes de variabilidad de las muestras (CV%).

Tabla 20: Absorbancias registradas a 550 [nm] para ensayo de actividad con Cellic HTec2 0,5 [ug/ml].

Xilano [mg/ml]	Cellic HTec2 [ug/ml]	Absorbancia 550 nm			Abs promedio	Abs real	σ	CV %
2,5	0,5	0,208	0,214	0,262	0,228	0,151	0,030	12,981
	Blanco	0,059	0,096	0,076	0,077	0,000	0,019	24,052
5	0,5	0,234	0,261	0,281	0,259	0,168	0,024	9,119
	Blanco	0,073	0,083	0,116	0,091	0,000	0,023	24,818
7,5	0,5	0,308	0,331	0,335	0,325	0,230	0,015	4,488
	Blanco	0,089	0,094	0,102	0,095	0,000	0,007	6,903
10	0,5	0,346	0,338	0,372	0,352	0,250	0,018	5,050
	Blanco	0,103	0,097	0,107	0,102	0,000	0,005	4,918

En base a los datos de absorbancias registrados y las ecuaciones entregadas en la Sección 8.3.4, se calculó la concentración de azúcares reductores generados en reacción, la actividad enzimática y la actividad específica de Cellic HTec2. Estos resultados se enseñan mediante la Tabla 21.

Tabla 21: Resultados ensayo de actividad para Cellic HTec2 0,5 [ug/ml].

Xilano [mg/ml]	AR [mg/ml]	AR [uM]	Actividad [U/l]	Actividad Específica [U/mg]
2,5	0,111	738,7	36,933	73,867
5	0,122	814,2	40,709	81,418
7,5	0,163	1.088,1	54,404	108,809
10	0,177	1.176,9	58,846	117,692

8.7.3. Concentración de Cellic HTec2: 1 [ug/ml]

La Tabla 22 presenta las absorbancias a 550 [nm] obtenidas para el ensayo de actividad aplicado a una concentración de Cellic HTec2 de 0,5 [ug/ml] y concentraciones de xilano de haya iguales a 2,5, 5, 7,5 y 10 [mg/ml]. Además, se muestran las desviaciones estándar (σ) y los coeficientes de variabilidad de las muestras (CV%).

Tabla 22: Absorbancias registradas a 550 [nm] para ensayo de actividad con Cellic HTec2 1 [ug/ml].

Xilano [mg/ml]	Cellic HTec2 [ug/ml]	Abs 550 nm			Abs promedio	Abs corregida	σ	CV %
2,5	1	0,468	0,545	0,552	0,522	0,425	0,047	8,934
	Blanco	0,084	0,095	0,111	0,097	0,000	0,014	14,045
5	1	0,631	0,680	0,729	0,680	0,548	0,049	7,206
	Blanco	0,144	0,113	0,140	0,132	0,000	0,017	12,742
7,5	1	0,627	0,629	0,705	0,654	0,567	0,044	6,803
	Blanco	0,093	0,080	0,086	0,086	0,000	0,007	7,536
10	1	0,716	0,730	0,720	0,722	0,589	0,007	0,999
	Blanco	0,123	0,132	0,144	0,133	0,000	0,011	7,922

En base a los datos de absorbancias registrados y las ecuaciones entregadas en la Sección 8.3.4, se calculó la concentración de azúcares reductores generados en reacción, la actividad enzimática y la actividad específica de Cellic HTec2. Estos resultados se enseñan mediante la Tabla 23.

Tabla 23: Resultados ensayo de actividad para Cellic HTec2 1 [ug/ml].

Xilano [mg/ml]	AR [mg/ml]	AR [uM]	Actividad [U/l]	Actividad Específica [U/mg]
2,5	0,294	1.955,7	97,786	97,786
5	0,375	2.500,6	125,029	125,029
7,5	0,389	2.587,9	129,396	129,396
10	0,403	2.684,2	134,208	134,208

8.7.4. Curvas de saturación por xilano de haya

Por medio de los datos obtenidos se determinaron curvas de saturación por sustrato para cada una de las concentraciones de enzima estudiadas. Estos resultados se presentan en la Sección 4.1.1.2 y los valores graficados se detallan en la Tabla 24, Tabla 25 y Tabla 26.

Tabla 24: Datos curva de saturación por sustrato para Cellic HTec2 0,25 [ug/ml].

Concentración inicial de enzima: 0,25 [ug/ml]		
Xilano [mg/ml]	Actividad [U/l]	Barra de error
0	0,000	0,000
2,5	13,688	8,390
5,0	22,276	10,753
7,5	23,016	7,428
10,0	32,121	12,185

Tabla 25: Datos curva de saturación por sustrato para Cellic HTec2 0,5 [ug/ml].

Concentración inicial de enzima: 0,5 [ug/ml]		
Xilano [mg/ml]	Actividad [U/l]	Barra de error
0	0,000	0
2,5	36,933	11,152
5	40,709	10,638
7,5	54,404	6,947
10	58,846	7,501

Tabla 26: Datos curva de saturación por sustrato para Cellic HTec2 1 [ug/ml].

Concentración inicial de enzima: 1 [ug/ml]		
Xilano [mg/ml]	Actividad [U/l]	Barra de error
0	0,000	0,000
2,5	97,786	14,179
5	125,029	14,907
7,5	129,396	13,379
10	134,208	6,233

8.8. Resultados: electroforesis en gel de poliacrilamida

Los resultados de la electroforesis en gel de poliacrilamida arrojaron la presencia de dos bandas predominantes. Se realizó un análisis de estas mediante el software Image Lab[®] determinándose su peso molecular. Los valores establecidos se presentan en la Tabla 27.

Tabla 27: Determinación peso molecular bandas predominantes de SDS-PAGE.

