



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

TESIS

**ESTUDIO DE LA DESLIGNIFICACIÓN ENZIMÁTICA DE MATERIALES
LIGNOCELULÓSICOS Y ACTIVIDAD FUNCIONAL DE LOS LIGNANOS
OBTENIDOS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA DE ALIMENTOS**

PRESENTA

IBETH PERALTA GARCÍA



MÉXICO, D.F.

AÑO: 2015



Universidad Nacional
Autónoma de México



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: JOSÉ GUILLERMO DE JESÚS AGUILAR OSORIO

VOCAL: CAROLINA PEÑA MONTES

SECRETARIO: JORGE ARTURO ABURTO ANELL

1er. SUPLENTE: NORMA ANGÉLICA CAMACHO DE LA ROSA

2° SUPLENTE: BRENDA SÁNCHEZ SALAZAR

INSTITUTO MEXICANO DEL PETRÓLEO

ASESOR DEL TEMA:

DR. JORGE ARTURO ABURTO ANELL

SUSTENTANTE:

IBETH PERALTA GARCÍA

RESUMEN

El presente trabajo se enfoca al estudio de pretratamiento biológico de material lignocelulósico a partir de enzimas oxido-reductasas, con el objetivo de incrementar la disponibilidad de azúcares a una subsecuente sacarificación y con ello aumentar la cantidad de azúcares fermentables para favorecer la producción de etanol. Además estudia a grandes rasgos la posible actividad funcional (actividad antioxidante y antimicrobiana) de la disolución resultante del pretratamiento.

Las enzimas utilizadas para los pretratamientos fueron lacasa y HRP y su efecto en la deslignificación se estudió mediante un diseño de experimentos factorial completo 2^3 con 3 puntos centrales en pasto Taiwán. Con las condiciones que se obtuvo una mejor respuesta se pretrataron pasto privilegio y bagazo de caña.

Con dichas condiciones se utilizó la disolución resultante del pretratamiento y se estudió su actividad antioxidante mediante la oxidación química del ABTS con H_2O_2 variando las concentraciones, y su actividad antimicrobiana, basada en su capacidad de inhibición de crecimiento bacteriano.

Contenido

INTRODUCCIÓN	1
Capítulo 1. Marco Teórico	3
1.1. Biocombustibles	3
1.1.1 Bioetanol	4
1.2. Material lignocelulósico	5
1.2.1 Componentes estructurales	5
1.2.1.1. Celulosa	5
1.2.1.2. Hemicelulosa.....	6
1.2.1.3. Lignina	8
1.3 Pretratamientos de material lignocelulósico	10
1.4. Enzimas Oxido-reductasas	12
1.4.1. Lacasa	12
1.4.2. Peroxidasa de rábano (Horseradish peroxidase, HRP)	13
1.5. Bagazo de caña, pasto Taiwán y privilegio	14
1.6. Actividad Antioxidante.....	15
1.7. Actividad antimicrobiana.	18
Capítulo 2. Objetivos e hipótesis.....	20
Capítulo 3. Metodología.....	21
3.1. Actividad enzimática lacasa	23
3.1.1. Actividad enzimática HRP	23
3.1.2. Efecto de temperatura y pH sobre la actividad enzimática.	23
3.2. Evaluación de la deslignificación enzimática mediante diseño de experimentos	24
3.2.1. Pretratamiento con enzimas lacasa	26

3.2.2. Pretratamiento con enzima HRP	26
3.2.3. Sacarificación.....	26
3.2.4. Determinación de azúcares totales (AT). Método fenol-sulfúrico	27
3.2.5. Determinación de azúcares reductores (AR). Método DNS	28
3.2.6. Determinación de lignina soluble (LS).....	28
3.2.7 Actividad Antioxidante	29
3.2.8. Actividad antimicrobiana	30
3.2.8.1. Antibiograma por difusión “Técnica de Kirby-Bauer”	31
3.2.8.2. Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) y porcentaje de inhibición mediante densidad óptica	32
Capítulo 4. Resultados y discusión	33
4.1. Caracterización de enzimas	33
4.1.1. Efecto de pH sobre la actividad enzimática de lacasa y HRP	33
4.1.2. Efecto de Temperatura sobre la actividad enzimática de lacasa y HRP	34
4.2. Deslignificación y sacarificación enzimática de los materiales lignocelulósicos	36
4.2.2. Modelo simplex	45
4.2.3. Tratamiento de pasto Taiwán con enzima HRP	46
4.2.4. Sacarificación de pasto Taiwán.....	53
4.2.4.1 Estudio de la sacarificación del material con pretratamiento y sin pretratamiento.....	54
4.2.5. Evaluación de la sacarificación enzimática de los pastos deslignificados.	59
4.3. Análisis de los espectros de las disoluciones resultantes de la deslignificación.....	63
4.4. Actividad antioxidante	65

4.5. Actividad Antimicrobiana	69
CONCLUSIONES	75
Recomendaciones	76
BIBLIOGRAFÍA	77

Contenido de figuras

Figura 1. Estructura primaria de la celulosa	6
Figura 2. Ejemplo de estructura de la hemicelulosa.....	6
Figura 3. Representaciones de Hawort de las principales pentosas presentes en la hemicelulosa	7
Figura 4. Alcoholes cinamílicos precursores de lignina.....	8
Figura 5. Materiales lignocelulósicos empleados en el presente trabajo.....	15
Figura 6. Estructuras de las vitaminas E (a), A (b) y C (c), de gran valor por su capacidad antioxidante entre otros de sus beneficios	17
Figura 7. Estructura de los derivados fenólicos y de los bisfenoles	19
Figura 8. Diagrama general de la metodología experimental para determinar la actividad enzimática de lacasa y HRP	21
Figura 9. Diagrama general de la metodología experimental del pretratamiento, sacarificación y evaluación disoluciones generadas	22
Figura 10. Reacciones que se llevan a cabo por el método fenol-sulfúrico.....	27
Figura 11. Efecto del pH sobre la actividad enzimática de lacasa y HRP, medido a 25 °C	33
Figura 12. Efecto de temperatura sobre la actividad enzimática de lacasa y HRP, medido a pH 5.....	34
Figura 13. Superficies de respuesta para el porcentaje de azúcares totales obtenidos de la deslignificación y sacarificación enzimática en función de la concentración de Lacasa y el tiempo de deslignificación para los porcentajes de sólidos en variables codificadas a) -1, b) 0 y c) +1.....	39

Figura 14. Superficies de respuesta para el porcentaje de azúcares reductores obtenidos de la deslignificación y sacarificación enzimática en función de la concentración de lacasa y el tiempo de deslignificación para los porcentajes de sólidos en variables codificadas a) -1, b) 0 y c) +1	41
Figura 15. Superficies de respuesta para el porcentaje de lignina soluble obtenido de la deslignificación y sacarificación enzimática en función de la concentración de lacasa y el tiempo de deslignificación para los porcentajes de sólidos en variables codificadas a) -1, b) 0 y c) +1	43
Figura 16. Espacio tridimensional de análisis para el modelo simplex. La variable x corresponde a la cantidad de enzima, la variable y al tiempo y la variable z al %de sólidos	45
Figura 17. Superficies de respuesta para el porcentaje de azúcares totales obtenido de la deslignificación y sacarificación enzimática en función de la concentración de HRP y la concentración de peróxido de hidrógeno para los diferentes tiempos en variables codificadas a) -1, b) 0 y c) +1	48
Figura 18. Superficies de respuesta para el porcentaje de azúcares reductores obtenido de la deslignificación y sacarificación enzimática en función de la concentración de HRP y la concentración de peróxido de hidrógeno para los diferentes tiempos en variables codificadas a) -1, b) 0 y c) +1	50
Figura 19. Superficies de respuesta para el porcentaje de lignina soluble obtenido de la deslignificación y sacarificación enzimática en función de la concentración de HRP y la concentración de peróxido de hidrógeno para los diferentes tiempos en variables codificadas a) -1, b) 0 y c) +1	52
Figura 20. Comparación de azúcares totales, de cada pretratamiento con lacasa con los azúcares totales del control, correspondientes al diseño factorial completo 2^3 (a) y diseño simplex (b)	54
Figura 21. Comparación de azúcares totales de los pretratamientos con HRP con los azúcares totales del control.	55
Figura 22. Comparación de azúcares reductores de los pretratamientos con lacasa con los azúcares reductores del control correspondientes al diseño factorial completo 2^3 (a) y al diseño simplex (b)	56

Figura 23. Comparación de azúcares reductores de los pretratamientos con HRP con los azúcares reductores del control.	57
Figura 24. Comparación de lignina soluble de los pretratamientos con lacasa con la cantidad de lignina soluble del control correspondientes al diseño factorial completo 2 ³ (a) y al diseño simplex (b).....	57
Figura 25. Comparación de lignina soluble de los pretratamientos con HRP con el control	58
Figura 26. Disminución porcentual de lignina soluble e incremento porcentual de azúcares reductores y totales para pasto privilegio, Taiwán y bagazo de caña con los diferentes pretratamientos	61
Figura 27. Espectro UV-vis de las disoluciones resultantes de los distintos materiales pretratados con HRP	63
Figura 28. Disoluciones obtenidas de la deslignificación mediante lacasa y HRP de los diferentes materiales.....	65
Figura 29. Actividad antioxidante del ácido ascórbico con respecto a la concentración. El 100% corresponde a una concentración de ABTS de 15.94µM.	66
Figura 30. Actividad Antioxidante (AA) y oxidante (AO) de la disolución resultante de los diferentes pretratamientos aplicados al pasto Taiwán	67
Figura 31. Actividad Antioxidante (AA) y oxidante (AO) de la disolución resultante de los diferentes pretratamientos aplicados al pasto privilegio.....	67
Figura 32. Actividad Antioxidante (AA) y oxidante (AO) de las disoluciones resultantes de los diferentes pretratamientos aplicados al bagazo de caña.	68
Figura 33. Actividad antimicrobiana de la disolución resultante del pretratamiento con enzima lacasa aplicada al pasto Taiwán	70
Figura 34. Actividad antimicrobiana de la disolución resultante del pretratamiento con enzima lacasa aplicada al pasto privilegio.....	71
Figura 35. Actividad antimicrobiana de la disolución resultante del pretratamiento con enzima lacasa aplicado a bagazo de caña	71
Figura 36. Actividad antimicrobiana de la disolución resultante del pretratamiento con enzima HRP aplicado a bagazo de caña.....	72

Figura 37. Actividad antimicrobiana de la acetona	73
Figura 38. Actividad antimicrobiana del etanol	73

Figura A 1. Curva de calibración de glucosa para determinación de azúcares totales por el método fenol-sulfúrico.....	83
Figura A 2. Curva de calibración de glucosa para determinación de azúcares reductores por el método de DNS	83
Figura A 3. Valor normal vs residuos, residuos vs predichos y valores predichos vs observados de azúcares reductores del pretratamiento con lacasa	86
Figura A 4. Valor normal vs residuos, residuos vs predichos y valores predichos vs observados de azúcares totales del pretratamiento con lacasa.	87
Figura A 5. Valor normal vs residuos, residuos vs predichos y valores predichos vs observados de lignina soluble del pretratamiento con lacasa.....	88
Figura A 6. Valor normal vs residuos, residuos vs predichos y valores predichos vs observados de azúcares reductores del pretratamiento con HRP	89
Figura A 7. Valor normal vs residuos, residuos vs predichos y valores predichos vs observados de azúcares totales del pretratamiento con HRP	90
Figura A 8. Valor normal vs residuos, residuos vs predichos y valores predichos vs observados de lignina soluble del pretratamiento con HRP.	91

Contenido de tablas

Tabla 1. Porcentaje de los diferentes monolignoles presentes en la lignina para los diferentes tipos de plantas.....	9
Tabla 2. Actividad antioxidante de diferentes compuestos con respecto al ácido ascórbico.....	16
Tabla 3. Condiciones del pretratamiento con enzima lacasa, para el diseño factorial 2 ³ según las variables codificadas.....	24
Tabla 4. Condiciones del pretratamiento con enzima lacasa, para el diseño simplex según las variables codificadas.....	25
Tabla 5. Condiciones del pretratamiento con enzima HRP, para el diseño factorial 2 ³ según las variables codificadas	25
Tabla 6. Diseño experimental de la sacarificación de pasto Taiwán pretratado con lacasa.....	36
Tabla 7. Coeficientes de correlación del modelo $y = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \beta_3 x_3 + \beta_{123} x_1 x_2 x_3$, donde x_1 = cantidad de enzima (mL), x_2 =tiempo (min) y x_3 =contenido de sólidos (%)......	37
Tabla 8. Modelo simplex para las diferentes cantidades de enzima, diferentes tiempos y mismo porcentaje de sólidos en variables codificadas.....	45
Tabla 9. Diseño de experimentos para la sacarificación con pretratamiento utilizando enzima HRP	46
Tabla 10. Coeficientes de correlación del modelo $y = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \beta_3 x_3 + \beta_{123} x_1 x_2 x_3$, donde x_1 = cantidad de enzima (mL), x_2 =tiempo (min) y x_3 =concentración de H ₂ O ₂ (%)......	47
Tabla 11. Sacarificación de pasto Taiwán con E7, sin pretratamiento	53
Tabla 12. Comparación de AT, AR y LS resultantes de los diferentes pretratamientos de pasto Taiwán, pasto privilegio y bagazo de caña	59
Tabla 13. Índice de polimerización (IP) de los diferentes materiales pretratados.	60
Tabla 14. Azúcares obtenidos a partir de hidrólisis ácida de los diferentes materiales.....	62

Tabla 15. Eficiencia de conversión de cada pasto con base en la composición porcentual de azúcares resultante de la hidrólisis ácida	62
Tabla 16. Absorbancias relativas de furfurales y componentes derivados de lignina encontrados en estudios sobre biomasa hidrolizada.....	64
Tabla 17. Halos de inhibición (cm) medidos mediante la técnica de Kirby- Bauer de las disoluciones resultantes de los pretratamientos de pasto Taiwán (T), privilegio (P) y bagazo de caña (BC) con enzima peroxidasa (HRP) y lacasa (L) .	69
Tabla 18. CMI de las disoluciones resultantes de los diferentes pretratamientos, determinada por turbidez observada.....	70
Tabla A 1. Valores de actividad específica de Lacasa y HRP medida a diferente pH, T= 25°C.	84
Tabla A 2. Valores de actividad específica de lacasa y HRP medida a diferente temperatura, pH 5.	84
Tabla A 3. ANOVA de resultados de actividad específica de la enzima lacasa para valores de pH 4,5 y 6 ($\alpha=0.05$).....	84
Tabla A 4. ANOVA de resultados de actividad específica de la enzima HRP para valores de pH 4, 5,6 y 7 ($\alpha=0.05$).....	85
Tabla A 5. ANOVA de resultados de actividad específica de la enzima Lacasa para valores de temperatura 25 y 35°C ($\alpha=0.05$).....	85
Tabla A 6. ANOVA de resultados de actividad específica de la enzima HRP para valores de temperatura 25, 35 y 50°C ($\alpha=0.05$).....	85
Tabla A 7. Anova extraída de STATISTICA de azúcares reductores del pretratamiento con lacasa. ($\alpha=0.05$), $r= 0.99947$, Ms residual= 0.0306333	86
Tabla A 8. Anova extraída de STATISTICA de azúcares totales del pretratamiento con lacasa ($\alpha=0.05$), $r= 0.99923$, Ms residual= 0.6516	86
Tabla A 9. Anova extraída de STATISTICA de lignina soluble del pretratamiento con lacasa ($\alpha=0.05$), $r= 0.9968$, Ms residual= 0.002333.	88
Tabla A 10. Anova extraída de STATISTICA de azúcares reductores del pretratamiento con HRP ($\alpha=0.05$), $r= 0.99177$, Ms residual= 0.264033.	89

Tabla A 11. Anova extraída de STATISTICA de azúcares totales del pretratamiento con HRP ($\alpha=0.05$), $r= 0.99631$, $Ms\ residual= 1.026633$	90
Tabla A 12. Anova extraída de STATISTICA resultados de azúcares totales del pretratamiento con HRP ($\alpha=0.05$), $r= 0.99449$, $Ms\ residual= 0.000333$	91
Tabla A 13. ANOVA de resultados de azúcares reductores utilizando lacasa como pretratamiento ($\alpha=0.05$)	92
Tabla A 14. ANOVA de resultados de azúcares totales utilizando lacasa como pretratamiento ($\alpha=0.05$)	92
Tabla A 15. ANOVA de resultados de lignina soluble utilizando lacasa como pretratamiento ($\alpha=0.05$)	93

INTRODUCCIÓN

La demanda mundial de combustibles es actualmente un problema ya que los combustibles fósiles, el petróleo y sus derivados, como fuente de energía, están llegando a niveles de agotamiento. Esta situación, la actual contaminación ambiental y el calentamiento global, provocados en gran medida por el uso de este tipo de combustibles, son un gran problema que representa un reto y una oportunidad para la implementación de energías renovables. La seguridad energética y la reducción de los efectos del cambio climático son los factores más importantes que llevan a la elaboración de programas bioenergéticos en la mayoría de los países. (SENER, 2006)

Desde hace ya algunos años, se ha dedicado tiempo y dinero en la búsqueda de fuentes alternas de energía. Sin embargo como resultado de esa investigación, sólo ha llegado a producir una cantidad de energía renovable que sustituye aproximadamente 10% de la energía total consumida, pero se estima que a corto plazo, la producción de este tipo de energía pueda aumentar. (SAGARPA, 2010)

Debido a que la obtención de biocombustibles toma como principal materia prima el maíz y la caña de azúcar (FAO) existen muchas inquietudes, como que si el hecho de utilizar y promover la producción de caña de azúcar para la producción de etanol tiene como consecuencia limitar las oportunidades para un crecimiento sostenible de la agricultura, o bien el saber si el etanol como biocombustible contribuye positivamente a un mejoramiento del ambiente, por tal motivo se han buscado distintos materiales como alternativas para la producción de etanol, para que siga siendo una fuente de energía renovable.

La producción de etanol a partir de residuos lignocelulósicos es una gran alternativa ya que no toma como fuente materiales utilizados para consumo humano. La lignocelulosa es el polímero natural más abundante en el planeta

(Sarkanen *et al.*, 1971), representando cerca del 50% de la biomasa en la tierra y se encuentra en residuos agrícolas, industriales, forestales, municipales, pastos de crecimiento rápido, material vegetal del mar, y biomasa proveniente de zonas semiáridas.

La conversión de las materias primas a etanol involucra: el pretratamiento (hidrólisis de la lignocelulosa), detoxificación de la hemicelulosa, sacarificación enzimática de la celulosa, fermentación y recuperación del etanol (destilación y deshidratación).

La biomasa lignocelulósica, es resistente a la sacarificación enzimática, por lo que estos residuos necesitan ser pretratados para facilitar la hidrólisis de la celulosa y la hemicelulosa (Saha, 2004). Dado lo anterior, el objetivo del procesamiento de dichos materiales consiste, por un lado, en incrementar el área expuesta de la materia prima, permitiendo con ello una mayor accesibilidad de las enzimas que hidrolizan la celulosa (Galbe *et al.*, 2002) y por otro generar jarabes ricos en azúcares fermentables.

Existen varios métodos, el procesamiento con ácido diluido a altas temperaturas, por ejemplo, es uno de los más comunes para el pretratamiento de muchos materiales lignocelulósicos, por su relativa facilidad para realizarlo y por su bajo costo. Dado que los residuos provocados por este último método no son condescendientes con el ambiente, es de suma importancia buscar otras alternativas que permitan realizar la designificación y que no generen residuos tóxicos o corrosivos. Por tal motivo el promover e investigar más acerca de pretratamientos a partir de sistemas biológicos como son las enzimas es de gran importancia ya que por un lado se evita el generar productos tóxicos y por otro lado se obtiene el beneficio principal que es aumentar la disponibilidad de celulosa y hemicelulosa descrito anteriormente.

Capítulo 1. Marco Teórico

1.1. Biocombustibles

Los biocombustibles son recursos energéticos producidos por el ser humano a partir de biomasa. Pueden ser líquidos, sólidos o gaseosos, y su finalidad es liberar la energía contenida en sus componentes químicos mediante una reacción de combustión (Álvarez, 2009).

Existen varios tipos de biocombustibles, clasificados de acuerdo al insumo o materia prima y a la tecnología empleada para producirlos, los cuales son:

Primera generación: Se emplean las partes alimenticias de las plantas con alto contenido de almidón, azúcares y aceites. Las ventajas son su facilidad de procesamiento y sus bajas emisiones de gases de efecto invernadero (a excepción de maíz donde el balance es casi nulo). Los productos que se obtienen son metanol, etanol, butanol, biodiesel y biogás.

Segunda generación: Los materiales empleados para este fin son residuos agrícolas y forestales compuestos principalmente por celulosa, su producción es más compleja y da como resultado la obtención de etanol, metanol, biodiesel, entre otros. Su principal ventaja es que no es un alimento para el ser humano.

Tercera generación: Los materiales empleados son vegetales no alimenticios de crecimiento rápido y con una alta densidad energética almacenada en sus componentes químicos. También conocidos como cultivos energéticos, por las razones antes mencionadas, entre ellos se encuentran los pastos perennes como son switchgrass (*Panicum virgatum*), miscanthus (*Miscanthus giganteus*), pasto elefante (*Pennisetum purpureum*), reed canary grass (*Phalaris arundinacea*), entre otros, árboles de ciclo corto o crecimiento rápido (eucalipto, álamo, pino, etc.), las algas verdes y verde-azules.

Las hierbas perennes presentan alto potencial en rendimientos de biocombustible por hectárea, balances energéticos y ahorro de emisiones que podrían superar a los de las materias primas de primera generación cuyas limitantes es la utilización de tierras de cultivo de alimentos y debido a que algunas especies son consideradas invasivas existe el riesgo de efectos negativos para la agricultura (FAO)

Cuarta generación: Los biocombustibles son producidos a partir de bacterias genéticamente modificadas, las cuales emplean anhídrido carbónico (CO₂) o alguna otra fuente de carbono.

1.1.1 Bioetanol

El etanol es utilizado para distintos fines, dentro de los cuales los que más destacan se encuentra en el sector energético ya que puede ser utilizado de forma directa como combustible o como aditivo de gasolina. Como aditivo tiene la función de oxigenante presentando una gran ventaja ya que reemplaza al oxigenante metil-terbutil-eter (MTBE) que en altas concentraciones puede ser dañino para el ambiente (Gillner, 1988).

El etanol puede producirse a partir del etileno, que es un derivado del petróleo, o del procesamiento de materia orgánica. Al etanol producido de materia orgánica se le conoce como bioetanol (SENER, 2011) y se obtiene mediante la fermentación de toda materia prima que contengan azúcares fermentables o almidón y/o celulosa que pueden ser convertidos en azúcares (Lee, 2002).

1.2. Material lignocelulósico

La lignocelulosa es el polímero natural más abundante en el planeta (Sarkanen *et al.* 1971), representando cerca del 50% de la biomasa en la tierra y se encuentra en residuos agrícolas, industriales, forestales, municipales, pastos de crecimiento rápido, material vegetal del mar, y biomasa proveniente de zonas semiáridas.

El material lignocelulósico está constituido por los tejidos de los vegetales cuyas células presentan una pared celular constituida por microfibrillas de celulosa formando capas de hemicelulosa sobre las que se deposita la lignina.

1.2.1 Componentes estructurales

Los componentes de los materiales lignocelulósico se clasifican en:

Componentes estructurales: formado por tres polímeros, celulosa (40-50%), hemicelulosa (25-35%) y lignina (15-20%). Ésta última puede estar unida a la celulosa directamente o a través de la hemicelulosa, lo cual es más común.

Componentes secundarios: formados por componentes de bajo peso molecular hidrosolubles o extraíbles con solventes orgánicos y por cenizas.

1.2.1.1. Celulosa

Es un homopolímero lineal de elevado peso molecular y grado de polimerización que llega hasta 10,000 unidades de β -D-glucopiranosas unidas por enlace glucosídico o de tipo éter.

El enlace glicosídico se forma por la reacción del grupo -OH del carbono 4 de otra piranosas. Uno de los extremos de cada cadena presenta en este carbono un grupo aldehído de carácter reductor.

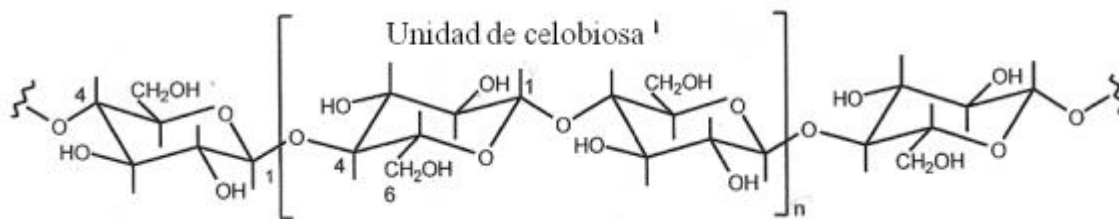


Figura 1. Estructura primaria de la celulosa

Fuente: Barroso, 2010

Las fibras están compuestas por entre 40 a 100 cadenas de celulosa presentando zonas de estructura cristalina que le dan una mayor resistencia al tejido y zonas amorfas que le dan elasticidad, dependiendo de la relación entre zonas amorfas y cristalinas será la capacidad de los reactivos químicos o bien de las enzimas para hidrolizar la celulosa.

