



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**HIDRÓLISIS DE ALFA-CELULOSA  
MEDIANTE UNA ENZIMA COMERCIAL (ENDOLASE 5000)  
EN UN BIOREACTOR DE MEMBRANA**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE**

**QUÍMICA DE ALIMENTOS**

**PRESENTA**

**SONIA ALICIA HERNÁNDEZ PADRÓN**



**MÉXICO, D.F.**

**2008**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## JURADO ASIGNADO:

Presidente	Herminia de Jesús Loza Tavera
Vocal	Luz Sandra Sánchez del Ángel
Secretario	Jorge Arturo Aburto Anell
1 <sup>er</sup> suplente	Maricarmen Quirasco Baruch
2 <sup>o</sup> suplente	Minerva Carrasco Fuentes

Sitio donde se desarrolló el tema:

Laboratorio de Biocatálisis y Reconocimiento Molecular del  
Instituto Mexicano del Petróleo

Asesor del Tema

Dr. Jorge Arturo Aburto Anell

Sustentante

Sonia Alicia Hernández Padrón

## **AGRADECIMIENTOS**

Al doctor Jorge Arturo Aburto Anell, por el sostén que me brindó durante mi estancia en el instituto y realización de este trabajo, no sólo como docente, sino, como persona.

A la doctora Herminia Loza Tavera, por su contribución mediante las correcciones pertinentes al trabajo escrito a través de sus conocimientos, observaciones y tiempo otorgado.

A la doctora Carmina Montiel, por la asesoría brindada durante mi permanencia en el instituto.

A mi tía Claudia Padrón Martínez, por la corrección de estilo del trabajo escrito final.

A la Universidad Nacional Autónoma de México y a la Facultad de Química, por acogerme durante estos años a través de su personal e instalaciones.

A cada uno de los contribuyentes del país, quienes de forma indirecta ayudaron a pagar mis estudios.

## **DEDICATORIAS**

*A Dios,*

Por la vida y sus enseñanzas.

*A mi madre Sonia y a mi padre Antonio,*

Por su apoyo, comprensión, paciencia y confianza; por ser ejemplos de coraje, tenacidad y fortaleza en todo momento.

*A Luis, mi hermano,*

Por su ayuda, pero sobre todo por el tiempo que se toma para escuchar y platicar, aún en la distancia.

*A Ana, mi hermana y Filiberto, mi cuñado,*

Por estar siempre presentes y apoyarnos, hasta en los momentos más críticos, a mis papás y a mí.

*A Leo, mi sobrino,*

Por traer diversión, aprendizaje y alegría a la familia desde el día en que nació.

*A mi sobrina recién nacida,*

Con quien comienzo una nueva etapa de mi vida, al igual que ella.

*A mis familiares en general,*

De quienes he aprendido diversas cosas y he encontrado apoyo en diferentes momentos.

*A mis amigos y compañeros,*

A Miguel, Denni, Alejandro Rubio, Ray (q.e.p.d), Carlos Guadarrama, Ernesto Ibarra, por su sinceridad en los buenos y malos momentos, por su apoyo y por creer en mí. Por que cada uno de ustedes ha marcado mi vida enseñándome algo nuevo a través de su persona.

A Eva, Lalo, Yolotli, Valentina, Lucila, Margarita, Adriana Pérez, Ailed, Ángeles Adriana, Adriana Gutiérrez, Paola Caballero, Chío Longoría, Lorena Estupiñán, Mónica Pérez, , Joyce Alfaro, Aldo Hernández, Carlos Moles, Adriana Gill, Carmen O. Tafoya, Guadalupe, Carolina Hernández, Blanca Saldaña, Roberto, Helena, Sandra Alfaro, Gerardo (donde quiera que te encuentres). Por ser parte de mi crecimiento profesional y personal, compartiendo parte de su tiempo y conocimientos tanto escolares como de la vida a través de los trabajos y las pláticas.

*Al doctor Antonio Mejías,*

Por enseñarme a conocerme mejor a través de su orientación, ayuda y dedicación.

*A los profesores:*

Ma. Elena Ibarra Rubio, Natalia de la Torre Aceves, Alberto Tecante, Rojo Callejas, Luis A. Ortiz Frade, Ernesto Sánchez Mendoza, Javier Cruz, que me enseñaron más que lecciones académicas, lecciones de vida.

*“Es el tremendo e irremediable resentimiento del fracaso vital en nombre del éxito. Se intenta sustituir la vida por el triunfo, y si éste no se logra, es la vida misma la que naufraga para siempre. Muchas veces, aunque el triunfo se alcance del modo más resonante, no sustituye a la vida misma.”*

Manuel Villegas López



# ÍNDICE

Resumen.....	I
CAPÍTULO I. Antecedentes.....	1
I.1. Bioetanol como combustible.....	1
I.1.1. Bioetanol.....	1
I. 1.2. Métodos de obtención de etanol.....	2
I.1.2.1. Bioetanol obtenido convencionalmente a partir de cosechas con alto contenido en azúcar.....	4
I.1.2.2. Bioetanol obtenido convencionalmente a partir de cultivos con alto contenido de almidón.....	5
I.1.2.3. Bioetanol obtenido convencionalmente a partir de material celulósico.....	6
I.1.2.4. Obtención de etanol a partir de síntesis química.....	7
I.1.3. Mercado de etanol en el mundo.....	8
I.1.4. Mercado de etanol en México.....	10
I.2. Materiales lignocelulósicos.....	13
I.2.1. Celulosa.....	14
I.2.2. Hemicelulosa.....	14
I.2.3. Lignina.....	15
I.2.4. Importancia de la hidrólisis de los materiales lignocelulósicos y su conversión a azúcares.....	16
I.2.4.1. Tratamientos previos a la hidrólisis.....	16
I.2.4.2. Métodos de hidrólisis (sacarificación).....	17
I.2.4.2.1. Hidrólisis ácida.....	17
I.2.4.2.2. Hidrólisis enzimática.....	18
I.2.4.2.2.1. Reactores enzimáticos.....	18
I.3. Enzimas.....	20
I.3.1. Usos de enzimas para la hidrólisis de material lignocelulósico.....	20
I.3.1.1. Oxidoreductasas: degradación de lignina.....	20
I.3.1.2. Hidrolasas: degradación de celulosa y hemicelulosa.....	21
I.3.1.2.1. <i>Endolase</i> 5000 (Novozymes): endoglucanasa.....	23
I.4. Objetivos e hipótesis.....	24
CAPÍTULO II. Metodología y diseño experimental.....	25
II.1. Diagrama general.....	25
II.2. Reactivos y equipo.....	26
II.3. Métodos.....	26

CAPÍTULO III. Resultados y Discusión.....	32
III.1. Identificación de las condiciones ópticas de la hidrólisis enzimática de $\alpha$ -celulosa mediante superficie de respuesta.....	32
III. 1.1. Comprobación del diseño experimental y su adecuación.....	32
III. 1.1.1. Suposición de normalidad del modelo.....	33
III.1.1.2. Estandarización del modelo mediante el estudio de residuales.....	35
III.1.2. Pruebas con concentración fija de catalizador.....	36
III.1.3. Pruebas con tiempo fijo.....	39
III.1.4. Pruebas a temperatura constante.....	41
III.2. Obtención de azúcares totales y reductores dentro del bioreactor de membrana..	43
III.2.1. Tiempo de vida media de la enzima <i>Endolase</i> 5000 (Novozymes).....	43
III.2.2. Comportamiento de la endocelulasa en el reactor.....	44
III.2.3. Cinética de hidrólisis de $\alpha$ -celulosa en el bioreactor de membrana.....	46
III.2.4. Eficiencia de hidrólisis y grado de polimerización.....	48
III.3. Producción de azúcares totales y reductores en un sistema de membrana vs. sistema por lotes.....	49
Conclusiones y recomendaciones.....	51
Anexo A.....	52
Anexo B.....	53
Bibliografía.....	54



## RESUMEN

En la actualidad el petróleo y sus derivados son los recursos de obtención de energía más importantes en el nivel mundial, no obstante a pesar de la importancia que tienen en nuestros días son una fuente energética no renovable. Debido a ello se están buscando alternativas energéticas renovables, que contribuyan a la conservación del medio ambiente. Entre estas alternativas se encuentra la producción de biocombustibles, como el etanol que se obtiene a partir de hidratos de carbono entre los que se encuentran los materiales lignocelulósicos. Dichos materiales deben ser fraccionados en sus componentes, celulosa, hemicelulosa y lignina, los cuales por acción de enzimas de tipo hidrolasas son degradados hasta azúcares reductores. Si los azúcares reductores generados por la hidrólisis enzimática de biomasa, como la  $\alpha$ -celulosa, se someten a un proceso de fermentación en condiciones anaeróbicas junto con levadura se obtendrá etanol. Este alcohol podrá emplearse como un energético dentro de mezclas con gasolina de tal forma que se comiencen a sustituir de manera parcial los hidrocarburos, con el doble objetivo de buscar fuentes de energía renovables y preservar el equilibrio ecológico.

En afinidad con la investigación que promueve la búsqueda de nuevas alternativas energéticas, en el presente trabajo se estudió la hidrólisis de  $\alpha$ -celulosa, uno de los componentes del material lignocelulósico. El análisis se enfocó en determinar las mejores condiciones para obtener azúcares reductores y azúcares totales solubles mediante una enzima del tipo endoglucanasa.

Inicialmente la reacción de hidrólisis se llevó a cabo en un sistema de lotes y designando como variables independientes a la temperatura (20, 30, 45, 60 y 70 °C), el tiempo (8 min. 1.5, 3.5, 5.5 y 7 h) y la concentración de enzima *Endolase* 5000 (Novozymes) (0.8, 2.5, 5, 7.5, 9% (v/v)) mediante un diseño de experimentos de tipo composito central. Posteriormente, con base en los resultados obtenidos en el diseño de experimentos se escogieron los valores de los factores de  $T = 20$  °C y  $[\text{enzima}] = 7.5\%$  (v/v) que se fijaron, para realizar la hidrólisis del polisacárido ( $\alpha$ -celulosa) en un reactor de membrana de forma semicontinua durante 25 h, tomando muestras cada media hora para realizar la cuantificación de azúcares totales solubles por el método de fenol-sulfúrico, la de azúcares reductores con la técnica de DNS y el monitoreo de proteína lavada, realizando la determinación de todos mediante espectroscopía UV-VIS.

Los resultados obtenidos fueron que el factor que más influyó en la producción de azúcares fue la concentración de enzima. La mayor capacidad de hidrólisis se presenta durante la primera hora siendo del siete por ciento y del 10% al tiempo final, presentando el mayor grado de polimerización durante las primeras 2 h, generando oligosacáridos conformados de cuatro monómeros. La cantidad de proteína lavada del biorreactor de membrana fue de 0.0306% (1.205mg) y la estabilidad de la actividad catalítica de la enzima de 1.93 h.

Debido a que no se tiene un incremento alto en la capacidad de hidrólisis y la producción de azúcares reductores sólo es detectable hasta las 5 h en concentraciones inferiores a 20 µg/mL, se recomienda que al montar un sistema de membrana utilizando al catalizador *Endolase 5000*, se incremente la concentración del mismo, se utilicen temperaturas en el intervalo de 60 a 65 °C y tiempos de trabajo inferiores a tres horas.

# CAPÍTULO I. ANTECEDENTES

## I.1. BIOETANOL COMO COMBUSTIBLE

### I.1.1. Bioetanol

Se conoce como bioetanol para uso de combustibles al alcohol etílico o etanol producido por microorganismos en procesos de fermentación a partir de la sacarosa de la caña o de los almidones del maíz, la papa o la yuca (López-Munguía, 2000) y que debe presentar un grado de pureza del 99%. Sin embargo, también se ha puesto la mira, para su obtención, en materiales con alto contenido en celulosa como maderas y residuos de materia orgánica (Grassi y Tripsa, 2004).

El uso de etanol como combustible no es un fenómeno nuevo, Henry Ford en 1907 aportó la idea de producir el primer vehículo que funcionara con etanol como combustible (Jacob, 2002). El proceso se desarrolló primero en Alemania durante la Primera Guerra Mundial; en 1941 había ya 30 plantas en diferentes partes del mundo trabajando con buenos resultados en la producción de alcohol por hidrólisis de madera en soluciones débiles de ácido sulfúrico o clorhídrico (Austin, 1988).

De los diferentes biocombustibles, (Grassi y Tripsa, 2004) el bioetanol es uno de los más interesantes por las siguientes razones:

- ✓ Su producción es de bajo costo.
- ✓ Tiene un alto rendimiento por hectárea.
- ✓ Su obtención a partir de azúcar y almidón es sencillo, así como del tratamiento enzimático de biomasa lignocelulósica, aunque este último tiene un costo alto.
- ✓ Estará disponible para abarcar todos los mercados (cogeneración-transporte-químicos).

Por su parte, el etanol es un combustible que presenta un octanaje alto, debido a que el oxígeno que se encuentra en su molécula permite que la combustión se efectúe a bajas temperaturas disminuyendo las emisiones de CO<sub>2</sub> y de NO<sub>x</sub> (IEA, 2007), así como una presión de vapor inferior, resultando en menores emisiones evaporativas (Tabla 1). Por ello, las gasolinas con índices de octano altos presentan una combustión de modo más uniforme, por lo que son combustibles más eficientes (Brown *et al.*, 2004) y menos contaminantes. De ahí que las mezclas de etanol-gasolina con bajos porcentajes (5%-10%) pueden ser utilizadas en motores con ingeniería convencional y sin necesidad de hacer cambios en la tecnología que actualmente se emplea (IEA, 2007).

**Tabla 1. Características comparativas entre etanol y gasolina**  
(Enriquez Poy, 1998)

	Gasolina	Etanol
Calor específico (kJ/Kg)	34 900	26 700
Número de octano (RON/MON)*	91/80	109/98
Calor latente de vaporización (kJ/Kg)	376-502	903
Temperatura de ignición (°C)	220	420
Relación estequiométrica (aire/combustible)	14,5	9
*RON: research octane number; MON: Motor octane number.		

Con estos resultados se puede esperar que a medida que las biorefinerías reemplacen de manera parcial los productos de las refinerías de petróleo, la sociedad y el ambiente se irán beneficiando, porque con el cambio de materia prima se reducirán las emisiones de gases contaminantes. Asimismo, al pasar del uso de hidrocarburos a hidratos de carbono renovables como fuente de energía en la elaboración de materiales y productos químicos, también habrá menos agentes contaminantes en nuestro ambiente.

Las ventajas en el desarrollo de la tecnología para la producción de etanol a partir de biomasa tiene beneficios directos como: la reducción de emisiones de gas, el uso de recursos renovables, la construcción de industrias con procesos químicos basados en hidratos de carbono, así como ventajas económicas para las comunidades rurales que implementen este proceso y en general a toda la sociedad (Knauf y Moniruzzaman, 2004).

### I.1.2. Métodos de obtención de etanol

Para la obtención de etanol se utiliza principalmente tres tipos de biomasa<sup>1</sup>, los azúcares (remolacha, caña de azúcar y melaza), los amiláceos (maíz, trigo, cebada, sorgo y tubérculos), y los lignocelulósicos (maderas y residuos lignocelulósicos) (IMP, 2006. Tabla 2). Por otro lado, los métodos de síntesis química se basan en la hidratación del acetileno.

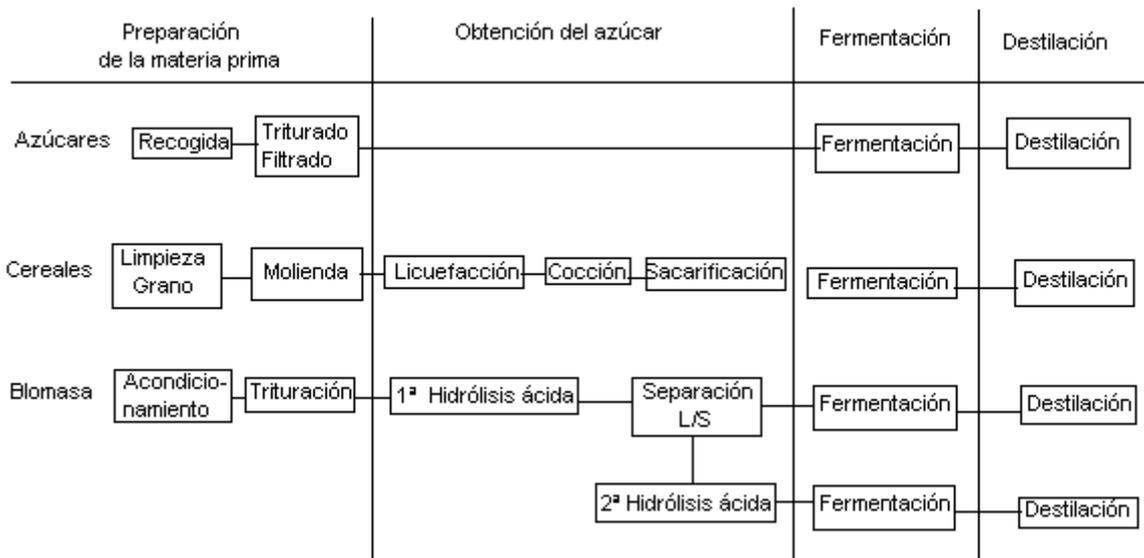
**Tabla 2. Tipo de biomasa en función de sus principales componentes.**

<b>TIPO</b>	<b>HIDRATOS DE CARBONO</b>	<b>EJEMPLOS</b>
Azúcares	Glucosa Monosacáridos Fructosa  Disacáridos (Sacarosa)	Pulpa de frutas  Pulpa de frutas  Caña de azúcar, sorgo dulce y remolacha
Amilácea	Inulina Polisacáridos Almidón	Granos de cereal, tubérculos de patata, rizomas de cassava, rizomas de dalia y archicoria
Lignocelulósica	Hemicelulosa Polisacáridos Celulosa	Maderas en general  Residuos lignocelulósicos.

De manera general, el proceso de producción del etanol a partir de biomasa se conforma de cuatro subprocesos (Figura 1): la preparación de la materia prima, la obtención del azúcar (en donde varía ligeramente la segunda etapa dependiendo del tipo de materia prima), la fermentación y la destilación (IMP, 2006).

---

<sup>1</sup> Se entiende por biomasa todo aquel material de origen biológico que es susceptible a ser utilizado para otros fines distintos al alimentario.



**Figura 1. Diferenciación de procesos de producción de bioetanol.**

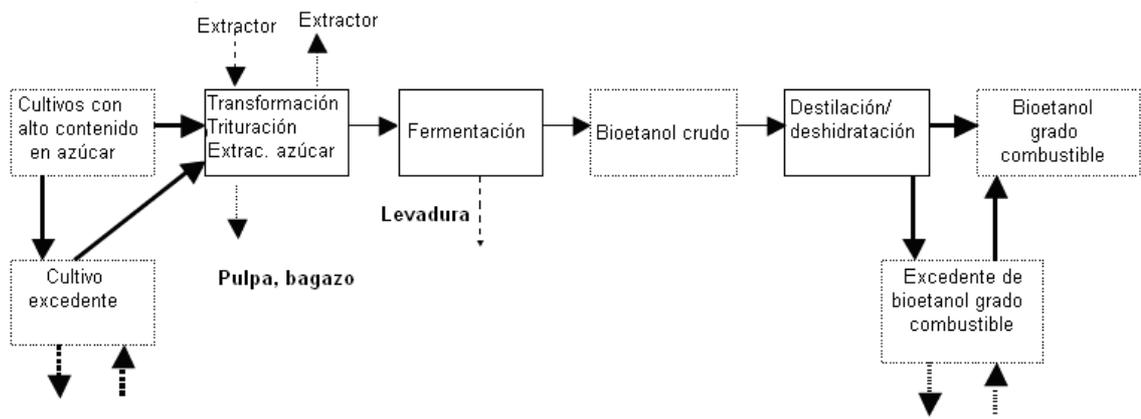
A continuación se presentan tres procesos de obtención del etanol a partir de biomasa (E. van Thuijl *et al.*, 2003).