Banda	Peso molecular [kDa]				Peso molecular promedio [kDa]	σ	CV%
	Volumen de carga 12 [ul]	Volumen de carga 8 [ul]	Volumen de carga 4 [ul]	Volumen de carga 2 [ul]			
1	69,2	66,5	63,9	62,9	65,6	2,8	4,3
2	49,6	49,0	48,6	49,0	49,1	0,4	0,9

8.9. Resultados: parámetros cinéticos de Michaelis-Menten para la fase líquida

8.9.1. Curva de progreso de azúcares reductores: xilano 2,5 [mg/ml]

Los datos de la curva de progreso de azúcares reductores (AR) experimental y simulada para una concentración de Cellic HTec2 de 1 [ug/ml] y una concentración de xilano de haya de 2,5 [mg/ml] se presentan en la Tabla 28. Además, la Figura 30 presenta el gráfico asociado a los datos.

Tabla 28: Datos curva de progreso experimental y simulada para xilano de haya 2,5 [mg/ml].

Tiempo [min]	AR experimentales [uM]	AR modelo [uM]
0	0	0
5	216,0	456,5
10	732,7	900,2
15	1.196,2	1.331,1
20	1.955,7	1.749,3
25	2.211,9	2.154,7
35	3.029,1	2.927,2
45	3.554,8	3.648,6

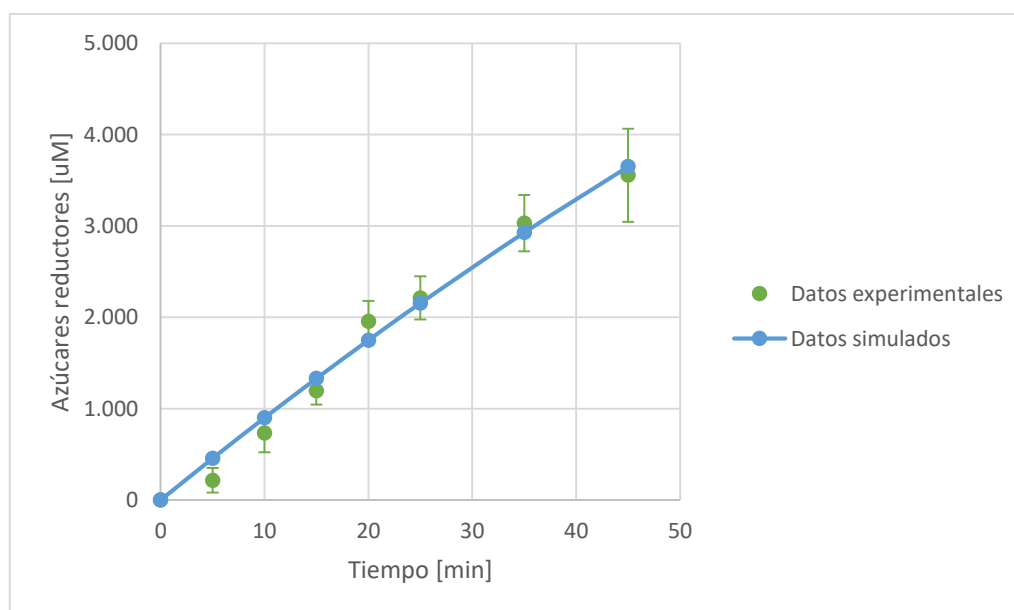


Figura 30: Curva de progreso de azúcares reductores para xilano 2,5 [mg/l] para la determinación de los parámetros cinéticos de Michaelis-Menten.

Por otra parte, el ajuste de parámetros realizado determinó que la concentración de azúcares reductores en función del tiempo de reacción se rige por la ecuación 20:

$$\text{Azúcares reductores [uM]} = -0,255 \cdot t^2 + 92,574 \cdot t \quad (20)$$

8.9.2. Curva de progreso de azúcares reductores: xilano 3,75 [mg/ml]

Los datos de la curva de progreso de azúcares reductores (AR) experimental y simulada para una concentración de Cellic HTec2 de 1 [ug/ml] y una concentración de xilano de haya de 3,75 [mg/ml] se presentan en la Tabla 29. Además, la Figura 31 presenta el gráfico asociado a los datos.

Tabla 29: Datos curva de progreso experimental y simulada para xilano de haya 3,75 [mg/ml].

Tiempo [min]	AR experimentales [uM]	AR modelo [uM]
0	0	0
5	370,0	568,5
10	997,8	1.110,1
15	1.653,7	1.624,6
20	2.160,0	2.112,1
25	2.660,5	2.572,6
35	3.406,7	3.412,4
45	4.115,9	4.144,3