1.2.1.2. Hemicelulosa

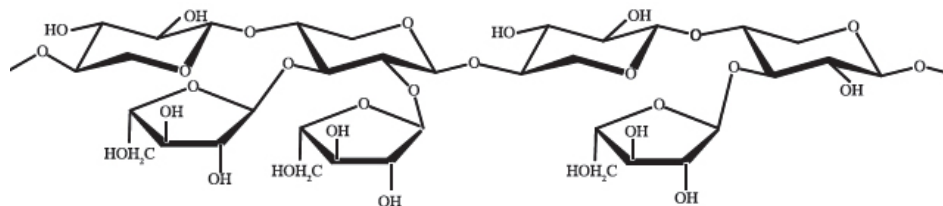


Figura 2. Ejemplo de estructura de la hemicelulosa

Fuente: Pabón, 2004.

La hemicelulosa es un polímero formado por polisacáridos con grupos heterogéneos, forma cadenas ramificadas de menor grado de polimerización que la celulosa y no tiene zonas cristalinas.

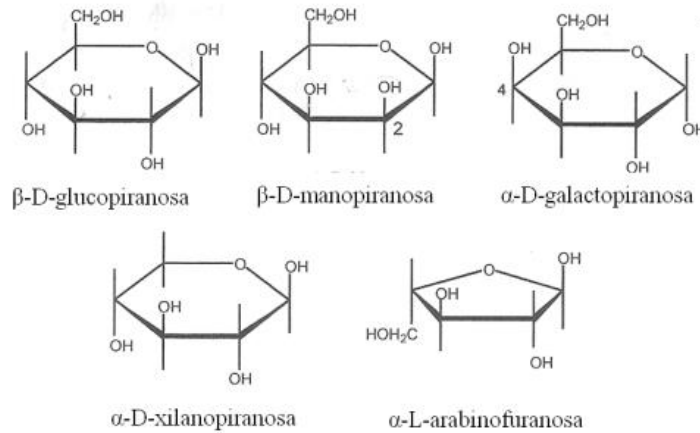


Figura 3. Representaciones de Hawort de las principales pentosas presentes en la hemicelulosa

Fuente: Barroso, 2010.

Los heteropolímeros de hemicelulosa están formados principalmente por hexosas, pentosas o ácidos urónicos y se demoninan según el monómero mayoritario.

Xilanos: Polímero constituido por una cadena lineal de residuos de xilosa con uniones β -(1-4) y diversas ramificaciones y sustituciones, mayoritarios en las maderas de frondosas y en algunas angiospermas herbáceas, menos frecuente en la madera de coníferas.

Mananos: Los mananos están constituidos por residuos de manosa con uniones β -(1-4) con algunas variaciones entre sí. Se dividen en mananos lineales, glucomananos, galactomananos y galactoglucomananos, son las hemicelulosas mayoritarias de las maderas de coníferas, y son solubles en agua.

Galactanos: Los heteropolímeros constituidos por residuos de galactosa son minoritarios en comparación con xilosa o glucosa con uniones β -(1-4) en materiales lignocelulósicos.

Glucanos: Heteropolímeros ramificados constituidos por glucosa de menor grado de polimerización que en celulosa unidos por enlaces glucosídicos con uniones β -(1-4).

Sustancias pécticas: Heteropolímeros caracterizados por presentar ácido galacturónico, aparecen en células que no han lignificado.

1.2.1.3. Lignina

La lignina es un polímero aromático de estructura compleja formado de la condensación de precursores fenólicos (alcoholes cinamílicos) cuya proporción varía dependiendo del material.

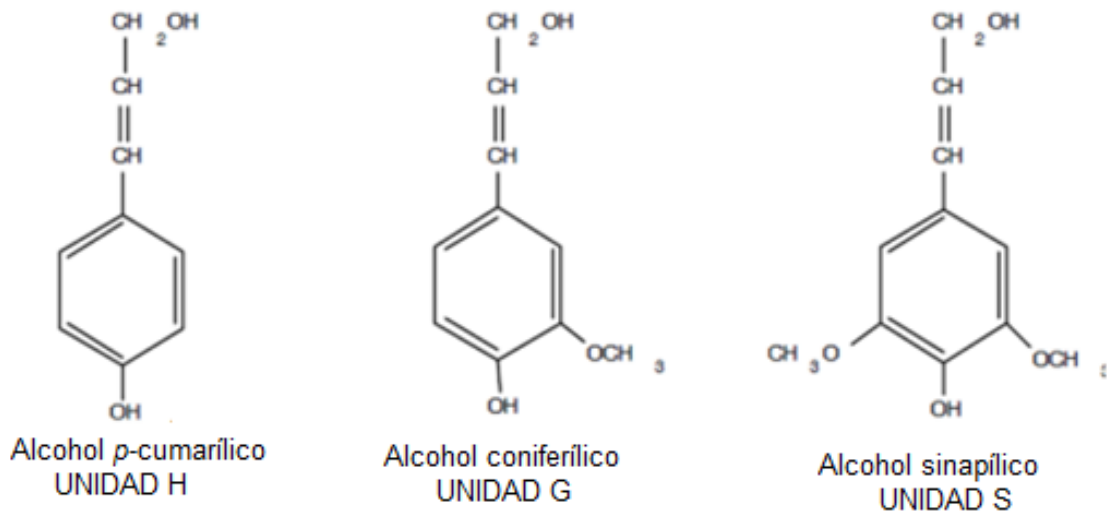


Figura 4. Alcoholes cinamílicos precursores de lignina

Fuente: Barroso, 2010

Las proporciones de las tres unidades varían entre especies, órganos vegetales e incluso entre las capas de la pared celular, cuyas unidades no parecen llevar un orden repetitivo (Taiz, 2006). El tipo de enlace mediante el cual están unidos puede ser éter, son los más frecuentes, carbono-carbono y tipo éster.

La lignina tiene una estructura ópticamente inactiva (Ralph *et al.*, 1999). Sin embargo, los dímeros de monolignoles denominados lignanos, tienen actividad óptica y biológica como antibacterial y/o antioxidante (Prinsen, 2010). Varios lignanos han sido identificados en extractos de algunas especies de cereales

como salvado de trigo (Smeds, *et al.*, 2007) y legumbres con hasta un 5% de estos compuestos (Ralph, 1999).

La lignina se puede clasificar según el grupo taxonómico:

Ligninas G (Ginospermas): formadas por unidades tipo G, las unidades S son menos frecuentes (relación S/G=1/10)

Ligninas G/S (Angiospermas leñosas): Incluyen la misma cantidad de unidades tipo G como tipo S.

Ligninas HGS (Angiospermas herbáceas): contienen los 3 tipos de unidades cuyas porciones son variadas en las diferentes especies.

Tabla 1. Porcentaje de los diferentes monolignoles presentes en la lignina para los diferentes tipos de plantas

Tipo de planta		Porcentaje (%)		
		<i>p</i> -cumarílico	Coniferílico	Sinapílico
Ginospermas	Coníferas (maderas suaves)	<5	<95	0
	Angiospermas			
	Eucotiledónias (maderas duras)	0-8	25-50	45-75
	Monocotiledónias (hierbas)	5-35	35-80	20-55

Fuente: Gellerstedt, 2008

1.3 Pretratamientos de material lignocelulósico

El pretratamiento es un proceso previo a la sacarificación al que se somete a la biomasa con la finalidad de remover la lignina para así reducir la cristalinidad de la celulosa y favorecer la obtención de azúcares fermentables después de la sacarificación.

Los pretratamientos pueden ser clasificados como biológicos, físicos, químicos y físico-químicos.

Físicos (Mecánico): El pretratamiento mecánico incrementa la superficie de contacto de la biomasa haciendo al sustrato más accesible a la hidrólisis enzimática, su principal desventaja es que no remueve la lignina (Zheng, 2009)

Físico-químicos (Explosión por vapor): tratamiento efectivo para maderas duras pero poco efectivo para suaves. La biomasa es tratada con vapor saturado a una temperatura de 160–260 °C (0.69–4.83 MPa), causando reacciones de autohidrólisis, donde la hemicelulosa y lignina son convertidos en oligómeros solubles (Cuervo *et al.*, 2009).

Químicos:

- a) **Ozonólisis:** Degrada la lignina mediante ozono, ataca principalmente a la lignina y a la hemicelulosa, no produce residuos tóxicos y no se requiere incrementar la temperatura ni la presión, el único inconveniente es el costo del ozono.
- b) **Hidrólisis ácida:** El ácido diluido solubiliza la hemicelulosa, exponiendo a la celulosa para su subsecuente sacarificación cuyo inconveniente principal es la generación de productos que inhiben la fermentación.
- c) **Alcalino:** El mecanismo de acción consiste en la saponificación de los enlaces éster entre la lignina y la hemicelulosa, provocando así su separación. Se provoca la disminución de la cristalinidad y la separación estructural entre lignina y carbohidratos y la desorganización de la estructura de lignina (Mussatto, 2010).

- d) **Alcalino-oxidante:** Disminuye la cristalinidad de la celulosa y el contenido de lignina. La deslignificación se lleva a cabo mediante la acción de oxidación por radicales peróxido y superóxido.
- e) **Organosolv:** Se utilizan disolventes orgánicos así como ácidos inorgánicos como catalizadores que rompen los enlaces de la lignina y la celulosa. La eliminación de los disolventes después del pretratamiento es necesaria, ya que inhiben a las enzimas encargadas de la hidrólisis así como a los microorganismos involucrados en la fermentación (Zhao *et al.*, 2009).

Biológicos: Los tratamientos biológicos, basados en el uso de hongos de putrefacción café, blanca y blanda se usan comúnmente para degradar la lignina, considerado un método barato y eficaz de deslignificación. Siendo los hongos de pudrición blanca (basidiomicetos) los más eficaces para el pretratamiento biológico de materiales lignocelulósicos (Fan *et al.*, 1987).

La degradación de la lignina por los hongos, permite un mejor acceso a la celulosa y hemicelulosa. Los principales problemas del uso de estos hongos es que pueden atacar a la celulosa y hemicelulosa. Las tres principales enzimas involucradas en la biodegradación son lignina peroxidasa, manganeso peroxidasa y lacasa. Éstas han ganado atención por sus aplicaciones en la industria para el blanqueo y depuración de los efluentes, degradación de compuestos fenólicos contaminantes, etc.

1.4. Enzimas Oxido-reductasas

Son un grupo de enzimas que catalizan reacciones redox, es decir la transferencia de electrones o sus equivalentes entre un donante y un receptor.

En general, las enzimas redox se clasifican en:

- Hidroxilasas: Favorecen la fijación de un grupo hidroxilo sobre uno de los átomos de carbono de un núcleo aromático.
- Deshidrogenasas: Catalizan la oxidación o reducción de un sustrato por sustracción o adición de dos átomos de hidrógeno (deshidrogenación).
- Oxidasas: Catalizan la reacción de óxido-reducción empleando oxígeno molecular (O_2) como agente de transferencia de electrones. En estas reacciones el oxígeno se reduce a agua (H_2O).

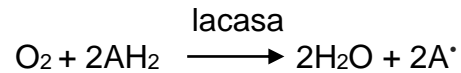
1.4.1. Lacasa

La lacasa es una fenol oxidasa extracelular producida por el micelio de basidiomicetos, ascomicetos y deuteromicetos, la cual usa al oxígeno molecular como oxidante (Bourbonnais, 1990).

Bioquímicamente, la lacasa es una enzima que oxida una variedad de compuestos aromáticos. Cataliza la sustracción de un electrón y un protón de hidroxilos fenólicos o de grupos amino aromáticos, para formar radicales libres fenoxilo y radicales amino, respectivamente. Este grupo de enzimas, posee cuatro átomos de cobre en su estado de oxidación $2+$ que les confieren una coloración azul (Dávila, 2006).

Esta enzima oxida no solamente ácidos fenólicos y metoxifenólicos, sino que también los descarboxila (Agematu et al., 1993) y ataca sus grupos metoxilo mediante la desmetilación (Leonowicz et al., 1984) o desmetoxilación (Potthast et al., 1995).

La reacción enzimática se muestra a continuación:



Los mejores productores de esta enzima son los hongos ligninolíticos. Algunos estudios reportan que la lacasa es eficaz en la deslignificación de maderas y otros materiales que suele ser usada en la producción de papel o bien recientemente para pretratar material lignocelulósico en la producción de etanol.

1.4.2. Peroxidasa de rábano (Horseradish peroxidase, HRP)

Actualmente la peróxidasa de rábano (HRP) se produce del rábano picante (*Armoracia rusticana*). La HRP es una enzima muy utilizada para catalizar reacciones orgánicas y es producida a gran escala, además se emplea para bioensayos en inmunología.

Esta enzima cataliza la reacción de oxidación vía radicales mediante H_2O_2 , esta reacción puede expresarse con la siguiente ecuación donde AH_2 es el sustrato y AH^\bullet es el radical generado. Dentro de los sustratos más comunes se encuentran compuestos fenólicos, índoles, aminas y sulfonatos (Nigel, 2008).



La peroxidasa se emplea para el tratamiento industrial de aguas contaminadas: por ejemplo, los fenoles pueden eliminarse mediante su polimerización catalizada mediante la peroxidasa de rábano.

Existen algunas peroxidasas (ligninaperoxidasa y Manganese peroxidasa) que se encuentran en hongos capaces de depolimerizar la lignina, dichas enzimas comparten la estructura del grupo prostético férrico presente en su sitio activo cuyas diferencias se encuentran en los sustratos (Dávila, 2006)

1.5. Bagazo de caña, pasto Taiwán y privilegio

Bagazo de caña: Es un residuo de la caña que se produce como consecuencia de la fabricación de azúcar y constituye un subproducto de esta industria. Es un material fibroso, heterogéneo en cuanto a su composición granulométrica y estructural, dentro de sus usos, el más común es como combustible en las calderas en las fábricas azucareras. Puesto que se trata de un residuo agroindustrial, tiene un gran potencial de ser empelado como materia prima para producir bioetanol. Por esta razón es importante realizar estudios sobre este material lignocelulósico.

Pasto privilegio (*Panicum maximun*): Como su nombre lo indica, se trata de un pasto. Es una de las especies más comunes en el paisaje cultural del trópico mexicano. Su hábitat son campos y lugares abandonados así como orillas de caminos y lagunas. Se distribuye principalmente al Oeste de México en zonas tropicales de julio a diciembre. Se propaga por semillas, es registrado como maleza en arroz, caña, frutales, maíz, sorgo y tomate, especialmente molesto en caña porque tolera la sombra (Villaseñor *et al.*, 1998). Se cultiva en regiones cálidas y es una de las especies forrajeras importantes del trópico.

Pasto Taiwán (*Pennisetum purpureum*): Es otra especie de pasto, es una planta perene que se desarrolla en terrenos de 0 a 120 m sobre el nivel del mar, produce forraje todo el año en zonas libres de heladas, se adapta a una amplia diversidad de suelos con excepción de los inundables y faltos de sales. Crece en el Oeste de México a lo largo de todo el año, principalmente de Diciembre a Mayo (McVaugh, 1983).

Es considerado forraje de producción sobresaliente y es utilizado en el pastoreo (UGRJ, 2014). Algunos autores lo describen como maleza de frutales (Villaseñor *et al.*, 1998).



Figura 5. Materiales lignocelulósicos empleados en el presente trabajo

Estos pastos, son especies colonizadoras y se podría considerar su crecimiento como cultivo energético. Por lo que representan una gran oportunidad para producir etanol de segunda generación.

1.6. Actividad Antioxidante

Existen además de las vitaminas E, A y C, que son más comúnmente conocidas por su excelente actividad antioxidante, otras sustancias presentes en plantas como son carotenoides, flavonoides, taninos y algunos compuestos fenólicos simples cuyo efecto antioxidante se ha estudiado recientemente.

Dentro de dichos compuestos fenólicos simples se ha encontrado que algunos precursores de lignina (ácido p-cumarílico, ácido sinápico), algunos compuestos presentes en el entrecruzamiento de lignina y polisacáridos (ácido ferúlico), así como sus formas oxidadas (vainillina), cuya actividad al ser comparada con la vitamina C es casi equivalente e incluso del doble (Tabla 2)

Tabla 2. Actividad antioxidante de diferentes compuestos con respecto al ácido ascórbico

Compuesto	Actividad antioxidante (AA)*	Compuesto	Actividad antioxidante (AA)*
Ácido ascórbico	1.00	Ácido gálico	3.02
Trolox®	1.03	Ácido p-cumárico	1.81
Tocoferol	0.99	Ácido caféico	1.14
Glutación	0.97	Ácido ferúlico	1.94
Cisteína	0.65	Ácido siríngico	1.15
Fenol	0.50	Ácido vainillínico	0.76
Guayacol	1.47	Ácido sinapínico	2.10
Catecol	1.10	n- propilgalato	1.90
Resveratrol	2.34	Quercetina	4.30

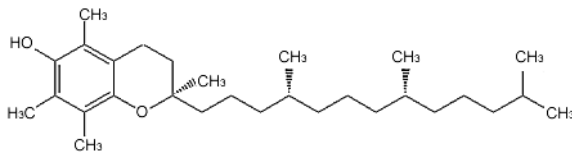
*Valores expresados como $AA_{\text{compuesto}} / AA_{\text{ácido ascórbico}}$ que es la relación referida a la actividad antioxidante del ácido ascórbico. Error aproximado al 4%

Fuente: Arnao et al., 1999.

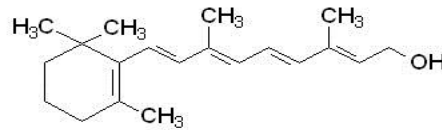
Los antioxidantes son compuestos que pueden inhibir o retardar la oxidación de otras moléculas evitando la iniciación o propagación de una reacción que se da

en cadena vía radicales libres (Arnao et al., 1999). En la actualidad han tomado cierta importancia, ya que en el caso de los alimentos, al menos en el cuerpo humano previene enfermedades cardiovasculares, algunos tipos de cáncer, disfunciones neurológicas, manchas de la piel relacionadas a la edad, entre otras (Frei, 1994; Mackerras, 1995; Schwartz 1996).

a)



b)



c)

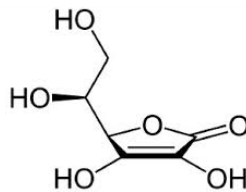


Figura 6. Estructuras de las vitaminas E (a), A (b) y C (c), de gran valor por su capacidad antioxidante entre otros de sus beneficios

Fuente: Illiera et al., 2000

Algunas aplicaciones de los compuestos antioxidantes extraídos son enriquecer los alimentos para hacerlos funcionales, adicionarlos a cosméticos para ayudar a evitar la oxidación de piel y retardar el envejecimiento o bien adicionarlos a pinturas para ayudar al mantenimiento del color y evitar la decoloración por corrosión con oxígeno, agua, entre otros.

1.7. Actividad antimicrobiana.

Las sustancias antimicrobianas son aquellas que interfieren en el funcionamiento del microorganismo ya sea en la síntesis de sus ácidos nucleicos, de proteínas, o para el procesamiento de aminoácidos o azúcares del medio. Los cuales son necesarios para la biosíntesis de sus paredes o membranas celulares, estas sustancias pueden ser (Molina, 2011):

Bactericida: Causa la muerte del microorganismo.

Bacteriostático: Inhibe el desarrollo del microorganismo.

Recientemente ha habido gran interés de la producción de compuestos con capacidad antimicrobiana, provenientes de extractos de plantas, ya que se ha encontrado que muchos de los productos naturales que se utilizaban tradicionalmente para curar enfermedades, contienen compuestos con efectiva actividad antimicrobiana.

Los derivados fenólicos ejercen su actividad antimicrobiana al lesionar las membranas plasmáticas que contienen lípidos, lo que determina la pérdida del contenido celular

Uno de los compuestos fenólicos utilizados con más frecuencia forma parte del grupo de los cresoles. Un cresol muy importante es el O-fenilfenol, el principal componente de la mayoría de las fórmulas de Lysol®. Los cresoles son muy buenos desinfectantes de superficie.

Los bisfenoles son derivados de fenol que contienen dos grupos fenólicos unidos por un puente entre los cuales destacan el hexaclorofeno utilizado para el control microbiano de procedimientos quirúrgicos y hospitalarios y el triclosan un componente de los jabones antibacterianos el cual inhibe una enzima necesaria para la biosíntesis de lípidos que ataca principalmente a bacterias Gram positivas, pero también a Gram negativas (Tortora *et al.*, 2007)

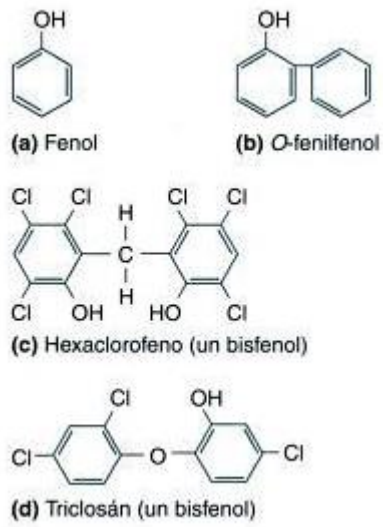


Figura 7. Estructura de los derivados fenólicos y de los bisfenoles

Fuente: Tortora *et al.*, 2007.

Capítulo 2. Objetivos e hipótesis

2.1 Objetivo General

Realizar la deslignificación enzimática de materiales lignocelulósicos (pasto Taiwán, privilegio y bagazo de caña) para promover su sacarificación.

2.1.1 Objetivos particulares

- Evaluar si un pretratamiento biológico basado en enzimas oxido-reductasas permite la deslignificación de algunos materiales lignocelulósicos como pastos y bagazo de caña.
- Realizar una sacarificación de los materiales pretratados con la finalidad de obtener azúcares fermentables a bioetanol y evaluar las condiciones que permiten una mejor respuesta.
- Evaluar si la disolución resultante de la deslignificación enzimática presenta actividad antioxidante y/o antimicrobiana.

2.2 Hipótesis

- Si un material lignocelulósico se somete a un tratamiento mediante la oxidación de la lignina por oxido-reductasas entonces la celulosa y hemicelulosa quedan más expuestas al ataque de las celulasas obteniendo un incremento de azúcares fermentables después de la sacarificación.
- Si los precursores de lignina son compuestos fenólicos con propiedades antioxidantes y algunos compuestos fenólicos tienen poder antimicrobiano, entonces los derivados de lignina obtenidos de las reacciones de oxidación catalizadas por lacasa y HRP presentan actividad antioxidante y/o antimicrobiana.

Capítulo 3. Metodología.

La parte experimental de este proyecto se dividió en varias etapas, primeramente se determinó la actividad enzimática de las enzimas que se emplearon, para después usarlas como agentes redox con los materiales lignocelulósicos. En la figura 8 se puede observar el diagrama general de la metodología empleada en la caracterización de las diferentes enzimas. Los disolventes utilizados fueron grado reactivo y la concentración de H_2O_2 se estandarizó utilizando como coeficiente de extinción molar $\epsilon = 40 M^{-1}cm^{-1}$ a 240 nm.

