



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**EVALUACIÓN DE LA EFICACIA DE LA
DESLIGNIFICACIÓN DEL ASERRÍN POR ENZIMAS Y
POR UN DISOLVENTE IÓNICO**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUIMICO**

PRESENTA

GUILLERMO ANTONIO HUERTA MIRANDA

MÉXICO, D.F.

2012





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:	PROFESOR: DRA. IRMA OFELIA BERNAL LUGO
VOCAL:	PROFESOR: DR. ROGELIO RODRIGUEZ SOTRES
SECRETARIO: AGUILAR OSORIO	PROFESOR: DR. JOSE GUILLERMO DE JESUS
1ER. SUPLENTE:	PROFESOR: QFB. ALEJANDRO CAMACHO CRUZ
2DO. SUPLENTE: VALDEZ	PROFESOR: QFB. VERONICA DOMINGUEZ

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

LABORATORIO 104 CONJUNTO E FACULTAD DE QUÍMICA

ASESOR DEL TEMA:

DRA. IRMA OFELIA BERNAL LUGO

SUSTENTANTE:

GUILLERMO ANTONIO HUERTA MIRANDA

Reconocimiento a la Facultad de Química por el financiamiento de este trabajo a través del PAIP-4290-01 y la beca otorgada por el subprograma 127.

Agradecimientos.

- ❖ A mis padres Margarita y José Antonio por su cariño y por todo su apoyo a lo largo de mi vida.
- ❖ A mi hermana Ayla por su cariño y amistad a lo largo de todo este camino recorrido.
- ❖ A mis primos Diana, Marisol, Miguel, Juan, David y Rodrigo por las aventuras y a mi sobrina Adriana por su amistad y cariño.
- ❖ A la memoria de mis Abuelos Margarito, Juan y Ángela H. Con especial dedicatoria a mi abuela Ángela G. por cuidarme y ver por mí y mi hermana desde chicos
- ❖ A mis compañeros del grupo 18 por dejarme iniciar este camino universitario con ellos.
- ❖ A mis hermanos adoptivos: Giuli, Blanca, Diana, Thalía, Licha, Tania, Vladimir, Rubén, Jorge, Gustavo, Ángel, Jesús, Fernando, Rodrigo y Joaquín por las aventuras y por todo el apoyo emocional que me han brindado a lo largo de mi carrera y vida.

- ❖ A la Dra. Irma Bernal por dejarme pertenecer a su laboratorio y por su apoyo, asesoría y consejos durante el desarrollo de este proyecto.
- ❖ A la Q.F.B. Laurel Fábila por su apoyo técnico durante los experimentos realizados en este trabajo.
- ❖ A la Dra. Carmina Montiel por su asesoría, apoyo técnico y por proporcionarnos el líquido iónico [Bmim] y las hidrolasas.
- ❖ A los profesores Dr. Guillermo Aguilar y Q.F.B. Ignacio Camacho por su asesoría en este trabajo.
- ❖ A las profesoras M. en C. María de los Ángeles Valdivia López y la QFB. Bertha Julieta Sandoval Guillén por los análisis de proteína cruda.
- ❖ Al Ing. Q. Iván Puente Lee, por su colaboración con las micrografías de microscopía electrónica de barrido.
- ❖ Al Dr. Oscar Velazco, IPN por proporcionarnos el sustrato de Durango.
- ❖ A la UNAM por todo el aprendizaje brindado y por la gran oportunidad que me dio de pertenecer a la comunidad Universitaria

Índice.

Índice de figuras	I
Abreviaturas	IV
1. Resumen.	1
2. Introducción.	2
3. Antecedentes.	4
3.1. Definición de biomasa	4
3.2. Fuentes de biomasa	4
3.3. Fuentes secundarias, residuos lignocelulósicos.	4
3.4. Utilización de los residuos lignocelulósicos.	6
3.5. Composición y características químicas de los residuos lignocelulósicos.	7
3.6. Celulosa.	11
3.7. Hemicelulosa.	13
3.8. Lignina.	15
3.9. Pretratamientos.	20
3.9.1. Enzimas ligninolíticas.	21
3.9.2. Líquidos iónicos.	26
4. Hipótesis	29
5. Objetivos.	30
5.1. Objetivo general.	30

5.2. Objetivos particulares.	30
6. Materiales y métodos	31
6.1. Sustratos.	31
6.2. Fragmentación y tamizado.	31
6.3. Contenido de humedad.	32
6.4. Contenido de cenizas.	33
6.5. Extracción de compuestos solubles en acetona	34
6.6. Contenido de proteína cruda.	36
6.7. Hidrólisis química.	37
6.7.1. Cuantificación de azúcares reductores.	38
6.7.2. Cuantificación de lignina soluble en H₂SO₄.	39
6.7.3. Cuantificación de lignina insoluble en H₂SO₄.	40
6.8. Pretratamientos.	41
6.8.1. Pretratamiento con enzimas ligninolíticas.	42
6.8.1.1. Cuantificación de lignina solubilizada por las enzimas ligninolíticas.	44
6.8.2. Pretratamiento con líquidos iónicos.	44
6.9. Hidrólisis enzimática.	46
6.10. Metodologías complementarias.	49
6.10.1. Secado de crisoles y crisoles gooch de porcelana.	49
6.10.2. Secado de cartuchos de celulosa.	49
6.10.3. Secado y contenido de humedad en papel filtro.	50
6.10.4. Preparación del reactivo de DNS y curva de calibración.	51

6.10.5. Estabilidad de la actividad enzimática de las hidrolasas.	52
7. Resultados y discusión	54
7.1. Características físicas visuales de los sustratos.	54
7.2. Composición química de los aserrines.	57
7.2.1. Contenido de carbohidratos y lignina.	59
7.3. Deslignificación del aserrín.	65
7.3.1. Efecto de las enzimas ligninolíticas en la deslignificación.	65
7.3.2. Efecto de los líquidos iónicos en la deslignificación.	75
7.3.2.1. Deslignificación de acuerdo al tipo de líquido iónico.	75
7.3.3.2. Efecto del tiempo y [Emim] en la deslignificación.	79
7.4. Disponibilidad de los carbohidratos mediante los pretratamientos.	82
7.4.1. Efecto de las enzimas ligninolíticas en la disponibilidad de los carbohidratos.	82
7.4.2. Efecto del tipo de líquido iónico en la accesibilidad a los carbohidratos.	86
7.4.2.1. Efecto del tiempo en el pretratamiento con [Emim] sobre la accesibilidad de los carbohidratos en los sustratos L-104-X y L-104-D.	88
8. Conclusiones.	93
9. Perspectivas	94
9. Anexo.	95
1A. figuras de apoyo de la sección 6.11.5.	95
2A. figuras de apoyo de la sección 7.3.1.	95

3A. figuras de apoyo de la sección 7.3.1.	96
4A. figuras de apoyo de la sección 7.3.2.1.	97
5A. figuras de apoyo de la sección 7.3.3.2.	99
10. Referencias.	100

Índice de figuras y tablas.

Figura o tabla	Página
Tabla 3.1. Producción anual de algunos residuos lignocelulósicos.	5
Tabla 3.2. Composición de algunos residuos lignocelulósicos	8
Figura 3.1. Diagrama de la estructura de la pared celular secundaria	10
Figura 3.2. Estructura de la molécula de celulosa.	11
Figura 3.3. Puentes de hidrógeno en celulosa cristalina y amorfa.	13
Figura 3.4. Estructura del O-acetil-galactoglucomanano.	14
Figura 3.5. Monómeros de lignina.	16
Figura 3.6. Nomenclatura de las posiciones y enlaces en la lignina.	18
Figura 3.7. Modelo de la estructura de lignina.	19
Figura 3.8. Ciclo catalítico de manganeso peroxidasa.	23
Figura 3.9. Ciclo catalítico de la lacasa.	24
Figura 3.10. Degradación de lignina por el sistema enzima/cooxidante.	25
Figura 3.11. Cationes mayormente empleados en líquidos iónicos.	27
Tabla 3.3. Aniones mayormente utilizados en líquidos iónicos.	27
Tabla 6.1. Condiciones de extracción con acetona.	34
Figura 6.1. Esquema del sistema Soxhlet.	35
Figura 6.2. Procedimiento durante la hidrólisis ácida.	38
Tabla 6.2. Pretratamiento enzimático de las muestras de aserrín.	42
Figura 6.3. Procedimiento general con las enzimas ligninolíticas.	43
Figura 6.4. Estructura de los líquidos iónicos empleados.	45
Tabla 6.3. Disolventes empleados para la separación de la biomasa.	45
Figura 6.5. Procedimiento general del pretratamiento con líquidos iónicos.	46
Tabla 6.4. Actividad de las hidrolasas en las preparaciones comerciales.	47
Tabla 6.5. Componentes de las soluciones de hidrolasas.	48

Figura 6.6. Procedimiento general de las hidrólisis enzimáticas.	48
Figura 6.7. Crisoles y crisoles Gooch de porcelana	49
Figura 6.8. Cartuchos de celulosa para extracción tipo Soxhlet.	50
Tabla 6.6. Reactivos para la preparación de solución DNS	51
Tabla 6.7. Curva de calibración con DNS.	52
Figura 7.1. Fotografías de los aserrines estudiados.	55
Figura 7.2. Imágenes de microscopía electrónica de barrido 1.	57
Tabla 7.1 Análisis de composición de las muestras de aserrín.	58
Tabla 7.2. Condiciones para la optimización de la hidrólisis ácida.	60
Figura 7.3 Optimización de la hidrólisis ácida.	61
Figura 7.4. Composición de L-104-X	62
Figura 7.5. Lignina soluble e insoluble en los aserrines.	64
Figura 7.6. Espectro de absorción de las muestras con Lac.	67
Figura 7.7. Espectros de absorción de las muestras con MnP	68
Figura 7.8. Lignina disuelta por enzimas.	69
Figura 7.9. Deslignificación de los aserrines por enzimas.	71
Figura 7.10. Imágenes de microscopía electrónica de barrido 2.	72
Figura 7.11. Deslignificación por los líquidos iónicos.	77
Figura 7.12. Deslignificación de L-104-Xte por [Emim].	80
Figura 7.13. Deslignificación de L-104-Dte por [Emim].	81
Figura 7.14. Azúcares reductores cuantificados 1	83
Figura 7.15. Azucares reductores cuantificados 2	84
Figura 7.16. Azucares reductores cuantificados 3	86
Figura 7.17. Azucares reductores cuantificados 4	87
Figura 7.18. Azúcares reductores cuantificados 5.	89
Figura 7.19. Imágenes de microscopía electrónica de barrido 3.	90
Figura 7.20. Comparación de la composición de los sustratos.	91
Tabla 1A. Actividades enzimáticas de las mezclas de hidrolasas.	95
Figura 2A. Pretratamiento aplicado en L-104-Xte con las enzimas ligninolíticas.	96
Figura 3A. Pretratamiento aplicado a ambos sustratos con las enzimas ligninolíticas.	97
Figura 4A. Pretratamiento aplicado a L-104-Xte con líquidos iónicos.	98

Tabla 4A. Absorbancia de lignina soluble en [Emim].	98
Figura 5 A. Pretratamiento con [Emim] aplicado en ambos sustratos.	99

Abreviaturas.

- **[Bmim]**: cloruro de 1-butil-3-metilimidazolio.
- **[Emim]**: acetato de 1-etil-3-metilimidazolio.
- **ABTS**: ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico).
- **AV**: alcohol veratrílico.
- **DNS**: ácido 3,5-dinitrosalicílico.
- **EN**: mezcla de enzimas ENMEX®
- **GE**: mezcla de enzimas GENENCOR®
- **L-104-D**: aserrín de Durango.
- **L-104-Dt**: aserrín de Durango tamizado
- **L-104-Dte**: aserrín de Durango tamizado y libre de extraíbles.
- **L-104-X**: aserrín de Xochimilco.
- **L-104-Xt**: aserrín de Xochimilco tamizado
- **L-104-Xte**: aserrín de Xochimilco tamizado y libre de extraíbles.
- **Lac**: lacasa.
- **MnP**: manganeso peroxidasas.

1. Resumen.

En la actualidad, la remoción de lignina de residuos lignocelulósicos se realiza con tratamientos que generan diversos contaminantes ambientales. Por lo que es recomendable desarrollar y utilizar tecnologías limpias. Por lo anterior, en este trabajo se emplearon enzimas ligninolíticas y líquidos iónicos para remover a la lignina presente en aserrín de carpintería (**L-104-X**) y de aserradero (**L-104-D**). El efecto de estos tratamientos se evaluó cuantificando la lignina solubilizada por el tratamiento, y si éste modificaba la accesibilidad de los polisacáridos a la hidrólisis enzimática.

De las enzimas utilizadas, sólo la manganeso peroxidasa (**MnP**), en presencia de alcohol veratrílico (**AV**) como cooxidante, fue capaz de solubilizar alrededor de un **41 %** de la lignina presente en **L-104-X**, pero sólo un **7 %** en el **L-104-D**. Estos resultados podrían deberse a que la estructura de la lignina presente en **L-104-X** era más rica en enlaces α -O-4, β -O-4 y γ -O-4 que la del **L-104-D**, ya que esta enzima degrada principalmente este tipo de enlaces. En contraste, el tratamiento con el líquido iónico acetato de 1-etil-3-metilimidazolio [**Emim**] removió el **51 %** de la lignina presente en el sustrato **L-104-X** y el **45 %** del **L-104-D**. Sorpresivamente, el tratamiento con líquidos iónicos incrementó la accesibilidad de la celulosa a la hidrólisis enzimática, mientras que con **MnP** no se modificó aún cuando en **L-104-X**, la cantidad de lignina solubilizada fue similar.

Los resultados anteriores indican que la estructura de la lignina no afecta su remoción cuando se emplean líquidos iónicos, pero la efectividad del método enzimático si depende de su estructura. Por otro lado, el hecho de que el tratamiento con líquido iónico fuese más efectivo en la hidrólisis enzimática de la celulosa que el tratamiento con **MnP**, podría deberse a que el primero también disminuye la cristalinidad de la celulosa, no así el tratamiento con enzimas ligninolíticas.

2. Introducción.

De manera general, la biomasa vegetal tiene varios usos industriales: materia prima para la producción de etanol, para la fabricación de papel, dentro de compostas, como sustrato para el cultivo de hongos comestibles, en la alimentación animal, entre otros. Adicionalmente, se han hecho muchas investigaciones para su posible utilización en la producción de combustibles alternativos o biocombustibles (Sánchez, 2009).

Dentro de toda la biomasa vegetal, se encuentran los desechos forestales, entre ellos el aserrín de madera. En México, se generan aproximadamente, 206,000 m³ de aserrín de pino al año (INEGI 2008). Considerando que su densidad promedio es de 500 kg/m³, esta producción equivale a 103,000 ton anuales de éste material, a partir del cual, tomando en cuenta los biopolímeros constitutivos del aserrín, se podrían obtener 46 000 ton de celulosa, 28 000 ton de hemicelulosa y 29 000 ton de lignina anuales aproximadamente (López y col., 2009).

Para poder aprovechar energéticamente al aserrín es necesario separar sus componentes intrínsecos. Con el objetivo anterior, existen actualmente tratamientos químicos y físicos los cuales permiten remover la lignina que rodea las fibras de carbohidratos (Fan y col., 2006). El tratamiento más conocido y estudiado con este fin es el proceso Kraft, muy utilizado en la industria del papel, involucra reacciones de hidrólisis y de oxidación para remover la mayor cantidad de lignina posible y así mejorar la calidad del papel (fibras de celulosa), sin embargo como se utilizan agentes alcalinos y sulfitos como agentes deslignificantes, los residuos producidos por estas plantas presentan problemas durante su tratamiento. Inclusive se pueden llegar a utilizar productos clorados o peróxidos para blanquear el papel, implicando un gran impacto ambiental (Burke y col., 2009). Otros métodos incluyen la hidrólisis ácida, activación en amoniaco, disolventes orgánicos, baños con agua caliente, entre otros. A pesar de su aparente eficacia, estos métodos presentan el inconveniente de generar

subproductos nocivos al ambiente como ya se mencionó o requieren cantidades elevadas de energía para su funcionamiento (Talebnia y col., 2010).

En años recientes, se han propuesto el uso de métodos amigables con el ambiente como una alternativa a los ya mencionados. Uno de ellos es la utilización de enzimas ligninolíticas secretadas por microorganismos, principalmente hongos. Las enzimas más reportadas en la literatura son tres: lignina peroxidasa (LiP), peroxidasa dependiente de manganeso (MnP) y lacasa (Lac). Las enzimas ligninolíticas, al provenir de una fuente biológica, no representan daño al medio ambiente y también han demostrado ser eficientes en la remoción de lignina en la industria del pulpeo (Dávila y Vázquez, 2001; Papinutti y col., 2003; Husain, 2006; Asghner y col., 2007). Otro método alternativo consiste en la utilización de líquidos iónicos para la remoción de la lignina. Los líquidos iónicos son sustancias compuestas por cationes y aniones los cuales presentan la peculiaridad de ser líquidos a temperaturas menores de los 100°C (Cox y col., 2011). Este método parece prometedor dado que el disolvente se puede recuperar y reutilizar sin disminuir significativamente su capacidad deslignificante (Lee y Col.; 2009).

Ambos métodos se reportan como eficientes, su efecto ha sido demostrado en diferentes residuos lignocelulósicos, sin embargo una se necesita una comparación entre ambos trabajando sobre condiciones similares de trabajo y de esta manera tener un mejor panorama sobre las ventajas y desventajas de cada uno de ellos teniendo como punto de referencia un mismo sustrato. Por lo anterior, en este trabajo se propone evaluar la capacidad “deslignificante” del método de enzimas ligninolíticas y el de los líquidos iónicos sobre el aserrín, el cual es un residuo lignocelulósico de fácil manejo y almacenaje en el laboratorio. Además que, debido a su alto contenido de lignina, podría representar un modelo de trabajo para posteriormente tratar otros residuos lignocelulósicos menos recalcitrantes.

3. Antecedentes.

3.1. Definición de biomasa.

La biomasa vegetal es una fuente renovable de energía, resultante de la conversión de la energía solar por la fotosíntesis de las plantas (Abril y Abril, 2009). Diferentes tipos de células en las plantas, vivas y muertas, componen los materiales de la biomasa. La estructura y la composición de estas células varían de acuerdo a la especie vegetal y a la localización dentro de la planta (Nuñez-Alcántara, 1997).

3.2. Fuentes de biomasa.

Las fuentes de biomasa las podemos dividir en (Nuñez-Alcántara 1997):

- a) Fuentes primarias: organismos fotosintéticos.
- b) Fuentes secundaria: basuras orgánicas (residuos lignocelulósicos).

3.3. Fuentes secundarias, residuos lignocelulósicos.

Se les denomina residuos debido a que estos materiales son generados como subproductos de la agricultura o de la actividad forestal. Sólo una pequeña cantidad de éstos se utiliza y el resto es desechado o incinerado. Por otro lado, son lignocelulósicos ya que sus componentes principales son los biopolímeros de pared celular vegetal: celulosa, hemicelulosa, pectinas y lignina (Sánchez, 2009).

La creciente expansión de la actividad agroindustrial ha llevado a la acumulación de una gran cantidad de residuos lignocelulósicos como: yerbas, cascarillas,

materiales leñosos, residuos sólidos urbanos (papel y cartón), entre otros. En todo el mundo, anualmente, se genera una gran cantidad de este tipo de materiales, es por esto que muchos autores los consideran como una fuente de energía renovable (Villas y col. 2002; Mosier y col., 2005; Mesa y col. 2008; Taherzadeh y Karimi, 2008; Abril y Abril, 2009; Kaparaju y col., 2009; Sánchez, 2009; Wan y Li, 2012). En la **Tabla 3.1**, se muestran algunos residuos lignocelulósicos y su producción promedio anual entre los años 2005 y 2008 (Sánchez, 2009).

Tabla 3.1. Producción anual de algunos residuos lignocelulósicos.

Residuos lignocelulósicos	Ton×10⁶ / año
Bagazo de caña	317 – 380
Paja de maíz	159 – 191
Cascarilla de arroz	157 – 188
Paja de trigo	154 – 185
Paja de Soja	54 – 65
Paja de yuca	40 – 48
Paja de cebada	35 – 42
Fibra de algodón	17 – 20
Paja de Sorgo	15 – 18
Residuos del plátano	13 – 15
Cascara de cacahuete	9.2 – 11.1
Paja de girasol	7.5 – 9.0
Paja de haba	4.9 – 5.9
Paja de centeno	4.3 – 5.2
Residuos de pino	3.8 – 4.6
Paja de café	1.6 – 1.9
Paja de almendra	0.4 – 0.49
Cáscara de avellana	0.2 – 0.24
Paja de henequén	0.077 – 0.093

Fuente: Sánchez, (2009).

3.4 Utilización de los residuos lignocelulósicos.

Como se observa en la **Tabla 3.1**, el origen de los residuos lignocelulósicos es diverso. Sin embargo, en todos ellos los compuestos estructurales de la pared celular, son los que representan un gran interés biotecnológico. Lo anterior se debe a que éstos compuestos, de naturaleza polimérica, son capaces de ser transformados en otro tipo de productos con alto valor agregado (Lee, 1997; Iranmahboob y col., 2002; Mesa y col., 2008; Abril y Abril, 2009; Dodd y Cann, 2009; Kaparaju y col., 2009; Lopez y col., 2009; Sánchez, 2009; Domínguez y col.; 2011). Para este tipo de materiales, se ha sugerido su utilización como materia prima para la fabricación de papel (Da Re y col., 2008), como composta para el cultivo de hongos comestibles (Varnero y col., 2010), como forraje en la alimentación animal (Villas y col., 2002; Sánchez, 2009) y finalmente como sustratos fermentables para la producción de etanol, ácidos orgánicos, aminoácidos, vitaminas y un gran número de metabolitos producidos por bacterias y hongos (Lee, 1997; Iranmahboob y col., 2001; Zhu y col., 2006; Mesa y col., 2008; Abril y Abril, 2009; Dodd y Cann, 2009; Kaparaju y col., 2009; Lopez y col., 2009; Sánchez, 2009; Domínguez y col.; 2011). La importancia de transformar estos residuos en diversos compuestos con aplicación industrial, radica en que los primeros contribuyen a la contaminación ambiental, ya que algunos de ellos, como el aserrín de madera, cuya acumulación en los suelos en los que se deposita constituye un serio problema ecológico, mismo que se puede incrementar si el material es incinerado a propósito (López y col., 2009; Sánchez, 2009). La acumulación de este material puede ser también un problema para la salud ya que al ser inhalado puede causar problemas respiratorios como asma, alergias, bronquitis e inclusive cierto tipo de cánceres (Malström y col., 1999; López y col., 2009). De esta forma, el aprovechamiento de los residuos lignocelulósicos, además del potencial energético que pueden proporcionar, también se contribuye a la preservación del medio ambiente (López y col., 2009;).

Para poder liberar la capacidad energética de los residuos lignocelulósicos, primero es necesario superar barreras, en este caso estructurales, de forma más

precisa, es necesario modificar la pared celular de éstos (Tahezadeh y Karimi, 2008). La pared celular y los elementos que la componen están diseñados biológicamente para mantenerse unidos ante situaciones de estrés (Ruel y col., 2006; Sánchez, 2009; Chen y col.; 2012). Por lo tanto, se necesita que exista una etapa en el procesamiento de estos materiales que haga a la estructura de la pared celular más susceptible a la separación de sus componentes, pero que los preserve energéticamente (Mosier y col.; 2005; Mesa y col., 2008; Tahezadeh y Karimi, 2008; Moilanen y col., 2011; Santos y col., 2012).

3.5. Composición y características químicas de los residuos lignocelulósicos.

Para conocer cuáles son los biopolímeros que se deben de separar para poder aprovechar a los residuos lignocelulósicos, se debe de conocer primero la identidad y naturaleza química de éstos. De manera particular, en este trabajo nos enfocaremos en los componentes mayoritarios de la pared celular secundaria, estos son: lignina, hemicelulosa y celulosa, los cuales comprenden 80% o más del peso seco de los residuos lignocelulósicos que no han recibido tratamiento alguno (Sánchez, 2009).

En la **Tabla 3.2** se muestran algunos residuos lignocelulósicos y su contenido aproximado en los biopolímeros antes mencionados. En este caso, se considera la biomasa sin componentes minoritarios, como cenizas proteínas y resinas que en conjunto representan el 20 % del peso seco de los residuos.

La celulosa y las hemicelulosas son polisacáridos. El contenido de celulosa es bajo en la pared celular primaria y se incrementa en la secundaria. Las hemicelulosas están presentes en todas las capas celulares, con un alto porcentaje en las capas interiores (Núñez-Alcántara, 1997; Núñez, 2008). Estos polímeros le confieren la fibrosidad a los materiales lignocelulósicos. Por otro lado, la lignina, está formada por tres tipos de monómeros aromáticos. Los cuales

integran ramificaciones tridimensionales sin algún orden aparente. Este biopolímero es más abundante en las capas exteriores celulares y decrece al alejarse de la superficie, la lignina le proporciona dureza al material lignocelulósico debido a su estructura tridimensional de enlaces covalentes (Nuñez-Alcántara, 1997; Hofrichter y col., 1999; Hatfield y Vermerris, 2001, Neutelings, 2011).).

Tabla 3.2. Composición de algunos residuos lignocelulósicos.

Residuo Lignocelulósico	Lignina (%)	Hemicelulosa (%)	Celulosa (%)
Hojas	0	80–85	15–20
Pelos de semillas de algodón	0	0.5–20	80–95
Periódico y papel	0–25	25-40	40–99
Estiércol vacuno sólido	2.7–5.7	1.4–3.3	1.6–4.7
Pasto Bermuda	6.4	35.7	25
Fibra de agave	7–9	21–24	43–56
Pasto varilla	12.0	31.4	45
Paja de Henequén	13.1	4–8	77.6
Residuos del plátano	14	14.8	13.2
Mazorcas de maíz	15	35	45
Paja de avena	16–19	27–38	31–37
Paja de trigo	16–21	26–32	29–35
Paja de arroz	18	24	32.1
Pulpa de café	18.8	46.3	35
Madera dura	18–25	24–40	40–55
Bagazo de caña	19–24	27–32	32–44
Bambú	21–31	15–26	26–43
Fibra de yute	21–26	18–21	45–53
Madera Suave	25–35	25–35	45–50
Cáscaras de nuez	30–40	25–30	25–30

Fuente: Sánchez (2009).

Estos biopolímeros de la pared celular secundaria forman una estructura compacta, la cual tiene diversas funciones biológicas (Mosier y col; 2005; Mesa y col., 2008; Taherzadeh y Karimi, 2008; Sánchez, 2009; Moilanen y col., 2011; Santos y col., 2012). En la **Figura 3.1**, se esquematiza el arreglo que los biopolímeros de celulosa, hemicelulosa y lignina pueden tener dentro de la pared celular secundaria de las células vegetales, en donde interaccionan entre ellos. Se puede observar que la lignina y la hemicelulosa forman una matriz que rodea las microfibrillas de celulosa (**Figura 3.1**) (Dávila y Vázquez, 2006). Esta estructura es esencial en en varios procesos fisiológicos y en el desarrollo de los vegetales. Actúa como un “exoesqueleto” rígido que controla la forma celular y que les permite tener una alta presión de turgencia (Ruel y col., 2006). De manera conjunta, las paredes celulares también pegan células juntas, impidiendo el deslizamiento de unas sobre otras y de esta manera tener gran resistencia mecánica de las estructuras vegetales permitiéndoles crecer en gran altura (Santos y col., 2012). Dentro del interés biotecnológico, las diferentes proporciones de los biopolímeros antes mencionados dentro de la pared celular, son las que le darán las propiedades macromoleculares a cada material lignocelulósico así como las bases para comprender los fenómenos que se producen durante los procesos de transformación química y fisicoquímica de la biomasa (Sánchez, 2009).

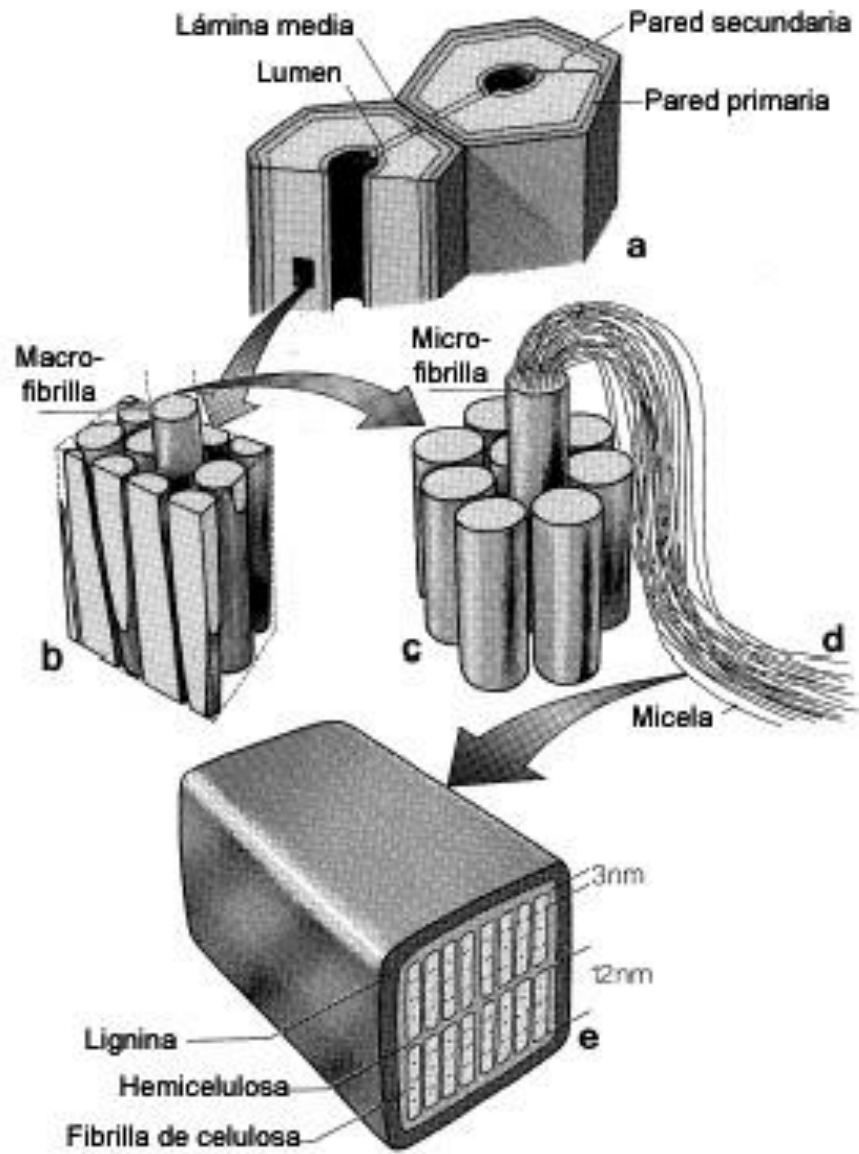


Figura 3.1. Diagrama de la estructura de la pared secundaria en células vegetales. Fuente: Dávila y Vázquez (2006).

3.6. Celulosa.

La celulosa es el material más abundante en la tierra. Sin embargo, el término "celulosa" se utiliza para denominar a un grupo de moléculas que poseen semejanza estructural, propiedades químicas muy similares, y que presentan gran dificultad en su separación intermolecular (Dadi y col, 2006; Núñez, 2008). Las plantas generan celulosa a partir de la glucosa que sintetizan por medio de la fotosíntesis (Núñez-Acántara, 1997; Iranmahboob y col., 2001; Mesa y col., 2008; Núñez, 2008; Sánchez, 2009).

Químicamente, la celulosa es un polímero lineal de la D-glucosa, formando uniones entre monómeros mediante enlaces β -1,4 glucosídicos. Esto significa una unión a través del oxígeno del carbono 1 de una molécula de glucosa con el carbono 4 de otra molécula de glucosa cuyos grupos homólogos se encuentren en planos opuestos (conformación β) (Núñez-Alcántara, 1997; Dadi y col., 2006; Nuñez, 2008; Yang y col., 2010). En la **Figura 3.2**, se muestra un ejemplo de la unión entre dos polímeros de glucosa en una cadena de celulosa (unidades de glucosa entre corchetes).

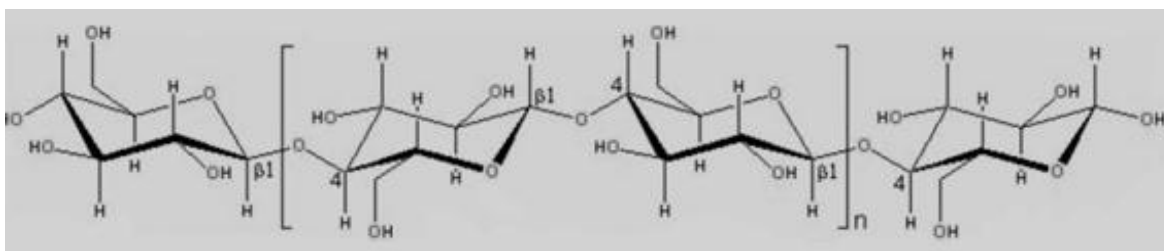


Figura 3.2. Estructura de la molécula de celulosa. La parte entre corchetes se repite "n" veces a lo largo del polímero. Fuente: Nuñez (2008).

El tipo de enlaces y la forma del polímero hacen a la molécula sumamente estable y apta para extenderse a través de muchísimas uniones monoméricas. La ubicación de los grupos oxhidrilos (-OH) permite la formación de puentes de hidrógeno con otras moléculas iguales en varios planos. De esta forma, las

moléculas de celulosa se van agrupando de forma paralela haciendo estructuras lineales de varios niveles de estructura y tamaño que van desde las fibrillas elementales, microfibrilas, y fibras en orden creciente (Núñez-Alcántara, 1997; Dadi y col., 2006; Núñez, 2008; Taherzadeh y Karimi, 2008; Sánchez, 2009; Santos y col., 2012). Aunque la estructura química de la celulosa está bien estudiada y entendida en muchos aspectos, hay otros que aun están en estudio. La estructura de la celulosa puede adoptar dos estados, dependiendo de si los puentes de hidrógeno se forman entre polímeros de glucosa (**Figura 3.3 A**), celulosa cristalina, o si las cadenas de glucosa forman puentes de hidrógeno con moléculas de agua (**Figura 3.3 B**), celulosa amorfa. La adopción de una u otra conformación depende del contenido de humedad de la celulosa. Sin embargo, los estudios a nivel molecular y los fenómenos macroscópicos observados en la celulosa y sus derivados demuestran que la celulosa presente en residuos lignocelulosicos posee un alto nivel de cristalinidad (Núñez, 2008; Steinbüchel y col 2004). Los enlaces de puente de hidrógeno intermolecular e intramolecular son fuertes, así que la celulosa en conjunto, se encuentra en forma de microfibras en las cuales hay regiones cristalinas (de alto orden), que a su vez, están alternadas con regiones amorfas (de menor orden) (Núñez-Alcántara, 1997; Steinbüchel y col 2004; Núñez, 2008).