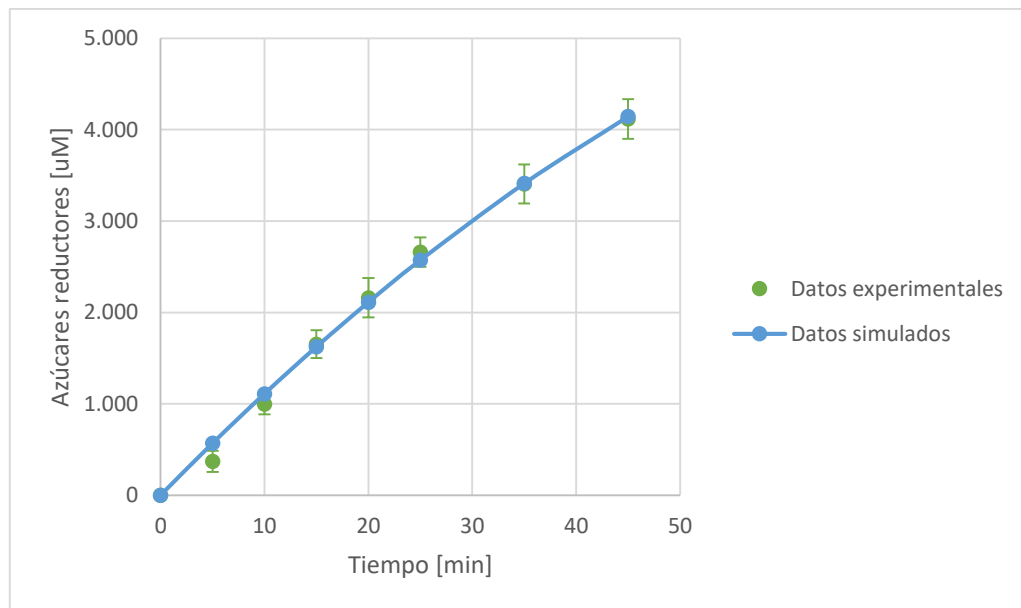


Figura 31: Curva de progreso de azúcares reductores para xilano 3,75 [mg/l] para la determinación de los parámetros cinéticos de Michaelis-Menten.

Por otra parte, el ajuste de parámetros realizado determinó que la concentración de azúcares reductores en función del tiempo de reacción se rige por la ecuación 21:

$$\text{Azúcares reductores [uM]} = -0,540 \cdot t^2 + 116,411 \cdot t \quad (21)$$

8.9.3. Curva de progreso de azúcares reductores: xilano 5 [mg/ml]

Los datos de la curva de progreso de azúcares reductores (AR) experimental y simulada para una concentración de Cellic HTec2 de 1 [ug/ml] y una concentración de xilano de haya de 5 [mg/ml] se presentan en la Tabla 30. Además, la Figura 32 presenta el gráfico asociado a los datos.

Tabla 30: Datos curva de progreso experimental y simulada para xilano de haya 5 [mg/ml].

Tiempo [min]	AR experimentales [uM]	AR modelo [uM]
0	0	0
5	441,1	580,2
10	1.008,1	1.145,0
15	1.658,1	1.694,4
20	2.220,7	2.228,3
25	2.891,5	2.746,9
35	3.805,0	3.737,7
45	4.595,6	4.666,9

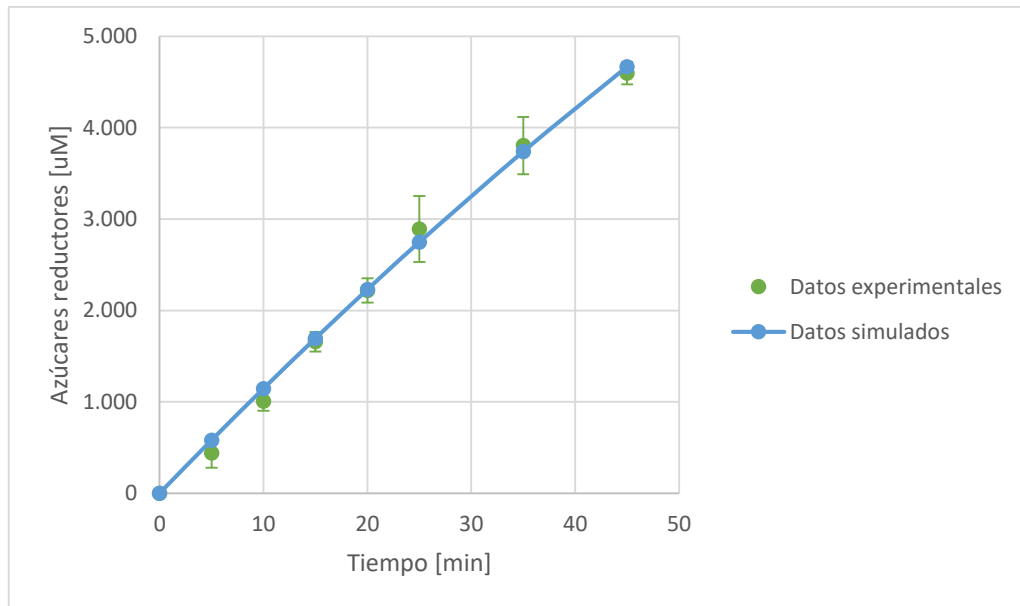


Figura 32: Curva de progreso de azúcares reductores para xilano 5 [mg/l] para la determinación de los parámetros cinéticos de Michaelis-Menten.

Por otra parte, el ajuste de parámetros realizado determinó que la concentración de azúcares reductores en función del tiempo de reacción se rige por la ecuación 22:

$$\text{Azúcares reductores [uM]} = -0,308 \cdot t^2 + 117,581 \cdot t \quad (22)$$

8.9.4. Curva de progreso de azúcares reductores: xilano 7,5 [mg/ml]

Los datos de la curva de progreso de azúcares reductores (AR) experimental y simulada para una concentración de Cellic HTec2 de 1 [ug/ml] y una concentración de xilano de haya de 7,5 [mg/ml] se presentan en la Tabla 31. Además, la Figura 33 presenta el gráfico asociado a los datos.

Tabla 31: Datos curva de progreso experimental y simulada para xilano de haya 7,5 [mg/ml].