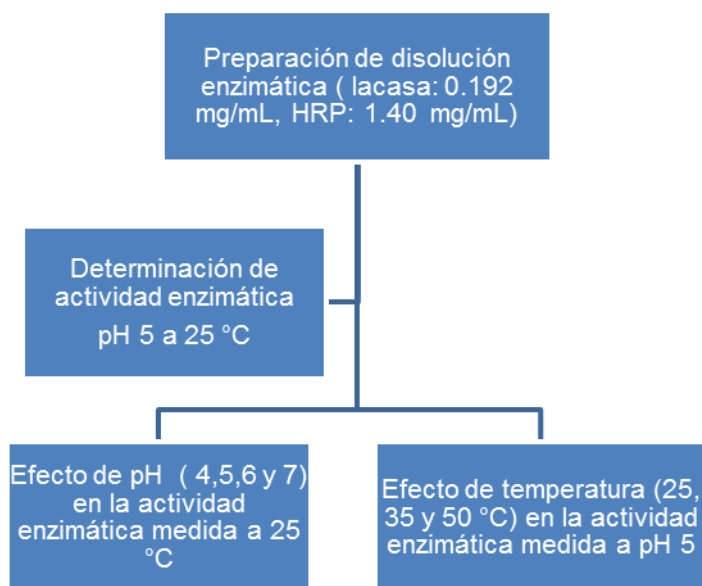


Figura 8. Diagrama general de la metodología experimental para determinar la actividad enzimática de lacasa y HRP

Posteriormente se evaluó el efecto de las enzimas al utilizarlas como agente redox en la deslignificación, seguido de una sacarificación, donde se cuantificó el incremento de azúcares totales y reductores. Finalmente se evaluó la actividad antioxidante y antimicrobiana de la disolución resultante de la deslignificación (Figura 9)

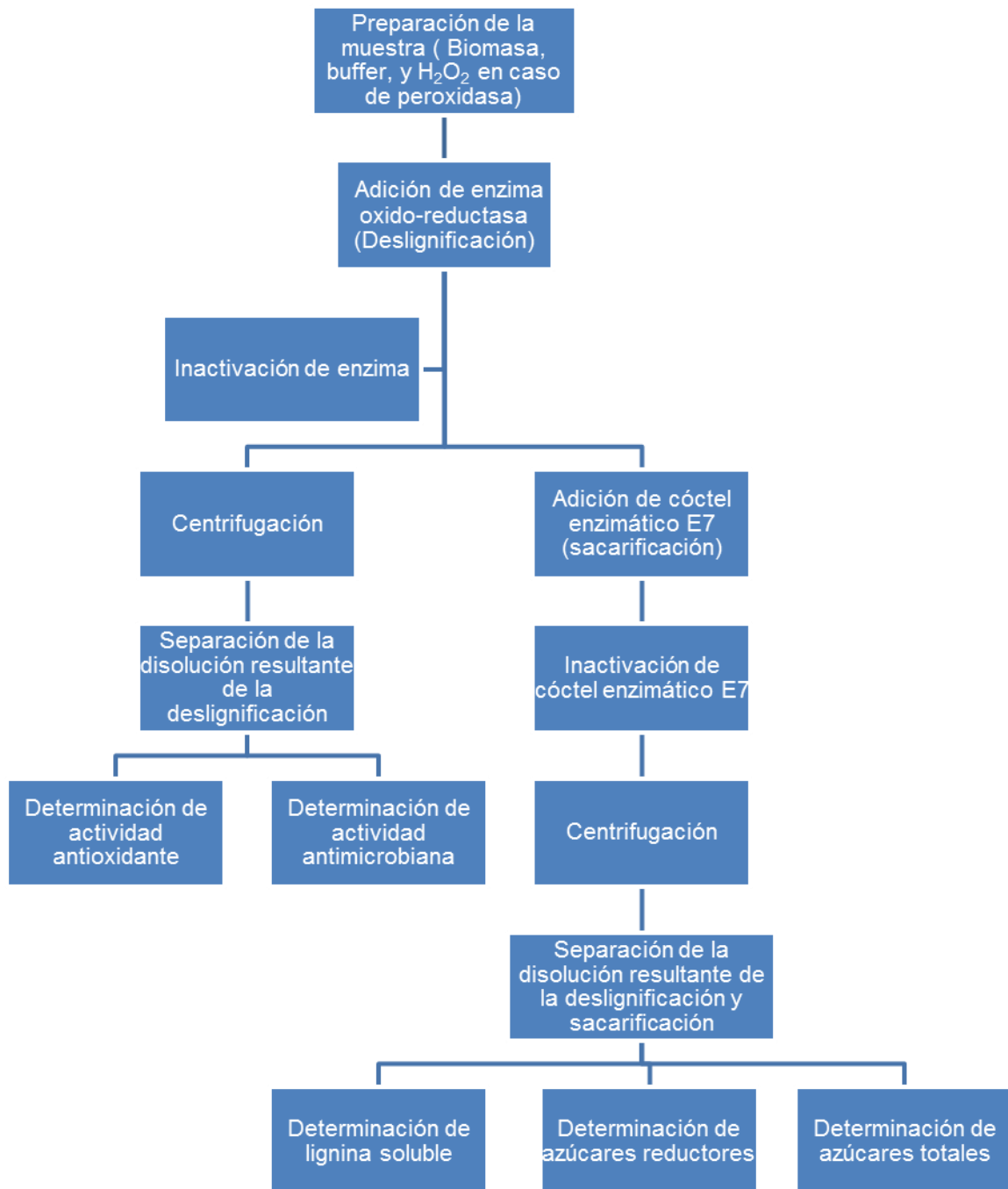


Figura 9. Diagrama general de la metodología experimental del pretratamiento, sacarificación y evaluación disoluciones generadas

3.1. Actividad enzimática lacasa

La actividad de la lacasa proveniente del organismo *T. versicolor* marca Sigma Aldrich se determinó utilizando una concentración 0.192 mg/mL de enzima, ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin)-6-sulfónico (ABTS) como sustrato a 1 mM en buffer de acetatos pH 5, 0.1 M, a 25 °C. La absorbancia se midió a 420 nm utilizando como coeficiente de absorción molar $\epsilon=36,000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (Jiménez ,1999). La actividad en unidades internacionales se calculó asumiendo 1 UI como la cantidad de enzima que cataliza la oxidación de 1 mmol de ABTS por minuto (mmol/min*mg E).

3.1.1. Actividad enzimática HRP

La actividad de la HRP se determinó empleando una concentración de 1.40 mg/mL de enzima, ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin)-6-sulfónico (ABTS) como sustrato 1 mM, H₂O₂ 145 µM, en buffer de acetatos pH 5, 0.1 M, a 25 °C. La absorbancia se midió a 420 nm utilizando como coeficiente de absorción molar $\epsilon=36,000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (Jiménez ,1999). La actividad en unidades se calculó asumiendo 1 U como la cantidad de enzima que cataliza la oxidación de 1 mmol de ABTS por minuto (mmol/min*mg E).

3.1.2. Efecto de temperatura y pH sobre la actividad enzimática.

Para cada enzima, se realizaron los ensayos para determinar la su actividad a diferentes temperaturas: 25, 35 y 50 °C, dejando fijo el pH a 5 con buffer de acetatos. Para la evaluación de efecto de pH, se determinó la actividad enzimática a pH 4, 5, 6 y 7 utilizando para pH 4 y 5 buffer de acetatos 0.1M y para pH 6 y 7 buffer de fosfatos 0.05M dejando fija la temperatura a 25 °C. Cabe señalar que no fue posible determinar la actividad de la enzima lacasa a un valor de pH de 7 a la concentración mencionada, se utilizó 5 veces más concentrada.

3.2. Evaluación de la deslignificación enzimática mediante diseño de experimentos

Mediante un diseño de experimentos factorial completo 2^3 para cada enzima, se evaluó el efecto de la variación de 3 factores de respuesta. Las variables de respuesta medidas fueron; el contenido de azúcares reductores, azúcares totales y lignina, todas cuantificadas por duplicado.

En el caso del pretratamiento con enzima lacasa siguiendo el diseño factorial 2^3 se evaluó el efecto de la variación del porcentaje de sólidos, cantidad de enzima y tiempo de reacción expuestos en variables codificadas. Los tiempos que se utilizaron fueron 1 h lacasa junto con el cóctel E7, 30 y 60 min sólo lacasa.

Tabla 3. Condiciones del pretratamiento con enzima lacasa, para el diseño factorial 2^3 según las variables codificadas.

Variable codificada	Porcentaje de sólidos	Tiempo previo a adición de E7(min)	Cantidad de enzima (mL*)
-1	5	0	0.5 (1.365 UI)
0	10	30	1(2.730 UI)
1	15	60	1.5 (4.09 UI)

(*) La solución enzimática de la que se partió fue a una concentración de 0.192 mg/mL

Además del diseño factorial completo 2^3 , se elaboró un diseño simplex evaluando 3 puntos, fijando el porcentaje de sólidos a 10, los detalles se muestran en el análisis de resultados sección, haciendo sólo una variación de tiempo y una de cantidad de enzima.

Tabla 4. Condiciones del pretratamiento con enzima lacasa, para el diseño simplex según las variables codificadas

Variable codificada	Tiempo previo a adición de E7(min)	Cantidad de enzima (mL*)
-1.5	---	0.25 (682.5 x10 ⁻³ UI)
-1	---	0.5 (1.365 UI)
1	60	---
1.5	90	---

(*) La solución enzimática de la que se partió fue a una concentración de 0.192 mg/mL

Con la enzima HRP se evaluó el efecto del cambio de concentración de H₂O₂, tiempo de reacción y cantidad de enzima, dejando fijo el porcentaje de sólidos a 10.

Tabla 5. Condiciones del pretratamiento con enzima HRP, para el diseño factorial 2³ según las variables codificadas

Variable codificada	Concentración de H ₂ O ₂ (µM)	Tiempo previo a adición de E7(min)	Cantidad de enzima (mL)
-1	145	30	0.0625 (15.66 x10 ⁻³ UI)
0	289	90	0.343 (86.14 x10 ⁻³ UI)
1	433	150	0.75 (187.92 x10 ⁻³ UI)

(*)La solución enzimática de la que se partió fue a una concentración de 0.232 mg/mL

3.2.1. Pretratamiento con enzimas lacasa

Se pesaron 0.5 g de pasto Taiwán tamiz 40, se colocaron en un reactor de vidrio y se le adicionó el volumen de buffer de acetatos 0.1M pH 5, necesario para que el porcentaje de sólidos fuera el requerido según el diseño de experimentos. Se usó un sistema de agitación mecánica usando una propela de dos paletas a 180 rpm y se calentó a 50 °C. Una vez homogénea la muestra y alcanzada la temperatura, se adicionó el volumen de la disolución de enzima lacasa y se dejó actuar el tiempo, correspondiente al diseño de experimentos. Al concluir dicho tiempo de reacción, la enzima se inactivo introduciendo el reactor a un baño de agua a ebullición por 5 minutos.

3.2.2. Pretratamiento con enzima HRP

Se pesaron 0.5 g de pasto Taiwán tamiz 40, se colocaron en un reactor de vidrio y se le adicionó el volumen de buffer de acetatos 0.1M pH 5, necesario para que el porcentaje de sólidos fuera el requerido según el diseño de experimentos. Se usó un sistema de agitación mecánica usando una propela de dos paletas a 180 rpm y se calentó a 50 °C.

Una vez homogénea la muestra y alcanzada la temperatura, se adicionó el volumen de la disolución de enzima HRP, la concentración de H₂O₂ y se dejó actuar cierto tiempo, ambos según lo correspondiente al diseño de experimentos. Al concluir dicho tiempo de reacción, la enzima se inactivo introduciendo el reactor a un baño de agua a ebullición por 5 minutos.

3.2.3. Sacarificación

LA disolución con la biomasa resultante del pretratamiento de la enzima oxido-reductasa, se colocó un el sistema de calentamiento con agitación a 180 rpm. Al alcanzar los 50 °C se adicionó el cóctel enzimático E7 y se dejó actuar 1 h, posteriormente la enzima se inactivó con agua a ebullición por 5 min. La disolución resultante se centrifugó a 12000 rpm durante 10-15 min y se recuperó.

El control corresponde al material sacarificado a las mismas condiciones y sin pretratar, por lo que en el caso de los pretratamientos con enzima lacasa se realizaron tres controles (5, 10 y 15 % de sólidos). Por otra parte y para conocer la contribución neta de los azúcares solubles del material, se realizó un lavado con agua y agitación por 10 min a la biomasa sin pretratar y se determinaron los azúcares reductores y totales, los cuales fueron restados a los obtenidos después de la sacarificación.

3.2.4. Determinación de azúcares totales (AT). Método fenol-sulfúrico

Los carbohidratos en presencia de un medio ácido concentrado, se hidrolizan y se deshidratan dando lugar a la formación de furfural e 5-hidroxiacetilfurfural que al reaccionar con el fenol forman los compuestos coloridos que pueden ser leídos en una longitud óptica específica. En el caso de las hexosas, el color naranja de la reacción debe ser leído a una longitud de onda de 490 nm.

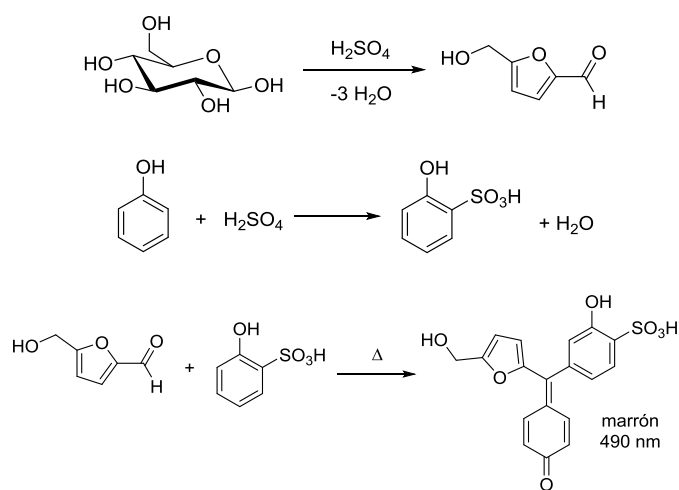


Figura 10. Reacciones que se llevan a cabo por el método fenol-sulfúrico

Para su determinación se tomó 1 mL de la disolución diluida y se adicionó 1 mL de una disolución de fenol al 5 % (p/v), se mezcló y posteriormente se agregan 5 mL de ácido sulfúrico concentrado, se homogenizó con vórtex. Se dejó enfriar la mezcla a temperatura ambiente y se determinó la absorbancia a 490 nm frente al blanco. Se calculó la concentración de azúcares presentes en la

muestra a partir de la absorbancia comparada con una curva patrón preparada en concentraciones de 10 a 100 µg/mL de glucosa.

3.2.5. Determinación de azúcares reductores (AR). Método DNS

El grupo aldehído presente en la glucosa reduce al grupo nitro del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) en condiciones básicas para producir el ácido 3-amino-5-nitrosalicílico (compuesto de color rojo) cuyo cambio de tonalidad es observado espectrofotométricamente a una longitud de 540 nm.

Se tomó 1 mL de la muestra acuosa diluida se adicionó 1 mL de una solución de reactivo DNS directamente en la muestra, se homogeneizó con vórtex, se calentó por 5 minutos en un baño de agua a ebullición, se enfrió hasta temperatura ambiente y finalmente se diluyó con 8 mL de agua destilada. Se determinó la absorbancia a 540 nm frente al blanco. Se calculó la concentración de azúcares reductores presentes en la muestra a partir de una curva patrón en concentraciones de 100 a 1000 µg/mL de glucosa.

3.2.6. Determinación de lignina soluble (LS)

La lignina soluble se determinó en un intervalo de 0-1 h después de centrifugar la disolución resultante del pretratamiento y sacarificación. En un UV-visible, se midió la absorbancia de una alícuota de la disolución recuperada, utilizando agua como blanco de tal forma que el valor de la absorbancia estuviera dentro del intervalo de 0.7-1. La longitud de onda a la que se midió fue de 320 nm para los pastos y 240 nm para bagazo de caña.

La ecuación utilizada para cuantificar el contenido de lignina soluble, fue la siguiente:

$$\% \text{LSA} = \frac{A \cdot V}{\epsilon \cdot m \cdot l} \times 100$$

Dónde:

A = absorbancia

v = volumen recuperado (L)

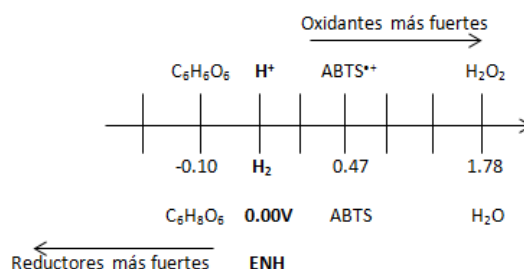
ϵ = coeficiente de absorción (para pastos 30 L/g*cm, para bagazo de caña 25 L/g*cm)

m = masa en base seca (g)

l = ancho de la celda (1 cm)

3.2.7 Actividad Antioxidante

El radical $ABTS^{•+}$ es un compuesto color verde azulado que se genera a partir de la oxidación de ABTS por H_2O_2 en condiciones ácidas y se mide su absorbancia a 420 nm. La actividad antioxidante se define como la capacidad de un compuesto para evitar o retardar la oxidación de algún sustrato, en este caso la actividad antioxidante se midió como la concentración de ABTS cuya oxidación se logró evitar, debido a la presencia de los compuestos presentes en la disolución obtenida de los diferentes pretratamientos.



Para la oxidación de ABTS con peróxido de hidrógeno, ambos se adicionaron en concentración de 2 mM. Las disoluciones de estudio fueron las resultantes de los pretratamientos de pasto Taiwán, privilegio y bagazo de caña con las diferentes enzimas y la cantidad de jarabe fue adicionado en diferentes concentraciones v/v (1, 5, 10, 20 y 40 %). La reacción se llevó a cabo durante 1 h en tubos color ámbar a temperatura ambiente en buffer de acetatos 30 mM pH 3.6. La absorbancia se midió a 420 nm utilizando como coeficiente de absorción molar $\epsilon = 36,000 M^{-1}cm^{-1}$ (Jiménez 1999).

Como control se utilizó una disolución con la misma concentración de ABTS y peróxido de hidrógeno. Se realizó un blanco para cada concentración de la disolución resultante de los pretratamientos utilizando ABTS con la misma concentración y buffer.

Fórmula para calcular la actividad antioxidante:

$$\%AA = \frac{ABTS\ control - ABTS\ con\ jarabe}{ABTS\ control} \times 100$$

Fórmula para calcular la actividad Oxidante:

$$\%AA = \frac{ABTS\ jarabe - ABTS\ control}{ABTS\ jarabe} \times 100$$

3.2.8. Actividad antimicrobiana

Se probaron las disoluciones resultantes de los pretratamientos de pasto Taiwán, privilegio y bagazo de caña con las diferentes enzimas, frente a una bacteria Gram positiva (*Staphylococcus aureus*) y una Gram negativa (*Escherichia coli*) procedentes de cepas aisladas por la Facultad de medicina de la UNAM con las claves 10428 y 44821 respectivamente. Las cepas se mantuvieron en medio sólido a temperatura de refrigeración de 4°C. Se midió la capacidad de inhibición de las disoluciones resultantes de los pretratamientos sobre las bacterias mediante la técnica Kirby-Bauer y se cuantificó por densidad óptica la concentración mínima inhibitoria (CMI) y el porcentaje de inhibición.

La fórmula utilizada para calcular el % de inhibición fue:

$$\% \text{ inhibición} = \left(1 - \frac{A}{Ac} \right) \times 100$$

Dónde:

Ac= absorbancia del control

A= absorbancia del caldo nutritivo con disolución resultante de cada pretratamiento.

Como control se incubó un tubo con la misma concentración de la cepa a las mismas condiciones.

3.2.8.1. Antibiograma por difusión “Técnica de Kirby-Bauer”

Se empleó el método de difusión en discos conocido como “técnica Kirby-Bauer”. Para la activación de los microorganismos se aislaron las bacterias en agar nutritivo marca Difco™, preparado según especificaciones del fabricante y esterilizado en autoclave a 121 °C y 1 atmósfera durante 15 min y mediante la técnica de agotamiento de muestra por estría, en cajas de petri servidas con un espesor de agar de 25 mL e incubadas por un tiempo de 18 h. a 37 °C. Después del tiempo de incubación, con ayuda de una asa microbiológica estéril se tomaron 2 a 5 colonias y se suspendieron las bacterias en solución salina NaCl al 0.85 % hasta alcanzar la turbidez comparable con el patrón de 0.5 unidades en la escala de Mcfarland, de manera cualitativa. Para el ensayo de actividad se empleó agar nutritivo servido en cajas de petri, a las que se les adicionó 100 µL de la suspensión ajustada de cada bacteria indicadora, se emplearon discos estériles de 6 mm de diámetro los cuales fueron impregnados con la disolución resultante de cada pretratamiento diluida. Posteriormente las cajas de petri se incubaron a 37 °C por 18 horas; los ensayos se realizaron por triplicado. Como controles se utilizaron etanol y acetona.

El halo se definió de la siguiente manera:

Halo de inhibición = $(dt - dd)$

Dónde:

dt= diámetro total del halo

dd= diámetro del disco

3.2.8.2. Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) y porcentaje de inhibición mediante densidad óptica

Se tomaron tubos de ensayo que contenían caldo nutritivo Difco™, preparado según especificaciones del fabricante. A cada uno de ellos se le añadió una cantidad de disolución del pretratamiento de manera de obtener diluciones dobles y progresivas del agente de sospecha antimicrobiano (1000, 500, 100, 50 y 10 µL). Los tubos se inocularon con 500 µL para *E.coli* y 500 µL para *S. aureus* de una suspensión de bacterias con turbidez comparable con el patrón 0.5 de Mcfarland, se incubaron durante 22 h horas a 37 °C. A uno de los tubos no se le adicionó jarabe y sirvió como control de desarrollo. Transcurrido el tiempo se observó la CMI es decir la concentración en la que visualmente parecía no haber turbidez y se midió el crecimiento de células por densidad óptica mediante UV-vis, la absorbancia se leyó a 600 nm y con base en esta lectura se calculó el porcentaje de inhibición.

Capítulo 4. Resultados y discusión

4.1. Caracterización de enzimas

4.1.1. Efecto de pH sobre la actividad enzimática de lacasa y HRP

En la caracterización de las enzimas, en lo referente al pH se observa que la actividad específica de la enzima lacasa aparentemente presenta una disminución poco pronunciada en los valores de pH de 4 a 6, observándose una disminución importante en un valor de pH de 7.0 (Figura 11). La variación entre pH de 4 a 6 puede asociarse al error experimental (Tabla A 1, mostrada en el anexo). Por esta premisa, se realizó el análisis de varianza para estos 3 valores de pH (Tabla A 3). Los resultados muestran que a valores de pH 4, 5 y 6 la actividad no es significativamente diferente. En el caso de pH 7 la enzima pierde casi toda su actividad.

Se ha reportado en la base de datos BRENDA que los pH óptimos para la enzima proveniente de *Trametes versicolor* son 3, 4.5 y 5, encontrándose los dos últimos dentro del rango en el cual la enzima utilizada muestra mayor actividad.

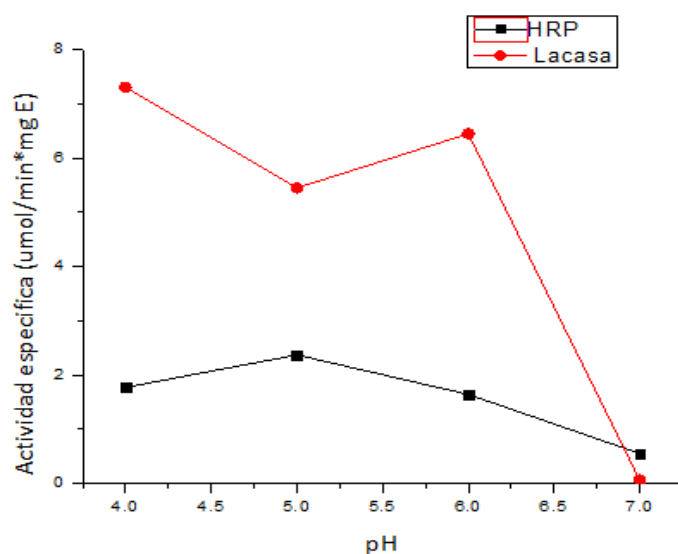


Figura 11. Efecto del pH sobre la actividad enzimática de lacasa y HRP, medido a 25 °C

En cuanto a HRP, después de realizar el análisis de varianza ANOVA (tabla A 4) se encontró que hay diferencia significativa entre los valores obtenidos de la actividad específica en cada valor de pH. Se observa que el pH óptimo es 5 (Figura 11), mientras que su actividad disminuye a un pH de 7. Esta información, nos hace descartar la posibilidad de trabajar a dicho valor de pH para ambas enzimas en el presente trabajo.

4.1.2. Efecto de Temperatura sobre la actividad enzimática de lacasa y HRP

La temperatura en la que la enzima lacasa presentó mayor actividad fue de 50°C (figura 12), mientras que a temperaturas de 25 y 35°C su actividad fue aparentemente semejante. Se realizó una ANOVA en estas temperaturas y se encontró que no había diferencia significativa (Tabla A 5). De acuerdo a BRENDA, las temperaturas óptimas para esta enzima son de 25, 30 y 50 °C, por lo que podríamos decir que la enzima estudiada es semejante a aquella cuya temperatura óptima es de 50 °C.

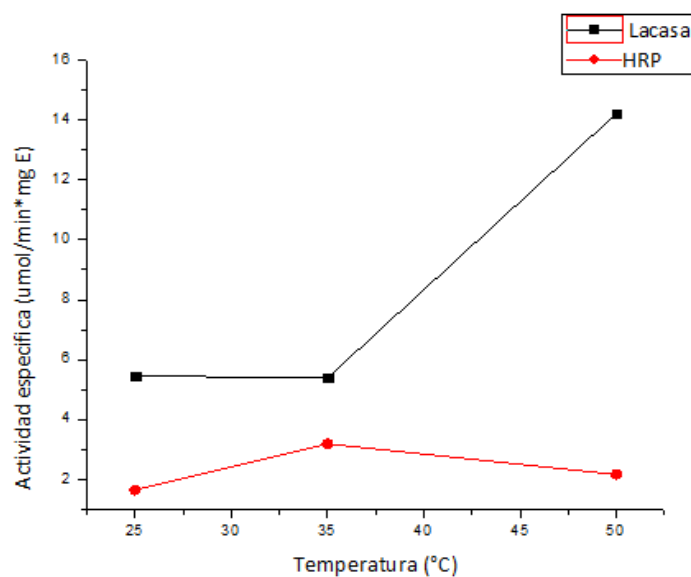


Figura 12. Efecto de temperatura sobre la actividad enzimática de lacasa y HRP, medido a pH 5

En cuanto a HRP, después de realizar el análisis de varianza ANOVA (tabla A 6) se encontró que hay diferencia significativa entre los valores obtenidos de la actividad específica a cada temperatura. Se puede observar que a medida que se aumentó la temperatura de 25 a 35 °C también incrementó su actividad (figura 12), y al incrementar la temperatura a 50 °C la actividad disminuyó. Por esto se puede decir que dentro de las temperaturas estudiadas la óptima es de 35°C. El valor de temperatura óptima que reportan para HRP es de 30°C (BRENDA).

Con base en los resultados obtenidos en la caracterización, se establecieron las condiciones para la siguiente parte del trabajo. Se decidió trabajar a pH 5, que además es el valor al cual el coctel enzimático que se utiliza para la sacarificación (E7) presenta alta actividad. En cuanto a la temperatura, en el presente estudio se decidió dejar fija una temperatura y se eligió trabajar a 50°C ya que las celulasas y la lacasa presentan una mayor actividad a esta temperatura.

4.2. Deslignificación y sacarificación enzimática de los materiales lignocelulósicos

4.2.1. Tratamiento de pasto Taiwán con enzima lacasa

Para la evaluación del pretratamiento de pasto Taiwán con enzima lacasa, se realizó un diseño de experimentos factorial completo 2 niveles y 3 puntos centrales. Las variables utilizadas para el dominio experimental fueron el contenido de sólidos (%), la cantidad de enzima (mL), y el tiempo (min) y las variables de respuesta fueron % de AT, AR y lignina soluble (LS). Los resultados encontrados en este diseño experimental se muestran en la tabla 6.

Tabla 6. Diseño experimental de la sacarificación de pasto Taiwán pretratado con lacasa.