La relación entre orden y desorden de estas estructuras moleculares ha sido muy estudiada, puesto que tienen importancia en algunos procesos químicos, sobre todo industriales. La celulosa amorfa es más reactiva que la completamente cristalina y, por lo tanto, es más fácilmente degradable por diversos reactivos o enzimas produciendo la hidrólisis de los polímeros en unidades monoméricas de glucosa (Dadi y col., 2006; Núñez, 2008; Abril y Abril, 2009; Yang y col., 2010; Santos y col., 2012). El nivel de cristalinidad de la celulosa natural oscila entre alrededor de 90% para las fibras de ramio, 80 – 85% para el algodón y de 60 al 85% para la celulosa de madera. Existe evidencia de que las zonas amorfas son las únicas reactivas en los procesos de pulpado químico y, posiblemente, si la cristalinidad fuera completa, este material no se degradaría (Steinbüchel y col 2004). Los ácidos fuertes, soluciones alcalinas y soluciones concentradas de sales

pueden expandir y dispersar (o en algunos casos disolver) la celulosa y romper su estructura cristalina haciéndola susceptible a la hidrólisis (Iranmahboob y col., 2001; Villas y col., 2002; Mesa y col., 2008; Mosier y col., 2005, Nuñez, 2008; Wan y Li, 2012).

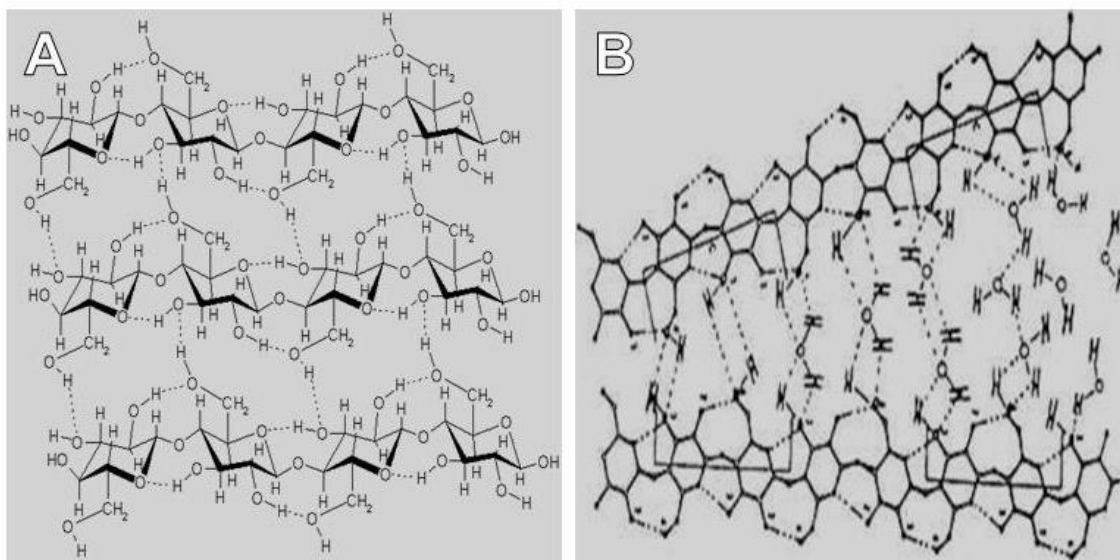


Figura 3.3. Diferencia entre los puentes de hidrógeno presentes dentro de la celulosa cristalina (A) y la celulosa amorfa (B). Fuente: <http://magufos.com/blog/87/reloj-de-arena/> (15/08/12).

3.7. Hemicelulosa.

Las hemicelulosas son heterosacáridos constituidos por pentosas y hexosas. Están asociadas con la estructura de la pared celular y se diferencian de la celulosa, en que son amorfos (Núñez-Alcántara, 1997). Las hemicelulosas se pueden subdividir en xiloglucanos, xilanos, beta-glucanos y glucomananos. Las hemicelulosas, tienen un grado de polimerización de aproximadamente 200 unidades y aunque éstas no son solubles en agua, en ácido son rápidamente solubles y fácilmente hidrolizadas para producir compuestos monoméricos como: D-manosa, D-galactosa, D-xilosa, D-glucosa, L-arabinosa, ácido glucorónico, ácido 4-O-metil glucorónico, el ácido galacturónico y constituyentes más raros

como la L-ramnosa, L-fucosa y varios azúcares metilados neutros son parte también de las estructuras de las hemicelulosas (Hartman, 2006).

La composición de la hemicelulosa en maderas suaves es del 25%, siendo el O-acetil-galactoglucomanano, la hemicelulosa presente principalmente en este tipo de maderas. Sin embargo la madera blanda consta también de otras hemicelulosas como xiloglucanos (Nuñez-Alcántara, 1997; Hartman, 2006). El O-acetil-galactoglucomanano varía en la proporción de galactosa: glucosa: manosa pudiendo ser 0.1:1:3 ó 1:1:3. Este polímero está compuesto de enlaces lineales β -1-4 de D-manopiranosas y D-glucopiranosas, mientras que el residuo α -D-galactosa está vinculado como cadena lateral a las unidades de manosa mediante un enlace 1-6 (**Figura 3.4**). Los grupos hidroxilo en las posiciones C2 y C3 en la manosa están parcialmente substituidos por grupos O-acetilo, en promedio un grupo por cada dos a tres unidades de hexosa (Hartman, 2006).

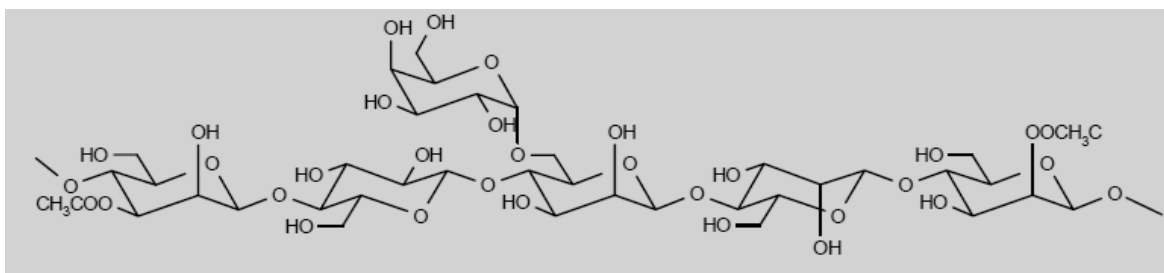


Figura 3.4. Estructura del O-acetil-galactoglucomanano de maderas blandas. Fuente: Hartman (2006).

Como ya se mencionó antes, el material que presenta mayor interés dentro de los residuos lignocelulósicos es la celulosa debido a la diversidad de usos que se le pueden dar a la glucosa, como por ejemplo, en la producción industrial de etanol (Dodd y Cann, 2009). Los estudios en la despolimerización de la celulosa, son los que han recibido más atención, sobre todo en la optimización de los procesos. El interés en el uso de las hemicelulosas como materia prima en la industria no se ha incrementado como el de la celulosa (Dood y Cann, 2009; Hartman, 2006). Los estudios existentes en los carbohidratos de las hemicelulosas están enfocados a

su papel en la pared celular y en la interferencia que este polímero produce en la hidrólisis de la celulosa (Valls y col, 2010). Los estudios sobre su utilización como materia prima dentro de procesos industriales es limitada debido a que sus componentes son más heterogéneos y en el caso de los biocombustibles, microorganismos como *Saccharomyces cerevisiae* son incapaces de fermentar algunos azúcares que se encuentran comúnmente en las hemicelulosas (Dood y Cann, 2009). A pesar de esto, las hemicelulosas pueden aportar compuestos extras, aprovechables industrialmente, si se tiene el proceso indicado. Actualmente, existe interés en el uso más eficiente de la biomasa vegetal (celulosa y hemicelulosa) para la producción de otros compuestos con valor agregado (Nuñez-Alcántara, 1997; Dood y Cann, 2009).

3.8. Lignina.

La lignina junto con las hemicelulosas, forman una matriz en la que se insertan las microfibrillas de celulosa en la pared celular secundaria (**Figura 3.1**) (Dávila y Vázquez, 2006; Núñez, 2008). A diferencia de los otros polímeros, la lignina está compuesta de monómeros de carácter aromático. Ello le da algunas características especiales tanto física como químicamente (Nuñez, 2008). El estudio de la lignina comenzó a finales del siglo XIX y en la actualidad todavía no se conocen su totalidad. Desde el punto de vista funcional, la lignina confiere resistencia a las paredes celulares, facilita el transporte de agua, e impide la degradación de los polisacáridos de la pared, actuando como un importante mecanismo de defensa contra los agentes patógenos, insectos y otros herbívoros (Hatfield y Vermerris, 2001).

La síntesis de la lignina comienza en la formación de la pared secundaria de la célula vegetal y puede estar distribuida en la pared secundaria, la pared primaria y la lamela media (Neutelings, 2011). La lignina se forma mediante la polimerización oxidativa de monómeros de carácter aromático. La producción de los diferentes monómeros de lignina y las funciones de las diferentes enzimas involucradas en

su síntesis son procesos relativamente bien dilucidados (Hatfield y Vermerris, 2001; Neutelings, 2011). Gran parte de este conocimiento se obtuvo mediante el estudio de mutantes de lignina y especies de plantas modelo. Como ya se dijo, la lignina es la parte de la pared celular que no es carbohidrato, sino que es un polímero derivado de dos aminoácidos: fenilalanina y tirosina (Núñez, 1997; Hofrichter y col., 1999; Hatfield y Vermerris, 2001, Neutelings, 2011). Los monómeros que sintetiza la planta para la conformación de la lignina es el alcohol p-cumarílico (**Figura 3.5A**), el alcohol coniferílico (**Figura 3.5B**) y el alcohol sinapílico (**Figura 3.5C**). La proporción de los tres monómeros varía según el tipo de tejido celular y entre individuos. Sin embargo, la diferencia principal está entre coníferas, latifoliadas y monocotiledóneas (Nuñez, 2008; Neutelings, 2011).

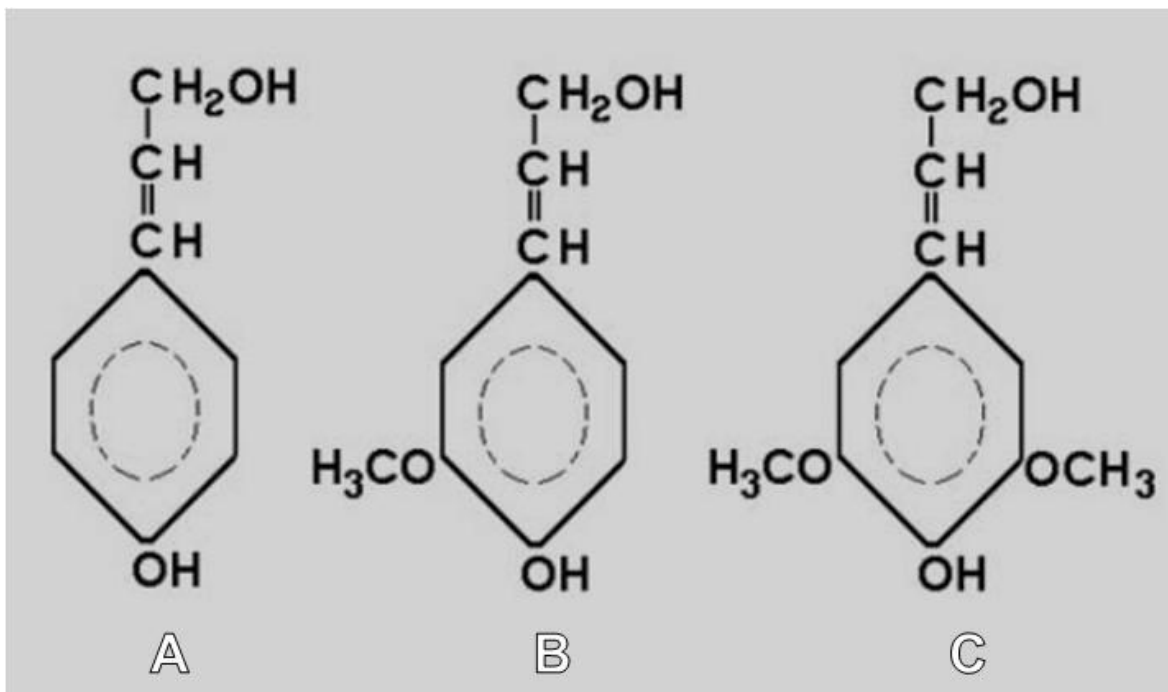


Figura 3.5. Monómeros fenilpropiónicos principales de la molécula de lignina. (A) alcohol p-cumarílico, (B) alcohol coniferílico, el alcohol sinapílico (C). Fuente: Nuñez (2008).

Una vez sintetizados los monómeros, hay una gran cantidad de formas en las cuales éstos se pueden unir en la molécula de lignina (Nuñez-Alcántara, 1997;

Hatfield y Vermerris, 2001; Nuñez, 2008). La nomenclatura de las uniones va de acuerdo al esquema de la **Figura 3.6A** y se utilizan los números o letras de los carbonos que intervienen en el enlace (**Figuras 3.6B - H**), y, si así lo fuera, la letra “O” que significa una función éter (**Figuras 3.6B, 3.6C y 3.6D**). El tipo de unión entre monómeros es muy importante para saber el comportamiento del material lignocelulósico dentro de los procesos de transformación de la biomasa (Iranmahboob y col., 2001). Hay que recordar que la energía de ruptura de una unión carbono-carbono es mucho mayor que la de una unión éter (**Figuras 3.6E y 3.6F**) y, en la práctica, estas últimas son las que se rompen (Núñez-Alcántara, 1997). Hablando de cuestiones de madera, en la madera dura (caoba, roble, abedul), los enlaces entre carbonos son menos frecuentes que en maderas suaves (cedro, pino, abeto). Las maderas suaves contienen aprox. **48%** de enlaces **β -O-4**, mientras que las maderas duras tienen un **60%** (Núñez-Alcántara, 1997). Cabe recordar que el concepto “madera suave” y “madera dura” no tiene que ver con las características físicas de la madera, es simplemente un concepto que se les dio a las maderas para diferenciarlas de su origen: **angiospermas** para madera **dura** y **gimnospermas** la maderas **suaves** (http://forestry.about.com/cs/treeid/f/Tree_ID_wood.htm) (15/08/12). La formación del enlace entre monómeros es el resultado de la oxidación (a través de radicales libres) y del acoplamiento entre un monómero y el polímero creciente (Hatfield y Vermerris, 2001). Este acoplamiento oxidativo entre monómeros, como se observa en la **Figura 3.6**, puede resultar en la formación de varios vínculos inter-unidades. De esta manera se forma un polímero irregular en tres dimensiones muy difícil de definir por la cantidad de unidades y el tipo de enlaces que tiene (Núñez, 2008).

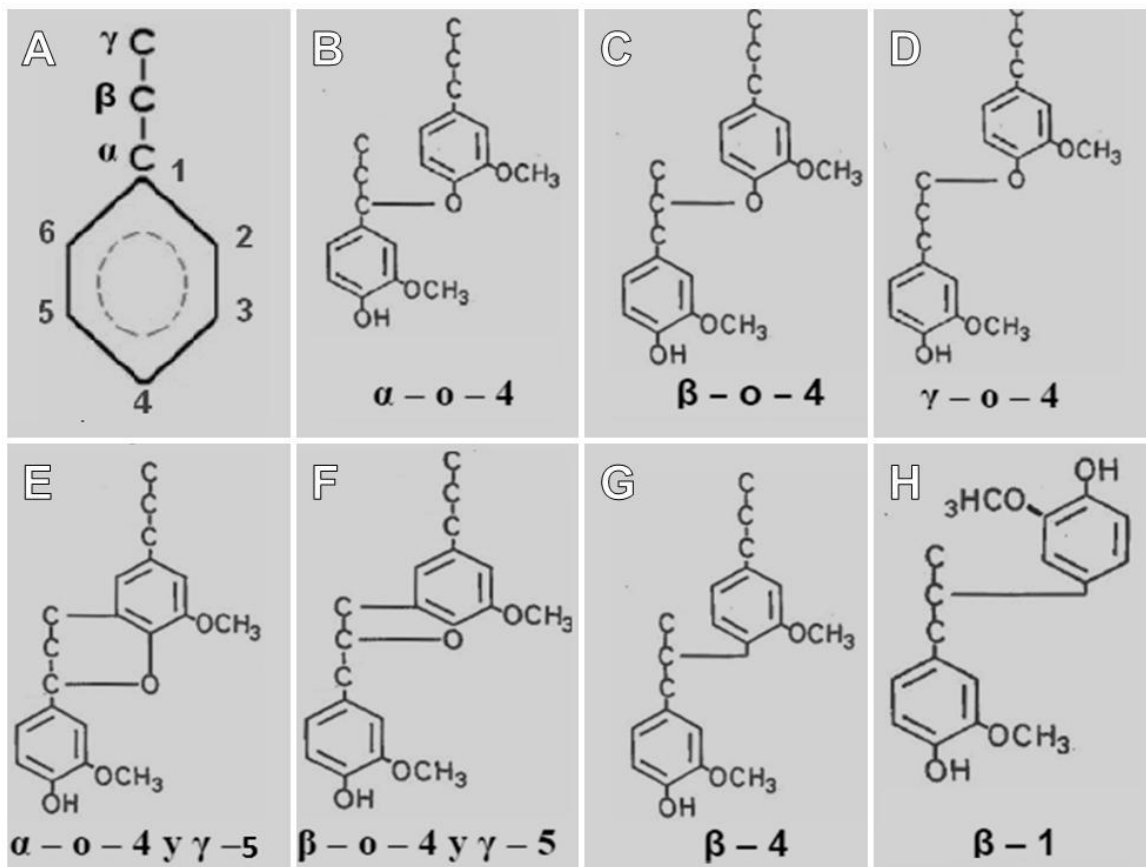


Figura 3.6. (A) Nomenclatura de las posiciones dentro del esqueleto de carbonos de la lignina; (B - H) principales uniones intermonoméricas en la molécula de lignina; (B -D) Enlaces tipo éter (B) enlace $\alpha - o - 4$; (C) enlace $\beta - o - 4$; (D) enlace $\gamma - o - 4$. (E - F) Enlace entre monómeros en dos posiciones; (E) enlace $\alpha - o - 4$ y $\gamma - 5$; (F) enlace $\beta - o - 4$ y $\gamma - 5$. (G - H) Enlaces C - C; (G) enlace $\beta - 4$; (H) enlace $\beta - 1$. Fuente: Núñez (2008).

En la **figura 3.7** se puede observar una representación estructural de lo que puede ser una red polimérica de lignina (Alder, 1977, Núñez, 1997; Dávila y Duhalt, 2006, Núñez, 2008). La naturaleza química de la lignina la convierten en un polímero muy difícil de degradar ya sea por agentes naturales como enzimas o dentro de un proceso industrial (Da Re y col., 2008; Sánchez, 2009). Varios estudios han descubierto que la resistencia a la separación de los componentes de los materiales lignocelulosicos, surge principalmente de la cantidad de lignina existente, de su baja reactividad, de la mayor abundancia de monómeros del tipo

coniferílico (enlaces de mayor energía), entre otros factores (Moilanen y col., 2011; Neutelings, 2011; Santos y col., 2012). En general, la presencia de residuos fenólicos ha sido reportado como uno de los principales obstáculos a la hidrólisis enzimática eficiente de los carbohidratos en la biomasa lignocelulósica (Martin y Akin, 1988; Zhu y col. 2008; Ximénez y col. 2010).

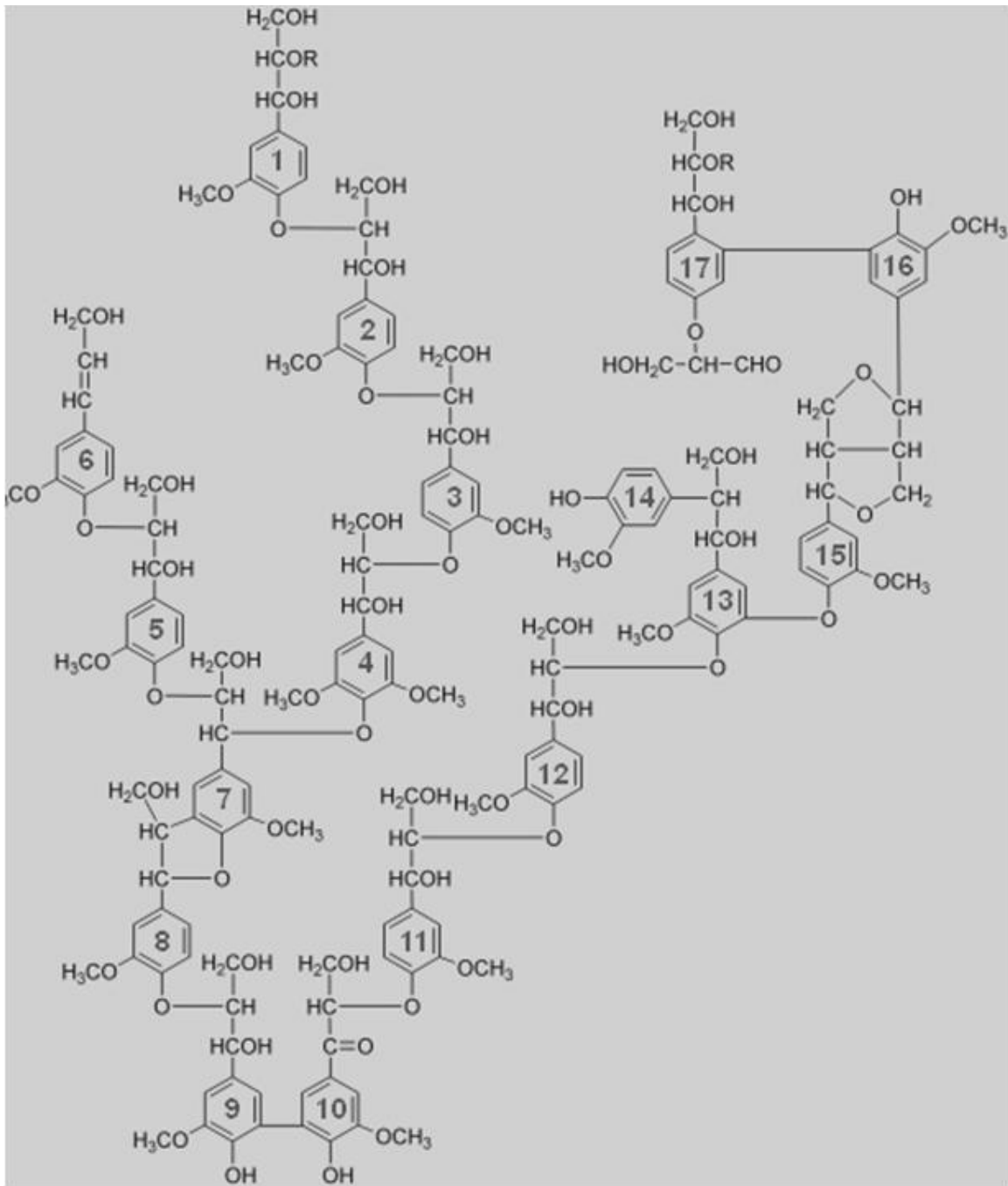


Figura 3.7. Modelo de la estructura de lignina. Fuente: Alder (1977)

3.9. Pretratamientos.

En la industria del pulpeo como en otras industrias, la remoción total o parcial de la lignina es de mucha importancia ya que mientras menor sea su contenido, la disponibilidad de polisacáridos, como la celulosa es mejor (Aracri y col., 2009; Mendonça y col., 2002; Widsten y Kandelbauer, 2008; Da Re y col., 2008). Existen actualmente muchas investigaciones enfocadas en la deslignificación para la posterior transformación de la biomasa en compuestos químicos de mayor valor agregado (Mosier y col., 2005). Además, se sabe que la lignina residual se une a las enzimas hidrolíticas inespecíficamente, reduciendo así su acción sobre sustratos de polisacáridos (Santos y col., 2012). Las enzimas, representan un gran costo y son uno de los principales obstáculos en la aplicación industrial de los procesos de transformación de la biomasa, así que es importante cualquier acción para evitar la inactivación de éstas (Ibarra, 2009; Moilanen y col., 2011). Una forma de influir en las propiedades de la lignina es tratar el material con todos sus componentes y mejorarlo antes de la hidrólisis.

Para lograr lo anterior, se han utilizado diversos métodos físicos y químicos capaces de remover la interacción polisacáridos lignina y disminuir la cristalinidad de la celulosa. A los métodos utilizados con esta finalidad se les denomina de manera genérica pretratamiento. Por ejemplo, los pretratamientos físicos como la molienda (Taherzadeh y Karimi, 2008), irradiación con rayos gama (Kumakura y Kaetsu; 1983) y la explosión de vapor (Negro y col, 2003), pueden aumentar entre un 50 y un 60% el rendimiento de la hidrólisis enzimática de los polisacáridos presentes en comparación con los controles cuando la biomasa es rastrojo de maíz o bagazo de caña. En pretratamientos químicos como la hidrólisis a alta temperatura (Moisier y col., 2005), hidrólisis alcalina (Silverstein y col., 2007) y el peróxido alcalino (Saha y Cotta, 2007), se han reportado rendimientos en la hidrólisis enzimática del 60 al 90% en sustratos como paja de trigo, paja de maíz y tallos de algodón. De esta manera, podemos observar que la eficiencia de los pretratamientos de la biomasa está sujeta a las características del sustrato en el que se apliquen y al nivel de escala en el que se planteen utilizar (Mesa y col.,

2008). Sin embargo, en todos los casos anteriores se requiere de un alto gasto de energía y durante el proceso se generan líquidos residuales que contaminan el ambiente (Tahezadeh y Karimi, 2008). Por lo anterior, se han seguido estrategias en las que se procura reducir al máximo la generación de contaminantes como es la utilización de CO₂ supercrítico sobre el pretratamiento de biomasa lignocelulósica (Park y col, 2001), o el uso de enzimas ligninolíticas producidas por hongos de pudrición. Sin embargo, la implementación de la primer tecnología a nivel comercial resulta muy poco viable debido al elevado costo del procedimiento global (Tahezadeh y Karimi, 2008). Mientras que el tratamiento con enzimas ligninolíticas presenta la ventaja de no generar residuos contaminantes y, además, permite la utilización a nivel industrial tanto de los componentes de lignina como la de los de los polisacáridos (Wan y Li, 2012).

Como este tipo de pretratamientos, actualmente, se siguen desarrollando y mejorando tecnologías con el mismo fin, ya que es necesario contar con tecnologías ecológicamente amigables, de bajo consumo energético y que además den buenos resultados (Villas y col., 2002; Widsten y Kandelbauer, 2008; Sánchez, 2009; Talebnia y col., 2010; Wan y Li, 2012; Chen y col., 2012). En este trabajo se eligieron dos tipos de pretratamientos de biomasa, uno es la utilización de enzimas ligninolíticas y el segundo es la utilización de líquidos iónicos, la finalidad de ambos sistemas es mejorar un residuo lignocelulósico desde el punto de vista de la accesibilidad hacia sus polisacáridos endógenos. A continuación, se describirán brevemente ambos sistemas.

3.9.1. Enzimas ligninolíticas.

La capacidad para catabolizar la celulosa y hemicelulosa es una característica común para diversos microorganismos. Por el contrario, la lignina, al ser un biopolímero muy recalcitrante, solamente es degradada en forma limitada por algunas bacterias y por un grupo de hongos (Dávila y Vázquez, 2006). Estos hongos lignolíticos, son conocidos como hongos de la pudrición blanca de la

madera y comprenden un grupo de organismos cuya característica es su capacidad para fracturar eficientemente la barrera de lignina (Dávila y Vázquez, 2006; Weng y col., 2008; Sánchez, 2009; Valls y col., 2010; Chen y col., 2012). Biológicamente, esta degradación selectiva les permite tener acceso a la celulosa y hemicelulosa, las cuales finalmente representan su fuente de carbono y energía (Dávila y Vázquez, 2006).

Estos organismos secretan varias enzimas extracelulares que son esenciales para la transformación inicial de la lignina y que en conjunto logran su despolimerización. Estos microorganismos degradadores de lignina producen isoformas diferentes de enzimas ligninolíticas extracelulares: lacasas (**Lac**) y diferentes peroxidasas, incluyendo lignina peroxidasa, manganeso peroxidasa (**MnP**) y versátil peroxidasa (Dávila y Vázquez, 2006; Papinutti y col., 2003; Husain 2006; Asghner y col., 2007). Se ha reportado en la literatura que las enzimas más abundantes son la lacasa y la manganeso peroxidasa (Dávila y Vázquez, 2006; Dhouib y col., 2005; Sánchez, 2009). En conjunto, representan un sistema de despolimerización de la lignina a través de mecanismos oxidativos mediante radicales libres. Los sistemas enzimáticos tienen similitudes en cuanto a la formación de radicales libres, sin embargo, las enzimas difieren entre sí en el sitio catalítico, en la utilización de cofactores y el tipo de enlaces que son capaces de oxidar (Call y col. 1997; Mester y Tien, 2000; Wan y Li, 2012). La manganeso peroxidasa (**MnP**) es una hemoproteína glicosilada con un peso molecular de aproximadamente 46 kDa (García-Rivero, 1996). El ciclo catalítico de la MnP es similar al de otras peroxidasas pero se requiere Mn (II) para completar su ciclo catalítico. Como se muestra en la **Figura 3.7**, la enzima es oxidada por H_2O_2 a MnP^{2+} , es rápidamente convertida a MnP^+ por reacción con un equivalente de Mn (II) o algún sustrato (X_{red}), dando lugar a Mn(III) ó el sustrato oxidado (X_{ox}). En la reacción siguiente un nuevo equivalente de Mn (II) reduce a MnP^+ a la forma nativa y el Mn(III) formado puede oxidar a los sustratos fenólicos identificados como X_{red} , en la **Figura 3.7** (Gold y Glenn, 1988). **MnP**, es capaz de oxidar un repertorio amplio de compuestos modelos de lignina, además, la presencia del ión

Mn^{3+} en la solución enzimática favorece aún más la capacidad deslignificante de éste sistema (Call y col. 1997; Mester y Tien, 2000).

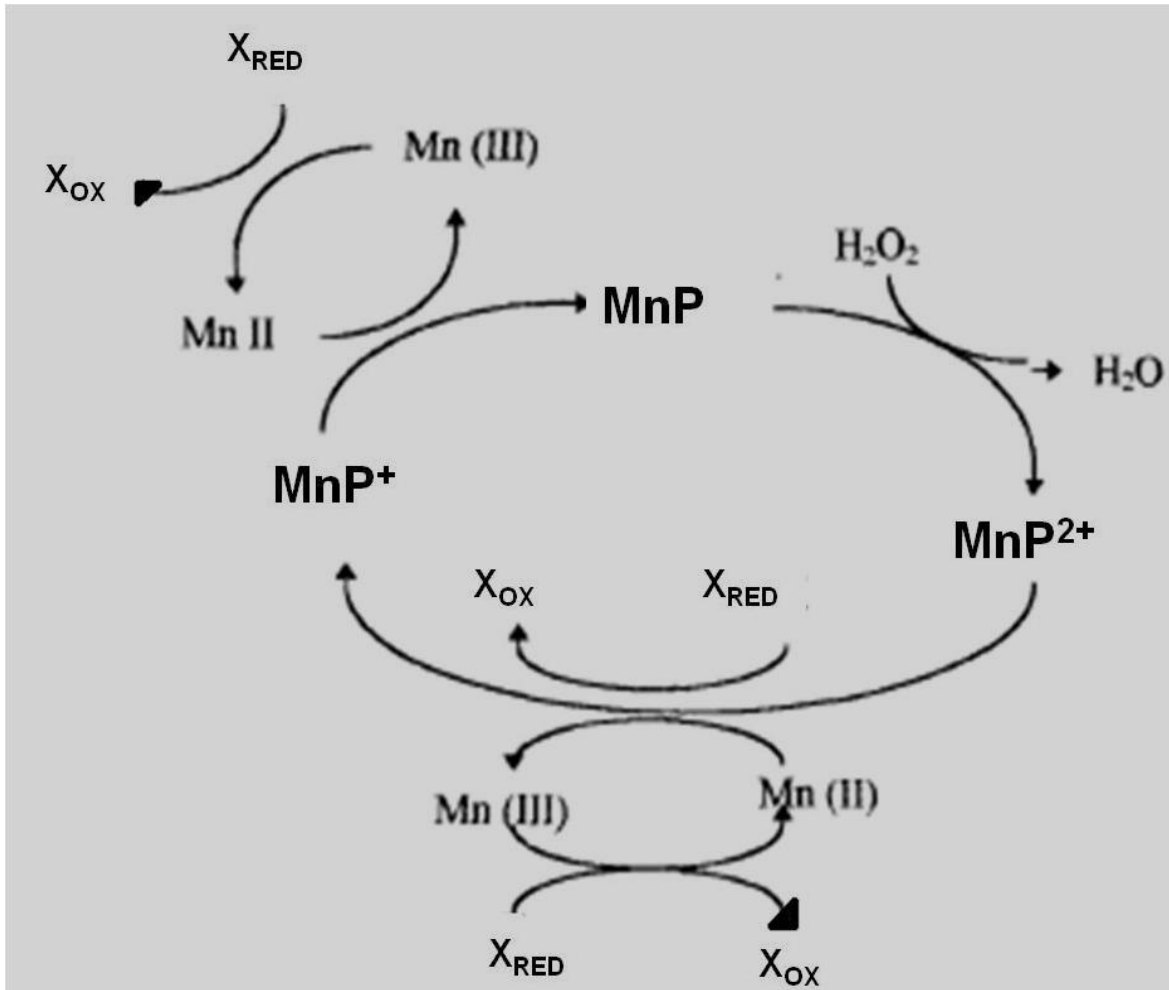


Figura 3.8. Ciclo catalítico de la manganeso peroxidasa (**MnP**). Fuente: García-Rivero (1996).

Las lacasas, en general son proteínas monoméricas de 60-70 kDa, la mayoría están glicosiladas dependiendo de la especie de procedencia (Giardina y col., 2010). Estas enzimas contienen un sitio catalítico de cuatro átomos de cobre haciéndolas diferentes a las peroxidadas, las cuales tienen hierro (Claus, 2003; Giardina y col., 2010) y además requieren O_2 para la oxidación de fenoles, polifenoles y aminas aromáticas en vez de H_2O_2 , como en el caso de **MnP** (Mester y Tien, 2000; Claus, 2003). **Lac** inicia su ciclo catalítico siendo oxidada por O_2 , a

ésta molécula le transfiere cuatro electrones de sus cuatro átomos de Cu (I) que están presente en el sitio catalítico, una vez que la enzima se encuentra en su forma oxidada, se reduce tomando cuatro electrones de cuatro equivalentes de sustrato (**Figura 3.8**). Esta enzima se caracteriza por la oxidación de compuestos fenólicos, produciendo radicales fenilo. Los cuales son altamente reactivos (Mester y Tien, 2000; Claus, 2003; Giardina y col., 2010).