### **I.1.2.1. Bioetanol obtenido convencionalmente a partir de cosechas con alto contenido en azúcar.**

Las cosechas con alto contenido en azúcar contienen sacáridos que pueden ser fácilmente separados y estar disponibles para las levaduras durante el proceso de fermentación (Figura 2).

Los azúcares pueden ser obtenidos a partir de la remolacha, mediante un proceso de difusión como primer paso, seguido de la fermentación para generar etanol en bruto, posteriormente el bioetanol es purificado mediante una serie de destilaciones y deshidrataciones, hasta obtenerlo en un grado de combustible.

El bioetanol puede ser utilizado como combustible para automóviles o también como aditivo para la producción de otros combustibles como el éter etil ter-butílico (ETBE). Los subproductos como la pulpa y el bagazo se pueden seguir aprovechando, ya que pueden ser utilizados para generar electricidad o calor dentro del proceso.

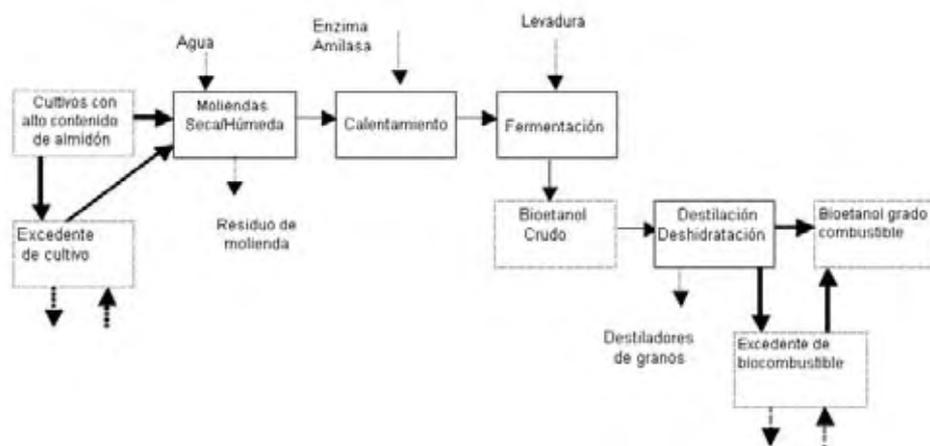


**Figura 2. Proceso de obtención de etanol, a partir de cultivos con alto contenido en azúcar (Adaptada de E. van Thuijl *et al.*, 2003)**

**1.1.2.2. Bioetanol obtenido convencionalmente a partir de cultivos con contenido alto de almidón.**

A la materia prima que se obtiene de cosechas con alto contenido de almidón, se le debe dar un tratamiento mayor debido a que los hidratos de carbono que contiene son más complejos estructuralmente y no pueden ser degradados fácilmente a azúcares simples.

En un paso adicional al proceso (Figura 3), el material comprimido es calentado para disolver todo el almidón soluble en agua. Simultáneamente, el almidón es convertido a azúcares mediante un proceso enzimático o por hidrólisis ácida, posteriormente se realiza la fermentación de los azúcares para obtener etanol en bruto, para finalizar se realizan los pasos de destilación y deshidratación para obtenerlo en grado combustible.



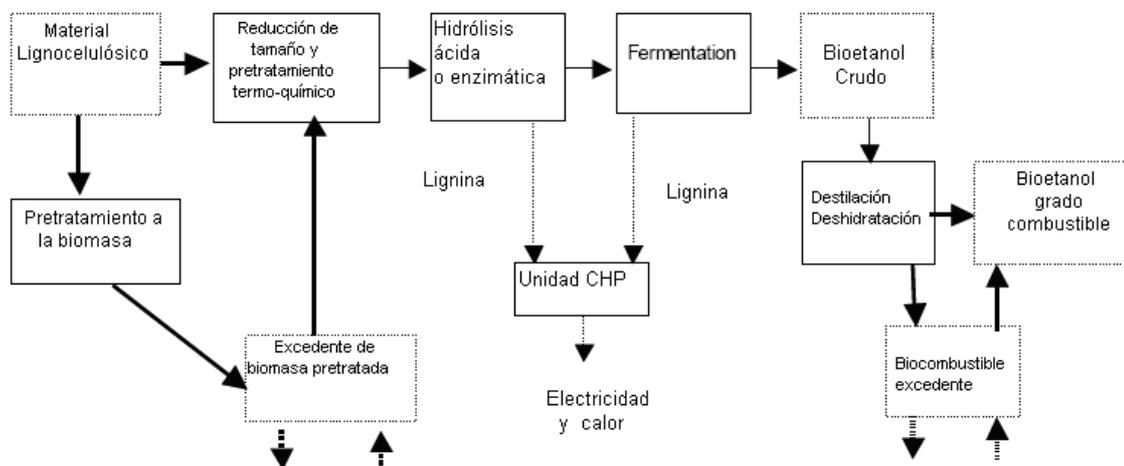
**Figura 3. Proceso de conversión a etanol a partir de cultivos con contenido alto de almidón (Adaptada de E. van Thuijl *et al.*, 2003)**

**I.1.2.3. Bioetanol obtenido a partir de material celulósico (conocido también como bioetanol celulósico).**

El etanol puede ser obtenido a partir de material celulósico, el cual está compuesto principalmente de celulosa, hemicelulosa y lignina. Tanto la celulosa como la hemicelulosa son fuentes potenciales de azúcares que pueden ser fermentados a etanol. La fracción remanente conocida como lignina, no puede ser fermentada, pero puede ser utilizada como combustible para la generación de energía eléctrica y/o generación de calor (Figura 4).

La obtención de azúcares fermentables a partir de biomasa lignocelulósica es más difícil de producir comparada con la que se hace a partir de azúcar o almidón; ya que requiere tanto de un proceso de pretratamiento como de un proceso de hidrólisis. El pretratamiento de la biomasa consiste en una molienda para reducir el tamaño de partícula y hacer disponibles los azúcares para el pretratamiento termo-químico y tratamientos posteriores. El tratamiento termo-químico permite retirar la lignina y las fracciones celulósicas (hemicelulosa y celulosa).

Los compuestos estructurales del material lignocelulósico son rotos para optimizar el acceso a las enzimas durante el proceso de hidrólisis, en el cual se añade ácido para producir una corriente líquida de azúcares oligoméricos. Posteriormente, se lleva a cabo la sacarificación, con la que se obtiene, por ejemplo, azúcares monoméricos fermentables (como la glucosa y xilosa que son los que se obtienen principalmente); para finalmente ser fermentados a etanol. La lignina es separada durante el proceso de hidrólisis o durante su fermentación. El etanol en bruto es destilado y deshidratado para obtener etanol grado combustible



**Figura 4. Proceso de obtención de etanol producido a partir de material lignocelulósico (Adaptada de E. van Thuijl *et al.*, 2003)**

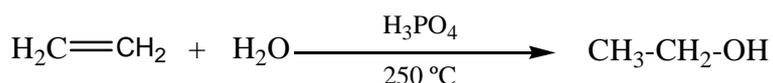
La fermentación se lleva a cabo de manera industrial de tres maneras diferentes:

- a) Tanques con lotes individuales,
- b) Tanques operados en serie, también conocido como cascada y
- c) Tanques individuales operando de manera continua, es decir, conforme se alimenta el reactor, se saca el producto.

El último paso, que se refiere a la destilación, se lleva a efecto recuperando el etanol del fermentador y realizando la destilación de manera fraccionada, en plantas tradicionales el destilado es condensado y pasado en varias series de redestilación y recondensaciones para obtener la calidad de producto deseado (Keim,1983).

#### **I.1.2.4. Obtención de etanol a partir de síntesis química.**

La obtención de etanol mediante reacciones químicas es conocida con el nombre de hidratación. Esta reacción tiene lugar al tratar al alcano con agua y como catalizador un ácido fuerte (Figura 5). Así, la protonación de un doble enlace del alqueno produce un carbocatión intermediario, que reacciona con el agua formando un alcohol protonado como producto ( $\text{ROH}_2^+$ ). La pérdida del protón ( $\text{H}^+$ ) en este alcohol protonado produce un alcohol neutro y se regenera el catalizador ácido. La hidratación del alqueno catalizada en medio ácido es un procedimiento adecuado a escala industrial. Por ejemplo, en Norteamérica se producen cada año alrededor de 300,000 toneladas de etanol por hidratación de etileno (Mc Murry, 2001).

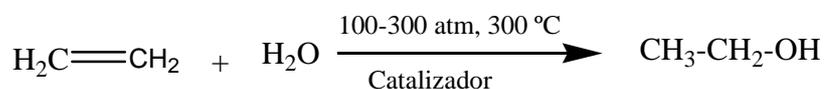


**Figura 5. Reacción para la obtención de etanol mediante hidratación**

El alcohol de 95° que se produce por destilación es apropiado para emplearse como disolvente y como reactivo cuando el agua no afecta la reacción que se desea generar. Cuando se requiere alcohol absoluto (etanol ca. 99%), como es el caso para combustible, el azeótropo <sup>2</sup> de 95 % se trata con un agente deshidratante como óxido de calcio anhidro ( $\text{CaO}$ ), que elimina el 5 % de agua.

<sup>2</sup> Un azeótropo, es una mezcla de líquidos que hierve a menor temperatura que cualquiera de sus componentes.

Desde la segunda guerra mundial, la mayor parte del etanol se obtiene por la reacción del agua con etileno a alta temperatura y presión, en fase gaseosa y utilizando un catalizador (Figura 6). Se emplean catalizadores como P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, óxido de tungsteno, o varios caolines tratados de manera especial (Wade, 1993).



**Figura 6. Reacción para la obtención de etanol con temperaturas y presiones altas.**

El etanol es un combustible excelente para motores, con una clasificación de octano arriba de 100. Si un automóvil se pone en funcionamiento con etanol puro, se debe ajustar el carburador del automóvil para evitar problemas en el motor, pero las mezclas con aproximadamente 10 % de etanol en gasolina (conocida como *gasohol*) trabajan bien sin tener que hacer ajuste alguno (Wade, 1993).

### **I.1.3. Mercado de etanol en el mundo**

A mediados de los años 70, se puso la mira en la obtención de etanol mediante el proceso de fermentación como una alternativa o suplemento a la gasolina, con el fin de reducir los costos en los combustibles y la dependencia de importar petróleo (Keim, 1983) en los países carentes de zonas petrolíferas. La crisis energética puso de manifiesto la forma irracional en que la colectividad, sobre todo la de países industrializados, usa la energía en particular la proveniente del petróleo (López-Munguía, 2000).

En el año 2002 en Europa, se produjeron cerca de 1.6 millones de toneladas de etanol, de las cuales 225 000 se utilizaron como biocombustibles, principalmente en España, Francia y Suecia. Sin embargo, Europa se encontró por debajo de Estados Unidos y Brasil, donde se produjeron para uso exclusivo de biocombustibles 5.7 y 8.7 toneladas de etanol/año respectivamente. En el nivel mundial en el 2002, se produjeron 26 millones de toneladas de etanol, destinándose el 63% a biocombustibles (BACAS, 2004).

En el período de 1975 a 2004 el mercado más grande en bioetanol se ubicaba en Brasil, producido a partir de caña de azúcar. Su programa en bioetanol, le ha permitido a este país reducir el consumo de gasolina en aproximadamente 230 mil millones de litros de gasolina (Aburto *et al.*, 2007) teniendo, hasta el año de 1998, un área cultivada de caña superior a 4 millones de hectáreas, de las cuales 2.69 millones se encontraban destinadas para la

producción de cerca de 14 millones de metros cúbicos de etanol (Enriquez Poy, 1998). El segundo mercado más grande era en Estados Unidos, donde se utiliza maíz para la producción de etanol.

En el período del 2004-2005, la producción global de etanol aumento en un ocho por ciento incrementándose de 30.5 a 33 mil millones de litros. A finales del año 2005, en Estados Unidos se tenían 95 plantas productoras de etanol con capacidad de producción de 16.4 mil millones de litros por año. Pero a mediados del año 2006 fueron construidas 35 plantas adicionales con capacidad para producir arriba de 8 mil millones de litros adicionales por año. Por otro lado, Brasil tiene arriba de 300 plantas en operación (IEA, 2007).

En el año 2005, la producción de etanol destinada para uso como combustible fue de 36.5 mil millones de litros, superando al año 2004 en un 19%. Los principales productores son Estados Unidos y Brasil, quienes lo obtienen principalmente de los cultivos de maíz y caña de azúcar consiguiendo una producción del 90% basada en estas dos materias primas (Aburto, 2007).

La *IEA's Energy Technology Perspectives* (2006) sugiere que el bioetanol y el biodiesel pueden reunir el 13% de la demanda de combustible para transportes y contribuir con la reducción del 6% de las emisiones contaminantes para el 2050 (IEA, 2007).

En Brasil (2008), dos terceras partes del consumo de combustible para transporte es producido con base en caña o semillas. En una ciudad como Sao Paulo, con 11 millones de habitantes, se vende ya más etanol que gasolina (Gabrielli, Presidente de Petróleos Brasileiros, Petrobras).

Recientemente, a finales de febrero del 2008 durante un foro en Brasilia, un panel de legisladores de 13 países, en los que se encontraba México, fracasó sobre su propuesta de iniciativa de regulación y producción de biocombustibles. En esta reunión además se aseguró que pasarán algunos años antes de que el etanol sustituya a los combustibles generados a partir del petróleo a nivel mundial (González Amador, 2008).

#### **I.1.4. Mercado de etanol en México.**

En México durante los años de 1997 y 1998, operaron únicamente 14 destilerías la mitad de las que existían en años anteriores. Para el año de 1998 resurgen las iniciativas de la incursión de un proyecto que propuso el uso de etanol como carburante y con miras de ayuda al sector agrícola de caña de azúcar. Dentro de ese plan se encontraba destinar un lote de automóviles que utilizaran combustibles híbridos de etanol-gasolina, llevando a cabo un seguimiento de control de emisiones, así como el rendimiento de los motores, con el apoyo de instituciones como la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), el Instituto Politécnico Nacional (IPN) y el Instituto Mexicano del Petróleo (IMP), y siendo como fuente de suministro de etanol algunas de las destilerías con producción de alcohol hidratado (Enriquez Poy, 1998).

Dentro del sector energético en México, el etanol no se ha empleado como aditivo para gasolinas ni combustibles para vehículos de transporte, como es el caso de Brasil, Estados Unidos y algunos países de Europa (Aburto, 2007).

En México, se ha realizado un análisis sobre el aprovechamiento que se le debe dar a los productos agrícolas nacionales para la elaboración de combustibles y junto con esto, se ha generado una conciencia por parte de empresarios mexicanos acerca de que debe haber una reducción del impacto ambiental, pronunciándose 94% de ellos a favor de la utilización de energía renovable si estuviera disponible y 54% declara estar dispuesto a pagar un sobre precio hasta del 11% por la energía renovable (Gallup México, 2000).

La propuesta de ley de bioenergéticos alentó a empresarios y a productores de caña y maíz a establecer proyectos de inversión para producir etanol. Sin embargo y debido a las restricciones y cambios de la ley realizados por los legisladores de Senado, algunos empresarios descartaron su participación. A mediados del 2006 se consideraron alrededor de 19 proyectos posibles en diferentes estados de la república como Tamaulipas, Sonora, Jalisco, Chihuahua y Baja California Norte (Mexicali), los cuales utilizarían maíz y sorgo como materia prima por tener ventajas en precio sobre la caña de azúcar. En Veracruz y Chiapas también se tenían contempladas plantas de producción de etanol, pero a diferencia de las demás proponían el uso de caña como materia prima. Por otro lado, en Nuevo León se propuso el uso de la remolacha para la producción de etanol (Aburto, 2007).

El Centro de Estudios Económicos del Sector Privado (CEESP), en mayo del 2007, expuso que al no crecer la producción petrolera, la búsqueda de combustibles alternativos se ha intensificado sugiriendo que México debía idear una estrategia que impulse el uso de maíz trasgénico para la elaboración de etanol y al mismo tiempo lograr un repunte en la producción del grano.

Este mismo organismo señaló que en el caso de México no se ha logrado producir una cantidad significativa de etanol a partir de caña debido a los problemas productivos que han frenado el desarrollo de ese producto. Los productores de caña argumentan que no es rentable destinar su producto a la producción de etanol ya que una tonelada de caña de azúcar puede convertirse en 120 kilos del endulzante cuyo obteniendo una ganancia de 720 pesos mientras que la misma tonelada de caña se transforma en 80 litros de etanol que generan una ganancia de 480 pesos.

Recordó que la producción de etanol en México fue de nueve millones de galones en el 2004, mientras que para el 2005 y 2006 se produjeron 12 y 13 millones de galones, respectivamente, presentando cambios mínimos cada año e indicó que los que pueden abastecer el mercado interno son los productores de caña de azúcar y los productores de maíz (Notimex, 2007).

El uso directo o complementario de biocombustibles presenta ventajas potenciales en diversos órdenes como:

- a) el ecológico, aprovechamiento de residuos agrícolas y urbanos, reducción significativa de las emisiones de compuestos aromáticos, equilibrio en el ciclo de gases invernadero ( $\text{CO}_2$ ),
- b) el tecnológico, incremento en la capacidad instalada de combustible automotor,
- c) el social y el económico, diversificación de los agricultores hacia productos de mayor valor agregado, diversificación de las fuentes de energía.

Existe una gran oportunidad para que México emprenda la producción a gran escala de etanol debido a que cuenta con una gran producción de caña de azúcar y agave. No obstante, la obtención de etanol también puede realizarse a partir de insumos como maíz, yuca, sorgo, etc., con los que cuenta México. Además, es importante resaltar que ya existen tecnologías maduras en el mercado y otras tecnologías de reciente creación basadas en el aprovechamiento de materiales lignocelulósicos que se encuentran en desarrollo.

Actualmente, la fabricación de etanol en México comparada con otros países es marginal, ca. 50 millones de litros (organización de cañeros). Para tener un programa de producción de etanol exitoso es necesaria la disminución del costo de la materia prima, elemento más importante para los costos de producción, con el aumento de la escala productiva y precios de etanol en la franja superior. El precio del etanol combustible tiende a asociarse al precio de la gasolina, cuya tendencia futura es creciente; no se espera que el etanol desplace completamente a la gasolina del mercado en ningún momento. Sin embargo, si es plausible que el uso de éste pueda coadyuvar a alargar los recursos petrolíferos logrando una moderada cuota de mercado y ahorrando gasolina para el futuro.