	Enz (mL)	Tiempo de deslignificación (min)	Contenido de sólidos (%)	%AR	%AT	%LS
1	0	0	0	11.09±0.0	40.44±0.0	0.45±0.0
				0	0	0
2	-1	1	-1	13.72±0.0	23.73±0.4	0.27±0.0
				8	9	0
3	1	-1	1	2.75±0.08	10.96±0.0	0.27±0.0
					6	0
4	0	0	0	10.74±0.2	41.58±0.0	0.48±0.0
				4	8	0
5	0	0	0	10.91±0.2	42.00±0.1	0.47±0.0
				4	7	0
6	-1	1	1	11.52±0.0	17.28±0.1	0.23±0.0
				0	4	0
7	1	1	1	10.21±0.1	16.93±1.0	0.22±0.0
				9	2	0
8	-1	-1	-1	5.63±0.09	7.73±0.32	0.57±0.0
						0
9	-1	-1	1	8.47±0.09	11.15±0.0	0.26±0.0
					7	0
10	1	1	-1	6.66±0.22	19.69±0.0	0.30±0.0
					0	0
11	1	-1	-1	13.63±0.1	13.75±0.1	0.30±0.0
				8	9	0

Nota: Las condiciones correspondientes a las variables codificadas están descritas en la metodología (página 24)

El efecto de los factores sobre la concentración de AR, AT y LS, se analizó empleando el programa STATISTICA versión 10.0 con un intervalo de confianza del 95%. Los resultados del análisis de varianza (ANOVA) se encuentran en el anexo C. Los valores mostrados en rojo son aquellos que tienen un impacto significativo en la respuesta y aquellos que no, se presentan en negro. Para evaluar el efecto de los factores sobre las respuestas medidas se generaron las gráficas correspondientes a un modelo con triple interacción entre los efectos ($\gamma = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \beta_3 x_3 + \beta_{123} x_1 x_2 x_3$) mostradas a continuación.

Tabla 7. Coeficientes de correlación del modelo $\gamma = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \beta_3 x_3 + \beta_{123} x_1 x_2 x_3$, donde x_1 = cantidad de enzima (mL), x_2 =tiempo (min) y x_3 =contenido de sólidos (%)

Coeficiente	%AR	%AT	%LSA
B₀	9.07±0.06	15.15±0.28	0.30±0.00
B₁	-0.76±0.06	0.18±0.28	-0.03±0.01
B₂	1.45±0.06	4.25±0.28	-0.05±0.00
B₃	-0.84±0.06	-1.07±0.28	-0.06±0.00
B₁₂	1.33±0.06	-1.28±0.28	0.03±0.00
B₁₃	-0.99±0.06	-0.31±0.28	0.03±0.00
B₂₃	1.17±0.06	-1.23±0.28	0.03±0.00
B₁₂₃	2.43±0.06	1.24±0.28	-0.04±0.00

Finalmente, para comprobar la idoneidad del modelo se realizaron las gráficas de valor normal vs residuos, valores predichos vs observados y residuos vs predichos correspondientes al diseño de experimentos, mostrados en el Anexo C.

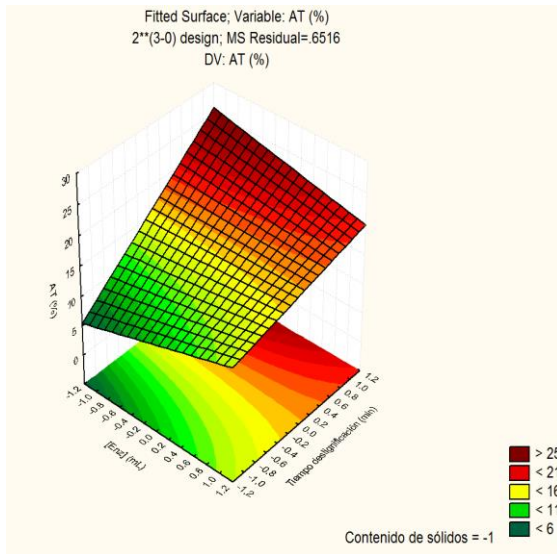
Las gráficas de valor normal vs valor residual muestran para AT un dato atípico, es decir un valor que está arriba de 3 veces \pm la desviación estándar, en AR se encuentran dos datos atípicos y en lignina también se muestran dos datos atípicos.

Las gráficas de residuos contra predichos en los tres casos (AT, AR y LS) no muestran ningún patrón repetido, lo que comprueba la hipótesis de linealidad y homocedasticidad e indica que el modelo es adecuado.

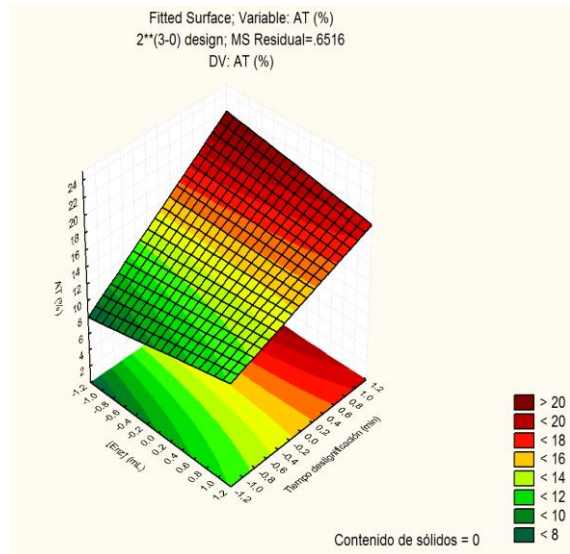
La gráfica de valores predichos vs valores observados al estar en los 3 casos ajustados a la línea con pendiente 1, indican que los valores esperados, de acuerdo al modelo, son parecidos o bien se ajustan a los obtenidos en otras palabras las predicciones son adecuadas. Basándonos en el análisis anterior a pesar que existen datos atípicos, y que normalmente se aconseja quitarlos para dar mayor confiabilidad. Las gráficas de residuos vs predichos y de valor normal vs valor residual le dan solidez al modelo, por esta razón y porque el error residual (figuras A 3, A 4 y A 5) es pequeño en los tres casos, podemos decir que el modelo es adecuado y los resultados en general confiables.

4.2.1.1 Azúcares Totales

a)



b)



c)

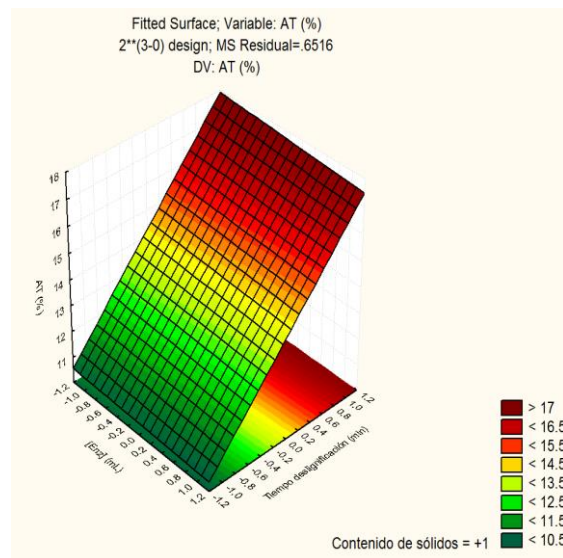


Figura 13. Superficies de respuesta para el porcentaje de azúcares totales obtenidos de la designificación y sacarificación enzimática en función de la concentración de Lacasa y el tiempo de designificación para los porcentajes de sólidos en variables codificadas a) -1, b) 0 y c) +1

Según el análisis de varianza (Tabla A 8) para AT, el tiempo es el único factor que impacta de manera significativa, pero también lo hacen las interacciones enzima-tiempo y tiempo-contenido de sólidos y la interacción de los 3 factores.

Como se observa en la figura 13, la mayor respuesta se obtiene para los tres casos al incrementar el tiempo de acción de la lacasa por separado. Lo cual sugiere en el tiempo -1, en el cual trabajan conjuntamente lacasa con celulasas, una inhibición de los productos de la lignina o bien la misma lignina sobre las hidrolasas. Al parecer la cantidad de enzima no se presenta como un factor influyente por si solo según con la tabla ANOVA, pero la interacción de ésta con los demás factores sí. En las gráficas a y b, se observa que a menor cantidad de enzima se presenta un ligero incremento en la cantidad de azúcares totales. Lo cual sugiere, que a menor volumen de enzima hay menor generación de producto en un tiempo determinado, lo que permite que la lacasa siga oxidando por una parte y por otra los productos se polimericen, evitando que haya una inhibición de la lacasa por producto.

En cuanto a la comparación entre porcentaje de sólidos, observamos que a medida que hay menor cantidad de sólidos se obtiene una mayor cantidad de AT. Este comportamiento nos sugiere que en el caso de 5 % hay mejor transferencia de materia y los productos que se están obteniendo, al mezclarse adecuadamente no impiden que la enzimas actúen al incrementar la probabilidad de que las enzimas entren en contacto con el sustrato. En 10 y 15 %, la transferencia de materia es menos eficiente y los productos formados por la deslignificación pueden ser un impedimento para ambas enzimas.

Las condiciones que más favorecen la producción de azúcares totales son menor contenido de sólidos, menor enzima, mayor tiempo de reacción.

4.2.1.2. Azúcares reductores

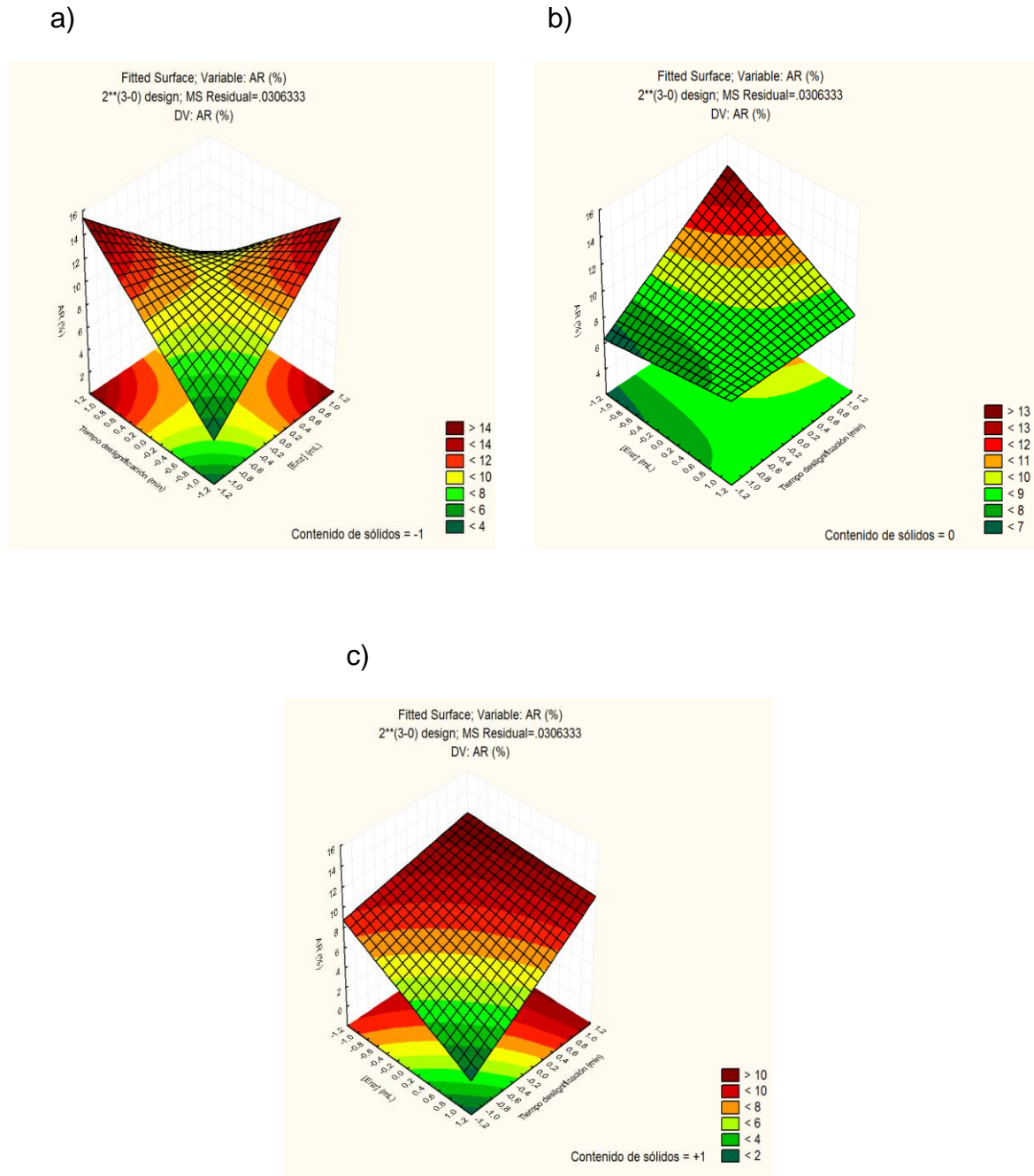


Figura 14. Superficies de respuesta para el porcentaje de azúcares reductores obtenidos de la deslignificación y sacarificación enzimática en función de la concentración de lacasa y el tiempo de deslignificación para los porcentajes de sólidos en variables codificadas a) -1, b) 0 y c) +1

Según el análisis de varianza (Tabla A 7) para azúcares reductores todos los factores y sus correspondientes interacciones influyen de manera significativa en la respuesta.

En la figura 14 observamos que el perfil de AR es variable a diferentes % de sólidos. En el caso de 5 % (gráfica a) apreciamos que la tendencia para obtener la mayor cantidad de azúcares reductores es disminuir la concentración de enzima y dejando actuar la mayor cantidad de tiempo por separado a la lacasa o bien incrementar la concentración de enzima dejándola el menor tiempo por separado.

En el caso de 10 % de sólidos (gráfica b) y 15 % (gráfica c) observamos que la tendencia para obtener la mayor cantidad de azúcares reductores es disminuir la concentración de enzima, dejando actuar el mayor tiempo por separado. Este comportamiento nos sugiere que en el caso de 5 %, al no haber tanto impedimento físico los productos que se están obteniendo se distribuyen de mejor manera. Aunque se produzcan más rápido, la mejor transferencia lograda provoca que las enzimas lacasa y *endo- β -(1-4)-glucanasas*, que son las encargadas de romper los enlaces $\beta(1-4)$ entre glucosas no sustituidas sobre las moléculas de celulosa, actúen (Iglesias, 2008). Para el 10 y 15 %, en donde la transferencia de materia es menos eficiente, las enzimas no entran en contacto con la misma rapidez sobre el sustrato. Además de que los productos formados por la deslignificación pueden ser impedimento si se generan más rápido en un medio menos móvil ya que es más difícil que estos logren estabilizarse entre sí, si hay más sólidos.

La mejor combinación de factores que favorece la producción de AR es menor contenido de sólidos, menor enzima y mayor tiempo o bien, menor contenido de sólidos, mayor enzima, menor tiempo. Analizando las condiciones que favorecían la producción de AT, encontramos que fueron también, menor contenido de sólidos, menor concentración de enzima y mayor tiempo de reacción, por tanto podemos generalizar a éstas como las mejores condiciones que favorecen la producción de azúcares totales y reductores.

4.2.1.3. Lignina soluble

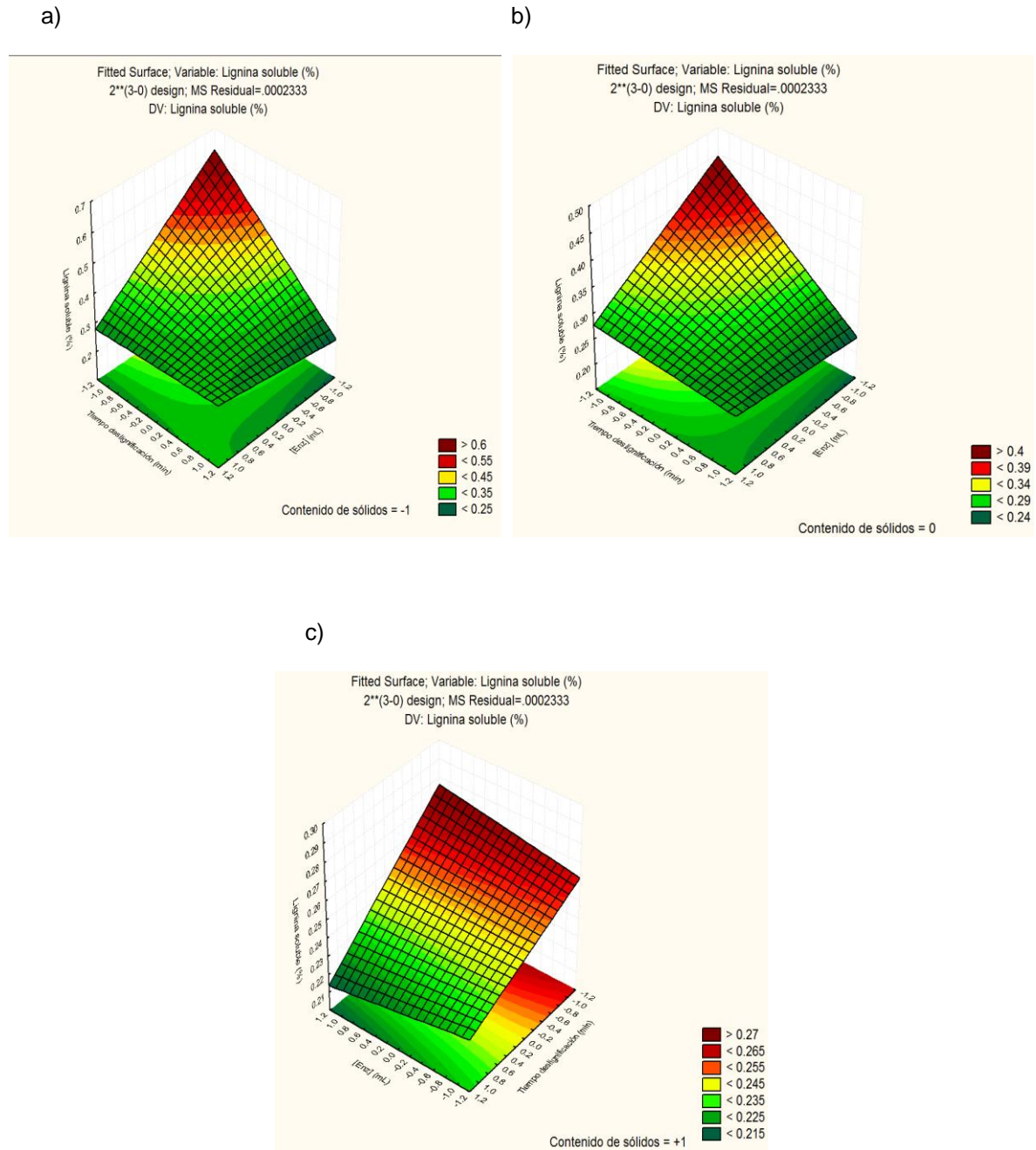


Figura 15. Superficies de respuesta para el porcentaje de lignina soluble obtenido de la designificación y sacarificación enzimática en función de la concentración de lacasa y el tiempo de designificación para los porcentajes de sólidos en variables codificadas a) -1, b) 0 y c) +1

Según el análisis de varianza (Tabla A 9) para lignina soluble en ácido todos los factores y sus correspondientes interacciones influyen de manera significativa en la respuesta.

Las superficies de respuesta en el caso de lignina nos indican que al 5 % de sólidos se obtiene mayor cantidad de lignina soluble al disminuir el tiempo. Esto es, dejar actuar a lacasa conjuntamente con las celulasas durante una hora y disminuir la cantidad de enzima. Si analizamos el contenido de lignina soluble obtenida, observamos que es muy poco, lo que sugiere, que debido a que el mecanismo de acción de lacasa es por radicales libres y los radicales catiónicos formados son bastante inestables y sufren una gran variedad de reacciones no enzimáticas (Kersten *et al.*, 1985; Schoemaker *et al.*, 1985), estos reaccionan entre sí, formando polímeros que no se cuantifican en la lignina soluble. Siendo así que entre menos tiempo de reacción total sea, menos tiempo pasa en medir la lignina y por tanto se puede cuantificar una mayor cantidad.

En el caso del 10% de sólidos se obtiene el mismo comportamiento a diferencia que es menor la cantidad de lignina soluble detectada que en 5%, eso es de esperarse ya que se incrementa el tiempo total de reacción 30 min y debido a la formación de nuevos producto vía radicales, mencionado anteriormente, se cuantifica menos.

Finalmente en el caso de 15% de sólidos, el comportamiento observado en la figura c se observa que la cantidad de enzima no es un efecto que impacta. Esto concuerda con los resultados de azúcares totales donde observó que la concentración de enzima no es un factor que afecte solo, por lo que se puede generalizar que a 15% de sólidos la concentración de la enzima no es importante en la deslignificación.

4.2.2. Modelo simplex

Con base en los resultados, se decidió realizar un estudio más en el dominio donde aparentemente se obtienen los mejores resultados, basado en el incremento de la cantidad de azúcares totales principalmente y también reductores (figura 16). Los parámetros a los que corresponde dicho estudio son: mayor tiempo de deslignificación y menor concentración de enzima, fijando la concentración de sólidos en 10% este último debido a que es un porcentaje que a mayor escala permite que no haya un gasto innecesario de energía y que haya una buena generación de productos.

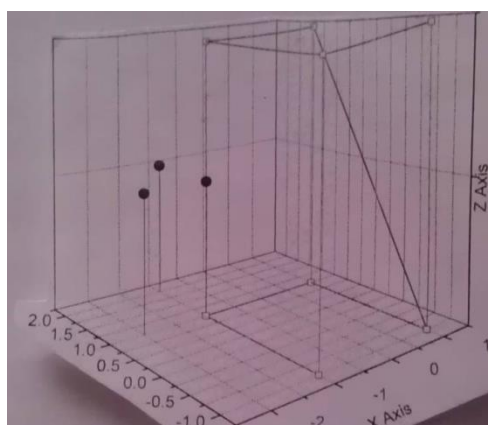


Figura 16. Espacio tridimensional de análisis para el modelo simplex. La variable **x** corresponde a la cantidad de enzima, la variable **y** al tiempo y la variable **z** al %de sólidos

Tabla 8. Modelo simplex para las diferentes cantidades de enzima, diferentes tiempos y mismo porcentaje de sólidos en variables codificadas.

Número de ensayo	Enzima (mL)	Tiempo (min)	%Sólidos	%AR	%AT	%LS
1	-1	1.5	0	11.51±0.50	23.32±0.27	0.22±0.01
2	-1	1	0	5.93±0.41	21.96±0.48	0.22±0.01
3	-1.5	1	0	10.86±0.41	35.77±0.00	0.19±0.01

Nota: Las condiciones correspondientes a las variables codificadas están descritas en la metodología (página 25)

En el anexo D se encuentran las ANOVAS correspondientes a los resultados del modelo simplex e indican que hay diferencia significativa en todas las respuestas, con las diferentes condiciones.

En el caso de azúcares reductores se observa que se obtienen mejores resultados al cambiar cualquiera de los parámetros lo cual ya fue explicado. Los resultados para azúcares totales muestran que aunque en el diseño Factorial 2³ según la ANOVA al 95% de confianza (tabla A 13) la cantidad de enzima por sí sola no influye significativamente, pero fuera de ese espacio se puede observar que no es así. La concentración de enzima influye de manera más significativa que el tiempo. Los resultados de lignina soluble muestran una ligera disminución al disminuir la cantidad de enzima, como se puede observar en la tabla 8 (-1.5, 1, 0)

4.2.3. Tratamiento de pasto Taiwán con enzima HRP

Para la evaluación del pretratamiento de pasto Taiwán con enzima HRP, se realizó al igual que con lacasa un diseño de experimentos factorial completo 2 niveles y 3 puntos centrales. El dominio experimental se fijó variando la concentración de H₂O₂ (M), la cantidad de enzima (mL), y el tiempo (min).

Tabla 9. Diseño de experimentos para la sacarificación con pretratamiento utilizando enzima HRP

	Enz (mL)	Tiempo de deslignificación (min)	Concentración de H ₂ O ₂ (M)	%AR	%AT	%LS
1	1	-1	1	13.79±0.0	34.95±2.19	0.29±0.00
2	-1	-1	1	12.01±0.38	17.60±0.54	0.29±0.00
3	0	0	0	13.17±0.09	20.56±0.07	0.27±0.00
4	-1	1	-1	18.9±0.00	21.24±0.22	0.20±0.00
5	0	0	0	14.06±0.19	22.06±0.27	0.27±0.00
6	1	1	-1	8.86±0.12	11.11±0.59	0.30±0.00
7	0	0	0	14.06±0.19	22.49±0.07	0.28±0.00
8	1	-1	-1	12.29±0.19	18.43±1.16	0.33±0.00
9	-1	1	1	16.45±0.09	36.88±0.27	0.24±0.00
10	1	1	1	13.99±0.09	26.61±0.13	0.27±0.00
11	-1	-1	-1	12.90±0.09	20.51±0.27	0.24±0.00

Nota: Las condiciones correspondientes a las variables codificadas están descritas en la metodología (página 25)

Tabla 10. Coeficientes de correlación del modelo $y = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \beta_3 x_3 + \beta_{123} x_1 x_2 x_3$, donde x_1 = cantidad de enzima (mL), x_2 =tiempo (min) y x_3 =concentración de H_2O_2 (%)

Coeficiente	%AR	%AT	%LSA
B₀	13.64±0.18	23.41±0.36	0.27±0.00
B₁	-1.41±0.18	-0.64±0.36	0.03±0.00
B₂	0.90±0.18	0.54±0.36	-0.02±0.00
B₃	0.41±0.18	5.59±0.36	0.00±0.00
B₁₂	-1.71±0.18	-4.45±0.36	0.00±0.00
B₁₃	1.24±0.18	2.41±0.36	-0.02±0.00
B₂₃	0.26±0.18	2.19±0.36	0.00±0.00
B₁₂₃	0.65±0.18	-2.44±0.36	0.00±0.00

De las gráficas obtenidas para comprobar la idoneidad del modelo tenemos que la gráfica de normal vs residual muestra en el caso de AT dos datos atípicos, en AR no se encuentran datos atípicos y en el caso de lignina también se muestran dos datos atípicos.