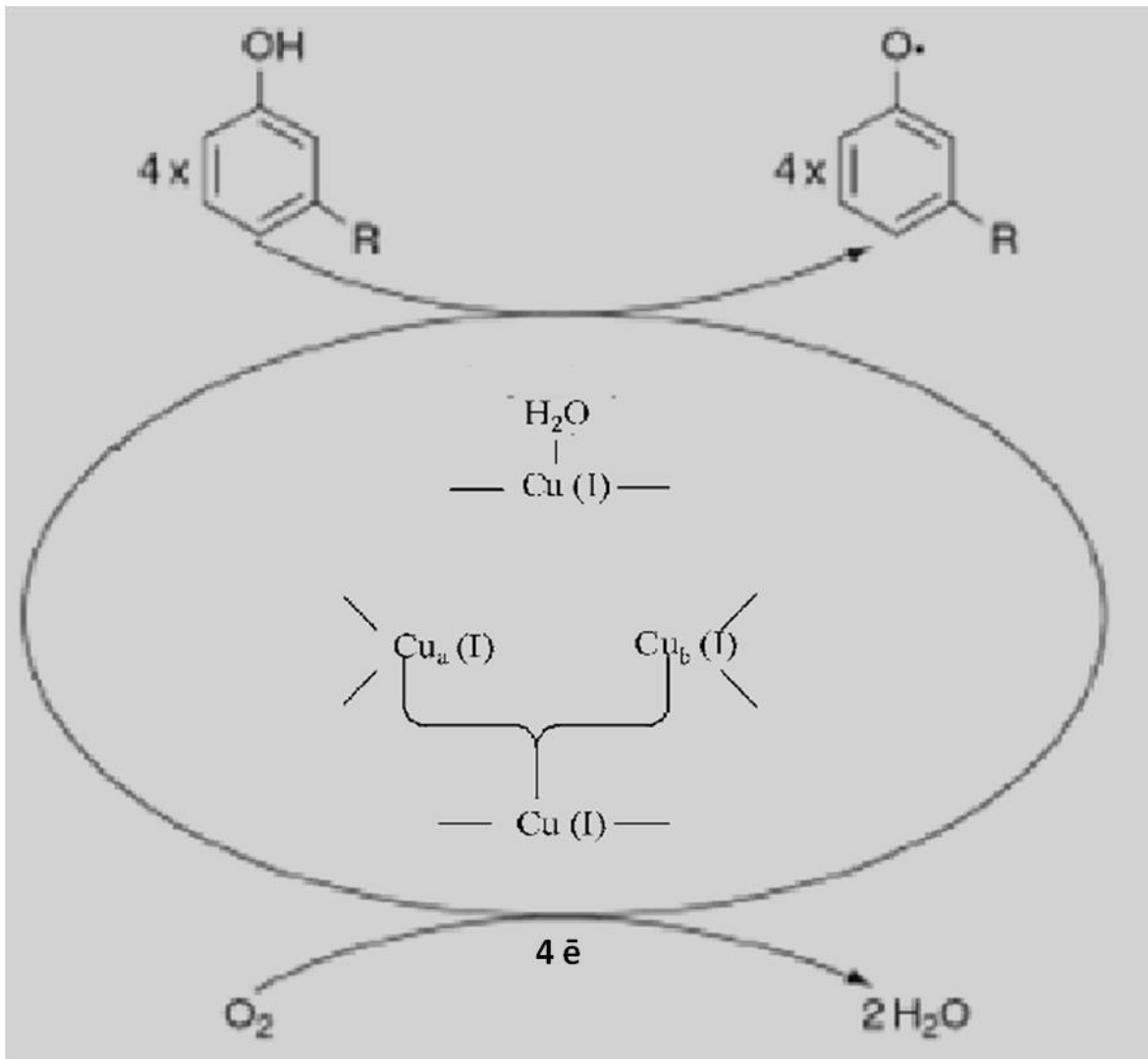


Figura 3.9. Ciclo catalítico de la lacasa (**Lac**). Fuente: Claus (2003).

En la práctica se sugiere la aplicación únicamente de las enzimas ligninolíticas, prescindiendo del microorganismo productor, de esta manera, se logra una

selectividad hacia la degradación de la lignina, dejando las fibras de polisacáridos intactas (Taherzadeh y Karimi, 2008; Sánchez, 2009; Talebnia y col., 2010; Wan y Li, 2012). Adicionalmente, diversos autores sugieren que dentro del sistema, se incluyan compuestos aromáticos de bajo peso molecular conocidos como cooxidantes. Los cooxidantes se aplican para la disminución de desigualdades catalíticas entre enzimas ligninolíticas (Cui y Dolphin, 1991; Shin y col., 2006; Camarero y col., 2007; Torres y col., 2009). En la literatura se recomienda no prescindir de los cooxidantes, ya que la formación de los radicales originados a partir de estas moléculas aumenta la capacidad oxidativa de las enzimas ligninolíticas (**Figura 3.9**), esto es porque al ser moléculas de poco volumen, pueden difundir mejor en la red de lignina y de esta manera el pretratamiento tiene una mayor capacidad oxidativa (Call y Mücke, 1997; Aracri y col, 2009; Giardina y col., 2010; Chen y col., 2012; Wan y Li, 2012).

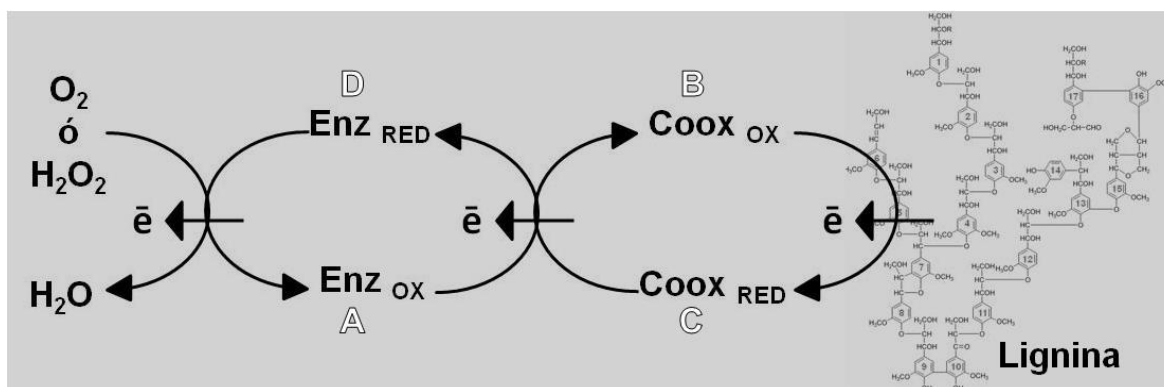


Figura 3.10. Degradación de lignina por el sistema enzima/cooxidante. (A) inicio del ciclo catalítico por oxidación de la enzima, (B) Reducción de la enzima y oxidación del cooxidante, (C) oxidación de la lignina por el cooxidante oxidado, (D) repetición del ciclo. Fuente: Shin y col. (2006).

En la **Figura 3.9**, se muestra un esquema de un sistema enzima/cooxidante en donde primero la enzima inicia su ciclo catalítico (A), posteriormente toma los electrones del cooxidante (B), el cooxidante oxidado difunde por la malla de lignina oxidándola (C) y finalmente el ciclo se repite (D). El tipo de cooxidantes que se proponen en la literatura son diversos y siguen bajo estudio. Sin embargo, se ha

demostrado que el tamaño del cooxidante es de mucha importancia en la deslignificación con enzimas ligninolíticas, ya que un cooxidante con menor tamaño, puede difundir mejor en la red de lignina a diferencia de otras moléculas más grandes. Cinéticamente, un cooxidante más lábil de formar su estado radical positivo evita la inactivación de la enzima debido a la acumulación del sustrato (Mestrer y Tien, 2000). Por lo tanto, el pretratamiento basado en enzimas ligninolíticas puede ser considerado como una oxidación catalizada que depende de diversos factores tanto bioquímicos como fisicoquímicos, los cuales juegan un papel importante tanto en la deslignificación como en el rendimiento de las reacciones de hidrólisis de los polisacáridos. Las condiciones de este tipo de sistemas sigue bajo investigación debido a que el campo de estudio dentro de estos sistemas implica varias disciplinas (Chen y col., 2012; Wan y Li, 2012), por lo mismo, no puede decirse que es un sistema que presenta desventajas comparado con otro tipo de pretratamientos de diferente naturaleza.

3.9.2. Líquidos iónicos.

La implementación de medios distintos al acuoso con la finalidad de llevar a cabo procesos químicos ha sido ampliamente estudiada. Entre los medios no acuosos se pueden emplear disolventes orgánicos y fluidos supercríticos, como el caso de CO₂ (Mosier y col., 2005; Mena-Martínez, 2009; Talebnia y col., 2010). Sin embargo, en el caso de los disolventes orgánicos, estos son líquidos inflamables y volátiles, además son perjudiciales para el ambiente y la salud humana. Por otro lado, los fluidos supercríticos requieren de equipo especial para su utilización, lo cual, en un proceso a gran escala, incrementa los costos (Park y col, 2001; Taherzadeh y Karimi, 2008; Mena-Martinez, 2009).

Los líquidos iónicos pueden ser una alternativa a estos medios distintos ya que presentan características deseables tanto prácticas como ecológicas (Dadi y col., 2006 Mena-Martinez, 2009). Los líquidos iónicos son sales orgánicas en estado líquido a temperatura ambiente, su presión de vapor va de nula a insignificante y

presentan excelentes estabilidades químicas y térmicas (Doherty y col., 2010; Yang F. y col. 2010).

Los líquidos iónicos están compuestos de un catión, generalmente una molécula orgánica (**Figura 3.4**) y un anión, que puede ser de distintas naturalezas (**Tabla 3.3**).

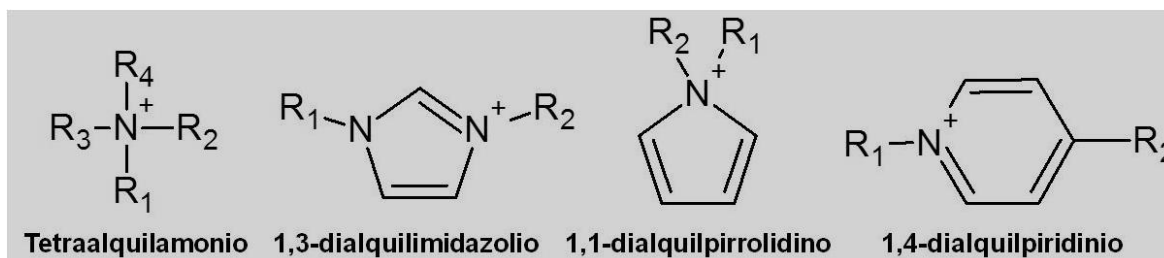


Figura 3.11. Cationes mayormente utilizados en líquidos iónicos. Fuente: Mena-Martínez (2009).

Cada combinación entre aniones y cationes, le confiere a cada líquido iónico propiedades distintas, debido a esta gran versatilidad, los líquidos iónicos se pueden aplicar en diferentes campos de estudio (Mena-Martínez, 2009).

Tabla 3.3. Aniones utilizados en líquidos iónicos.

Anion	Nombre
BF_4^-	Tetrafluoroborato
PF_6^-	Hexafluorofosfato
NO_3^-	Nitrato
CH_3COO^-	Acetato
CH_3SO_4^-	Metilsulfato
CF_3COO^-	Trifluoroacetato
Cl^-	Cloruro
Br^-	Bromuro

Fuentes: Pu (2007) y Mena-Martínez (2009).

Entre estas nuevas aplicaciones, se ha demostrado que algunos líquidos iónicos tienen la capacidad de disolver biomasa vegetal (Dadi y col., 2006; Lee y col., 2009; Sun y col., 2009). Esta propiedad puede contribuir a la utilización eficiente de recursos lignocelulósicos. Esta idea ha dado lugar a importantes investigaciones en la disolución de la celulosa así como también de lignina (Kubo y col., 2008; Lee y col., 2009; Sievers y col., 2009; Sun y col., 2009; Cox y col., 2011; Wu y col., 2011). En el caso de la celulosa, se ha demostrado que ésta pierde cristalinidad al someterse a un tratamiento con líquidos iónicos y de esta manera es más susceptible a la despolimerización mediante enzimas hidrolíticas (Dadi y col., 2006; Yang y col., 2010). En el caso de la lignina existe un debate en el efecto que ejerce el líquido iónico sobre este polímero, la primera propuesta es una disolución en el líquido iónico mediante la formación de puentes de hidrógeno (Doherty y col., 2010; Wu y col., 2011) y la otra es la ruptura de enlaces del tipo β -O-4 éter en la molécula de lignina (Kubo y col., 2008; Cox y col., 2011). Independientemente del mecanismo seguido, se ha demostrado una mejor separación de los componentes de los materiales lignocelulósicos así como también una clara disponibilidad de los polisacáridos a ser hidrolizables (Lee y col., 2009; Sievers y col., 2009; Sun y col., 2009; Wu y col., 2011).

4. Hipótesis.

Los residuos lignocelulósicos son materiales de gran complejidad debido a su organización estructural interna. Como hipótesis de este trabajo se planteó que para poder aprovechar al aserrín como materia prima es necesario separar los componentes mayoritarios de pared celular y para lograrlo se necesita un pretratamiento que remueva parcial o completamente la lignina y además disminuya la cristalinidad de la celulosa. De los pretratamientos seleccionados (enzimas lignolíticas y líquidos iónicos), aquel que logre ambos propósitos, producirá un sustrato más susceptible a ser hidrolizado por enzimas.

5. O b j e t i v o s.

5.1. OBJETIVO GENERAL.

- Evaluar la eficiencia de las enzimas ligninolíticas y de los líquidos iónicos para modificar la pared celular del aserrín.

5.2 OBJETIVOS PARTICULARES.

- Caracterizar a los sustratos de aserrín a través de un análisis composicional de acuerdo al procedimiento utilizado en la literatura.
- Evaluar la influencia de las enzimas ligninolíticas seleccionadas así como la presencia o ausencia de un cooxidante sobre un mismo sustrato.
- Evaluar la influencia de los líquidos iónicos sobre un mismo sustrato.
- Evaluar la influencia de la procedencia del sustrato en cada pretratamiento.

6. Materiales y métodos.

6.1 Sustratos.

Se eligió aserrín de madera debido a que es un residuo lignocelulósico de fácil manejo y almacenamiento en el laboratorio. Además, por ser un material recalcitrante, el aserrín puede representar un buen modelo de trabajo posteriormente, si se deseara tratar otros residuos lignocelulósicos más “suaves”, podría aprovecharse los estudios realizados en el aserrín de acuerdo a lo descrito en este trabajo.

Se utilizaron dos muestras de aserrín de diferente procedencia. La primera muestra fue de una carpintería de la zona de Xochimilco, por lo que el tipo de madera que originó este aserrín es desconocido. Durante este trabajo se le dió la clave **L-104-X**. La segunda muestra fue aserrín del aserradero Forestal Alfa “El Salto” Durango, México; de pino *Pinus cooperi blanco*. Generosamente proporcionado por el Dr. Oscar Velazco, IPN. Durante este trabajo se le dio la clave **L-104-D**.

6.2 Fragmentación y tamizado.

En la literatura, se han optimizado los procedimientos de análisis composicional, para un intervalo de tamaños de partícula específicos, es por esto, que se necesita convertir una muestra de biomasa en un material uniforme y adecuado para su estudio. Mediante la fragmentación y el tamizado se logra una disminución en la desviación de los parámetros medios en la muestra, así como también el número de errores introducidos en el análisis. Los procedimientos seguidos en este trabajo para la determinación de la composición del aserrín esta reportado en el documento NREL/TP-510-42620 (Hames y col., 2008).

Las muestras de aserrín se fragmentaron en una licuadora (WARING COMMERCIAL LABORATORY BLENDER®, modelo 34BL97) mediante tres pulsos de 5 min cada uno, a máxima velocidad. Los fragmentos, fueron tamizados en una malla metálica de poro de 2 mm. Las muestras tamizadas se conservaron dentro de frascos de vidrio para su uso posterior y se les denominaron con las claves **L-104-Xt** y **L-104-Dt**, la primera correspondiente a la muestra de aserrín procedente de Xochimilco y la segunda a la muestra de aserrín procedente de Durango.

6.3 Contenido de humedad.

Las muestras de biomasa pueden variar en cuanto al contenido de humedad. A su vez, éste puede cambiar rápidamente cuando la muestra está expuesta al aire. Para ser significativos, los resultados de los análisis químicos de biomasa, estos son típicamente informados de acuerdo al peso seco, determinado de acuerdo a la norma NREL/TP-510-42621 (Hames y col, 2008).

Se tomaron cuatro crisoles de porcelana, previamente preparados de acuerdo a la sección **6.10.1**. Dentro de dos crisoles se midió, en cada uno, aproximadamente 1.0 g de la muestra **L-104-Xt** y dentro de los otros dos crisoles, se midió la misma cantidad de la muestra **L-104-Dt**. Los crisoles con su contenido, se colocaron en un horno con vacío por 24 h a 45 °C.

Al finalizar este periodo, se dejaron alcanzar temperatura ambiente dentro de un desecador, y se llevaron a “peso constante” repitiendo el procedimiento dos veces más. El contenido de humedad de cada muestra dentro de cada crisol, se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$\text{humedad (\%)} = \frac{\text{muestra húmeda (mg)} - (\text{crisol} + \text{muestra (mg)} - \text{crisol vacío (mg)})}{\text{muestra húmeda (mg)}} \times 100\%$$

Nota:

- Masa del crisol vacío de acuerdo a la sección **6.10.1**.

El contenido de humedad de las muestras **L-104-Xt** y **L-104-Dt**, fue el promedio entre los dos crisoles correspondientes para cada tipo de muestra.

6.4 Contenido de cenizas.

El contenido de cenizas de un sustrato puede llegar a interferir con el contenido de lignina insoluble de acuerdo al NREL/TP-510-42618 (Hames y col., 2008), por eso mismo, fue importante conocer el contenido de cenizas de las muestras de aserrín.

Se tomaron cuatro crisoles de porcelana, previamente preparados de acuerdo a la sección **6.10.1**. En dos crisoles se pesaron, en cada uno, aproximadamente 1.0 g de la muestra **L-104-Xt**. En los otros dos crisoles se colocó la misma cantidad de la muestra **L-104-Dt**. Los crisoles con las muestras se calentaron con un mechero Fisher hasta que cada muestra de aserrín se quemó y su color cambió completamente a negro. Una vez hecho esto, los crisoles con las muestras quemadas, se metieron dentro de una mufla encendida con 30 min de anticipación y ajustada a una temperatura de 500 °C. Las muestras se dejaron calcinar por un periodo de 4 horas a 500 °C y al finalizar el periodo de calcinación, los crisoles se dejaron por un rato dentro de la mufla hasta que su temperatura disminuyó un poco, para después colocarlos dentro de un desecador hasta que alcanzaron temperatura ambiente. Por último, se registró el peso de los crisoles y su contenido. El contenido de cenizas en cada crisol, se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$\text{cenizas } (\%) = \frac{\text{Crisol+cenizas (mg)} - \text{crisol vacío(mg)}}{\text{muestra inicial (mg)}} \times 100\%$$

Notas:

- La muestra inicial corresponde al peso seco del aserrín.
- Masa del crisol vacío de acuerdo a la sección **6.10.1**.

El contenido de cenizas de las muestras **L-104-Xt** y **L-104-Dt**, fue el promedio entre dos muestras correspondientes a cada tipo de sustrato.

6.5. Extracción de compuestos solubles en acetona.

La cantidad de materia soluble en acetona presente en madera o pulpa de celulosa, proporciona una medida del contenido de resinas. La materia soluble en acetona incluye por ejemplo, ácidos grasos, ácidos resínicos, alcoholes grasos, esteroides, di y triglicéridos, ésteres y ceras.

Para la determinación del contenido de extraíbles en acetona, se siguió un procedimiento de acuerdo al documento de la Scandinavian Pulp, Paper and Board Testing Committee (*SCAN-CM 49:03*). Dentro de un cartucho de celulosa previamente preparado de acuerdo a la sección **6.10.2**, se midieron aproximadamente 5.0 g de aserrín tamizado. El cartucho se colocó en un sistema Soxhlet como el mostrado en la **Figura 6.1**, y se extrajo con acetona de acuerdo a las condiciones descritas en la **Tabla 6.1**.

Tabla 6.1 Condiciones de Extracción.

Extracción en equipo Soxhlet	
Disolvente	150ml de acetona
Tiempo	6 horas
Velocidad de extracción	4 ciclos por hora ^a

^a la velocidad de extracción se ajustó con el reóstato.

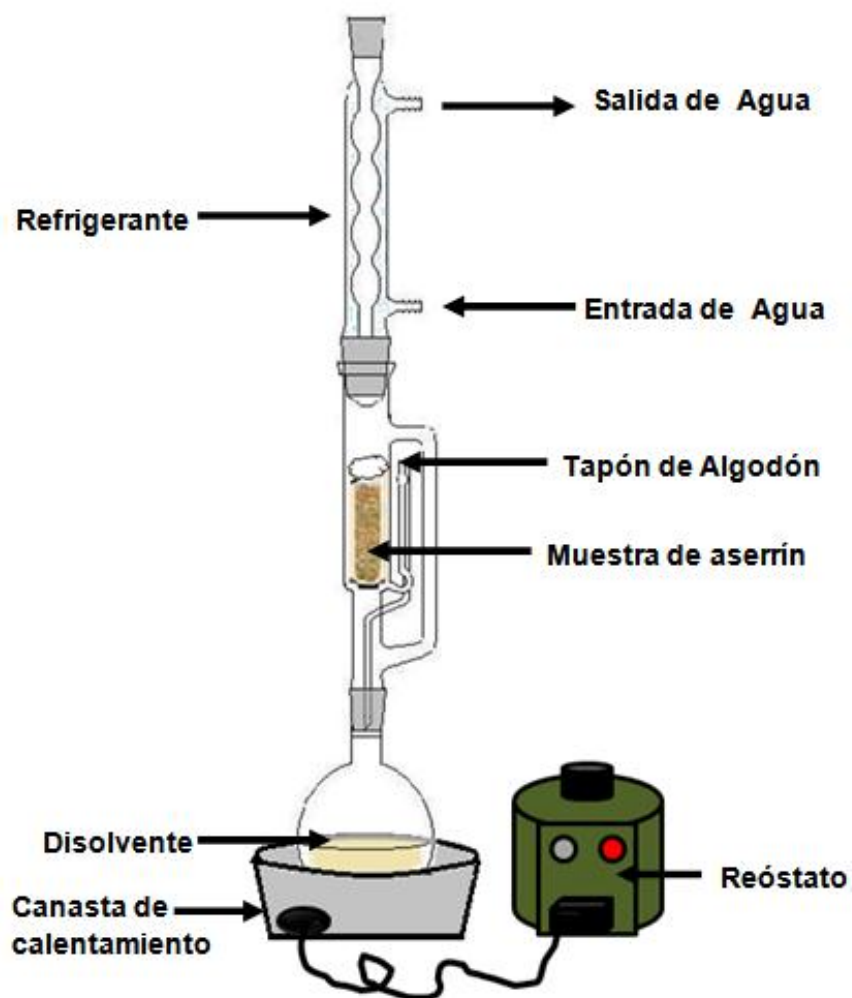


Figura 6.1. Esquema del sistema de extracción Soxhlet utilizado.

Una vez concluido el tiempo de extracción, la muestra dentro del cartucho, se colocó dentro del horno con vacío y se dejó secar por 24 h a 45°C. Una vez que se evaporó el disolvente, el cartucho con la muestra se colocó dentro de un desecador hasta que alcanzó temperatura ambiente y, finalmente, se midió la masa alcanzada. El procedimiento antes descrito se realizó para dos lotes independientes de la muestra **L-104-Xt** y para dos de la muestra **L-104-Dt**. Los lotes de las muestras libres de extraíbles se combinaron de acuerdo a la procedencia del aserrín inicial y se les denominó finalmente como **L-104-Xte** y **L-104-Dte**. A las muestras se les dio esta nueva denominación debido a que con estas muestras libres de extraíbles se trabajó a partir de este momento.

El porcentaje de extraíbles en acetona se calculó de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\text{Extraíbles}(\%) = \frac{\text{muestra inicial (mg)} - (\text{cartucho} + \text{muestra extraída(mg)} - \text{cartucho seco(mg)})}{\text{muestra inicial (mg)}} \times 100\%$$

Notas:

- La muestra inicial corresponde al peso seco del aserrín
- Para la masa del cartucho seco, revisar la sección **6.10.2**

6.6 Contenido de proteína cruda.

La biomasa utilizada como materia prima para la conversión a combustibles y otros productos químicos, puede contener proteínas y otros compuestos nitrogenados. Estos componentes son parte de un análisis integral de la biomasa, por lo que deben cuantificarse. La proteína en la biomasa es difícil de medir directamente. En muchos casos el contenido de nitrógeno de la muestra de biomasa se mide por métodos de combustión como el de Kjeldahl de acuerdo a NREL/TP-510-42625 (Hames y col., 2008) y el contenido de proteína se estima utilizando un factor de conversión adecuado, como se describe dentro de esta norma. Sin embargo este procedimiento no se pudo aplicar al pie da la letra a las por falta de infraestructura para poder calcular los factores de conversión adecuados.

El contenido de nitrógeno en las muestras **L-104-Xte** y **L-104-Dte** (por duplicado) se realizó en el laboratorio 323 del conjunto E de la Facultad de Química de la UNAM por la M. en C. María de los Ángeles Valdivia López y la QFB. Bertha Julieta Sandoval Guillén. De acuerdo al reporte generado, se siguió el procedimiento: *Crude protein in meat. Block digestion method* (AOAC oficial Method 981.10).

Para calcular el contenido de proteína cruda, se consultó la página web: <http://www.foragetesting.org/> (15/08/12); dentro de la pestaña “*Lab procedures*”,

se encontró un documento dentro de la sección 3 “*Nitrogen and Crude Protein Determination*”, con el cual se deduce la siguiente ecuación:

$$\textit{Proteína cruda} (\%) = 6.25 \times (\textit{N}_2 \textit{ en la muestra} (\%))$$

6.7. Hidrólisis química.

La finalidad de realizar una hidrólisis química es para cuantificar azúcares reductores liberados, lignina soluble e insoluble en H₂SO₄. Estos polímeros representan el mayor interés dentro de la biomasa, ya que Los primeros son los compuestos que pueden ser transformados en otro tipo de recursos de mayor valor agregado y es realmente la parte aprovechable de la biomasa. De esta manera, conocer el contenido de cada uno de ellos puede ayudar a clasificar a la biomasa como “muy aprovechable” o “poco aprovechable” (Varnero y col., 2010).

El procedimiento que se siguió está basado en el documento NREL/TP-510-42618 (Hames y col, 2008), pero se realizó una modificación en cuanto a los tiempos de hidrólisis, con la finalidad de que ésta fuera óptima para los sustratos utilizados en este trabajo. Se trató un triplicado de cada muestra, siguiendo el procedimiento esquematizado en la **Figura 6.2**.

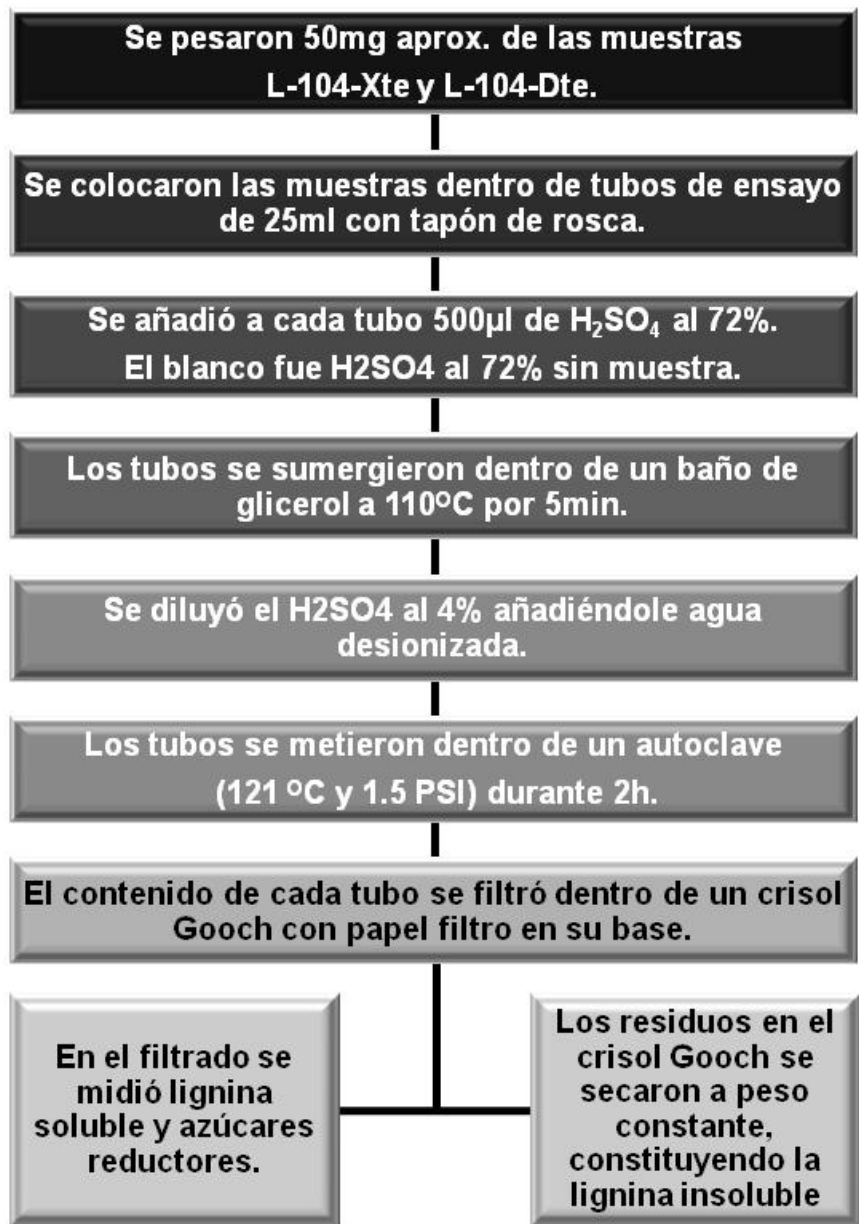


Figura 6.2. Procedimiento durante la hidrólisis ácida

6.7.1 Cuantificación de azúcares reductores.

En el documento original NREL/TP-510-42618, las muestras hidrolizadas mediante ácido sulfúrico al 4 %, se analizan mediante HPLC para cuantificar la cantidad de monosacáridos liberados mediante el tratamiento, posteriormente

éstos se asocian a la cantidad de carbohidratos totales presentes en la muestra. Sin embargo, Domínguez y col. (2011) analizaron mediante la técnica de DNS (ácido 3,5-Dinitrosalicílico) bagazo de caña, hidrolizado con ácido sulfúrico al 4% y asocian la cantidad de azúcares reductores a los polisacáridos totales de las muestra. Basándonos en Domínguez y col. (2011), se logró obtener de una manera rápida, información acerca de la cantidad de polisacáridos en los sustratos. Información que fue muy útil para los siguientes experimentos.

Los azúcares liberados por hidrólisis química (ácido sulfúrico al 4 %) se cuantificaron como azúcares reductores por el método del DNS(ácido 3,5-Dinitrosalicílico), descrito en la **sección 6.10.4**, previa neutralización de la muestra; ya que el exceso de ácido inhibe la formación del color. Alicuotas de 193 μL del hidrolizado se neutralizaron con 57 μL de NaOH 4 M. Para calcular la cantidad de azúcares reductores presentes en la muestra analizada se utilizó la siguiente ecuación:

$$\text{Azúcares reductores (mg)} = \frac{\text{Absorbancia}_{\lambda=540} \times \text{sobrenadante (mL)}}{\epsilon_{\lambda=540} \times \text{alícuota tomada (mL)}}$$

El contenido de carbohidratos totales en los diferentes sustratos se expresó por gramo de aserrín mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Carbohidratos totales (\%)} = \frac{\text{Azúcares reductores (mg)}}{\text{muestra inicial(mg)}} \times 100\%$$

Nota:

- La muestra inicial se encuentra en peso seco y restando el contenido de extraíbles y de ceniza.

6.7.2 Cuantificación de lignina soluble en H_2SO_4 .

En el sobrenadante de las muestras hidrolizadas con ácido sulfúrico al 4 %, se determinó el contenido de lignina soluble (**Figura 6.2**). Con la ayuda de una

micropipeta se tomaron dos alícuotas de 0.2 mL de cada muestra hidrolizada, las alícuotas se transfirieron a tubos de ensayo de 12.5 mL y a cada una se les añadió la cantidad de agua desionizada suficiente para completar 1 mL de solución. Se leyó la absorbancia de cada muestra en un espectrofotómetro UV-Visible (marca Shimadzu® y modelo UV-160). La longitud de onda utilizada fue de $\lambda=240\text{nm}$ de acuerdo al documento NREL/TP-510-42618 (Hames y col., 2008). El contenido de lignina soluble en H_2SO_4 se determinó mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Lignina soluble (mg)} = \frac{\text{Absorbancia}_{\lambda=240} \times \text{Volumen del filtrado (mL)}}{\epsilon_{\lambda=240} \times \text{alícuota tomada (mL)}}$$

Nota:

- $\epsilon_{\lambda=240} = 12 \text{ mL mg}^{-1}$ de acuerdo a NREL/TP-510-42618 (Hames y col., 2008).

El porcentaje de lignina soluble en cada muestra hidrolizada con ácido sulfúrico se determinó mediante:

$$\text{Lignina soluble (\%)} = \frac{\text{lignina soluble (mg)}}{\text{muestra inicial (mg)}} \times 100\%$$

Nota:

- La muestra inicial se encuentra en peso seco y restando el contenido de extraíbles y de ceniza.

6.7.3 Cuantificación de lignina insoluble en H_2SO_4 .

Previamente se prepararon 6 crisoles Gooch de porcelana y 6 papeles filtro de acuerdo a las secciones 6.10.1 y 6.10.3 respectivamente. Dentro de los crisoles, se recuperaron los sólidos no solubles después de la hidrólisis ácida. Los sólidos se enjuagaron con agua desionizada varias veces para remover el ácido sulfúrico. Finalmente, los crisoles, con su contenido, se colocaron dentro de un horno con vacío por 24 h a 115 °C. Al término, se colocaron dentro de un desecador hasta

que alcanzaron temperatura ambiente. Por último se registró la masa de cada crisol y su contenido. Para conocer la cantidad de lignina insoluble se utilizó la siguiente ecuación:

$$\textit{lignina insoluble (mg)} = X_1 - X_2 - X_3 - X_4 - X_5$$

Donde: X_1 = crisol gooch + papel filtro + sólidos (mg), X_2 = crisol gooch (mg), X_3 = papel filtro (mg), X_4 = muestra inicial (mg) x proteína cruda (%) y X_5 = muestra inicial (mg) x cenizas (%)

El porcentaje de lignina soluble en cada muestra hidrolizada con ácido sulfúrico se determinó mediante:

$$\textit{Lignina insoluble (\%)} = \frac{\textit{lignina insoluble (mg)}}{\textit{muestra inicial (mg)}} \times 100\%$$

Nota:

- La muestra inicial se encuentra en peso seco y restando el contenido de extraíbles y de ceniza.

6.8 Pretratamientos.

Se requiere un pretratamiento para alterar la estructura de la lignina presente en la biomasa y de esta manera hacer a la celulosa más accesible a las enzimas que convierten los polímeros de carbohidratos en azúcares fermentables. El objetivo es romper el sello de la lignina y modificar la estructura cristalina de la celulosa. El pretratamiento se considera como una de las etapas más caras del procesamiento de la biomasa celulósica en azúcares fermentables (Mosier y col., 2005).