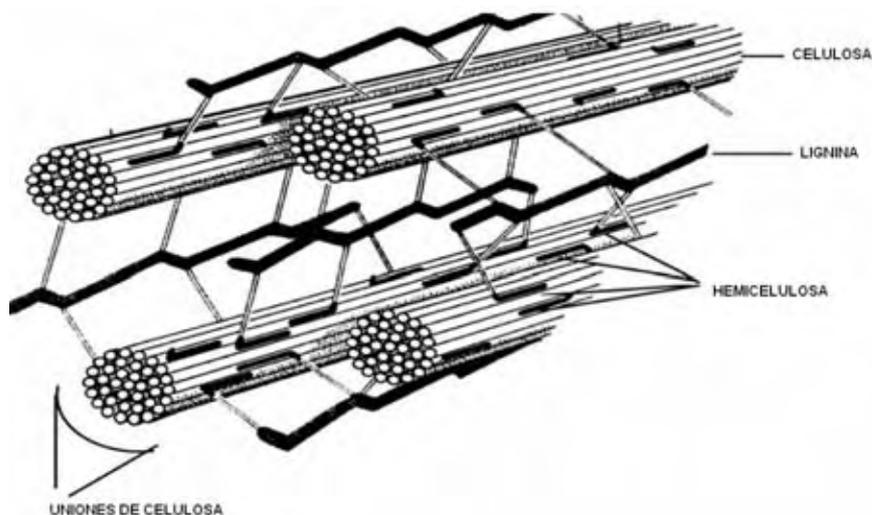
La estructura de la producción de etanol en México (Maserá Cerruti *et al.*, 2006) en el futuro tiene dos alternativas:

- 1) Continuar con la situación actual, esto es, que existan un gran número de propietarios de tierra, superficies pequeñas organizadas en cooperativas pequeñas,
- 2) Participación a escalas mayores, dentro de este modelo se considera la expansión a gran escala de los pastizales de caña y convertir en tierras productivas las tierras marginales, dando lugar al desarrollo rural y de infraestructuras social, en lugares donde no cuentan con este tipo de desarrollo.

## I.2. MATERIALES LIGNOCELULÓSICOS

En el mundo, grandes cantidades de compuestos basados en polisacáridos son biosintetizados en la tierra cada año mayoritariamente por fotosíntesis (Svendsen, 2004). Durante la producción de biomasa lignocelulósica, las reacciones fotosintéticas son dirigidas principalmente a la formación de los componentes de ésta, entre los que se encuentran la celulosa y la hemicelulosa constituidos de varios bloques de glucosa o una pentosa unidos y representados como  $(\text{CH}_2\text{O})_x$  en forma polimérica (Yu *et al.*, 2007) y cada uno de estos bloques unidos mediante lignina.

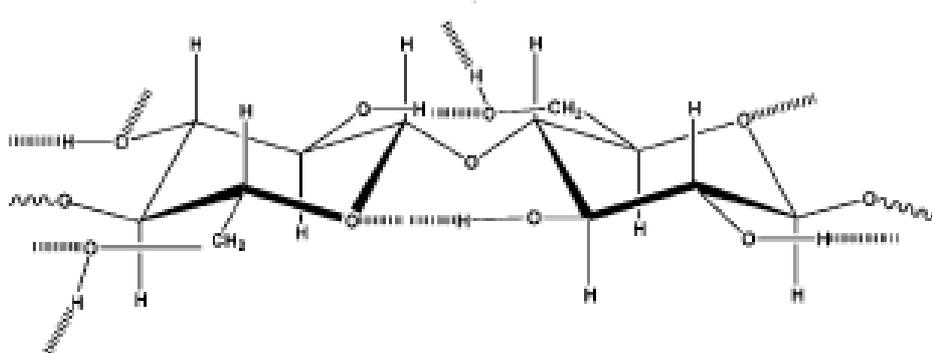
De esta misma forma, los materiales lignocelulósicos constituyen arriba del 90% del peso seco de las células vegetales. Este tipo de residuos se pueden considerar como complejos macromoleculares de polisacáridos (celulosa y hemicelulosa) y lignina (Figura 7). Los polisacáridos constituyen entre el 50 y el 70% de la biomasa de las plantas vasculares y la lignina constituye entre un 15 y un 30% (Lucas *et al.*, 2001).



**Figura 7. Arreglo típico de la pared celular de una planta (adaptada de Yu *et al.*, 2007)**

### I.2.1. Celulosa

La celulosa es el material orgánico más abundante en la tierra, debido a que es un componente fundamental de la pared de las células vegetales, donde se encuentra íntimamente asociada con otros polisacáridos (hemicelulosas y pectinas) y con la lignina (Lucas *et al.*, 2001). Su esqueleto es un homopolímero de cadena lineal de glucosa unido por enlaces  $\beta$ -(1-4)-glucosídicos, con peso molecular aproximado de 300,000-500,000 dependiendo de su cadena. La unidad básica repetida en el polímero de celulosa consiste en dos glucosas anhidras unidas, llamada *celobiosa*, mediante un enlace  $\beta$  (Figura 8). Esta disposición de las uniones es bastante rígida y muy estable, lo cual proporciona a la celulosa las propiedades adecuadas para su empleo como material estructural (Wade, 1993). La celulosa puede ser considerada como una condensación polimérica de glucosa, similar al almidón, pero las uniones entre las glucosas son significativamente diferentes (Yu *et al.*, 2007).



**Figura 8. Estructura química de un fragmento de celulosa, Nombre sistemático: poli (1,4-O- $\beta$ -D-glucopiranosido)**

### I.2.2. Hemicelulosa

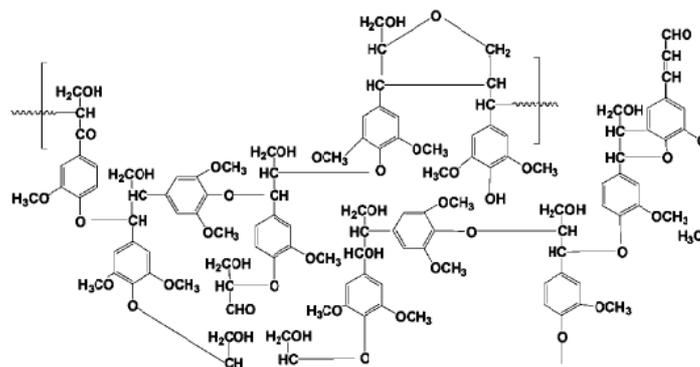
La hemicelulosa consiste en varios monosacáridos polimerizados, incluyendo azúcares de cinco carbonos (usualmente xilosa y arabinosa) y azúcares de seis carbonos (en los que se incluyen la galactosa, glucosa y la manosa), así como residuos de ácido 4-O-metilglucurónico y de ácido galacturónico. La hemicelulosa existe en asociación con la celulosa en la pared celular. El bloque más abundante de la hemicelulosa en maderas duras es el xilano (un polímero de xilosa), el cual consiste de monómeros de xilosa unidos mediante enlaces en las posiciones 1 y 4. La hemicelulosa tiene una estructura amorfa, la cual es más fácil de hidrolizar a sus monómeros en comparación con la celulosa (Yu *et al.*, 2007).

### I.2.3. Lignina

El término lignina deriva del latín *lignum*, que significa madera y define al material cementante entre las paredes celulares de los tejidos leñosos de los vegetales (Lucas *et al.*, 2001).

La lignina tiene una estructura de árbol tridimensional, altamente ramificado de estructura amorfa (Figura 9). Es una sustancia polifenólica que consiste en un arreglo irregular de varias uniones hidroxilo y metoxilo, sustituido con unidades de fenilpropano. Se considera a la lignina un componente necesario para que una planta sea clasificada como leñosa. La lignina es comúnmente asociada con la celulosa y la hemicelulosa, formando compuestos lignocelulósicos que deben ser degradados a celulosa y hemicelulosa para poder llevar a cabo su hidrólisis a azúcares de menor tamaño.

De igual manera, tiene una estructura amorfa, la cual forma un gran número de posibles uniones internas entre unidades individuales. Los enlaces tipo éter predominan entre las unidades de lignina. También, existen uniones covalentes entre la lignina y los polisacáridos, que hacen más fuerte la adhesión entre las fibras de celulosa y la lignina (Yu *et al.*, 2007).



**Figura 9. Estructura parcial de una molécula de lignina proveniente de madera dura (Yu *et al.*, 2007)**

## **I.2.4. Importancia de la hidrólisis de los materiales lignocelulósicos y su conversión a azúcares**

La bioconversión de residuos de origen vegetal para su empleo como fuente energética renovable, así como para la obtención de productos químicos, adquiere cada vez un mayor interés, debido a que son materiales energéticos que producen menos contaminantes como gases de CO<sub>2</sub>. De igual modo, se pueden generar productos de fácil desintegración biológica, por ejemplo biopolímeros, lo que permite que no se acumulen desechos por períodos largos de tiempo (Lucas *et al.*, 2001).

La hidrólisis de los materiales lignocelulósicos tiene como objetivo romper la celulosa y la hemicelulosa en azúcares simples (Aburto *et al.*, 2007). El proceso de obtención de etanol está conformado por tres pasos principales: un pretratamiento, la hidrólisis y la fermentación. Existen varios métodos de hidrólisis ejemplos de esta son la hidrólisis ácida y la enzimática. Sin embargo, debido a la estructura recalcitrante de la celulosa y su asociación con la lignina y la hemicelulosa, matriz resistente a la hidrólisis, los sustratos lignocelulósicos deben ser pretratados químicamente o físicamente para que se pueda llevar a cabo la posterior hidrólisis química o enzimática a azúcares (Yu *et al.*, 2007).

### **I.2.4.1. Tratamientos previos a la hidrólisis**

Dentro de los métodos de pretratamiento se encuentran (Fan *et al.*, 1982):

A. Pretratamientos físicos:

- ✓ Mecánicos: en este tipo de pretratamientos se utilizan fuerzas físicas para subdividir el material lignocelulósico en partículas finas que son susceptibles a la hidrólisis ácida o enzimática debido a que se incrementa la superficie de contacto y también permiten disminuir la cristalinidad de la celulosa.
  
- ✓ No mecánicos: permiten la descomposición del material lignocelulósico exponiéndolo a otras fuerzas externas diferentes a las mecánicas, como son irradiación, explosión de vapor y pirólisis.

B. Pretratamientos químicos: son utilizados para la remoción de lignina y la destrucción de su estructura cristalina. Son usualmente efectivos, sin embargo, presentan desventajas como el uso de grandes cantidades de materiales corrosivos; por ejemplo:

- ✓ Tratamientos en medio alcalino: hidróxido de sodio, amonio, sulfito de amonio.
- ✓ Tratamientos en medio ácido: los ácidos son utilizados principalmente para la hidrólisis de la celulosa.
- ✓ Tratamientos con gases: este tipo de pretratamientos tiene la ventaja de que facilita la penetración a través del substrato, por eso, es posible que se recubra perfectamente el material. Entre los gases utilizados están: dióxido de cloro, óxidos de nitrógeno, dióxido de sulfuro, ozono.
- ✓ Tratamientos con agentes oxidantes: los agentes oxidantes son utilizados para el pretratamiento de materiales lignocelulósicos, modificando la estructura de la celulosa mediante la oxidación, ejemplos de estos son: peróxido de hidrógeno y ácido peracético.

C. Pretratamientos biológicos, este tipo de tratamientos utilizan el ataque microbiano a la madera para que se pueda degradar la lignina y se encuentran clasificados en tres categorías:

- ✓ Putrefacción café: ataque principalmente hacia celulosa.
- ✓ Putrefacción blanca: ataca principalmente a lignina y celulosa.
- ✓ Putrefacción roja: al igual que la blanca ataca a lignina y celulosa.

#### **I.2.4.2. Métodos de hidrólisis (sacarificación)**

##### **I.2.4.2.1. Hidrólisis ácida**

La hidrólisis ácida de los enlaces glicosídicos en los polisacáridos y las divisiones de las uniones de tipo  $\alpha$  y  $\beta$ -aril éter dentro de la lignina, son las reacciones primarias de degradación que ocurren cuando los materiales lignocelulósicos son sometidos a un medio ácido. Para llevar a cabo la hidrólisis se pueden utilizar medios ácidos empleando, ácido sulfúrico o clorhídrico ya sea concentrados o diluidos, ácido nítrico, medios básicos o mediante enzimas hidrolíticas (Austin, 1988). Estas reacciones de tipo hidrolítico son acompañadas por otro tipo de reacciones como las de deshidratación, condensación y degradación. El método de hidrólisis ácida, así como, su tecnología tiene una gran historia a nivel industrial; sin embargo, este tipo de hidrólisis conlleva grandes costos de operación y diversos problemas de corrosión y daños ambientales.

La hidrólisis de la celulosa en la madera para la producción de glucosa, es realizada en los residuos prehidrolizados con contenido bajo de hemicelulosa. Los rendimientos de glucosa varían considerablemente dependiendo de las condiciones de hidrólisis, por ejemplo, la utilización de ácido diluido (0.1-1.6%  $H_2SO_4$ ) y temperaturas elevadas (alrededor de 200 °C) solo permite obtener un rendimiento cercano al 60%, debido a la formación de productos secundarios.

Con ácidos concentrados a bajas temperaturas (alrededor de 10 °C), la celulosa es extensamente hinchada y eventualmente disuelta, llevándose a cabo el proceso de hidrólisis de manera rápida, dando un rendimiento próximo cuando se utiliza ácido diluido. La reactividad de hidrólisis en los residuos de lignina depende del tipo de ácido que se utilice (Hon y Shiraishi, 2001).

#### **I.2.4.2.2. Hidrólisis enzimática**

Para la degradación completa del material lignocelulósico se requiere del uso de diferentes enzimas que degraden a cada uno de sus componentes, esto es, para la degradación de la celulosa se requiere de enzimas conocida como celulasas, para la hemicelulosa se necesitan hemicelulasas y para la degradación de la lignina se deben utilizar enzimas oxidoreductasas, de manera que se pueda llevar a cabo la mayor conversión del material lignocelulósico a azúcares simples.

El proceso de hidrólisis enzimática generalmente comienza a decaer dentro de un rango de 24 a 72 h. Al parecer a las 48 horas se logra la sacarificación total del sustrato. El grado de hidrólisis es alto durante las primeras horas después de que se comienza el proceso y posteriormente declina rápidamente. El decremento depende de varios factores como son la inhibición competitiva de las enzimas, el agotamiento del sustrato y el decremento del ataque celulolítico. La hidrólisis enzimática aún no se utiliza a nivel comercial debido a su alto costo, no obstante, es un método de hidrólisis promisorio.

##### **I.2.4.2.2.1. Reactores enzimáticos**

Para llevar a cabo las reacciones enzimáticas se pueden utilizar una gran variedad de reactores que pueden clasificarse con base en su operación. Estos pueden ser de tipo continuo o semicontinuos (intermitentes), cabe aclarar que en ambos se utilizan tanques agitados. La forma en que se encuentre la enzima es muy importante, debido a que se puede encontrar en solución, inmovilizada a un soporte o atrapada en geles o microcápsulas.

### ➤ **Biorreactores enzimáticos de membrana.**

Los reactores de membrana ofrecen aplicaciones como la separación y concentración del producto, la recuperación del catalizador utilizado, la separación de fases, etc. La operación de un reactor de membrana se basa en la separación de la enzima y el producto (o sustrato) por una membrana semipermeable que crea una barrera selectiva. La completa retención de la enzima en el sistema es el primer y más importante requerimiento para el éxito de una operación continua en un reactor de membrana.

El producto resultante de la catálisis debe permear a través de los poros de la membrana, ya sea por difusión (inducida por gradiente de concentración) o por convección (usualmente inducida por gradiente de presión), de manera que se asegure la remoción del producto.

Los reactores de membrana pueden ser clasificados de acuerdo con el mecanismo por el cual la enzima y el sustrato entran en contacto.

- A.** Reactores de contacto directo: en este tipo de reactores las enzimas solubles pueden actuar directamente sobre los sustratos tan pronto como entran en el sistema, las enzimas pueden estar inmovilizadas o libres en el reactor. Pueden estar divididos a su vez en reactores con recirculación, *dead-end* y de diálisis.
- B.** Reactores de membrana de contacto por difusión: esta clase de reactores promueve el contacto enzima-sustrato después de un simple proceso de difusión pasiva de las moléculas del sustrato a través de los microporos de la membrana al compartimento adyacente en el cual se encuentra la enzima ya sea soluble o inmovilizada.
- C.** Reactor de membrana multifase (Contacto interfacial): promueven el contacto entre enzima y sustrato en la matriz de la membrana. Los sustratos y productos pueden estar localizados en cualquiera de las fases y la difusión está en contra del mecanismo de transporte dominante junto con el transporte interfacial.

Estos reactores presentan numerosas ventajas, a nivel de laboratorio se pueden llevar a cabo estudios de fenómenos relacionados con los mecanismos enzimáticos como cinéticas, efectos de inhibición por producto y procesos de desactivación enzimática, también permiten un uso continuo e intensivo de enzimas lo cual contribuye a un incremento en la productividad y posiblemente en la viabilidad económica del proceso (Romero *et al.*, 2004).

### **I.3. ENZIMAS**

Un enzima es un catalizador biológico formado por una o varias cadenas polipeptídicas (Wade, 1993). Son los encargados de mediar la enorme variedad de reacciones bioquímicas que comprende la vida.

Las enzimas se diferencian de los catalizadores químicos ordinarios (Voet y Voet, 1992), en aspectos como:

1. Velocidades de reacción más elevadas: las velocidades de reacción de los enzimas son superiores, en factores de  $10^6$  a  $10^{12}$ .
2. Condiciones de reacción más suaves: temperaturas menores a 100 °C, a presión atmosférica y pH casi neutros.
3. Especificidad de reacción mayor: las enzimas tienen un grado de especificidad superior a los catalizadores químicos, lo que evita la obtención de productos laterales.
4. Capacidad para la regulación: las actividades catalíticas de muchas enzimas varían en respuesta a las concentraciones de sustancias diferentes de sus sustratos, regulándose por mecanismos como control alostérico.

#### **I.3.1. Usos de enzimas para la hidrólisis de material lignocelulósico**

Uno de los usos potenciales de las celulasas es la conversión de material lignocelulósico a glucosa para posteriormente fermentarlo y tratarlo hasta obtener etanol grado combustible. Sin embargo, su uso a gran escala aún no es viable industrialmente debido a su alto costo (Tenkanen *et al.*, 2003), ya que la hidrólisis enzimática es un proceso que requiere de una gran cantidad y diversificación de enzimas, cuya acción en conjunto genera la degradación completa de la celulosa (Aburto *et al.*, 2007).

##### **I.3.1.1. Oxidoreductasas: degradación de lignina**

En los procesos de degradación de la lignina intervienen una variedad de enzimas hidrolíticas, cuya principal característica es su capacidad oxidativa; todas las enzimas relacionadas directamente con estos procesos son óxidoreductasas.

