



# Método de cuantificación enzimática con DNS para $\beta$ -mananasa en soya y en un aditivo nutricional

## Enzymatic quantification method with DNS for $\beta$ -mannanase in soybeans and in a nutritional additive

Danyerly Johana Ruiz Chatez<sup>1</sup>  
Natalia Afanasjeva<sup>2</sup>



DOI: <https://doi.org/10.19053/01228420.v19.n3.2022.14621>

**RESUMEN:** En la búsqueda de la disminución del uso de antibióticos en la alimentación animal se destaca el desarrollo de aditivos nutricionales que promueven la salud animal y el mejor aprovechamiento de nutrientes en alimentos de origen vegetal. En este trabajo se desarrolló un método analítico para cuantificar la actividad de la enzima endo- $\beta$ -mananasa en un aditivo nutricional comercial y en la soya comúnmente usada como fuente de alimento para cerdos y pollos. El método usado se basa en la determinación de azúcares reductores con ácido 3,5-dinitrosalicílico complementado con espectroscopia ultravioleta, donde mediante una curva de calibración de manosa se logra determinar la cantidad de azúcares liberados por una unidad equivalente de enzima (U) en la materia prima, en un aditivo nutricional comercial y cuando es adicionado a la soya.

Adicionalmente, se hizo la determinación de la actividad enzimática por el método de cromatografía líquida con detector infrarrojo, se pudo identificar la señal del estándar de monosacárido manosa, pero no se logró la separación, identificación y posterior cuantificación de los azúcares reductores producidos o liberados por la actividad de la enzima en la matriz del alimento.

**PALABRAS CLAVE:** Enzima; Azúcar; Procedimiento; Nutrición; Alimento.

**ABSTRACT:** In the search for the decrease in the use of antibiotics in animal feed, the development of nutritional additives that promote animal health and the best use of nutrients in plant-based foods has been reached. In this work, an analytical method was developed to quantify the activity of the enzyme endo- $\beta$ -mannanase in a commercial nutritional additive and in soybeans commonly used as a feed source for pigs and chickens. The method used is based on the determination of reducing sugars with 3,5-dinitrosalicylic acid complemented with ultraviolet spectroscopy, where by means of a mannose calibration curve it is possible to determine the amount of sugars released by an equivalent unit of enzyme (U) in the raw material, in a commercial nutritional additive and when added in the soybeans. Additionally, the determination of the enzymatic activity was made by the method of liquid chromatography with an infrared detector, the signal of the mannose monosaccharide standard could be identified, but the separation, identification and subsequent quantification of the reducing sugars produced or released by the enzyme were not achieved enzyme activity in the feed matrix.

**KEYWORDS:** Enzyme; Sugar; Procedure; Nutrition; Feed.

**FECHA DE RECEPCIÓN:** 17 de Julio de 2022 **FECHA DE ACEPTACIÓN:** 29 de septiembre de 2022

**COMO CITAR:** Ruiz Chatez, D. J., & Afanasjeva, N. Método de cuantificación enzimática con DNS para  $\beta$ -mananasa en soya y en un aditivo nutricional. *Ciencia y Agricultura*, 19(3): 57-72. <https://doi.org/10.19053/01228420.v19.n3.2022.14621>

- 1 Quím, Programa de Química, Facultad de Ciencias Naturales y Exactas, Universidad del Valle, grupo GI-CAT. Cali, Colombia. [danyerly.ruiz@coreounivalle.edu.co](mailto:danyerly.ruiz@coreounivalle.edu.co) ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0728-9399>
- 2 Ph D. Departamento de Química, Facultad de Ciencias Naturales y Exactas, Universidad del Valle, grupo GI-CAT. Cali, Colombia. [natalia.afanasjeva@correounivalle.edu.co](mailto:natalia.afanasjeva@correounivalle.edu.co) ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6184-1458>

## INTRODUCCIÓN

Entre los granos más producidos para la alimentación se listan en orden descendente el maíz, trigo, arroz y la soya (*Glycine max*), pero en la familia de las leguminosas o *Fabaceae*, la soya es la más producida a nivel mundial (Ramírez et al., 2022). Su alto contenido de proteínas y carbohidratos, la hace ser altamente comestible y sus productos derivados son ampliamente utilizados en la alimentación animal y humana y en la industria farmacéutica (San Miguel et al., 2017). Por estas razones la soya es considerada una de las leguminosas más importante por lo que ha aumentado su producción mundialmente (Garcés et al., 2014).

Es conocido que los polímeros naturales de la biomasa están representados por los compuestos como celulosa, hemicelulosa y lignina. En cuanto a la aplicación en alimentación, se está estudiando más la hemicelulosa, ya que la celulosa y lignina son más usados en procesos industriales del papel y biodiesel (Nguyen et al., 2017). En comparación con la celulosa, la estructura química de la hemicelulosa posee ramificaciones con combinaciones de monosacáridos que son parte de su composición básica (xilosa, arabinosa, glucosa, manosa y galactosa), además contiene los carbohidratos como xilano, xiloglucano, manano, glucomanano, galactoglucomanano y calosa (Cerdeña, 2016).