Tiempo [min]	AR experimentales [uM]	AR modelo [uM]
0	0	0
5	455,9	672,8
10	1.347,2	1.317,9
15	2.063,8	1.935,2
20	2.466,5	2.524,8
25	3.044,0	3.086,6
35	4.200,3	4.126,9
45	5.023,5	5.056,3

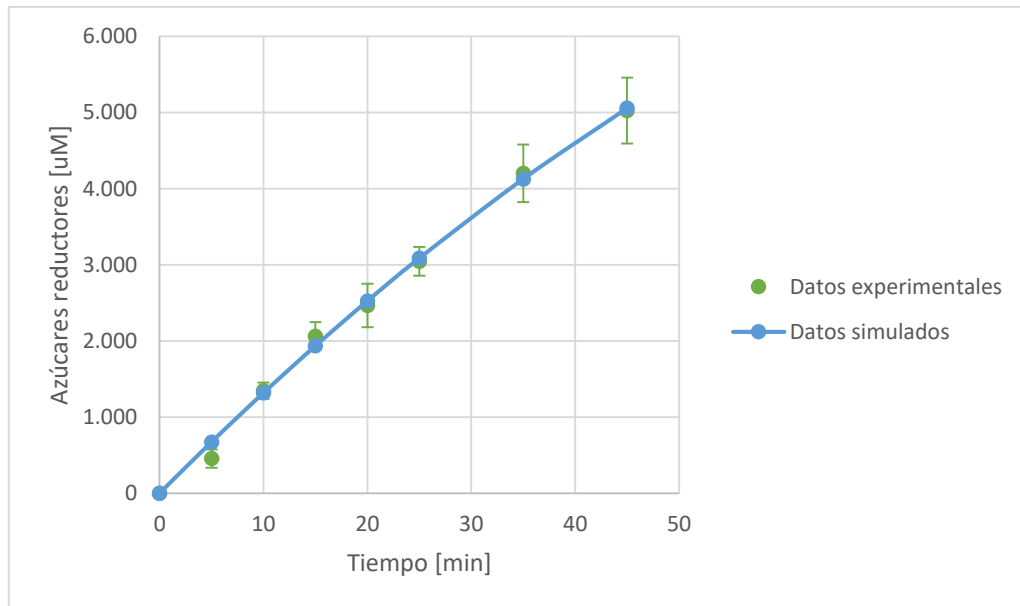


Figura 33: Curva de progreso de azúcares reductores para xilano 7,5 [mg/l] para la determinación de los parámetros cinéticos de Michaelis-Menten.

Por otra parte, el ajuste de parámetros realizado determinó que la concentración de azúcares reductores en función del tiempo de reacción se rige por la ecuación 23:

$$\text{Azúcares reductores [uM]} = -0,555 \cdot t^2 + 137,338 \cdot t \quad (23)$$

8.9.5. Datos diagrama de Lineweaver-Burk

Posteriormente, para construir el diagrama de Lineweaver-Burk, se calculó la velocidad de reacción (R) para los instantes de velocidad inicial mediante los datos de azúcares reductores simulados. Los datos que componen el diagrama de Lineweaver-Burk se presentan en la Tabla 32.

Tabla 32: Datos diagrama de Lineweaver-Burk.

Datos Diagrama Lineweaver-Burk				
Tiempo [min]	C_{s,o} [uM]	1/C_{s,o} [1/uM]	R [uM/min]	1/R [min/uM]
5	16.652,2	$6,005 \cdot 10^{-5}$	91,297	0,0110
	24.978,4	$4,003 \cdot 10^{-5}$	113,710	0,0088
	33.304,5	$3,003 \cdot 10^{-5}$	116,040	0,0086
	49.956,7	$2,002 \cdot 10^{-5}$	134,563	0,0074
10	16.652,2	$6,005 \cdot 10^{-5}$	90,020	0,0111
	24.978,4	$4,003 \cdot 10^{-5}$	111,008	0,0090
	33.304,5	$3,003 \cdot 10^{-5}$	114,499	0,0087
	49.956,7	$2,002 \cdot 10^{-5}$	131,788	0,0076
15	16.652,2	$6,005 \cdot 10^{-5}$	88,743	0,0113
	24.978,4	$4,003 \cdot 10^{-5}$	108,306	0,0092
	33.304,5	$3,003 \cdot 10^{-5}$	112,957	0,0089
	49.956,7	$2,002 \cdot 10^{-5}$	129,013	0,0078
20	16.652,2	$6,005 \cdot 10^{-5}$	87,466	0,0114
	24.978,4	$4,003 \cdot 10^{-5}$	105,604	0,0095
	33.304,5	$3,003 \cdot 10^{-5}$	111,416	0,0090
	49.956,7	$2,002 \cdot 10^{-5}$	126,238	0,0079

A continuación, determinaron las pendientes y los coeficientes de posición de las curvas implementadas, las cuales permitieron calcular la constante de Michaelis-Menten y la velocidad máxima de reacción. Estos datos se presentan en la Tabla 33.

Tabla 33: Determinación de los parámetros cinéticos de Michaelis-Menten.

Cálculo parámetros cinéticos						
5 [min]	m	84,214	1/R [min/uM]	0	Km [uM]	14.548,5
	n	0,0058	1/Cs [1/uM]	-0,000069	V _{máx} [uM/min]	172,7
10 [min]	m	84,697	1/R [min/uM]	0	Km [uM]	14.280,7
	n	0,0059	1/Cs [1/uM]	-0,000070	V _{máx} [uM/min]	168,6
15 [min]	m	85,163	1/R [min/uM]	0	Km [uM]	14.007,0
	n	0,0061	1/Cs [1/uM]	-0,000071	V _{máx} [uM/min]	164,4
20 [min]	m	85,611	1/R [min/uM]	0	Km [uM]	13.727,1
	n	0,0062	1/Cs [1/uM]	-0,000073	V _{máx} [uM/min]	160,3

Se evidenció que las curvas construidas no poseen una diferencia aparente, por lo cual se realizó una prueba de t-student ($p < 0,05$), la cual indicó que no existe diferencia significativa entre la recta construida a los 5 [min] y las rectas de los tiempos 10, 15 y 20 [min] de reacción. El resultado de este análisis estadístico se presenta en la Tabla 34.

Tabla 34: Prueba de t-student entre rectas del diagrama de Lineweaver-Burk.

