

Marc Navarro Boleda

**ESTUDIO DE LA HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DEL
SALMOSAN EMPLEADO EN NUTRICIÓN ANIMAL**

TRABAJO FIN DE GRADO

Dirigido por la Dra. M. Soledad Larrechi

Grado de Química



**UNIVERSITAT
ROVIRA I VIRGILI**

Tarragona

2019

Abstract

Keywords: Salmosan, Beta-galactomannans, spectroscopy, ultraviolet-visible, near infrared.

Salmosan is a product used in animal nutrition to prevent salmonella infections. Salmosan is mainly formed by β -galactomannans and β -mananasa enzymes. The purpose of this work is to study the enzymatic hydrolysis of β -galactomannans in the same process conditions as the intestinal tract of the birds in order to determine the effect of both the enzyme concentration and the medium in the hydrolysis. In intestinal tract conditions the reaction has been monitored by using infrared spectroscopy. The results are analysed using principal component analysis and evolving factor analysis.

Finally the conclusions obtained from the results are the following.

- a) The analytical methodology is proved to be valid for the study of the enzymatic hydrolysis of Salmosan.
- b) The enzyme concentration factor must be controlled to prevent the infection along the intestinal tract.
- c) In the crop and gizzard region of the intestinal tract, there is presence of pepsine enzyme which competes with the β -mananasa causing a delay in the β -galactomannans hydrolysis.
- d) In the last part of the intestinal tract (duodeno, yeyuno and ileon), the hydrolysis is reactivated due to the presence of pancreatine.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	4
2. OBJETIVO	6
3. FUNDAMENTOS TEÓRICOS	7
3.1 Hidrólisis enzimática de polisacáridos (reducción).....	7
3.2. Infrarrojo cercano (SW-NIR).....	9
3.3. Análisis multivariante de datos espectrales.....	9
3.3.1. Pretratamiento de datos espectrales.....	10
3.3.2. Análisis de componentes principales (PCA)	10
3.3.3. Análisis de factores emergentes (Evolving Factor Análisis, EFA).....	11
4. PARTE EXPERIMENTAL	12
4.1. Muestra analizada y situaciones químicas.....	12
4.2. Reactivos empleados.....	13
4.3. Espectrofotómetro infrarrojo y material.....	13
4.4. Procedimiento de análisis y adquisición de los espectros.....	14
4.5. Adquisición de espectros y software empleado	15
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	16
5.1. Hidrólisis enzimática del Salmosan a pH= 3.....	16
5.2. Efecto de la concentración de la enzima en la hidrólisis enzimática del Salmosan a pH=3.....	19
5.3. Hidrólisis enzimática del Salmosan a pH=3 en presencia de pepsina.....	22
5.4. Hidrólisis enzimática del resultado final del punto 3, a pH= 6,8 y en presencia de pancreatina.....	25
6. CONCLUSIONES	28
7. BIBLIOGRAFÍA	30

1. INTRODUCCIÓN

Antes de los años 60 la utilización de antibióticos como promotores del crecimiento y control de enfermedades era lo habitual. Pero a principios de los 60 se empezó a conocer que esta práctica tenía altos riesgos ya que podían generarse resistencias a los antibióticos en los animales.

En 1970 la comunidad europea publicó el directivo 70/524 donde se empezaba a regular estas prácticas. Esta directiva se ha llegado a modificar más de un centenar de veces hasta la fecha. En el año 2003 se tenía más presente el gran riesgo que se corría a que se desarrollaran resistencias a los antibióticos en la alimentación animal y la unión europea prohibió el uso de promotores de crecimiento antibiótico en la alimentación animal (Reglamento [CE]nº1831/2003) ⁽¹⁾. En consecuencia, fue necesario encontrar nuevas alternativas para el control y la prevención de las enfermedades en los animales.

Una de las enfermedades que se controlaban mediante antibióticos era la salmonelosis, causada por la bacteria *salmonella*. En este trabajo se pretenderá investigar sobre un método para el control de dicha enfermedad. Esta bacteria se contagia principalmente por vía oral y se adhiere a la pared intestinal como paso previo a la infección, en su estructura contiene fimbrias, apéndices anclados a la membrana externa de la bacteria, que contienen adhesinas, proteínas encargadas de reconocer a un receptor con gran especificidad como son las manosas ubicadas en la superficie celular de la pared intestinal ⁽²⁾. En la figura 1.1 podemos observar una fotografía en el microscopio de la adhesión de la salmonela junto con un dibujo explicativo de la misma.

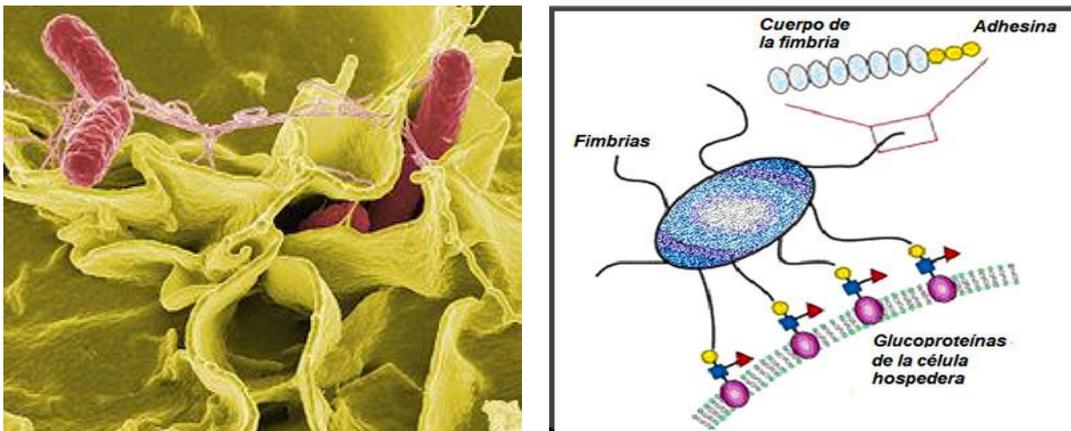


Fig. 1.1 Adhesión de una bacteria *Salmonella* a una célula (Font: https://www.abc.es/salud/enfermedades/abci-salmonelosis-culpa-flora-intestinal-201807261728_noticia.html).

Sabiendo esto, el objetivo fue proporcionar al animal en su ingesta compuestos que contuviesen manosas, así habría competencia en la adhesión de la bacteria entre las manosas del compuesto y las manosas de la pared intestinal.

En la actualidad para la prevención de la salmonelosis se añade en el pienso animal el producto llamado SALMOSAN, Figura 1.2. Un producto que contiene β -galactomananos (fuentes ricas en manosas), enzima beta-mananasa y dispersantes. Se conoce que ambos compuestos reaccionan entre sí para liberar manosas ⁽³⁾.

Pero se desconoce el tiempo que transcurre desde la ingesta del producto hasta que empiezan a liberarse las manosas, como tampoco se conoce en qué parte del intestino ocurre esto.

El conocimiento estricto de los aspectos indicados requiere la monitorización de la reacción en condiciones representativas del proceso que tiene lugar en el aparato digestivo de los animales para el análisis de los compuestos que se liberan.

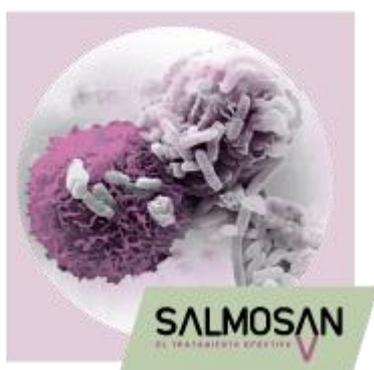


Fig. 1.2 Salmosan adherido a salmonella (Font: <https://nutricionanimal.info/salmosan/>)

Antecedentes

En un trabajo previo ⁽⁴⁾ dentro del grupo de investigación en el que he realizado este trabajo, se estableció una metodología analítica basada en el seguimiento de la reacción mediante espectroscopia UV-Vis-NIR y tratamiento quimiométrico de los datos espectrales, a fin de determinar si la reacción transcurre en diferentes etapas, en qué tiempo se producen los cambios y en qué condiciones están más favorecidos. El estudio se llevó a cabo empleando como fuentes de β -galactomananos diferentes gomas vegetales (garrofín, AZO-galactomanano y guar), con diferentes proporciones mananosa/galactosa en su estructura. La Figura 1.3. Muestra un ejemplo de los espectros obtenidos al monitorizar mediante esta técnica la hidrólisis de un Azo-galactomanano en presencia de mananasa.

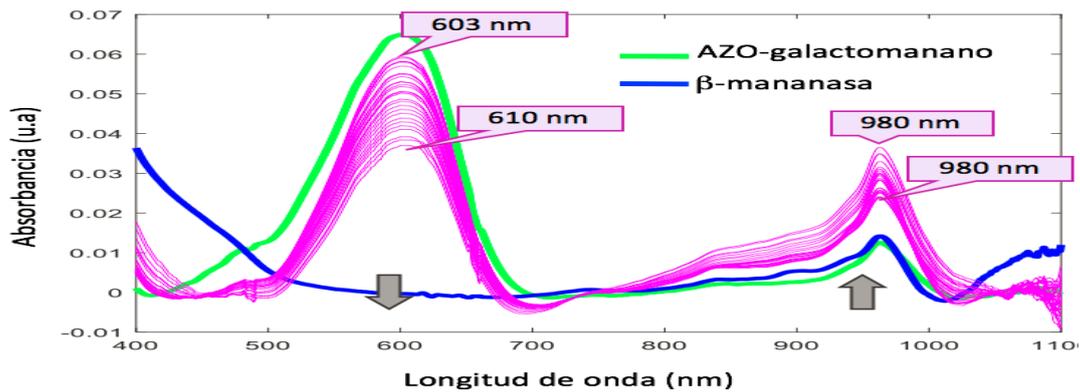


Fig. 1.3 Hidrólisis de AZO-galactomananos en presencia de β -galactomananos a $Ph=3$ ⁽⁴⁾

Los resultados encontrados, permitieron concluir que la metodología planteada parecía ser una alternativa válida para el control del proceso que se lleva a cabo en estas reacciones.

El objetivo general del trabajo es continuar avanzando el estudio de estos procesos, tal y como se detalla a continuación.

2. OBJETIVO

El objetivo general del trabajo es el estudio de la hidrólisis enzimática del Salmosan, simulando las condiciones del tránsito intestinal de las aves, Figura 2.1.