La degradación de la lignina (Lucas *et al.*, 2001) debe entenderse como un proceso integrado, en el que existe una estrecha relación entre la actividad de las diferentes enzimas oxidativas, las peroxidasas y las reductasas para la degradación de la lignina son:

- Lignina peroxidasas (LiP, EC 1.11.1.14; ligninasa), enzima capaz de sustraer uno de los electrones de la nube del anillo aromático de las unidades no fenólicas de la lignina, generando radicales catiónicos aromáticos. Puede oxidar directamente a compuestos aromáticos no fenólicos metoxilados de alto potencial de reducción.
- Manganeso peroxidasa (MnP; EC 1.11.1.13), glicoproteínas que contienen al grupo prostético hemo (hierro-protoporfirina IX), el Mn (II) es el donador de electrones, los compuestos reducidos al mismo tiempo son oxidados por el Mn (III). Los iones Mn(III) con alto potencial de reducción son estabilizados mediante la formación de quelatos con ácidos orgánicos. Estos quelatos actúan como mediadores redox difusibles y capaces de sustraer un electrón de los compuestos fenólicos para formar radicales fenoxi intermediarios, así como romper enlaces tipo C $\alpha$ -C $\beta$ , alquil-fenil o bencil-carbonil. De este modo, el Mn (III) puede oxidar a los fenoles a determinados compuestos metoxilados, a compuestos nitro y cloroaromáticos.
- Fenol oxidasas, entre las que se encuentran:
  1. Tirosinasas (EC 1.14.18.1). Catalizan la *orto*-hidroxilación de monofenoles y oxidan los *orto*-difenoles a sus correspondientes *orto*-quinonas. Son inhibidas por monóxido de carbono.
  2. Catecol oxidasas (EC 1.10.3.1) Se diferencian de las tirosinasas en que no hidroxilan monofenoles, pero son igualmente inhibidas por monóxido de carbono.
  3. Lacasas (*p*-difenol-oxígeno-oxidoreductasas, EC 1.10.3.3), son glicoproteínas que contienen cuatro átomos de cobre por molécula, son específicas hacia su sustrato, catalizan la oxidación de *orto* y *para*-fenoles y diaminas, no son inhibidas por monóxido de carbono.

### **I.3.1.2. Hidrolasas: degradación de celulosa y hemicelulosa**

Las enzimas hidrolíticas son las que se utilizan con mayor frecuencia debido a que:

- 1) Son fáciles de usar, ya que no requieren cofactores como las oxidoreductasas, y
- 2) Se encuentran en cantidades altas, lo cual las hace fácilmente disponibles.

La característica principal de las enzimas hidrolíticas (Saha y Demirijian, 2001) que como su nombre lo indica es hidrolizar enlaces glicosídicos, ésteres y amidas. Tienen diferente especificidad por el sustrato, de cualquier forma, muchas hidrolasas pueden aceptar una amplia gama de sustratos.

La mayor parte de las celulasas están compuestas por un dominio catalítico unido mediante secuencias de unión reconocidas, a uno o más dominios auxiliares. Las regiones de unión entre dominios de muchas celulasas son particularmente sensibles a las proteasas, lo que permite la liberación de los dominios como unidades funcionales discretas (Lucas *et al.*, 2001).

La característica principal de todos los tipos de celulasas es su habilidad para hidrolizar las uniones glucosídicas de tipo ( $\beta$ -1,4) en la celulosa. Las celulasas se encuentran clasificadas en cuatro clases separadas, dependiendo de la posición en la que lleven a cabo la hidrólisis y los productos que generen (Tenkanen *et al.*, 2003).

- La primera clase comprende a las endoglucanasas, enzimas que hidrolizan las uniones internas de la cadena de celulosa (endo-1,4[1,3; 1,4]- $\beta$ -D-glucan 4-glucanohidrolasas. EC 3.2.1.4).
- La segunda clase es la exocelobiohidrolasa (1,4- $\beta$ -D-glucan celobiohidrolasas, EC 3.2.1.91). Esta clase de enzimas da como producto predominante celobiosa a partir de la cadena de celulosa.
- La tercera clase esta formada por las exoglucohidrolasas (1,4- $\beta$ -D-glucan glucobiohidrolasa, EC 3.2.1.74). Este grupo comprende enzimas que generan glucosa mayoritariamente de la parte terminal no reductora de la molécula de celulosa.
- La cuarta clase es la que contiene a las  $\beta$ -glucosidasas ( $\beta$ -glucosido glucohidrolasa, EC 3.2.1.21). Este grupo hidroliza la celobiosa y en menor cantidad a la celotriosa para producir glucosa. Técnicamente estas enzimas no pueden ser consideradas celulasas (debido a que no hidrolizan de manera directa la celulosa). Sin embargo, son incluidas dentro de las celulasas debido a que hidrolizan un enlace  $\beta$ -1,4-glicosídico.

En las paredes celulares, la degradación de la hemicelulosa puede ocurrir de dos formas: mediante hemicelulasas producidas por los hongos de la podredumbre de la madera o por bacterias, una vez que las paredes celulares han sido parcialmente dañadas. En la hidrólisis de las hemicelulosas pueden intervenir diferentes grupos de enzimas necesarias para la degradación de xilanos, que son el tipo predominante de hemicelulosas (Lucas *et al.*, 2001).

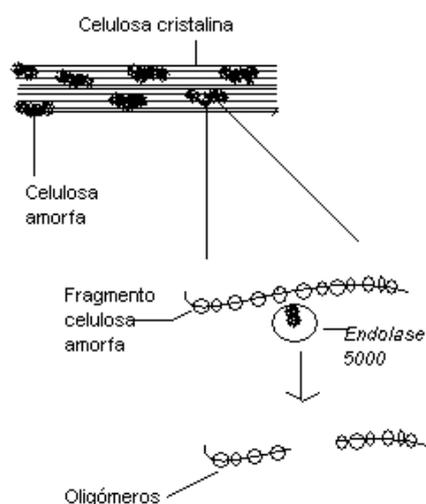
Las hemicelulasas se encuentran clasificadas, en:

- Dextranasa (EC 3.2.1.11), corta las uniones de la dextrana en las uniones glicosídicas ( $\alpha$ -1,6).
- Inulinasa (EC 3.2.1.7), complejo enzimático que puede romper y convertir la inulina a fructosa con un rendimiento del 99% en 24 h.
- Xilanasas y Pentosanasas, mezcla de diferentes  $\beta$ -glucosidasas, que hidrolizan tanto a la hemicelulosas como a las pentosas (Gerhartz, 1990).

#### **1.3.1.2.1. *Endolase 5000 (Novozymes): endoglucanasa***

La enzima *Endolase 5000* pertenece al grupo de las celulasas (E. C. 3.2.1.4). Esta enzima rompe al azar los enlaces internos de las regiones amorfas de la celulosa produciendo oligómeros y concentraciones bajas de azúcares reductores (Figura 10). Su producción se realiza en un microorganismo genéticamente modificado, no especificado por la empresa Novozymes, posteriormente se separa de éste y se purifica.

Su actividad enzimática sobre celulosa es de 5000 ECU/g y su densidad de 1.05 g/mL, es estable en un intervalo de pH (25 °C) de 6.5 a 7.5



**Figura 10. Degradación de celulosa mediante *Endolase 5000 (Novozymes)***

## I.4. OBJETIVOS E HIPÓTESIS

### Objetivo General

Establecer las condiciones de temperatura, tiempo y concentración de la enzima *Endolase 5000* (Novozymes) que permitan generar la mayor producción de azúcares reductores a partir del polímero  $\alpha$ -celulosa.

### Objetivos particulares

- Comparar la actividad catalítica de una endocelulasa comercial (*Endolase 5000*) en un bioreactor en lote y en uno de membrana.
- Determinar el efecto de la variación del tiempo y la temperatura de reacción sobre la estabilidad de la enzima *Endolase 5000* (Novozymes).
- Obtener el grado de polimerización de los azúcares solubles producidos por la enzima así como la eficiencia de hidrólisis.
- Establecer el tiempo de vida media y la constante de pérdida de actividad enzimática de la endocelulasa en el reactor de membrana.

### Hipótesis

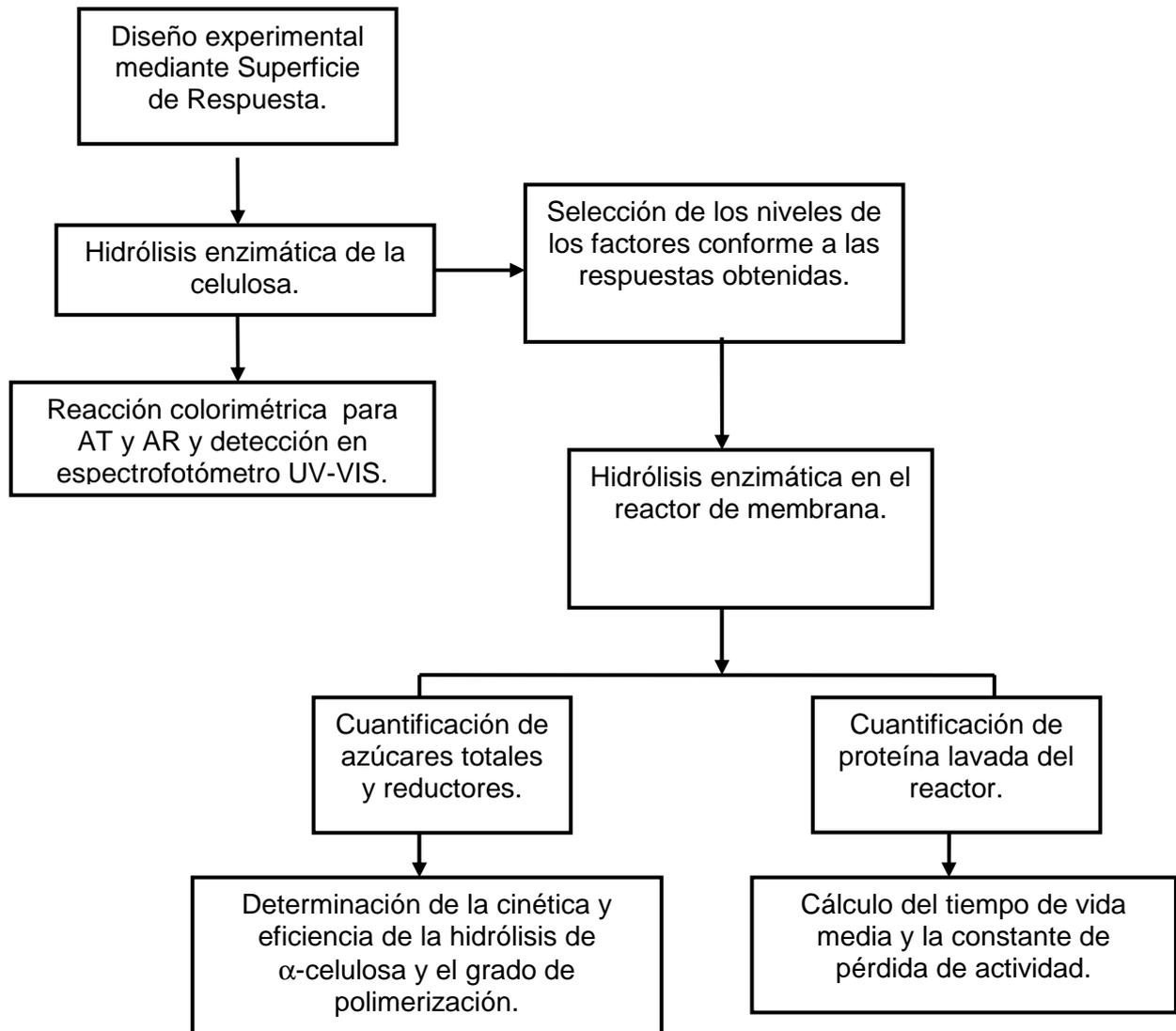
Si se realiza la hidrólisis de la  $\alpha$ -celulosa por la endocelulasa en un bioreactor de membrana la actividad catalítica aumentará, ya que se limitará el contacto de los azúcares con la enzima, comparada con aquella obtenida en un bioreactor en lote donde se mantiene el contacto con el producto.

### Alcances

El presente trabajo permitirá caracterizar la actividad catalítica de la enzima comercial *Endolase 5000* (Novozymes) en la hidrólisis de  $\alpha$ -celulosa, reflejada en la generación de azúcares reductores y azúcares solubles totales, quedando como fuente de información para una comparación futura con la actividad de otras endocelulasas y con la hidrólisis química de celulosa.

# CAPÍTULO II. METODOLOGÍA Y DESARROLLO EXPERIMENTAL

## II.1. DIAGRAMA GENERAL



## II.2. REACTIVOS Y EQUIPO

### Reactivos

Polímero  $\alpha$ -celulosa (Sigma-Aldrich), ácido sulfúrico concentrado con pureza del 96.6% (J.T. Baker), fenol (Sigma-Aldrich), hidróxido de sodio en perlas, ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) (Aldrich), tartrato de sodio y potasio tetrahidratado (Sigma-Aldrich), agua destilada, glucosa (Sigma-Aldrich) y enzima comercial *Endolase 5000* (Novozyme).

### Equipo

- Espectrofotómetro UV-VIS (Marca Themospetronic, modelo Helios  $\alpha$ ).
- Bombas peristálticas (Master Flex, modelo 72201-60).
- Baño (Fisher Scientific, Isotemp 3006).
- Centrifuga (Labnet, Hermle Z233M2).
- Parrilla de calentamiento (Techne dri-black DB-3D).
- Pipetas de 5 mL y 10 mL electrónicas (Labsystems) y micropipetas de 100 y 250  $\mu$ L.
- Celda de agitación (*Stired Cell*) 50 mL (Millipore corporation).

## II.3. MÉTODOS

*Identificación de las condiciones óptimas de la hidrólisis enzimática de  $\alpha$ -celulosa mediante Superficie de Respuesta.*

- Modelo de la Superficie de Respuesta

El diseño que se usó fue un composito central conformado por un diseño factorial  $2^3$  con cuatro tratamientos centrales (0,0) para la estimación del error experimental y seis tratamientos en los extremos del dominio experimental. Se estudiaron los efectos del tiempo y temperatura de reacción así como la concentración de la enzima sobre la producción de azúcares solubles totales y azúcares reductores y que fueron analizados mediante el estudio de Superficie de Respuesta usando el Software Statistica v. 6.0. Los 18 tratamientos se encuentran listados en la Tabla 4.

**Tabla 4. Dominio experimental del efecto de la temperatura, tiempo de reacción y concentración de biocatalizador sobre la hidrólisis de  $\alpha$ -celulosa.**

Experimento #	Temperatura (°C)		Tiempo (h)		Catalizador (%)	
	VC*	VR*	VC	VR	VC	VR
8	1	60	1	5.5	1	7.5
3	-1	30	1	5.5	-1	2.5
1	-1	30	-1	1.5	-1	2.5
11	0	45	-1.68179	8 min	0	70
10	1.68179	70	0	3.5	0	5
16 (c)	0	45	0	3.5	0	5
12	0	45	1.68179	7	0	5
4	-1	30	1	5.5	1	7.5
14	0	45	0	3.5	1.68179	9
15 (c)	0	45	0	3.5	0	5
6	1	60	-1	1.5	1	7.5
2	-1	30	-1	1.5	1	7.5
17 (c)	0	45	0	3.5	0	5
18 (c)	0	45	0	3.5	0	5
5	1	60	-1	1.5	-1	2.5
9	-1.68179	20	0	3.5	0	5
13	0	45	0	3.5	-1.68179	0.8
7	1	60	1	5.5	-1	2.5
Composito central 2 <sup>3</sup> con 2 puntos centrales. *VC: variable codificada; VR: valor real.						

Las variables codificadas se calcularon acorde a la siguiente ecuación:

$$Y = (X_1 - X_0) / \Delta X \dots \dots \dots [A]$$

Despejando  $X_1$  de A se obtiene el valor real de la variable.

$$X_1 = (Y * \Delta X) + X_0$$

**MODELO DE REGRESIÓN DEL MODELO**

$$y = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \beta_3 x_3 + \beta_{33} x_3 x_3 + \varepsilon$$

Donde:

y es la respuesta expresada en azúcares reductores ( $\mu\text{g/mL}$ ) y azúcares solubles totales ( $\mu\text{g/mL}$ ),

las  $\beta$ 's son coeficientes cuyos valores serán estimados en el modelo,

$x_1$  es la variable que representa al factor de Temperatura de reacción,

$x_2$  es la variable que representa al factor de Tiempo de reacción,

$x_3$  es la variable que representa al factor de Concentración de enzima y,

$\varepsilon$  es el término del error al azar.

El análisis de varianza así como los estimados de  $\beta$ 's para cada una de las respuestas se determinaron mediante el software Statistica v. 6.0.

- Hidrólisis de  $\alpha$ -celulosa

Se pesaron  $30 \pm 5$  mg de  $\alpha$ -celulosa dispersándola con un volumen correspondiente de agua destilada para alcanzar un volumen total de 5 mL en tubos con tapa. Posteriormente, los tubos se colocaron en una parrilla de calentamiento con temperatura y agitación controlada, finalmente se adicionó el volumen correspondiente a la concentración de enzima y tapando el tubo se dejó correr el tiempo asignado a cada uno. Los experimentos se realizaron de acuerdo a las temperaturas (30, 45 y 60 °C) variando la concentración de enzima (0.8, 2.5, 5, 7.5% (v/v)) y el tiempo (8 min; 1.5, 3.5, 5.5 y 7 h).

- Cuantificación de azúcares totales y reductores

Una vez transcurrido el tiempo de reacción, se tomó una alícuota de 375  $\mu$ L de cada tubo y se llevaron a un volumen final de 1.5 mL en microtubos Eppendorf con acetona para precipitar la proteína y se centrifugaron a 14000 rpm ( $g= 18384$ ) por 5 minutos. De la muestra centrifugada, se tomaron 250  $\mu$ L y se llevaron a un volumen final de 1 mL para la determinación de azúcares reductores por el método del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) (Lorenz Miller, 1959).

- Azúcares reductores (AR): a los tubos designados para azúcares reductores se les añadió 1 mL del reactivo DNS (ver anexo) y se agitaron con un vortex, después se colocaron en un baño de agua hirviendo durante 5 minutos para que se llevara a cabo la reacción, a continuación se sumergieron en un baño de hielo para detenerla, enseguida se les adicionaron 8 mL de agua destilada y se hizo la lectura de absorbancia en el espectrofotómetro UV-VIS a 540 nm (Figura 11). Se preparó una curva estándar de glucosa en un intervalo de 0-1000  $\mu$ g/mL para el cálculo de AR.

Para la determinación de azúcares solubles totales por el método de Fenol-Sulfúrico (AOAC, 2000) se tomó una alícuota de 125  $\mu\text{L}$  las primeras 6 h y de 30  $\mu\text{L}$  a partir de la octava hora. Todos los volúmenes anteriores se completaron a 1 mL con agua destilada en tubos de ensayo de 10 mL con tapón de rosca.

- Azúcares totales solubles (AT): a los tubos de ensayo que tenían la muestra para azúcares totales se les adicionó 1 mL de fenol al cinco por ciento y se agitaron en un vortex, posteriormente se les añadió 5 mL de ácido sulfúrico concentrado. Se agitaron e inmediatamente se colocaron en un baño de hielo para detener la reacción, de la misma forma se realizó un blanco; en el espectrofotómetro UV-VIS se hizo la lectura de absorbancia a 490 nm. Se preparó una curva estándar de glucosa en un intervalo de 0-100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  para calcular la concentración de AT.