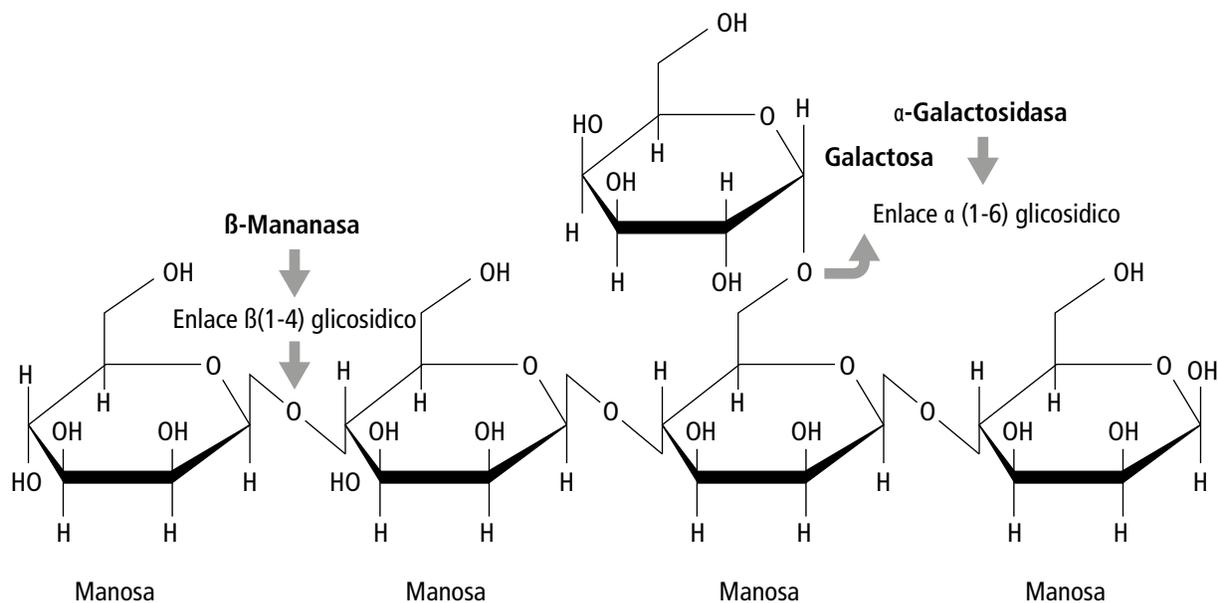
Por su composición los carbohidratos no aportan mucho valor nutricional debido a la formación de las estructuras complejas de polisacáridos que generan la presencia de factores anti-nutricionales y la baja digestibilidad de los animales monogástricos ya que ellos son incapaces de digerir las estructuras complejas y largas de polisacáridos sin la ayuda de las enzimas microbianas que ayudan a descomponerlos (Loman y Ju, 2016). Estos polisacáridos junto con la lignina forman parte de biomasa lignocelulósica y componen la pared celular en los diferentes alimentos de origen vegetal.

Un valor agregado nutricional de la soya en el proceso de digestión se da por medio del mananoligosacarido (MOS) que tiene características de un alimento funcional prebiótico y que promueve el crecimiento de bacterias probióticas en microbiota intestinal y confiere propiedades antineoplásicas sin citotoxicidad para las células (Singh et al, 2018).

Una manera de lograr el máximo aprovechamiento de las propiedades nutricionales de la soya es aumentar su digestibilidad, y esto se puede lograr mediante el proceso de hidrólisis enzimática junto con la aplicación de los métodos químicos (Kumar y Satyanarayana, 2015), y el uso de algunas de las enzimas como son la  $\beta$ -mananasa,  $\beta$ -glucosidasa y  $\beta$ -manosidasa. En el caso de la enzima  $\beta$ -mananasa, clasificada de acuerdo con la nomenclatura internacional como EC 3.2.1.78 (McDonald y Tipton, 2021), se conoce, que esta enzima es responsable de hidrolizar los  $\beta$ -mananos o galactomananos de las

paredes celulares de los vegetales (Rodwell et al. 2016), como se muestra en la Figura 1.

En las dietas de los animales, el  $\beta$ -manano es uno de los principales polisacáridos no almidonados (PNA), que están compuestos principalmente de manosa con enlaces glucosídicos  $\beta$ -1,4 (Jana y Kango, 2020). La enzima  $\beta$ -mananasa, que es una enzima exógena, hidroliza los  $\beta$ -mananos, disminuye los efectos anti-nutricionales de los  $\beta$ -mananos y, por lo tanto, mejora la productividad animal (Zuluaga et al, 2017).



**FIGURA 1.** Esquema de la acción enzimática de endo- $\beta$ -mananasa y  $\alpha$ -galactosidasa involucradas en la hidrólisis del galactomanano (tomado de Rodwell et al. 2016).

La medición de la actividad enzimática por medio de cuantificación de los azúcares reductores (monosacáridos) producidos por la reacción al hidrolizar el galactomanano presente en la muestra, se realiza comúnmente por el método de Miller con el reactivo ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) (Al Loman, 2017) y se basa en una reacción entre los azúcares reductores y DNS, resultando en un complejo de color naranja cuantificable (Zuluaga, 2013).

Otro de los métodos para determinar azúcares reductores es por cromatografía líquida con detector de índice de refracción que es un detector universal por lo que es altamente improbable que el índice de refracción del soluto sea similar al del solvente. Como inconveniente tiene la desventaja de ser muy poco sensible, y esto limita su campo de aplicación y además su funcionamiento es muy afectado por cambios de temperatura (Foitzich, 2013).

## MATERIALES Y MÉTODOS

Los experimentos de análisis de actividad enzimática se realizaron en la ciudad de Cali, que tiene temperatura promedio de 23,9°C, precipitación anual de 457,4 mm/año y humedad relativa anual de 78,3%/año (Alcaldía de Cali, 2021).

La enzima *endo- $\beta$ -mananasa* es derivada del *Aspergillus Niger* (Avinews, 2014), fabricada por la compañía Compro, (2020) que garantiza una actividad enzimática de mínimo  $40 \times 10^6$  U/Kg.

*Aditivo Nutricional comercial* (de ahora en adelante en el texto se denotará como ANC).

Es un aditivo mejorador (Tabla I) de la eficiencia alimentaria y se utiliza en la elaboración de alimentos para pollos de engorde, ponedoras y reproductoras en todas sus etapas y para cerdos en todas sus etapas productivas (Inteagro, 2022).

**TABLA I.** Composición, registro sanitario y dosis del aditivo nutricional comercial (ANC), (Inteagro, 2022).

<b>Nombre comercial</b>	Zybum®
<b>Registro sanitario en Colombia</b>	Reg. ICA 15108-SL
<b>Forma farmacéutica</b>	Polvo granulado
<b>Dosis</b>	200 g/t
<b>Composición</b>	$\beta$ -mananasa - mínimo 320.000.000 U/Kg*
	Excipientes c.s.p 100%

\*U/Kg: medida de la actividad enzimática en unidades de  $\beta$ -mananasa equivalentes para la liberación de 1  $\mu$ g/min de azúcar reductor.