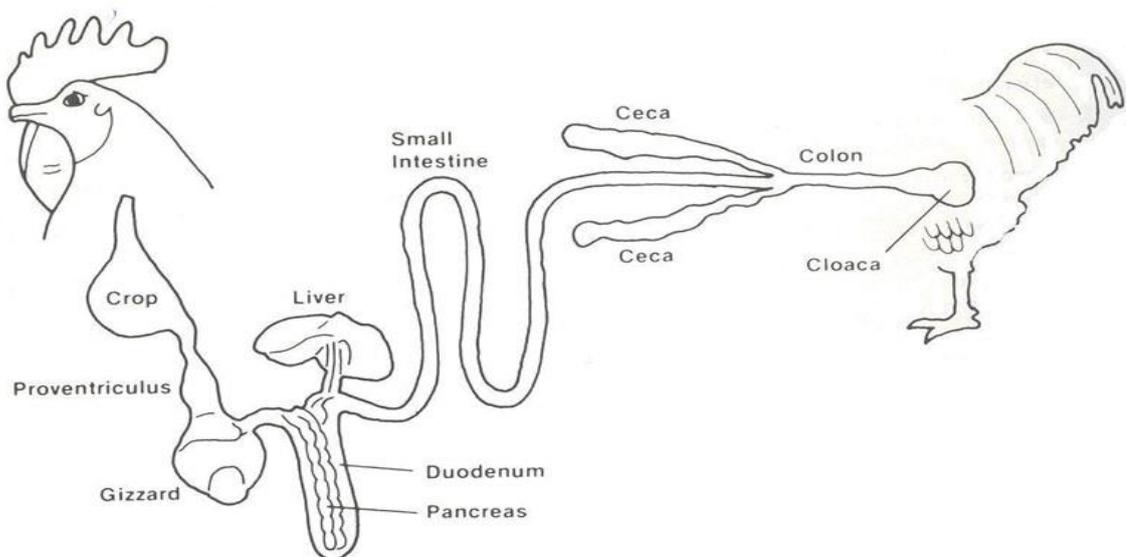


Fig. 1.1 Anatomía y aparato digestivo avícola ⁽⁵⁾.

En la Tabla 1 se refleja tanto el tiempo de residencia del alimento en el sistema digestivo como el pH en cada zona.

Tabla 1 Tiempos de residencia del Salmosan en el tracto intestinal⁽⁵⁾

Partes del sistema digestivo	pH	Tiempo en tránsito(min)
Buche (crop)	5.5	10 a 50
Molleja (gizzard)	2.5 a 3.5	30 a 90
Duodeno	5 a 6	5 a 10
yeyuno	6.5 a 7	20 a 30
ileón	7 a 7.5	50 a 70

Este objetivo general involucra los siguientes objetivos específicos:

- 1.** Estudio de la hidrólisis enzimática del Salmosan a pH= 3. Su finalidad es comparar su comportamiento con los resultados obtenidos en los antecedentes cuyos reactivos (β -galactomananos y enzima estaban libres de impurezas).
- 2.** Estudio del efecto de la concentración de la enzima en la hidrólisis enzimática del Salmosan a pH=3. Su finalidad es estudiar el efecto de la concentración de la enzima y su actividad enzimática. Dado que es conocido que la actividad de la enzima tiene una determinada caducidad.
- 3.** Estudio de la hidrólisis enzimática del Salmosan a pH=3 en presencia de pepsina. Su finalidad es evaluar la hidrólisis en condiciones representativas de la zona gástrica de las aves (molleja y buche).
- 4.** Estudio de la hidrólisis enzimática del resultado final del punto 3, a pH= 6,8 y en presencia de pancreatina. Su finalidad es el estudio de la hidrólisis en condiciones representativas del tracto intestinal (duodeno, yeyuno e ileón).

3. FUNDAMENTOS TEÓRICOS

En este apartado se presenta una breve introducción de los fundamentos teóricos involucrados en este trabajo: La hidrólisis enzimática de los polisacáridos, la espectroscopia infrarroja y los métodos del análisis multivariante empleados para el análisis de los espectros infrarrojos obtenidos durante la reacción de hidrólisis en las condiciones indicadas en los objetivos.

3.1 Hidrólisis enzimática de polisacáridos (reducción)

Los galactomananos, cuya estructura química se muestra en la Figura 3.1., son convertidos en galactosa y mano-oligosacáridos con la utilización de enzimas.

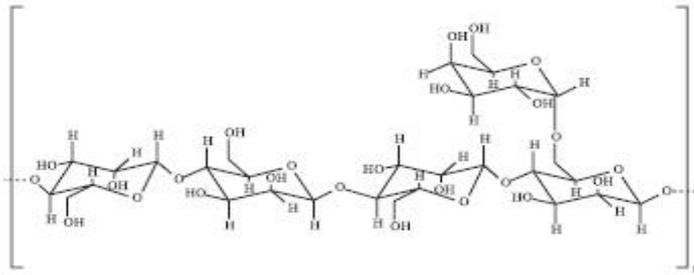


Fig. 2.1 Estructura química de un galactomanano ⁽⁶⁾

De acuerdo a la información suministrada por la casa comercial que proporciona el Salmosan ⁽⁶⁾, su producto en presencia de β-mananasa reacciona y la reacción transcurre en diversas etapas esquematizadas a continuación:

(β-mananasa)

(1) Galactomanano + H₂O → Galactomanano-oligomeros

(β-mananasa+ α-galactosidasa)

(2) Galactomanano-oligomeros + H₂O → D-galactosa + mano-oligomeros

(β-Galactosa desidrogenasa)

(3) D-galactosa + NAD⁺ → ácido D-galaconico + NADH + H⁺

En la Figura 3.2. se esquematiza la hidrólisis de los polisacáridos en presencia del agua. La hidrólisis de un enlace glucosídico se lleva a cabo mediante la disociación de una molécula de agua. El hidrógeno del agua se une al oxígeno del extremo de una de las moléculas de azúcar, el OH se une al carbono libre del otro residuo de azúcar y se rompen las uniones covalentes del polisacárido. El resultado de esta reacción, es la liberación de monosacáridos.

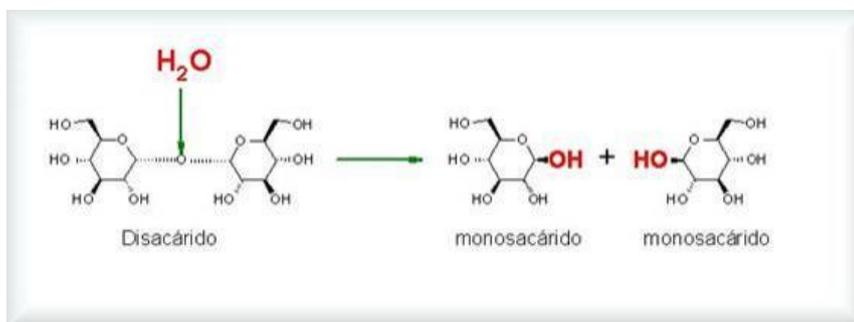


Fig. 3.2 Hidrólisis polisacárido (Font: <https://modelode.com/modelos/ld-hidrolisis-de-carbohidratos.php>).

3.2. Infrarrojo cercano (SW-NIR)

La región espectral del NIR abarca un rango de longitud de ondas comprendido entre 780nm (13000cm^{-1}) hasta los 2500nm (4000cm^{-1}). En esta franja se observan principalmente vibraciones características de los sobretonos y las bandas de combinación de las vibraciones y tensiones fundamentales de los enlaces C-H, N-H y O-H, en el infrarrojo medio. Concretamente se ha trabajado en la región de las longitudes de onda más cortas, del infrarrojo cercano, entre 780nm (13000cm^{-1}) y 1100nm (9091cm^{-1}) (SW-NIR). Dado que la muestra a analizar, el Salmosan contiene en su estructura grupos -NH; OH y CH, esta técnica es idónea para el estudio del objetivo planteado ⁽⁷⁾.

A las longitudes de onda característica de cada uno de los enlaces indicados, la señal registrada en el espectro; la absorbancia (A) se relaciona con la cantidad de sustancia, concentración, mediante la Ley de Beer, Ec.3.1.

$$A = -\log(T) = L \cdot \varepsilon \cdot C \quad \text{Ec. (3.1)}$$

A= Absorbancia
T= Transmitancia
L= Longitud de la cubeta
 ε = Absortividad
C= Concentración

3.3. Análisis multivariante de datos espectrales.

En este apartado se describe brevemente los fundamentos teóricos del pretratamiento de los datos espectrales obtenidos en cada experimento y de los métodos de análisis multivariante, el análisis de componentes principales (PCA) ⁽⁸⁾ y del análisis de factores emergentes (EFA) ^(9,10) empleados para el análisis conjunto de los cambios registrados a todas las longitudes de onda durante la reacción de hidrólisis.

3.3.1. Pretratamiento de datos espectrales

- Ajuste de la línea base y suavizado.

Cuando se trabaja con un espectrofotómetro de un solo haz, como el empleado en el laboratorio, UV-Vis-NIR Cary 8453 UV-Vis, es habitual observar un desplazamiento vertical de los espectros cuando se realizan análisis sucesivos de la misma muestra. Este desplazamiento puede afectar de forma diferente en función de la longitud de onda considerada, ocasionando lo que se conoce como deriva instrumental en el espectro registrado ⁽¹¹⁾. Por ello previo al análisis de los espectros obtenidos ambos efectos, desplazamiento de línea base y deriva espectral, fueron corregidos empleado la función de corrección de línea base por mínimos cuadrados de PLS-Tool box v7 (The Eigen, research, Manson, Wa).

3.3.2. Análisis de componentes principales (PCA)

El PCA es un método de reducción de variables mediante el cual se sustituyen las variables originales por unas nuevas variables denominadas componentes principales (PCs). Las nuevas variables, son combinaciones lineales de las variables originales que siguen la dirección de máxima variación en los datos y por lo tanto retienen el máximo de información ⁽¹²⁾.

Cuando este método se aplica a los datos de una matriz **M** de datos espectrales de dimensiones ($n \times m$) siendo n en el conjunto de espectros registrados al largo de la reacción en estudio, y m el número de valores de absorbancia registrado en cada espectro, y dado que es habitual que $n \ll m$, el número de componentes principales “i” que se pueden calcular es $n-1$. La expresión general de un componente principal es la reflejada en la ecuación:

$$PC_i = a_{1i}A_{\lambda,1} + a_{2i}A_{\lambda,2} + \dots + a_{mi}A_{\lambda,m} \quad \text{Ec. (3.2)}$$

Siendo $a_{1i}, a_{2i}, \dots, a_{mi}$ los valores de los coeficientes de los vectores que acompañan a los valores propios que se derivan de la descomposición de la matriz **M**. Cuando esta descomposición se hace efectuada de acuerdo a la descomposición de valores singulares (SVD) ⁽¹³⁾ esta descomposición obedece a la ecuación (3.3)

$$\mathbf{M} = \mathbf{U} \mathbf{W} \mathbf{V}^T \quad \text{Ec. (3.3)}$$

El producto de las matrices **U** y **W** contiene los valores de la denominada matriz de los “scores” y la matriz **V^T** los valores de la matriz de los “loadings o coeficientes”. En el caso de los datos espectrales analizados en este trabajo, los “scores” son los valores de cada

espectro en cada nueva variable o PC y los “loadings” son los valores de los coeficientes $a_{xi}, x= 1.....m$, que acompañan a cada valor de absorbancia en las nuevas PC de acuerdo en la ecuación 3.2.