Test de significancia estadística: tiempo 5 [min] vs tiempo 10, 15 y 20 [min]	
Tiempo [min]	p-value
10	0,882
15	0,763
20	0,647

8.10. Resultados: estudio de inhibición por producto terminal

Para estudiar el potencial efecto inhibidor del producto terminal de la hidrólisis enzimática de xilano de haya por Cellic HTec2 se elaboraron curvas de progreso de producto, en presencia de concentraciones variables de xilosa. Posteriormente, los resultados obtenidos se compararon con curvas de progreso control, es decir, sin adición de xilosa. La comparación realizada para las distintas concentraciones de sustrato utilizadas se presentan en la Tabla 35, Tabla 36, Tabla 37 y Tabla 38.

Tabla 35: Comparación curvas de progreso de azúcares reductores para xilano 2,5 [mg/ml] con y sin adición de xilosa.

Concentración de xilano 2,5 [mg/ml]						
Tiempo [min]	Azúcares reductores [uM]					
	Sin adición	Barra de error	Xilosa 0,2 [mg/ml]	Barra de error	Xilosa 1 [mg/ml]	Barra de error
0	0	0	0	0	0	0
5	216,0	134,9	433,7	137,2	506,1	118,7
10	732,7	208,7	1.169,5	139,7	1.847,5	362,5
15	1.196,2	151,3	1.542,6	199,5	1.533,6	325,3
20	1.955,7	224,2	2.189,6	228,2	1.886,0	353,0
25	2.211,9	236,7	2.367,3	140,6	2.540,4	259,4
35	3.029,1	308,1	3.046,9	258,0	3.565,0	339,7
45	3.554,8	509,9	3.508,9	213,8	3.935,1	238,3

Tabla 36: Comparación curvas de progreso de azúcares reductores para xilano 3,75 [mg/ml] con y sin adición de xilosa.

Concentración de xilano 3,75 [mg/ml]						
Tiempo [min]	Azúcares reductores [uM]					
	Sin adición	Barra de error	Xilosa 0,2 [mg/ml]	Barra de error	Xilosa 1 [mg/ml]	Barra de error
0	0	0	0	0	0	0
5	370,0	114,9	608,4	157,5	503,4	233,4
10	997,8	111,4	1.268,7	132,3	1.071,9	153,2
15	1.653,7	151,6	1.742,5	141,2	1.581,3	130,2
20	2.160,0	215,4	2.362,9	192,5	2.007,7	238,8
25	2.660,5	161,1	2.630,9	181,9	2.552,5	299,6
35	3.406,7	214,8	3.541,4	104,8	3.387,6	148,2
45	4.115,9	216,7	4.132,2	153,7	4.065,7	346,3

Tabla 37: Comparación curvas de progreso de azúcares reductores para xilano 5 [mg/ml] con y sin adición de xilosa.

Concentración de xilano 5 [mg/ml]						
Tiempo [min]	Azúcares reductores [uM]					
	Sin adición	Barra de error	Xilosa 0,2 [mg/ml]	Barra de error	Xilosa 1 [mg/ml]	Barra de error
0	0	0	0	0	0	0
5	441,1	160,1	583,2	155,1	1.006,5	558,3
10	1.008,1	104,8	1.233,2	164,9	1.394,4	598,6
15	1.658,1	106,3	1.868,4	174,0	1.797,1	469,5
20	2.220,7	133,0	2.296,3	221,0	1.989,6	249,1
25	2.891,5	361,6	2.741,9	291,8	2.356,8	411,7
35	3.805,0	313,0	3.699,9	265,5	2.392,3	489,6
45	4.595,6	122,4	4.358,7	365,0	3.633,1	703,4

Tabla 38: Comparación curvas de progreso de azúcares reductores para xilano 7,5 [mg/ml] con y sin adición de xilosa.

Concentración de xilano 7,5 [mg/ml]						
Tiempo [min]	Azúcares reductores [uM]					
	Sin adición de xilosa	Barra de error	Xilosa 0,2 [mg/ml]	Barra de error	Xilosa 1 [mg/ml]	Barra de error
0	0	0	0	0	0	0
5	455,9	119,2	836,4	240,2	562,3	139,4
10	1.347,2	107,7	1.319,1	188,7	1.036,1	310,1
15	2.063,8	183,1	1.822,5	129,3	2.173,2	145,0
20	2.466,5	285,8	2.522,8	399,3	2.700,3	280,4
25	3.044,0	189,0	3.069,1	311,1	3.342,9	271,2
35	4.200,3	376,9	4.031,5	291,9	3.772,3	402,0
45	5.023,5	433,0	4.848,8	187,3	5.164,0	261,7

8.11. Resultados: parámetros de equilibrio de adsorción

Para estimar de los parámetros de equilibrio de adsorción se construyó la isoterma de Langmuir para distintos tiempos de incubación. La ecuación que representa la isoterma se presenta a continuación. Los términos de la ecuación 24 se presentan en el Capítulo 3.

$$\frac{C_{s,o}}{E_{endo,s}} = \frac{1}{\Omega_{max} \cdot K_{eq}} \cdot \frac{1}{E_{endo,l}} + \frac{1}{\Omega_{max}} \quad (24)$$

8.11.1. Primera toma de muestras: 1:15 [h] de reacción

Los datos experimentales y simulados de la isoterma de Langmuir a las 1:15 [h] de reacción, se presentan en la Tabla 39 y Tabla 40.

Tabla 39: Datos experimentales isoterma de Langmuir: 1:15 [h] de reacción.

Datos experimentales					
C _{s,o} /E _{endo,s} [uM sustrato/uM enzima]			1/E _{endo,l} [1/uM]		
57.580	52.125	54.155	3,638	5,432	4,545
28.634	28.534	30.056	1,851	1,872	1,605
20.652	18.913	20.756	0,992	1,272	0,980
17.080	13.995	15.895	0,608	1,000	0,701

Tabla 40: Datos modelados isoterma de Langmuir: 1:15 [h] de reacción.