**Figura 11. Espectrofotómetro UV-VIS (Marca Thermospectronic modelo Helios  $\alpha$ ).**

Una vez obtenidos los resultados de AT y AR, se calculó el grado de polimerización y el grado de hidrólisis de la celulosa de acuerdo a las siguientes ecuaciones:

Grado de polimerización para azúcares totales solubles:

$$\text{GP} = [\text{ATsolubles}] (\mu\text{g}/\text{mL}) / [\text{AR}] (\mu\text{g}/\text{mL})$$

Grado de hidrólisis:

$[AT] (\mu\text{g/mL}) \cdot 1 \text{ mol} / 180 \text{ g glucosa} \cdot 5 \text{ mL} \cdot 1 \text{ g} / 1 \times 10^6 \mu\text{g} = \text{Moles Glucosa.}$

Gramos de celulosa (utilizados en cada ensayo)  $\cdot 1 \text{ mol} / 422.99 \text{ g celulosa} = \text{Moles de Celulosa.}$

Donde el valor de 422.99 g se obtuvo de la hidrólisis ácida siguiendo el protocolo descrito por Moxley y Zhang (2007) y se calculó con las siguientes ecuaciones:

$0.0432 \text{ g de celulosa hidrolizada} / 1.0213 \times 10^{-4} \text{ moles de glucosa.}$

Y los moles de glucosa se calcularon con:

$[AR] (\text{g/mL}) / \text{P.M. glucosa}^{-1}$ , esto es:

$[(218.85 \times 10^{-6} \text{ g/mL}) \cdot (1 \text{ mol de glucosa}) \cdot (84 \text{ mL})] / 180 \text{ g}$

Para finalmente obtener el grado de hidrólisis de la siguiente manera:

$(\text{Moles de glucosa} \cdot 100) / \text{Moles de celulosa} = \text{Grado de hidrólisis (\%)}$

*Hidrólisis enzimática de  $\alpha$ -celulosa dentro del reactor de membrana.*

- Para llevar a cabo la hidrólisis del polímero,  $\alpha$ -celulosa, fue necesario adaptar una celda de agitación de 50 mL (Millipore corporation) como reactor, con una membrana de poliétersulfona con tamaño de poro de 10 KDa (Millipore corporation) que fue conectada a dos recipientes volumétricos uno de entrada, que era el que contenía el líquido de alimentación (agua) y el de salida en el que se recibía el producto. Los flujos de alimentación del agua y la salida fueron regulados mediante una bomba peristáltica (Master Flex, Figura 12). Antes de comenzar la reacción, se realizó un primer lavado de la membrana pasando agua a través de ella seguido de una solución enzimática (7.5% (v/v)) estableciendo de esta manera cual era el tiempo de retención del catalizador en el reactor.

Durante la reacción de hidrólisis enzimática, el reactor se operó de manera semicontinua a razón de que durante las primeras cinco horas de reacción, la entrada y salida de líquido no fueron interrumpidas y la toma de muestra se realizó cada media hora. Al llegar a la quinta hora se apagaron las bombas y el reactor se mantuvo con agitación constante hasta las 23 h, en este momento se encendieron nuevamente las bombas de flujo y las muestras fueron colectadas cada hora hasta la 25 h, manteniendo durante todo el experimento una temperatura constante (30 °C).



**Figura 12. Equipo para hidrólisis enzimática**

Conforme se tomaron las muestras, a una porción de éstas se les realizó un barrido en el espectrofotómetro en un intervalo de longitud de onda de 190 a 380 nm para confirmar si había o no pérdida de proteína durante la reacción. Para ello, se determinó el centro espectral de masas (CEM) a partir de los espectros UV-VIS a los diferentes tiempos para determinar si la proteína lavada del reactor coincidía al espectro promedio del preparado enzimático de *Endolase 5000* (Novozymes) y de esta forma saber si se perdía una cantidad considerable del catalizador.

El cálculo del CEM se realizó utilizando las longitudes de onda ( $\lambda$ ) y las absorbancias (Abs) correspondientes a cada una de ellas mediante las siguientes ecuaciones:

$$\lambda * Abs \dots \dots \dots (1)$$

$$\sum (\lambda * Abs) \dots \dots \dots (2)$$

$$\sum Abs \dots \dots \dots (3)$$

$$CEM = (\sum (\lambda * Abs)) / \sum Abs$$

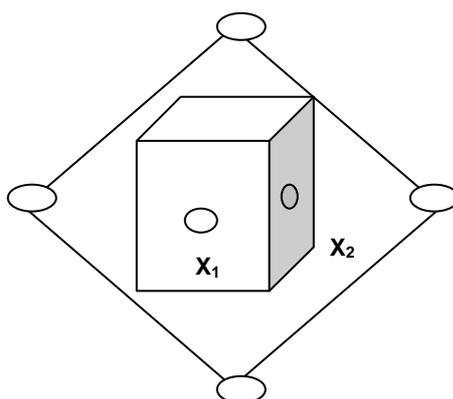
## CAPÍTULO III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### III.1. Identificación de las condiciones óptimas de la hidrólisis enzimática de $\alpha$ -celulosa mediante superficie de respuestas

La serie de pruebas realizadas que permitieron determinar el efecto de la temperatura, concentración de enzima y tiempo sobre la reacción, así como el parámetro más influyente y su valor sobre la producción de azúcares reductores y azúcares totales solubles a partir de la hidrólisis de  $\alpha$ -celulosa se realizaron mediante un diseño de superficie de respuesta, para lo cual se mantuvo constante el valor de uno de los factores dejando libres los otros dos factores.

#### III.1.1. Comprobación del diseño experimental y su adecuación

Para la evaluación del efecto de los factores ( $X_1$ : temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ );  $X_2$ : tiempo (h);  $X_3$ : [catalizador]% (v/v)) en la producción de azúcares totales (AT) y azúcares reductores (AR) durante la hidrólisis del polímero ( $\alpha$ -celulosa) se realizó un diseño de experimentos de tipo composito central basado en tres niveles para cada factor ( $X_1$ : 30, 45, 60  $^{\circ}\text{C}$ ;  $X_2$ : 1.5, 3.5, 5.5 h;  $X_3$ : 2.5, 5, 7.5% (v/v)), es decir del tipo  $2^3$  factorial con cuatro puntos centrales y seis en los extremos (Figura 13).



**Figura 13. Representación esquemática de un composito central.**

En principio, para llevar a cabo el estudio del efecto de los factores sobre las respuestas, producción de AT y AR, se generaron las gráficas correspondientes a un modelo cuadrático sin interacción entre los efectos ( $\beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_{11} X_1X_1 + \beta_{22} X_2X_2 + \beta_{33}X_3X_3$ ). Sin embargo, éste presentaba un comportamiento no adecuado, ya que gráficamente se observó que al incrementar el nivel de los factores se originaba un decaimiento de la producción. Posteriormente, se eligió un modelo cuadrático, pero únicamente con el factor  $X_3$  como término cuadrado ( $\beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_{33} X_3X_3$ ), mostrando una tendencia esperada respecto a la respuesta, esto es, al ir incrementado el nivel de los factores también se incrementaba la producción de AT y AR.

Por medio de los valores estimados de los errores de los coeficientes (Tabla 5) con un intervalo de confianza del 95% y empleando el programa *Statistica* versión 6.0, se observa que la temperatura y el tiempo de reacción no influyen en la producción de azúcares reductores. Para el caso de azúcares totales el único factor que influye sobre su generación es la concentración del catalizador.

**Tabla 5. Coeficientes del modelo  $\beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_{33} X_3 X_3$**

Coeficiente	AT ( $\mu\text{g/mL}$ )	AR ( $\mu\text{g/mL}$ )
$\beta_0$	453.3087 $\pm$ 51.04639	100.3527 $\pm$ 10.45340
$\beta_1$	60.3732 $\pm$ 88.35502	6.5571 $\pm$ 18.09356
$\beta_2$	59.3477 $\pm$ 88.3502	70.9791 $\pm$ 18.09356
$\beta_3$	448.9585 $\pm$ 88.35502	163.3734 $\pm$ 18.09356
$\beta_{33}$	38.5658 $\pm$ 88.41493	35.0157 $\pm$ 0.10583
$X_1$ : temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ ); $X_2$ : tiempo (h); $X_3$ : [catalizador] (%)		

### III.1.1.1. Suposición de normalidad del modelo

La distribución de los errores tanto en la obtención de AT como en la de AR se considera que fue de tipo normal debido a que la distribución es uniforme (Figuras 14 y 15), es decir, que los valores residuales se encuentran agrupados simétricamente alrededor del valor promedio, generando así una línea recta que no presenta residuos distanciados y que son mayores a los demás. Al no haber presencia de residuos inusitados, como también se les conoce, se confirma que el procesamiento de los datos generados experimentalmente fue realizado correctamente.

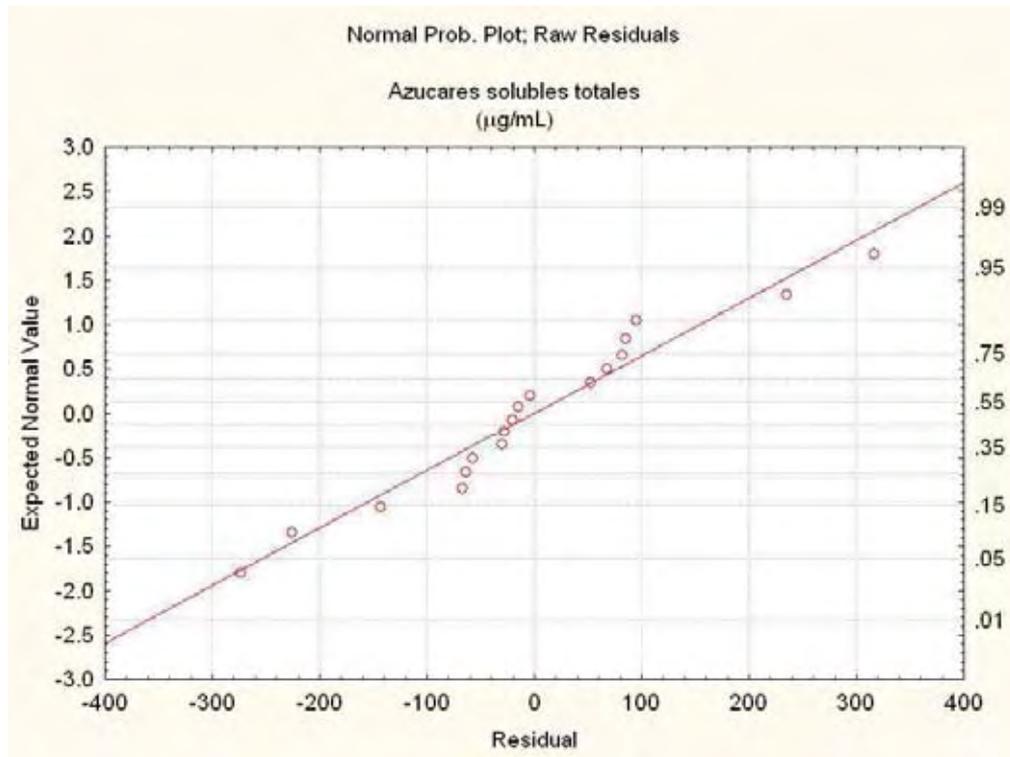


Figura 14. Probabilidad normal de los residuos de azúcares solubles totales.

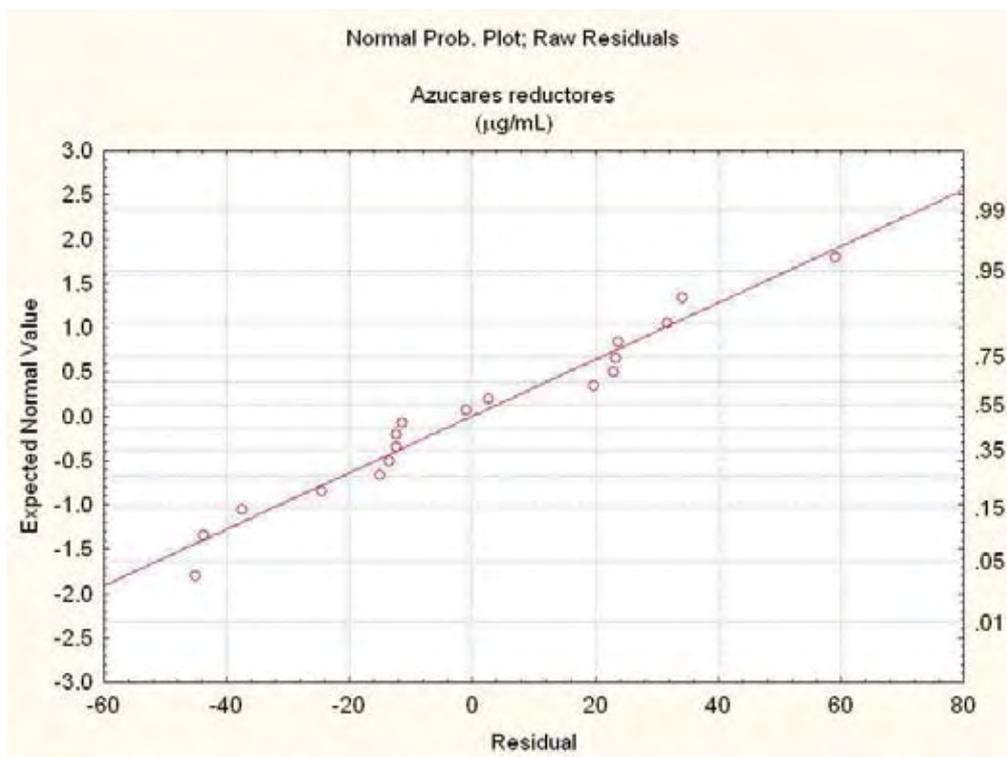


Figura 15. Probabilidad normal de los residuos de azúcares reductores.

### III.1.1.2. Estandarización del modelo mediante el estudio de residuales

Dentro del estudio de estandarización del modelo para la respuesta de azúcares solubles totales, la variación de los residuales en función de los valores predichos por el modelo son de tipo heterogéneo y sin estructura definida (Figura 16). Si el modelo es correcto y las suposiciones del mismo se cumplen, los residuales no deben de tener una estructura regular ni estar relacionados con ninguna variable incluyendo la variable de respuesta (Montgomery, 2005). En este caso, los residuales no forman una especie de embudo (Walpole y Myers, 1992), es decir, la variancia del error no se incrementa con la variable de respuesta y por tanto siguen una distribución normal como se demostró en la sección anterior.

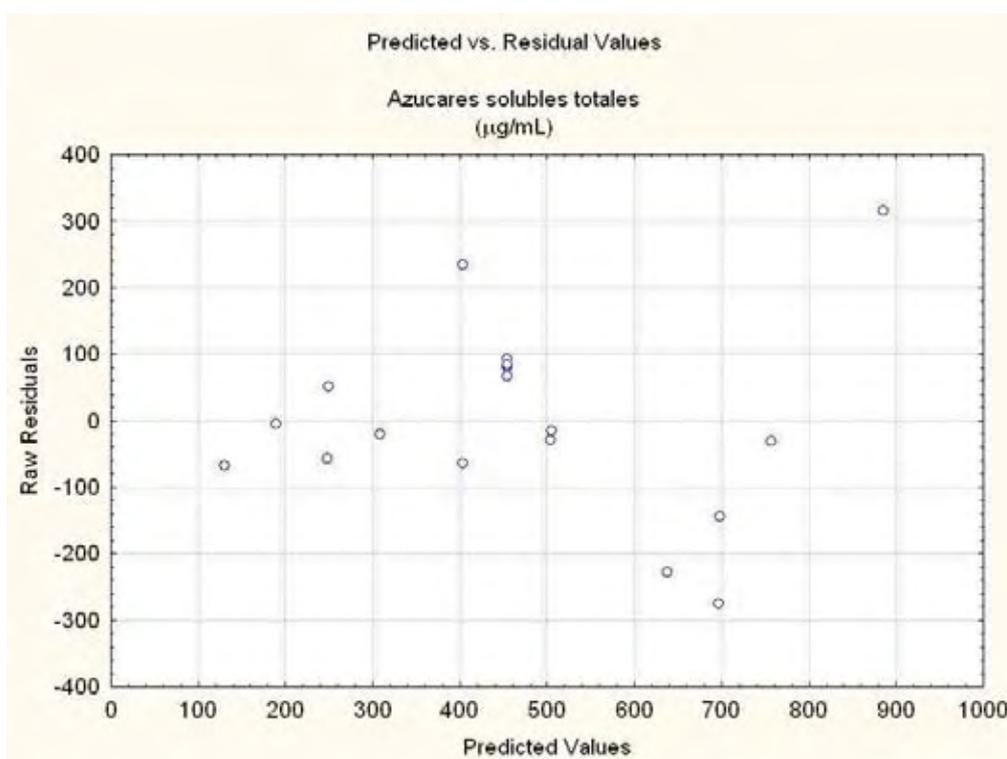
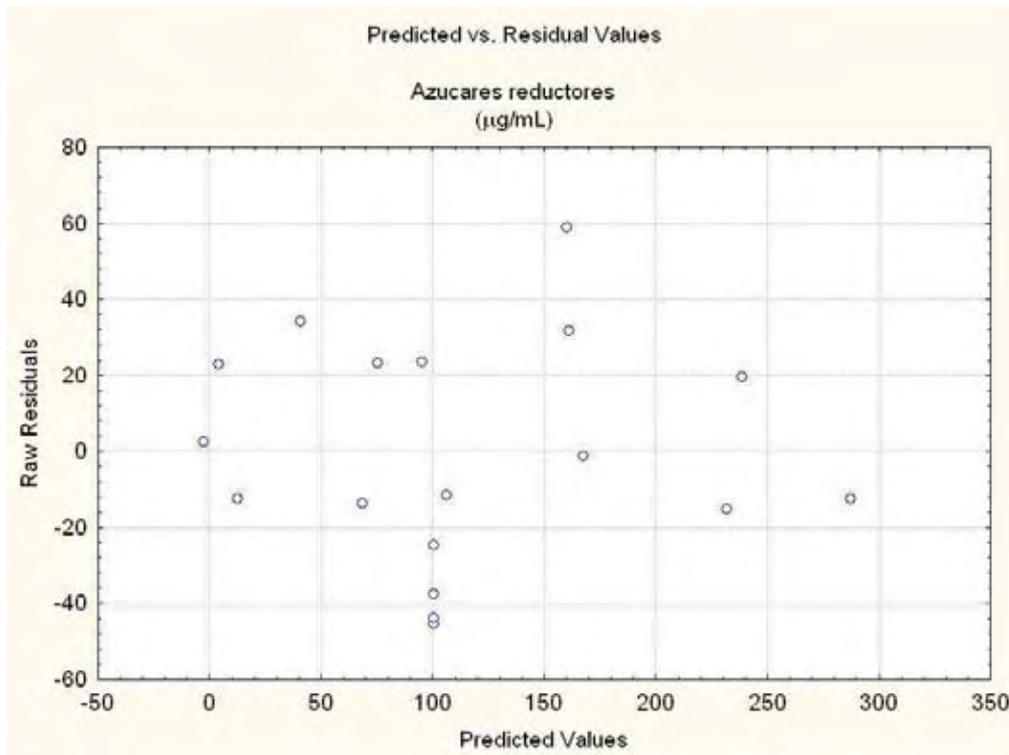


Figura 16. Residuos para azúcares solubles totales.