Como ya se mencionó, en éste trabajo, se evaluó el efecto de un pretratamiento con enzimas y otro con líquidos iónicos sobre un mismo tipo de sustrato, pero de dos procedencias. A continuación, se describen las actividades realizadas para lograr este propósito.

6.8.1 Pretratamiento con enzimas ligninolíticas.

Las enzimas utilizadas fueron: Manganese peroxidasa (**MnP**) de *Nematoloma frogardii* (SIGMA-ALDRICH: 41563) y Lacasa (**Lac**) de *Pleurotus ostreatus* (SIGMA-ALDRICH: 75117).

Los cooxidantes fueron: alcohol veratrílico (**AV**) (Cui y Dolphin, 1991) (SIGMA-ALDRICH: D133000) y ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) (**ABTS**) (Bourbonnais y Paice, 1990) (SIGMA-ALDRICH: A1888). La concentración de cada uno de los reactivos y las condiciones de los pretratamientos enzimáticos se muestran en la **Tabla 6.2**.

Tabla 6.2 Pretratamiento enzimático de las muestras de aserrín.

	Composición	Concentración
Solución enzimática 1	{ Lacasa (Lac) Buffer acetato de sodio	0.4 U/mL 25mM (pH=4.5)
Solución enzimática 2	{ Manganeso peroxidasa (MnP) Buffer malonato de sodio MnCl ₂	0.4 U/mL 25mM 1mM (pH = 4.5)
Cooxidante 1	Acido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) (ABTS)	0.05% (m/v)
Cooxidante 2	Alcohol veratrílico (AV)	0.05% (m/v)

Lotes de 500 mg aproximadamente de cada sustrato se colocaron en matraces Erlenmeyer de 50 mL y a cada matraz, se le añadió **10 mL** de una de las soluciones enzimáticas más la cantidad necesaria de cualquiera de los cooxidante de acuerdo a la **Tabla 6.2**. Dependiendo del experimento, las incubaciones duraron **36, 168 ó 336 h** y todas fueron a temperatura ambiente y en agitación radial.

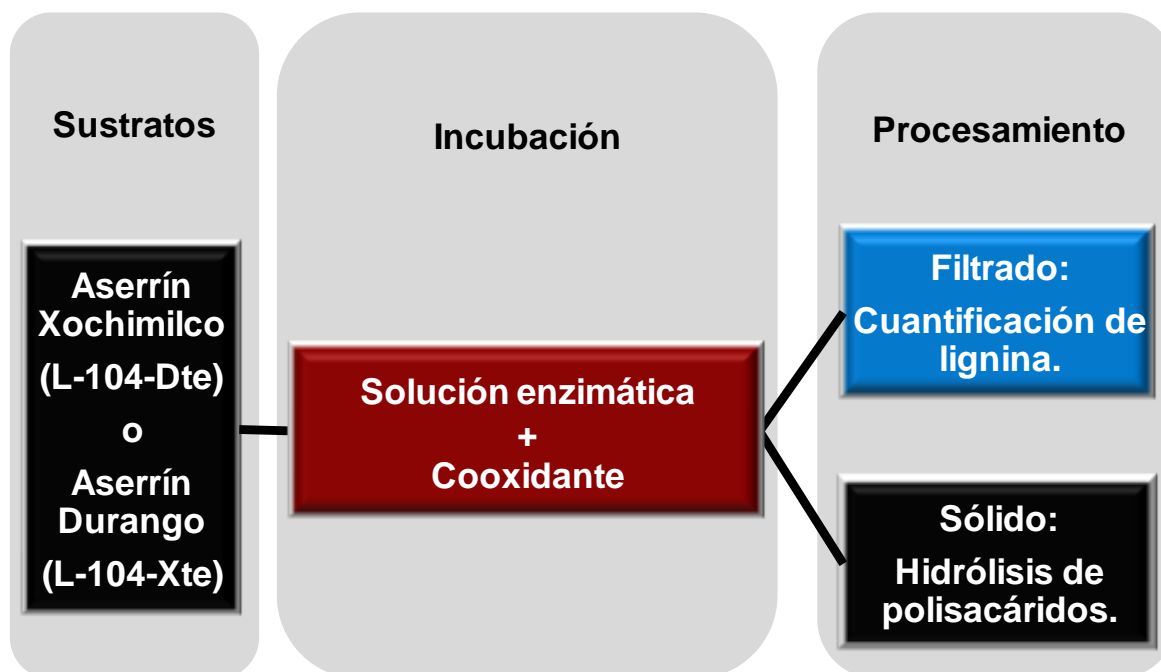


Figura 6.3. Procedimiento general del pretratamiento con enzimas ligninolíticas. Soluciones enzimáticas: lacasa (**Lac**) o manganeso peroxidasa (**MnP**). Cooxidantes: alcohol veratrílico (**AV**) o Acido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) (**ABTS**). La etapa posterior a la incubación, se describirá a lo largo del texto.

En la **Figura 6.3** se muestra el esquema del procedimiento general para el pretratamiento de los sustratos con las enzimas ligninolíticas. Al final del tiempo de incubación, la muestras se filtraron en crisoles Gooch con papel filtro Whatman® No.1 (ambos previamente llevados a "peso constante" ver **6.10.1 6.10.3**). Dependiendo del experimento, los sobrenadantes se descartaron o se utilizaron para su análisis (ver **6.8.1.1**) Los sólidos recuperados se secaron (115°C, 24h), se etiquetaron, y se reservaron para su posterior análisis. Los experimentos

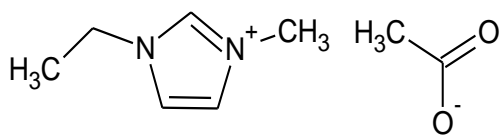
realizados a las **336 h** se realizaron por triplicado, mientras que los demás se determinaron por duplicado.

6.8.1.1. Cuantificación de lignina solubilizada por las enzimas ligninolíticas.

Con la finalidad de comprobar la longitud de onda a la cual la lignina presenta un máximo, se determinó su espectro de absorción. Los sobrenadantes de la incubación enzimática a **336 h** se filtraron, a través de filtros concentradores (Spin-XUF, CORNING) con tamaño de poro menor de 10000 Kd, para remover el contenido de proteína presente en ellos. Se tomaron 6 mL de los sobrenadantes originales, se colocaron en los filtros concentradores y se centrifugaron a 4000 x *g* por 6 min. De los filtrados, libres de proteína (2 mL aproximadamente), se tomaron alícuotas de 50 µL y se les añadió agua desionizada suficiente para completar 2 mL (dilución 1:40). Por último, con ayuda del espectrofotómetro, se obtuvo su espectro de absorción en el intervalo de **240-300 nm** de longitud de onda. Como blanco se utilizó buffer de acetatos o de malonato a la mismas concentraciones que la mencionadas en la **Tabla 6.2**. Como patrón de las bandas principales de lignina se obtuvo un espectro de una solución acuosa (0.01mg/mL) de lignina soluble (SIGMA-ALDRICH 471003).

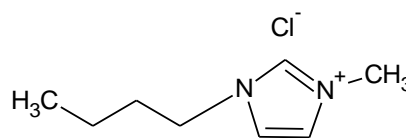
6.8.2 Pretratamiento con líquidos iónicos.

Los líquidos iónicos utilizados fueron acetato de 1-etil-3-metilimidazolio [**Emim**] (SIGMA-ALDRICH: 689483) y cloruro de 1-butil-3-metilimidazolio [**Bmim**] (Donación Lab. 314 conjunto E, Facultad de Química UNAM).



Acetato de 1-etil-3-metilimidazolio

[Emim]



Cloruro de 1-butil-3-metilimidazolio

[Bmim]

Figura 6.4. Estructuras de los líquidos iónicos empleados.

En tubos de vidrio de 12.5 mL (100mm X 15 mm), se pesaron aproximadamente 50 mg del sustrato a utilizar y a cada tubo se le agregaron aproximadamente 600 mg del líquido iónico a evaluar, dependiendo del experimento (Wu y col. 2011). A los tubos se les añadió también una barra magnética y se sumergieron dentro de un baño de aceite a 110°C (Lee y col., 2009) en agitación constante y durante diferentes tiempos de incubación, dependiendo del experimento. Al finalizar el periodo de incubación, los tubos se sacaron del baño de aceite, se colocaron en una gradilla sobre una parrilla con agitación magnética y se les agregaron 6 ml de alguno de los disolventes descritos en la **Tabla 6.3** para separar la biomasa del líquido iónico.

Tabla 6.3. Disolventes empleados para la separación de la biomasa.

Disolvente	Composición
1	Agua desionizada
2	Mezcla acetona-agua (1:1)
3	Mezcla acetoniilo-agua (80:20)

Al separar la biomasa, ésta se recuperó por filtración al vacío dentro de crisoles Gooch con papel filtro Whatman® No.1 (previamente secados y pesados ver **6.10.1** y **6.10.3**). El sólido recuperado se secó a 115 °C por 24 h y se guardó para

su posterior análisis. En el sobrenadante, se cuantificó lignina soluble de la siguiente manera: se tomaron alícuotas de 200 μL de cada sobrenadante y se les agregó a cada una 800 μL de agua desionizada, en el espectrofotómetro se leyeron las absorbancias de la soluciones en la zona del ultravioleta ($\lambda = 240\text{nm}$), cómo blanco se utilizó una solución del respectivo líquido iónico a la misma concentración final. Estos experimentos se realizaron por duplicado. En la **Figura 6.4** se muestra el procedimiento seguido en esta parte experimental.

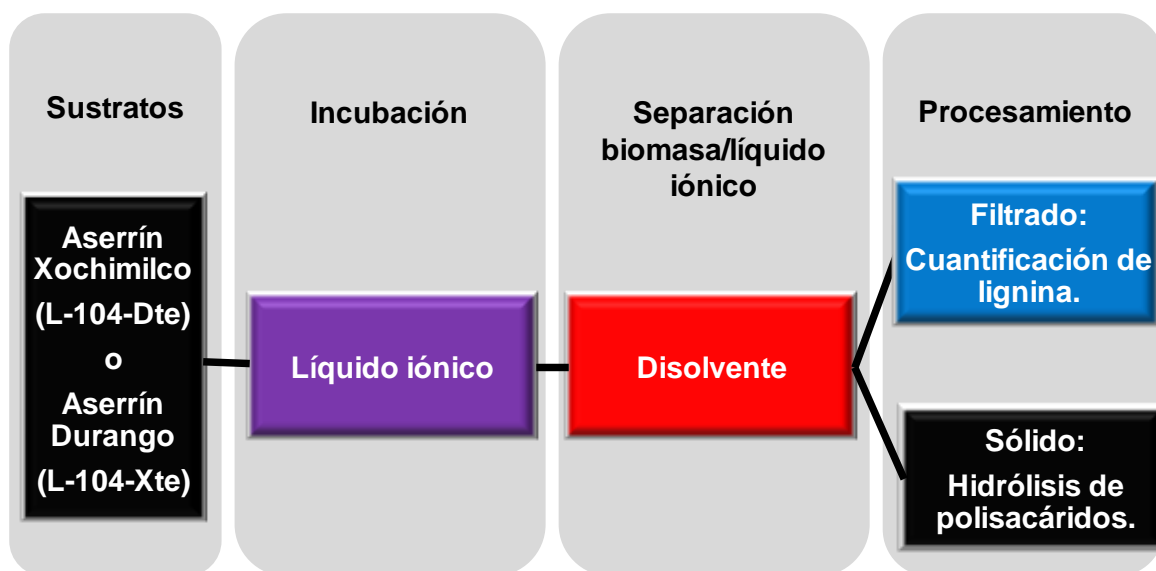


Figura 6.5. Procedimiento general del pretratamiento con líquidos iónicos. Líquidos iónicos: acetato de 1-etil-3-metilimidazolio [**Emim**] o cloruro de 1-butil-3-metilimidazolio [**Bmim**]. Disolventes: agua desionizada, mezcla acetona-agua (1:1), mezcla acetoniilo-agua (80:20). La etapa posterior a la incubación, se describirá a lo largo del texto.

6.9 Hidrólisis enzimática.

Las muestras pretratadas tanto por enzimas ligninolíticas como por líquidos iónicos se sometieron a una hidrólisis enzimática para la liberación de los azúcares presentes en el sustrato. Como enzimas hidrolíticas se utilizaron dos

mezclas comerciales, una de GENENCOR® (**GE**) y la otra de ENMEX® (**EN**). En ambos casos las mezclas contenían Celulasa, β -glucosidasa y xilanasa (**Tabla 6.4**).

Tabla 6.4. Actividad de las Hidrolasas en las preparaciones comerciales.

Enzima (U* / ml)	GENENCOR (GE)	ENMEX (EN)
Celulasa ¹	2200	45000
β -glucosidasa ²	3000	12000
Xilanasa ³	20000	34000

¹Cuantificada con carboximetilcelulasa; ²cuantificada con p-nitrofenil-b-D-glucopiranosido; ³cuantificada con xilano de avena. * μ moles de reductores o de p-nitrofenil, según corresponda / min.

Varias muestras de aserrín pre-tratado (50mg aprox) por alguno de los métodos mencionados en **6.8**, se colocaron en matraces Erlenmeyer de 50 mL y se les añadieron 10 mL de la solución de enzimas descrita en la **Tabla 6.5**. Cada matraz se incubó por 168 h a 50 °C en agitación constante. Una vez cumplido el periodo de incubación, el contenido de cada matraz se filtró a través de crisoles Gooch con papel filtro Whatman® No.1 (previamente secados y pesados ver **6.11**). El residuo en cada caso se secó (115 °C, 24 h) y se guardó para su posterior análisis. Mientras que el filtrado correspondiente se utilizó para cuantificar azúcares reductores por DNS, de acuerdo a la sección **6.11.4**, excepto que la alícuota de muestra fue de 150 μ L y se le adicionaron 100 μ L de agua para completar los 250 μ L, descritos en dicha sección.

Tabla 6.5. Componentes de la soluciones de hidrolasas.

Solución de hidrolasas	1	2
Mezcla enzimática	GENENCOR (GE)	ENMEX (EN)
Concentración	10 µL/mL	10 µL/mL
Buffer	Acetato de sodio (25mM)	Acetato de sodio (25mM)
pH	5.5	5.5
Inhibidor microbiano	Azida de sodio (0.01%)	Azida de sodio (0.01%)

En la **Figura 6.6** se muestra esquemáticamente el procedimiento a seguir a partir de que las muestras **L-104-Xte** y **L-104-Dte** son sometidas a los pretratamientos.

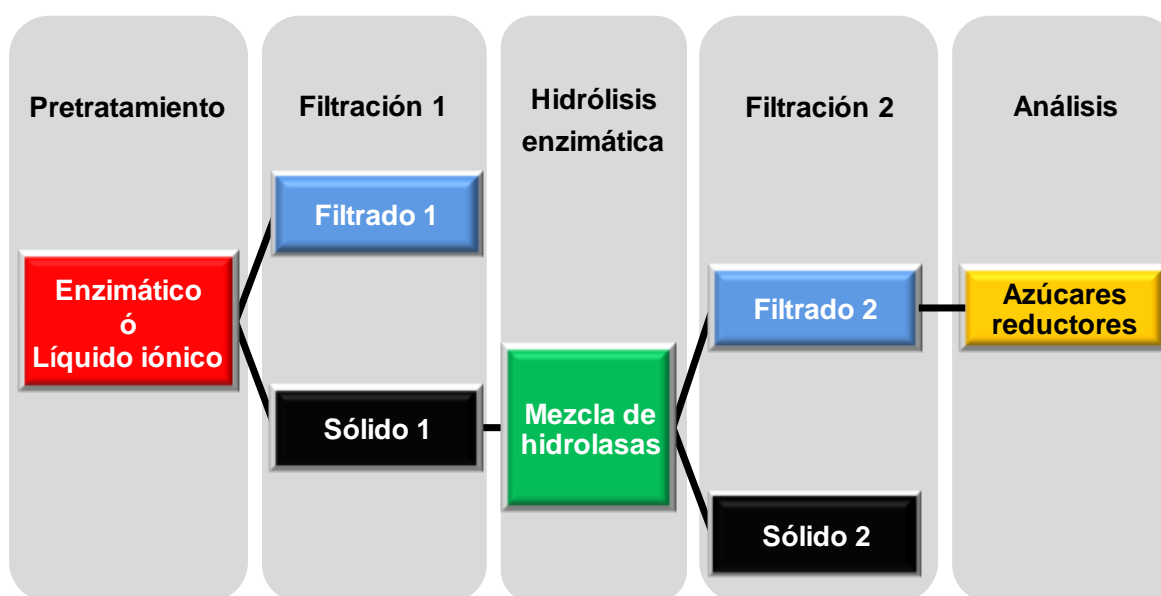


Figura 6.6. Procedimiento general de las hidrólisis enzimáticas. Mezcla de hidrolasas: GENENCOR® (GE) o ENMEX® (EN).

6.10 Metodologías complementarias.

6.10.1 Secado de crisoles y crisoles Gooch de porcelana.

Para este trabajo se contó con cuatro crisoles de porcelana de 25 mL y seis crisoles Gooch de porcelana de 25 mL. Los crisoles, previamente enjuagados con agua desionizada y etanol al 96 %, se colocaron dentro de un horno con vacío a 45 °C durante 24 h y al final se colocaron dentro de un desecador hasta que alcanzaron temperatura ambiente. Finalmente, se registró la masa de cada crisol.

****Nota:** Durante el trabajo, se realizó el mismo procedimiento, previamente a la utilización de cualquier tipo de crisol. Así mismo, se registró en cada ocasión la masa de cada uno de ellos para su utilización dentro de las ecuaciones en donde se mencionaron las masas de los crisoles.



Figura 6.7. Crisoles (izquierda), crisoles gooch (derecha).

6.10.2 Secado de cartuchos de celulosa.

Previo a su utilización, varios cartuchos de celulosa para extracción marca Whatman® de 33 x 80mm; se dejaron secar por 2h a 45°C o hasta que alcanzaron “peso constante” dentro de un horno con vacío, se registró la masa de cada cartucho vacío para su utilización posterior dentro de los cálculos del contenido de extraíbles en acetona.

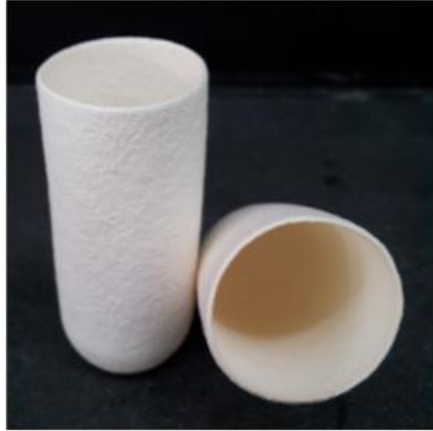


Figura 6.8. Cartuchos de celulosa para extracción tipo Soxhlet.

6.10.3 Secado y contenido de humedad de papel filtro.

Para el filtrado de las muestras de aserrín se utilizó papel filtro Whatman® No. 1. Se recortaron numerosos círculos de 2 mm de diámetro aprox. Los círculos se pesaron en una balanza analítica para registrar su masa inicial, posteriormente, los círculos de papel se distribuyeron a lo largo y ancho de una hoja de aluminio de tal forma que pudieran ser introducidos dentro de un horno con vacío. El secado se realizó por 24 h a una temperatura de 45 °C. Después, la hoja de aluminio con los papeles filtros, se colocó en un desecador hasta alcanzar la temperatura ambiente. Por último, se midió la masa final de cada círculo de papel filtro seco. El contenido de humedad de los papeles filtro se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$\textit{humedad} (\%) = \frac{\textit{papel húmedo} (mg) - \textit{papel seco} (mg)}{\textit{papel húmedo} (mg)} \times 100\%$$

Para conocer el peso seco de cualquier círculo de papel filtro Whatman No. 1 de 2 cm de diámetro Se utilizó la siguiente ecuación:

$$\textit{papel seco} (mg) = \textit{papel húmedo} (mg) \left(1 - \left(\frac{\textit{humedad} (\%)}{100\%} \right) \right)$$

6.10.4 Preparación del reactivo de DNS y curva de calibración.

Para la cuantificación de azúcares reductores, se decidió utilizar la metodología del ácido 3,5-Dinitrosalicílico (DNS), alternativamente al método de Nelson-Somogyi, ya que el método de DNS es un método sencillo, sensible e ideal para la manipulación de un gran número de muestras.

Para preparar el reactivo de DNS, las sustancias descritas en la **Tabla 6.6**, se disolvieron en agua desionizada y la solución se guardó en un frasco ámbar. Antes de utilizar, el reactivo se dejó reposar 24 h.

Tabla 6.6 Reactivos para preparar 100mL de solución de DNS

Reactivos	100ml
Hidróxido de sodio (NaOH)	1.4g
Ácido 3.5-Dinitrosalisílico (DNS)	0.75g
Tartrato de sodio y potasio	10.0g
Fenol	0.54g
Metabisulfito de sodio	0.59g

Fuente: Miller (1959).

Posteriormente, se realizó una curva de calibración con glucosa (SIGMA-ALDRICH G-5000) como estándar. Se prepararon una serie de soluciones de la sustancia patrón en un intervalo de concentraciones de 0.0 a 1.0 mg/L (**Tabla 6.7**), se tomaron 250 μ l de cada solución de glucosa y se añadieron 350 μ l de reactivo DNS, el contenido de los tubos se agitó en vortex, se calentaron las muestras a baño maría por 5 min; las muestras se dejaron enfriar y a cada una se les añadieron 5 mL de agua desionizada. Finalmente las muestras se leyeron en el espectrofotómetro a $\lambda=540$ nm. El equipo se ajustó a cero con un blanco de agua tratado bajo el mismo procedimiento.

Tabla 6.7. Contenido por tubo para la elaboración de la curva de calibración con DNS.

Tubo	[Glu] (mg/ml)	Vol. de la muestra (μL)	Vol. de reactivo (μL)
0	0.0	250	350
1	0.1	250	350
2	0.2	250	350
3	0.3	250	350
4	0.4	250	350
5	0.5	250	350
6	0.6	250	350
7	0.7	250	350
8	0.8	250	350
9	0.9	250	350
10	1.0	250	350

6.10.5 Estabilidad de la actividad enzimática de las hidrolasas.

Para conocer el periodo en el que las mezclas hidrolasas utilizadas, (GENENCOR® (**GE**) Y ENMEX® (**EN**)), se mantuvieron activas, se realizó un registro de la actividad de celulasa a través del tiempo de incubación. Para la realización de éste experimento, se incubaron dos matraces Erlenmeyer de 50 mL con 10 mL de las soluciones enzimáticas mostradas en la **Tabla 6.5**, a 50 °C y en agitación constante. A diferentes tiempos (0 – 168 h), se tomaron alícuotas de 250 μ L de cada matraz y se transfirieron dentro de un tubo de ensayo de 12.5 mL. Los tubos se incubaron a 50 °C por 1h utilizando como sustrato, círculos de papel filtro Whatman® No.1 de 8 mm de diámetro (3.5 mg aprox.). Al finalizar la incubación, a los tubos de ensayo, se les añadieron 350 μ L de reactivo DNS y se les sometió a

un tratamiento como el señalado en la **sección 6.11.4**. Una vez que se determinaron la cantidad de azúcares reductores para cada tiempo, se utilizó la ecuación **(15)** para determinar las UPF's (Unidades de Papel Filtro) a cada tiempo (Ghose, 1987). Los datos obtenidos se encuentran en el **ANEXO** en la **Tabla 1A** y en la **Figura 1A**.

$$UPF = \frac{370 \times A_r}{F \times E_0}$$

Donde: **A_r** = Azúcares reductores (mg), **E₀** = concentración de enzima inicial (µg/mL) y **F** = 2 mg (Factor de Ghose (1987)).

7. Resultados y discusión.

7.1 Características físicas visuales de los sustratos.

Debido al origen distinto de los sustratos **L-104-X** (Xochimilco) y **L-104-D** (Durango). Es necesario establecer las características macroscópicas de los sustratos antes y después del proceso de fragmentación y tamizado. La **Figura 7.1**, muestra los sustratos de aserrín estudiados: **L-104-X** y **L-104-D**.

La muestra **L-104-X** (**Figura 7.1A**) es un aserrín de color rojizo, las partículas son pequeñas, hay mucha presencia de astillas y no tiene olor resinoso. La **Figura 7.2C** corresponde a esta muestra después del tamizado (**L-104-Xt**) con un tamaño de partícula ~ 2 mm.

La muestra **L-104-D** (**Fig. 7.1B**) es un aserrín de color amarillo claro, las partículas son de tamaño irregular, no hay tantas astillas y presenta olor resinoso. La **Figura 7.1D** corresponde al aserrín de Durango tamizado (**L-104-Dt**) con un tamaño de partícula ~ 2 mm. Comparando los dos sustratos, se observa que la muestra **L-104-D** es la que tiene mayor tamaño de partículas y es menos homogénea que la muestra **L-104-X**. Después de la fragmentación y el tamizado, se logró tener una mejor homogeneidad en las muestras y, únicamente, existe la diferencia de color entre uno y otro aserrín.

Dado que sólo se conocía la identidad de uno de los sustratos se decidió realizar un análisis ultraestructural de los sustratos, ya que a este nivel la estructura de las maderas blandas, como el pino, es diferente de la de las maderas duras, como por ejemplo la caoba (http://www.diffen.com/difference/Hardwood_vs_Softwood 15/08/12) (ver **Figura 7.2**).

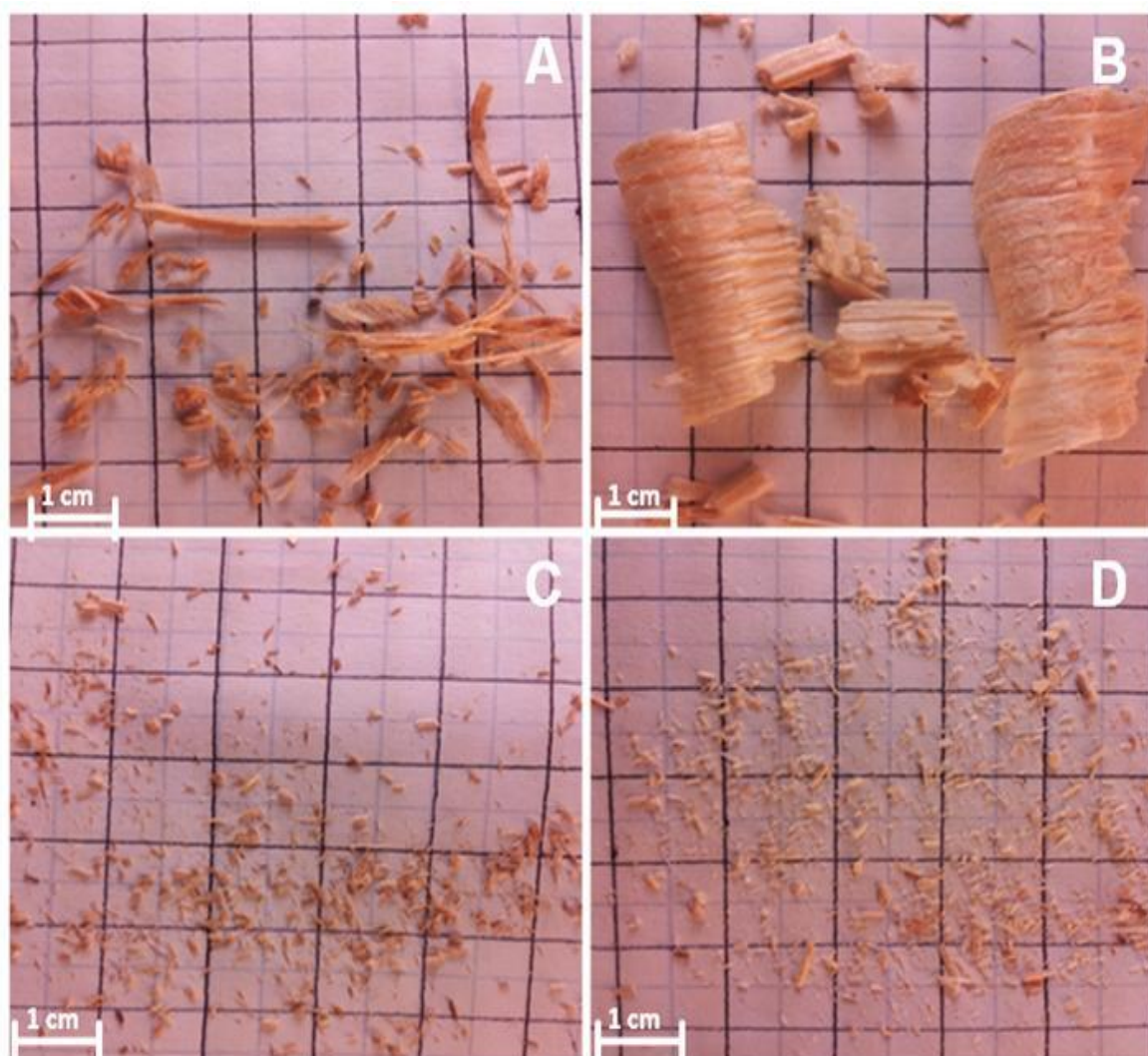


Figura 7.1. Fotografías de los aserrines utilizados: (A) aserrín de Xochimilco sin tamizar (L-104-X), (B) aserrín de Durango sin tamizar (L-104-D), (C) aserrín de Xochimilco tamizado en malla de 2 mm (L-104-Xt), (D) aserrín de Durango tamizado en malla de 2 mm (L-104-Dt).

En la **Figura 7.2**, se observa que ambos lotes están formados por fibras largas, unidas entre ellas (**Figura 7.2A** y **7.2B**). Las células largas se denominan traqueidas y su superficie está constituida por pared celular secundaria, la cual se interrumpe por pequeños orificios o “pozos”. La función de los pits es la de permitir la difusión de gases y fluidos de célula a célula. Este tipo de arreglo en el aserrín utilizado en este trabajo demuestra que ambos sustratos provienen de

maderas blandas (Keey, 2005). Sin embargo, la ultra-estructura de estos materiales muestra ciertas diferencias. En el aserrín de Xochimilco (**Figura 7.2 A**), la superficie de algunas traqueidas (1) está cubierta por un material amorfo que no permite observar los pozos claramente (2) mientras que en el aserrín de Durango (**Figura 7.2 B**), dicha cubierta no se observaron los pozos (3) y las traqueidas (4), se pueden observar con más claridad, aunque las traqueidas se encuentran más separadas que en aserrín de Xochimilco. Existe la posibilidad de que esta malla estuviera formada por lignina y, de ser así, sugeriría que la estructura de dicho polímero es diferente en cada caso, o bien, el material amorfo observado en el aserrín **L-104-Xte** es parte de las ceras y resinas que no fueron disueltas en su totalidad durante el tratamiento con acetona. El cambio estructural realizado por el tratamiento ácido sulfúrico fue mayor en **L-104-Dte** que en **L-104Xte**. En este último, sólo se observa la separación entre las paredes secundarias y la remoción del material amorfo (**Figura 7.2 C**), esto permitió que las traqueidas (5) y los pozos (6) pudieran observarse más claramente. En el aserrín de Durango (**Figura 7.2 D**) se observó la fragmentación de la pared celular secundaria y la ausencia de traqueidas y pozos (7).

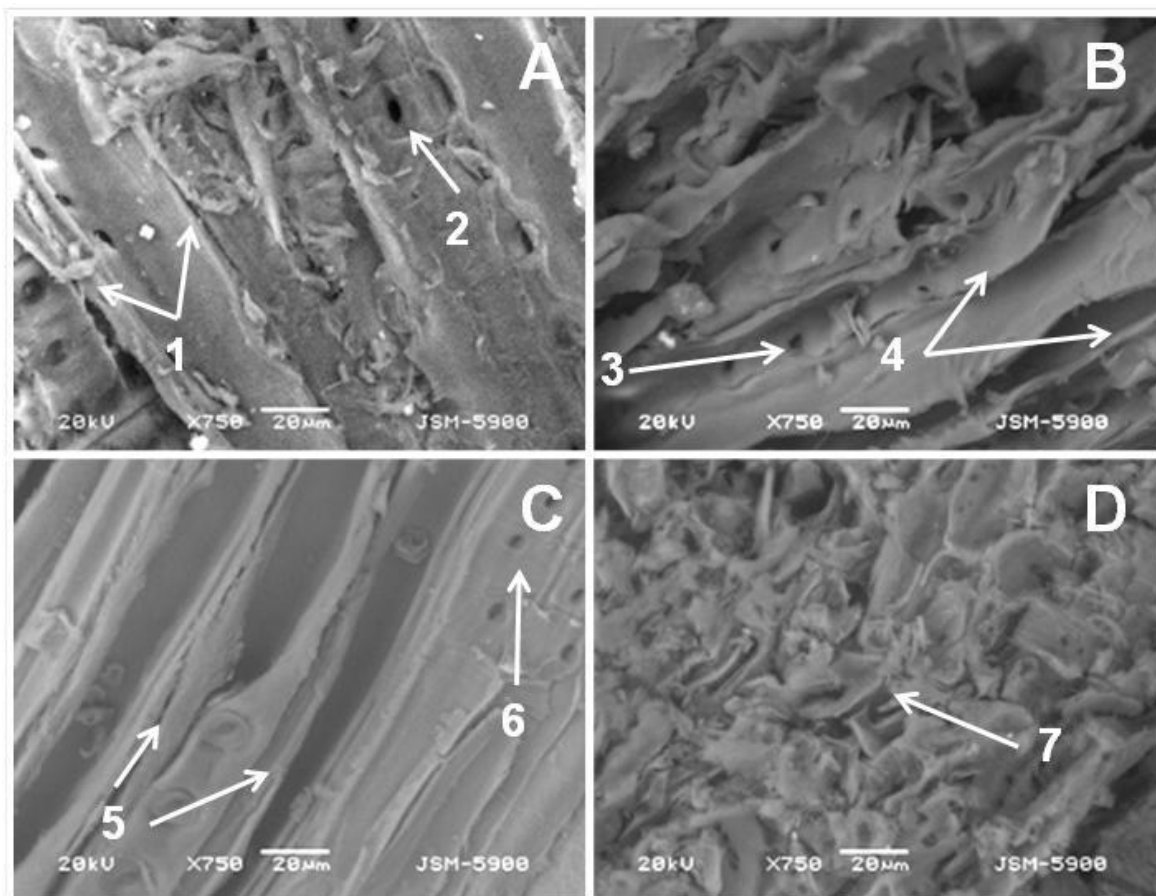


Figura 7.2. Imágenes de microscopía electrónica de barrido a un aumento de 750 veces. (A) Aserrín Xochimilco sin extraíbles (**L-104-Xte**), (B) Aserrín Durango sin extraíbles (**L-104-Dte**), (C) Aserrín Xochimilco sin extraíbles hidrolizado con H_2SO_4 , (D) Aserrín Durango sin extraíbles hidrolizado con H_2SO_4 . (1 y 2) traqueidas y pozos en la muestra **L-104-Xte**, (3 y 4) traqueidas y pozos en la muestra **L-104-Dte**, (5 y 6) traqueidas y pozos en la muestra **L-104-Xte** hidrolizada con ácido sulfúrico, (7) ausencia de pozos y traqueidas en la muestra **L-104-Dte** hidrolizada con ácido sulfúrico.