Utilizare este vocabulario cuando comente los resultados obtenidos en el análisis PCA de las matrices que contienen los datos espectrales.

3.3.3. Análisis de factores emergentes (Evolving Factor Analysis, EFA)

La idea fundamental del análisis de factores emergentes (EFA) ^(9,10) es analizar la evolución de los componentes principales a medida que incrementamos el número de datos (espectro) en la matriz de datos. Este método permite analizar comparativamente la importancia de cada factor al largo de la experimentación considerada. Estableciendo un criterio para determinar de cuando la aportación de un factor es significativa, es posible visualizar en que momento del análisis emergen los factores y por lo tanto determinar situaciones químicas diferentes a lo largo del análisis.

La Figura 3.3, muestra a modo de ejemplo el resultado de un análisis EFA sobre una matriz **M** de datos espectrales de dimensiones (28 x 300). En el eje de las y se representa el valor del log (eigen values, λ) y en el eje de las x el valor del nº de espectro en las filas de la matriz **M**. El valor de λ se obtiene de las soluciones de la ecuación 3.3. Concretamente son los valores de la diagonal en la matriz W y cada valor λ lleva asociado un % de varianza.

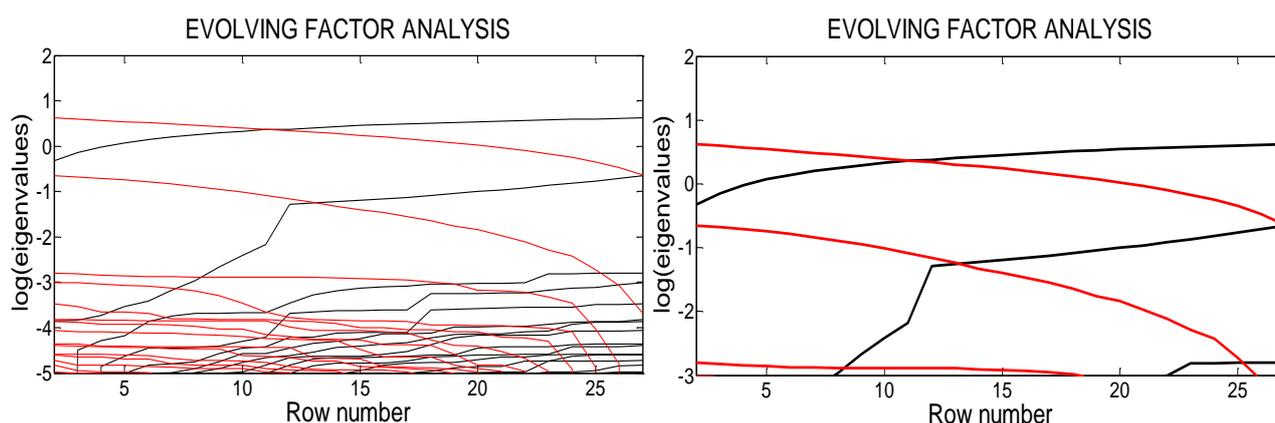


Fig. 3.3 Resultados EFA de una matriz de datos espectrales **M** (28 x 300) a) resultados completos. b) muestra los factores para $\log(\text{eigenvalues}) = -3$.

El análisis EFA comienza aplicando la descomposición de los valores singulares a una sub-matriz que contiene solo las dos primeras filas de la matriz de datos inicial **M**. A continuación, se agrega el tercer espectro de la matriz de datos a la sub-matriz inicial

para calcular los nuevos valores de W que resultan al agregar una nueva fila. Este proceso se repite hasta completar el total de filas que componen la matriz de datos. Al final la matriz W contiene los 27 valores propios que se pueden calcular de la ecuación 3.3. Este mismo proceso se repite en la dirección contraria, es decir, partiendo de las dos últimas filas de la matriz de datos y realizando el análisis de abajo hacia arriba del conjunto de datos. Como se ilustra en la Figura 3.3.a. Los logaritmos decimales de los valores de λ calculados en cada etapa se representa en función del número de espectros considerados en ella. A continuación, fijando un valor de $\log(\lambda)$ como umbral para considerar que un factor es significativo, es posible estimar la cantidad de componentes principales que contribuyen a la variabilidad de los datos experimentales en un momento dado. En el ejemplo de la Fig.3.3 b este umbral se ha fijado en $\log \lambda = -3$. Y se visualizan en ambos sentidos, que 3 factores superan este valor umbral. Pero además se ve que, al nivel de significancia considerado, la variabilidad de los datos recogida en los 9 primeros espectros se puede interpretar con un solo factor. La variabilidad de los datos de los 22 espectros se puede interpretar con dos factores y para la variabilidad del total de los 28 espectros se necesitan 3 factores. Por tanto, se pueden considerar tres situaciones químicas diferentes en los datos analizados.

4. PARTE EXPERIMENTAL

4.1. *Muestra analizada y situaciones químicas.*

En el presente trabajo se analizó el Salmosan un producto de origen vegetal que es rico en β -galactomananos, la muestra fue proporcionada por el laboratorio IRTA ⁽¹⁴⁾. Para el trabajo con el Salmosan no es necesario tomar ninguna precaución adicional debido a que el producto no presenta ningún tipo de riesgo ni peligro.

Para dar cumplimiento a los objetivos específicos planteados, la monitorización del proceso de degradación de los polisacáridos presentes en Salmosan con el transcurso del tiempo se llevó a cabo en las siguientes condiciones:

- 4.2.1. Salmosan a pH=3, durante 120 minutos
- 4.2.2. Salmosan a pH=3 en presencia de β -mananasa, durante 120 minutos
- 4.2.3. Salmosan a pH=3 en presencia de pepsina durante 105 minutos
- 4.2.4. Producto final de la etapa (4.3.3), a pH=6.8 y en presencia de pancreatina durante 120 minutos

Los tiempos considerados están dentro de los valores de residencia del alimento en el sistema digestivo referenciado en la literatura (tabla 1).

4.2. *Reactivos empleados.*

Para realizar la experimentación se requirió el uso de soluciones preparadas con antelación:

- Solución 0.1 M de tampón de $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ (pH=6.0)
- Solución 0.2 M de tampón de $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ (pH=6.8)
- Solución 0.1 M de NaOH
- Solución 1.0 M de HCl
- Solución 0.2 M de HCl
- Solución 2.0 M de NaAcO/HAcO (pH=3)
- Solución de pepsina (0.01g/ml)
- Solución de pancreatina (0.05g/ml)
- Solución de mananasa (0.02g/ml)

El pH se ajustó con las respectivas soluciones de HCl y NaOH.

4.3. *Espectrofotómetro infrarrojo y material.*

En la Figura 4.1 se muestra el montaje experimental empleado para monitorizar la hidrólisis de los galactomananos con el tiempo.

Dicho montaje, constaba de:

- Una placa calefactora con agitador magnético FB15001 de la casa Fisher Scientific con un intervalo de temperatura de 0°C y 370°C.
- Un cristalizador con una capacidad de 500ml.
- Un soporte con pie.
- Dos pinzas con sus respectivas nueces.
- Una sonda de temperaturas.
- Una micropipeta.
- Una cubeta Helma para el espectrofotómetro.

Situado en la proximidad del espectrofotómetro Cary 8453 UV-VIS-NIR de la casa Agilent.



Fig. 4.1 Montaje para la digestión y espectrofotómetro situados en proximidad para mejor control.

4.4. Procedimiento de análisis y adquisición de los espectros.

A continuación, se detalla el procedimiento llevado a cabo para preparar las muestras antes de registrar sus espectros a lo largo del tiempo de los diferentes experimentos indicados en los apartados (4.1.1 ----- 4.1.4).

En un vial se mezclaron 0.2g de Salmosan y se diluyeron con 8ml de H₂O destilada a una temperatura de 40°C, se introdujo un imán y con ayuda de la placa e intercalándola con agitación manual se agito durante 10 minutos para asegurarnos de disolver el producto.

Seguidamente se añadió 1 ml de la solución de NaAcO/HAcO 2M se agito vigorosamente y se comprobó que el pH=3. Con el objetivo de separar la parte solubilizada de la mezcla total se centrifugo durante 10 minutos a 4000rpm.

Se separó el sobrenadante decantándolo y tenemos la muestra lista para el análisis que se describe a continuación.

Preparamos el montaje tal y como vemos en la figura (4.1), se sumerge el vial con el sobrenadante en un cristizador con H₂O y este estando sobre la placa calefactora, dentro del vial se introdujo un imán magnético para mantener la muestra completamente homogeneizada, la temperatura de la muestra fue controlada con una sonda magnética y cuando la muestra alcanzo los 41°C se empezaron los análisis, el rango de temperaturas siempre fue 40-43°C.

A tiempos controlados se extrae una alícuota suficiente para llenar la cubeta y registrar un espectro NIR y una vez adquirido se retorna el contenido al vial para seguir con la monitorización. El tiempo transcurrido entre la manipulación de muestra, el registro del espectro nunca fue superior a 60 segundos.

La monitorización de la degradación a pH=3 de los polisacáridos presentes en el Salmosan, (experimento 4.1.1) no requiere manipulación adicional a la indicada.

La degradación en presencia de mananasa (experimento 4.1.2), y pepsina (experimento 4.1.3), requirió añadir 1ml i 250µL de las respectivas soluciones de las enzimas de mananasa (0.02g/ml) y pepsina (0.01g/ml) una vez se había mezclado el Salmosan con el agua.

Para la degradación en presencia de pancreatina se llevó a pH=6.8 la solución de pepsina monitorizada anteriormente y se le añadió 1ml de solución (0.05g/ml) de pancreatina para monitorizarse a continuación.

4.5. Adquisición de espectros y software empleado

Para realizar la medida, el cero del instrumento se realizó empleando agua destilada con NaAc. Los espectros se registraron entre 700nm y 1100nm con un intervalo de medida de 1nm.

En las tablas siguientes se muestran de forma detallada el número de espectros recogidos durante el tiempo de duración de los análisis. Se puede observar como los tiempos de residencia del producto en las diversas partes del cuerpo del pollo son inferiores a los tiempos transcurridos durante el análisis.