### Método de análisis de la actividad enzimática de $\beta$ -mananasa con DNS por espectrofotometría UV

Esta metodología se usó específicamente para medir la actividad enzimática de *endo- $\beta$ -mananasa* en el producto aditivo nutricional comercial, en la materia prima *endo- $\beta$ -mananasa* y en la muestra de soya y en la muestra de soya enriquecida con el ANC.

Todos los reactivos utilizados fueron de grado analítico de Merck Millipore. El agua utilizada es grado analítico para el uso en métodos químicos. Reactivos: acetato de sodio trihidratado, ácido acético, ácido 3,5 dinitrosalicílico, fenol (cristales), hidróxido de sodio en lentejas, tartrato de sodio y potasio tetrahidratado, nitrito de sodio anhidro, goma algarroba SIGMA G0753, acetonitrilo, estándar D-manosa, materia prima  $\beta$ -mananasa de (Compro Ltd.). Balanza analítica (0,05g – 200g  $\pm$  0,0001 g) Metter Toledo se utilizó para preparación de muestras.

La  $\beta$ -mananasa degrada el manano en oligosacáridos y monosacáridos, estos a su vez por su composición con un grupo reductor llevan a cabo la reacción con DNS en un baño de agua hirviendo. La intensidad del color de la solución resultante de la reacción es directamente proporcional al azúcar reductor producido por la enzimólisis. La producción del azúcar reductor es directamente proporcional a la actividad de la mananasa en la solución de reacción. La medición de la actividad enzimática de la  $\beta$ -mananasa está definida como la unidad (U) equivalente de enzima capaz de liberar 1  $\mu$ mol de azúcar reductor (manosa) por minuto a partir de una solución de sustrato obtenida de la goma de algarroba a una concentración de 5mg/mL a condiciones de pH de 7,0 y a una temperatura de 40°C.

### Preparación de la curva de calibración de solución de manosa.

Preparación de la curva de calibración de solución de manosa en el rango de 0,0040-0,0317 [mg/mL] se realizó, cómo se muestra en la Tabla II.

**TABLA II.** Descripción de la preparación de la curva de calibración a partir de una solución de manosa a una concentración inicial de 5,0mg/mL.

Punto de la curva calibración	Volumen de alícuota solución de manosa (mL)	Concentración solución de manosa (mg/mL)	Concentración solución de manosa ( $\mu$ mol/mL)
1	1,0	0,0040	0,022
2	2,0	0,0079	0,044
3	3,0	0,0119	0,066
4	4,0	0,0159	0,088
5	5,0	0,0198	0,110
6	6,0	0,0238	0,132
7	7,0	0,0278	0,154
8	8,0	0,0317	0,176

De cada una de estas soluciones preparadas según la tabla 2, se tomó una alícuota de 1,0 mL y se transfirió a un balón de 100 mL, se aforó con solución buffer pH 7,0. Para finalizar se procedió a realizar la reacción con el reactivo DNS, se tomó una alícuota de 2,0 mL para cada punto de la curva en un balón de 25 mL, se agregaron 2,0 mL de solución buffer pH 7,0 y 5,0 mL del reactivo DNS, se agitó con ayuda de un vortex por 3 segundos y se dejó en un baño de agua en ebullición (aproximadamente 96°C) por 7 minutos, luego de este tiempo se retiró inmediatamente del agua y se enfrió en un baño de agua potable fría, se dejaron a los balones llegar a temperatura ambiente y se aforó luego con agua purificada. Las soluciones fueron analizadas en el espectrofotómetro, determinando su máximo de absorbancia a 540 nm. La concentración final de cada punto de la curva se presenta en la Tabla II.

## Preparación de las muestras ( $\beta$ -mananasa, ANC, soya y soya enriquecida con ANC) por el método con DNS.

A todas las muestras se les realizó una homogenización en un molino eléctrico con sistema de enfriamiento cada 10 segundos por 3 veces. La muestra de soya fue enriquecida según la dosis de uso del producto recomendada y descrita en la Tabla I.

*Preparación de la solución enzimática de muestra de  $\beta$ -mananasa (BM):* se pesaron 0,07 g de la enzima sobre un balón de 100 mL, luego se adicionan 60 mL de solución buffer pH 7,0, enseguida se llevó a ultrasonido por 30 minutos. Pasado este tiempo, se dejaba atemperar y se aforó con la misma solución buffer pH 7,0. Luego se centrifugó por 5 minutos y se tomó una alícuota de 1,0 mL sobre un balón de 50 mL, luego se aforó con la solución buffer pH 7,0. Esta solución muestra se reservó para la solución de enzimólisis de patrón blanco y de muestra. Este procedimiento siempre se realizó para las tres muestras independientes.

*Preparación de la solución enzimática de muestra de ANC:* se pesaron aproximadamente 0,02 g en un balón de 100 mL, luego se adicionan 60 mL de solución buffer pH 7,0, enseguida se llevó la solución a ultrasonido por 30 minutos, pasado este tiempo dejar atemperar y se aforó con la misma solución buffer pH 7,0. Luego se transfirió una porción de la muestra a un tubo de ensayo y se centrifugó por 5 minutos. De esta porción, se tomó una alícuota de 1,0 mL sobre un balón de 50 mL y luego se aforó con la solución buffer pH 7,0. Esta solución muestra se reservó para la solución de enzimólisis de blanco y de muestra. Este proceso se realizó para las tres muestras independientes.

*Preparación de muestra de soya y soya enriquecida con ANC:* se pesaron 50 g de muestra en un erlenmeyer de 250 mL y se adicionaron 200,0 mL de la solución buffer pH 7,0, se llevó a agitación magnética por 30 minutos. Después de los 30 minutos de agitación la muestra fue llevada a 4 tubos de 15 mL para centrifugar por 5 minutos. Luego la solución acuosa es filtrada por cualitativo en un frasco de vidrio. De la solución obtenida se tomó una alícuota de 2,0 mL en un balón de 50,0 mL y se aforó con la solución buffer pH 7,0. Esta muestra ya estuvo lista para realizar el proceso de hidrólisis enzimática más adelante. Este proceso se realizó para las tres muestras independientes.