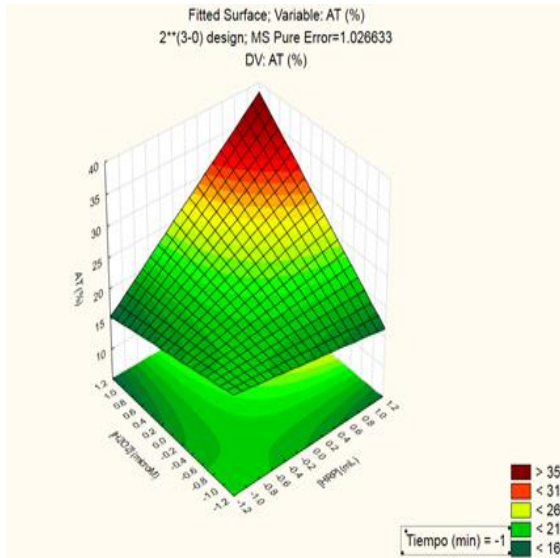
Las gráficas de residuos vs predichos en los tres casos (AT, AR y LS) no muestran ningún patrón repetido, lo que comprueba la hipótesis de linealidad y homocedasticidad e indica que el modelo es adecuado.

Las gráficas de predichos vs observados al estar en los 3 casos ajustados a la línea, con excepción de 1 punto, indican que los valores esperados de acuerdo al modelo son parecidos o bien se ajustan a los obtenidos en casi todos los casos.

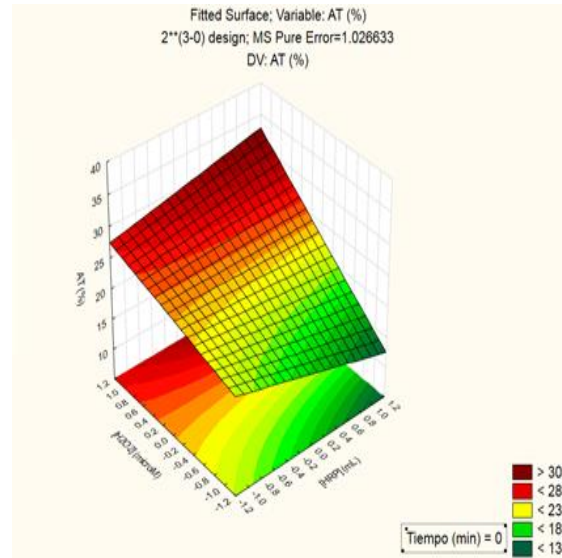
Basándonos en el análisis anterior a pesar que existen datos atípicos, pero como se mencionó con anterioridad al ver que las otras dos gráficas le dan solidez al modelo y que el error residual (figuras A 6, A 7, A 8) es pequeño en los tres casos, podemos decir que el modelo es adecuado y los resultados en general confiables.

4.2.3.1. Azúcares totales

a)



b)



c)

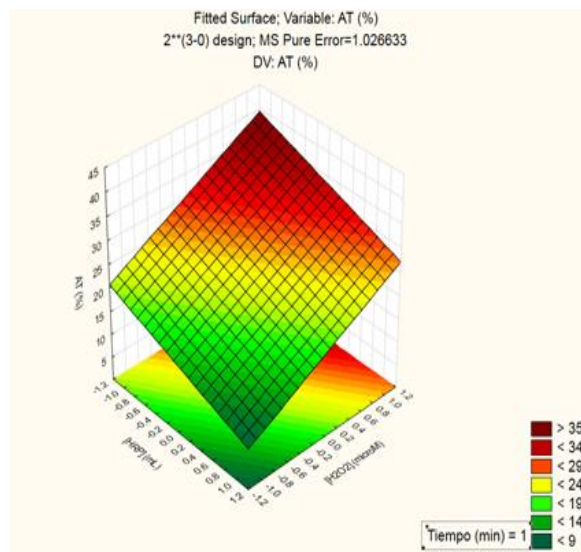


Figura 17. Superficies de respuesta para el porcentaje de azúcares totales obtenido de la deslignificación y sacarificación enzimática en función de la concentración de HRP y la concentración de peróxido de hidrógeno para los diferentes tiempos en variables codificadas a) -1, b) 0 y c) +1

Según el análisis de varianza (Tabla A 11) para azúcares totales, la concentración de H_2O_2 es el único factor que impacta de manera significativa, pero también lo hacen todas las interacciones de todos los factores.

En la figura 17 podemos observar que el perfil de AT no es muy variable a diferentes tiempos, en el caso de 30 min (figura a) se observa que la tendencia para obtener la mayor cantidad de AT es aumentando las concentraciones de H_2O_2 y de enzima mientras que a 90 min (figura b) se obtiene mayor cantidad de AT con la mayor concentración de H_2O_2 a cualquier concentración de HRP. En el caso de 150 min la mayor cantidad de AT se obtiene de la combinación, mayor concentración de H_2O_2 menor concentración de enzima, pero en general mientras se mantenga la mayor concentración de H_2O_2 , la concentración de HRP no es tan importante.

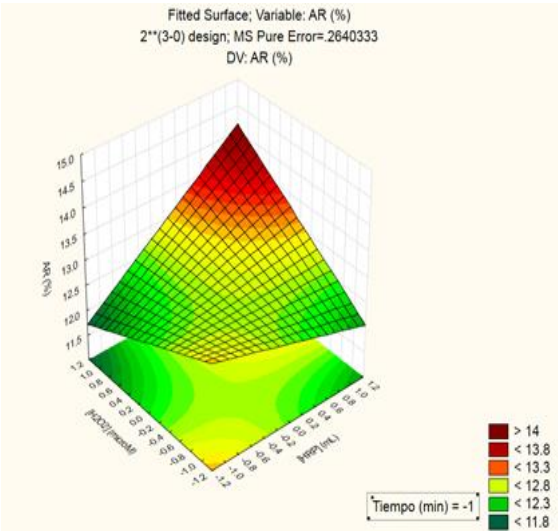
El comportamiento observado sugiere la posibilidad de que los productos de deslignificación están provocando una disminución en la eficiencia de la enzima HRP (inhibición por producto). En la figura c, se observa que al incrementar el tiempo de reacción y disminuir la concentración de enzima incrementan los AT, esto se puede explicar considerando que al generar menor cantidad de radicales en una misma unidad de tiempo estos pueden acomodarse mejor e interferir menos en la enzima, lo cual se logra disminuyendo la concentración de ésta. Al haber mayor concentración de H_2O_2 , sustrato que requiere la enzima para realizar su función, se favorece la oxidación de la lignina. Es muy importante también no perder de vista que el H_2O_2 es una sustancia que también oxida por sí solo (Woodings, 2001), siendo así una reacción simultánea a la enzimática.

En el caso del menor tiempo de reacción (Figura a) es coherente que para que haya mayor deslignificación, reflejado en la cantidad de azúcares reductores, se necesite más enzima, ya que como sabemos la actividad de una enzima está en función del tiempo y concentración de la misma, por lo que al disminuir el tiempo para lograr un mismo resultado se necesita mayor enzima. En el caso del H_2O_2 los mejores resultados se obtienen en la más alta concentración de éste, lo cual concuerda con lo que se explicó anteriormente. La mayor cantidad de AT se

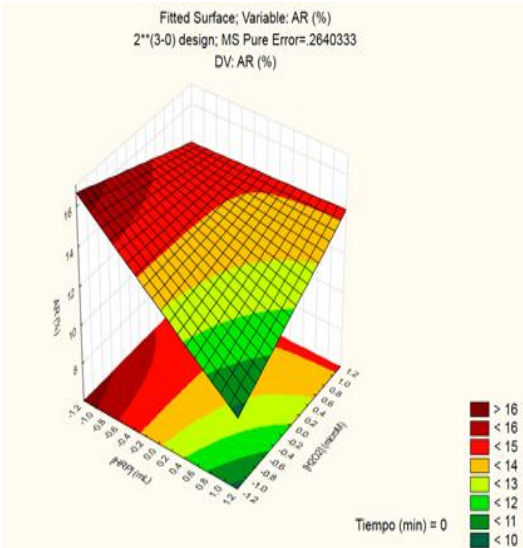
obtiene de la combinación menor concentración de enzima, mayor concentración de H₂O₂ y mayor tiempo, o bien menor tiempo, mayor concentración de enzima y de H₂O₂.

4.2.3.2. Azúcares reductores

a)



b)



c)

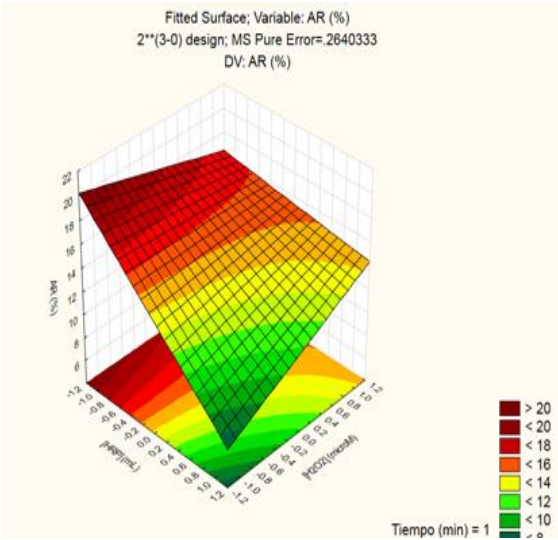


Figura 18. Superficies de respuesta para el porcentaje de azúcares reductores obtenido de la deslignificación y sacarificación enzimática en función de la concentración de HRP y la concentración de peróxido de hidrógeno para los diferentes tiempos en variables codificadas a) -1, b) 0 y c) +1

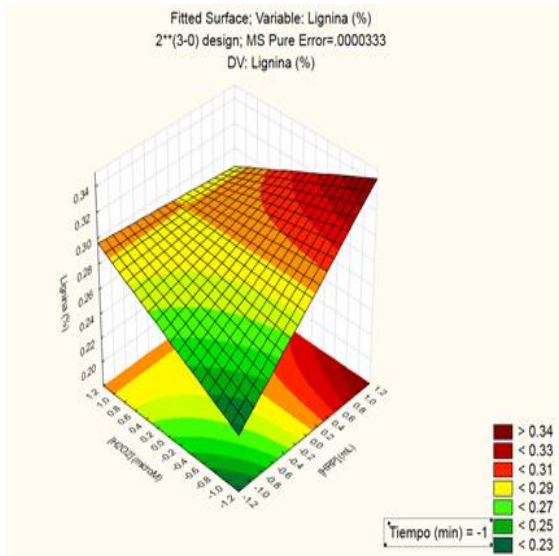
Según el análisis de varianza (Tabla A 10) para azúcares reductores el tiempo y la concentración de enzima son los factores que impactan de manera significativa solos, pero también lo hacen las interacciones enzima-tiempo y enzima-concentración de H_2O_2 .

En la figura 18 se puede observar que el perfil de AR es variable a diferentes tiempos, en el caso de 30 min (figura a) la tendencia para obtener la mayor cantidad de AR es aumentando las concentraciones de H_2O_2 y de enzima. Caso que no sucede al incrementar el tiempo (90 y 120 min) ya que los mejores resultados se obtienen con menor concentración de HRP a cualquier concentración de H_2O_2 , con la excepción de que a 90 min en la más alta concentración de H_2O_2 la concentración de enzima parece ser irrelevante.

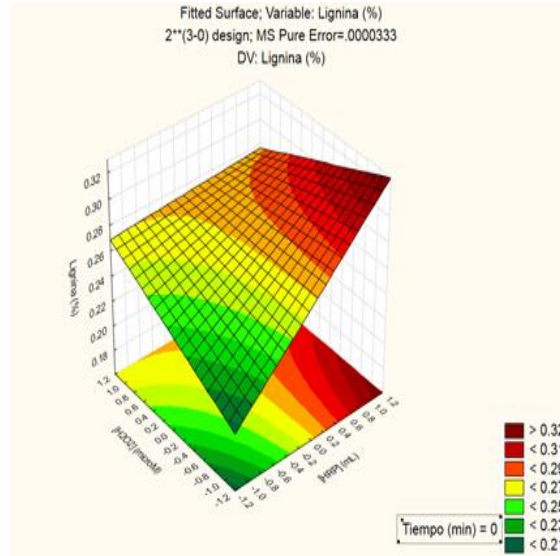
La mayor cantidad de AR se logra de la combinación mayor tiempo, menor concentración de enzima, a cualquier concentración de H_2O_2 . Lo que concuerda con AT en cuanto a enzima y tiempo respecta y varía poco en concentración H_2O_2 . Por lo que en general la mejor tendencia para que ocurra una mayor deslignificación con HRP y se obtengan mayor cantidad de AT y AR es: disminuyendo la concentración de enzima, incrementando la concentración de H_2O_2 e incrementando el tiempo de reacción, esto en el dominio estudiado.

4.2.3.3. Lignina soluble

a)



b)



c)

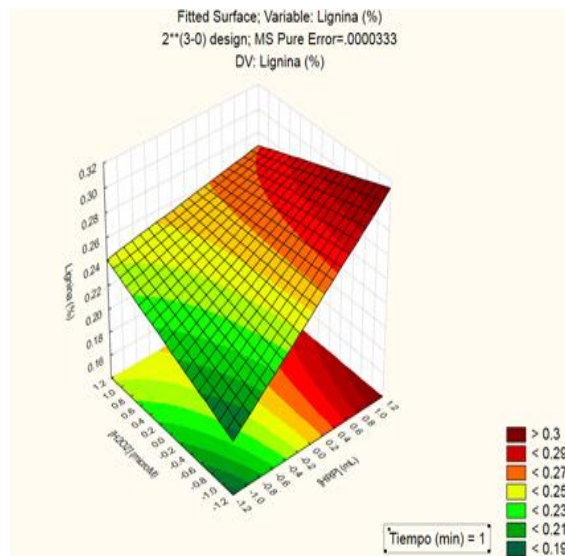


Figura 19. Superficies de respuesta para el porcentaje de lignina soluble obtenido de la designificación y sacarificación enzimática en función de la concentración de HRP y la concentración de peróxido de hidrógeno para los diferentes tiempos en variables codificadas a) -1, b) 0 y c) +1

Para el análisis de varianza (Tabla A 12) de lignina soluble el tiempo y la cantidad de enzimas son los factores que solos impactan de manera significativa, pero también lo hacen la interacción enzima- concentración de H₂O₂.

Como podemos observar en la figura 19 el caso de la lignina se cuantificó la mayor cantidad cuando hay más enzima y menor cantidad de H₂O₂ lo cual desde el punto de vista de deslignificación no tiene sentido ya que se espera que haya una mejor deslignificación al haber más peróxido ya que las peroxidasas lo utilizan como aceptor de electrones para catalizar la reacción oxidativa (Li *et al.* 1994), pero si consideramos el punto de vista en el que a mayor deslignificación mayor número de productos radicales, este resultado tiene sentido, debido a que al haber más radicales estos pueden reaccionar entre sí y dar una respuesta menor como se comentó anteriormente en los resultados del pretratamiento con la enzima lacasa.

4.2.4. Sacarificación de pasto Taiwán

Para evaluar la optimización de la sacarificación se realizó la sacarificación del pasto sin pretratamiento en los tres porcentajes de sólidos, que sirvieron como controles.

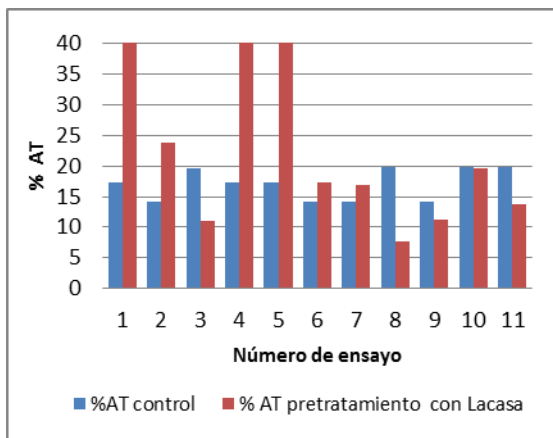
Tabla 11. Sacarificación de pasto Taiwán con E7, sin pretratamiento

% de sólidos	%AT	%AR	%LS
5	19.57±1.45	5.07±0.09	0.49±0.00
10	17.24±1.06	4.11±0.22	0.34±0.02
15	14.19±1.16	3.01±0.18	0.25±0.01

Los resultados de los controles nos muestran que en las tres respuestas hay diferencia, la única variación fue el porcentaje de sólidos, se comprueba que el impedimento físico provocado por la concentración de sólidos es mayor al incrementarlo y se refleja en la eficiencia de la enzima.

4.2.4.1 Estudio de la sacarificación del material con pretratamiento y sin pretratamiento

a)



b)

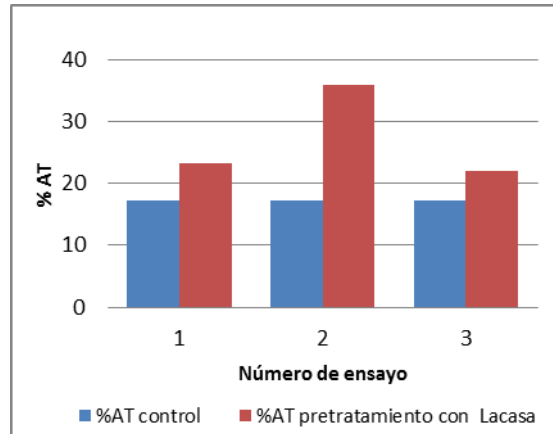


Figura 20. Comparación de azúcares totales, de cada pretratamiento con lacasa con los azúcares totales del control, correspondientes al diseño factorial completo 2^3 (a) y diseño simplex (b)

Nota: Las variables codificadas de los números de ensayos están descritas en los resultados de cada diseño experimental (inciso a página 36, inciso b página 45)

En la cantidad de azúcares totales se puede observar que para lacasa (figura 20) los tratamientos 3, 8, 9 y 11 que corresponden al tiempo de deslignificación de 1 hora trabajando conjuntamente con las hidrolasas, la cantidad de azúcares totales es menor que el control. Esto refuerza la idea de que existe una inhibición de la lacasa sobre las hidrolasas y de los productos que genera, asociada principalmente a los radicales que se generan al momento, los cuales afectan su actividad posiblemente interfiriendo a nivel de su estructura. Si bien, observando los datos puntuales se obtuvo una mayor cantidad de azúcares totales en las condiciones (0, 0, 0) al analizarlo estadísticamente, con las superficies de respuesta, basándonos en la idoneidad del modelo y la confiabilidad de resultados no son las mejores por lo que no se tomaron en cuenta.

Al analizar los resultados del modelo simplex en cuanto a AT, se observa que en todos los casos se obtiene mayor cantidad en el material que fue pretratado, principalmente al disminuir la cantidad de enzima. Esto reafirma que las condiciones de pretratamiento que permiten una mejor respuesta son menor enzima y mayor tiempo de reacción.

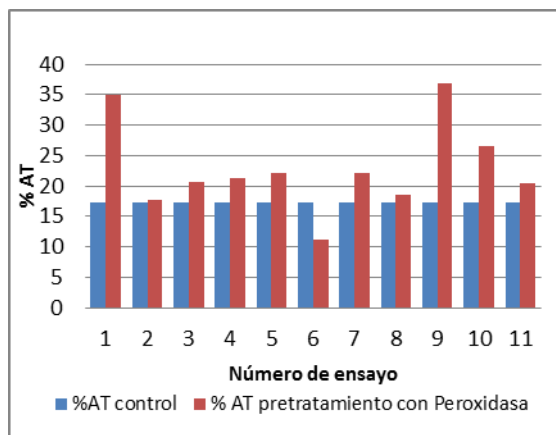


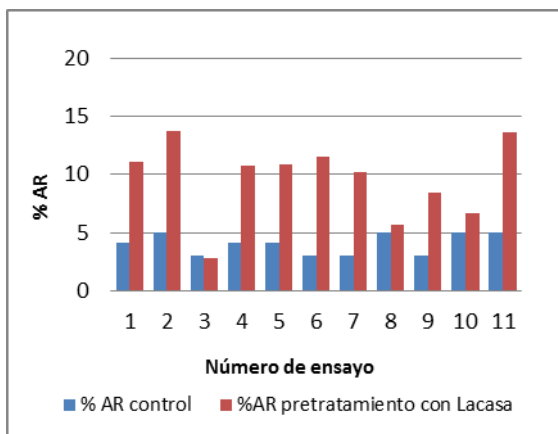
Figura 21. Comparación de azúcares totales de los pretratamientos con HRP con los azúcares totales del control.

Nota: Las variables codificadas correspondientes a los números de ensayos están descritas en los resultados del diseño experimental (página 46)

En el caso de HRP sólo en el tratamiento 6, que corresponde a mayor cantidad de enzima, mayor tiempo y menor cantidad de H_2O_2 , mostró menor cantidad de azúcares totales que el control, esto se puede asociar a un posible problema de homogeneización.

El mayor incremento se obtuvo a mayor concentración de enzima y menor tiempo o bien menor concentración de enzima, mayor tiempo, ambas con la más alta concentración de H_2O_2 . Por lo que pensando en conveniencia económica, se eligió el tratamiento correspondiente a la menor concentración de enzima.

a)



b)

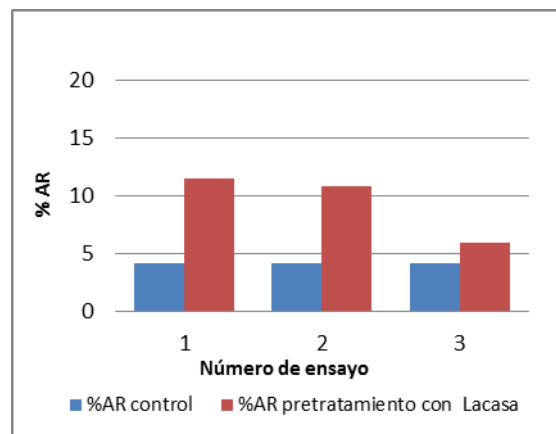


Figura 22. Comparación de azúcares reductores de los pretratamientos con lacasa con los azúcares reductores del control correspondientes al diseño factorial completo 2^3 (a) y al diseño simplex (b)

Al comparar los azúcares reductores obtenidos después del pretratamiento con el control (figura 22) podemos observar que en todos los casos, a excepción del ensayo 3, se obtiene un incremento en los azúcares reductores. En dicho caso se observa una diferencia mínima lo cual se puede asociar al error experimental, indicando así que las condiciones de ese pretratamiento no afectan a esta respuesta.

Al comparar el porcentaje de AR del control con los del modelo simplex se observó que en los tres casos se optimiza la sacarificación.

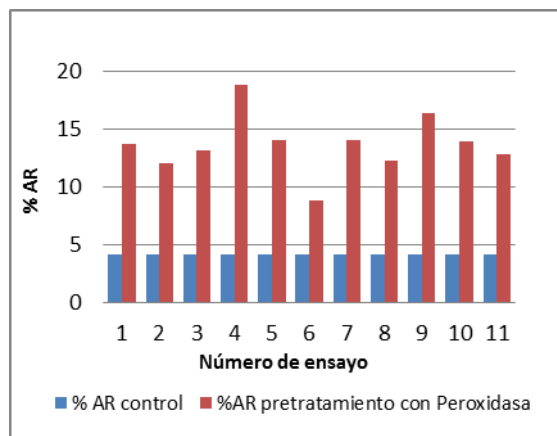


Figura 23. Comparación de azúcares reductores de los pretratamientos con HRP con los azúcares reductores del control.

En el caso de los azúcares reductores obtenidos con el pretratamiento con la enzima HRP, en todos los casos se obtuvo mayor cantidad de azúcares reductores que en el control (figura 23).

a)

b)

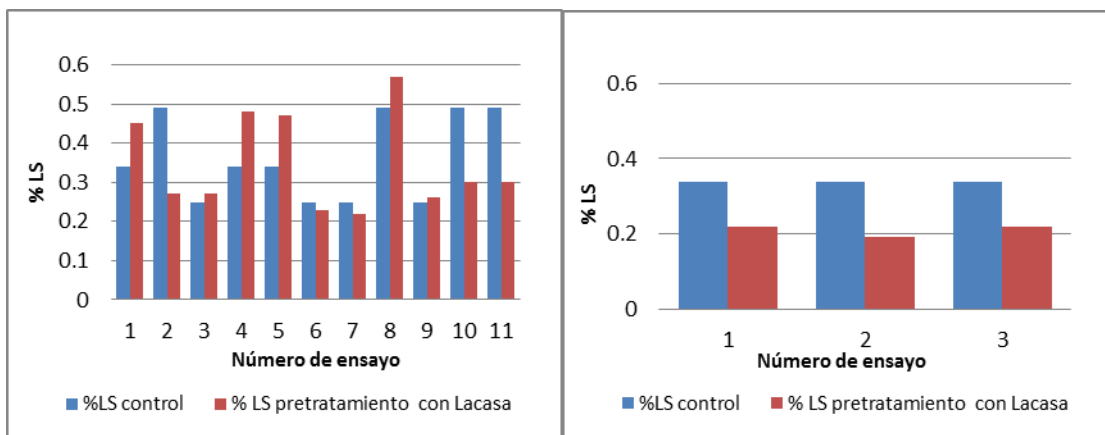


Figura 24. Comparación de lignina soluble de los pretratamientos con lacasa con la cantidad de lignina soluble del control correspondientes al diseño factorial completo 2^3 (a) y al diseño simplex (b)

Las gráficas de comparación de cantidad de lignina cuantificada en el caso de lacasa muestran que sólo en los pretratamientos (1, 4, 5 y 8) se logró cuantificar mayor cantidad de lignina que en el control. Estos pretratamientos

corresponden a la menor cantidad de enzima, menor porcentaje de sólidos y menor tiempo, es decir tiempo en el que actuaron en conjunto con las hidrolasas. Nuevamente concuerda con el análisis anterior, ya que al pasar menos tiempo los radicales no atacan a la lignina soluble ya presente, más bien reaccionan entre si formando compuestos estables. Es importante mencionar que cuando se realizó el control para cada porcentaje de sólidos, se observó que el volumen recuperado era mayor, lo cual al realizar los cálculos de lignina esto tiene un impacto (figura 24 a).