En el caso de la respuesta de azúcares reductores, los residuales están dispersos con respecto a los valores predichos por el modelo (Figura 17), hecho que indica que durante la realización de las pruebas no se cometieron muchos errores experimentales, o que si lo hubo no estaban relacionados. En conjunto, ambas gráficas muestran que el modelo utilizado en el diseño de experimentos fue adecuado.

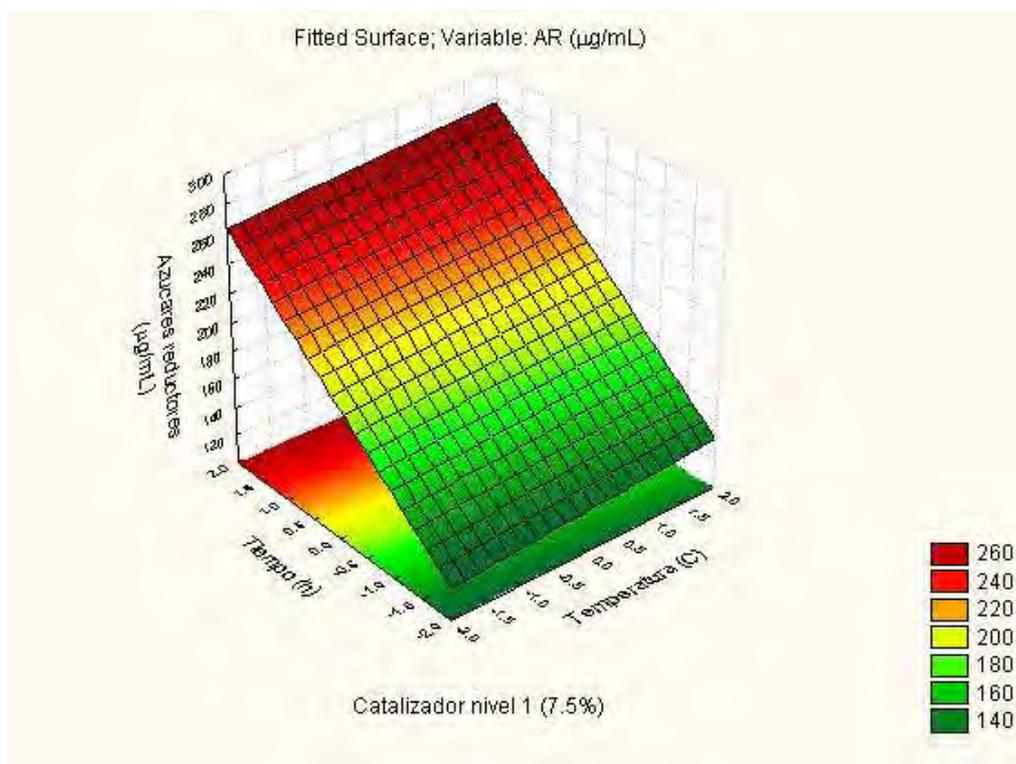


**Figura 17. Residuos para azúcares reductores.**

A continuación se realiza el análisis del efecto que tienen sobre la respuesta dos factores libres y uno fijo dentro de un sistema por lotes, de forma que se pueda identificar mejor el comportamiento realizando una comparación entre la producción de azúcares totales solubles (AT) y la de azúcares reductores (AR) para todos los casos.

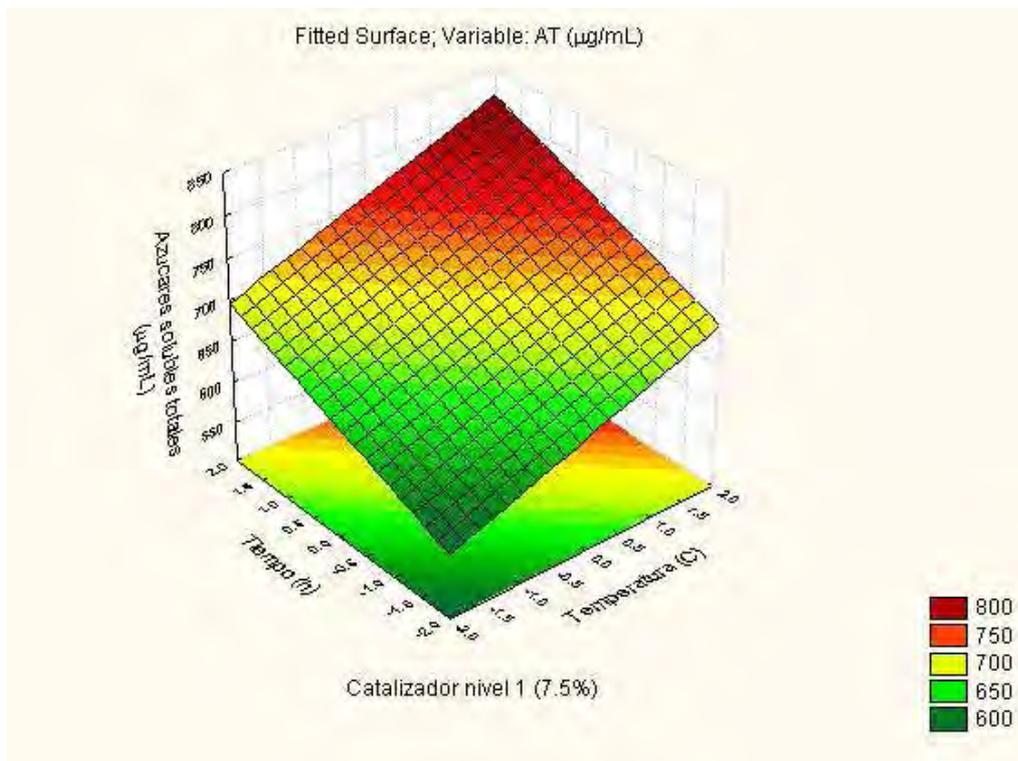
### III.1.2. Pruebas con concentración fija de catalizador.

Para cada uno de los niveles de concentración de enzima (factor  $X_3$ ), se aprecia que para que la temperatura tenga un efecto en el incremento de la concentración de azúcares reductores (AR) es necesario aumentar el tiempo de reacción. Por ejemplo, a una concentración fija de 2.5% (v/v) de enzima a 30 °C y 1.5 h no hay producción de AR. Sin embargo, cuando se incrementa el tiempo a 5.5 h se alcanza una producción de 55 µg/mL; por otro lado cuando la concentración de enzima se mantiene en 5.5% (v/v) a 20 °C por 3.5 h la producción de estos alcanza una cantidad de 118.6 µg/mL, mientras que a 45 °C durante 8 minutos es de 75 µg/mL. El factor  $X_3$  a un valor de 7.5% (v/v) con temperatura de 60 °C y un tiempo de reacción de 1.5 h la producción de AR es de 166 µg/mL, mientras que el incremento del tiempo a 5.5 h resulta en 258 µg/mL de AR (Figura 18).



**Figura 18. Producción de azúcares reductores con concentración de enzima constante (7.5% (v/v))**

Para el caso de azúcares solubles totales (AT) a niveles fijos de concentración, el incremento de la temperatura sí favorece la formación de estos en conjunto con el tiempo (Figura 18). A una concentración de 2.5% (v/v) de enzima, 30 °C y 1.5 h de reacción se producen 183  $\mu\text{g/mL}$  de AT pero al incrementar la temperatura a 60 °C se alcanza una concentración de 285  $\mu\text{g/mL}$ . Además, el incremento de la concentración de catalizador a 5% (v/v) tiene un efecto positivo sobre la producción de AT (20 °C, 3.5 h) ya que se obtiene una concentración de 637.6  $\mu\text{g/mL}$ . Si se incrementa la concentración de enzima a 7.5% (v/v) (30 °C, 5.5 h), la producción de AT aumenta a 422  $\mu\text{g/mL}$ , y a 60 °C alcanza un valor de 726  $\mu\text{g/mL}$  (Figura 19).



**Figura 19. Producción de azúcares solubles totales con concentración de enzima constante (7.5% (v/v))**

El incremento observado en la producción de AT puede atribuirse al aumento de la actividad catalítica de la enzima al acercarse a una mejor temperatura para realizar la hidrólisis de la celulosa. No obstante, el incremento de la temperatura no tiene un efecto significativo, como lo es el tiempo, sobre la producción de azúcares reductores. Lo anterior puede ser debido a que al incrementarse la velocidad de producción de oligómeros, la concentración de éstos sea lo que inhiba a la enzima, evitando así la degradación de estos y con ello la producción de azúcares reductores. Asimismo, se debe tener en cuenta que esta enzima de tipo endoglucanasa no puede generar celobiosa, ni glucosa debido a que sus cortes no lo realiza a partir del extremo reductor de la celulosa.

### III.1.3. Pruebas con tiempo fijo.

Para las pruebas de tiempo fijo se utilizaron los niveles de 1.5, 3.5 y 5.5 h, variando en cada uno la temperatura y la concentración de catalizador. Se puede observar que la temperatura tiene poco efecto sobre el incremento en la producción de azúcares reductores (AR) y azúcares totales solubles (AT). Pero, una mayor concentración de enzima permite alcanzar mayor grado de azúcares totales en la disolución.

Para el caso de AR, a un tiempo fijo de 1.5 h (60 °C, 2.5 % (v/v) de enzima) se producen 32 µg/mL y con 7.5% (v/v) de enzima se generan 166.28 µg/mL. Cuando el nivel se incrementa y fija a 3.5 h, no hay producción de AR a 45 °C y 0.8% (v/v) de enzima; pero si se incrementa la concentración de enzima a 9% (v/v), la producción aumenta a 275 µg/mL. Para el caso del mayor nivel (5.5 h), se observa que hay un efecto combinado de la concentración de enzima y la temperatura sobre una respuesta de 216 µg/mL (30 °C con 7.5% (v/v) de catalizador), ya que a 60 °C se incrementa a 258 µg/mL (Figura 20).

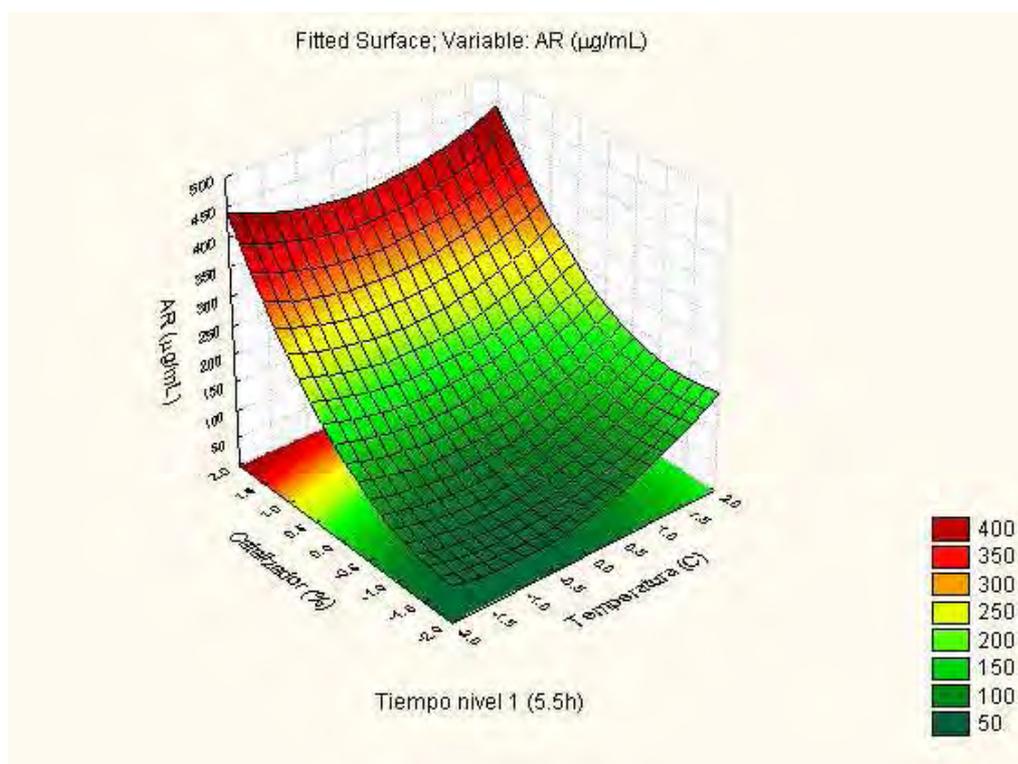
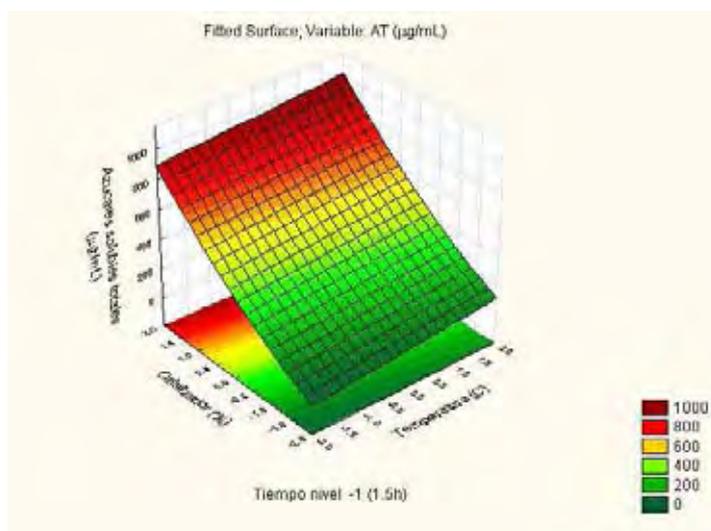


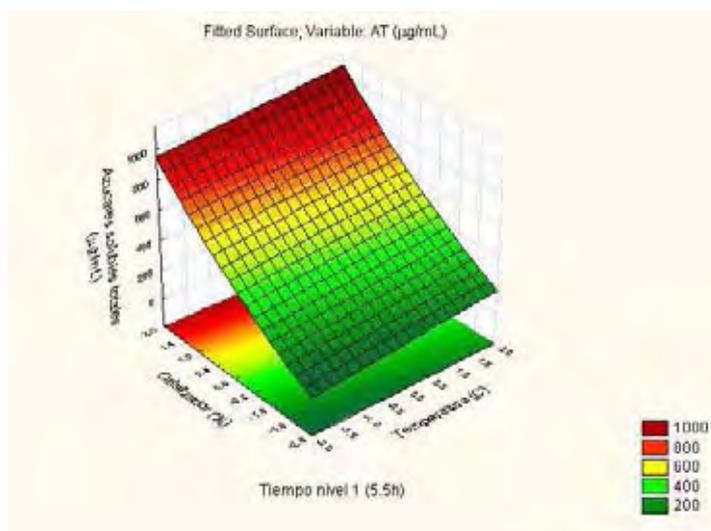
Figura 20. Producción de azúcares reductores a tiempo constante de 5.5 h.

Respecto a la producción de azúcares solubles totales, a un tiempo de 3.5 h, 45 °C y 5% (v/v) de enzima la concentración de AT es de 535.5 µg/mL, que aumenta a 1201 µg/mL con 9% (v/v) de enzima, al incrementar la temperatura a 70 °C se observó un efecto negativo al obtener 489 µg/mL.

Por otro lado, al comparar los resultados que se obtienen a tiempos fijos de 1.5 h y 5.5 h la producción de azúcares reductores se ve favorecida con el tiempo de reacción, pasando de 0 µg/mL a 55 µg/mL de 1.5 a 5.5 h (30 °C, 2.5% (v/v) de catalizador), respectivamente. Pero los AT no tuvieron un incremento significativo en las mismas condiciones al pasar de 183 a 190 µg/mL (Figura 21). Esto indica que la enzima comenzó a cortar los oligómeros generados, ya que estos mismos sirven como sustrato a la enzima generando posteriormente azúcares reductores como glucosa y celobiosa (Lucas *et al.*, 2001).



a



b

Figura 21. Producción de azúcares solubles totales a tiempo constante  
a) nivel -1 (1.5 h), b) nivel 1 (5.5 h).

### III.1.4. Pruebas a temperatura constante.

Como ya se mostró en el análisis anterior, la temperatura es un factor influyente sobre la producción de azúcares totales así como en el ahorro de tiempo durante la reacción. Esto posiblemente se deba a que la temperatura ayude a modificar la conformación estructural de la endolasa propiciando una mayor afinidad por el sustrato.

Durante las pruebas a temperatura constante se notó que el tiempo de reacción pero sobre todo la concentración de catalizador favorecen la producción de AR (Figura 22). Es importante mencionar que el efecto de la temperatura en la generación de AR es muy poco significativo como se observa al pasar del nivel -1 (30°C) al nivel 1 (60°C) y que se ve reflejado con un valor de  $\beta_1$  de 6.56 (ver Tabla 5).