7.2. Composición química de los aserrines.

La realización de un análisis composicional en cada una de muestras utilizadas en éste trabajo permite evaluar la eficacia de los procesos de conversión de la biomasa (Voguel y col., 2011), porque en este análisis se cuantifica la abundancia de los polisacáridos y la lignina, además de otros componentes minoritarios, como cenizas, proteínas y humedad. El análisis de la composición química porcentual de

los sustratos se realizó mediante diversas metodologías descritas en las secciones 6.3 - 6.7. Los resultados obtenidos de estos experimentos se reportan en la **Tabla 7.1**.

Tabla 7.1. Análisis de composición de las muestras de aserrín.

Parámetro ^a	Muestra	
	L-104-Xt (g/100g)	L-104-Dt (g/100g)
Contenido de humedad	3.8 ± 0.8	4.7 ± 0.1
Contenido de cenizas	1.3 ± 0.2	0.9 ± 0.7
Compuestos extraíbles en acetona	10.0 ± 2.5	4.2 ± 1.3
Contenido de proteína cruda	1.7 ± 0.2	0.9 ± 0.1
Lignina total ^a	38.8 ± 3.0	44.4 ± 2.1
Carbohidratos totales ^a	24.1 ± 0.6	56.3 ± 0.2

^a cantidades determinadas en los sustrato, secos y sin extraíbles.

En la **Tabla 7.1**, se muestra que el contenido de humedad y cenizas para ambas muestras fue similar. Sin embargo, el contenido de extraíbles en acetona y proteínas fue significativamente mayor para la muestra **L-104-Xt**. Diferencias entre el contenido de cenizas y extraíbles han sido reportados en otros trabajos para diversas especies de pinos de origen diferente (Bernabé-Santiago 2008; Núñez 2008). El valor promedio de contenido de cenizas para algunas especies crecidas en Canadá, Estados Unidos de Norteamérica o México varía entre **0.2 y 0.5 %**; mientras que los contenidos de extraíbles para estas mismas muestras se encuentran en un rango mucho más amplio desde **2.9** hasta **10.7 %** (Bernabé-Santiago 2008). El contenido de ambos parámetros depende de varios factores. Para el caso de las cenizas, su contenido está influido por la especie de pino, del tiempo de cosecha, lugar de crecimiento, parte del árbol utilizado (Bernabé-Santiago, 2008); mientras, que el contenido de extraíbles a su vez depende del solvente utilizado en su extracción (Sefara y Birkett, 2004; Sluiter y col., 2010).

También, la concentración de extraíbles puede ser mayor en ciertas partes del árbol, tales como ramas, raíces y las áreas dañadas (Nelson y col. 2004). A la luz de estos reportes, el resultado del contenido de cenizas para las muestras aquí trabajadas no está dentro del rango de lo reportado, aunque el de extraíbles sí lo está. Lo primero podría deberse a que las muestras aquí trabajadas son de especies diferentes a las reportadas o a cualquier otro de los factores que influyen en su contenido. Respecto al contenido de proteína no se encontraron reportes para hacer la comparación.

7.2.1. Contenido de carbohidratos y lignina.

En maderas blandas se ha reportado que el contenido de lignina es del orden del **25-30%** y el de carbohidratos totales es del orden de **65 - 70 %** (Bernabe – Santiago 2008; Núñez 2008). Tomando en cuenta lo reportado en la literatura y en lo observado en este trabajo (**Tabla 7.1**), el contenido de lignina es más alto y el de azúcares más bajo. Aparentemente en la muestra **L-104-Dte**, la lignina está sobreestimada en más del **45%**, quizás porque los azúcares no fueron separados exitosamente de la lignina por medio de la hidrólisis con ácido sulfúrico y en el caso de la muestra **L-104-Xte**, los carbohidratos totales están subestimados en más del **60%** de acuerdo a las referencias. Ya que en este caso no se logran determinar casi un **20 %** de la masa ni como azúcares reductores ni como lignina. Una posibilidad es que la masa faltante sea celulosa que no alcanza a hidrolizarse con el tratamiento ácido. A continuación, se explica con mayor detalle lo mencionado previamente, con respecto al contenido de lignina y carbohidratos. Por medio del tratamiento ácido, se pueden detectar tanto el contenido de lignina como los polisacáridos, éstos a su vez se pueden detectar como reductores totales. Sin embargo, la hidrólisis de los polisacáridos se encuentra limitada por la presencia de lignina y la cristalinidad de la celulosa (Iranmahboob y col., 2002, López y col., 2009; Sluiter y col., 2010; Janga y col, 2012). De acuerdo a los documentos de Hames y col. (2008), el procedimiento estandarizado, Laboratory Analytical Procedure (LAP) del NREL (National Renewable Energy Laboratory),

puede ser utilizado para la cuantificación de los polisacáridos y de la lignina en los diversos tipos de biomasa. En este procedimiento se realiza una pre-hidrólisis con H₂SO₄ al **72 %** y luego se diluye con agua para dar paso a la hidrólisis con H₂SO₄ al **4%** (ver **sección 6.7**). Sin embargo, las condiciones descritas en los documentos del NRLE, tuvieron que ser modificadas debido a que los contenidos de lignina y de azúcares, especialmente para el sustrato **L-104-X**, no fueron representativos de los que se muestran en la literatura para maderas (Bernabe-Santiago, 2008; Núñez 2008). En la **Tabla 7.2**, se muestran cuatro condiciones empleadas para realizar la hidrólisis con H₂SO₄ sobre la muestra **L-104-Xte**.

Tabla 7.2 Condiciones para la optimización de la hidrólisis ácida.

Tratamiento	Pre hidrólisis			Hidrólisis			Referencia
	[H ₂ SO ₄]	t	T	[H ₂ SO ₄]	t	T	
	(%)	(min)	(°C)	(%)	(min)	(°C)	
1	72	60	30	4	60	121	NREL/TP-510-42618 (Hames y col., 2008).
2	72	60	92	4	60	121	Este trabajo
3	72	1140	25	4	60	121	Este trabajo
4	72	5	110	4	120	121	Este trabajo

Las diferentes cantidades de lignina total y carbohidratos cuantificadas en cada una de ellas se muestran en la **Figura 7.3**. La relación entre los contenidos de lignina y azúcares es inversamente proporcional y dependen principalmente del tiempo y temperatura utilizados en la pre-hidrólisis ácida (H₂SO₄ **72%**). En la **Figura 7.3**, también se observa que las condiciones del **Tratamiento No. 4** son las que presentan mejores resultados con respecto al contenido de lignina ya que en éstas condiciones, la cantidad de lignina detectada fue similar (~ **30 %**), a lo reportado por otros autores para diferentes especies de pino (Bernabe-Santiago, 2008; Núñez, 2008). Estos resultados justifican que la hidrólisis química descrita por Hames y col. (2008) en NREL/TP-510-42618, haya tenido que modificarse de sus condiciones originales para la aplicación en los sustratos aquí estudiados.

Adicionalmente, en la **Figura 7.3**, se puede observar que en las condiciones del tratamiento ácido sólo se detectan 208 mg de reductores / g de aserrín (**Tratamiento No. 4**), cuándo el rendimiento esperado, de acuerdo a los reportes en literatura para aserrín de madera debía ser arriba de 500 mg de reductores por gramo de aserrín (Bernabe –Santiago 2008; Núñez 2008; López y col., 2009).

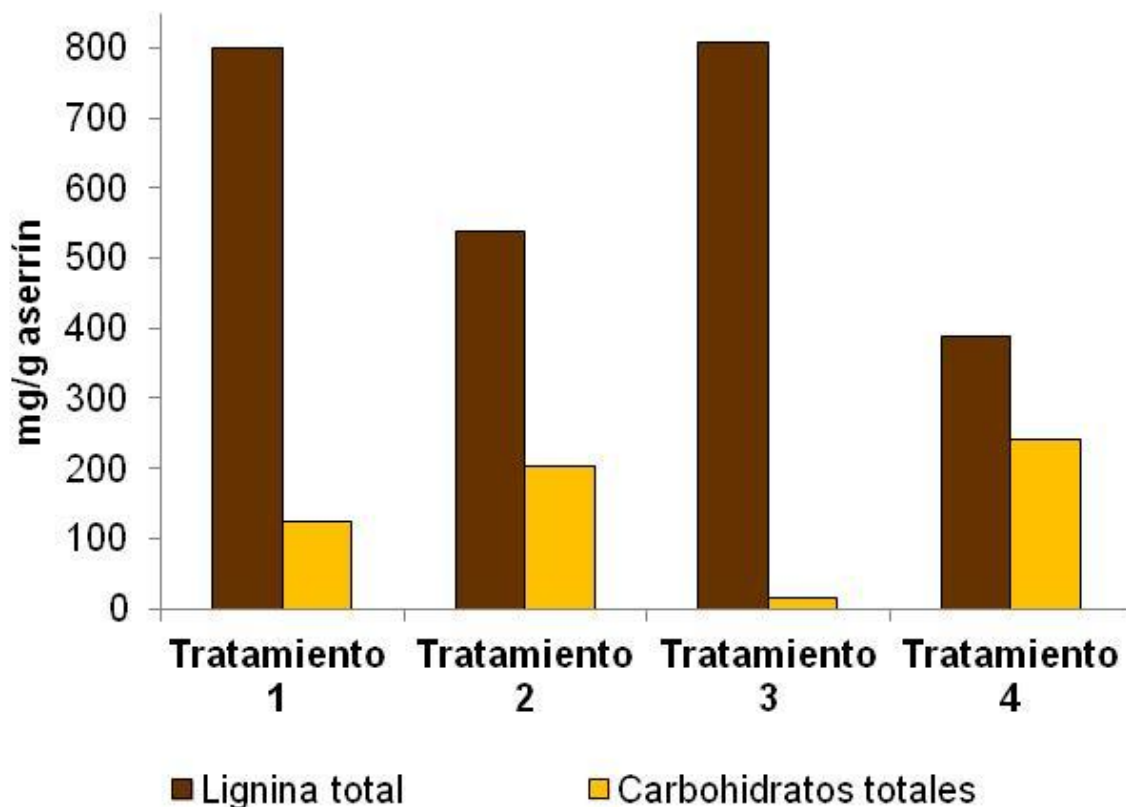


Figura 7.3. Lignina total y carbohidratos totales cuantificados en diferentes condiciones de hidrólisis ácida aplicada sobre **L-104-Xte**.

Iranmahboob y col. (2002), en un estudio utilizando maderas como sustrato, optimizaron las condiciones de hidrólisis ácida con H_2SO_4 , para obtener el mejor rendimiento en cuanto a la cantidad de glucosa liberada. En dicho trabajo, se encontró que las mejores condiciones se lograron con una prehidrólisis con H_2SO_4 al **80 %** por **30 min** a **100 °C** y, posteriormente, diluyendo a **26 %** y calentando a ebullición por **2 h**. De esta forma, se logró obtener sólo un **43 %** de glucosa cuando el rendimiento teórico era del **75 %**. De acuerdo a los resultados reportados (**Figura 7.3**) y a los descritos por Iranmahboob y col. (2002), se

concluye que las condiciones de hidrólisis ácida a emplear, deben de ser modificadas de acuerdo al tipo de muestra, con lo que se logra una cuantificación más precisa de los parámetros de lignina total y el contenido de carbohidratos.

De esta manera, para comprobar que el procedimiento de la **hidrólisis 4** lograra una hidrólisis total de la muestra **L-104 Xte**, se realizó un experimento en donde el **primer sobrenadante** de la hidrólisis ácida, se dividió en dos porciones, en una, se determinaron azúcares reductores (de acuerdo a la **sección 6.7.1**), cuantificándose los **241.9 mg** de reductores por g de aserrín reportados en la **Tabla 7.1** para la muestra **L-104-Xt**. La segunda porción se liofilizó y en el material recuperado se realizó una segunda hidrólisis ácida con H_2SO_4 (4%) por 2 h. Posteriormente, mediante se cuantificaron azúcares reductores por DNS y se obtuvieron aproximadamente **18.3 mg** de azúcares reductores adicionales por gramo de sustrato (**8 %** más). Sumando ambas cantidades de azúcares reductores, se obtuvo que el contenido de carbohidratos final fue de **260.2 mg/g de aserrín**, a pesar de esto, siguió faltando aún un **20 %** de masa para la recuperación total de la masa inicial (ver **Figura 7.4**).



Figura 7.4. Composición de **L-104-X** en condiciones optimizadas.

Los datos anteriores muestran que el análisis composicional mediante la hidrólisis con H_2SO_4 , en la muestra **L-104-Xt**, no fue una técnica útil para obtener el contenido de lignina y carbohidratos totales. Estos resultados contrastan con los obtenidos para la muestra **L-104-Dt**. La cual se trató con las condiciones descritas para la hidrólisis del **Tratamiento No. 4 (Tabla 7.2)**, en este caso, el contenido de lignina total fue de ~ **45 %** y el de azúcares fue de casi el **50 %**. Con estos valores, más los valores porcentuales de los componentes minoritarios, se obtuvo un balance de materia cercano al **100 % (Tabla 7.1)**.

Estas diferencias en el balance de materia obtenido con la misma metodología (recuperación de materia para **L-104Xt** de **80 %** y para **L-104Dt** de **100 %**), sugieren que la primera contiene componentes diferentes a los aquí cuantificados o bien que no se detectó la totalidad de uno de sus componentes, ya fuese por limitación de los métodos empleados o por descomposición de los azúcares durante el tratamiento (Redding y col., 2011).

En la realización del análisis composicional se determinó la cantidad de lignina soluble e insoluble en ambos sustratos de aserrín. Debido a que los resultados anteriores nos habían mostrado diferencias entre ambos sustratos, se esperaban resultados contrastantes también en cuanto a la abundancia de éstos dos parámetros. Para entrar en contexto, se debe de mencionar que la lignina soluble es una fracción de lignina de bajo peso molecular y que se encuentra disuelta en el medio ácido de la hidrólisis, si se desea conocer el contenido de lignina total de una muestra de biomasa, es necesario cuantificar este polímero en su fracción soluble e insoluble (Núñez, 2008). En la **Figura 7.5**, se muestra una gráfica con las cantidades (en **mg/g de aserrín**) correspondientes a cada fracción de lignina estimadas para cada una de las muestras. Tomando en cuenta la masa inicial de una muestra de sustrato sin extraíbles y seco, el contenido de lignina soluble e insoluble, en la muestra **L-104-Xte** se estimó en **46.6** y **341.1 mg/g aserrín**, respectivamente. Mientras que en la muestra **L-104-Dte**, el contenido de estos parámetros fue del **53.3** y **390.7 mg/g aserrín**, respectivamente.

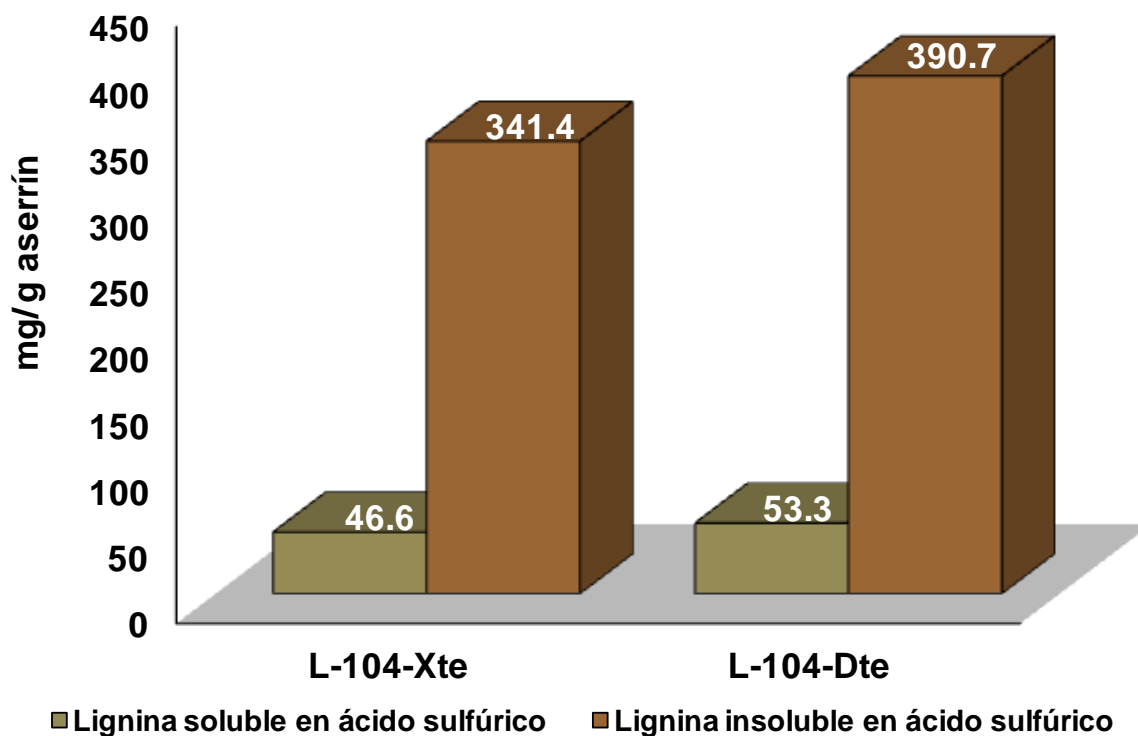


Figura 7.5. Cantidades de lignina soluble a insoluble en los sustratos.

Si se suman los porcentajes de lignina soluble e insoluble en cada muestra, se obtiene el porcentaje de lignina total presentado en la **Tabla 7.1**. Si bien el contenido de lignina ya sea soluble o insoluble fue mayor en la muestra **L-104-Dte** con respecto a la **L-104-Xte**, la abundancia de cada tipo de lignina fue similar en ambos materiales. Esto significa que, si se considera **1g** de muestra y se suman las cantidades de lignina soluble e insoluble (lignina total), tanto en la muestra **L-104-Dt** como en la muestra **L-104-Xt**, el **88 %** de la lignina total corresponde a lignina insoluble y el **restante 12 %** corresponde a lignina soluble en ambas muestras.

De acuerdo a los resultados anteriores la disponibilidad de los azúcares en la biomasa no depende de que la lignina se solubilice pues en ambos casos la cantidad de lignina solubilizada fue de apenas el **12 %** para ambas muestras y esto permitió un porcentaje de azúcares disponibles de cerca del **50 %** en la muestra **L-104-Dte** y casi un **25 %** en **L-104-Xte**. Esto sugiere que la

disponibilidad de azúcares depende en gran medida de que la interacción lignina-polisacáridos se modifique o bien que la estructura general de toda la biomasa pierda su estructura original. Aparentemente, ambas modificaciones son importantes. En el primer caso, las traqueidas se fisuran y se separan de manera parcial, pero conservan su forma original antes y después del contacto con ácido sulfúrico (**Figura 7.2C**). En el segundo caso, las paredes celulares secundarias se fragmentan y la biomasa luce como una masa desordenada, porosa pero compacta, en dónde se logran visualizar pequeños fragmentos de traqueidas que conservan uno o varios pozos, sin embargo, se pierde totalmente la estructura original (**Figura 7.2D**). Lo anterior indica que el sulfúrico y las condiciones del tratamiento hacen más accesible los polisacáridos ya sea porque las paredes celulares se abren o porque el material se hace poroso.

7.3. Deslignificación del aserrín

Para evaluar la deslignificación de las muestras de aserrín por acción de las enzimas ligninolíticas y los líquidos iónicos, los experimentos se realizaron con aserrín tamizado, seco y lavado con acetona (**L-104-Xte** y **L-104-Dte**). La eficiencia de los tratamientos mencionados, se evaluó determinando la distribución de la lignina total entre lignina soluble e insoluble y comparándola con la obtenida por hidrólisis ácida. El más eficiente de los tratamientos será aquél que disminuya más la lignina insoluble y al mismo tiempo incremente la lignina soluble, respecto a la obtenida por hidrólisis ácida o bien él que produzca mayor cambio en la biomasa.

7.3.1. Efecto de las enzimas ligninolíticas en la deslignificación.

La degradación de lignina por enzimas oxidativas como la **Lac** y la **MnP** no se realiza eficientemente por la interacción directa entre el sitio activo de las enzimas antes mencionadas y la lignina. Esto se debe al enorme tamaño de esta última.

Por lo anterior una despolimerización oxidativa de la lignina requiere de moléculas pequeñas, llamadas cooxidantes, que actúan como mediadores entre el sitio activo de la enzima y los enlaces a degradar. En este trabajo se utilizaron dos cooxidantes el ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) (**ABTS**) (Bourbonnais y col., 1997) y el alcohol veratrílico (**AV**) (Cui y Dolphin, 1991). Durante la aplicación de enzimas ligninolíticas como **Lac** o **MnP** y los cooxidantes, se espera que el polímero de lignina sufra cambios químicos, tales como: desmetoxilaciones, oxidaciones de átomos de carbono α , modificaciones en las cadenas alifáticas, modificaciones de los anillos aromáticos, entre otras (Husain, 2006). Los cambios anteriores, producirían una mayor solubilidad de la lignina presente en la biomasa y probablemente repercutan en un cambio estructural de la misma.

La lignina soluble en la hidrólisis ácida se cuantificó en la zona del Ultra Violeta. Sin embargo, en esta zona también absorben las enzimas ligninolíticas, por ser proteínas, por lo tanto, se determinó el espectro de absorción (**240 nm-300 nm**) de los medios enzimáticos de acuerdo a lo descrito en la **sección 6.8.1.1** para verificar que la absorción en la zona del UV se debe a la lignina disuelta y no a la enzima.

En la **Figura 7.6**, se muestra, en una línea negra, el espectro de absorción que corresponde al de una solución de lignina soluble comercial, como control (0.02 mg/mL). Esta sustancia, presenta un máximo de absorción a $\lambda = 283 \text{ nm}$ aproximadamente. Las líneas punteadas roja y azul representan los espectros de absorción de las muestras de aserrín tratadas con **Lac L-104-Xte** y **L-104-Dte**, respectivamente, ambos espectros presentan tres máximos de absorción: **260**, **283** y **290 nm**, el de **283 nm** coincide con el máximo del espectro de lignina control. Por último, la línea punteada color marrón, corresponde al espectro de absorción de una solución de lacasa (**Lac**) sin sustrato, aquí no se observan estos máximos de absorción, indicando que la absorbancia a **283 nm** en los sobrenadantes no se debe a la enzima.

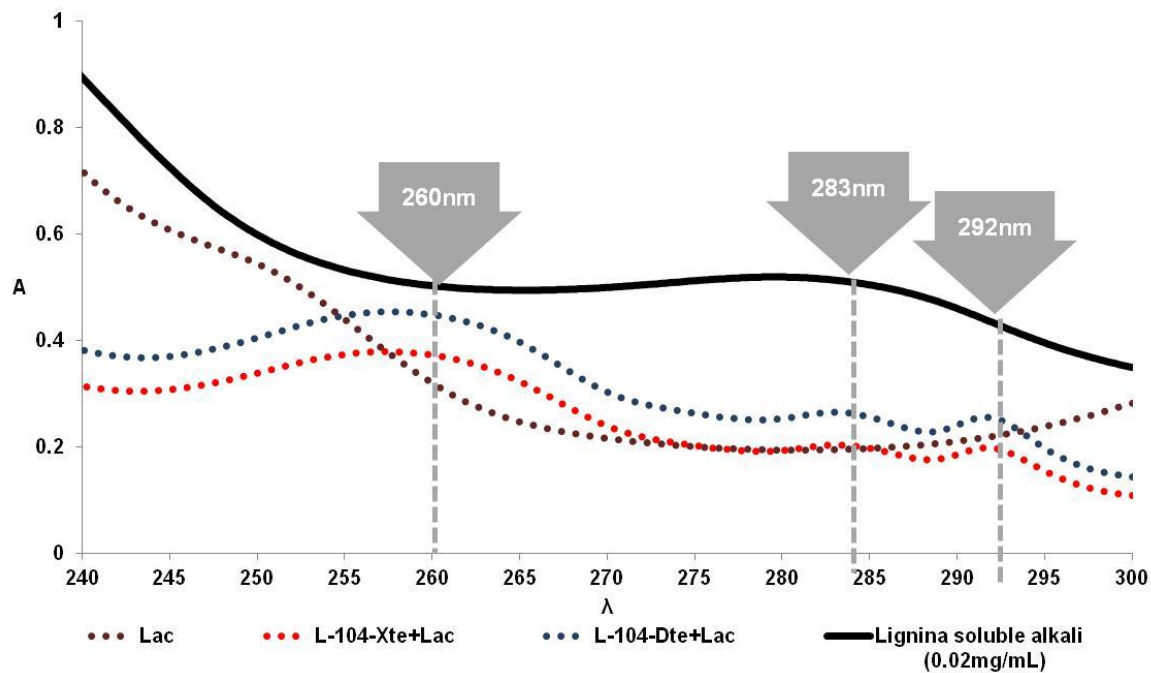


Figura 7.6. Espectros de absorción de las muestras pretratadas con lacasa (**Lac**).

En la **Figura 7.7**, la línea negra sólida representa, el espectro de absorción de una solución de lignina soluble como control, la línea punteada azul cielo, corresponde a una solución de manganeso peroxidasa (**MnP**) sin sustrato. Las líneas punteadas verde claro y magenta, corresponden a los espectros de absorción de los sobrenadantes de las muestras **L-104-Xte** y **L-104-Dte** tratadas con **MnP** respectivamente. En esta figura se observa que los tres espectros coinciden a lo largo de las longitudes de onda, aunque se puede apreciar un pequeño máximo en la zona de **283 nm**, en el caso de **MnP**, parece haber una interferencia con la absorbancia propia de la enzima.

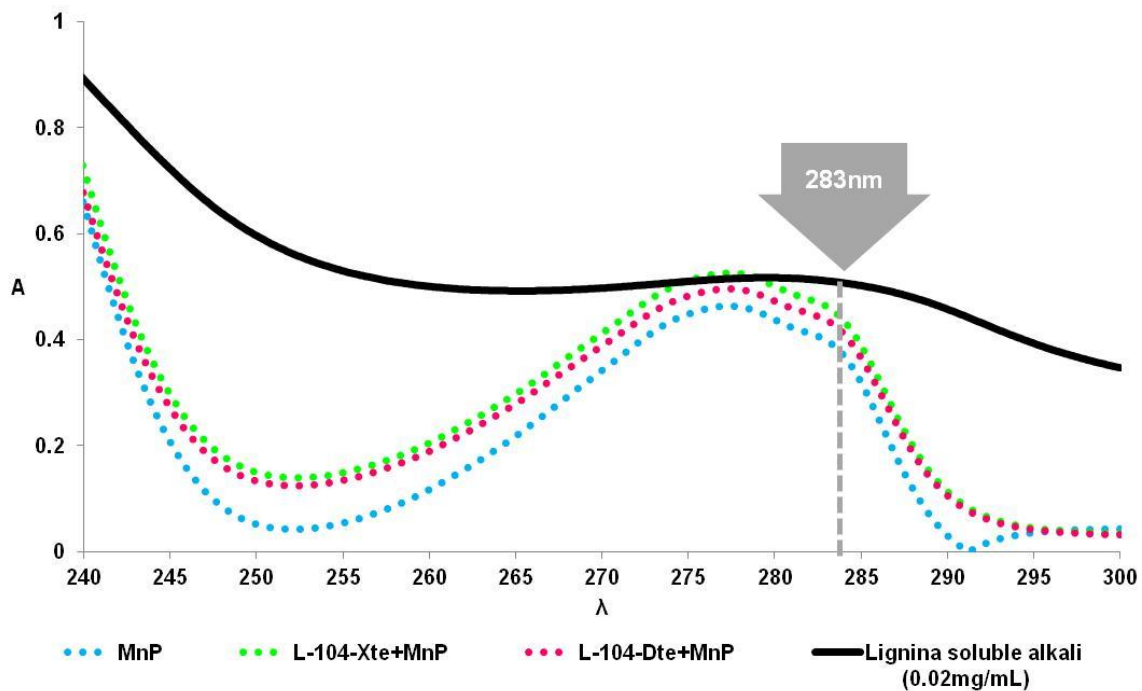


Figura 7.7. Espectros de absorción de las muestras pretratadas con manganeso peroxidasa (**MnP**).

Debido a que la manganeso peroxidasa (**MnP**) mostró un espectro de absorción similar al de la lignina soluble (**Figura 7.7**), se decidió no cuantificar la lignina solubilizada por las enzimas ligninolíticas en los sobrenadantes del medio de reacción. En vez de esto, se evaluó la deslignificación de manera indirecta cuantificando la cantidad de lignina remanente en los sustratos y restándola al valor de lignina total. Se realizó un pretratamiento con enzimas ligninolíticas siguiendo un procedimiento como el que se indica en **el ANEXO (Figura 2A)**. Después de la incubación con las enzimas ligninolíticas, las muestras se filtraron. El sólido recuperado (sólido 1) fue sometido a una hidrólisis ácida con **H₂SO₄** (de acuerdo a la **sección 6.7**). Después de la hidrólisis ácida, las muestras se volvieron a filtrar, en el segundo filtrado se cuantificó lignina soluble (de acuerdo a la **sección 6.7.2**) y sobre el nuevo sólido recuperado (sólido 2) se cuantificó lignina insoluble (de acuerdo a la **sección 6.7.3**). La lignina soluble e insoluble en **H₂SO₄** se sumaron y el resultado representa el contenido de lignina remanente en las muestras.

En la **Figura 7.8**, se muestra la cantidad calculada de lignina disuelta después de los pretratamientos con enzimas ligninolíticas. La cantidad de lignina disuelta por las enzimas es la diferencia entre el promedio de la **lignina total** en el sustrato (muestras **Control**) y la **lignina remanente** en cada muestra después de la incubación con las enzimas ligninolíticas. Las muestras **Control** son tomadas como la lignina total debido a que las cantidades de lignina soluble e insoluble determinadas son independientes del tiempo de incubación y el tipo de cooxidante, lo cual era esperado, y demuestra que los cooxidantes no actúan en ausencia de las enzimas.

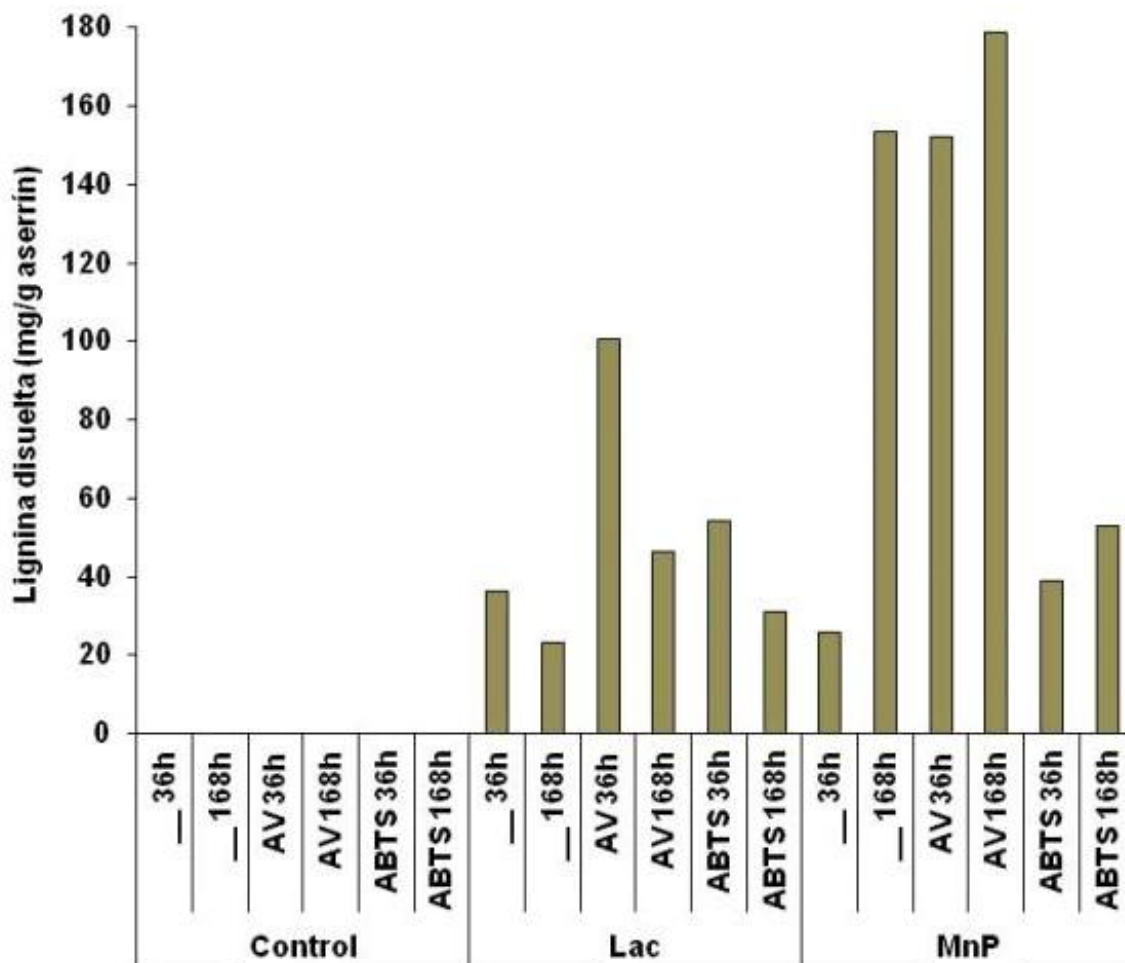


Figura. 7.8. Lignina disuelta por los pretratamientos con enzimas ligninolíticas.

Para el caso de las muestras pretratadas con **Lac**, se observa que la enzima ejerció un efecto deslignificante sobre el sustrato. Los mejores resultados se obtuvieron a tiempos cortos (**36h**) con **AV** y también con **ABTS** como cooxidantes. En estas condiciones se removió un **26%** de lignina con **AV** y un **14%** con **ABTS**. A diferencia de las muestras con Lac, el pretratamiento con **MnP**, muestra una mayor deslignificación, siendo los tiempos largos (**168 h**) y la utilización de **AV**, los parámetros que mejores resultados presentaron. La mayor deslignificación se obtuvo a las **168 h** de incubación y con **AV** como cooxidante (**180 mg** de lignina disuelta por gramo de aserrín, **46 %** de la lignina total).

Para evaluar la deslignificación, dependiendo del tipo de sustrato (**L-104-Xte** ó **L-104-Dte**), se eligió el mejor sistema deslignificante de acuerdo a la **Figura 7.8**. Se eligió la utilización de **MnP** con **AV** como cooxidante. Simultáneamente también se decidió utilizar **Lac** con **ABTS** y evaluar su comportamiento en ambas muestras de aserrín. Se siguió un procedimiento como el descrito en el **ANEXO (Figura 3A)**, donde el tiempo de incubación fue de **336 h**.

En la **Figura 7.9**, se muestran la cantidad de lignina que se disolvió al término de las **336 h** de incubación. La lignina se cuantificó como la diferencia entre la lignina remanente y la lignina total estimada de acuerdo a la **Tabla 7.1**.