*Hidrólisis enzimática de las muestras  $\beta$ -mananasa, del ANC, de soya y soya enriquecida con el ANC.* Se pesaron 50 g de muestra en un erlenmeyer de 250 mL y se adicionaron 200,0 mL de buffer pH 7,0. Las muestras ya preparadas se mantuvieron acondicionado previamente el baño María a 40°C y en agitación constante la goma de algarroba. De cada muestra preparada anteriormente, se transfirió una alícuota de 2,0 mL de la solución enzimática de la muestra del ANC en un balón de 25,0 mL. Cada balón se llevó a un baño

María a 40°C por 20 minutos. Después de este tiempo se retiró y se adicionó 2,0 mL de la solución de goma de algarroba (que se encontraba en agitación constante) y agitó en vórtex por 3 segundos, luego adicionó nuevamente 2,0 mL de goma de algarroba y agitó nuevamente en vórtex por 3 segundos más. Se llevó nuevamente al baño María a 40°C por 60 minutos exactamente.

Después de este tiempo, las muestras se retiraron del baño María e inmediatamente se adicionaron 5,0 mL del DNS y se llevaron a un baño María en ebullición por 15 minutos. Luego se retiraron del baño María y se enfriaron hasta temperatura ambiente, finalmente se aforó con agua purificada a 25,0 mL y se agitó en vórtex por 5 segundos más. En este punto las muestras ya estaban listas para ser analizadas en el espectrofotómetro UV.

### **Preparación del blanco de reactivos y del blanco enzimático.**

Se realizó la preparación del blanco de reactivos del análisis con 4,0 mL de la solución buffer pH 7,0 y 5,0 mL del reactivo DNS. Este fue llevado en el paso final en el baño de agua en ebullición y se siguieron los mismos pasos hasta aforar con agua purificada.

Por cada lote de muestra ( $\beta$ -mananasa, ANC, soya y soya enriquecida) se preparó una solución de blanco enzimático.

### **Análisis espectrofotométrico de las soluciones preparadas anteriormente.**

Todas las muestras fueron filtradas por 0,45  $\mu$ m sobre la celda de cuarzo para su análisis. Se realizó inicialmente el ajuste de la línea base en el espectrofotómetro en el rango de 510 nm – 590 nm con agua purificada, luego se realizaron las lecturas de las soluciones blanco de reactivos y enzimático, y finalmente se analizaron las muestras para determinar el máximo de absorbancia a una longitud de onda de 540 nm. Se elaboró la gráfica (figura 2) del valor de absorbancia versus la concentración (mg/mL) de manosa.

### **Determinación de la actividad enzimática por el método de HPLC con detector IR.**

Las condiciones cromatográficas usadas: HPLC-Waters/software Empower 3. Fase móvil: Agua purificada: ACN (20:80). Columna: Polaris-NH2 dimensiones: 250 x 4,6 mm; tamaño de poro 5 $\mu$ m; tipo L8. Flujo: 1,0 mL/min. Temperatura de columna: 40°C. Detector: Índice de refracción. Temperatura de detector: 40°C. Volumen de inyección: 5  $\mu$ L. Modo: Isocrático. Tiempo de corrida: 12 minutos.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El método colorimétrico con DNS se ha utilizado ampliamente para medir contenido de azúcares reductores con la presencia de un grupo aldehído o cetona en su estructura en el cual el compuesto aromático formado absorbe fuertemente la luz UV, lo que permite establecer una relación directa entre la medida colorimétrica y la cantidad de azúcares reductores presentes (Pinho et al., 2014). El método se lleva a cabo siempre bajo condiciones alcalinas y de temperatura controlada (Deshavath et al, 2020). Sin embargo, es un método inexacto pues los componentes endógenos de la soya (aminoácidos, grasas y azúcares, etc.) interfieren con los resultados ya que se producen coloraciones muy intensas al principio de los ensayos, lo que resulta difícil de cuantificar por espectrofotometría UV y probablemente una cuantificación errada o sobrestimada del contenido de azucares liberados (Canseco et al., 2015; Mizutani et al., 2012).

La solución preparada de ácido DNS incluye la adición del reactivo fenol que se añade precisamente para aumentar la intensidad del color (Sposina et al., 2012), y en este caso, al analizar muestras de origen vegetal, se confirma que no es tan eficiente la determinación de su contenido.

En este trabajo se evaluaron los resultados comparando los datos de la curva de calibración de manosa analizada con un reactivo DNS con adición del reactivo de fenol y sin adición del fenol. Los resultados se presentan en la tabla III.