Tabla 4.1 Intervalo de medidas de las reacciones (4.1.1//4.1.3)

Tiempo entre espectros (min)	Tiempo de medida(min)	Espectros obtenidos
1	0-5	5
2	5-15	5
5	15-60	8
10	60-90	3
15	90-120	2
Total	120	23

Para el análisis del salmosan + pancreatina se requirió primero hacer el análisis de la pepsina tal y como se especificaba en el guion de trabajo e la empresa IRTA

Tabla 4.2 Intervalo de medidas salmosan + pancreatina (4.1.4)

Tiempo entre espectros (min)	Tiempo de medida(min)	Espectros obtenidos
1	0-5	5
2	5-15	5
5	15-40	5
10	40-80	4
15	80-120	2
Total	120	21

Todos los espectros obtenidos se guardaron en el software 8453UV-visible ONLINE en formato SD y se exportaron como archivos CSV compatibles con el formato Matlab. Estos archivos se trataron en Excel para poder crear la matriz de datos en MATLAB.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Hidrólisis enzimática del Salmosan a pH= 3.

En la figura 5.1 se muestran los espectros obtenidos al monitorizar la muestra de Salmosan a pH=3. Se observa una banda ancha alrededor de 973 nm. En esta región espectral (800-1100 nm) aparecen los sobretonos de los grupos funcionales –OH, CH y NH, en nuestro caso presentes en los reactivos H₂O y el propio Salmosan y en la estructura química de la enzima.

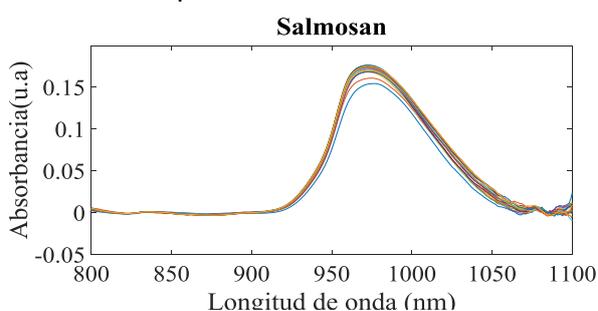


Fig. 5.1 Espectros NIR Salmosan

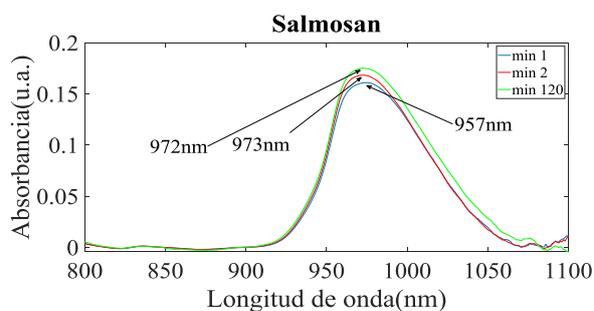


Fig. 5.2 Espectros NIR Salmosan

Se observa que la intensidad de la banda aumenta y a la vez existe un cierto desplazamiento hipsocrómico del pico hacia longitudes de onda menores. El análisis detallado de la evolución de la banda con el tiempo permitió detectar que en el primer minuto había un cambio pronunciado respecto a los siguientes tiempos, y para su visualización el espectro 1, 2 y el final se han aislado en la Figura 5.2.

El incremento en los valores de intensidad del pico alrededor de 973 nm es lo que cabe esperar del hidrólisis enzimática planteada en la Fig 3.2. Así mismo, el mencionado desplazamiento hipsocrómico (frecuencias de vibración más altas // longitudes de onda más cortas) es atribuible a la presencia de mayor cantidad de –OH libres respecto a la molécula inicial (18).

Una aproximación a la determinación de los componentes que contribuyen a la variabilidad espectral registrada, es el análisis de los componentes principales (PCA), sobre la matriz de datos $\mathbf{M}_{\text{salmosan}}$, cuyos resultados se muestran y discuten a continuación.

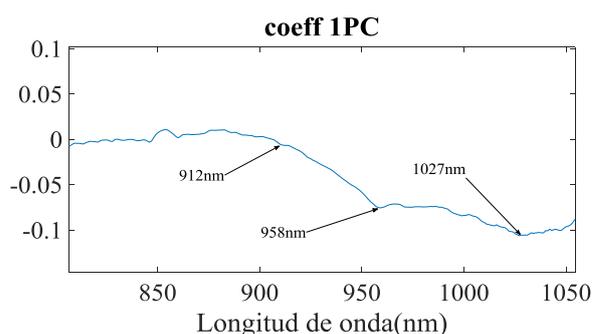
Los valores de % de varianza explicado por los 5 primeros componentes principales, se muestran en la Tabla 5.1 Su valor determinar la significancia de estos componentes y representan las diferentes fuentes de variabilidad implícitas en los datos analizados. Se puede observar que el valor de los dos primeros es significativamente mayor que el de los otros y que en los tres primeros ya tendríamos explicado un 97% de la variabilidad espectral.

Tabla 5.1 . %Varianza explicada por los 5 primeros PC obtenidos al analizar los datos espectrales de los experimentos indicados en la sección 4.1

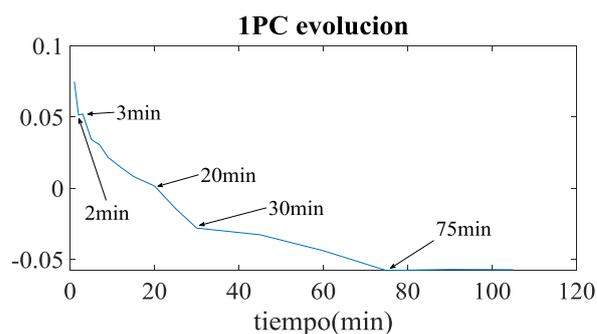
Experimentos	(%varianza explicada)					
	PC1	PC2	PC3	PC4	PC5	Total
Salmosan	77.93	15.44	2.31	1.66	0.84	98.18
Salmosan+mananosa	82.14	3.16	2.13	1.86	1.50	90.79
Salmosan+pepsina	52.12	13.40	10.08	7.58	5.45	88.63
Salmosan+pepsina+pancreatina	41.63	28.96	11.31	6.04	4.17	92.11
Garrofin+mananasa	84.30	14.68	0.58	0.11	0.09	99.76

Las Figuras 5.3 pertenecientes al análisis del Salmosan expuestas a continuación, muestran los valores de los coeficientes, Figuras 5.3 (A, C, E) de cada PC versus las longitudes de onda y de los scores Figuras 5.3 (B, D, F) versus el tiempo de los tres primeros componentes principales (95.68% de varianza en total).

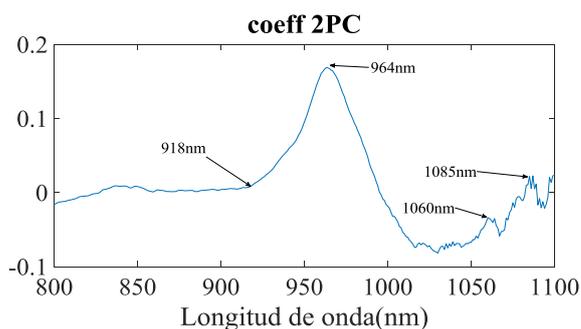
A)



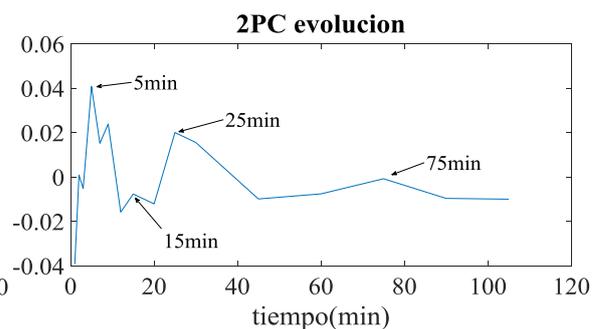
B)



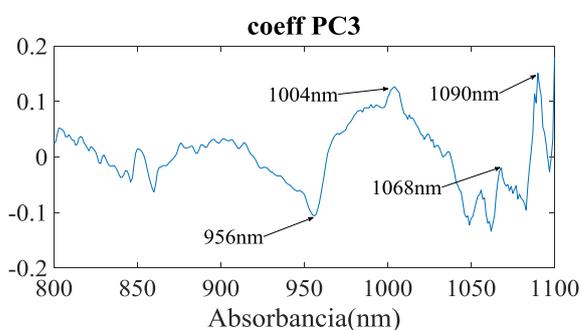
C)



D)



E)



F)

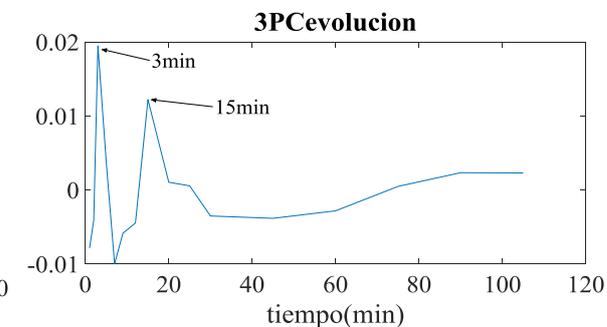


Figura 5.3. Representación de valores de los coeficientes, de los tres primeros componentes principales Salmosan versus las longitudes de onda Figuras 5.3 (A, C, E) y de los scores versus el tiempo. Figuras 5.3(B, D, F).

Claramente el perfil mostrado en la Figura 5.3.B, corresponde a la evolución de un reactivo, el Salmosan que sabemos que es una mezcla de polisacárido y la enzima mananasa. También se observa que el gradiente de los cambios varía en función del tiempo, lo que sugiere un proceso que involucre distintas etapas, como no indica la información aportada por el grupo IRTA. El perfil de los coeficientes asociados a este componente, Figura 5.3A, muestran valores distintos de cero para las longitudes de onda comprendidas entre 920 y 1100. Siendo mayores los comprendidos entre 1000 nm y 1100 nm. Lo cual sugiere que sea representativo de la enzima mananasa.

El espectro asociado al segundo PC, Figura 5.3C, es característico de los grupos OH-. Cabe señalar que el máximo del pico característico de los grupos OH aparece desplazada a 964 nm lo que sugiere que sea representativo de grupos -OH más libres y por tanto atribuible al producto de reacción formado. La interpretación de la evolución con el tiempo de los espectros en este PC, Figura 5.3D, no es tan sencilla. Entre el minuto 1 y 15 se observa un pico con un máximo alrededor del minuto 10 y luego otro máximo

alrededor de 25 min. Este comportamiento hace pensar en la presencia de diversas reacciones simultáneas.