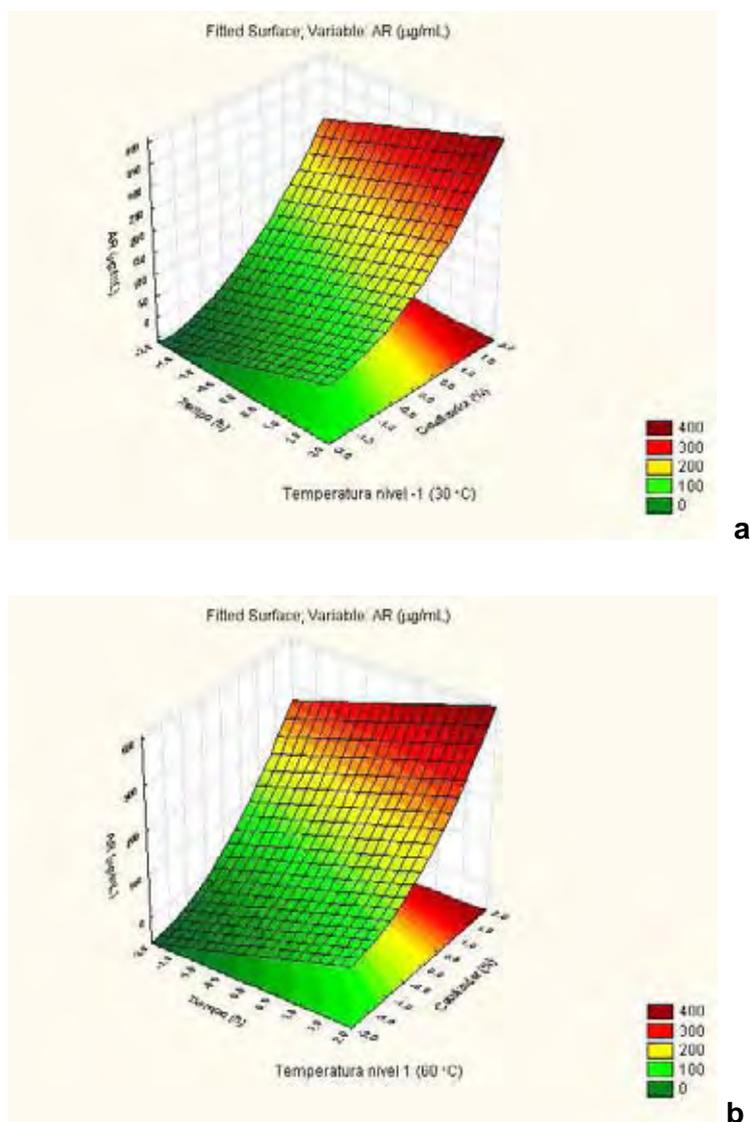
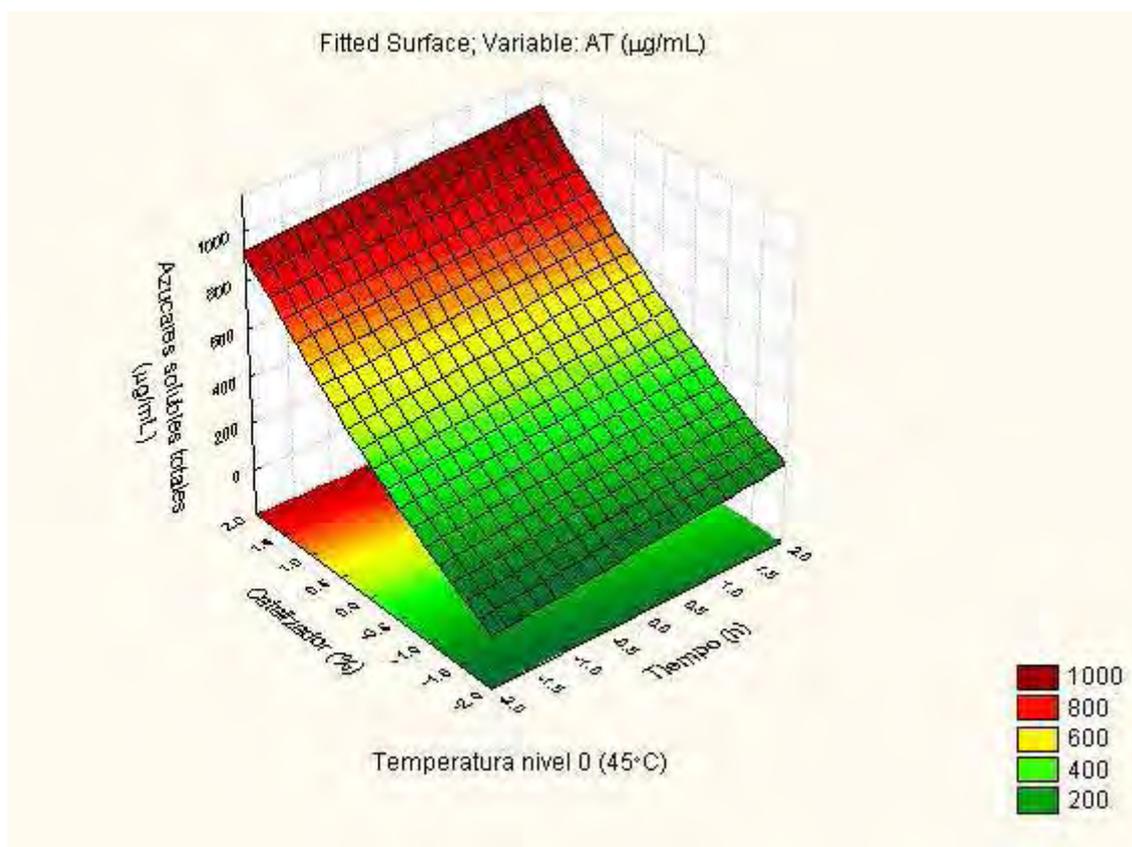


Figura 22. Producción de azúcares reductores a temperatura constante, a) nivel -1 (30 °C), b) nivel 1 (60 °C).

Para el caso de azúcares totales, la concentración de catalizador es nuevamente el factor con mayor efecto sobre la respuesta. En efecto, los AT obtenidos a una temperatura de 45 °C (concentración de enzima 5% (v/v), 3.5 h) son muy similares si pasamos a 60°C (Figura 23). En cambio, cuando la temperatura se fijó a 70 °C con las mismas condiciones de tiempo y catalizador, la producción de AT disminuye de 535.5 µg/mL a 489 µg/mL.



**Figura 23. Producción de azúcares solubles totales a temperatura constante de 45 °C.**

Con los resultados anteriores se puede sugerir que la endolasa con la que se está trabajando es una enzima termoestable ya que la cantidad de azúcares solubles totales a 70 °C disminuye ligeramente y la producción de azúcares reductores incrementa a 95 µg/mL de los 62.75 µg/mL producidos a 45 °C. Esta comparación se basa en estudios recientes donde se consideran enzimas termoestables a temperaturas dentro de un intervalo de 55 a 60 °C (Viikari *et al.*, 2007).

### III.2. Obtención de azúcares totales y reductores dentro del bioreactor de membrana

#### III.2.1. Tiempo de vida media de la enzima *Endolase* 5000 (Novozymes)

Uno de los parámetros que permite obtener información acerca de la estabilidad de la enzima es el tiempo de vida media ( $t_{1/2}$ ), que es el tiempo necesario para que la enzima disminuya su actividad catalítica a la mitad de su actividad inicial. Este tiempo se obtiene a partir del valor de la constante de desactivación ( $k$ ) y que es la pendiente de la relación (Ecuación 2, figura 23).

Cálculo del tiempo de vida media:

$$\ln(P/P_0) = K \cdot t \dots\dots\dots [1]$$

$$k = m = -0.3599 \text{ h}^{-1} \dots\dots\dots [2]$$

$$t_{1/2} = -[\ln(1/2P_0/P_0)] / K$$

Sustituyendo  $k$  en:

$$t_{1/2} = -(\ln 1/2 / K) \dots\dots\dots [3]$$

$$t_{1/2} = 1.93 \text{ h}$$

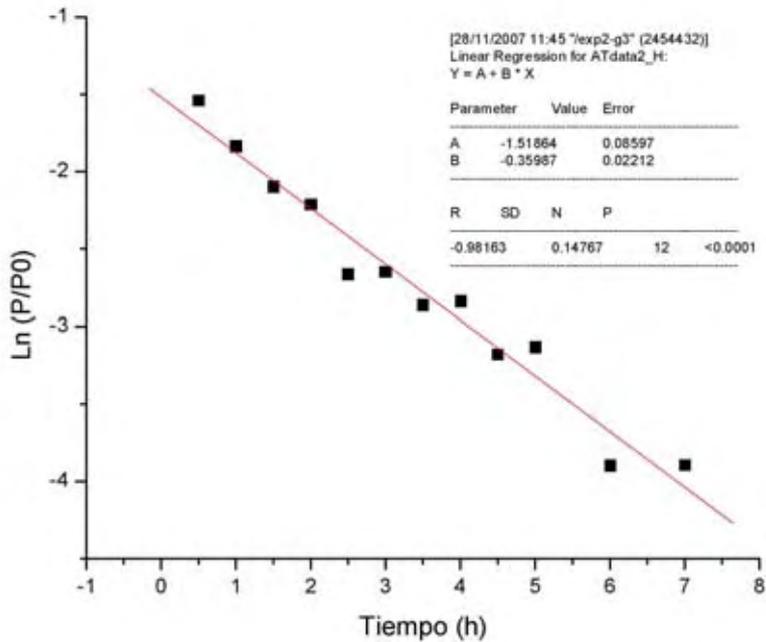


Figura 23. Regresión lineal para el tiempo de vida media de la *Endolase* 5000 a 30 °C.

El tiempo de vida media obtenido manifiesta una estabilidad durante 1.93 h, que se considera un valor alto en comparación con otras enzimas a temperaturas cercanas de 40 y 50 °C como lo son las carbohidratasa y las proteasas obtenidas de microorganismos mesófilos. Sin embargo,  $t_{1/2}$  es bajo en comparación con los obtenidos a partir de termófilos extremos (Tabla 6) o de la endoglucanasa cuyos tiempos de vida media son de 98 h a 70 °C y de 4.1 h a 75 °C. Además, la  $\beta$ -glucosidasa obtenida del microorganismo *Thermoascus aurantiacus* que presenta un  $t_{1/2}$  de 23.5 h a 70 °C y de 1.7 h a 75 °C (Gomes *et al.*, 2000).

**Tabla 6. Tiempos de vida media enzimática en función de la temperatura** (adaptada de García *et al.*, 1993).

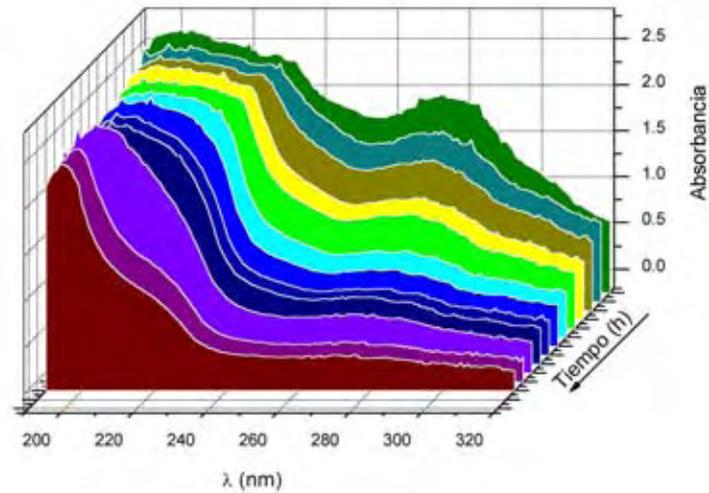
Enzima	Termófilos extremos		Mesófilos	
	$t_{1/2}(\text{h})/ T(^{\circ}\text{C})$		$t_{1/2}(\text{h})/ T(^{\circ}\text{C})$	
L-asparaginasa	0.66/85	0.041/95	0.66/60	
NADH deshidrogenasa	121/85	0.66/95	0.083/60	0.05/70
$\beta$ -galactosidasa	121/85	0.033/95	0.6/50	0.05/50
$\beta$ -glucosidasa	1.66/75	0.023/85	0.083/40	0.083/60
CMC-celulasa	12.66/85	1/95		
$\alpha$ -amilasa		1/100	0.25/55	1/60
Proteasa		1/100	0.25/50	0.25/60

### III.2.2. Comportamiento de la endocelulasa en el reactor

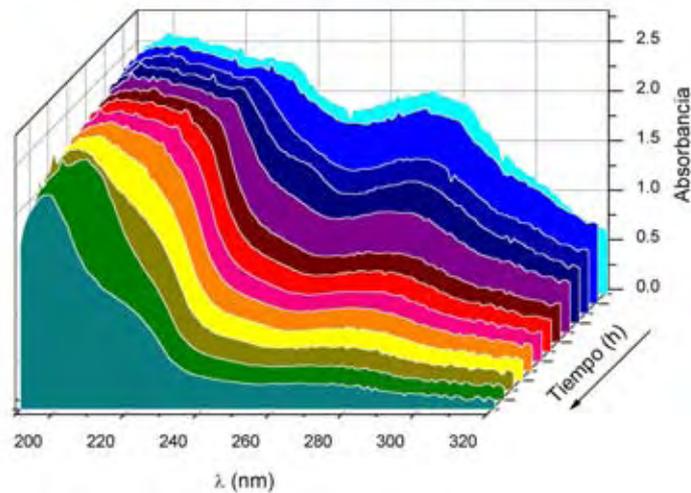
Para conocer si había pérdida de enzima a través de la membrana de 10 kDa, se determinó la concentración de proteína total lavada mediante espectroscopía UV-VIS en el intervalo de 190 a 320 nm. Para ello, se realizaron dos pruebas, en la primera se colocó únicamente la enzima en el bioreactor (Figura 25) y en la segunda se adicionó el polímero ( $\alpha$ -celulosa) para llevar a cabo la hidrólisis (Figura 26). En ambos casos se observa que sí hubo lavado de proteína, sin embargo, no hubo diferencia en las lecturas de absorbancia para ambas condiciones. Para confirmar que fuera proteína la que se lavó del bioreactor durante la reacción, se realizó el cálculo del promedio del centro espectral de masas (CEM) para cada una de las pruebas (Tabla 7). Se confirmó que en ambos casos, el CEM coincide ya que no hubo desplazamiento del centro espectral de masas.

**Tabla 7. Centro espectral de masa (CEM) del filtrado del biorreactor y del preparado enzimático de *Endolase 5000*.**

Centro espectral de masa para	$\lambda$ (nm)
Preparado enzimático lavado	278.22
Proteína lavada en presencia de $\alpha$ -celulosa	278.27



**Figura 25. Proteína lavada del bioreactor, curvas de referencia**



**Figura 26. Proteína lavada en presencia de  $\alpha$ -celulosa durante el experimento**

### III.2.3 Cinética de hidrólisis de $\alpha$ -celulosa en el bioreactor de membrana

En relación a la cinética de hidrólisis, se observó que la mayor producción de AT y AR a partir del polímero ( $\alpha$ -celulosa) mediante la endoglucanasa se obtuvo durante la primera media hora, presentando un decremento en la velocidad de hidrólisis del 84% en la primera hora para azúcares reductores y del 83% para azúcares solubles totales (Figura 27 a, b). Lo anterior puede ser debido a tres factores, a la adsorción del catalizador en la membrana, a la desnaturalización de la proteína dentro del reactor o al lavado de la enzima del bioreactor. En el primer caso, la adsorción paulatina de la enzima en la membrana pudo provocar la formación de varias capas de ésta, ocasionando que las moléculas de enzima en capas inferiores no tuvieran acceso al substrato y con ello la disminución de la hidrólisis de  $\alpha$ -celulosa. Otro factor que pudo influir fue la agitación, no siendo suficiente para evitar la sedimentación y la adsorción de los reactivos en la membrana. Ocasionando con esto la disminución de la hidrólisis y la saturación del poro de la membrana evitando la salida del producto. Así que, debido a lo anterior se pudo provocar que la enzima adsorbida presentara un cambio estructural y con ello la pérdida de su actividad hidrolítica.

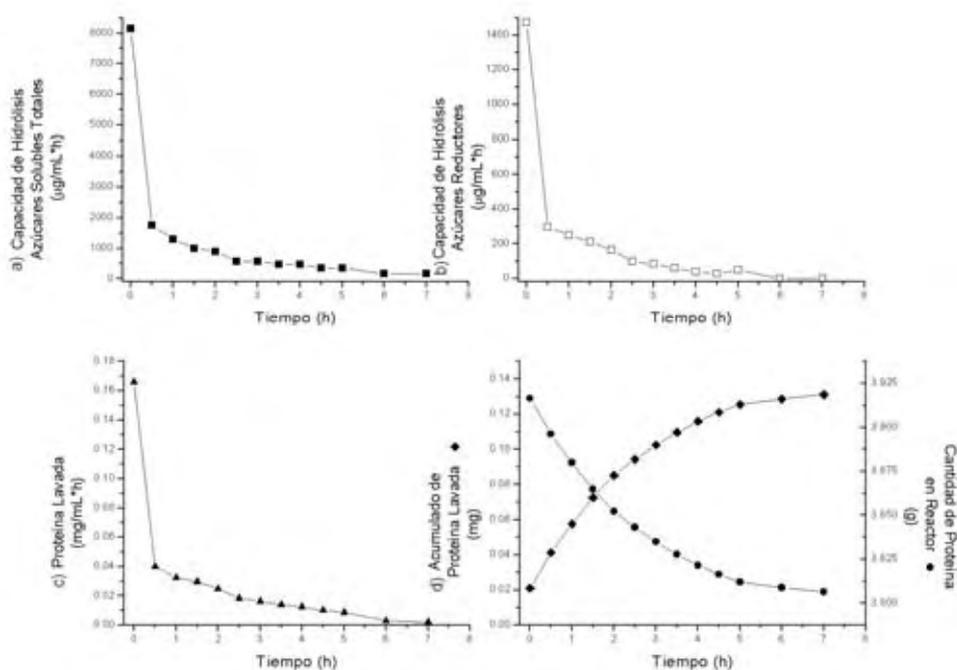
Por otro lado, la hidrólisis pudo haber disminuído por la desnaturalización de la proteína debido al medio iónico y al pH del medio de reacción, considerando que es un sistema biológico y que para llevar a cabo su actividad catalítica requería de ciertas condiciones de pH. Entonces, el agua con un pH menor a 7 pudo afectar la estabilidad de la enzima debido al cambio de fuerzas no covalentes, como son los puentes de hidrógeno y las interacciones electrostáticas, desplegando la estructura nativa de la proteína y en consecuencia la pérdida paulatina de su actividad catalítica.

Otro factor que pudo disminuir la hidrólisis del polímero es la posible salida de la enzima del bioreactor. No obstante, la disminución de la absorbancia de la salida de la proteína (Figura 26) llega a cero a las 4.5 h aproximadamente, asimismo la velocidad de flujo de salida del bioreactor disminuyó en un 19% en la primera hora (Figura 27 c). Y por otro lado, la cantidad de proteína lavada del bioreactor corresponde únicamente al 0.0306%, que equivale a 1.205 mg de la cantidad adicionada inicialmente de 3.9375 g (Figura 27 d).

Al tener menos moléculas de proteína activas, la hidrólisis se realizó de forma más lenta a partir de las 2 h, estabilizándose y manteniendo constante la producción de AT y AR de las 3.5 h hasta las 5h.

Posteriormente, la capacidad de hidrólisis cae lentamente hasta cero debido a que la producción de azúcares reductores ya no se detectó mediante la técnica de espectroscopía UV-VIS (Figura 27 a, b). Otra razón por la que no se pudo detectar la producción de azúcares en la salida del reactor fué, posiblemente, por la adhesión de la celulosa y de la enzima a la membrana que evitó su salida del reactor. En efecto, el cálculo de la enzima adsorbida, por diferencia de la concentración inicial menos la suma de la concentración de enzima final dentro y fuera del reactor, dio como resultado 3,9343 g (99.919%) de enzima acumulada en la membrana. Asimismo, al no tener un buen flujo de salida del producto del reactor debido a la adhesión, la acumulación de agua pudo tener un efecto más rápido sobre la desnaturalización. Estos factores que pueden haber ocasionado la pérdida de actividad enzimática no fueron estudiados en el presente trabajo pero deberán ser considerados en estudios posteriores

Es bien conocido que la actividad hidrolítica de la celulasa y de la  $\beta$ -glucosidasa presenta un gran decremento al incrementar el contenido de glucosa en el hidrolizado (Xiao *et al.*, 2004) o por la pérdida de su estructura funcional, concepto que puede aplicarse para *Endolase 5000* (Novozymes). En este caso el tiempo de vida media (Sección III.2.1) corrobora la disminución de la capacidad de hidrólisis después de la primera media hora.