**TABLA III.** Resultados de curva de calibración de manosa con el reactivo DNS con fenol versus el DNS sin fenol.

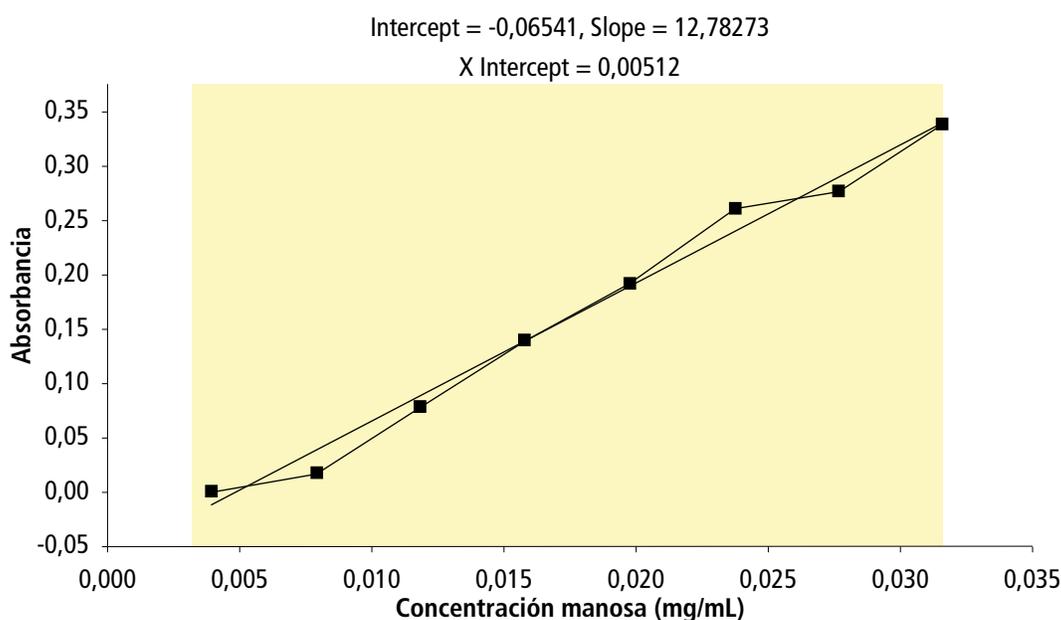
Punto de la curva calibración	Manosa + DNS con fenol	Manosa + DNS sin fenol
	Absorbancia	Absorbancia
1	0,0278	0,0016
2	0,0900	0,0275
3	0,1850	0,0726
4	0,2800	0,0945
5	0,3792	0,1260
6	0,4721	0,1614
7	0,5610	0,2023

Efectivamente ocurre una disminución del valor de absorbancias en los mismos puntos de la curva (ver tabla III) en las muestras de manosa + DNS sin fenol, lo que resulta ser de gran ayuda para el manejo de los datos en los análisis siguientes con la muestra de soya.

**TABLA IV.** Resultados de absorbancia bajo la curva calibración de manosa en el rango de concentración de 0,0040-0,0317 [mg/mL] descrita según tabla II.

Puntos de la curva calibración	Concentración de manosa (mg/mL)	Absorbancia
1	0,0040	0,0009
2	0,0079	0,0164
3	0,0119	0,0785
4	0,0159	0,1394
5	0,0198	0,1914
6	0,0238	0,2606
7	0,0278	0,2764
8	0,0317	0,3380

Con los datos obtenidos se graficó la concentración de manosa versus la absorbancia en cada uno de los ocho puntos, para obtener la gráfica de una línea recta y por interpolación final obtener el dato de concentración y luego realizar el cálculo de actividad enzimática (A.E.) teniendo en cuenta las demás diluciones y variables en la ecuación [1].



**FIGURA 2.** Curva de calibración de concentración de solución de manosa vs. absorbancia.

*Ecuación de cálculo actividad enzimática (AE) en las muestras analizadas:*

$$A.E. = \frac{(Abs_E - Abs_B) \times K \times C_o \times 1000\mu\text{mol} \times 200\text{mL} \times 50\text{mL} \times 25\text{mL}}{180,2\text{mg} \times 60 \text{ min} \times W_{\text{muestra}} \text{ (g)}}; \left( \frac{\text{U}}{\text{g}} \right) \quad [1]$$

Dónde:

$A_E$  = Absorbancia de la solución muestra

$A_B$  = Absorbancia de la solución blanco

K = Pendiente de la curva (mg/mL)

$C_o$  = Intercepto de la curva

108,2 mg/mmol = Peso molecular de manosa,

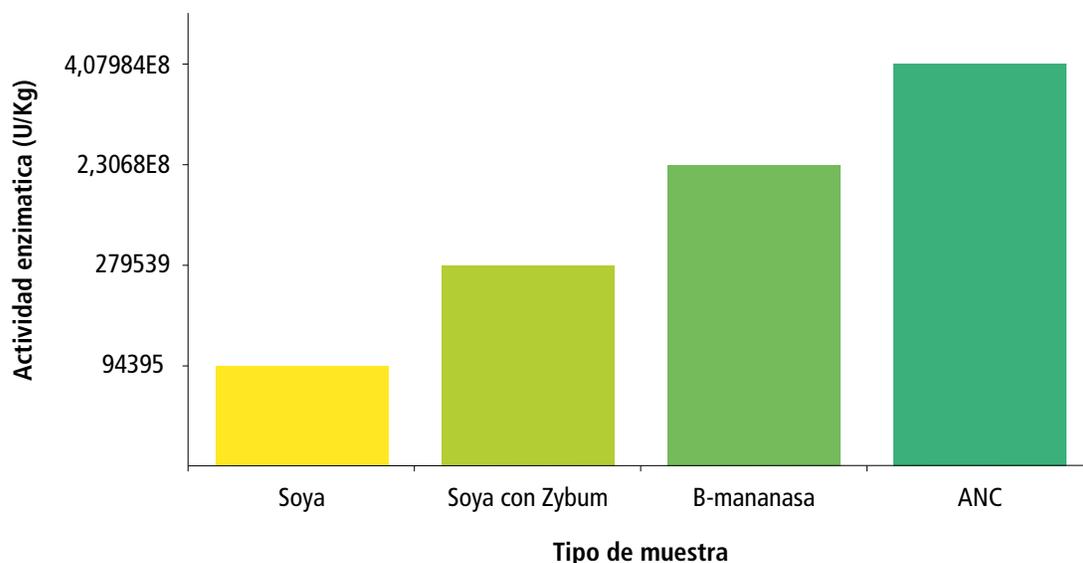
60 minutos = tiempo de enzimólisis

W muestra = peso de la muestra, g

F =  $5,78 \times 10^6$

**TABLA IV.** Resultados actividad enzimática (U/Kg) en muestras analizadas.

Muestra	Réplica muestra	Peso muestra (g)	Absorbancia solución blanco (Ab)	Absorbancia solución muestra (Amtra)	Resultado actividad enzimática (U/kg)	%DRS
β -mananasa	M1	0,0702	0,0042	0,2326	227.100.930	1,6
	M2	0,0710	0,0042	0,2310	230.419.790	
	M3	0,0701	0,0042	0,2288	234.518.286	
soya	M1	50,3588	-0,0071	0,0590	89.481	5,5
	M2	50,4586	0,0015	0,0707	93.844	
	M3	51,9323	0,0015	0,0768	99.860	
soya + ANC	M1	50,8010	-0,0040	0,2018	291.901	5,1
	M2	50,5127	0,0020	0,1874	263.726	
	M3	50,6513	0,0020	0,2011	282.990	
ANC	M1	0,0211	-0,0050	0,1349	472.009.530	13,6
	M2	0,0218	0,0001	0,1154	373.470.515	
	M3	0,0220	0,0001	0,1179	378.472.149	