Datos modelados	
C _{s,o} /E _{endo,s} [uM sustrato/uM enzima]	1/E _{endo,l} [1/uM]
55.122	4,538
27.183	1,776
20.154	1,081
17.001	0,769

Mediante el ajuste de parámetros implementado, se determinó la estructura de la isoterma de Langmuir. La ecuación 25 representa el proceso de adsorción a las 1:15 [h] de reacción se muestra enseguida:

$$\frac{C_{s,o}}{E_{endo,s}} = 10.115 \cdot \frac{1}{E_{endo,l}} + 9.218 \quad (25)$$

Además, la Figura 34 presenta el gráfico asociado a los datos.

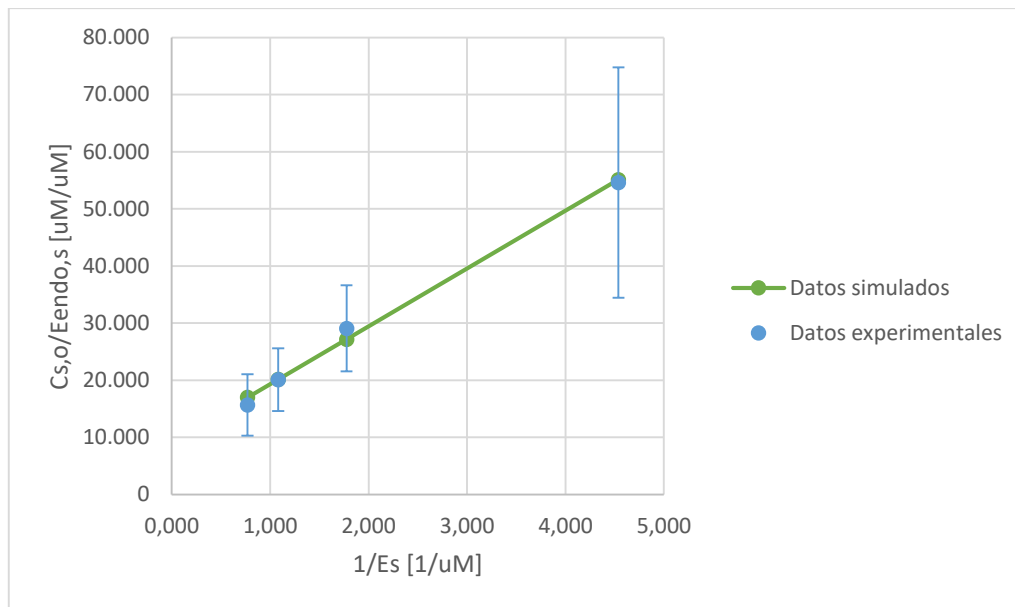


Figura 34: Isoterma de Langmuir: 1:15 [h] de reacción.

8.11.2. Segunda toma de muestras: 3:45 [h] de reacción

Los datos experimentales y simulados de la isoterma de Langmuir a las 3:45 [h] de reacción, se presentan en la Tabla 41 y Tabla 42.

Tabla 41: Datos experimentales isoterma de Langmuir: 3:45 [h] de reacción.

Datos experimentales					
$C_{s,o}/E_{endo,s}$ [uM sustrato/uM enzima]			$1/E_{endo,l}$ [1/uM]		
56.462	55.078	54.214	3,880	4,247	4,524
31.573	29.737	29.592	1,423	1,653	1,676
20.766	19.515	20.298	0,979	1,153	1,035
15.723	15.650	15.188	0,718	0,726	0,781

Tabla 42: Datos modelados isoterma de Langmuir: 3:45 [h] de reacción.

Datos modelados	
$C_{s,o}/E_{endo,s}$ [uM sustrato/uM enzima]	$1/E_{endo,l}$ [1/uM]
56.028	4,217
26.815	1,584
20.953	1,055
17.471	0,742

Mediante el ajuste de parámetros implementado, se determinó la estructura de la isoterma de Langmuir. La ecuación 26 representa el proceso de adsorción a las 3:45 [h] de reacción se muestra enseguida:

$$\frac{C_{s,o}}{E_{endo,s}} = 11.094 \cdot \frac{1}{E_{endo,l}} + 9.245 \quad (26)$$

Además, la Figura 35 presenta el gráfico asociado a los datos.

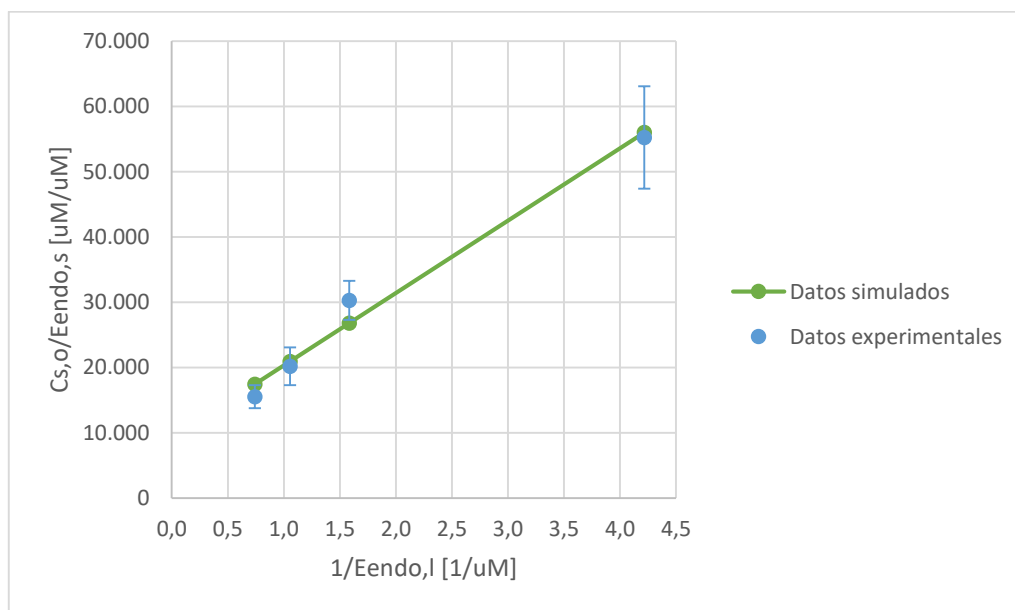


Figura 35: Isoterma de Langmuir: 3:45 [h] de reacción.