En la muestra **L-104-Xte** con **Lac** y **ABTS** a las **336 h** de incubación, la cantidad de lignina disuelta es de **30 mg/g de aserrín**, esto representa el **8 %** de la lignina total. Cuando se utilizó **MnP** y **AV**, la lignina disuelta es de **168 mg/g** de aserrín, un **43 %** de la lignina total quedó disuelta por acción de las enzimas ligninolíticas. Para la muestra **L-104-Dte**, la cantidad de lignina disuelta con **Lac** y **ABTS** es de **6 %** con respecto a la lignina total y **3 %** con **MnP** y **AV**. El efecto deslignificante sobre este sustrato, no fue tan bueno como en el caso del sustrato **L-104-Xte**.

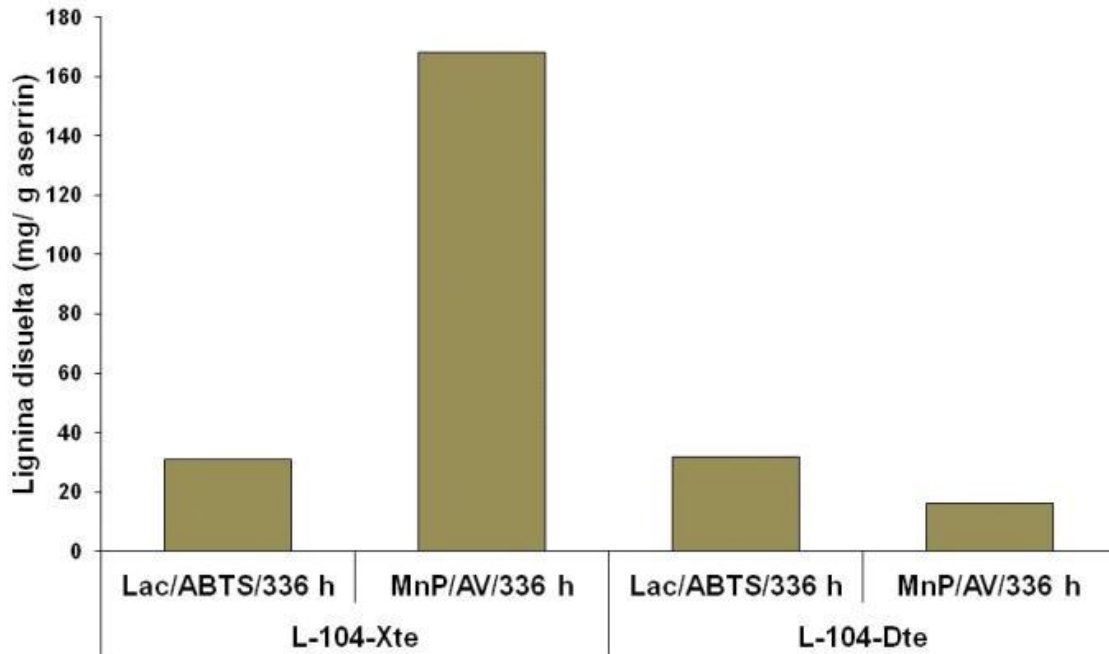


Figura. 7.9. Deslignificación en el pretratamiento con enzimas ligninolíticas a las **336 h** en las muestras **L-104-Xte** y **L-104-Dte**.

Los resultados anteriores fueron corroborados por microscopia electrónica de barrido. En la **Figura 7.10**, se observa que para el sustrato de **L-104-Xte**, tanto **Lac** como **MnP** fueron capaces de modificar la ultraestructura del sustrato (**Figuras 7.12 A y C**). En ambos casos se observa ruptura superficial (1) y la separación de las traqueidas (2) además de solubilización de lignina representada zonas blancas que pueden ser las fibras expuestas de celulosa (3) (Hong y col., 2010). En cambio en el sustrato **L-104-Dte**, el efecto de las enzimas en el sustrato fue diferente dependiendo de la enzima, visualmente fue más efectiva **MnP** (**Figura 7.12 D**) que **Lac** (**Figura 7.12 B**) En este último caso sólo se logro separar algunas traqueidas (4) y disolver lignina de pequeñísimas áreas (5). Mientras que **MnP** logró disolver lignina de las uniones entre las traqueidas (6) y se logra una mejor exposición de las fibras de celulosa (7).

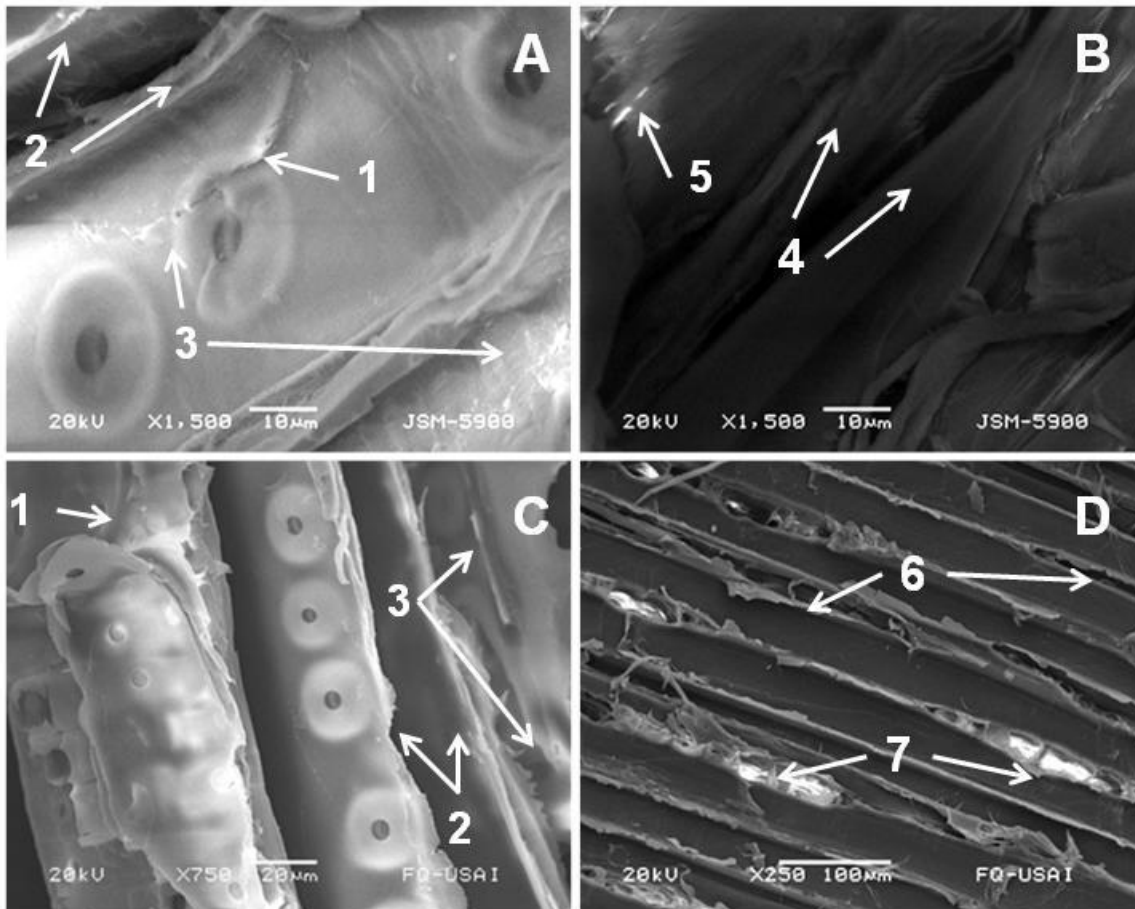


Figura 7.10. Imágenes de microscopía electrónica de barrido. (A) Aserrín Xochimilco (**L-104-Xte**) tratado con lacasa (**Lac**) y **ABTS** (X 1500), (B) Aserrín Durango (**L-104-Dte**) tratado con lacasa (**Lac**) y **ABTS** (X 1500), (C) Aserrín Xochimilco (**L-104-Xte**) tratado con manganeso peroxidasa (**MnP**) y **AV** (X 750), (D) Aserrín Durango (**L-104-Dte**) tratado con manganeso peroxidasa (**MnP**) y **AV** (X 250). Efectos producidos por las enzimas ligninolíticas en el aserrín de Xochimilco: (1) ruptura de traqueidas, (2) separación entre traqueidas y (3) exposición de fibras de polisacáridos. Efectos producidos en el aserrín de Durango: (4 y 6) separación de traqueidas, (5 y 7) fisuras en las traqueidas y exposición de las fibras de polisacáridos.

Para la utilización eficiente de los azúcares presentes en materiales lignocelulosicos se requiere remover la lignina y disminuir el grado de cristalinidad de la celulosa (Mosier y col., 2005; Mesa-Garriga y col., 2008; Abril y Abril, 2009; Lopez y col., 2009; Domínguez y col., 2011; Santos y col., 2012). En este trabajo

se evaluaron dos métodos para remover a la lignina. El primero es el enzimático dónde sólo se estudió la remoción de la lignina, y la disponibilidad de los polisacáridos relacionada con la remoción de lignina. En el pretratamiento enzimático, se utilizaron dos enzimas ligninolíticas que oxidan residuos fenólicos en la lignina. Estas dos enzimas se escogieron porque la lacasa (**Lac**) es capaz de oxidar residuos fenolicos, mientras que la manganeso peroxidasa (**MnP**) es capaz de despolimerizar lignina sintética de alto peso molecular a productos solubles en agua y CO₂ (Hofrichter y col., 1999). Los sustratos utilizados fueron aserrín de maderas blandas, las cuales contienen mayor abundancia de unidades de guayacilo (alcohol p-coniferílico) a diferencia de las maderas duras (Santos y col., 2012). En este tipo de maderas la lignina está formada principalmente por enlaces **C-C** y **R-O-R**, debido a esto, **Lac**, no es capaz de atacar a unidades de lignina con este tipo de enlaces (Widsten y Kandelbauer, 2008). Siendo esta la razón por la cual esta enzima en ausencia de cooxidantes sólo fue capaz de solubilizar entre el **7-10 %** de lignina. Para incrementar el poder oxidativo de esta ligninasa, se adicionaron al sistema cooxidantes como **ABTS** o **AV** (Call y Mücke, 1997; Aracri y col, 2009; Giardina y col., 2010; Chen Q. y col., 2012; Wan y Li, 2012). La presencia de **ABTS** no mejoró de manera importante la solubilización de la lignina, aún cuando en sistemas modelo de lignina, **Lac** en presencia de **ABTS** oxida residuos fenólicos de lignina (Mester y Tien, 2000; Widsten y Kandelbauer, 2008). Sorprendentemente, **Lac** en presencia de **AV**, disolvió casi un 27 % de lignina, aún cuando se ha reportado que éste cooxidante no es muy susceptible a la oxidación por **Lac** debido a que **AV** no posee los grupos hidroxilo en el anillo aromático para que la **Lac** realice la oxidación de la molécula (Call y Mücke, 1997). Sin embargo, la detección de menor contenido de lignina soluble a mayores tiempos de incubación (**168 h**) en el mismo sistema sugieren que la preparación comercial de la enzima lacasa de *P. ostreatus*, como la utilizada en este trabajo, podría contener otras actividades enzimáticas que oxidaran a **AV** y éste, a su vez, despolimerizara la lignina.

MnP, al contrario de **Lac**, fue capaz de solubilizar hasta un **46 %** utilizando **AV** como cooxidante. Adicionalmente al **AV**, el sistema de **MnP**, aumenta su

capacidad deslignificante con ayuda del ión Mn^{3+} formado a partir del ión Mn^{2+} adicionado en la solución enzimática (ver **Sección 6.8.1**) y peróxido de hidrógeno (Tien y Kirk, 1988; Call y Mücke, 1997; Mester y Tien, 2000) Sin embargo, en el sistema utilizado en este trabajo no se adicionó peróxido de hidrógeno debido a que Hofrichter y col. (1998) demostró que la **MnP**, secretada por *N. frowardii*, como la aquí utilizada, en presencia de malonato y Mn^{2+} forman radicales hidroperoxil acético, los cuales pueden funcionar en lugar del peróxido de hidrogeno para mantener el ciclo de Mn^{2+} a Mn^{3+} . El no adicionar peróxido de hidrógeno al sistema enzimático representa una ventaja al escalar el sistema.

Lo antes discutido se refiere al aserrín de Xochimilco (**L-104-Xte**) y contrasta con los resultados obtenidos al utilizar aserrín de Durango (**L-104-Dte**). En este caso la deslignificación enzimática sólo fue de **4 %** y **6 %** utilizando **MnP** y **Lac**, respectivamente (**Figura 7.9**). Esta pobre eficiencia del sistema deslignificante, podría ser el resultado de un arreglo químico de la lignina diferente entre aserrines, la cual depende tanto de la especie y del género, así como de la edad y sitio de crecimiento, así como también de la parte del árbol utilizado (Bernabé-Santiago, 2008). Existe una gran probabilidad que ambos sustratos provengan de maderas blandas, sin embargo, el género y la especie de la cual proviene el aserrín de Xochimilco es desconocida. En el caso del aserrín de Durango, el proceso de deslignificación a través de enzimas ligninolíticas necesita ser estudiado con mayor detalle. Por un lado, conocer más sobre la química del sustrato en cuanto a la química de la lignina y, por otro lado, observar la actividad de las enzimas a lo largo del tiempo dentro de este sistema.

El efecto de deslignificación producido por las enzimas ligninolíticas si incrementó la disponibilidad de los polisacáridos a la hidrólisis enzimática con respecto al sustrato sin pretratamiento, estos resultados se mostrarán más adelante.

7.3.2. Efecto de los líquidos iónicos en la deslignificación.

La utilización de líquidos iónicos para el pretratamiento de biomasa se ha propuesto en años recientes (desde 2006 aprox.), los autores señalan que el principal fenómeno que está involucrado en el efecto del líquido iónico sobre la biomasa, son interacciones del tipo puente de hidrógeno entre los biopolímeros del sustrato y los iones del líquido iónico (Dadi y col., 2006; Pu y col, 2007; Doherty y col. 2010). A través de estas interacciones, los sustratos, son disueltos y por lo tanto, pierden su estructura original, en el caso de la lignina, parece haber una disolución completa de esta molécula en el líquido iónico; mientras que la celulosa, además de una disolución parcial, pierde cristalinidad (Dadi y col., 2006; Doherty y col., 2010; Cox y col 2011). Debido a estas y otras propiedades, el pretratamiento de biomasa con líquidos iónicos es prometedor, por eso forman parte de este trabajo.

7.3.2.1. Deslignificación de acuerdo al tipo de líquido iónico.

Debido a que existe una gran variedad de líquidos iónicos y estos tienen propiedades diferentes, es importante establecer primero, las mejores condiciones de trabajo. Los líquidos iónicos utilizados fueron acetato de 1-etil-3-metilimidazolio (**[Emim]**) y cloruro de 1-butil-3-metilimidazolio (**[Bmim]**). En esta parte experimental, se evaluó el efecto que **18 h** de pretratamiento con los líquidos iónicos produjo sobre los sustratos y los diversos disolventes utilizados para separar el líquido iónico de la biomasa.

Al finalizar la incubación con líquidos iónicos, la deslignificación pudo ser evaluada cuantificando, espectrofotométricamente, la cantidad de lignina disuelta (Lee y col., 2009). Como ya se mencionó en la **sección 6.8.2**, es posible separar los sustratos de los líquidos iónicos, utilizando varios disolventes. Después de esto, se puede cuantificar la lignina que se disolvió por efecto del líquido iónico de manera directa midiendo la absorbancia en las soluciones de lavado (Lee y col., 2009; Sun

y col., 2009). Después del pretratamiento con los líquidos iónicos, se filtró la muestra, en el filtrado (**filtrado 1**) se determinó la cantidad de lignina disuelta en el líquido iónico (de acuerdo a la **sección 6.8.2**). El sólido (**sólido1**) recuperado fue sometido a una hidrólisis enzimática con hidrolasas (de acuerdo a la **sección 6.9**), posteriormente se volvió a filtrar la muestra y en el nuevo material recuperado (**sólido 2**) se determinó la cantidad de lignina insoluble. Se debe mencionar que el líquido iónico no interfiere con la lectura en la absorbancia de la lignina soluble en el **filtrado 1** al menos, en el caso de **[Emim]** (ver **Tabla 4Aa** del **ANEXO**)

En la **Figura 7.11**, se muestran los resultados obtenidos en la determinación de lignina soluble e insoluble determinadas al finalizar el pretratamiento con los líquidos iónicos **[Emim]** y **[Bmim]** después de **18 h** de incubación y después de **1 h** de enjuagado con los diferentes disolventes mencionados en la **Sección 6.8.2** para separar los polisacáridos del líquido iónico. En esta misma figura se comparan las cantidades de lignina soluble e insoluble determinadas con H_2SO_4 (**Tabla 7.1**) con las determinadas después de incubar la muestra **L-104-Xte** con los líquidos iónicos. El pretratamiento de la muestra **L-104-Xte** con el líquido iónico **[Emim]** permitió disolver **135 mg** de lignina soluble por g de sustrato, por lo que es tres veces más eficiente que con ácido sulfúrico.

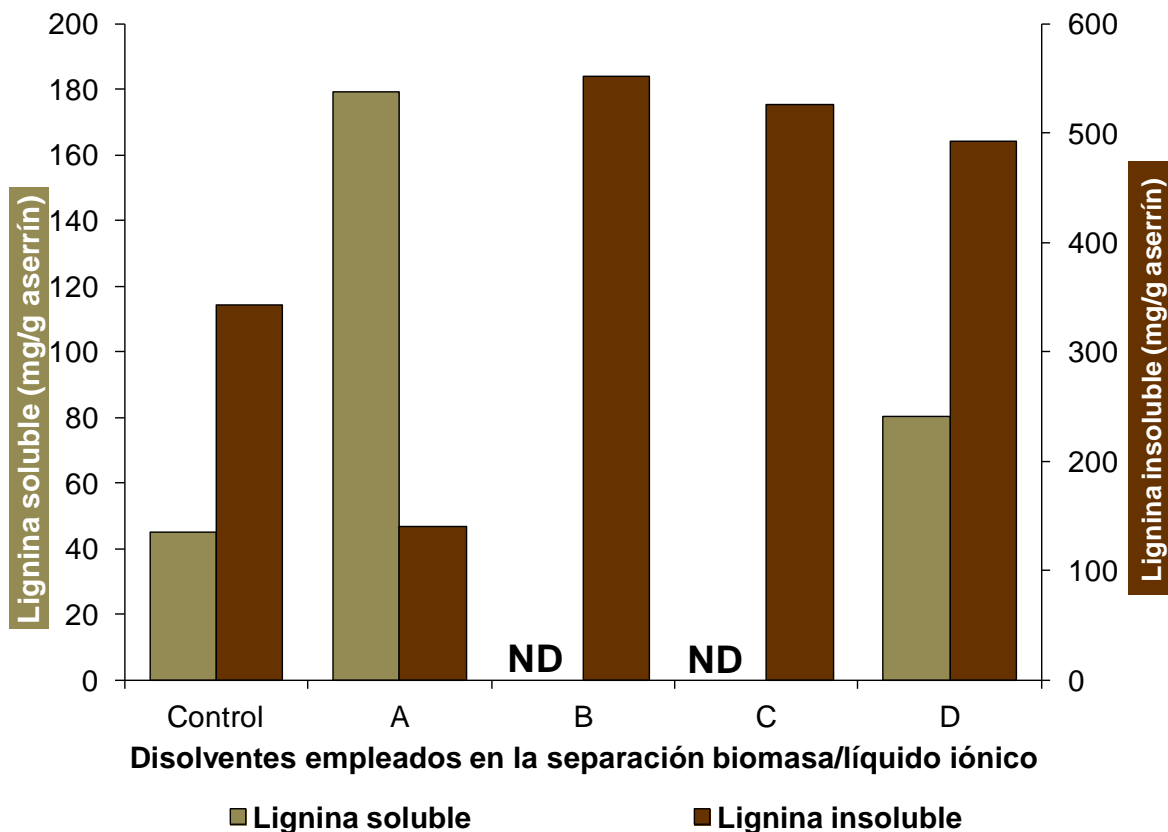


Figura 7.11. Cantidades de lignina soluble e insoluble en después del pretratamiento con líquidos iónicos. **ND:** No determinado. Disolventes empleados: **A:** [Emim]/H₂O; **B:** [Bmim]/H₂O; **C:** [Bmim]/acetona-agua; **D:** [Bmim]/acetonitrilo-agua.

También, se observa en la **Figura 7.11** que la cantidad de lignina insoluble se redujo **62%** comparando con el control. A diferencia de **[Emim]**, cuyo disolvente extractor de biomasa fue únicamente agua, el líquido iónico **[Bmim]** necesitó la evaluación de varios disolventes para identificar el más efectivo para separar la biomasa del líquido iónico. Cuando se utilizó agua (**Figura 7.11 B**) o una mezcla acetona/agua (**Figura 7.11 C**) no se pudo cuantificar espectrofotométricamente la lignina soluble, debido a interferencias en las lecturas. Por lo que se decidió dejar este parámetro como “**No Determinado**” (**ND**). En estas mismas muestras, la lignina insoluble está sobreestimada. Esto se puede deber a que el líquido iónico, no pudo ser removido de manera efectiva por el disolvente extractor y podría estar

interfiriendo en la determinación de lignina insoluble del sólido recuperado después del pretratamiento con líquidos iónicos. El mejor disolvente extractor, de acuerdo a lo obtenido, es la mezcla acetonitrilo/agua (80:20) (**Figura 7.11 D**), en el sobrenadante no se presentaron interferencias como en los otros dos casos. A pesar de esta mejora, la lignina insoluble cuantificada en este experimento, también fue sobreestimada, probablemente por interferencia con el líquido iónico residual.

La eficacia de un Líquido iónico en un pretratamiento, está ligada a la identidad, tanto del anión como del catión que lo componen. En la literatura, se han determinado algunos parámetros fisicoquímicos que pueden ayudar a caracterizar a un líquido iónico, y predecir su comportamiento en los procesos de conversión de biomasa. Estos son los parámetros de Kamlet-Taft: α , β y π^* que corresponden a su capacidad como donadores de puentes de hidrógeno, capacidad como aceptores de puente de hidrógeno y polarizabilidad, respectivamente (Lee y col., 2009; Doherty y col., 2010). Está demostrado que cuando el valor del parámetro β es de cierta magnitud (>0.9), la capacidad del líquido iónico para interaccionar molecularmente con la celulosa y la lignina aumenta, reflejándose en una disminución del índice de cristalinidad de la primera molécula y una solubilidad alta de la última (Doherty y col., 2010). Así mismo, el parámetro β de **[Emim]** (CH_3COO^-) en la literatura es de $\beta = 1.06$ (Doherty y col., 2010) y el mismo parámetro para **[Bmim]** (Cl^-) es $\beta = 0.84$ (Lee y col. 2010) y esto puede explicar la **Figura 7.11**, en donde **[Emim]**, tiene una capacidad mayor que **[Bmim]** para formar puentes de hidrógeno y esto reflejarse en una mayor deslignificación del sustrato. Adicionalmente, la poca efectividad de **[Bmim]** (Cl^-) en el pretratamiento se le puede atribuir a la presencia del anión Cl^- , ya que, Doherty (2010), reporta extracciones de lignina y rendimientos en la disponibilidad de los polisacáridos de harina de madera de arce relativamente altos utilizando **[Bmim]** pero con el anión (CH_3COO^-) en vez del anión (Cl^-). Lee y col. (2008) explica que los líquidos iónicos con el anión Cl^- no son selectivos en su interacción con la lignina y la celulosa, eso quiere decir que la afinidad por ambos polímeros es similar y por lo tanto las separaciones biomasa/líquido iónico y celulosa/lignina son pobres, de

esta manera, la deslignificación fue parcial como se demostró durante la deslignificación enzimática (**Sección 7.3.1**), en estas condiciones de pobre remoción de lignina la disponibilidad de carbohidratos es baja (ver **Sección 7.4.2**).

7.3.3.2 Efecto del tiempo en el pretratamiento con [Emim] en la deslignificación

Debido a que se tienen dos sustratos con cantidades de lignina distintas (**Tabla 7.1**), el tiempo en el cuál se solubilice la mayor cantidad de lignina en el líquido iónico podría ser distinto para ambos sustratos. Para evaluar lo anterior, se realizó un curso temporal del efecto del líquido iónico **[Emim]** sobre la solubilización de lignina en el aserrín **L-104-Xte** y el aserrín **L-104-Dte** (ver **Figura 5A, ANEXO**). Al finalizar el pretratamiento mencionado, se siguió un procedimiento similar al de la sección anterior, en donde en el **Filtrado 1**, se determinó espectrofotométricamente la lignina disuelta por el pretratamiento y en el **Sólido 2** se determinó la lignina insoluble. La única diferencia es que en esta ocasión se utilizó únicamente **[Emim]** como deslignificante y agua como disolvente separador.

En la **Figura 7.12**, se muestran los resultados de la cuantificación de lignina soluble e insoluble en los diferentes tiempos de incubación aplicados sobre la muestra **L-104-Xte**, como **control**, se utilizan los datos de la lignina total reportados en la **Figura 7.6**. En esta figura, se puede observar que de las **3h** a las **24 h**, el líquido iónico **[Emim]** convierte la lignina del sustrato **L-104-Xte** de lignina insoluble a lignina soluble. Se puede observar una clara relación lineal entre el tiempo y la cantidad de lignina disuelta. A las **24 h**, se ha disuelto casi el **60%** de la lignina total del sustrato **L-104-Xte**, tomando en cuenta que la lignina total es de **388 mg/g de aserrín (Tabla 1)**.

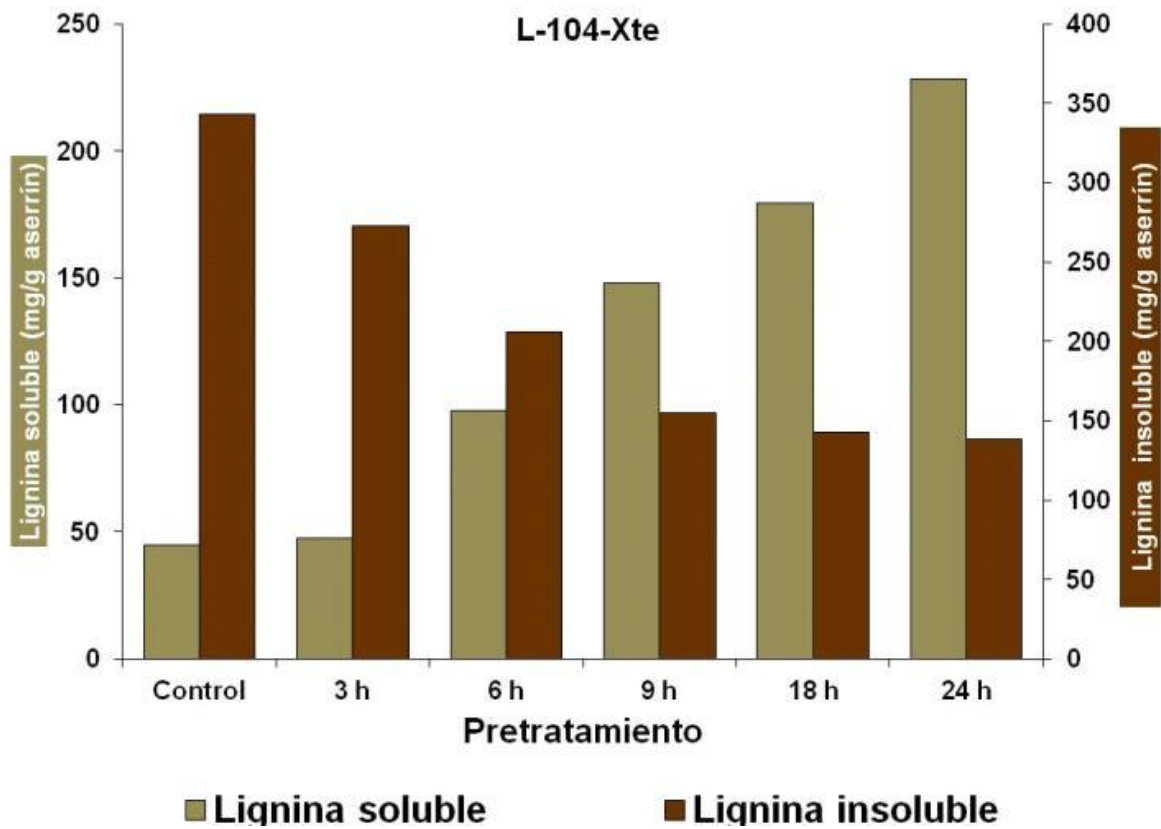


Figura 7.12. Lignina soluble e insoluble a través del tiempo en el pretratamiento con [Emim] sobre L-104-Xte.

Por otro lado en la **Figura 7.13**, se muestran los resultados para el aserrín procedente del aserradero de Durando y en este caso, la muestra **L-104-Dte**, únicamente, se cuantificaron las cantidades de lignina soluble e insoluble a dos tiempos de pretratamiento, **6 h** y **24 h**. Nuevamente, las cantidades de lignina soluble e insoluble presentadas de la **Figura 7.6** son utilizadas como **Control**.

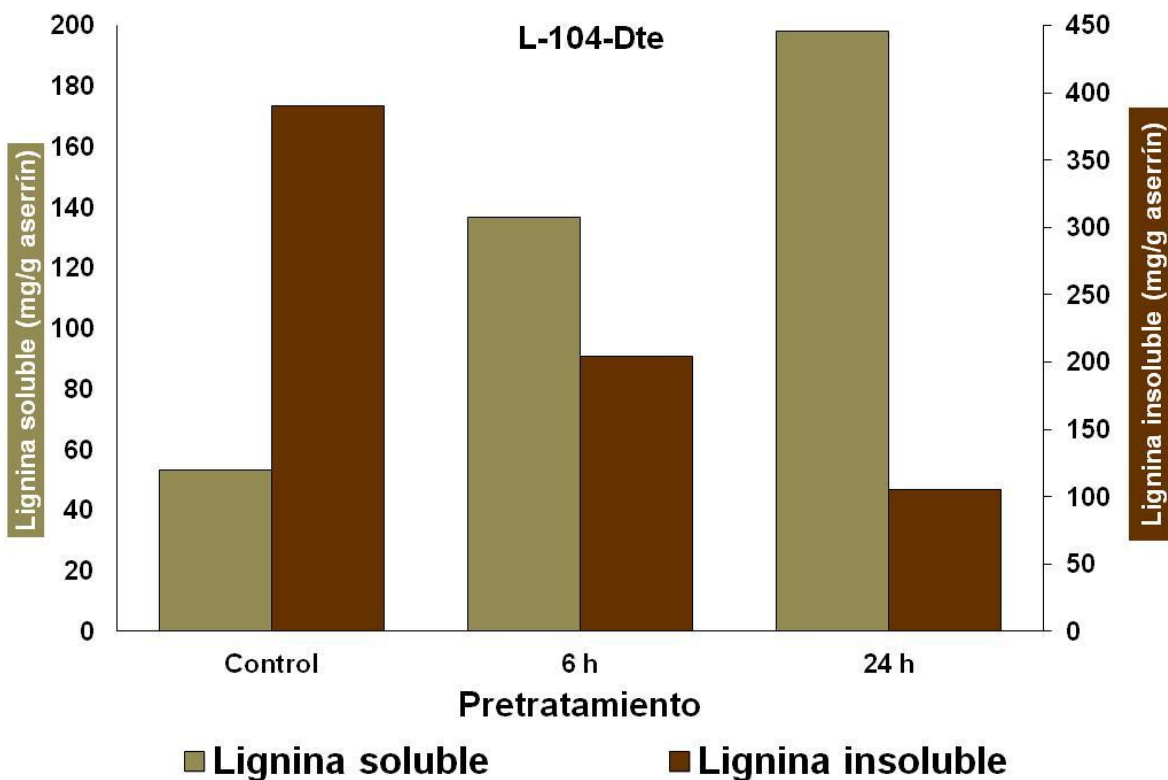


Figura 7.13. Lignina soluble e insoluble a través del tiempo en el pretratamiento con [Emim] sobre L-104Dte.

A las **6h**, el líquido iónico, solubilizó **140 mg** de lignina por gramo de sustrato. Si tomamos en cuenta que la lignina total estimada por hidrólisis ácida es de **444 mg/g** de aserrín, (**Tabla 7.1**), entonces a las **6 h** se ha removido cerca del **30%** de la lignina total en el sustrato y a las **24 h** se ha removido el **45%** de lignina total. Un aspecto importante que se debe señalar en éste experimento es la cantidad de lignina total en el sustrato que se estima a través de dos métodos: la hidrólisis ácida y el líquido iónico. Mientras que por la hidrólisis ácida se estima una cantidad e lignina total de **444 mg/g** aserrín (**Tabla 7.1**), mediante el pretratamiento con [Emim] se estima una cantidad de lignina total de **340 mg/g** aserrín a las **6h** y **300 mg/g** aserrín a las **24 h**. Esto podría indicar una sobreestimación en la cantidad de lignina utilizando el método de hidrólisis ácida debido a una limitación del método para distinguir entre los polisacáridos y la lignina.

7.4. Disponibilidad de los carbohidratos mediante los pretratamientos.

7.4.1 Efecto de las enzimas ligninolíticas en la disponibilidad de los carbohidratos.

Después de los pretratamientos con enzimas ligninolíticas, especialmente en aquellos donde se solubilizó lignina, se esperaba que los carbohidratos estuviesen más susceptibles a su hidrólisis o proceso de sacarificación (Singh, 2008). Para la evaluación del efecto de las ligninasas sobre la disponibilidad de carbohidratos del sustrato **L-104-Xte** se realizaron dos hidrólisis enzimáticas y una hidrólisis ácida. Al término de la incubación con **Lac** y **MnP** las muestras fueron filtradas y el sólido recuperado (**Sólido 1**) fue dividido en tres porciones, cada una fue tratada a diferentes condiciones de hidrólisis, las enzimáticas de acuerdo a la **sección 6.9** y la hidrólisis ácida de siguiendo un procedimiento similar que en la **sección 6.10**, pero ajustando la cantidad de reactivos en proporción a la cantidad de sustrato utilizada. Después de cada hidrólisis, las muestras se filtraron y en los sobrenadantes, se cuantificó la disponibilidad de los carbohidratos como azúcares reductores mediante la técnica del ácido 3,5-Dinitrosalicílico (DNS) (ver **sección 6.7.1**).

En la **Figura 7.14**, se muestran los resultados de la disponibilidad de azúcares reductores mediante una hidrólisis enzimática utilizando dos mezclas de enzimas hidrolíticas, la mezcla de Genencor® (**GE**) y la mezcla Enmex® (**EN**). En esta figura, se observa que sólo algunos pretratamientos fueron capaces de permitir la hidrólisis enzimática de una pequeña fracción de los polisacáridos presentes en la biomasa. Esta efectividad fue independiente de la cantidad de lignina solubilizada durante la incubación con **Lac** y **MnP**. Los mejores resultados se obtuvieron empleando **Lac** con **ABTS** como cooxidante a tiempos largos (**168 h**). Tomando en cuenta los carbohidratos totales de la muestra **L-104-Xte** (**Tabla 7.1**), utilizando la mezcla de enzimas (**GE**), con las condiciones antes mencionadas, se hidrolizaron el **71 %** de los carbohidratos totales y el **10 %** utilizando la mezcla de

enzimas (**EN**). Sin embargo, en estas muestras sólo se solubilizó del orden de **8 %** de lignina total cuando se utilizó **Lac**. En cambio en los tratamientos dónde se solubilizó casi un **30 %** de lignina (con **MnP** y **VA**, **Figura 7.8**) no se detectaron azúcares liberados por las hidrolasas de polisacáridos.