Similar interpretación a la realizada para este componente se puede llevar con las Figuras 5.3E y 5.3F. En el espectro de la Figura 5.3E las bandas más significativas aparecen a las longitudes de onda típicas del OH y del NH, ambos presentes en la mezcla de reacción. Las formas de la evolución con el tiempo de los scores de este factor nuevamente serían representativos de reacciones donde hay un intermedio.

La evolución de estos factores con el tiempo se puede visualizar en la Figura 5.3. obtenida al realizar el análisis EFA sobre la matriz de datos.

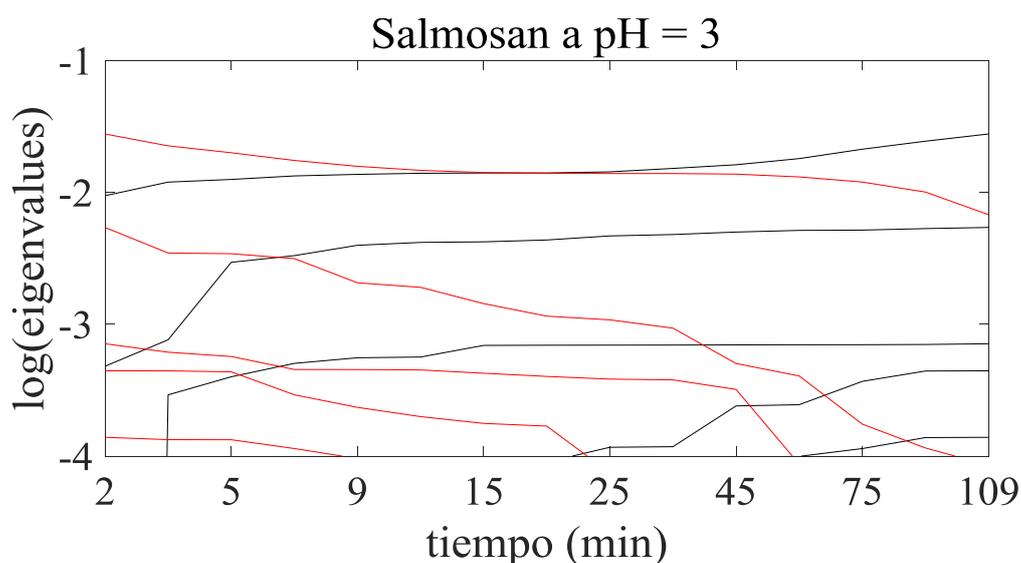


Fig. 5.4 EFA perteneciente al Salmosan

Los dos primeros componentes aparecen desde el principio. El tercer componente en el minuto 3, mientras que el 4º y 5º no aparecen hasta los minutos 14 y 45 respectivamente.

Globalmente estos resultados, coincidían con los que se habían obtenido en el trabajo anterior (6), por lo que se confirmaba que el comportamiento del Salmosan era similar al que se había constatado con las gomas vegetales puras (garrofin, guar, etc).

5.2. Efecto de la concentración de la enzima en la hidrólisis enzimática del Salmosan a pH=3.

Los resultados de los espectros obtenidos en el experimento llevado a cabo cuando al Salmosan se le había añadido mananasa, matriz de datos $\mathbf{M}_{\text{salmosan+mananasa}}$, para evaluar el efecto de la concentración de esta enzima en el Salmosan se muestran en la Figura 5.5.

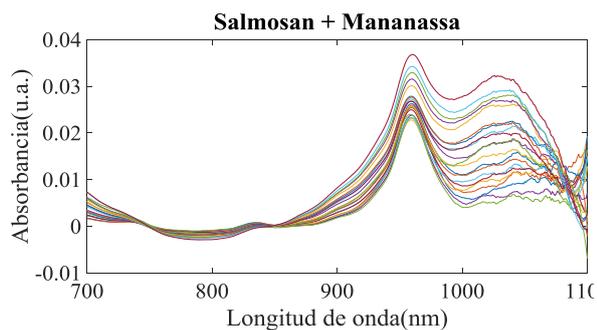


Fig. 5.5 Espectro NIR correspondientes al experimento Salmosan + mananassa

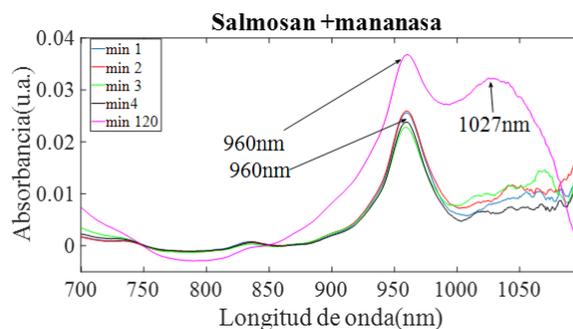


Fig. 5.6 Espectro NIR correspondientes al experimento Salmosan + mananassa

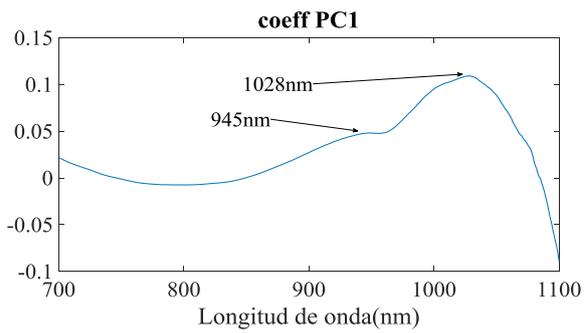
En este caso el pico característico del grupo funcional OH aparece desde el inicio a longitudes de onda menores (958nm), esto es atribuible a una rápida hidrólisis del polisacárido.

Una detallada exploración de los espectros obtenidos permitió observar que el sentido de la evolución de los picos cambia con el tiempo. A modo de ejemplo se muestra la Figura 5.6. En ella se observa que la banda alrededor de 959 nm disminuye hasta el minuto 3 y luego aumenta de nuevo. En el final del análisis, aparece una fuerte banda en la región del grupo $-NH$ (1000-1100 nm). Lo cual se puede atribuir a una ruptura de las estructuras de la enzima. Que facilitaría mayores vibraciones del enlace N-H

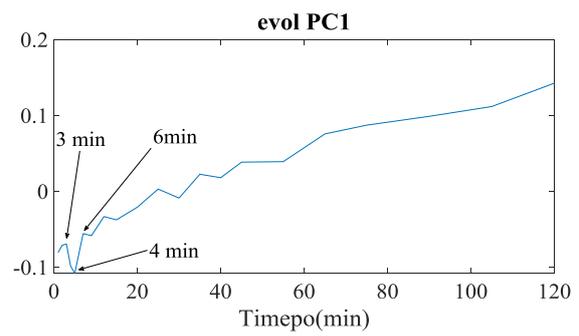
El análisis de componentes principales, confirmó la evolución comentada. La varianza explicada por los cinco primeros componentes es prácticamente del 90%. El 1º PC ya explica un 82% de la varianza, Tabla 5.1.

En la Figura 5.7A se muestran los resultados de los coeficientes del 1PC (82% varianza versus los valores de longitud de onda y de sus scores respecto al tiempo Figura 5.7B. El espectro de la Figura 5.7A es similar al espectro obtenido en el minuto 120, cuando la hidrólisis posiblemente esté muy avanzada. La evolución con el tiempo de los escores, Figura 5.7B, nos muestra un perfil típico de un reactivo entre el minuto 1 y 3, pero a partir de aquí una evolución creciente propia de un producto y atribuible a un avance de la hidrólisis de los polisacáridos. Nuevamente la interpretación de los otros perfiles, que no son tan relevantes, tampoco es sencilla.

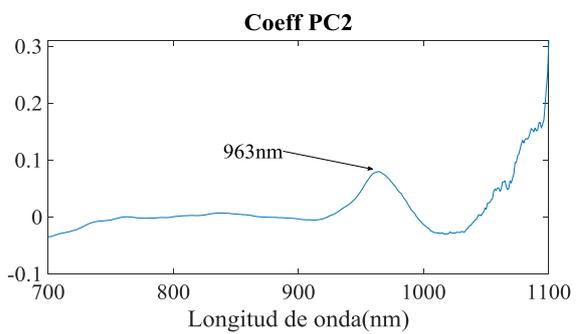
A)



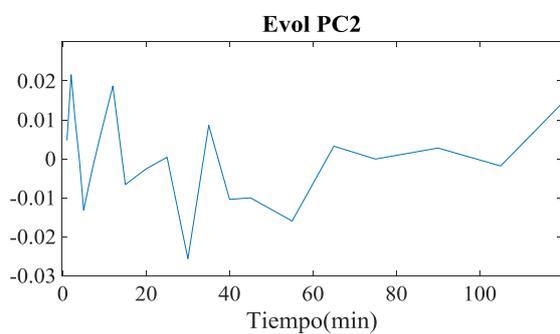
B)



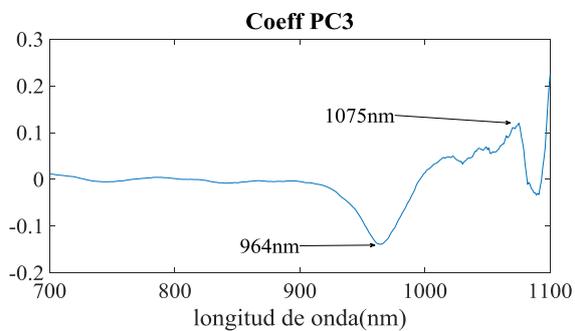
C)



D)



E)



F)

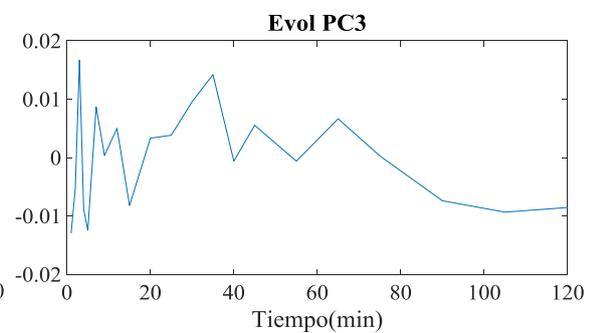


Figura 5.7. Representación de valores de los coeficientes Salmosan+mananasa, de los tres primeros componentes principales versus las longitudes de onda Figuras 5.7 (A, C, E) y de los scores versus el tiempo. Figuras 5.7(B, D, F).