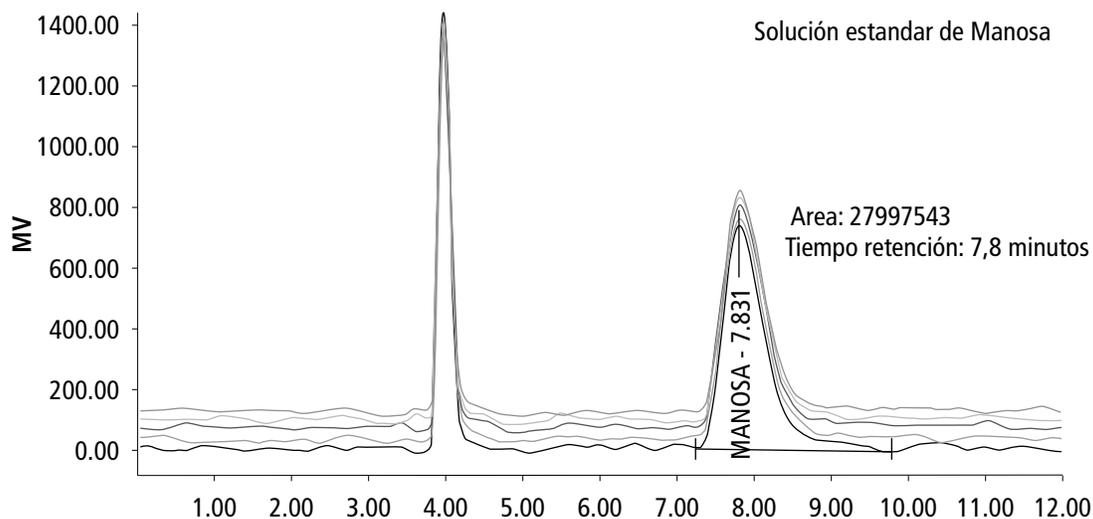
**FIGURA 3.** Comparación de resultados de la actividad enzimática (U/Kg) en las muestras analizadas.

Los resultados obtenidos muestran para el caso de la enzima  $\beta$ -mananasa y del ANC se cumple con las especificaciones declaradas según la Tabla I. Para el caso de la muestra de soya y de soya enriquecida con ANC según dosis recomendada en la Tabla 1, se logró medir la actividad enzimática en la muestra de alimento de soya sin interferencias por efecto de los componentes de matriz, controlando las variables de pH del buffer a 7.0, la temperatura controlada a 40°C, se logró determinar el tiempo necesario para la reacción de enzimólisis a 60 minutos, la concentración de sustrato de goma de algarroba a 5 mg/mL y finalmente la reacción con el DNS por 15 minutos en un baño de agua a ebullición.

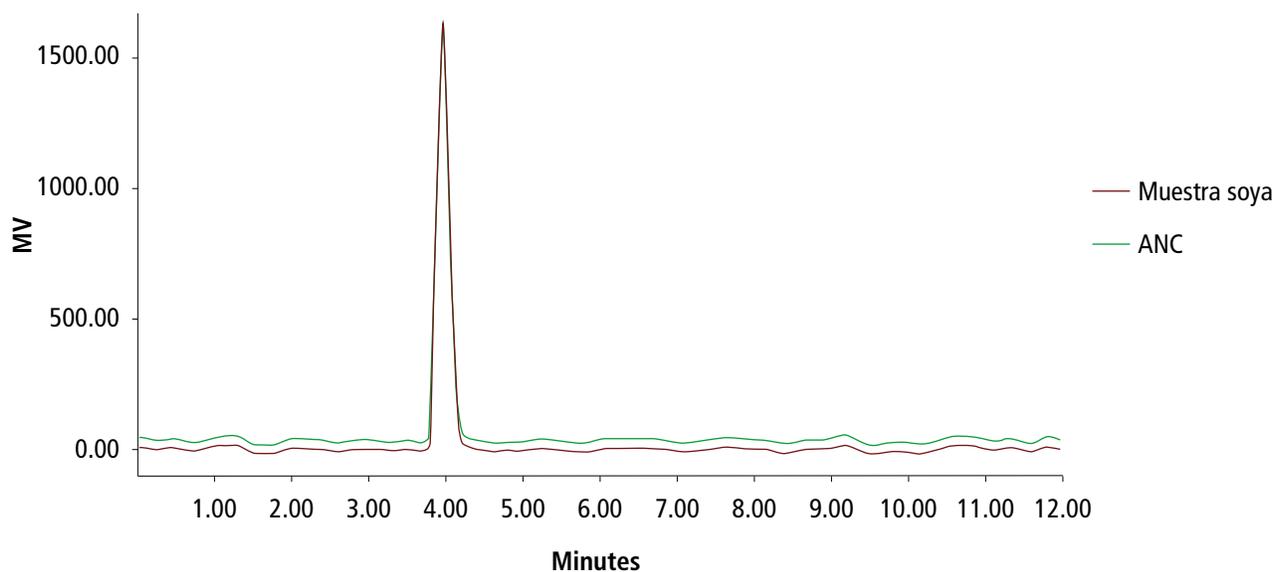
Comparando los resultados entre la muestra de soya y soya enriquecida con el ANC, se distingue un aumento en la actividad enzimática cuando se adiciona la encima al alimento por medio del ANC, con lo que se comprueba su función de hidrólisis en la cadena del polisacárido y así liberar los monosacáridos simples que son determinados por DNS y por el método de espectrofotometría UV (Zhang et al., 2021). Indirectamente se demuestran los beneficios del producto ANC, pues ese aumento en la actividad enzimática se relaciona directamente con la disminución de los efectos anti nutritivos en alimentos vegetales para un mejor aprovechamiento de la energía en procesos digestivos en el animal y así permite mejorar la producción y salud animal (Sharma et al., 2016).