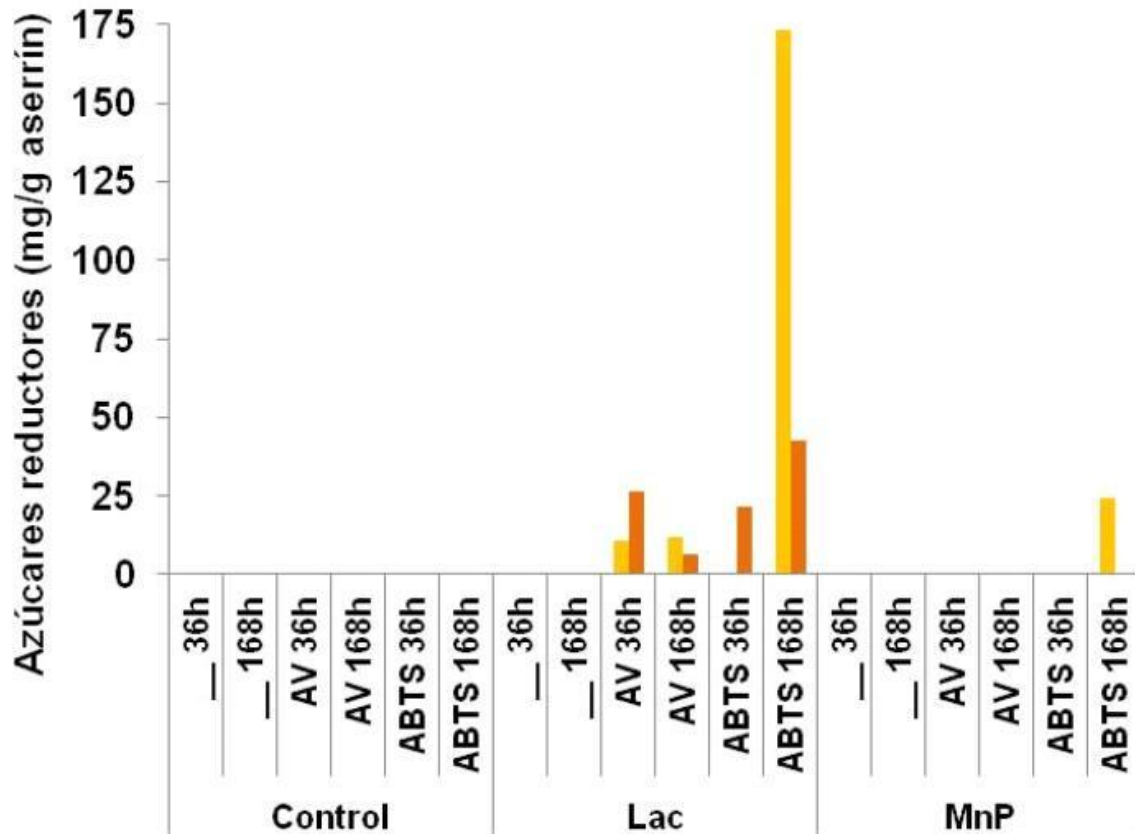


Figura 7.14. Azúcares reductores cuantificados después de la hidrólisis enzimática.

Debido a que los resultados de la **Figura 7.14** no son suficientes para establecer un criterio de la efectividad del pretratamiento, se decidió realizar una hidrólisis ácida sobre los sustratos deslignificados con enzimas, para evaluar la efectividad de la incubación. De ésta manera, si el sustrato fue modificado, con respecto a las muestras **Control**, el cambio se vería reflejado en la cantidad de azúcares hidrolizables por el ácido sulfúrico. En la **Figura 7.15** se muestran los resultados de los azúcares reductores detectados en los sobrenadantes de las hidrólisis

ácidas de las muestras incubadas con **Lac**, **MnP** y las diferentes combinaciones con los cooxidantes y los tiempos de incubación.

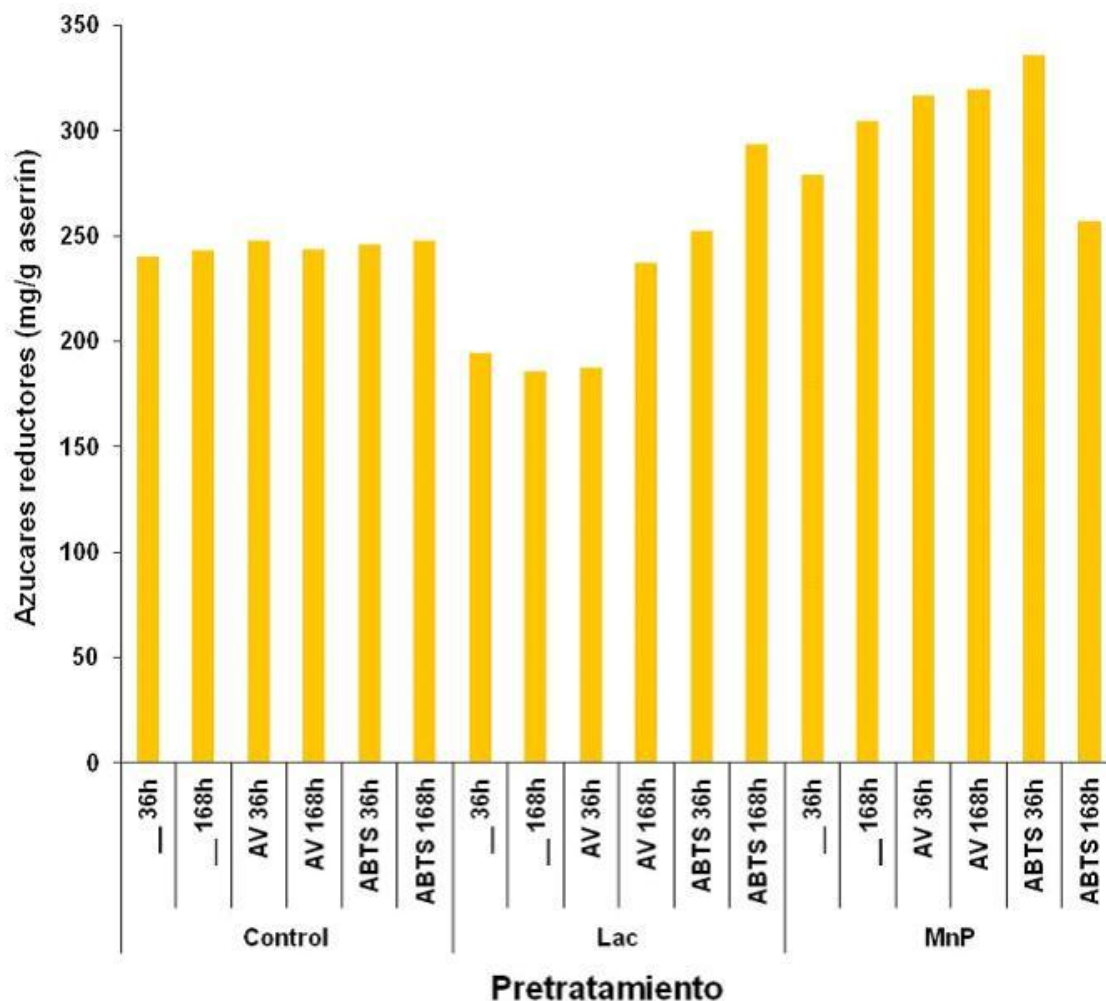


Figura 7.15. Azúcares reductores cuantificados en las hidrólisis ácidas de las muestras pretratadas con enzimas lignolíticas.

La cantidad de azúcares reductores en las muestras **Control** fue de **245** mg/g de aserrín aproximadamente (similar a los de **Tabla 1**). Resultados similares a las muestras **control** fueron obtenidos en el tratamiento con **Lac** en ausencia o presencia de cooxidantes a tiempos cortos (**36 h**), mientras que a tiempos largos en presencia de **ABTS** únicamente, la cantidad de reductores totales aumentó y fue de **300 mg/g** de aserrín, aproximadamente. En el caso de **MnP** en los tratamientos donde se solubilizó casi un **30 %** de lignina la cantidad de azúcares

reductores cuantificado fue de al menos **300 mg /g** de aserrín. Sin embargo, el tratamiento con esta enzima deslignificante y **ABTS** por **36 h** de tratamiento dónde sólo se solubilizó el **10 %** de la lignina también se solubilizaron más de **300 mg /g** de azúcares reductores por gramo de sustrato.

En el **ANEXO (Figura 3A)**, se describen los pretratamientos aplicados sobre las muestras **L-104-Xte** y **L-104-Dte**, a tiempos de incubación de **336 h**, las condiciones se encuentran señaladas en esa misma figura. Al finalizar los pretratamientos señalados, a ambas muestras se filtraron. El aserrín recuperado (**Sólido 1**), se sometió a una hidrólisis enzimática utilizando únicamente, la mezcla de enzimas hidrolíticas Genencor® (**GE**). Finalmente, las muestras hidrolizadas se filtraron nuevamente y en el **Filtrado 2**, se cuantificaron azúcares reductores mediante la técnica del ácido 3,5-Dinitrosalicílico (DNS) (ver **sección 6.7.1**).

En la **Figura 7.16**, se muestran los resultados obtenidos de esta secuencia experimental y se comparan con los carbohidratos totales determinados en cada sustrato (**Tabla 7.1**). En esta figura el efecto de los pretratamientos a tiempos de **336 h** sobre la accesibilidad de los carbohidratos no pudo saberse mediante una hidrólisis enzimática de los polisacáridos, ya que en ambos sustratos se cuantifican cantidades de azúcares reductores similares independientemente de la enzima lignolítica utilizada en la deslignificación.

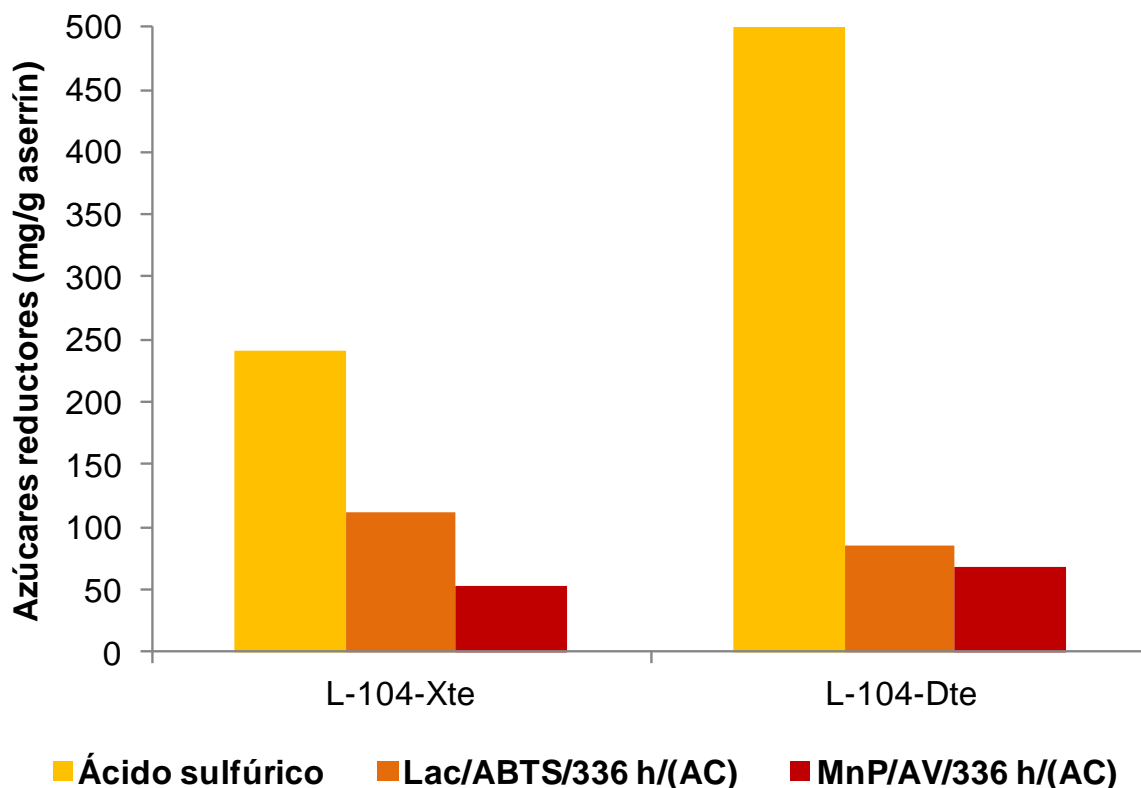


Figura 7.16. Azúcares reductores cuantificados en los sustratos **L-104-Xte** y **L-104-Dte** bajo deslignificación de **336 h** con las enzimas ligninolíticas y comparadas con los detectados bajo condiciones de hidrólisis ácida.

Sin embargo, si se puede decir que el pretratamiento con **Lac** permite una mejor accesibilidad a los carbohidratos que la **MnP** sin importar el sustrato. La hidrólisis ácida, por el contrario, sí depende del tipo de sustrato ya que como se vio en la **Tabla 7.1**, en ambos sustratos se cuantificaron cantidades de carbohidratos totales muy distintas.

7.4.2. Efecto del tipo de líquido iónico en la accesibilidad a los carbohidratos.

En la **sección 7.3.2.1**, se describió el procedimiento seguido después de los pretatamientos por 18h con los líquidos iónicos acetato de 1-etil-3-metilimidazolio

[Emim] y cloruro de 1-butil-3-metilimidazolio [Bmim] sobre la muestra L-104-Xte, en esta parte experimental, se ensayaron varios disolventes y mezclas de disolventes para remover los líquidos iónicos del sustrato. A cada sustrato, se le sometió a una hidrólisis enzimática con la mezcla de hidrolasas Genencor® (GE) y, finalmente, se cuantificó la cantidad de azúcares reductores liberados mediante la hidrólisis enzimática a través de la técnica del ácido 3,5-Dinitrosalicílico (DNS) (ver **sección 6.7.1**). En la **Figura 7.17** se muestran los resultados de los azúcares reductores detectados después de la hidrólisis enzimática en cada una de las muestras incubadas con los líquidos iónicos [Emim] y [Bmim] durante 18 h de incubación. La cantidad de carbohidratos totales estimados en el **control** se reportaron en la (**Tabla 7.1**)

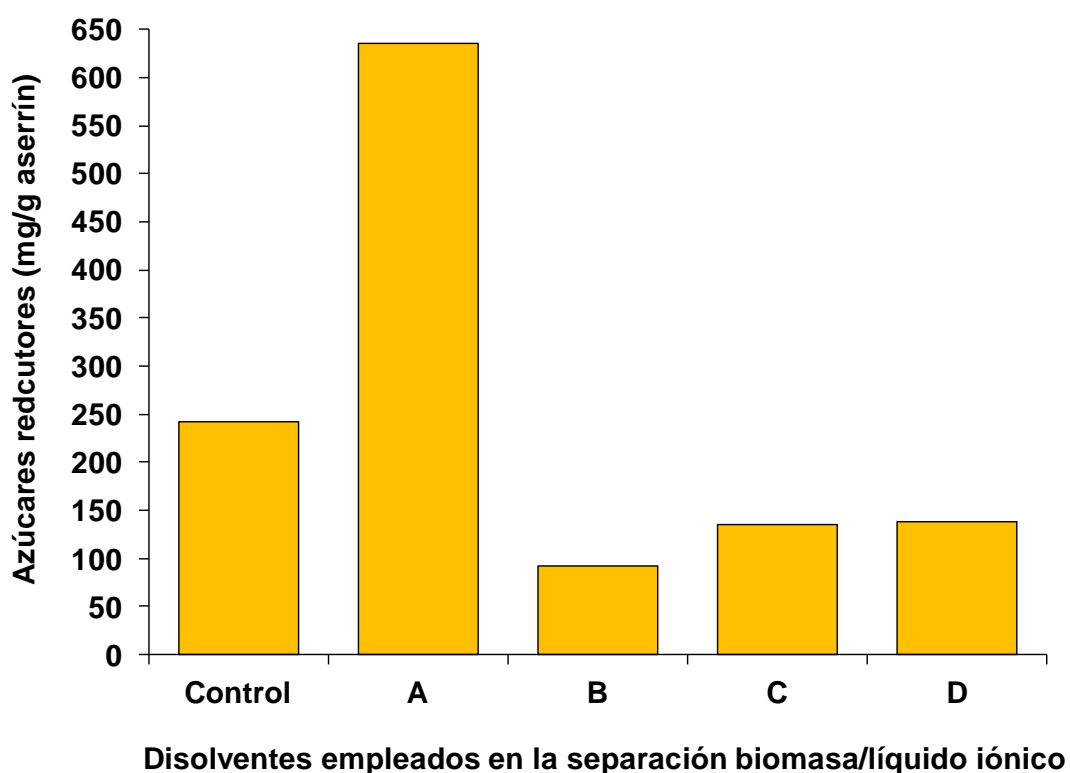


Figura 7.17. Azúcares reductores cuantificados después del pretratamiento con líquidos iónicos. Disolventes empleados: **A:** [Emim]/H₂O; **B:** [Bmim]/H₂O; **C:** [Bmim]/acetona-agua; **D:** [Bmim]/acetonitrilo-agua.

En la muestra incubada con **[Emim]** se hidrolizaron **640** mg de azúcares reductores por cada gramo de **L-104-Xte**. Esto 2.7 veces más de azúcares reductores que los determinados mediante la hidrólisis ácida (**241.6 mg /g aserrín**). Cuando se utiliza **[Bmim]**, la hidrólisis enzimática se ve afectada, ya sea porque hay residuos de **[Bmim]** que afectan la acción enzimática, o porque el efecto de **[Bmim]** (Cl⁻) sobre el sustrato no es tan bueno como con **[Emim]**, debido a las diferencias existentes entre los parámetros β de ambos líquidos iónicos (Doherty y col., 2010; Lee y col. 2009), como ya se había explicado anteriormente en la Sección **7.3.2.1**. Por lo anterior, **[Bmim]** (Cl⁻) ya no fue empleado posteriormente en los siguientes experimentos. Comparando los resultados de la **Figura 7.17** con los de la literatura, un pretratamiento de madera de acre con **[Emim]** (CH₃COO⁻) por 24h a 90°C demostró una reducción en el índice de cristalinidad de la celulosa y en la cantidad de la lignina del sustrato, resultando en un rendimiento de más del 90% de glucosa liberada mediante una hidrólisis enzimática (Sun y col., 2009; Doherty 2010). De esta manera, los resultados en este trabajo corroboran la efectividad de **[Emim]** (CH₃COO⁻) para incrementar la disponibilidad de los polisacáridos en muestras leñosas. Más aún, en este trabajo se demostró que un incremento en la temperatura de incubación (de **90 °C** a **110 °C**) con el mismo líquido iónico, disminuye el tiempo de tratamiento de **24 h** (Sun y col., 2009) a **18 h** con la misma eficiencia respecto a la solubilización de lignina y aumento en la disponibilidad de carbohidratos, pudiéndosele atribuir a una disminución en el índice de cristalinidad de la celulosa (no demostrado en este trabajo).

7.4.2.1 Efecto del tiempo en el pretratamiento con [Emim] sobre la accesibilidad de los carbohidratos en los sustratos L-104-X y L-104-D.

Después del procedimiento señalado en el **ANEXO, Figura 5A**, en donde el líquido iónico utilizado fue **[Emim]**, las muestras de aserrín, se hidrolizaron enzimáticamente, se filtraron y se cuantificaron azúcares reductores en el sobrenadante del medio de reacción. En la **Figura 7.18**, se muestran los datos

obtenidos de los azúcares reductores cuantificados a cada tiempo de pretratamiento con [Emim] en los sustratos **L-104-Xte** y **L-104-Dte**. Las muestras **control** son los datos de la **Tabla 7.1**.

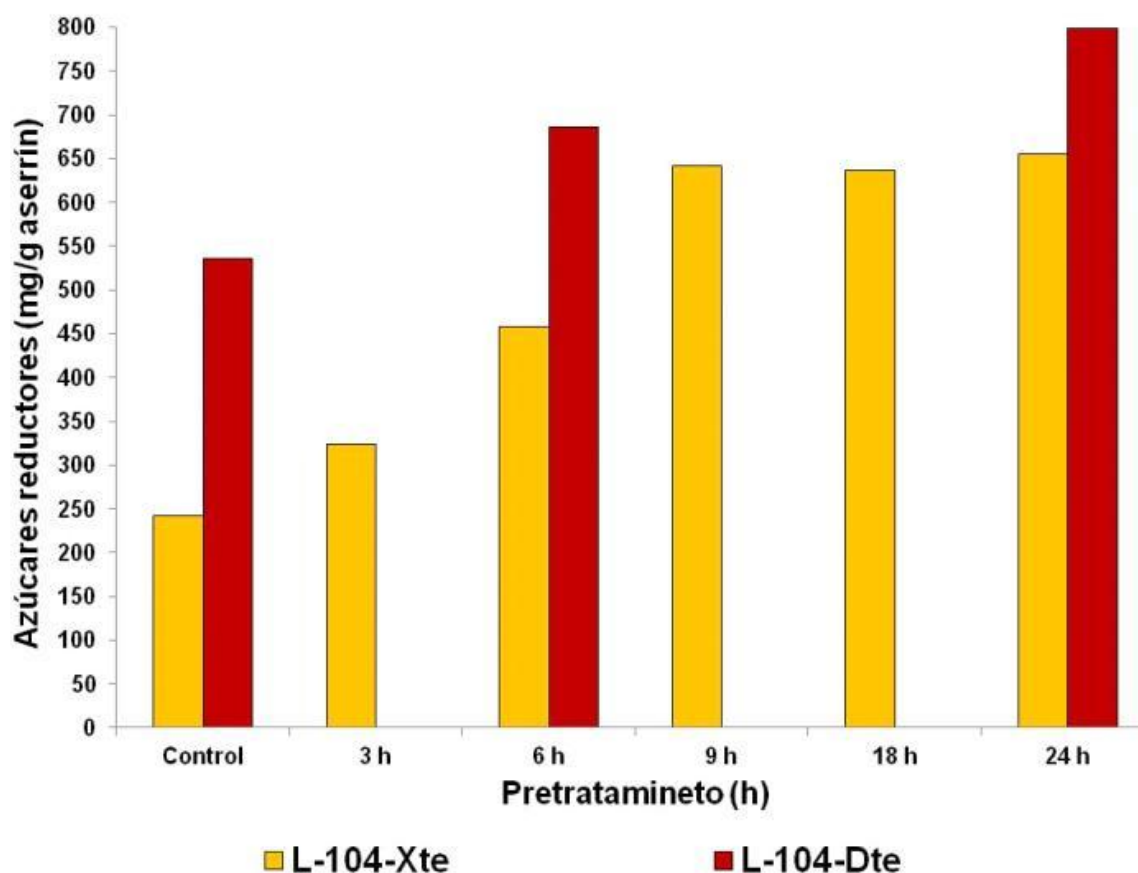


Figura 7.18. Azúcares reductores cuantificados a lo largo del tiempo de incubación en las muestras **L-104-Xte** y **L-104-Dte** durante el pretratamiento con [Emim].

En la muestra **L-104-Xte**, Entre las **3** y las **6 h**, se superó la cantidad de los azúcares reductores cuantificados por hidrólisis ácida. A partir de las **9 h** y hasta las **24 h**, se cuantifican **2.7** veces más azúcares reductores en la hidrólisis enzimática que en la hidrólisis ácida. Para el caso de **L-104-Dte**, a las **6 h** de pretratamiento se cuantifican **28 %** más de azúcares reductores en la hidrólisis

enzimática que en la hidrólisis ácida y a las **24 h**, por hidrólisis enzimática se cuantifica un **49 %** más de azúcares reductores que el **control**.

En la **Figura 7.19** se muestran las micrografías de los sustratos después del tratamiento con **[Emim]**. En ellas se localizan dos regiones: una dónde se observan fibras que parecen ser celulosa en ambos sustratos (**Figura 7.24 A y C**) pero que no se encuentran tan expuestas como en la **Figura 7.10**, en donde se observaban regiones completamente blancas entre las traqueidas. En la otra región aún se identifican traqueidas pero su superficie es porosa y se observa la pérdida de la estructura del sustrato inicial (**Figuras 7.24 B y D**).

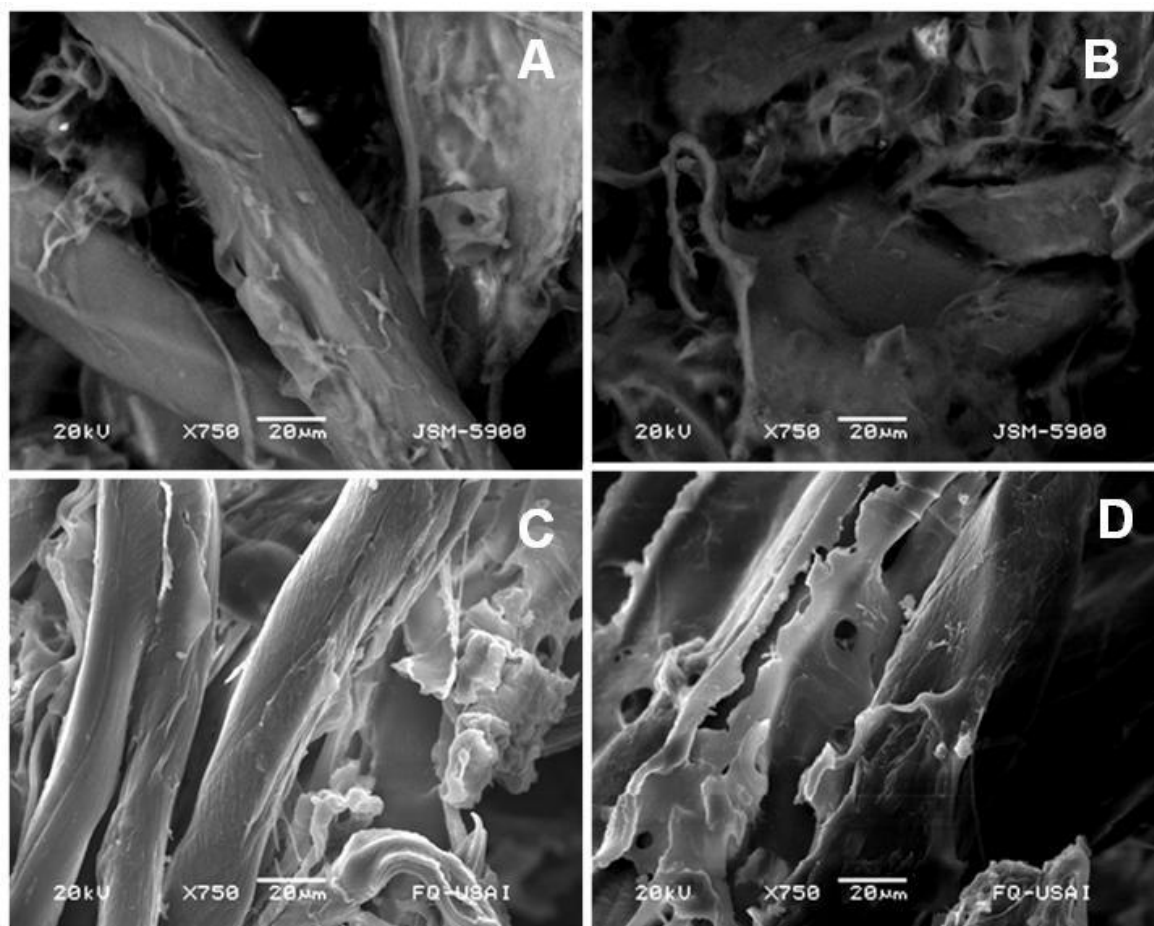


Figura 7.19. Imágenes de microscopía electrónica de barrido a un aumento de 750 veces. (**A y B**) Aserrín Xochimilco (**L-104-Xte**) tratado con **[Emim]**, (**C y D**) Aserrín Durango (**L-104-Dte**) tratado con **[Emim]**.

Es probable que la exposición de las fibras de celulosa o el incremento en la porosidad del material favorezcan la interacción de las enzimas hidrolíticas con los polisacáridos. Los resultados de esta sección y los de la **Sección 7.3.2** (deslignificación de los sustratos) sugieren que con líquidos iónicos se puede comprobar o rectificar la abundancia de lignina y azúcares presentes en la biomasa, siempre y cuando el líquido iónico utilizado sea el adecuado, como el caso de **[Emim]** (CH_3COO^-) lo fue en este trabajo.

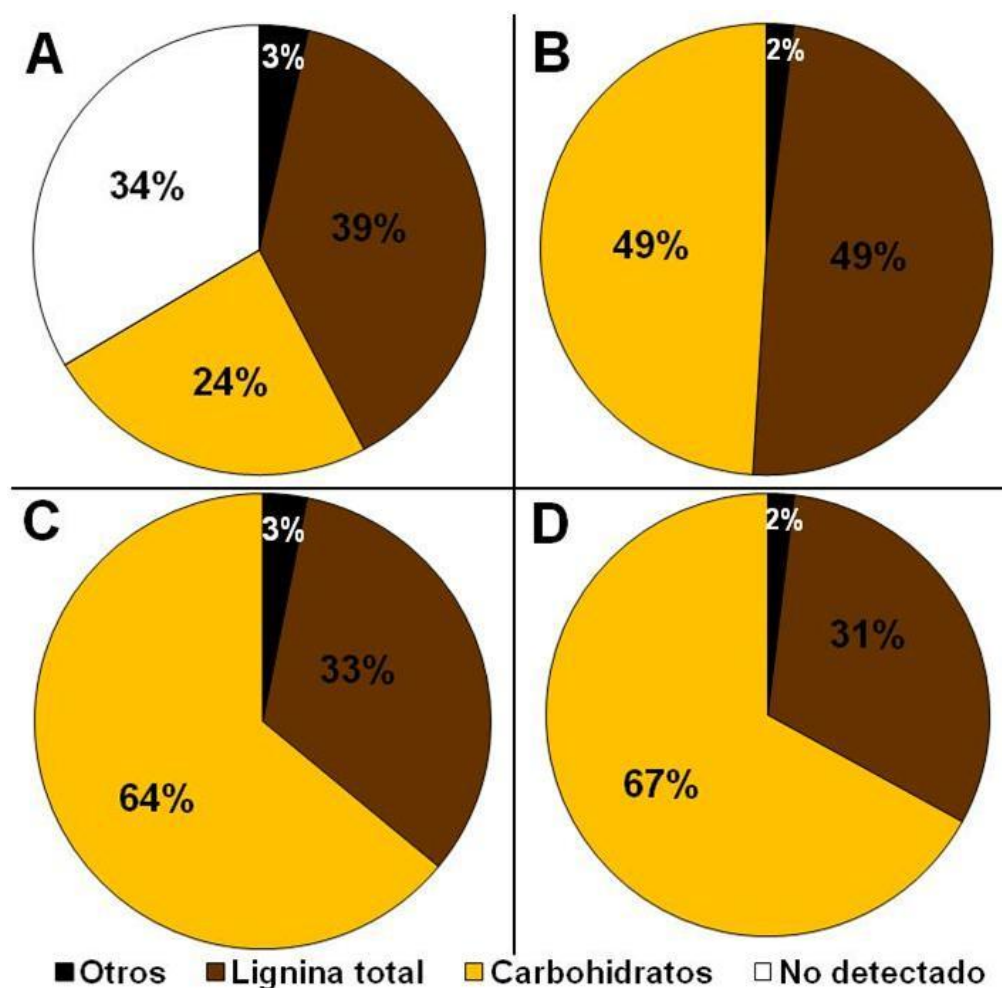


Figura 7.20. (A) Composición del sustrato **L-104-Xte** mediante la hidrólisis con H_2SO_4 , (B) composición del sustrato **L-104-Dte** mediante la hidrólisis con H_2SO_4 , (C) composición del sustrato **L-104-Xte** mediante el pretratamiento con **[Emim]** e hidrólisis enzimática con la mezcla GENENCOR, (D) composición del sustrato **L-104-Dte** mediante el pretratamiento con **[Emim]** e hidrólisis enzimática con la mezcla GENENCOR.

En la **Figura 7.20** se compara la composición química de los sustratos aquí utilizados cuando se empleó el método ácido y el tratamiento con líquido iónico y diversas enzimas para hidrolizar a los polisacáridos. Comparando la composición de azúcares obtenidos para cada sustrato, se puede concluir que el **34 %** en peso de la biomasa no detectada en el sustrato **L-104-Xte (Figura 8.6 A)** cuando se hidrolizaron por medio ácido, eran azúcares que se degradaron a compuestos como furfural e hidroximetilfurfural y que, a su vez, pueden degradarse a ácido levulínico y fórmico (Redding y col., 2011) que no pueden ser cuantificados como reductores. Nótese que el contenido de lignina evaluado en este sustrato, por cualquiera de los métodos fue similar. En contraste, en la muestra **L-104-Dte**, la comparación de la abundancia de los polímeros obtenida por metodologías distintas indica que la lignina fue sobrevalorada en el tratamiento ácido debido a que una fracción, correspondiente al **18 %** del peso total, pudieron ser polisacáridos fuertemente unidos a lignina que no pudieron ser separados por medio de la hidrólisis ácida. Otra posibilidad es que la celulosa dentro de este aserrín se tenga una cristalinidad tal que el tratamiento ácido no pudo hidrolizar las fibrillas de celulosa. Desafortunadamente, no se realizaron experimentos para decidir cuál de estas propuestas es la responsable de la sobrevaloración del contenido de lignina en la muestra **L-104-Dte** por tratamiento ácido. Sin embargo, lo que si podemos concluir de lo antes expuestos es que la estructura de la lignina, la interacción lignina-celulosa y grado de cristalinidad en ambos sustratos son diferentes.

8. Conclusiones.

Con base en los resultados de este trabajo se puede concluir:

- La estructura macro y micro de un mismo tipo de residuo lignocelulósico varía dependiendo del origen de éste.
- Esta diferencia estructural impacta en los procesos de transformación de la biomasa reflejándose en una menor o mayor deslignificación y en la susceptibilidad de los polisacáridos a hidrolizarse.
- En el aserrín de Xochimilco (**L-104-Xte**) las enzimas ligninolíticas logran una deslignificación del 8% con **Lac** y 43% con **MnP**.
- La utilización de **MnP** y **AV** constituyó un mejor sistema deslignificante que **Lac** y **ABTS** para el caso del aserrín de Xochimilco.
- El aserrín de Durango (**L-104-Dte**) es un sustrato que es más resistente a la deslignificación que el aserrín de Xochimilco cuando ambos se incuban a las mismas condiciones con **Lac** y **MnP**.
- El pretratamiento con enzimas ligninolíticas incrementa la disponibilidad de los polisacáridos de los aserrines a la sacarificación (hidrólisis de los polisacáridos en azúcares reductores).
- El **[Emim]** disminuye la cantidad de lignina en la muestra y además disminuye la cristalinidad de la celulosa haciéndola más susceptible a la hidrólisis enzimática.
- De esta manera queda evidenciado que para que los polisacáridos del aserrín puedan ser hidrolizables, además de una buena deslignificación, también es necesario impactar en el índice de cristalinidad de la celulosa. El pretratamiento que mejor cumple con este objetivo es el líquido iónico **[Emim]**.