La evolución de los factores con el tiempo se muestra en la Figura 5.8

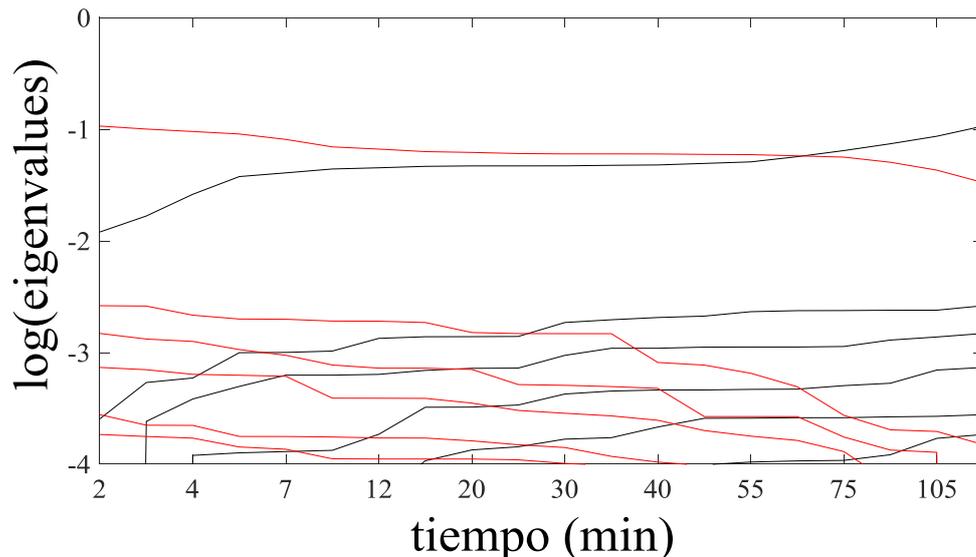


Fig. 5.8 EFA perteneciente al Salmosan + mananasa

En este gráfico se visualiza claramente que la reacción está siendo más rápida, los valores de los valores propios son mayores y salen antes en el tiempo mostrado en la figura 5.4. Este resultado es el que cabía esperar, dado que las velocidades de las reacciones se ven afectadas por las concentraciones de los reactivos, sin embargo proporciona una información útil desde el punto de vista práctico. Si el objetivo es que la mananasa llegue al intestino, para evitar la salmonelosis, no es conveniente trabajar en condiciones que aceleren la reacción, por lo tanto es importante controlar la concentración de la enzima.

5.3. Hidrólisis enzimática del Salmosan a pH=3 en presencia de pepsina.

La Figura 5.9, muestra los espectros obtenidos en condiciones representativas de la zona gástrica de las aves, buche y molleja, (pH= 3, y pepsina). Un aspecto llamativo es que comparativamente en lo comentado en la figura 5.1, las diferencias en el máximo del pico con el tiempo son menores lo cual hace pensar que la pepsina ralentiza la hidrólisis del Salmosan, Para ilustrarlo en la Figura 6.0 se han aislado los espectros a tiempo 1min y tiempo final.

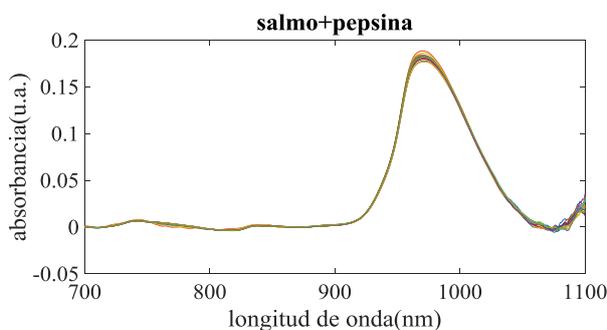


Fig. 5.9 Espectro NIR correspondientes al experimento Salmosan + Pepsina

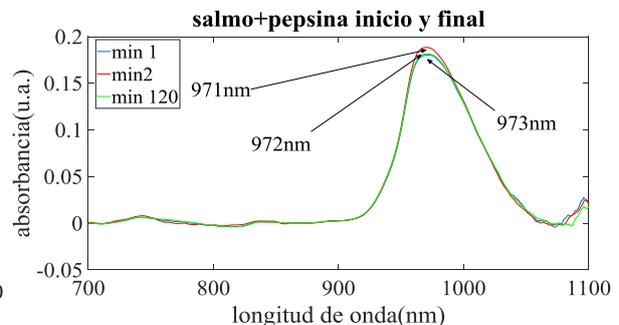


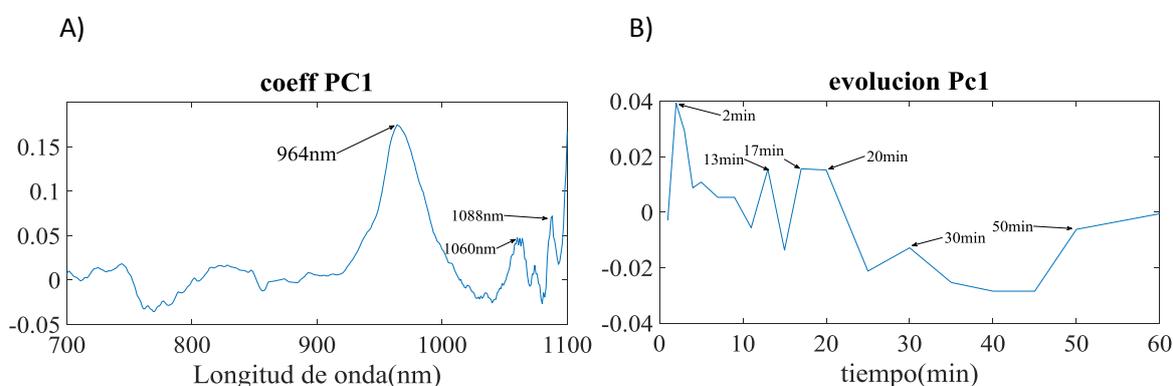
Fig. 6.0 Espectro NIR correspondientes al experimento Salmosan + Pepsina

El análisis de componentes principales, mostró que la varianza explicada por los 5 primeros componentes es relativamente menor a los casos anteriores. El primer componente principal (Tabla 5.1) solo explica un 52% de la varianza y la importancia de los sucesivos componentes es similar. Este hecho es compatible con la presencia de un mayor número de enzimas, la mananasa presente en el Salmosan y la pepsina. En la Figura 6.1A, se muestra los perfiles de los coeficientes y de los scores para el primer componente principal (52 % varianza), y los valores de los coeficientes de los 3 siguientes PC (PC2, PC3 y PC4).

Ahora en la Figura 6.1A, representativa de los coeficientes del 1ºPC, aparecen valores significativos a longitudes de onda características de los -OH más libres (alrededor de 964nm) y también en la región de los -NH (1000-1100nm). Lo que se interpreta como que este PC nos representa la evolución de compuestos en los que hay grupos -OH y -NH más libres. Esto sería compatible con una cierta hidrólisis de los polisacáridos presentes en el Salmosan y de ruptura de las estructuras de las enzimas.

Esto podría justificar la no uniforme evolución del valor de los scores con el tiempo Figura 6.1 B. Al inicio, minuto 2, se ve un relativo incremento de sus valores posiblemente atribuible a la presencia de los fragmentos más pequeños del polisacárido, pero luego aparecen comportamiento de crecimiento y decrecimiento variables, que son difíciles de interpretar.

Cabe resaltar que en la representación de los coeficientes de los PC2 (13% varianza) y PC3 (10%) solo se observan valores diferentes de cero en la zona representativa de los -NH. Lo cual sugiere que en estas condiciones puede haber una cierta interacción química entre ambas. En el 4º PC (7% varianza), Figura 6.1E vuelven a aparecer las bandas de los polisacáridos.



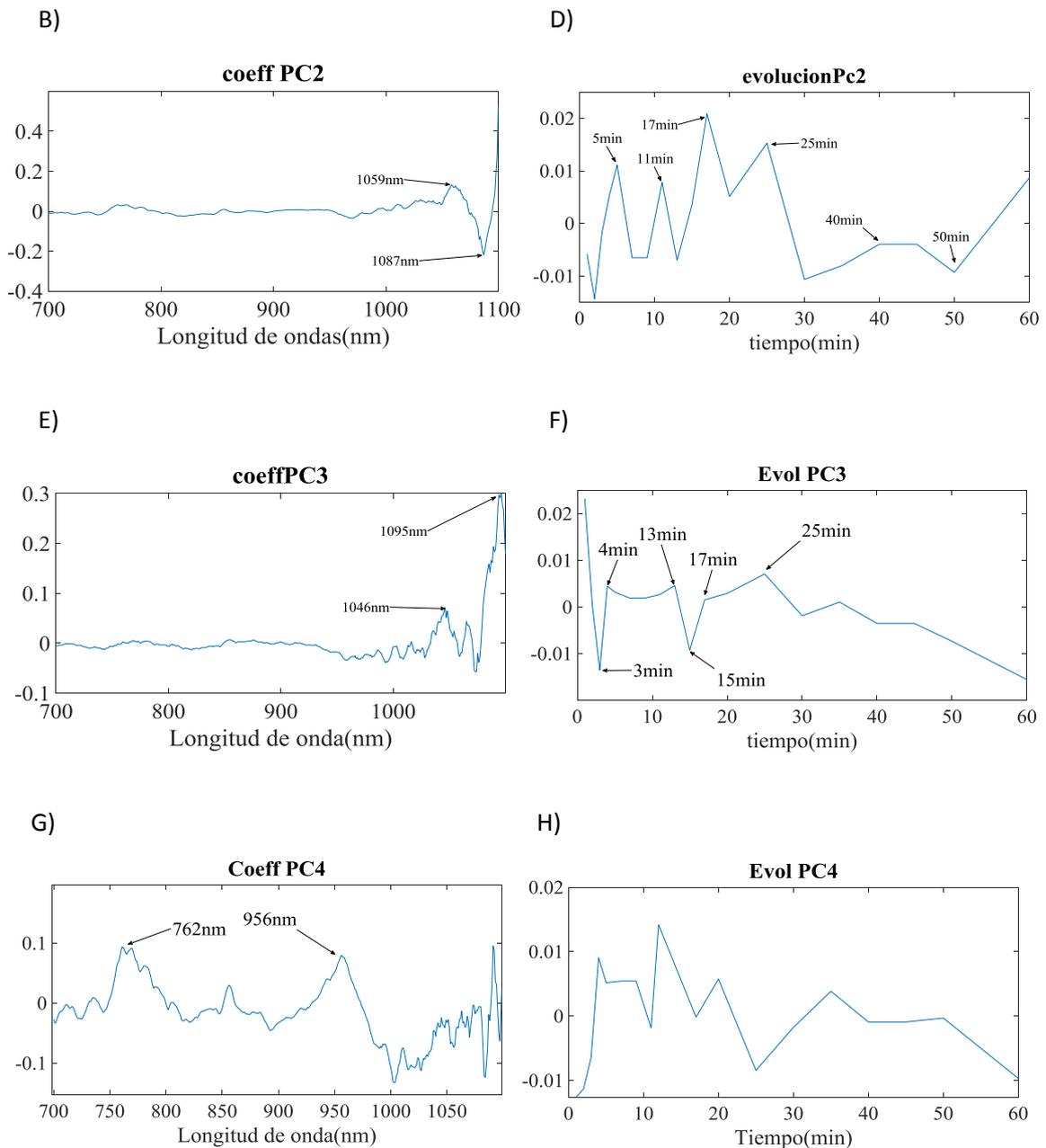


Figura 6.1. Representación de valores de los coeficientes Salmosan+pepsina, de los tres primeros componentes principales versus las longitudes de onda Figuras 6.1 (A, C, E, G) y de los scores versus el tiempo. Figuras 6.1(B, D, F, H).