Con los ensayos de determinación de la actividad enzimática por el método de HPLC-IR se usó la misma preparación de las muestras para el análisis con DNS, omitiendo el paso de la reacción con el DNS y finalmente se aforaba a 25,0 mL con agua purificada y se filtraba por nylon de 0,22  $\mu$ m en el vial para cromatografía líquida. Desafortunadamente, no se obtuvieron resultados

para la identificación y cuantificación de manosa obtenida después de la hidrólisis enzimática, solo se logró obtener la señal del estándar de manosa, pero el tratamiento con las muestras no produjo señal de monosacárido en el cromatograma de muestra de soya y del ANC, como se evidencia en las siguientes figuras 4 y 5.



**FIGURA 4.** Cromatograma HPLC de la solución de manosa [100mg/mL]. Tiempo de retención es aproximadamente 7,83 minutos.



**FIGURA 5.** Cromatograma de HPLC de la muestra de soya y ANC. (No muestra ninguna señal a 7,8 minutos).

Como se observa en la figura 5, así mismo ocurrió para la muestra de soya,  $\beta$ -mananasa y la soya enriquecida con el ANC. Los cromatogramas no muestran ninguna señal a tiempo de retención de 7,8 minutos. Una explicación a este resultado puede ser que posiblemente faltó el tiempo o un pretratamiento previo adicional como la hidrólisis ácida (o básica) que descompone la hemicelulosa y hace que la celulosa sea más accesible, o un pretratamiento termo-mecánico utilizando la técnica de extrusión que rompe la estructura de la pared celular fibrosa aumentando el área superficial para interactuar más con las enzimas (Yang et al. 2019). Otra explicación tiene relación con la estructura química debido a que los azúcares simples son compuestos por enlaces simples de C-H y carecen de grupos cromóforos, por lo que los análisis típicos por el método de HPLC de estas muestras utilizan detectores de dispersión de luz evaporativa (ELS), electroquímico o índice de refracción (IR). En este caso, solo se trabajó con el detector de IR, como se reporta en el trabajo (Teixeira et al., 2012).

## CONCLUSIONES

Con la metodología desarrollada con DNS se logró cuantificar la actividad enzimática endo- $\beta$ -mananasa en las tres matrices analizadas; 1) como materia prima, 2) cuando está presente en el aditivo nutricional comercial y 3) cuando a su vez está dosificado en un alimento de soya. En promedio los resultados de A.E. fueron 230.679.669 U/Kg, 407.984.065 U/Kg y 279.539 U/Kg respectivamente.

Con el método DNS aplicado se obtuvieron los resultados de actividad enzimática de 94.395 U/Kg para la torta de soya y de 279.539 U/Kg para la soya con el ANC, esto confirma que cuando es usado en el alimento soya, la actividad de la enzima  $\beta$ -mananasa aumenta la hidrólisis de polisacáridos, mejorando su digestibilidad y da pie a un avance en la creación de nuevos aditivos de alimentación y/o producción animal.

Se requiere un diseño analítico más amplio acompañado de equipos más especializados en el análisis de azúcares reductores en los productos mixtos alimenticios como son la electroforesis capilar o HPLC acoplado a masas, para que se pueda lograr su identificación, separación y cuantificación, y no solo por el método de cromatografía líquida HPLC como fue realizado en la segunda parte de este trabajo.

## Agradecimientos

Al apoyo del laboratorio de análisis físico-químico de la empresa Carval, Colombia.

## REFERENCIAS

- Al Loman, A., & Ju, L. K. (2017). Enzyme-based processing of soybean carbohydrate: Recent developments and future prospects. *Enzyme and Microbial Technology*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2017.06.013>.
- Alcaldía de Santiago de Cali. Departamento Administrativo de Planeación. (2021). Cali en cifras 2021. Recuperado de: <https://www.cali.gov.co/planeacion/publicaciones/%20137803/documentos-cali-en-cifras/>.
- Avinews. (2014). Combatir factores antinutricionales con enzimas en reacciones de broilers. <https://avinews.com/combatar-factores-antinutricionales-con-enzimas-en-rationes-de-broiler/>.
- Canseco, M., Martínez, J., Gusils, C. y Zossi, S. (2015). Validación de metodología para determinación de azúcares reductores totales en vinos fermentados. *Revista Industrial y Agrícola de Tucumán*, 92 (2), paginas 33-38.
- Cerda M, L. (2016). Enzimas modificadoras de la pared celular vegetal. Celulasas de interés biotecnológico papelero [Tesis doctoral, Universidad de Barcelona]. <http://hdl.handle.net/2445/104248>.
- Compro Limited(China). (2020). Nuzyme Beta mananasa. <http://www.compro.cn/product1.php?lm=14#page4>.
- Deshavath. N., Mukherjee, G., Goud, V. V., Veeranki, V. D., y Sastri, C. V. (2020). Pitfalls in the 3, 5-dinitrosalicylic acid (DNS) assay for the reducing sugars: Interference of furfural and 5-hydroxymethylfurfural. *International Journal of Biological Macromolecules*, 156, pages 180–185. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.04.045>.
- Foitzich, M. Andrea C. Desarrollo y validación de una metodología para determinar azúcares simples en matrices orgánicas mediante HPLH-IR. (2013). Universidad Austral de Chile. Facultad de ciencias agrarias. Escuela de Ingeniería de alimentos. Valdivia, Chile. <http://cybertesis.uach.cl/tesis/uach/2013/faf659d/doc/faf659d.pdf>.
- Garcés F. R., Ampuño M, S. A., y Vásquez M, G. H. (2014). Agronomía, producción y calidad de grano de variedades de soya durante dos épocas de cultivo. *Bioscience Journal*, 30(5), pages 717–729.
- Grupo Ingenio Colombiano (INGCO). <https://www.virtualpro.co/biblioteca/propiedades-y-reacciones-alergicas-al-aceite-de-soya-su-importancia-en-la-salud-y-la-nutricion>.
- Integro. (2022). Aditivo Zybum. <https://interagro.com.pa/farma-aditivos/zybum/>.
- Jana, U. K., & Kango, N. (2020). Characteristics and bioactive properties of manooligosaccharides derived from agro-waste mannans. *International Journal of Biological Macromolecules*, 149, pages 931–940. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.01.304>.
- Kumar, V., & Satyanarayana, T. (2015). Generation of xylooligosaccharides from microwave irradiated agroresidues using recombinant thermo-alkali-stable endoxylanase of the polyextremophilic bacterium *Bacillus halodurans* expressed in *Pichia pastoris*. *Bioresource Technology*, 179, pages 382–389. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.12.049>.
- Loman, A. A., & Ju, L. K. (2016). Towards complete hydrolysis of soy flour carbohydrates by enzyme mixtures for protein enrichment: A modeling