8.11.3. Tercera toma de muestras: 6 [h] de reacción

Los datos experimentales y simulados de la isoterma de Langmuir a las 6 [h] de reacción, se presentan en la Tabla 43 y Tabla 44. El gráfico asociado a los datos se presenta en la Sección 4.4.

Tabla 43 Datos experimentales isoterma de Langmuir: 6 [h] de reacción.

Datos experimentales					
$C_{s,o}/E_{endo,s}$ [uM sustrato/uM enzima]			$1/E_{endo,l}$ [1/uM]		
56.166	54.935	56.220	3,952	4,290	3,938
29.567	28.787	29.614	1,680	1,819	1,672
21.020	20.198	20.918	0,952	1,048	0,962
16.252	15.651	15.783	0,668	0,726	0,712

Tabla 44: Datos modelados isoterma de Langmuir: 6 [h] de reacción.

Datos modelados	
$C_{s,o}/E_{endo,s}$ [uM sustrato/uM enzima]	$1/E_{endo,l}$ [1/uM]
55.999	4,060
28.739	1,724
20.147	0,987
16.818	0,702

Mediante el ajuste de parámetros implementado, se determinó la estructura de la isoterma de Langmuir. La ecuación 27 representa el proceso de adsorción a las 6 [h] de reacción:

$$\frac{C_{s,o}}{E_{endo,s}} = 11.668 \cdot \frac{1}{E_{endo,l}} + 8.628 \quad (27)$$

8.12. Resultados curva de progreso de la concentración de azúcares reductores

La Tabla 45 presenta las absorbancias a 550 [nm] obtenidas para la curva de progreso de la concentración de azúcares reductores, realizada en duplicado, utilizando Cellic HTec2 1 [ug/ml] y xilano de haya 7,5 [mg/ml].

Tabla 45: Absorbancias registradas a 550 [nm] para curva de progreso de la hidrólisis enzimática.

Tiempo [min]	Tipo	Abs 550 nm		Abs Promedio	Abs corregida	
10	Muestra	0,517	0,531	-	0,406	0,420
	Blanco	0,111	0,111	0,111	-	-
20	Muestra	0,920	0,849	-	0,827	0,756
	Blanco	0,095	0,091	0,093	-	-
30	Muestra	1,166	1,173	-	1,049	1,056
	Blanco	0,117	0,117	0,117	-	-
45	Muestra	1,477	1,454	-	1,373	1,350
	Blanco	0,103	0,106	0,105	-	-
60	Muestra	1,723	1,702	-	1,593	1,572
	Blanco	0,126	0,135	0,131	-	-
75	Muestra	1,889	1,870	-	1,775	1,756
	Blanco	0,118	0,111	0,115	-	-
90	Muestra	2,061	1,995	-	1,922	1,856
	Blanco	0,140	0,138	0,139	-	-
120	Muestra	2,111	2,030	-	1,979	1,898
	Blanco	0,137	0,128	0,133	-	-
150	Muestra	2,127	2,061	-	1,988	1,922
	Blanco	0,141	0,137	0,139	-	-
180	Muestra	1,861	2,037	-	1,711	1,887
	Blanco	0,149	0,152	0,151	-	-

En base a los datos de absorbancias registrados y las ecuaciones entregadas en la Sección 8.3.4, se calculó la concentración de azúcares reductores generados en reacción. Estos resultados se enseñan mediante la Tabla 46.

Tabla 46: Concentración de azúcares reductores generados durante la curva de progreso de la hidrólisis enzimática.

Tiempo [min]	AR [mg/ml]		AR [uM]	
	0	0	0	0
0	0	0	0	0
10	0,281	0,290	1.871,3	1.933,5
20	0,562	0,514	3.741,3	3.425,9
30	0,710	0,714	4.727,4	4.758,5
45	0,925	0,910	6.164,3	6.062,1
60	1,072	1,058	7.141,5	7.048,2
75	1,194	1,181	7.949,9	7.865,5
90	1,292	1,248	8.605,1	8.311,9
120	1,330	1,276	8.856,0	8.496,2
150	1,336	1,292	8.898,2	8.605,1
180	1,151	1,268	7.665,6	8.447,4

8.13. Resultados: cuantificación de xilosa y xilobiosa por HPLC

8.13.1. Curva de calibración xilosa

La Tabla 47 presenta las áreas bajo la curva obtenidas para la construcción de la curva de calibración de xilosa para la cuantificación por HPLC. Además, se enseña la desviación estándar (σ) y el coeficiente de variabilidad (CV%) de cada set de datos. Por otra parte, la curva de calibración construida se presenta en la Figura 36.

Tabla 47: Datos curva de calibración de xilosa para cuantificación por HPLC.