Comparativamente con el caso del Salmosan a pH=3, Figura 5.4, la evolución de los factores con el tiempo, Figura 6.2, no aporta información adicional respecto a la aparición de los primeros factores, pero su valor es mucho más pequeño y considerando el umbral de log eigen value = -4, aparecen mucho más factor, probablemente como consecuencia de posibles interacciones entre ambas enzimas.

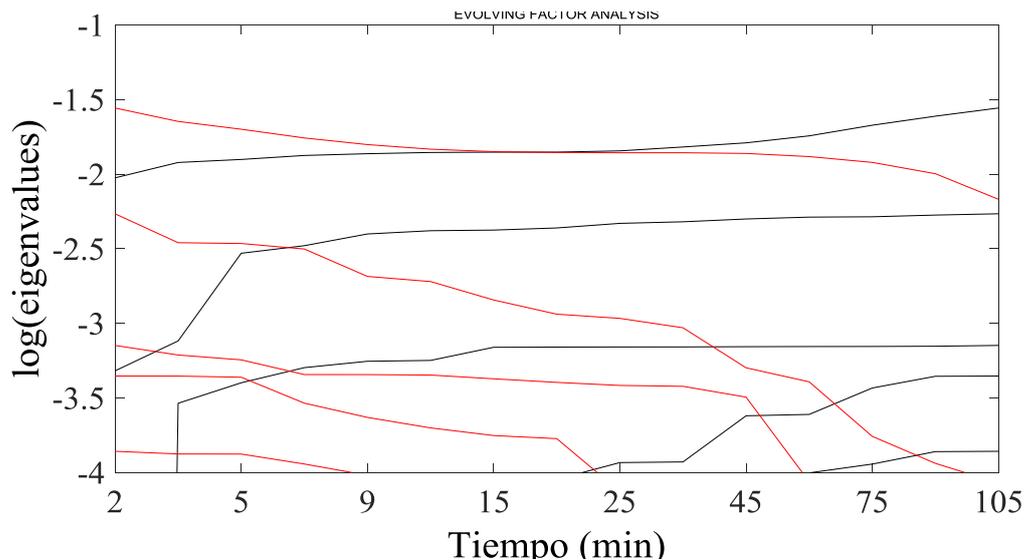


Fig. 6.2 EFA perteneciente al Salmosan + Pepsina

5.4. Hidrólisis enzimática del resultado final del punto 3, a pH= 6,8 y en presencia de pancreatina.

Cuando se siguieron registrando los espectros NIR de la mezcla anterior (Salmosan + pepsina a pH = 3 + pancreatina a pH=6,8) para evaluar la degradación en condiciones del tracto intestinal, los espectros fueron muy similares a lo comentado anteriormente. Cabe destacar que nuevamente aparecen bandas a longitudes de onda sobre 1100 atribuibles a los sobretonos de los grupos -NH de la enzima, esto nos hace pensar que nuevamente la enzima vuelve a degradarse en el tracto intestinal. A modo de ejemplo en la Figura 6.4 se muestran los espectros obtenidos en los minutos 1,2 y 120.

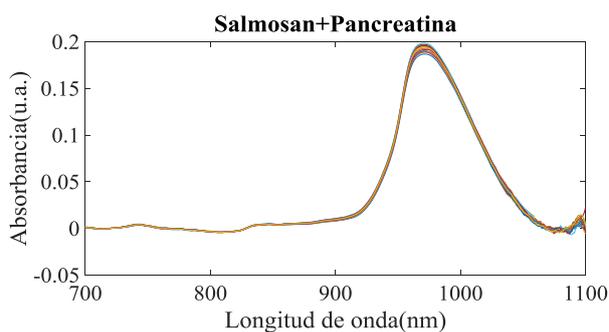


Fig. 6.3 Espectro NIR correspondientes al experimento Salmosan + Pancreatina

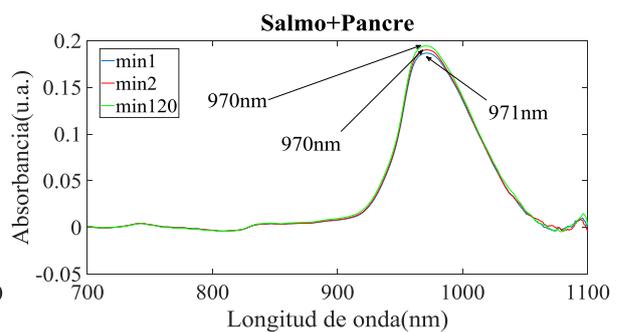


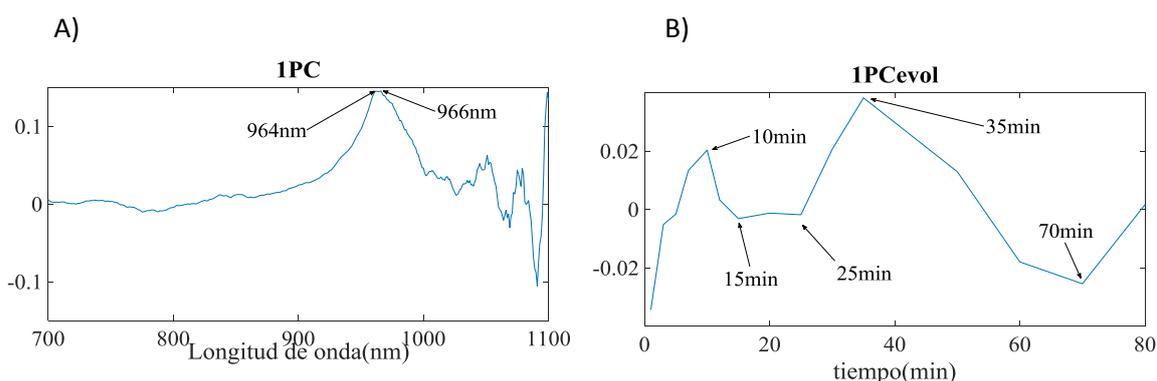
Fig. 6.4 Espectro NIR correspondientes al experimento Salmosan + Pancreatina

Nuevamente, la variabilidad espectral en los espectros registrados se repartía de una forma relativamente homogénea entre los primeros componentes. Tabla 5.1 El 1º PC solo representa el 42% de la varianza y el 5º PC un 4,16%, lo cual no es de extrañar teniendo presente el mayor grado de complejidad de la muestra a analizada.

La Figura 6.5 muestra los valores de los coeficientes y de los scores de los 4 primeros componentes. El gráfico de los coeficientes de los 2 primeros PC (Figuras 6.5A y 6.5C), muestran valores diferentes de cero en longitudes de onda características tanto de los -OH como de los -NH, aunque el signo de ambas zonas es diferente en los dos componentes. (el 1º PC, Fig 15A, valores positivos para los característicos del -OH alrededor de 966 nm,) y negativos para los característicos del -NH (entre 1000 y 1100 nm). En el gráfico del 2º PC, Fig. 15 C, los signos de estas zonas son opuestos, por tanto, ambos factores podrían ser representativos de variaciones en las condiciones de compuestos que llevan estos enlaces (-OH y las enzimas).

La evolución de los scores en el tiempo del primer PC, fig. 6.5B Parece indicar que la hidrólisis sigue su curso y en los primeros 10 minutos tenemos un pico posiblemente porque se forman nuevos fragmentos tanto del polisacárido como de la enzima, luego en el minuto 35 nuevamente se muestra otro pico el cual puede significar una nueva etapa de hidrólisis. Si nos fijamos en la evolución del PC2 fig.6.5D. Durante los primeros 25 minutos vemos un crecimiento irregular difícil de interpretar.

Finalmente, en los gráficos de los coeficientes de los dos últimos PCs (PC3 y PC4, fig. E, G) solo aparecen valores distintos de cero a las longitudes de onda propias de -NH, presentes en la estructura de las enzimas y la evolución de los scores de los espectros con el tiempo, en estos factores, fig. F y H muestran una tendencia igualmente irregular.