9. P e r s p e c t i v a s .

Los resultados de este trabajo no son determinantes debido a que ambos sistemas requieren de optimizaciones, en las condiciones de reacción.

1) El pretratamiento con las enzimas ligninolíticas, a pesar de ser un sistema deslignificante con resultados positivos, no afecta a la celulosa en su estructura macro molecular, es por esto que las enzimas ligninolíticas necesitan de un método auxiliar en donde al sustrato se le pueda disminuir la cristalinidad de la celulosa posiblemente con un aumento en la temperatura o con el auxilio de otro tipo de cooxidantes.

2) Aún cuando los líquidos iónicos son muy efectivos en incrementar la accesibilidad de los polisacáridos en los materiales lignocelulosicos, su aplicación a nivel industrial dependerá de los estudios de factibilidad económica de este tratamiento cuando se aplique a los grandes volúmenes de material lignocelulosico que se manejan a esta escala.

9. ANEXO.

1A. FIGURAS DE APOYO DE LA SECCIÓN 6.11.5.

Estabilidad de la actividad enzimática de las hidrolasas.

En la **Figura 1A**, se reporta la actividad enzimática con respecto al tiempo de la mezcla de enzimas hidrolíticas empleadas en este trabajo. Las unidades se reportan en **UFP** (Unidades de Papel Filtro). En la sección 6.11.5 se mencionó la ecuación para el cálculo de estas unidades.

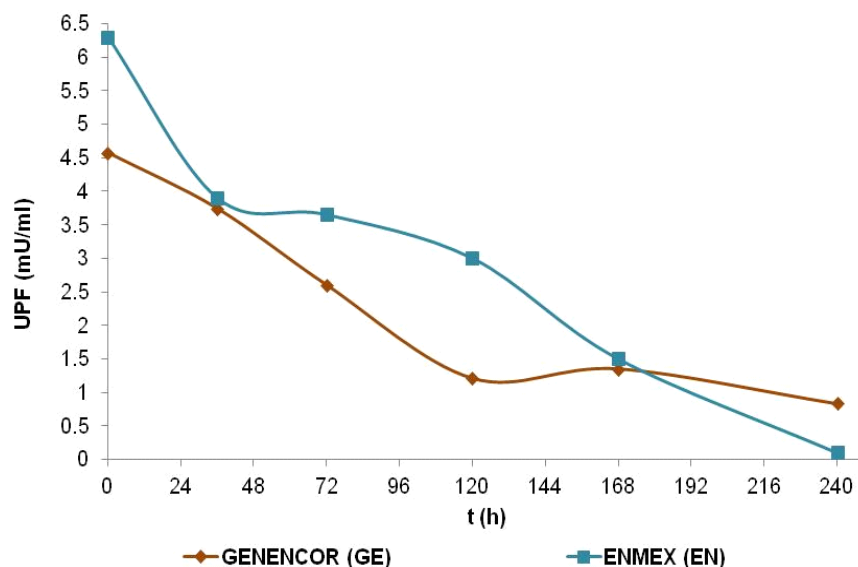


Figura 1A. Curso temporal de la actividad enzimática de las mezclas comerciales de hidrolasas.

2A. FIGURAS DE APOYO DE LA SECCIÓN 7.3.1.

Efecto de las enzimas ligninolíticas en la deslignificación del aserrín.

En la **Figura 2A**, se esquematiza el procedimiento experimental seguido para la evaluación del efecto del tipo de enzima, el cooxidante y el tiempo de incubación,

aplicado al sustrato L-104-Xte. Esta figura representa los experimentos descritos en las **Figuras 7.8, 7.14 y 7.15.**

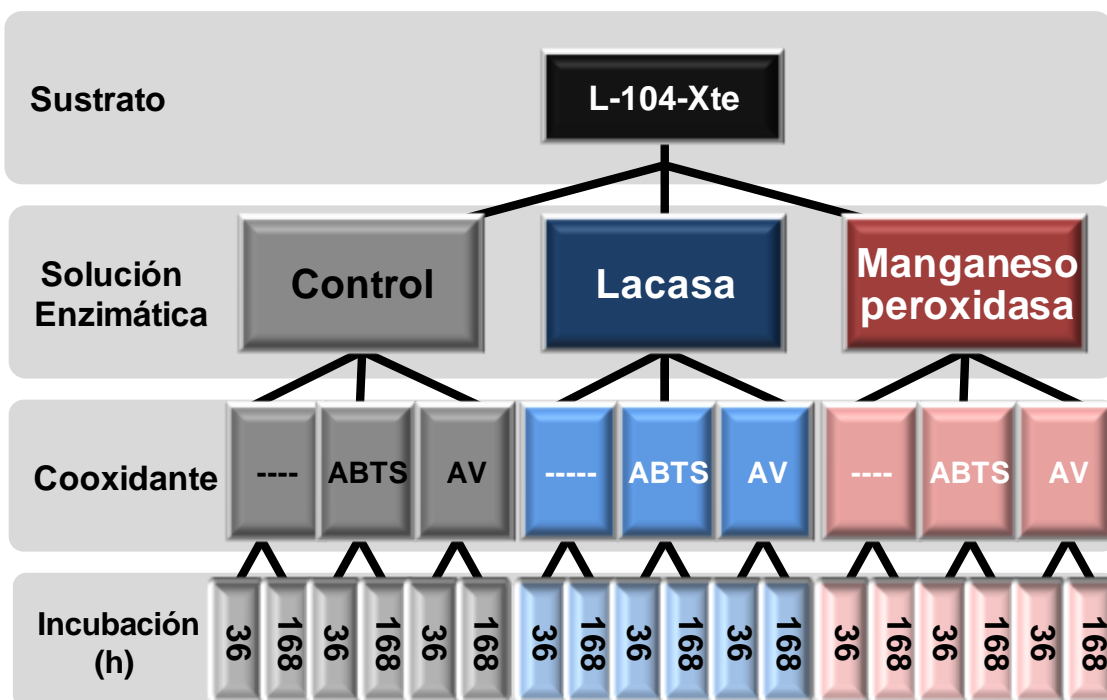


Figura 2A. Procedimiento aplicado sobre el aserrín Xochimilco (**L-104-Xte**) en el pretratamiento con las enzimas ligninolíticas. Cooxidantes: ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) (**ABTS**), el alcohol veratrílico (**AV**).

3A. FIGURAS DE APOYO DE LA SECCIÓN 7.3.1.

Efecto de las enzimas ligninolíticas en la deslignificación del aserrín.

En la **Figura 3A**, se muestra el esquema del procedimiento experimental seguido para la evaluación de los sistemas enzimáticos sobre aserrines de diferente procedencia, los sustratos se sometieron a tiempos aún más largos, para observar si la deslignificación podía optimizarse. En este cuadro se esquematizaron los experimentos reportados en las **Figuras 7.9, 7.16.**

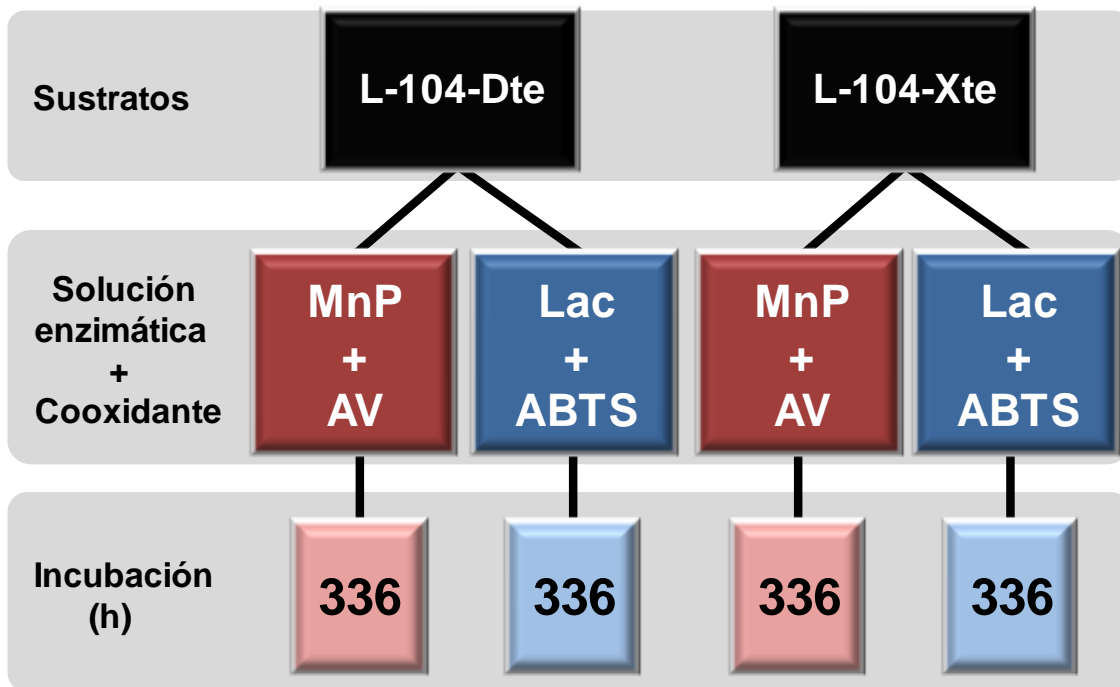


Figura 3A. Procedimiento de designificación aplicado sobre **L-104-Xte** y **L-104-Dte**. Enzimas: manganeso peroxidasa (**MnP**), lacasa (**Lac**). Cooxidantes: ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) (**ABTS**), el alcohol veratrílico (**AV**).

4A. FUGURAS DE APOYO DE LA SECCIÓN 7.3.2.1.

Efecto del tipo de líquido iónico.

En la **Figura 4A**, se muestra el procedimiento seguido en el pretratamiento del sustrato **L-104-Xte** con los líquidos iónicos acetato de 1-etil-3-metilimidazolio (**[Emim]**) y cloruro de 1-butil-3-metilimidazolio (**[Bmim]**). También involucra a c los disolventes mencionados en la sección **6.8.2** que se utilizaron para la separación de la biomasa del líquido iónico. Los resultados de este experimento se muestran en las figuras **7.11** y **7.17**.

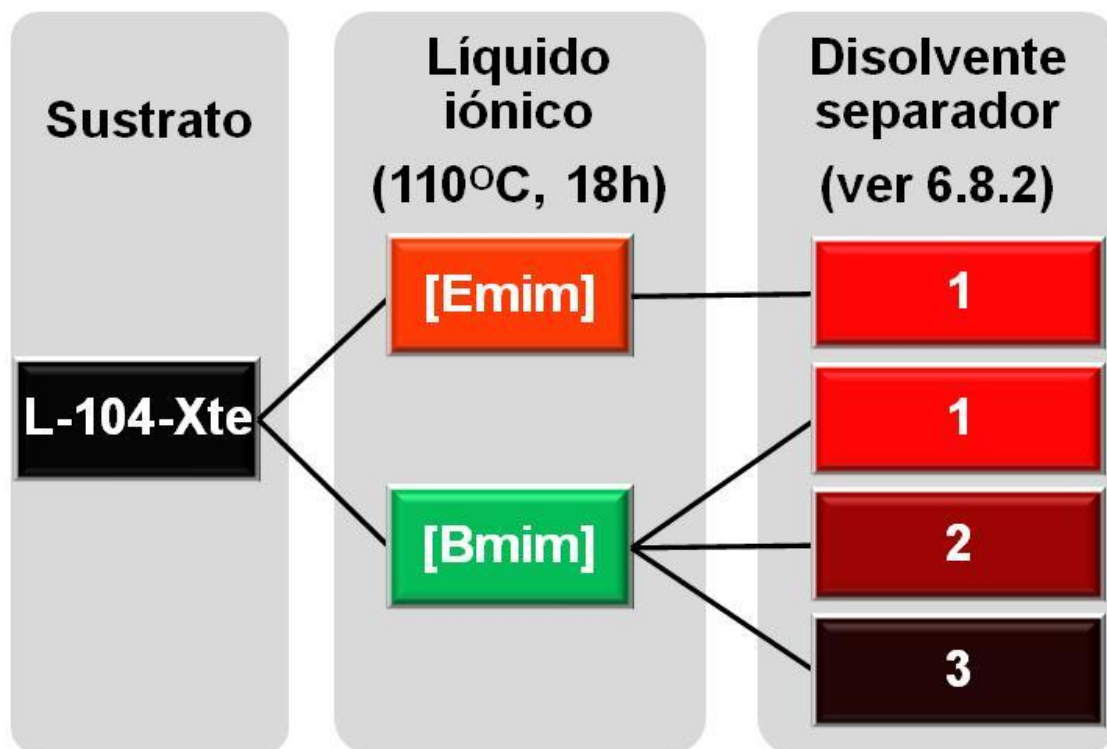


Figura 4A. Pretratamiento con líquidos iónicos aplicado sobre **L-104-Xte**. Disolventes: (1) agua desionizada, (2) mezcla acetona-agua (1:1), (3) mezcla acetoniilo-agua (80:20).

Tabla 4A. Absorbancia de lignina soluble en **[Emim]**.

Muestra		Absorbanci a (L=240 nm)	ΔA	Absorbanci a lignina
Solución de lignina soluble ^a		0.126	---	0.126
Solución [Emim] ^b		0.427	---	---
Solución /[Emim] ^b	Lignina soluble ^a	0.566	0.13 9	0.139

^a(5mg/mL); ^b(2.5 mg/mL)

5A. FIGURAS DE APOYO DE LA SECCIÓN 7.3.3.2.

En la **Figura 5A** se muestra el procedimiento experimental seguido para la evaluación del efecto del **[Emim]** sobre los sustratos de aserrín **L-104-Xte** y **L-104-Dte**, las condiciones se especificaron en la **Sección 6.8.2**. Los resultados de este experimento se encuentran reportados en las **Figuras 7.12, 7.13 y 7.18**.

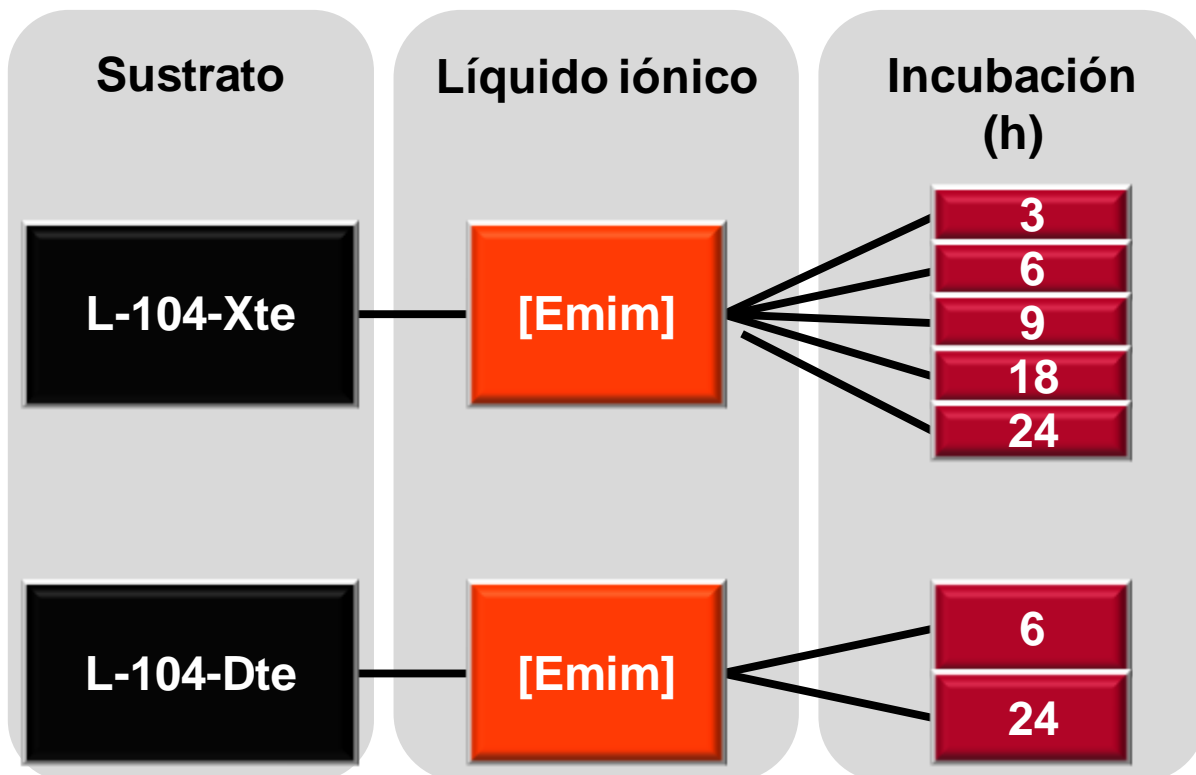


Figura 5A. Procedimiento en el pretratamiento con el líquido iónico acetato de 1-etil-3-metilimidazolio (**[Emim]**) sobre el aserrín Xochimilco (**L-104-Xte**) y el aserrín Durango (**L-104-Dte**).

10. REFERENCIAS

- Abril D. and Abril A. (2009). Ethanol from lignocellulosic biomass. *Cien. Inv. Agr.* 36(2): 177-190.
- Alder E.(1977). Lignin chemistry: past, present and future. *Wood Science and Technology.* 11(3): 169-218.
- Aracri E., Colom J.C., Vidal T. (2009). Application of laccase-natural mediator systems to sisal pulp: An effective approach to biobleaching or functionalizing pulp fibres?. *Bioresource Technology.* 100: 5911–5916.
- Asgher M., Kausara S., Bhattia H.N., Shahb S.A.H., Ali M. (2008) Optimization of medium for decolorization of Solar golden yellow R direct textile dye by *Schizophyllum commune* IBL-06. *International Biodeterioration & Biodegradation* 61: 189–193.
- Bernabé-Santiago R. (2008). Composición química de la madera de cinco especies de pino del nunicipio de Morelia, Michoacán, México. Tesis de licenciatura, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Michoacán, Morelia.
- Bourbonnais R., Paice M.G., Freiermuth B., Bodie E., and Borneman S. (1997). Reactivities of Various Mediators and Laccases with Kraft Pulp and Lignin Model Compounds. *Applied and Environmental Microbiology,* 63(12): 4627–4632.
- Call H.P., Mücke I. (1997). History, overview and applications of mediated lignolyticsystems, especially laccase-mediator-systems (Lignozym®-process). *Journal of Biotechnology* 53: 163–202.
- Camarero S., Ibarra D., Martínez A.T., Romero J., Gutiérrez A., del Río J.C. (2007). Paper pulp delignification using laccase and natural mediators. *Enzyme and Microbial Technology,* 40:1264–1271.

- Chen Q., Marshall M.N., Geib S.M., Tien M., Richard T.L. (2012). Effects of laccase on lignin depolymerization and enzymatic hydrolysis of ensiled corn stover. *Bioresource Technology*, 117: 186–192.
- Claus H. (2003). Laccases and their occurrence in prokaryotes. *Arch. Microbiol.*, 179 : 145–150.
- Cox B.J., Jia S., Zhang Z.C., Ekerdt J.G. (2011). Catalytic degradation of lignin model compounds in acidic imidazolium based ionic liquids: Hammett acidity and anion effects. *Polymer Degradation and Stability*. 96: 426-431.
- Cui F. and Dolphin D. (1991). Veratryl Alcohol as a Mediator in Lignin Model Compound Biodegradation. *Holzforschung*, 45: 31-35.
- Da Re V., Papinutti L., Villalba L., Forchiassin F., Levin L. (2008). Preliminary studies on the biobleaching of loblolly pine Kraft pulp with *Trametes trogii* crude extracts. *Enzyme and Microbial Technology*, 43: 164–168.
- Dávila G., y Vázquez R. (2006). Enzimas ligninolíticas fúngicas para fines ambientales. *Mensaje Bioquímico*, Vol XXX. Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, UNAM. pp: 29-55.
- Dadi A.P., Varanasi S., Schall C.A. (2006). Enhancement of Cellulose Saccharification Kinetics Using an Ionic Liquid Pretreatment Step. Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com). DOI: 10.1002/bit.21047
- Dodd D. and Cann I.O. (2009). Enzymatic deconstruction of xylan for biofuel production. *GCB Bioenergy*, 1: 2–17.
- Doherty T.V., Mora-Pale M., Foley S.E., Robert J.C., Linhardt. and Dordick J.S. (2010). Ionic liquid solvent properties as predictors of lignocellulose pretreatment efficacy, *Green Chem.*, 12:1967–1975.
- Domínguez-Domínguez M.M., Álvarez-Castillo A., Teodoro Castrejón-Rosales T., Granados-Baeza J.M., Hernández Campos F.J., Alcalá-Octaviano V.H.,
- Dhouib A., Hamza M., Zouari H., Mechichi T., H'midi R., MarLabat M., Martínez, M.J., and Sayadi S. (2005). Autochthonous fungal strains with high ligninolytic activities from Tunisian biotopes. *African Journal of Biotechnology*, 4 (5): 431-436.

- Garcia-Rivero M. (1996). Decoloración de colorantes azo y trifenilmetano por *Phanerochaete chrysosporium* por fermentación en medio sólido. Tesis de maestría, UAM-I, México, D.F.
- Giardina P., Faraco V., Pezzella C., Piscitelli A., Vanhulle S., Sannia G. (2010). Laccases: a never-ending story. *Cell. Mol. Life Sci.*, 67:369–385.
- Gold. M.H. and Glenn J.K. (1988). Manganese Peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*. *Methods in enzymology*, 161: 258-264.
- Ghose T.K. (1987). Measurement of cellulase activities. *Pure & Appl. Chem.*, 59(2): 257—268, 1987.
- Hames B., Ruiz R., Scarlata C., J. Sluiter J.B., Sluiter A. and Templeton D. (2008). Determination, of structural carbohydrates and lignin in biomass. NREL/TP-510-42618. National Renewable. Energy Laboratory, Golden, CO.
- Hames B., Ruiz R., Scarlata C., J. Sluiter J.B., Sluiter A. and Templeton D. (2008). Preparation of Samples for Compositional Analysis. NREL/TP-510-42620. National Renewable. Energy Laboratory, Golden, CO.
- Hames B., Ruiz R., Scarlata C., J. Sluiter J.B., Sluiter A. and Templeton D. (2008). Biomass and Total Dissolved Solids in Liquid Process Samples. NREL/TP-510-42621. National Renewable. Energy Laboratory, Golden, CO.
- Hames B., Ruiz R., Scarlata C., J. Sluiter J.B., Sluiter A. and Templeton D. (2008). Determination of Protein Content in Biomass. NREL/TP-510-42625. National Renewable. Energy Laboratory, Golden, CO.
- Hartman J. (2006). Hemicellulose as barrier material. Tesis de licenciatura. Royal Institute of Thecnologye, Suecia, Estocolmo.
- Hatfield R. and Vermerris W. (2001). Lignin formation in plants. The dilemma of linkage specificity. *Plant Physiology*, 126: 1351–1357.
- Hofrichter M., Vares K., Scheibner K., Galkin S., Sipilä J., Hatakka A. (1999). Mineralization and solubilization of synthetic lignin by manganese peroxidases from *Nematoloma frowardii* and *Phlebia radiata*. *Journal of Biotechnology*, 67: 217–228.

- Hong L.S., Ibrahim D. and Omar I.C. (2010). Microscopic Studies Of Oil Palm Frond During Processing For Saccharification. *The Internet Journal of Bioengineering*, 4(2), DOI: 10.5580/1f4e.
- Husain Q. (2006). Potential Applications of the Oxidoreductive Enzymes in the decolorization and detoxification of Textile and other synthetic dyes from Polluted Water: A Review. *Critical Reviews in Biotechnology*, 26:201–221.
- Ibarra D., Viviana Köpcke V. and Ek M. (2009). Exploring enzymatic treatments for the production of dissolving grade pulp from different wood and non-wood paper grade pulps. *Holzforschung*, 63: 721–730.
- INEGI (2008). Agenda Estadística de los Estados Unidos Mexicanos. http://www.inegi.gob.mx/prod_serv/contenidos/espanol/bvinegi/productos/integracion/pais/agenda/2008/Agenda_2008.pdf Consultado: Noviembre de 2010.
- Iranmahboob J., Farhad Nadima F. and Monemi S. (2002). Optimizing acid-hydrolysis: a critical step for production of ethanol from mixed wood chips. *Biomass and Bioenergy* 22: 401–404.
- Janga K.K., Hägg M.B. and Moe S.T. (2012). Influence of acid concentration, temperature, and time on decrystallization in two-stage concentrated sulfuric acid hydrolysis of pinewood and aspen wood: a statistical approach. *BioResources*, 7(1): 391-411.
- Kaparaju P., Serrano M., Thomsen A.B., Kongjan P. Angelidaki I. (2009) Bioethanol, biohydrogen and biogas production from wheat straw in a biorefinery concept. *Bioresource Technology* 100: 2562–2568.
- Keey R. B. (2005). Colour development on drying. *Maderas, ciencia y tecnología*. 7 (1): 3-16.
- Koroleva O.V., Stepanova E. V., Gavrilova V.P., Yakovleva N. S., Landesman E.O., Yavmetdinov I.S. and Yaropolov A.I. (2002). Lactase and Mn-Peroxidase Production by *Coriolus hirsutus* Strain 075 in a Jar Fermentor *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 93(5) 449-455.
- Kubo S., Hashida K., Yamada T., Hishiyama S., Magara K, Kishino M., Ohno H., and Hosoya S.(2008). A Characteristic Reaction of Lignin in Ionic Liquids,

Glycelol Type Enol-Ether as the Primary Decomposition Product of β -O-4 Model Compound. *Journal of Wood Chemistry and Technology*, 28: 84–96.

- Kumakura, M., Kaetsu, I. Effect of radiation pretreatment of bagasse on enzymatic and acid hydrolysis. *Biomass* 1983, 3, 199-208.
- Lee J. (1997). Biological conversion of lignocellulosic biomass to ethanol. *Journal of Biotechnology*, 56: 1–24.
- Lee S.H., Doherty T.V., Linhardt R.J., Dordick J.S. (2009). Ionic liquid-mediated selective extraction of lignin from wood leading to enhanced enzymatic cellulose hydrolysis. *Biotechnology and Bioengineering*. 102: 1368-1377.
- López J., Soto N.O., Rutiaga O.M., Medrano H., Arévalo K. (2009). Optimización del proceso de obtención enzimática de azúcares fermentables a partir de aserrín de pino. *Rev. Int. Contam. Ambient.* 25: 95-102.
- Malström K., Savolainen J. y Terho E. O. (1999). Allergic alveolitis from pine sawdust. *Allergy* 54: 526-533.
- Martin, S., Akin, D.E. (1988). Effect of phenolic monomers on the growth and β -glucosidase activity of *Bacteroides ruminicola* and on the carboxymethylcellulase, β -glucosidase, and xylanase activities of *Bacteroides succinogenes*. *Appl. Environ. Microbiol.* 54: 3019–3022.
- Mena-Martinez M.E. (2009). Síntesis enzimática de biopolímeros en líquidos iónicos. Tesis de maestría, UNAM, México, D.F.
- Mendoça R., Guerra A. and Ferraz A. (2002). Delignification of *Pinus taeda* wood chips treated with *Ceriporiopsis subvermispora* for preparing high-yield kraft pulps. *Chem Technol Biotchnol*, 77: 411-418.
- Mesa-Garriga L., González-Suárez E., González Cortes M., Lopretti M. y Castro-Galiano E. (2008). La producción de etanol a partir de residuos lignocelulósicos. *Estado del arte. Centro Azucar*, 2: 34-42.
- Mester T. and Tien M. (2000). Oxidation mechanism of ligninolytic enzymes involved in the degradation of environmental pollutants. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 46: 51-59.
- Miller G. L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*. 31: 426-428.

- Moilanen U., Kellock M., Galkin S. and Viikari L. (2011). The laccase-catalyzed modification of lignin for enzymatic hydrolysis. *Enzyme and Microbial Technology*, 49: 492–498.
- Mosier, N., Hendrickson, R., Ho, N., Sedlak, M., Ladisch, M.R. (2005). Optimization of pH controlled liquid hot water pretreatment of corn stover. *Bioresource Technol.* 96: 1986-1993.
- Neutelings G. (2011). Lignin variability in plant cell walls: Contribution of new models. *Plant Science*, 181: 379–386.
- Núñez-Alcántara F. (1997). Biomasa para la producción de combustibles y compuestos orgánicos por métodos químicos y electroquímicos. Tesis de licenciatura, UNAM, México, D.F.
- Nuñez C. E. (2008). Textos técnicos. Madera y pulpa. Sitio personal del autor. <http://www.cenunez.com.ar/articulos.php?cid=2>. Consultado 15/08/12.
- Papinutti V.L., Luis Alberto Diorio L.A., Forchiassin F. (2003). Degradación de madera de álamo por *Fomes sclerodermeus*: producción de enzimas en aserrín de
- Pu Y., Nan Jiang N. and Ragauskas A.J. (2007). Ionic Liquid as a Green Solvent for Lignin. *Journal of Wood Chemistry and Technology*, 27: 23–33.
- Redding A.P., Wang Z., Keshwani D.R. and Cheng J.J. (2011). High temperature dilute acid pretreatment of coastal Bermuda grass for enzymatic hydrolysis. *Bioresource Technology* 102: 1415–1424.
- Ruel K., Chevalier-Billosta V., Guillemain F., Berrio-Sierra J. and Joseleau J.P. (2006). The wood cell wall at the ultrastructural scale formation and topochemical organization. *Maderas. Ciencia y tecnología*, 8(2): 107-116.
- SCAN-CM 49:03. (2003). Wood chips for pulp production and pulp. Content of acetone-soluble matter. *Scandinavian Pulp, Paper and Board Testing Committee*.
- Saha, B.C., Cotta, M.A. Enzymatic saccharification and fermentation of alkaline peroxide pretreated rice hulls to ethanol. *Enzyme Microb. Tech.* 2007, 41, 528-532.

- Sánchez C. (2009). Lignocellulosic residues: Biodegradation and bioconversion by fungi. *Biotechnology Advances* 27: 185–194.
- Santos R.B., Lee J.M., Jameel H., Chang H.M. and Lucia L.A. (2012). Effects of hardwood structural and chemical characteristics on enzymatic hydrolysis for biofuel production. *Bioresource Technology*, 110: 232–238.
- Sefara N.L. and Birkett M. (2004). Development of an alternative solvent to replace benzene in the determination of organic soluble extractives in wood. *African pulp and paper*. Online web site. (15/08/12).
http://www.tappsa.co.za/archive2/APPW_2004/Title2004/title2004.html.
- Shin W., Cho H.Y. and Cho N.S. (2006). Screening of new mediators for lignin degradation based on their electrochemical properties and interactions with fungal laccase. *Journal of Korea TAPPI*, 38(5): 1-8.
- Sievers C., Valenzuela-Olarte M.B., Marzialetti T., Musin I, Agrawal P.K. and Jones C.W. (2009). Ionic-Liquid-Phase Hydrolysis of Pine Wood. *Ind. Eng. Chem. Res.* 48: 1277–1286.
- Silverstein, R.A., Chen, Y., Sharma-Shivappa, R.R., Boyette, M.D., Osborne, J. A comparison of chemical pretreatment methods for improving saccharification of cotton stalks. *Bioresource technol.* 2007, 98, 3000-3011.
- Sluiter J.B., Ruiz R.O., Scarlata C.J., Sluiter A.D. and Templeton D.W. (2010). Compositional Analysis of Lignocellulosic Feedstocks. 1. Review and Description of Methods. *J. Agric. Food Chem.*, 58: 9043–9053.
- Steinbüchel A., De Baets S., Vandamme, E.J. (2004) (eds.) *Biopolymers Vol. 6: Polysaccharides II: Polysaccharides from Eukaryotes*.
- SEMARNAP (2000). *Guía forestal*. Secretaría del Medio Ambiente Recursos Naturales y Pesca, México, D. F. 105 pp.
- Sun N., Rahman M., Qin Y., Maxim M.L., Rodríguez H. and Robin D. Rogers R.D. (2009). Complete dissolution and partial delignification of wood in the ionic liquid 1-ethyl-3-methylimidazolium acetate. *Green Chem.*, 2009, 11, 646–655.
- Talebnia F., Karakashev D., Angelidaki I. (2010). Production of bioethanol from wheat straw: an overview on pretreatment, hydrolysis and fermentation. *Bioresource Technology* 101: 4744-4753.

- Taherzadeh M. and Karimi K. (2008). Pretreatment of lignocellulosic wastes to improve ethanol and biogas production: A Review. *Int. J. Mol. Sci.*, 9: 1621-1651.
- Tapia-Picazo J.C. (2011). Estudio de la cinética de la hidrólisis ácida del bagazo de caña de azúcar sin pretratamiento para la obtención de azúcares reductores. *Rev. Iberoam. Polim.*, 12(3): 153-159.
- Tien M. and Kirk T.K. (1988). Lignin Peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium*. *Methods in enzymology*, 161: 238-250.
- Valls C., Vidal T. and Roncero M.B. (2010). The role of xylanases and laccases on hexenuronic acid and lignin removal. *Process Biochemistry*, 45: 425–430.
- Varnero M.T., Quiroz M.S. y Álvarez C.H. (2010). Utilización de residuos forestales lignocelulósicos para producción del hongo *Ostra* (*Pleurotus ostreatus*). *Información Tecnológica*, 21(2): 13-20.
- Villas B. S., Esposito E., Mitchell D. A. (2002). Microbial conversion of lignocellulosic residues for production of animal feeds. *Animal Feed Science and Technology*. 98:1-12.
- Vogel K.P., Dien B.S., Jung H.G., Casler M.D., Masterson S.D. and Mitchell R.B. (2011). Quantifying Actual and Theoretical Ethanol Yields for Switchgrass Strains Using NIRS Analyses. *Bioenerg. Res.*, 4: 96–110.
- Wan C. and Li Y. (2012).. *Biotechnology Advance*, disponible en línea: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2012.03.003>, (15/08/12)
- Weng J.K., Li X., Bonawitz N.D. and Chapple C. (2008). Emerging strategies of lignin engineering and degradation for cellulosic biofuel production. *Current Opinion in Biotechnology*, 19: 166–172.
- Widsten P. and Kandelbauer A. (2008). Laccase applications in the forest products industry: A review. *Enzyme and Microbial Technology*, 42: 293–307
- Wu H., Mora-Pale M., Miao J., Doherty T.V., Linhardt R.J., Dordick J.S. (2011). Facile Pretreatment of Lignocellulosic Biomass at High Loadings in Room Temperature Ionic Liquids. *Biotechnology and Bioengineering*, 30(30)1-11.

- Ximenes E., Kima Y., Mosiera N., Diend B., Ladischa M. (2010). Inhibition of cellulases by phenols. *Enzyme Microb. Technol.* 46: 170–176.
- Yang F., Li L., Li Q., Tan W., Liu W., Xian M. (2010). Enhancement of enzymatic in situ saccharification of cellulose in aqueous-ionic liquid media by ultrasonic intensification. *Carbohydrate Polymers*, 81: 311–316.
- Zhou Y., Stuart-Williams H., Farquhar G.D. and Hocart C.H. (2010). The use of natural abundance stable isotopic ratios to indicate the presence of oxygen-containing chemical linkages between cellulose and lignin in plant cell walls. *Phytochemistry*, 71: 982–993.