En el caso del modelo simplex podemos reforzar la idea de que mientras más deslignificación vía radicales libres menor cantidad de lignina soluble cuantificada por lo explicado anteriormente (figura 24 b).

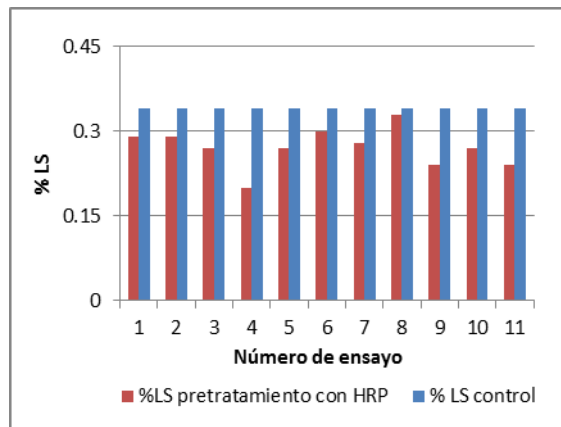


Figura 25. Comparación de lignina soluble de los pretratamientos con HRP con el control

En el caso de HRP se puede apreciar lo mismo para el caso del modelo simplex ya que en todos los caso se obtuvo menor cantidad de LS que en el control (figura 25).

4.2.5. Evaluación de la sacarificación enzimática de los pastos deslignificados.

Dados los resultados y análisis realizado anteriormente se prosiguió a realizar el pretratamiento y sacarificación para pasto privilegio y bagazo de caña utilizando las condiciones que permitieron los mejores resultados en la cantidad de azúcares totales y reductores. Para el pretratamiento con enzima lacasa fueron las condiciones del modelo simplex respectivo para las variables codificadas (-1.5, 1, 0). Para la enzima HRP el tratamiento respectivo para las variables codificadas (-1, 1, 1).

Tabla 12. Comparación de AT, AR y LS resultantes de los diferentes pretratamientos de pasto Taiwán, pasto privilegio y bagazo de caña

	%AR	%AT	%LS
Privilegio control (PC)	9.83±0.10	11.11±0.48	0.71±0.00
PL	16.90±0.24	20.96±0.00	0.39±0.00
P HRP	14.18±0.10	28.46±0.34	0.21±0.00
Taiwán control (TC)	4.11±0.22	17.24±1.06	0.34±0.00
TL	10.86±0.41	35.77±0.48	0.19±0.00
T HRP	16.45±0.10	36.88±0.27	0.24±0.00
Bagazo de caña control (BCC)	6.05±0.10	12.79±1.23	0.69±0.01
BC L	6.06±0.12	18.31±0.84	0.66±0.00
BC HRP	5.89±0.12	19.75±0.00	0.60±0.00

** Las abreviaturas corresponden a los pretratamientos de los diferentes materiales pasto Taiwán (T), privilegio (P) y bagazo de caña (BC), empleando las enzimas peroxidasa (HRP) y lacasa (L).

Tabla 13. Índice de polimerización (IP) de los diferentes materiales pretratados

IP	Pasto privilegio	Pasto Taiwán	Bagazo de caña
Control	0.88	0.24	0.47
HRP	0.50	0.45	0.30
L	0.81	0.30	0.33

Se determinó el índice de polimerización con la cantidad AR y AT de cada pretratamiento (Tabla 13), el cual se define como el número de unidades monoméricas en una macromolécula, una molécula oligomérica, un bloque o una cadena (IUPAC, 1997). Y se encontró que éste es diferente de acuerdo al pretratamiento y material. En el caso de pasto privilegio y bagazo de caña en ambos casos se obtiene un menor IP al del control siendo más significativa, sobre todo en pasto privilegio, la disminución en el pretratamiento con HRP, mientras que con pasto Taiwán ambos pretratamientos aumentan el IP obteniendo el mayor incremento con HRP. EL IP de pasto privilegio y bagazo de caña del pretratamiento con HRP indica una mayor inhibición sobre las hidrolasas, particularmente las endo- β -(1-4)-glucanasas. La diferencia entre el IP de cada pretratamiento sugiere que los productos generados de la oxidación de la lignina dependiendo de la fuente y del pretratamiento tienen una interferencia positiva o negativa en la actividad de las hidrolasas siendo en general los productos generados por HRP los más negativos.

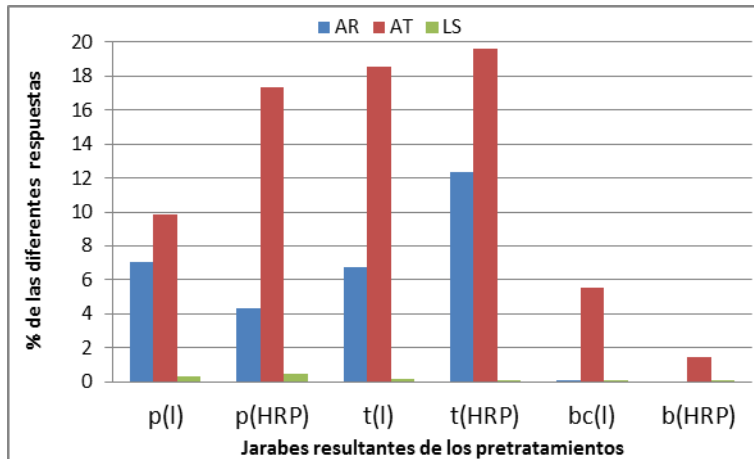


Figura 26. Disminución porcentual de lignina soluble e incremento porcentual de azúcares reductores y totales para pasto privilegio, Taiwán y bagazo de caña con los diferentes pretratamientos

Como se observa en la figura 26, para la lignina en el pasto privilegio sigue el comportamiento de disminución ya mencionado anteriormente. Se puede observar también que la disminución es mayor en el pasto privilegio que en el bagazo de caña. La cantidad de lignina en este último material lignocelulósico es mayor, (Tabla 12) por lo que es posible que la remoción de lignina en el pretratamiento depende de cuánto haya.

En el caso de azúcares reductores se puede observar que el incremento es variable para cada pretratamiento en cada material lignocelulósico. En pasto privilegio y bagazo de caña se observa un mayor incremento con el pretratamiento con enzima lacasa, mientras que con pasto Taiwán se observa lo contrario. En cuanto a azúcares totales refiere casi es el mismo incremento para pasto privilegio y Taiwán, ambos pretratamientos excepto con enzima lacasa para pasto privilegio, en este caso se puede observar que sólo incrementa aproximadamente la mitad que en los otros pretratamientos. Esto último se puede deber a que los productos de deslignificación estén inhibiendo las celulasas.

Tabla 14. Azúcares obtenidos a partir de hidrólisis ácida de los diferentes materiales

	Pasto privilegio	Pasto Taiwán	Bagazo de caña
AR(%)	60.12±3.58	53.28±2.06	50.78±3.56
AT(%)	75.88±4.17	66.58±2.29	57.29±2.16

Nota: Los resultados que se muestran en la tabla no se realizaron en el presente estudio, fueron tomados de previos estudios aún no publicados.

Tabla 15. Eficiencia de conversión de cada pasto con base en la composición porcentual de azúcares resultante de la hidrólisis ácida

Eficiencia de conversión (%)	Pasto privilegio		Pasto Taiwán		Bagazo de caña	
	AR	AT	AR	AT	AR	AT
Control	15.48	14.64	7.71	25.89	11.91	22.32
Pretratamiento con lacasa	31.93	27.62	20.38	53.72	11.93	31.96
Pretratamiento con HRP	23.58	37.50	30.37	55.39	11.59	34.47

Con base en los resultados de la eficiencia mostrados en la tabla 15 se puede observar que la mayor eficiencia de conversión de AT se encuentra en el pasto Taiwán con ambas enzimas, mientras que para azúcares reductores la mayor eficiencia la presentan pasto Taiwán pretratado con enzima HRP o bien pasto privilegio pretratado con enzima lacasa. En ambos casos, es decir AR y AT la eficiencia más baja resulta de la disolución de bagazo de caña, lo cual se asocia a la naturaleza del material ya que al absorber más agua la actividad de la enzima se ve afectada por la obstrucción para encontrar al sustrato y oxidarlo.

4.3. Análisis de los espectros de las disoluciones resultantes de la designificación.

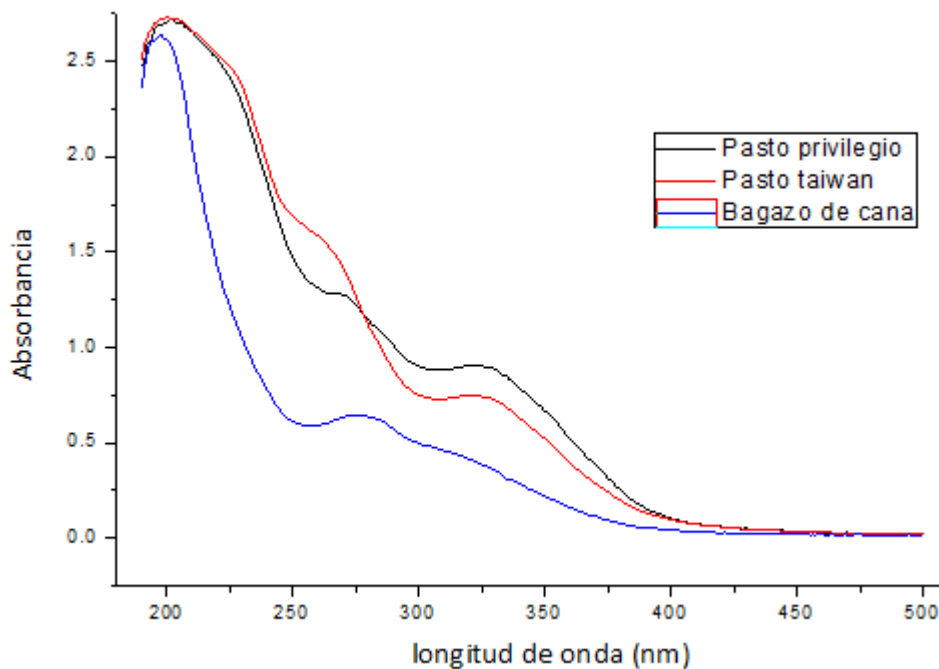


Figura 27. Espectro UV-vis de las disoluciones resultantes de los distintos materiales pretratados con HRP

La primera diferencia en los espectros UV-vis entre los materiales lignocelulósicos observados en la figura 27, se encuentra en el pasto Taiwán en la región de 250-275 nm ya que presenta mayor absorción, que no se observa en el pasto privilegio ni en el bagazo de caña, pero en estos dos últimos materiales hay una banda de absorción pronunciada en el intervalo de 275-300 nm la cual podría estar asociada a la presencia de furfural y HMF cuya longitud de máxima absorción se encuentra en ese intervalo (Tabla 16).

	λ_{\max} (nm)	200 nm	205 nm	240 nm	320 nm
Furfural	278	11%	6%	16%	1%
HMF	284	26%	13%	12%	3%
Ácido p-cumárico	308	35%	39%	19%	83%
Ácido ferúlico	322	58%	53%	60%	99%
Vainillina	230	90%	98%	45%	55%
Furfural-hidrolizado	190	64%	52%	18%	10.5%

Tabla 16. Absorbancias relativas de furfurales y componentes derivados de lignina encontrados en estudios sobre biomasa hidrolizada

Fuente: Hyman, 2008.

La diferencia de mayor interés, se encuentra en el espacio de 300-350 nm. En el pasto privilegio se observa una banda de absorción más pronunciada que en el pasto Taiwán y el bagazo de caña. En el espectro se observan los productos resultantes de la oxidación de la lignina que tienen estructura parecida a los precursores de la misma lo que sugiere que pasto privilegio es más rico en ácido *p*-cumárico. Además de que en dicho intervalo se encuentran los máximos de absorción de ácido ferúlico y vainillina (Tabla 16) lo cual indica que ese pasto es probablemente más rico en ambos. El ácido ferúlico es precursor de la vainillina y es un ácido que se encuentra en el entrecruzamiento de lignina y polisacáridos y que puede acoplar los polisacáridos con lignina (Scalbert *et al.*, 1985; Iiyama *et al.*, 1990; Quideau, *et al.*, 1997).

La fracción de lignina presente en complejos de lignina-carbohidratos y el nivel de entrecruzamiento dependen de la cantidad y organización espacial de ácido ferúlico, ferulatos y dehidrodiferulatos (Prinsen, 2010). Lo que sugiere que de acuerdo al perfil del espectro en el pasto privilegio es muy posible que haya una mayor fracción de lignina en complejo lignina-carbohidrato que en los demás materiales. La cantidad de lignina soluble cuantificada de los materiales sin pretratamiento, es decir en los controles, es mayor en pasto privilegio que en

pasto Taiwán y bagazo de caña por lo que es muy probable que esta relación tenga que ver con la cantidad real de lignina soluble en cada material.

4.4. Actividad antioxidante

Las disoluciones resultantes de la deslignificación mostraron un comportamiento diferente en cuanto a actividad antioxidante dependiendo de la enzima con la cual fueron pretratados. Las disoluciones del pretratamiento con enzima HRP mostraron un comportamiento antioxidante mientras que las disoluciones resultantes del pretratamiento con lacasa, mostraron el efecto contrario, es decir incrementaron la oxidación del sustrato (ABTS). Como se puede apreciar en la figura 28, las disoluciones son diferentes. En el caso de las disoluciones resultantes del pretratamiento con lacasa se puede ver claramente que el color es más oscuro, lo que se asocia a que sus componentes están más oxidados, lo que tiene sentido con que esas disoluciones en vez de ser presentar actividad antioxidante presenten actividad oxidante.

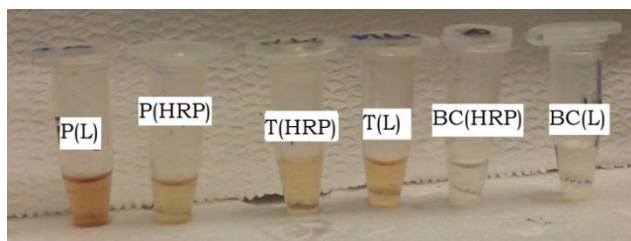


Figura 28. Disoluciones obtenidas de la deslignificación mediante lacasa y HRP de los diferentes materiales.

Con base en los resultados podemos asociar la actividad antioxidante de las disoluciones del pretratamiento con HRP entre otras cosas a que el H_2O_2 por sí sólo generan radicales $OH\cdot$ y $HOO\cdot$, los cuales pueden reaccionar con los productos de oxidación de la lignina estabilizándolos de tal manera que el producto sea monómero, dímero o polímero, tendrá un grupo hidroxilo, el cual

tendrá propiedad antioxidante. Cosa que no sucede con la enzima lacasa. La lacasa reacciona con polifenoles y otros compuestos aromáticos derivados de la lignina, los cuales, pueden ser polimerizados o despolimerizados (Bourbonnais *et al.* 1995) donde es posible que el nivel de oxidación al que llegan algunos o todos sus productos es tal que presentan un potencial redox mayor al ABTS y lo oxidan.

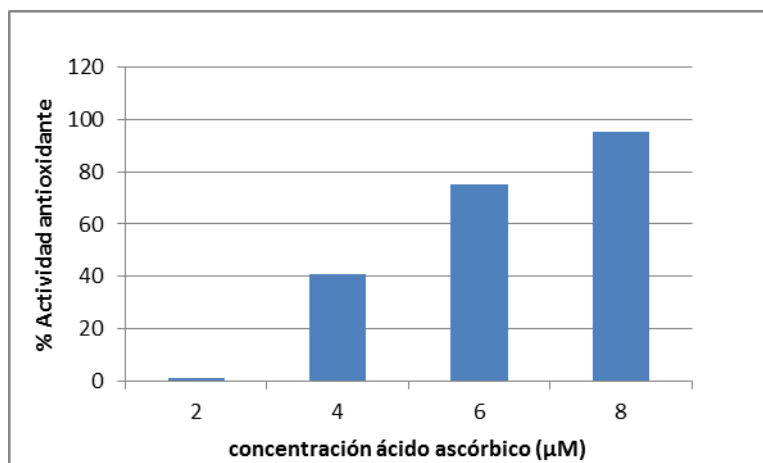


Figura 29. Actividad antioxidante del ácido ascórbico con respecto a la concentración. El 100% corresponde a una concentración de ABTS de $15.94\mu\text{M}$.

Para poder establecer una comparación de la actividad antioxidante que presentaban las disoluciones se tomó como referencia al ácido ascórbico el cual es conocido como un antioxidante natural (figura 29).

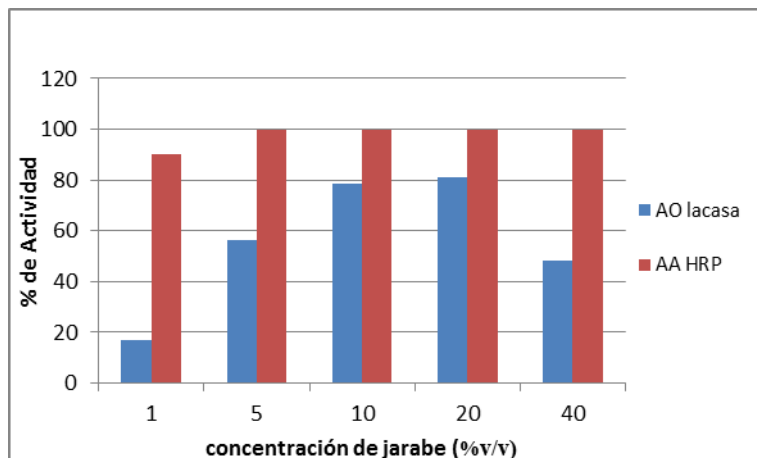


Figura 30. Actividad Antioxidante (AA) y oxidante (AO) de la disolución resultante de los diferentes pretratamientos aplicados al pasto Taiwán

Desde la concentración mínima que se estudió, el pasto Taiwán llega al 90% de actividad antioxidante casi lo equivalente a una concentración de ácido ascórbico de 8µM. En caso de la actividad oxidante, se puede observar que la tendencia es interesante ya que a medida que incrementa la concentración la AO aumenta, pero después del 20% parece que comienza a descender (figura 30).

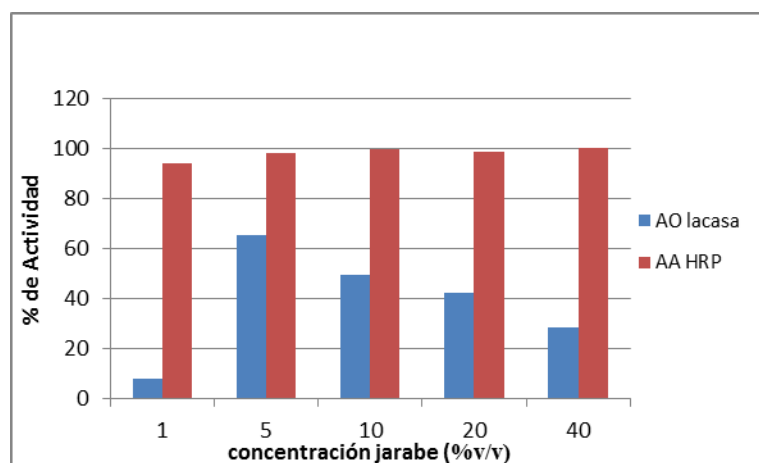


Figura 31. Actividad Antioxidante (AA) y oxidante (AO) de la disolución resultante de los diferentes pretratamientos aplicados al pasto privilegio

La actividad antioxidante de la disolución del pretratamiento de pasto privilegio fue incrementando conforme al incremento de la concentración y con la mínima concentración se obtuvo una AA casi equivalente a la exhibida por el ácido ascórbico de 8 μ M. En caso de la disolución del pretratamiento con lacasa la actividad oxidante aumenta y después disminuye lo que varía con respecto a la disolución obtenida de pasto Taiwán en que su máxima actividad oxidante se presenta en la concentración del 5% (figura 31).

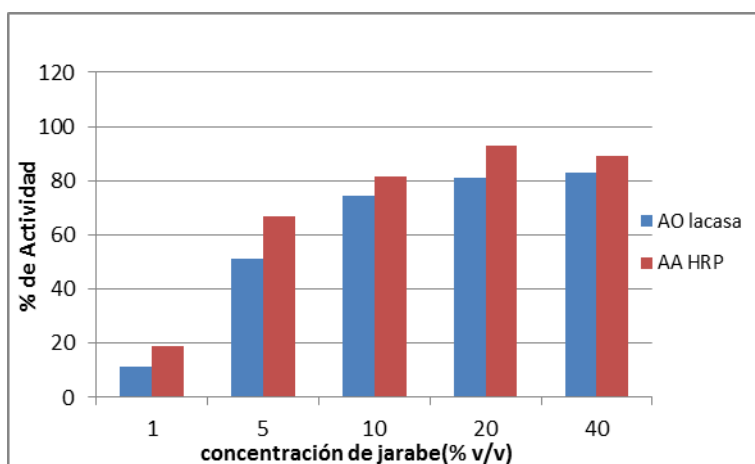


Figura 32. Actividad Antioxidante (AA) y oxidante (AO) de las disoluciones resultantes de los diferentes pretratamientos aplicados al bagazo de caña.

El caso de bagazo de caña ambas actividades incrementan con respecto a la concentración, comenzando en caso de AA desde 11.61% hasta 82.93 %, cuya efecto de concentración equivaldría aproximadamente a una concentración de 7 μ M de ácido ascórbico (figura 32).

En este material se encontró una relación más clara entre actividad antioxidante y oxidante y la concentración, las actividades aumentan gradualmente. Si recordamos el bagazo de caña fue el material que si nos basamos en la cantidad de azúcares totales y reductores, tuvo menor deslignificación, por tanto menor concentración de los productos de deslignificación. Si son estos

productos los que confieren la capacidad oxidante o antioxidante es congruente que a la misma concentración de otras disoluciones, éste presente menor actividad.

4.5. Actividad Antimicrobiana

Tabla 17. Halos de inhibición (cm) medidos mediante la técnica de Kirby- Bauer de las disoluciones resultantes de los pretratamientos de pasto Taiwán (T), privilegio (P) y bagazo de caña (BC) con enzima peroxidasa (HRP) y lacasa (L)

	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>
Etanol	0.46±0.06	0.50±0.10
Acetona	0.30±0.00	0.30±0.06
BC(L)	0.60±0.00	0.30±0.00
BC(HRP)	-----	0.20±0.06
P(L)	0.30±0.06	0.40±0.06
P(HRP)	-----	-----
T(L)	0.30±0.06	0.40±0.00
T(HRP)	-----	-----

Al medir la actividad antimicrobiana se encontró que las disoluciones del pretratamiento con enzima lacasa inhiben el crecimiento de *S. aureus* y *E. coli*, mientras que con HRP, sólo la disolución resultante del pretratamiento de bagazo de caña inhibe a *E. coli*.

En general se puede observar en este primer estudio mayor susceptibilidad de Gram positivas a las distintas disoluciones lo que concuerda con la tendencia general de los bisfenoles (Tortora *et al.* 2007).

Para cuantificar la capacidad inhibitoria del crecimiento de las bacterias, de las disoluciones que presentaron halo de inhibición se prosiguió a estimar su concentración mínima inhibitoria (CMI) y posteriormente se cuantificó por densidad óptica la inhibición por efecto de concentración.

4.5.1. CMI

Tabla 18. CMI de las disoluciones resultantes de los diferentes pretratamientos, determinada por turbidez observada.

Concentración de lignina soluble (%)	Disolución	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>
0.225±	T(L)	10%	10%
0.33±	P(L)	10%	10%
0.21±	BC(L)	10%	10%
0.11±	BC(HRP)	10%	10%
	Etanol	5%	5%
	Acetona	5%	5%

4.5.2. Densidad óptica

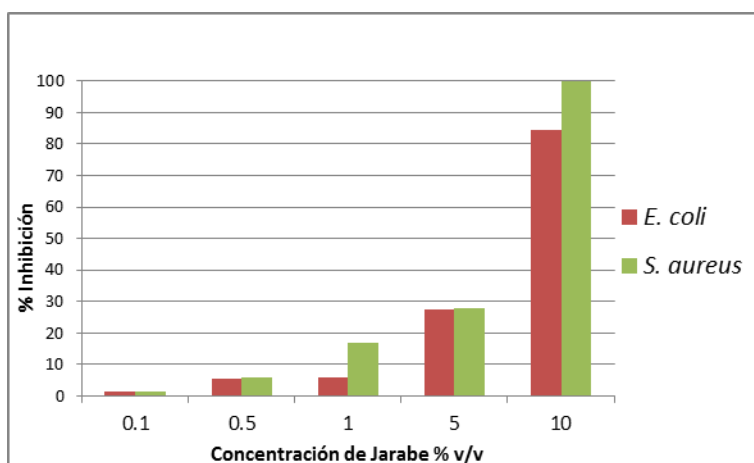


Figura 33. Actividad antimicrobiana de la disolución resultante del pretratamiento con enzima lacasa aplicada al pasto Taiwán

A la concentración de la disolución en el medio de 10% se inhibió el 100% de *S. aureus* y el 84.66% de *E. coli* (figura 33) por lo que en general podríamos sugerir que las bacterias Gram (+) son más susceptibles a los productos generados de la deslignificación del pasto Taiwán, comportamiento que ya se había mencionado antes, lo presentan los bisfenoles.