Xilosa [mg/ml]	Área Promedio	σ	CV %
0,0125	9.265	60,357	0,651
0,2500	194.987	3.097,128	1,588
0,500	392.282	626,497	0,160
1,000	762.787	1.886,492	0,247

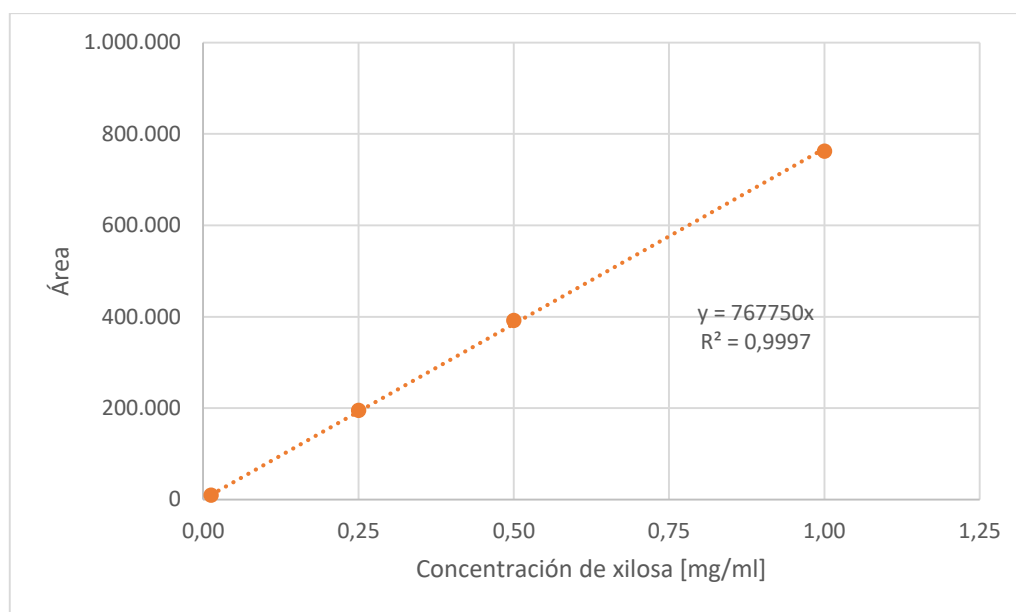


Figura 36: Curva de calibración de xilosa para cuantificación por HPLC.

8.13.2. Curva de calibración xilobiosa

La Tabla 48 presenta las áreas bajo la curva obtenidas para la construcción de la curva de calibración de xilobiosa para la cuantificación por HPLC. Además, se enseña la desviación estándar (σ) y el coeficiente de variabilidad (CV%) de cada set de datos. Por otra parte, la curva de calibración construida se presenta en la Figura 37.

Tabla 48: Datos curva de calibración de xilobiosa para cuantificación por HPLC.

Xilobiosa [mg/ml]	Área Promedio	σ	CV %
0,0625	19.979	63,640	0,319
0,125	38.572	729,027	1,890
0,25	82.673	493,561	0,597
0,5	164.866	546,594	0,332

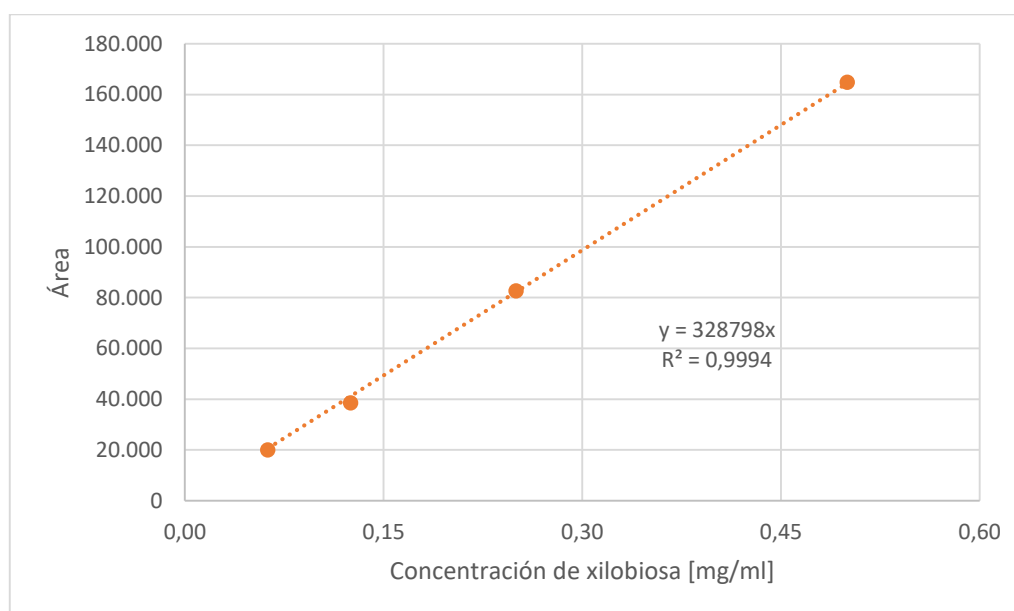


Figura 37: Curva de calibración de xilobiosa para cuantificación por HPLC.

8.13.3. Cuantificación de xilosa y xilobiosa

En base a los datos de absorbancias registrados y las ecuaciones entregadas en la Secciones 8.13.1 y 0, se cuantificó la concentración xilosa y xilobiosa generados durante la reacción de hidrólisis enzimática. Estos resultados se enseñan en la Tabla 49 y Tabla 50.

Tabla 49: Resultados cuantificación de la xilosa producida por la reacción de hidrólisis enzimática de xilano.

Tiempo [min]	Área promedio	σ	CV %	Xilosa [mg/ml]	Xilosa [uM]
0	-	-	-	0	0
30	12.905	1.147,1	8,889	0,017	111,965
90	13.634	651,5	4,779	0,018	118,287
120	14.239	440,0	3,090	0,019	123,533
180	14.971	32,3	0,216	0,020	129,889

Tabla 50: Resultados cuantificación de la xilobiosa producida por la reacción de hidrólisis enzimática de xilano.

Tiempo [min]	Área Promedio	σ	CV %	Xilobiosa [mg/ml]	Xilobiosa [uM]
0	-	-	-	0	0
30	67.929	3.474,0	5,114	0,207	731,985
90	178.079	34.449,3	19,345	0,542	1918,918
120	210.180	32.744,5	15,579	0,639	2264,828
180	257.679	12.681,0	4,921	0,784	2776,669