**Figura 27. Hidrólisis de  $\alpha$ -celulosa por medio de la enzima *Endolase 5000*.**

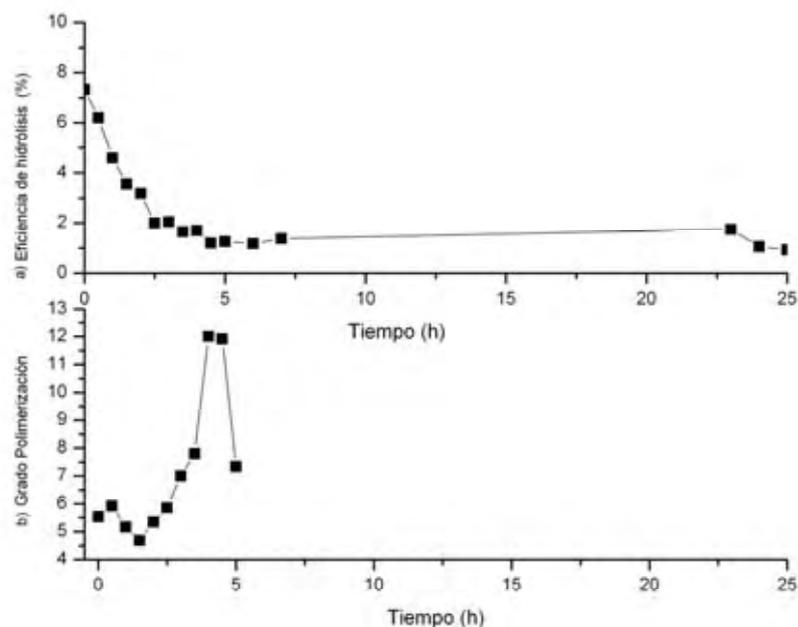
**a) Velocidad de producción de azúcares solubles totales, b) Velocidad de producción de azúcares reductores, c) Velocidad del lavado de proteína, d) Proteína lavada vs. proteína retenida en el reactor.**

### III.2.4. Eficiencia de hidrólisis y grado de polimerización

La facultad que presentó *Endolase* 5000 de llevar a cabo la ruptura de los enlaces glicosídicos del polisacárido más alta se obtuvo en el tiempo inicial de reacción con un valor cercano a 7.2%. Posteriormente la hidrólisis decae durante las dos primeras horas de manera más rápida (Figura 28 a) coincidiendo con el tiempo de vida media calculado. El porcentaje de la hidrólisis total al finalizar el experimento fue menor del 10%, inferior a resultados obtenidos mediante hidrólisis ácida con un valor de 15% (Lloyd y Wyman, 2005) y con la hidrólisis de la  $\alpha$ -celulosa con rendimientos del 56% con base en la producción de glucosa a partir de celulosa que ha pasado por pretratamientos (Nguyen y Saddler, 1991). Es importante considerar que la enzima utilizada en este experimento es una endoglucanasa y que este tipo de enzimas realizan cortes al azar dentro de la cadena de la celulosa, por lo que la generación de azúcares reductores fue baja y con ello la eficiencia de hidrólisis.

Aunque la enzima se comenzó a inactivar a las dos horas y la velocidad de reacción determinada en función de la producción de AR y AT decayó, manteniéndose constante la eficiencia de hidrólisis de las 5 h a las 23 h con un valor aproximado a 2% (Figura 28 a). Razón por la que se cuantificó la concentración de AR y AT en el interior del reactor, obteniéndose valores de 141  $\mu\text{g/mL}$  para azúcares reductores y de 2190  $\mu\text{g/mL}$  para azúcares solubles totales. Siendo que la actividad hidrolítica de la proteína cayó a cero a las 4 h de reacción, se puede considerar que al estar tapados los poros de la membrana esto disminuyó la velocidad de salida del producto (Figura 27 a, b) y de eficiencia de hidrólisis por retención de los azúcares el interior del bioreactor (Figura 28 a).

Por su parte el grado de polimerización (GP), que indica el número de monómeros que presentan las cadenas obtenidas por la hidrólisis, se mantiene alrededor de cuatro a seis en las primeras 3 h de reacción. A las 4 h se presenta un incremento en la longitud de los oligosacáridos obtenidos conteniendo 12 unidades de glucosa (Figura 28 b). Esto muestra que cuando *Endolase* 5000 presenta su mayor capacidad de hidrólisis de  $\alpha$ -celulosa, el GP de los azúcares es menor a seis unidades de glucosa y en cuanto disminuye la capacidad de hidrólisis (ver Figura 27 b) de la enzima, el grado de polimerización incrementa a 12.



**Figura 28. Capacidad de hidrólisis de *Endolase 5000* sobre  $\alpha$ -celulosa (a) y grado de polimerización de los azúcares solubles en el filtrado (b).**

Nota. A partir de las 5 h el valor de azúcares reductores fue cero por lo tanto el grado de polimerización ya no se pudo calcular.

### III.3. Producción de azúcares totales y reductores en un bioreactor de membrana vs. procedimiento por lotes.

Comparando los resultados de los dos sistemas con base en el tiempo de reacción se puede apreciar que en el biorreactor de membrana disminuye la producción de ambos tipos de azúcares con el tiempo, mientras que en el sistema por lotes la concentración es superior sin importar las condiciones de temperatura y la concentración de catalizador (Tabla 8).

**Tabla 8. Comparación de la producción de AT y AR ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) por lotes y membrana**

Tiempo ( h )	SISTEMA POR LOTES*		SISTEMA DE MEMBRANA**	
	AR ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	AT ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	AR ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	AT ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )
1.5	192.6	410	107	502
3.5	118.6	637.6	30	234
5.5	216.6	422.6	24.3	178
7	219	475	0	194

\* Condiciones: 1.5 y 5.5 h, 30 °C y 73.5 mg/mL de enzima; a 3.5 h, 20 °C y 52.5mg/ml de enzima; a 7 h, 45 °C y 5% de enzima.  
 \*\*Condiciones constantes de 30 °C y 78.75 mg/mLde catalizador durante todo el tiempo.

Es importante recordar que un reactor de membrana tiene como finalidad la separación del producto de la mezcla de reacción para poder tener el mayor aprovechamiento del agente catalítico (Romero *et al.*, 2004) y poder incrementar de esta manera la producción. Por otro lado, al no tener fuga de enzima en el sistema de lotes es posible que ésta tuviera un mayor número de interacciones con el sustrato incrementando de esta forma el rendimiento sin importar las condiciones de temperatura y concentración de enzima.

## CONCLUSIONES

- Se realizó la hidrólisis enzimática del polímero  $\alpha$ -celulosa en un biorreactor en lote y de membrana.
- El tiempo es un factor que favorece la producción de azúcares reductores, sin embargo, trabajar a períodos largos (7 h) disminuye la capacidad catalítica de la enzima.
- La enzima trabaja mejor a temperaturas superiores de 60 °C siendo estable hasta 2 h.
- El factor que más influye en la producción de azúcares reductores y azúcares solubles totales es la concentración de enzima.
- La hidrólisis efectuada sobre el polímero ( $\alpha$ -celulosa) por la enzima *Endolase* 5000 fue baja (10%).
- En relación al grado de polimerización, las cadenas de menor tamaño producidas por la enzima son oligómeros de cuatro monómeros.
- El sistema acoplado para llevar a cabo la hidrólisis por el método de membrana tuvo deficiencias de agitación y de flujo de salida, lo que generó que las concentraciones determinadas de los productos en el sistema de membrana fueran menores que en el sistema de lotes.

## RECOMENDACIONES

- Incrementar la concentración del catalizador.
- Utilizar temperaturas en el intervalo de 60 a 65 °C.
- Trabajar a tiempos inferiores de tres horas.
- Ajustar el pH del medio de reacción a 7.
- Realizar un diseño de experimentos donde se contemplen diferentes concentraciones salinas en el medio de reacción, considerándolas como un factor independiente.

**Modo de preparación del DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico) para la cuantificación de azúcares reductores**

1. Disolver 16 g de NaOH en agua destilada.
2. Agregar a esa disolución 300 g de tartrato doble de sodio y potasio.
3. Posteriormente agregar poco a poco 10 g de DNS previamente disueltos en agua.
4. Aforar a 1 L en un matraz volumétrico.

Notas.

- El orden de adición de los reactivos debe seguirse como está escrito.
- El reactivo debe ser guardado en un frasco ámbar.

## Cálculos para la gráfica (d) de la figura 27

**Proteína lavada**

Ecuación de la curva patrón de proteína.

$$Y = 96.219X + 0.01$$

Donde:

Y= Absorbancia.

X= Cantidad proteína ( $\mu\text{L}/\text{mL}$ )Ejemplo de cálculo con  $t = 1.5 \text{ h}$ 

Densidad = 1.05 g/mL (otorgada por Novozymes).

Proteína inicial en el reactor:  $(3.75 \text{ mL}) \cdot (1.05 \text{ g/mL}) = 3.9375 \text{ g}$ .Concentración proteína ( $\mu\text{L}/\text{mL}$ ):  $(1.388 - 0.01)/96.219 = 0,014321496 \mu\text{L}/\text{mL}$ Proteína lavada ( $\mu\text{L}$ ):  $(0,014321496 \mu\text{L}/\text{mL}) \cdot 8.8 \text{ mL} = 0,126029163 \mu\text{L}$ Proteína lavada (mg):  $(0,126029163 \mu\text{L}) \cdot (1 \text{ mL}/1000 \mu\text{L}) \cdot (1.05 \text{ g}/1 \text{ mL}) \cdot (1000 \text{ mg}/1 \text{ g}) = 0,132330621 \text{ mg}$ .Proteína lavada (g) =  $(0,132330621 \text{ mg}) \cdot (1 \text{ g}/1000 \text{ mg}) = 0,000132331 \text{ g}$ Proteína lavada acumulada (g) =  $t_{0 \text{ h}} + t_{0.5 \text{ h}} + t_{1 \text{ h}} + t_{1.5 \text{ h}} = 0,000546399 \text{ g}$ Proteína estimada dentro del reactor =  $3.9375 \text{ g} - 0,000546399 \text{ g} = 3,93620862 \text{ g}$ **Tabla 9. Proteína lavada y proteína estimada dentro del reactor.**

Tiempo (h)	Abs (280nm)	Concentración de proteína por curva patrón ( $\mu\text{L}/\text{mL}$ )	Volumen extraído (mL)	Proteína lavada ( $\mu\text{L}$ )	Proteína lavada (mg)	Proteína lavada (g)	Proteína lavada acumulada (g)	Proteína estimada dentro del reactor (g)
0	1,949	0,020151945	3	0,060455835	0,063478627	6,34786E-05	6,34786E-05	3,937436521
0,5	1,879	0,019424438	10	0,19424438	0,203956599	0,000203957	0,000267435	3,937169086
1	1,503	0,015516686	9	0,139650173	0,146632682	0,000146633	0,000414068	3,936755018
1,5	1,388	0,014321496	8,8	0,126029163	0,132330621	0,000132331	0,000546399	3,93620862
2	1,168	0,012035045	8,7	0,104704892	0,109940137	0,00010994	0,000656339	3,935552281
2,5	0,861	0,008844407	8,7	0,076946341	0,080793658	8,07937E-05	0,000737132	3,934815149
3	0,772	0,007919434	8,8	0,069691017	0,073175568	7,31756E-05	0,000810308	3,934004841
3,5	0,673	0,006890531	8,8	0,060636673	0,063668506	6,36685E-05	0,000873976	3,933130864
4	0,595	0,00607988	8,6	0,05228697	0,054901319	5,49013E-05	0,000928878	3,932201987
4,5	0,485	0,004936655	8,8	0,043442563	0,045614691	4,56147E-05	0,000974492	3,931227494
5	0,417	0,004229934	8,6	0,036377431	0,038196302	3,81963E-05	0,001012689	3,930214806
6	0,31	0,003117887	17,5	0,054563028	0,057291179	5,72912E-05	0,00106998	3,929144826
7	0,235	0,002806099	20,5	0,057525021	0,060401272	6,04013E-05	0,001130381	3,928014445



## BIBLIOGRAFÍA

- Aburto J. (2007). Estrategia tecnológica para la producción de bioetanol. Editado por el Instituto Mexicano del Petróleo, pp. 8-21.
- Aburto, J., E. Mar Juárez y L. Tavera Sánchez. (2007). Elementos técnico-económicos para la producción de bioetanol en México. Editado por el Instituto Mexicano del Petróleo, pp. 6-10, 47-50.
- AOAC International, 2000. Dextran in raw cane sugar. AOAC Official Method 988.12. *Official Methods of Analysis*.
- Austin, G. (1988). Manual de procesos químicos en la industria. Edit. Mc Graw Hill, pp. 712-714.
- BACAS. 2004. Industrial biotechnology and sustainable chemistry. Edit. The Royal Belgian Academy Council of Applied science (BACAS), pp. 63-65.
- Brown, T., H. E. Le May y B. E. Burten. (2004). Química, la ciencia central. Edit. Pearson-Prentice Hall, pp. 992-993.
- E. van Thuijl, R. van ree and T. J. de Lange. (2003). Biofuel production chains. Dutch agency for energy and environment and the department of science, technology and society of the University of Utrecht, pp. 14-16.
- Enriquez Poy, M. (1998). ¿Representa el etanol una alternativa viable para la agroindustria de caña de azúcar? Página en Internet consultada el 24/02/2008: [www.sagarpa.gob.mx/Forma/documentos/ingenio03.htm](http://www.sagarpa.gob.mx/Forma/documentos/ingenio03.htm).
- Fan, L. T., Y. H. Lee and M. M. Gharpuray. (1982). The nature of lignocellulosics and their pretreatments for enzymatic hydrolysis. *Adv. Biochem. Eng.* 23: 157-187.
- Gallup México, Conae y CCA. (2000). Mercado para la electricidad renovable en las industrias de México. Edit. Gallup México, p. 5.
- García Garibay, M., R. Quintero Ramírez y A. López-Munguía Canales. (1993). Biotecnología alimentaria. Edit. Limusa Editores, pp.117-121.
- Gerhartz, W. (1990). Enzymes industry: production and applications. Edit. VCH Publishers, pp. 81-83.
- Gomes, I., J. Gomes, D. J. Gomes, W. Steiner. (2000). Simultaneous production of high activities of thermostable endoglucanase and beta-glucosidase by wild thermophilic fungus: *Thermoascus aurantiacus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 4: 461-68.
- González Amador, R. (2008). Fracasa intento de regular la producción de biocombustibles. Página en Internet: <http://www.jornada.unam.mx/2008/02/21/indexphp>, consultada el 22/02/2008.
- Grassi, G and I. Tripsa. (2004). Bioenergy project for the production of bioethanol.

- Hon, D. N-S and N. Shiraishi. (2001). Wood and cellulosic chemistry. Edit. Marcel Dekker Inc., p. 497.
- Information Energy Administration (IEA). (2007). Biofuel Production. Página en internet: [www.iea.org/Textbase/techno/essentials.html](http://www.iea.org/Textbase/techno/essentials.html), consultada el 31/05/2007.
- Instituto Mexicano del Petróleo. (2006). Producción de bioetanol a partir de residuos lignocelulósicos. Editado por el Instituto Mexicano del Petróleo, pp. 59-61.
- Jacob, S. (2002). Genecor plays key role in cutting use of foreign oil. *Rochester Business Journal*. Página en internet: <http://www.rbjdaily.com>, consultada el 06/02/07.
- Keim, C. R. (1983). Technology and economics of fermentation alcohol-an update. *Enzyme Microb. Technol.* 5: 103-115.
- Knauf, M. and M. Muniruzzaman. (2004). Lignocellulosic biomass processing: A perspective. *International Sugar Journal*, 106: 147-150.
- Lloyd, T. A. and C. E. Wyman. (2005). Combined sugar yields for dilute sulphuric acid pre-treatment of corn stover followed by enzymatic hydrolysis of the remaining solids. *Bioresour. Technol.*, 96: 1967-1977.
- López-Munguía Canales, A. (2000). La biotecnología. Edit. Tercer Milenio, pp. 30-31.
- Lorenz Miller, G. (1959). Used of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.*, 31: 426-428.
- Lucas, R., A. M. Robles Gómez, A. Gálvez de Postigo Ruíz, T. García Gutiérrez, R. Pérez Pulido, G. Álvarez de Cienfuegos López. (2001). Biodegradación de la celulosa y la lignina. Publicaciones Universidad de Jaén, pp. 13-15, 18, 20-25, 27, 31, 32, 34-37, 59, 66, 68, 69.
- Masera Cerruti, O., N. Rodríguez Martínez, I. Lazcano Martínez, L. Augusto Horta Nogueira, I. C. Macedo, S. C. Trindade, M. Weber, O. Probst y F. Moler-Langer. (2006). Potenciales y viabilidad de uso del bioetanol y biodisel para el transporte en México. Edit. SENER.
- Mc Murry, J. (2001). Química orgánica. Internacional Thompson Editores, p. 239.
- Montgomery, D. C. (2005). Design and analysis of experiments. Edit. J. Wiley, pp. 85-92.
- Moxley G. and H. P. Zhang. (2007). More accurate determination of acid-labile carbohydrates in lignocellulose by modified quantitative saccharification. *Energy & Fuels.*, 21: 3684-3688.
- Nguyen, Q. A. and J. N. Saddler. (1991). An integrated model for the technical and economic evaluation of an enzymatic biomass conversion process. *Bioresour. Technol.* 35: 275-282.

- Notimex. (2007). Debe México impulsar maíz transgénico para etanol: CEESP. Página en Internet: <http://www.el-universal.com.mx/notas/424702.html>, consultada el 24/02/2008.
- Romero, L., R. Chávez, S. Huerta-Ochoa y A. Prado. (2004). Bioreactores enzimáticos de membrana: aplicaciones. *In: Tópicos en biotecnología: reactores enzimáticos*. Editor: Sergio Huerta Ochoa. Editorial UAM, páginas: 98-104.
- Saha, B. and D. C. Demirjian. (2001). Applied biocatalysis in specialty chemicals and pharmaceuticals. Edit. American Chemical Society, pp.
- Svendsen, A. (2004). Enzyme functionality: design, engineering and screening. Editorial Marcel Dekker Inc., p. 16.
- Tenkanen, M., M. L. N. Paavola, M. Linder and L. Viikari. (2003). Cellulases in food processing. *In: Handbook of food enzymology*. Publisher: John Whitaker. Edit. Marcel Dekker Inc. pp. 771-774.
- Viikari, L., M. Alapuranen, T. Puranene, J. Vehamaanpera, M. Shilka-Aho. (2007). Thermostable enzymes in lignocellulose hydrolysis. *Adv. Biochem. Eng. Biotech.*, 108: 121-145.
- Villegas López, M. (2003). Charles Chaplin, el genio del cine. Editorial ABC, S.L., p.126.
- Voet, D. y J. G. Voet. (1992). Bioquímica. Editorial Omega, pp. 187-194, 342-343.
- Wade, L.G. Jr. (1993). Química orgánica. Editorial Prentice-Hall Hispanoamericana, pp. 404, 1207-1212.
- Walpole R. y R. H. Myers. (1992). Probabilidad y estadística. Editorial McGraw-Hill, pp. 461-463, 527-534.
- Xiao, Z., X. Zhang, D. J. Gregg, J. N. Saddler. (2004). Effects of sugar inhibition on cellulases and beta- glucosidase during enzymatic hydrolysis of softwood substrates. *Appl Biochem Biotechnol.*, 115: 1115-26.
- Yu, M., R. P. Chandra and J. N. Saddler. (2007). Some recent advances in hydrolysis of biomass in hot-compressed water and its comparisons with other hydrolysis methods. *Energy and Fuels*, 22: 46-60.