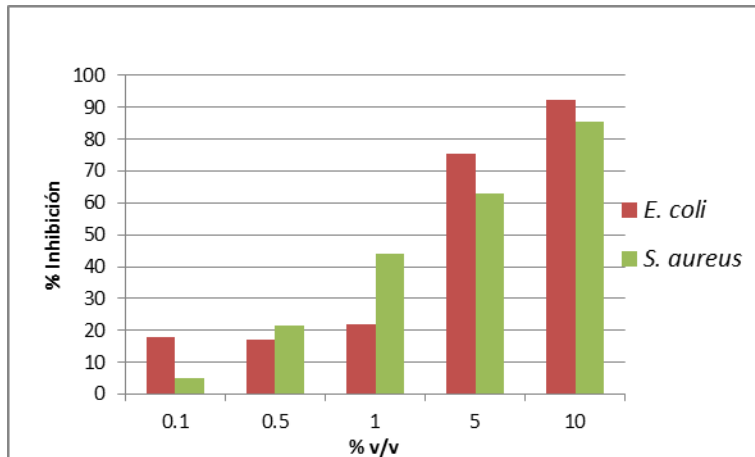


Figura 34. Actividad antimicrobiana de la disolución resultante del pretratamiento con enzima lacasa aplicada al pasto privilegio

La disolución resultante de pasto privilegio tuvo un comportamiento diferente, a altas concentraciones parece ser más efectivo contra Gram (-), pero a medida que la concentración disminuye el daño es constante en Gram (-) mientras que con Gram (+) la inhibición es proporcional a la concentración de la disolución (figura34).

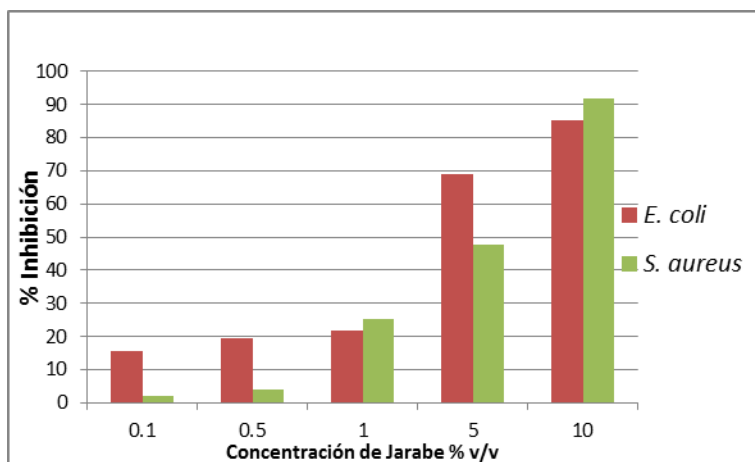


Figura 35. Actividad antimicrobiana de la disolución resultante del pretratamiento con enzima lacasa aplicado a bagazo de caña

Del jarabe resultante del tratamiento aplicado a bagazo de caña con enzima lacasa se presenta un comportamiento similar al privilegio con excepción de la concentración más alta donde se ve mayor inhibición en *S. aureus* (Figura 35).

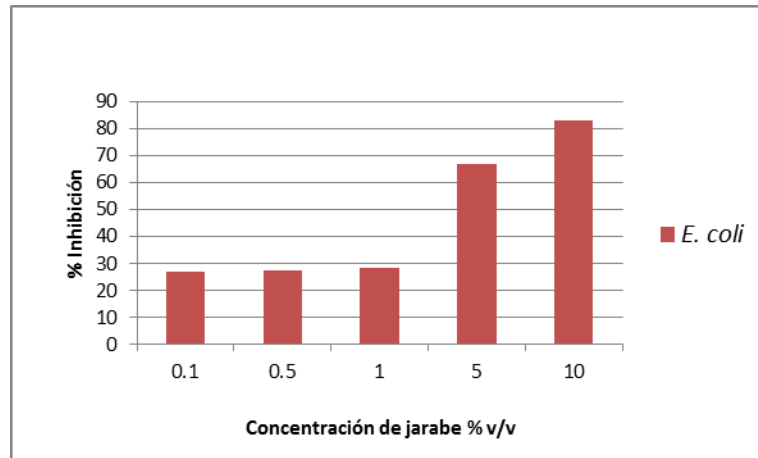


Figura 36. Actividad antimicrobiana de la disolución resultante del pretratamiento con enzima HRP aplicado a bagazo de caña

En bagazo de caña con HRP el comportamiento es similar al pretratado con lacasa en cuanto a Gram (-) refiere, sólo que como se puede observar y se mencionó anteriormente este jarabe no presenta efecto en Gram (+) (figura 36), considerando que de las disoluciones resultantes del pretratamiento con HRP sólo la disolución del bagazo de caña mostró actividad antimicrobiana existe la posibilidad de que esa actividad sea provocada por algún compuesto propio del material al que es susceptible *E. coli* y no es provocada por los productos de deslignificación.

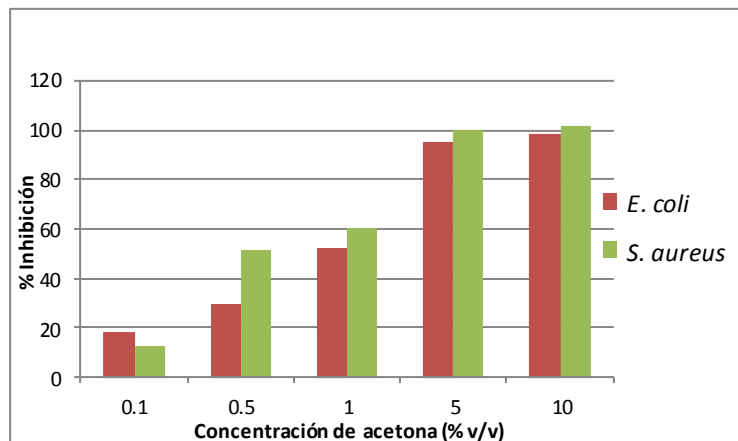


Figura 37. Actividad antimicrobiana de la acetona

La acetona inhibió a ambos microorganismos casi por igual, con una tendencia proporcional a la concentración. Se puede observar que la concentración mínima inhibitoria oscila alrededor del 5% y los jarabes resultantes de los pretratamientos están en 10% por lo que podemos considerar que el efecto de los jarabes obtenidos en la inhibición de los microorganismos estudiados es importante (figura 37).

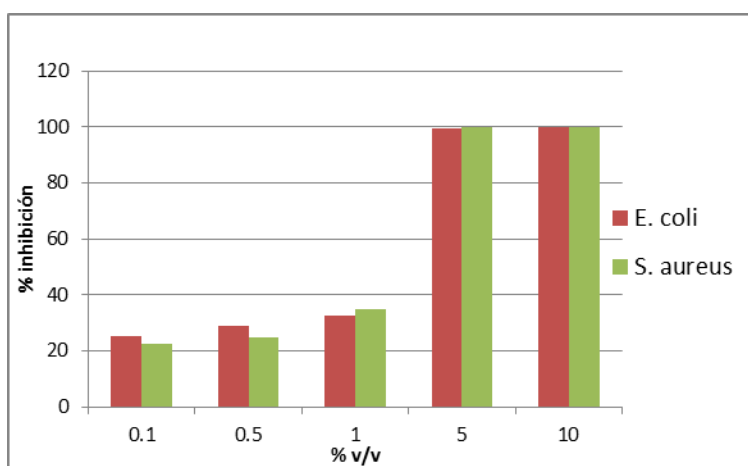


Figura 38. Actividad antimicrobiana del etanol

En el etanol la inhibición parece mantenerse constante para ambos microorganismos a medida que la concentración disminuye (figura 38), aun así al igual que la acetona la CMI está en el 5%. Este comportamiento puede asociarse a que el mecanismo de acción del etanol sobre las bacterias es la desnaturalización de sus proteínas en presencia de agua (ya que esta retrasa la evaporación y aumenta el tiempo de contacto).

En general el hecho de que las disoluciones resultantes de los diferentes materiales pretratados con enzima lacasa sean los que tenga poder inhibitorio, tiene sentido ya que los compuestos, como se analizó en el capítulo anterior, son compuestos oxidantes. Por tanto pueden dañar a la célula mediante la oxidación de los lípidos y proteínas presentes en su membrana y con esto impedir su desarrollo. Sería conveniente estudiar el efecto bactericida para verificar si el efecto oxidante es tal que cause la muerte del microorganismo.

CONCLUSIONES

- El uso de las enzimas lacasa y HRP promueven la deslignificación del material lignocelulósico, no genera un incremento significativo de la cantidad de lignina soluble. Sin embargo, sí se observa una mayor disponibilidad de la celulosa a una subsecuente sacarificación enzimática.
- Las condiciones de oxidación enzimática con lacasa en el dominio experimental estudiado del pasto Taiwán, que más favorecen la generación de AT y AR, son $t = 75$ min, sólidos = 10 % p/v y 1.37 UI/g de biomasa. Mientras que para HRP a 10% de sólidos, son $t = 150$ min, $[H_2O_2] = 866 \mu M/g$ de biomasa y 3.13×10^{-2} UI/g de biomasa.
- La eficiencia del pretratamiento con las enzimas lacasa y HRP está en función del tipo de material que se utiliza, por lo que las condiciones de deslignificación enzimática deberán ser ajustadas para cada caso particular.
- Las disoluciones resultantes del pretratamiento con la enzima HRP presentan actividad antioxidante mientras que las disoluciones resultantes del pretratamiento con enzima lacasa presentan actividad oxidante.
- Las disoluciones resultantes del pretratamiento con lacasa de los materiales bagazo de caña, pasto privilegio y Taiwán inhiben el crecimiento de *S. aureus* y *E. coli*, mientras que las disoluciones del pretratamiento de bagazo de caña con HRP sólo inhibe a *E. coli*.

Recomendaciones

- Evaluar la actividad antioxidante del pretratamiento con las enzimas lacasa y peroxidasa proveniente de otras fuentes.
- Identificar los compuestos resultantes de los diferentes pretratamientos, responsables de la actividad funcional.
- Estudiar el efecto de las condiciones del pretratamiento en la actividad funcional.
- Estudiar el efecto del tiempo en la actividad antioxidante y antimicrobiana de la disolución resultante de cada pretratamiento.

BIBLIOGRAFÍA

- Agematu, H., Shibamoto, N., Nishida, H., Okamoto, R., Shin, T., Murao, S. 1993. Oxidative decarboxilation of 4-hydroximandelic acid and 2-(4-hydroxyphenyl) glycine by laccase from *Trachyderma tsunodae* and *Myrothecium verrucaria*. Biosci. Biotechnol. Biochem. 57, 1877-1881.
- Álvarez, C., 2009. Biocombustibles: desarrollo histórico y tecnológico. Mercados actuales y comercio internacional.
- Arnao, M., Cano, A., and Acosta, M. 1999. Methods to measure the Antioxidant Activity in Plant Material. A comparative Discussion. 31,89-96.
- Barroso, M. 2010. Pretratamiento de biomasa celulósica para la obtención de etanol en el marco de biorefinería, [en línea].
Disponible en:
http://oa.upm.es/10559/1/MIGUEL_BARROSO_CASILLAS.pdf [último acceso 17/03/2014]
- Bourbonnais, R., and G. Paice, M. 1990. Oxidation of non-phenolic substrate an expanded role for laccase in lignin biodegradation. FEBS LETTERS; 267(1), 99-102.
- Bourbonnais, R., Paice, M. G., Reid, I. D., Lanthier, P., Yaguchi, M. 1995. Lignin oxidation by laccase isozymes from *Trametes versicolor* and role of the mediator 2,2'-azinobis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonate) in kraft lignin depolimerization. Appl. Environ. Microbiol. 61,1876-1880.
- BRENDA The comprehensive Enzyme information System. [en línea] (nueva versión Enero del 2014)
Disponible en:
<http://www.brenda-enzymes.info/> [último acceso 17/06/2014]
- Carreón, O., Sabido, A., et al., 2009. Etanol carburante. Bio Tecnología, 13(3) ,79-102.
- Cuervo, L., Folch J.L, Quiroz R E. 2009. Lignocelulosa como fuente de azúcares para la producción de etanol. Bio tecnología 13(3), 11-25.

- Dávila, G., Vázquez, R. 2006. Enzimas ligninolíticas para fines ambientales. Instituto de biotecnología UNAM, Mensaje Bioquímico, XXX, 29-55
- FAO Efectos de los biocombustibles en el medio ambiente [en línea] <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/011/i0100s/i0100s05.pdf>[último acceso 17/03/2014]
- Fan, L., Gharpuray, M., and Lee, H. 1987. In Cellulose Hydrolysis Biotechnology Monographs. Springer. Berlin p.57
- Frei, B., 1994. Natural antioxidant in human health and disease. San Diego. Academic Press.
- Galbe, M., & Zacchi, G. 2002. A review of the production of ethanol from softwood. Appl. Microbiol. Biotechnol. 59,618-628.
- Gellerstedt, G., Li, J., Eide, I., Kleinert, M. & Barth, T. (2008). Chemical structures present in biofuel obtained from lignin. Energy & Fuels, 22, 4240-4244.
- Hyman, D. 2008. Determination of Acid Soluble Lignin Concentration Curve by UV-Vis Spectroscopy Technical Report NREL/TP-510-42617, 1-10.
- Iglesias, N., 2008. Actividades glicosidasas sobre el xiloglucano de la pared celular de Arabidopsis thaliana Univ Santiago Compostela.
- Iiyama, K., Lam T.B.T. and Stone B.A. 1990. Phenolic acid bridges between polysaccharides and lignin in wheat internodes. Phytochemistry, 29, 733-737.
- Iliera, M., Iliera, J., Illiera, J, C. Vitaminas y Minerales. Madrid: Editorial computense, 2000.
- IUPAC. Compendium of Chemical Terminology, 2nd ed (the “Goold book”) Oxford 1997 [en línea] <http://goldbook.iupac.org/D01569.html> (último acceso 17/09/2014)
- Jiménez, G., Mejía, A. y López, B. 1999. Actividad de las enzimas ligninolíticas del Paneroachete chryososporium y su variación con la adición de Mn²⁺. Rev. Acad. Colomb. Cienc. 23 (89) ,587-594

- Kersten, P.J., Tien, M., Kalyanaraman, B. y Kirk, T.K.1985.The ligninase of *Phanerochaete chrysosporium* generates cation radicals from methoxybenzenes. *J. Biol. Chem.* 260, 2609-2611.
- Lee, H. 2002 .Fundamentos de biotecnología de los alimentos. Acribia.
- Leonowicz, A., Edgehill, R. U., Bollag, J. M. 1984. The effect of pH on the transformation of syringic and vainillic acids by the laccases of *Rhizoctonia praticola* and *Trametes versicolor*. *Arch. Microbiol.*137, 89-96.
- Mackerras, D., 1995. Antioxidant and health. Fruits and vegetables of supplements?. *Food Australia* 47S, 3-23
- McVaugh, R. 1983. Gramineae. En: W.R Anderson (ed.). *Flora Novo-Galiciana. A descriptive account of the vascular plants of western Mexico*, Vol. 14. The University of Michigan Press, Ann Arbor, Michigan
- Molina, J., 2011. Drogas antibacterianas [en línea]. Disponible en: <http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/bacteriologia/terapeutica.html> [último acceso 05/09/2014]
- Mussatto S. I, Teixeira J. A. 2010. Lignocellulose as raw material in fermentation processes. *Appliedmicrobiology and microbial biotechnology*.
- Nigel, C. 2008. Horseradish peroxidase: a modern view of a classic enzyme. *Phytochemistry.* 65,249-259
- Núñez, I. *Enzimología*. Madrid: Pirámide, 2012.
- Prinsen, P. 2010. Composición química de diversos materiales lignocelulósicos de interés industrial y análisis estructural de sus ligninas. Sevilla: IRNAS y CSIC.
- Pabón, M. *Notas de clase: Bioquímica ruminal*. Bogotá: Universidad Nacional de Colombia, 2004.
- Potthast, A., Rosenau, T., Chen, C.-L., Gratzl, J. S. 1995. Selective enzymatic oxidation of aromatic methyl groups to aldehydes. *J. Org .Chem.* 60:4320-4321.
- Ralph, J. y col. 1999. Are lignins optically active? *Journal of agriculture and Food Chemistry*, 47, 2991-2996.

- Quideau, S. y Ralph, J. 1997. Lignin-ferulate cross-links in grasses. Part 4. Incorporation of 5-5-coupled diferulate into lignin. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions*, 1, 2351-2358.
- SAGARPA 2010. Bases técnicas para el fomento a la producción de biocombustibles en el país a partir de caña de Azúcar.(http://www.infocana.gob.mx/materiales/Web_BIOCOMBUSTIBLES.pdf)
- Sarkanen, K.V. and Ludwig, C.H. 1971. Lignins. Occurrence, Fonnation, Structure and Reactions. New York: Wiley-Interscience
- Saha, BC. 2004. Lignocellulose biodegradation and applications in biotechnology. In: *Lignocellulose Biodegradation*. Saha BC, Hayashi K (eds). American Chemical Society, Washington. DC. 2-34.
- Scalbert, A., Monties B., Lallemand J.Y., Guittet E. and Rolando C. 1985. Ether linkage between phenolic acids and lignin fractions from wheat straw. *Phytochemistry*, 24, 1359-1362.
- SENER, 2006. Potenciales y Viabilidad del Uso de Bioetanol y Biodiesel para el Transporte en México. Edición de noviembre.[en línea]
http://www.sener.gob.mx/webSener/res/PE_y_DT/pub/Biocombustibles_en_Mexico_Estudio_Completo.pdf (último acceso 10/09/2014)
- SENER, 2011. Balance Nacional de Energía. [En línea]
http://www.sener.gob.mx/res/PE_y_DT/pub/2012/BNE_2011.pdf (último acceso 10/09/2014)
- Schoemaker, H.E., Harvey, P.J., Bowen, R.M. y Palmer, J.M. 1985. On the mechanism of enzymatic lignin breakdown. *FEBS Lett.* 183, 7-12.
- Schwartz, J., 1996. The dual roles of nutrients as antioxidants and prooxidants: their effects on tumor cell growth. *Journal of Nutrition*, 126S, 1221-1227.
- Smeds, A.I., Eklund, P.C., Sjöholm, R.E., Willford, S.M., Nishibe, S., Deyama. T., y Holmborn, B.R. 2007. Quatification of a broad spectrum of lignans in cereals oilseeds, and nuts. *Joournal of Agriculture and Food Chemistry*, 55, 1337-1346.

- Taiz, L., 2006. Fisiología vegetal. 3a edición. Castellón de la Plana. Universidad_Jaume.
- Tortora, G., Funke, B., Case, C. 2007. Introducción a la microbiología. 9 edición. Madrid.
- Unión Ganadera Regional de Jalisco (UGRJ). Zacates Perennes de corte. 2014 [en_línea]
<http://www.ugrj.org.mx> [último acceso 09/09/2014]
- Villaseñor, R., Espinosa, G. 1998. Catálogo de malezas de México. Universidad Nacional Autónoma de México. Consejo Nacional Consultivo Fitosanitario. Fondo de Cultura Económica. México, D.F.
- Woodings, C., 2001. Regenerated cellulose fibres. Elsevier
- Zaldivar, J., Martínez, A., & Ingram LO. 1999. Effect of selected aldehydes on the growth and fermentation of ethanogenic. Escherichia coli. Biotechnol. Bioeng. 65,24-33.
- Zhao, X., Cheng, K., and Liu, D. 2009. Organosolv pretreatment of lignocellulosic biomass for enzymatic hydrolysis Appl. Microbiol. Biotechnol. 82, 815-827.
- Zheng, Y., Pan, Z., and Zhang, R. 2009. Overview of biomass pretreatment for cellulosic ethanol production Int J. Agric & Biol Eng. 2(3), 52-54

ANEXO

Anexo A. Curvas de calibración de azúcares totales y reductores

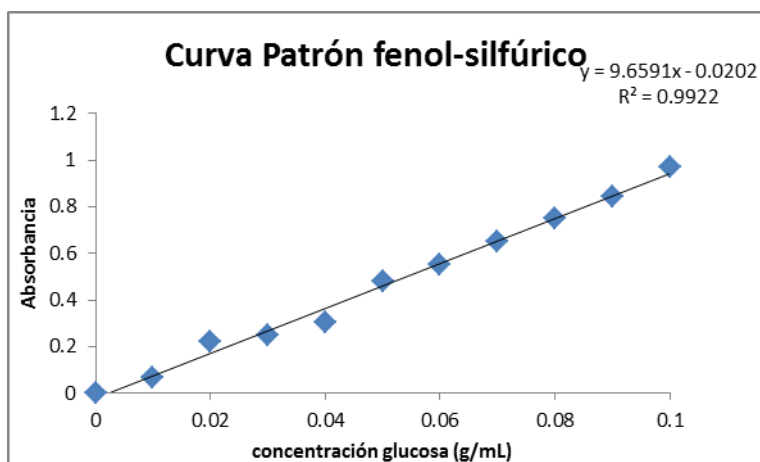


Figura A 1. Curva de calibración de glucosa para determinación de azúcares totales por el método fenol-sulfúrico

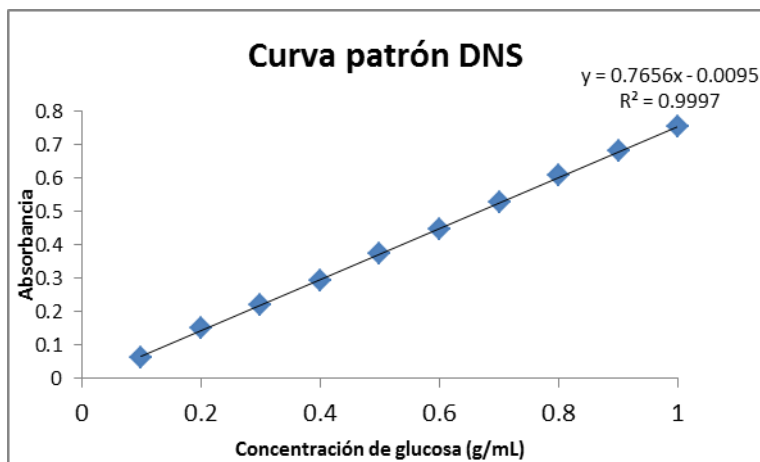


Figura A 2. Curva de calibración de glucosa para determinación de azúcares reductores por el método de DNS

Anexo B. Valores puntuales de caracterización enzimática y Anovas

Tabla A 1. Valores de actividad específica de Lacasa y HRP medida a diferente pH, T= 25°C.

Actividad específica (µmol/min*mg Enzima)	pH			
	4	5	6	7
Lacasa	7.31±0.60	5.45±0.40	6.45±0.60	0.06±0.00
HRP	1.77±0.03	2.37±0.06	1.64±0.00	0.55±0.01

Tabla A 2. Valores de actividad específica de lacasa y HRP medida a diferente temperatura, pH 5.