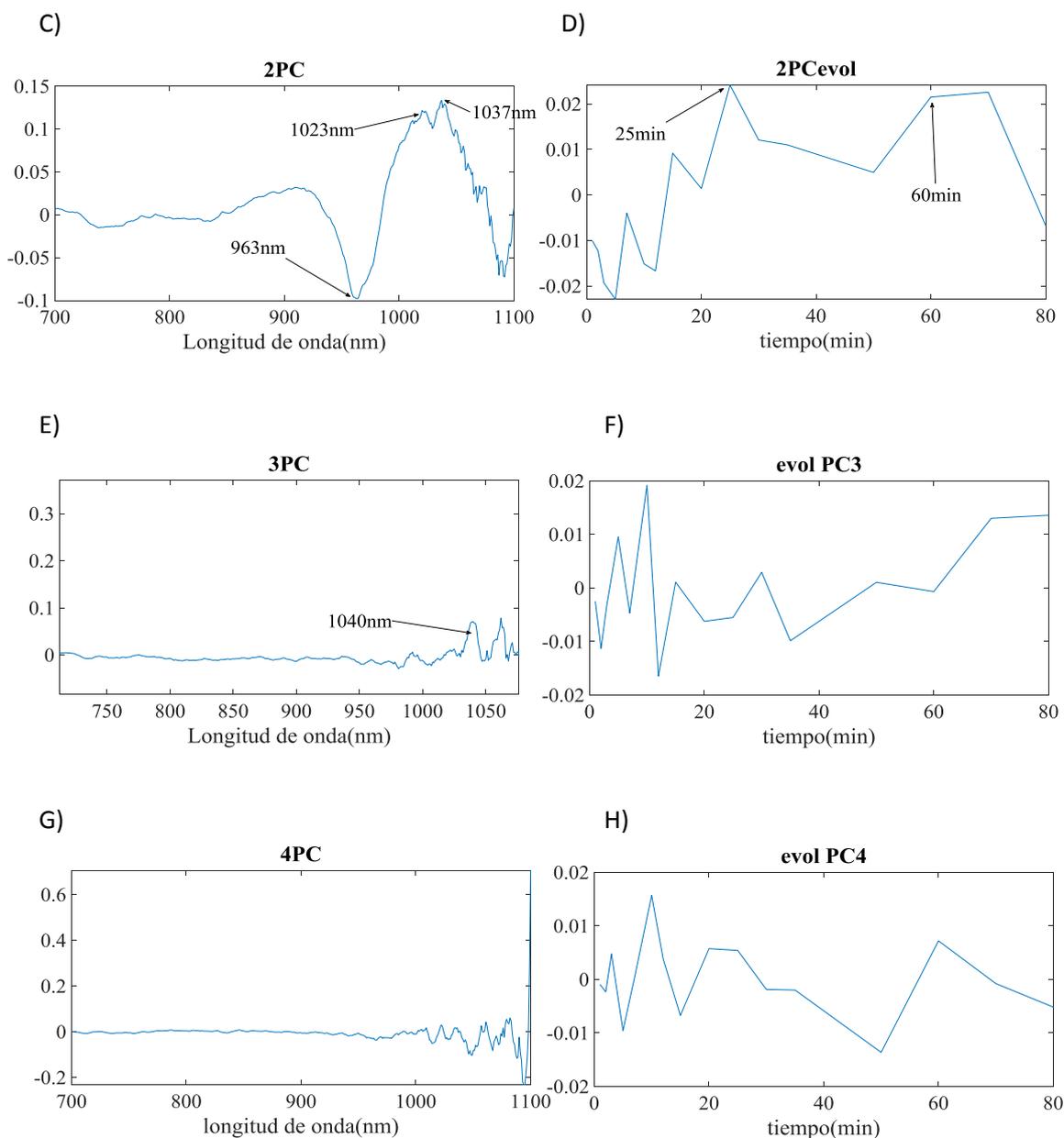


Figura 6.5. Representación de valores de los coeficientes Salmosan+Pancreatina, de los tres primeros componentes principales versus las longitudes de onda Figuras 6.5 (A, C, E, G) y de los scores versus el tiempo. Figuras 6.5(B, D, F, H).

El análisis de factores emergentes sobre los datos obtenidos en esta reacción se muestra en la Figura 6.6. Nuevamente se observó que el número de factores que aparecían como significativos era mayor que en ausencia de pepsina y pancreatina, reflejando la complejidad de la muestra analizada.

Se observa que en los 10 primeros minutos emergen un total de 6 factores emergentes a tener en cuenta que aportan información. El hecho de tener tantos factores puede ser

debido al número de situaciones químicas diferentes en el transcurso de la reacción y también con el número de especies químicas activas.

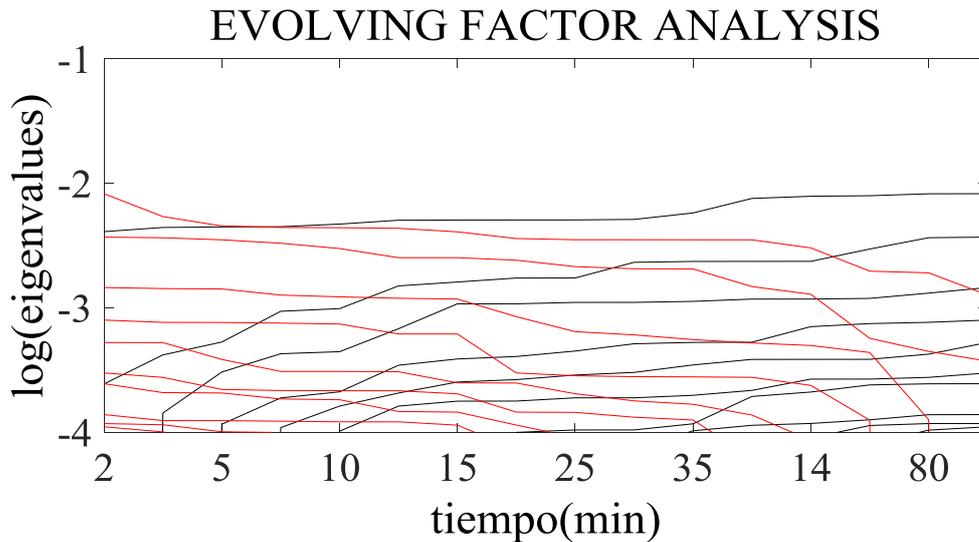


Fig. 6.6 EFA perteneciente al Salmosan + Pancreatina

6. CONCLUSIONS

After looking at the results from Salmosan in acidified water at pH=3, It has been observed that the methodology used for the study of enzymatic hydrolysis is a method for the study of the reaction. It was observed a similitude to pure β -galactomannans hidrolitization, the conclusion from this point is that the product contains some β -manasa.

After analysing the results of the concentration in the enzyme was observed that after increasing the enzyme concentration the polysaccharide hydrolysis was done much faster. If the aim is to introduce the product in the intestines of the bird, a cautious control of the manoses is a must, because even though they get degraded by time, a high concentration on manoses could produce faster hidrolitaztion of polysaccharides.

The activity enzyme was seen to decrease with time, but it was impossible to determine their actual life time.

As the Salmosan goes through the gastrointestinal tract and arrive to the crop and gizzard respectively, is when the enzyme takes part in the process, There seems to be a certain competition between papsin and b-mananasa, and because of this there seems to be some inhibition in the degradation of the polysaccharide and looks like produces an inhabitation for the polysaccharide.

In the last experimentation conditions for the next step in the intestine were simulated, but with variations of the pH concentration. In consequence (Duodeno, Yeyuno, Ileón)

a reactivation of the hydrolysis is observed making us think that a big part of their activity it was use don de gastrointestinal tract.

CONCLUSIONES

Al observar los resultados del Salmosan en agua a pH=3 se ha observado que la metodología utilizada para el estudio de la hidrolisis enzimática es un método valido para el estudio de la reacción además se observa una elevada similitud con la hidrolisis de los β -galactomananos puros lo que nos lleva a concluir que dicho producto efectivamente contiene cierta cantidad de β -mananasa.

Al analizar el efecto de la concentración en la enzima se observó que al elevar la concentración de dicha enzima la hidrolisis del polisacárido ocurría de manera mucho más rápida. Esto nos lleva a la conclusión de que, si el objetivo del producto es llegar a todas las zonas intestinales del ave, habrá de controlarse con extrema precaución la concentración de las manosas que, aunque se degraden con el tiempo, una concentración demasiado elevada podría hidrolizar el polisacárido demasiado rápido y el producto podríamos suponer que no será efectivo.

Se ha podido verificar que la actividad de la enzima degrada lentamente durante el transcurso del tiempo, pero no podemos llegar a dictaminar un tiempo de caducidad del producto.

Cuando el salmosan avanza por el tracto digestivo y llega a las zonas del buche y la molleja respectivamente, es cuando entra en acción la enzima pepsina, parece haber una cierta competencia entre la pepsina y la β -mananasa y debido a esto parece haber una cierta inhibición en la degradación del polisacárido.

En el último experimento se simularon las condiciones de la siguiente zona intestinal y variamos su pH en consecuencia (Duodeno, Yeyuno, Ileón) se observa una reactivación de la hidrolisis por lo que nos da a pensar que gran parte de su actividad se lleva a cabo en esta parte del aparato digestivo.

Estudio de la interacción entre enzimas. Esto se podría llevar a cabo con las gomas vegetales puras.

7. BIBLIOGRAFÍA

- [1] Aecosan – Agencia Española de Consumo, Seguridad Alimentaria y Nutrición http://www.aecosan.msssi.gob.es/AECOSAN/web/seguridad_alimentaria/subdetailed/salmonela.htm (2017)
- [2] Oyoyo B, De Loach J, Corrier D, Norman J, Ziprin R, Mollenhauer H. Prevention of Salmonella typhimurium colonization of broilers with D-mannose. *Poultry Sci.* 68 (1989) 1357.
- [3] Megazyme. “Galactomannan Assay Kit - Measurement of galactomannan – Megazyme”<https://secure.megazyme.com/Galactomannan-Assay-Kit> (2019).
- [4] Vives A. & Larrechi M. S. Trabajo fin de grado del enseñamiento de Química, curso 2018. Estudio mediante espectroscopia molecular UV-VIS-NIR de la degradación enzimática de gomas vegetales. (2018).
- [5] Anatomy of the Avian Digestive System. Zaher, Mostafa. "Anatomical, histological and histochemical adaptations of the avian alimentary canal to their food habits: I-Coturnix coturnix" *Life Science Journal.* 9: 252 (2012).
- [6] Pinho G. P., Matoso J. R. M., Silvério, F. O., Mota, W. C., Lopes, P. S. N., & Ribeiro, L. M. “A New Spectrophotometric Method for Determining the Enzymatic Activity of endo- β -mannanase in Seeds”, *J. Braz. Chem. Soc.*, 25, 1246, (2014).
- [7] Barnes, R. J.; Dhanoa, M. S.; Lister, S. J. Correction to the Description of Standard Normal Variate (SNV) and De-Trend (DT) Transformations in Practical Spectroscopy with Applications in Food and Beverage Analysis—2nd Edition. *NIR news* 5 (3), 6, (2013).
- [8] Wold, S., Geladi, P., Esbensen, K., & Öhman, J. (1987). Multi-way principal components-and PLS-analysis. *Journal of Chemometrics*, 1(1), 41
- [9] Gampp H, Maeder M. Meyer C, Zuberbühler A. “Calculation of equilibrium constants from multiwavelength spectroscopic data—IV: Model-free least-squares refinement by use of evolving factor analysis “ *Talanta* 13, 943, (1986).
- [10] Vander Heyden, Y.; Perrin, C.; Massart, D. L. Chapter 6 Optimization Strategies for HPLC and CZE. *Handb. Anal.* 1, 163, Sep. 2000.
- [11] Jerry Workman, Jr., L. W. *Practical Guide and Spectral Atlas for Interpretive Near-Infrared Spectroscopy*, Edition, 2.; Press, C., Ed.
- [12] Dunn, W. J., Wold, S., Edlund, U., Hellberg, S., & Gasteiger, J. Multivariate structure-activity relationships between data from a battery of biological tests and an ensemble of structure descriptors: The PLS method. *Quantitative Structure-Activity Relationships*, 3(4), 131, (1984).

- [13] Vandeginste B, Massart D, Buydens L De Jong S, Lewi P, Smeyers-Verbeke J. Handbook of chemometrics and Qualimetrics: Part B, Elsevier 1998.
- [14] Protocolo de “Determinación in vitro de la digestibilidad the salmosan en ankom yegami digestor “ IRTA. (2019, 18 febrero).