- approach. *Enzyme and Microbial Technology*, 86, pages 25–33. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2016.01.010>.
- McDonald, A. G., Tipton, K. F. (2021). *Enzyme nomenclature and classification: the state of the art*. FEBS Journal. John Wiley and Sons Inc. <https://doi.org/10.1111/febs.16274>.
- Mizutani, K., Tsuchiya, S., Toyoda, M., Nanbu, Y., Tominaga, K., Yuasa, K., Mikami, B. (2012). Estructura de la  $\beta$ -1,4-mananasa de la liebre de mar común *Aplysia kurodai* con una resolución de 1,05 Å. *Acta Crystallographica Sección F: Comunicaciones de biología estructural y cristalización*, 68 (10), pages 1164–1168. <https://doi.org/10.1107/S1744309112037074>.
- Nguyen, Q. A., Yang, J., & Bae, H. J. (2017). Bioethanol production from individual and mixed agricultural biomass residues. *Industrial Crops and Products*, 95, pages 718–725. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.11.040>.
- Pinho, G. P., Matoso, J. R. M., Silvério, F. O., Mota, W. C., López, P. S. N., & Ribeiro, L. M. (2014). A new spectrophotometric method for determining the enzymatic activity of endo- $\beta$ -mannanase in seeds. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 25(7), pages 1246–1252. <https://doi.org/10.5935/0103-5053.20140102>.
- Ramírez G, W., Mateo M, M., Cruz J, R., García F, A., & Labrada R, A. (2022). Validación del método SDS-PAGE para la determinación de la composición de proteínas en un extracto alergénico de soya. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*, 53(1), pages 31–42.
- Rodwell, VW., Bender, DA., Botham, KM., Kennelly, PJ y Weil, AP. (2016). Enzimas mecanismo de acción. *Bioquímica ilustrada*. Mc Graw Hill., pages 60-63.
- San Miguel H, A., Martín A, B., Martín A, S., Pachón, J., Pastor, R., Rodríguez B, E., Cabrero L, P. (2017). Propiedades y reacciones alérgicas al aceite de soya. Su importancia en la salud y la nutrición.
- Sharma, A., Tewari, R., Rana, SS, Soni, R. y Soni, SK (2016). *Celulasas: Clasificación, Métodos de Determinación y Aplicaciones Industriales*. Bioquímica aplicada y Biotecnología. Humana Press Inc. <https://doi.org/10.1007/s12010-016-2070-3>.
- Singh, S., Ghosh, A., & Goyal, A. (2018). Manno-oligosaccharides as Prebiotic-Valued Products from Agro-waste. In *Energy, Environment, and Sustainability*, pages 205–221. Springer Nature. [https://doi.org/10.1007/978-981-10-7434-9\\_12](https://doi.org/10.1007/978-981-10-7434-9_12).
- Sposina, R., Sant’Ana da Silva, A., Santana F-L, V., Pinto da Silva, E. (2012). Amino acids interference on the quantification of reducing sugars by the 3,5-dinitrosalicylic acid assay mislead carbohydrase activity measurements, *Carbohydrate Research*, 363,2012, pages 33-37. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2012.09.024>.
- Teixeira, R. S. S., Da Silva, A. S. A., Ferreira-Leitão, V. S., & Da Silva Bon, E. P. (2012). Amino acids interference on the quantification of reducing sugars by the 3,5-dinitro-salicylic acid assay mislead carbohydrase activity measurements. *Carbohydrate Research*, 363, pages 33–37. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2012.09.024>.
- Yang TS, Kim MC, Martínez-Pitargue F, Choi HS, Kil DY. Dietary  $\beta$ -mannanase decreases cloacal temperature of broiler chickens under hot conditions without affecting growth performance. *Rev Colomb Cienc Pecu.* (2019). 32(3): pages184-191. <https://doi.org/10.17533/udea.rccp.v32n3a03>.
- Zhang, R., Li, X. Y., Cen, X. L., Gao, Q. H., Zhang, M., Li, K. Y., Huang, Z. X. (2021). Enzymatic preparation of manno-oligosaccharides from locust bean gum and palm

- kernel cake, and investigations into its prebiotic activity. *Electronic Journal of Biotechnology*, 49, pages 64–71. <https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2020.11.001>.
- Zuluaga, L. (2013). Inmovilización de una mananasa en un soporte a base de quitina y/o quitosano para la hidrólisis de torta de palmiste. Tesis de maestría. Universidad Nacional de Colombia. Manizales.
- Zuluaga, L.V.; Padilla, B.E.; Aguilera, C.; Ocampo, J.L.; Acuña S., J.R. (2017). Remoción de sedimentos en extractos de café mediante hidrólisis enzimática con una mananasa de *Hypothenemus hampei*. *Revista Cenicafé* 68(2): paginas 90-98.