Actividad específica (µmol/min*mg enzima)	Temperatura		
	25°C	35°C	50°C
Lacasa	5.45±0.40	5.39±0.07	14.22±0.65
HRP	1.64±0.00	3.18±0.05	2.16±0.17

Tabla A 3. ANOVA de resultados de actividad específica de la enzima lacasa para valores de pH 4,5 y 6 ($\alpha=0.05$)

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico para F
Entre grupos	3.47	2	1.74	5.77	9.55
Dentro de los grupos	0.90	3	0.30		
Total	4.38	5			

Tabla A 4. ANOVA de resultados de actividad específica de la enzima HRP para valores de pH 4, 5,6 y 7 ($\alpha=0.05$)

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico para F
Entre grupos	3.46	3	1.15	825.62	6.59
Dentro de los grupos	0.01	4	0.00		
Total	3.47	7			

Tabla A 5. ANOVA de resultados de actividad específica de la enzima Lacasa para valores de temperatura 25 y 35°C ($\alpha=0.05$)

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico para F
Entre grupos	1.16	2	0.58	48.11	9.55
Dentro de los grupos	0.04	3	0.01		
Total	1.20	5			

Tabla A 6. ANOVA de resultados de actividad específica de la enzima HRP para valores de temperatura 25, 35 y 50°C ($\alpha=0.05$)

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico para F
Entre grupos	0.00	1	0.00	0.03	18.51
Dentro de los grupos	0.17	2	0.08		
Total	0.17	3			

Anexo C. Anovas y gráficos de valor normal vs residuos, valores predichos vs observados y residuos vs predichos obtenidas de los diseños de experimentos de los diferentes pretratamientos

Tabla A 7. Anova extraída de STATISTICA de azúcares reductores del pretratamiento con lacasa. ($\alpha=0.05$), $r= 0.99947$, M_s residual= 0.0306333

Factor	SS	df	MS	F	p
Curvatr.	7.3734	1	7.37339	240.698	0.004129
(1)[Enz] (mL)	4.6513	1	4.65125	151.836	0.006522
(2)Tiempo deslignificación (min)	16.8780	1	16.87805	550.970	0.001810
(3)Contenido de sólidos (%)	5.6113	1	5.61125	183.175	0.005415
1 by 2	14.1512	1	14.15120	461.954	0.002158
1 by 3	7.9202	1	7.92020	258.548	0.003845
2 by 3	11.0450	1	11.04500	360.555	0.002762
1*2*3	47.3365	1	47.33645	1545.260	0.000647
Error	0.0613	2	0.03063		
Total SS	115.0281	10			

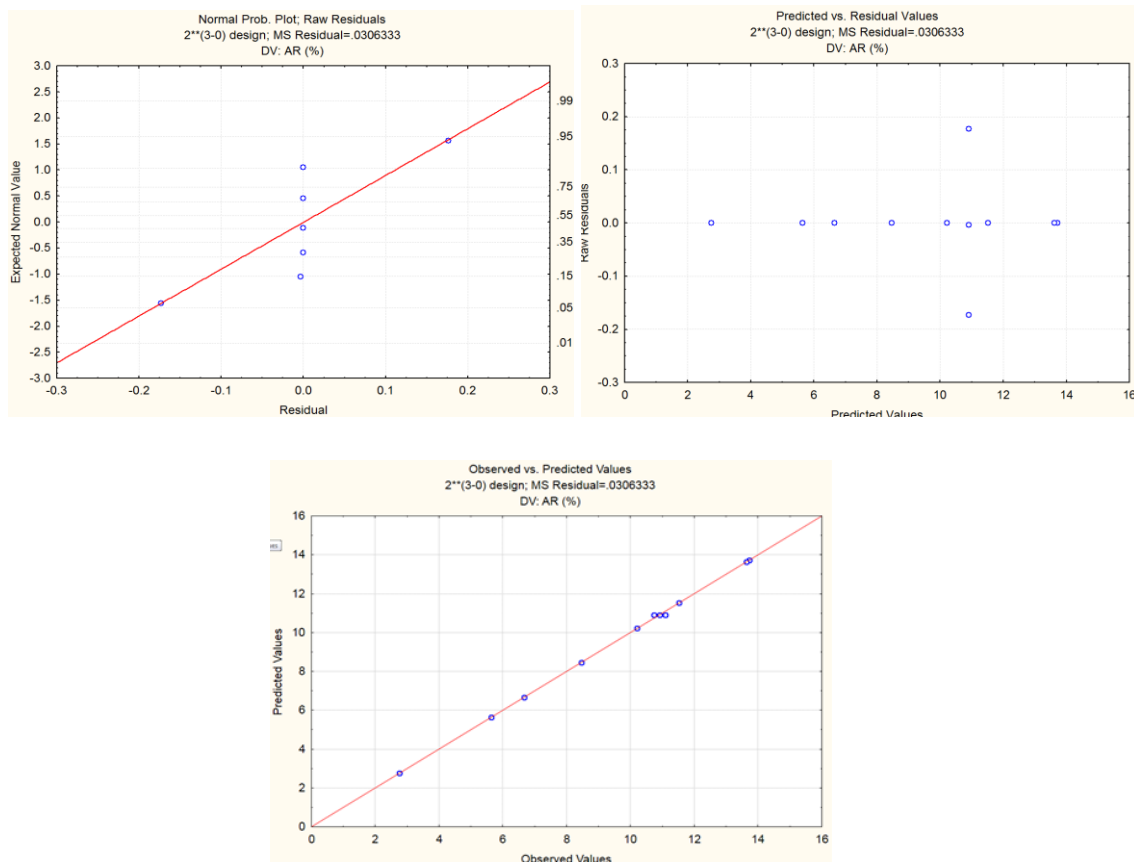


Figura A 3. Valor normal vs residuos, residuos vs predichos y valores predichos vs observados de azúcares reductores del pretratamiento con lacasa

Tabla A 8. Anova extraída de STATISTICA de azúcares totales del pretratamiento con lacasa ($\alpha=0.05$, $r= 0.99923$, M_s residual= 0.6516

Factor	SS	df	MS	F	p
Curvatr.	1496.259	1	1496.259	2296.284	0.000435
(1)[Enz] (mL)	0.259	1	0.259	0.398	0.592693
(2)Tiempo designificación (min)	144.840	1	144.840	222.284	0.004469
(3)Contenido de sólidos (%)	9.202	1	9.202	14.122	0.064079
1 by 2	13.056	1	13.056	20.037	0.046458
1 by 3	0.794	1	0.794	1.218	0.384743
2 by 3	12.103	1	12.103	18.575	0.049846
1*2*3	12.251	1	12.251	18.802	0.049287
Error	1.303	2	0.652		
Total SS	1690.067	10			

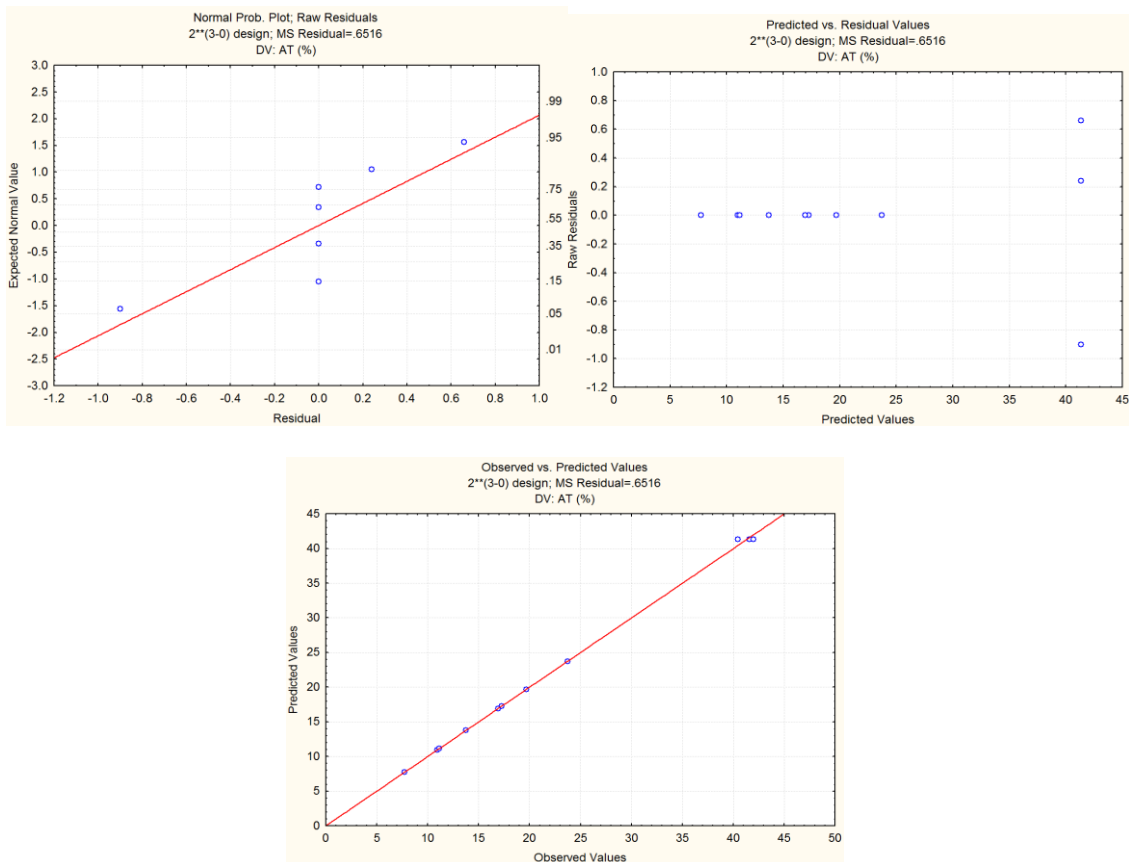


Figura A 4. Valor normal vs residuos, residuos vs predichos y valores predichos vs observados de azúcares totales del pretratamiento con lacasa.

Tabla A 9. Anova extraída de STATISTICA de lignina soluble del pretratamiento con lacasa ($\alpha=0.05$, $r= 0.9968$, $Ms\ residual= 0.002333$).

Factor	SS	df	MS	F	p
Curvatr.	0.057821	1	0.057821	247.8027	0.004011
(1)[Enz] (mL)	0.006555	1	0.006555	28.0934	0.033801
(2)Tiempo deslignificación (min)	0.018336	1	0.018336	78.5834	0.012487
(3)Contenido de sólidos (%)	0.027730	1	0.027730	118.8434	0.008310
1 by 2	0.009591	1	0.009591	41.1048	0.023475
1 by 3	0.006555	1	0.006555	28.0934	0.033801
2 by 3	0.006216	1	0.006216	26.6405	0.035547
1*2*3	0.012561	1	0.012561	53.8334	0.018074
Error	0.000467	2	0.000233		
Total SS	0.145832	10			

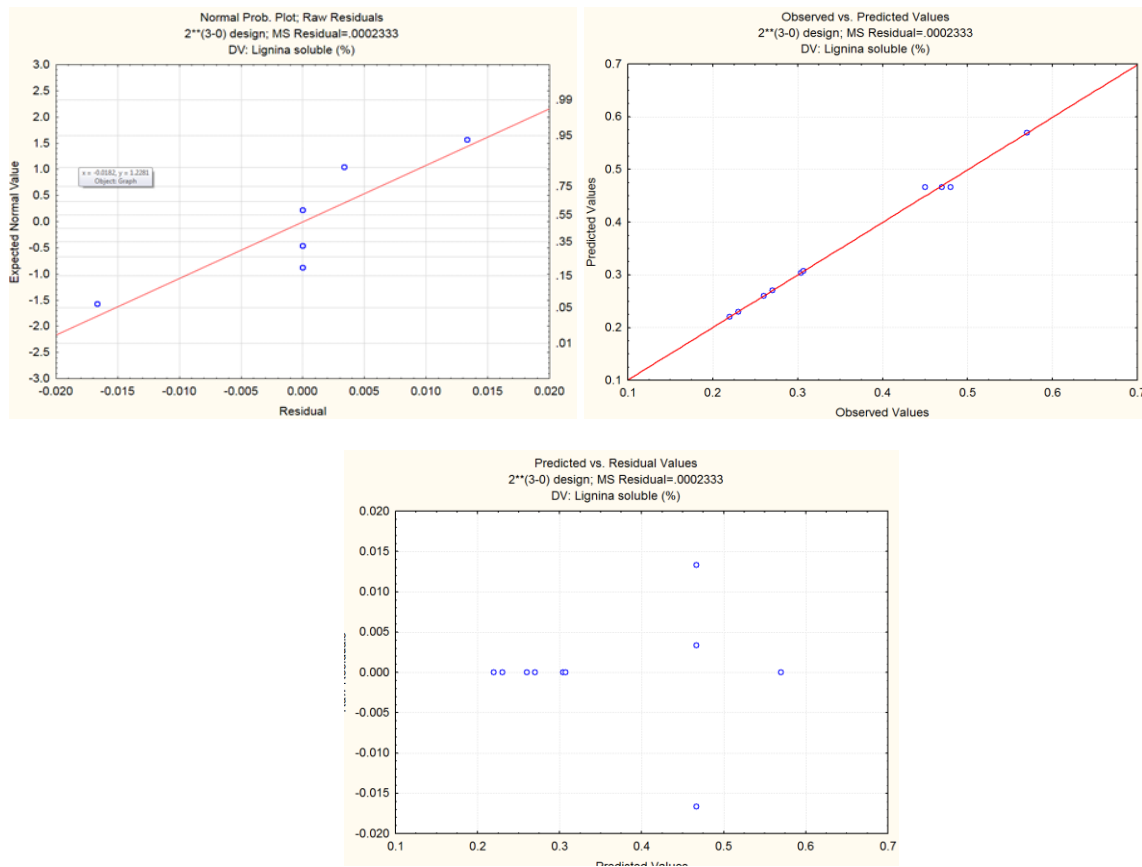


Figura A 5. Valor normal vs residuos, residuos vs predichos y valores predichos vs observados de lignina soluble del pretratamiento con lacasa.

Tabla A 10. Anova extraída de STATISTICA de azúcares reductores del pretratamiento con HRP ($\alpha=0.05$), $r= 0.99177$, $Ms\ residual= 0.264033$.

Factor	SS	df	MS	F	p
Curvatr.	0.02865	1	0.02865	0.10849	0.773162
(1)[HRP] (mL)	16.04611	1	16.04611	60.77306	0.016059
(2)Tiempo (min)	6.49801	1	6.49801	24.61058	0.038313
(3)[H2O2] (microM)	1.35301	1	1.35301	5.12440	0.151899
1 by 2	23.35861	1	23.35861	88.46842	0.011115
1 by 3	12.42511	1	12.42511	47.05888	0.020596
2 by 3	0.53561	1	0.53561	2.02858	0.290390
1*2*3	3.36701	1	3.36701	12.75223	0.070254
Pure Error	0.52807	2	0.26403		
Total SS	64.14020	10			

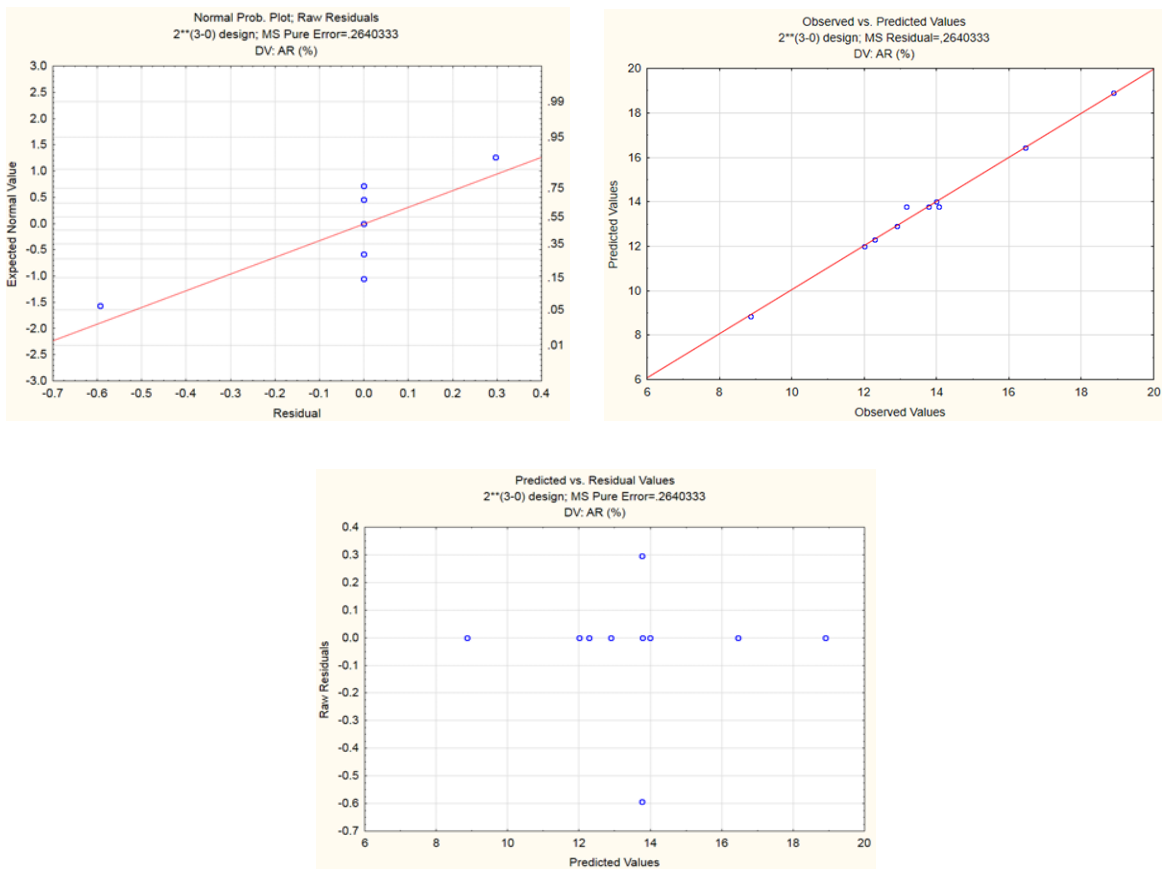


Figura A 6. Valor normal vs residuos, residuos vs predichos y valores predichos vs observados de azúcares reductores del pretratamiento con HRP

Tabla A 11. Anova extraída de STATISTICA de azúcares totales del pretratamiento con HRP ($\alpha=0.05$), $r = 0.99631$, $Ms_{residual} = 1.026633$.

Factor	SS	df	MS	F	p
Curvatr.	6.4016	1	6.4016	6.2356	0.129856
(1)[HRP] (mL)	3.2896	1	3.2896	3.2043	0.215334
(2)Tiempo (min)	2.3653	1	2.3653	2.3040	0.268351
(3)[H2O2] (microM)	250.3203	1	250.3203	243.8264	0.004076
1 by 2	159.0436	1	159.0436	154.9176	0.006393
1 by 3	46.5130	1	46.5130	45.3064	0.021367
2 by 3	38.4126	1	38.4126	37.4161	0.025701
1*2*3	47.8731	1	47.8731	46.6312	0.020779
Pure Error	2.0533	2	1.0266		
Total SS	556.2725	10			

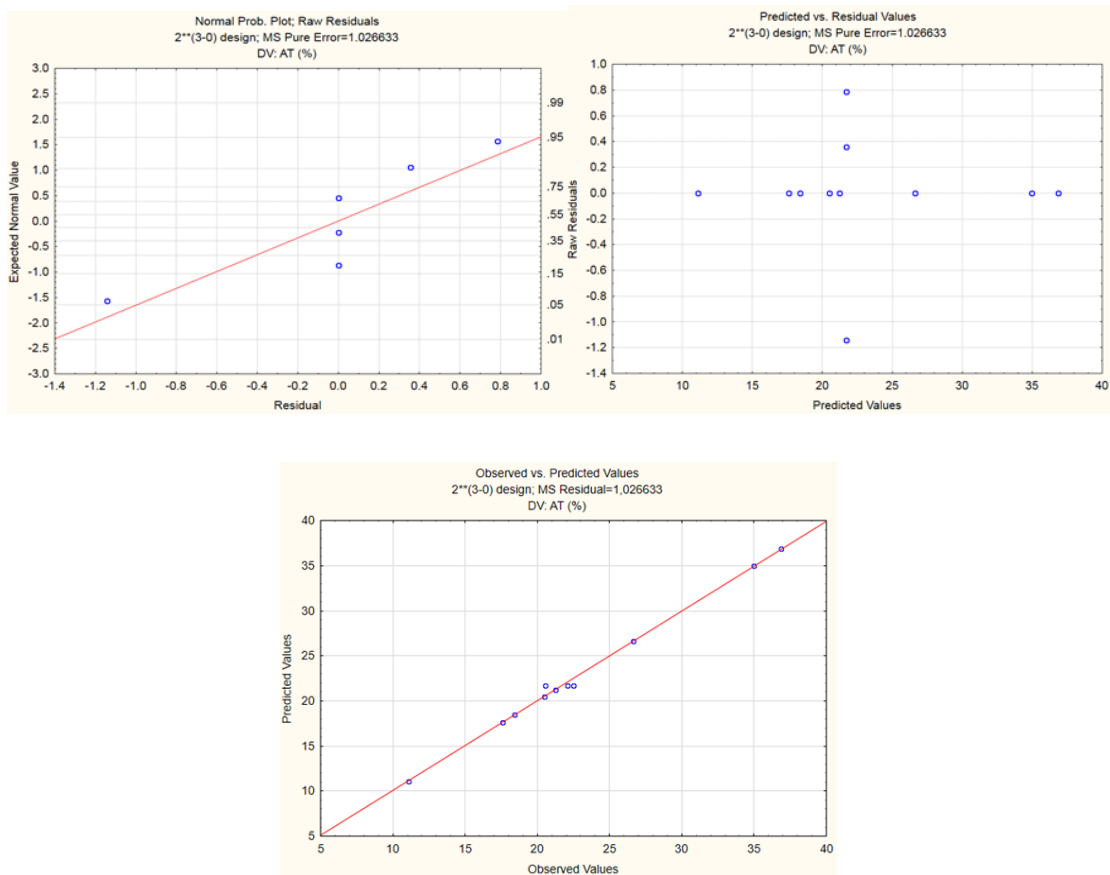


Figura A 7. Valor normal vs residuos, residuos vs predichos y valores predichos vs observados de azúcares totales del pretratamiento con HRP

Tabla A 12. Anova extraída de STATISTICA resultados de azúcares totales del pretratamiento con HRP ($\alpha=0.05$), $r = 0.99449$, $Ms\ residual = 0.000333$

Factor	SS	df	MS	F	p
Curvatr	0.000024	1	0.000024	0.7273	0.483602
(1)[HRP] (mL)	0.006050	1	0.006050	181.5000	0.005465
(2)Tiempo (min)	0.002450	1	0.002450	73.5000	0.013334
(3)[H2O2] (microM)	0.000050	1	0.000050	1.5000	0.345346
1 by 2	0.000200	1	0.000200	6.0000	0.133975
1 by 3	0.003200	1	0.003200	96.0000	0.010257
2 by 3	0.000000	1	0.000000	0.0000	1.000000
1*2*3	0.000050	1	0.000050	1.5000	0.345346
Pure Error	0.000067	2	0.000033		
Total SS	0.012091	10			

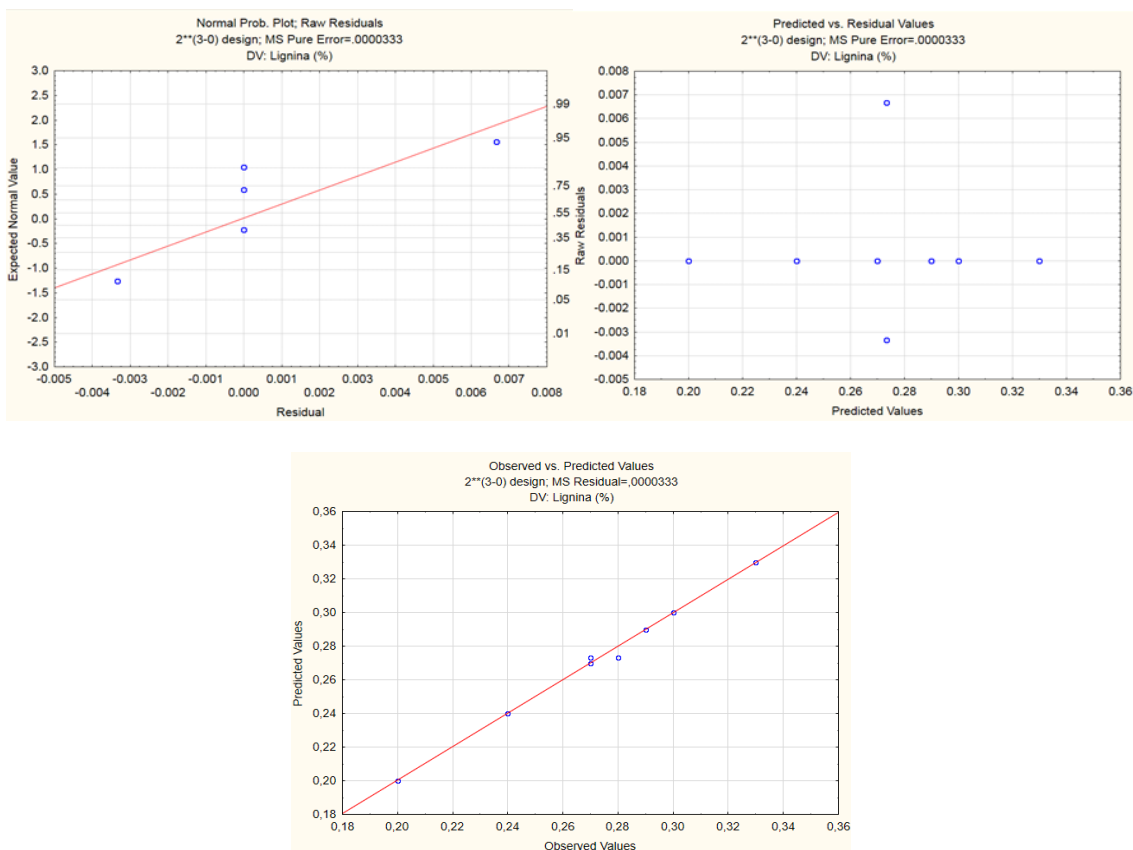


Figura A 8. Valor normal vs residuos, residuos vs predichos y valores predichos vs observados de lignina soluble del pretratamiento con HRP.

Anexo D. Anovas de las diferentes variables de respuesta de los pretratamientos con lacasa del modelo simplex

Tabla A 13. ANOVA de resultados de azúcares reductores utilizando lacasa como pretratamiento ($\alpha=0.05$)

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico para F
Entre grupos	37.27	2	18.63	95.20	9.55
Dentro de los grupos	0.58	3	0.19		
Total	37.85	5			

Tabla A 14. ANOVA de resultados de azúcares totales utilizando lacasa como pretratamiento ($\alpha=0.05$)

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico para F
Entre grupos	231.79	2	115.89	1131.58	9.55
Dentro de los grupos	0.30	3	0.10		
Total	232.09	5			

Tabla A 15. ANOVA de resultados de lignina soluble utilizando lacasa como pretratamiento ($\alpha=0.05$)

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico para F
Entre grupos	1.30×10^{-3}	2	6.50×10^{-4}	472.82	9.55
Dentro de los grupos	4.15×10^{-6}	3	1.37×10^{-6}		
Total	1.30×10^{-3}	5			