



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA

**CARACTERIZACIÓN DE CÓCTELES ENZIMÁTICOS
CELULOLÍTICOS COMERCIALES Y SU POTENCIAL EN
LA PRODUCCIÓN DE JARABES AZUCARADOS**

TESIS
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA DE ALIMENTOS

PRESENTA:
ERIKA MÉNDEZ QUERO



MÉXICO, D.F.

2014.



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 Aburto Anell Jorge Arturo

VOCAL: Profesora Rodríguez Penagos Mireya

SECRETARIO: Profesora Rodríguez Sanoja Romina Ma de la Paz

SUPLENTE 1: Profesora Peña Montes Carolina

SUPLENTE 2: Profesor Hernández Meléndez Óscar

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: INSTITUTO MEXICANO DEL PETRÓLEO.

ASESOR DEL TEMA:

Dr. Jorge Arturo Aburto Anell

SUSTENTANTE:

Erika Méndez Quero

ÍNDICE

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	2
1. ANTECEDENTES	5
1.1 Biocombustibles.....	5
1.1.1 Ventajas del uso de biocombustibles.....	7
1.1.2 Desventajas del uso de biocombustibles.....	7
1.1.3 Tipos de biocombustibles.....	9
1.2 Bioetanol.....	11
1.2.1 Ventajas del uso de bioetanol.....	13
1.2.2 Desventajas del uso de bioetanol.....	13
1.2.3 Bioetanol en México y en el mundo.....	14
1.2.4 Alternativas para la producción de bioetanol en México.....	16
1.2.5 Pasto Taiwán.....	16
1.2.6 Bagazo de caña.....	17
1.2.7 Residuos de malta.....	19
1.3 Biomasa lignocelulósica.....	20
1.3.1 Celulosa.....	21
1.3.2 Hemicelulosa.....	23
1.3.3 Lignina.....	24
1.4 Proceso para la obtención de bioetanol a partir de la biomasa lignocelulósica.....	26
1.5 Pretratamiento.....	26
1.5.1 Tipos de pretratamientos.....	28
1.5.1.1 Pretratamientos físicos.....	28
1.5.1.2 Pretratamientos químicos.....	29
1.5.1.3 Pretratamientos fisicoquímicos.....	31
1.5.1.4 Pretratamientos biológicos.....	32
1.6 Hidrólisis enzimática.....	33
1.7 Fermentación.....	37

1.7.1 Sacarificación y Fermentación Simultáneas (SSF).....	38
1.7.2 Sacarificación y Fermentación Separadas (SHF).....	39
2. OBJETIVOS	40
2.1 Objetivo General.....	40
2.2 Objetivos Particulares.....	40
3. HIPÓTESIS	40
4. JUSTIFICACIÓN	41
5. DIAGRAMAS DE ACTIVIDADES	42
5.1 Cócteles enzimáticos comerciales E9 y E10.....	42
5.2 Materiales Lignocelulósicos.....	43
6. METODOLOGÍA	44
6.1 Determinación de Azúcares Reductores (Método DNS).....	44
6.2 Determinación de Azúcares Totales (Método Fenol-Sulfúrico).....	45
6.3 Determinación de Proteína (Método de Bradford).....	47
6.4 Determinación de Actividades Enzimáticas.....	49
6.4.1 Actividad de Celulasas.....	49
6.4.2 Actividad de Endocelulasas.....	50
6.4.3 Actividad de Exocelulasas.....	52
6.4.4 Actividad de β -glucosidasas.....	54
6.4.5 Actividad de Xilanasas.....	55
6.4.6 Progreso de reacción de las Actividades Enzimáticas.....	56
6.4.7 Influencia del pH en las Actividades Enzimáticas.....	58
6.4.8 Influencia de la Temperatura en las Actividades Enzimáticas.....	58
6.4.9 Resistencia enzimática a la inactivación térmica.....	58
6.4.10 Inhibición por Substrato.....	59
6.4.11 Inhibición por Producto.....	59
6.5 Tratamiento de las Muestras.....	60
6.5.1 Muestras.....	60
6.5.2 Pretratamiento.....	60
6.5.3 Hidrólisis Enzimática.....	61

6.5.4	Cuantificación e Identificación de Azúcares mediante Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (HPLC).....	62
7.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	65
7.1	Azúcares Totales, Azúcares Reductores y Cantidad de Proteína en los Cócteles Enzimáticos Comerciales E9 y E10.....	65
7.2	Determinación de las diferentes Actividades Enzimáticas para los Cócteles Enzimáticos Comerciales E9 y E10.....	67
7.2.1	Actividad Enzimática de Celulasas (FPU).....	67
7.2.2	Actividad Enzimática de Endocelulasas.....	68
7.2.3	Actividad Enzimática de Exocelulasas.....	70
7.2.4	Actividad Enzimática de β -glucosidasas.....	70
7.2.5	Actividad Enzimática de Xilanasas.....	71
7.3	Determinación del progreso de reacción de los cócteles enzimáticos comerciales E9 y E10.....	72
7.3.1	Progreso de reacción de la Actividad Enzimática de Celulasas.....	73
7.3.2	Progreso de reacción de la Actividad Enzimática de Endocelulasas.....	74
7.3.3	Progreso de reacción de la Actividad Enzimática de Exocelulasas.....	75
7.3.4	Progreso de reacción de la Actividad Enzimática de β -glucosidasas.....	76
7.3.5	Progreso de reacción de la Actividad Enzimática de Xilanasas.....	77
7.4	Influencia del pH en las diferentes Actividades Enzimáticas de los Cócteles Enzimáticos Comerciales E9 y E10.....	79
7.4.1	Influencia del pH en la Actividad Enzimática de Celulasas.....	80
7.4.2	Influencia del pH en la Actividad Enzimática de Endocelulasas.....	81
7.4.3	Influencia del pH en la Actividad Enzimática de Exocelulasas.....	82
7.4.4	Influencia del pH en la Actividad Enzimática de β -glucosidasas.....	83
7.4.5	Influencia del pH en la Actividad Enzimática de Xilanasas.....	84
7.5	Influencia de la Temperatura en las diferentes Actividades Enzimáticas de los Cócteles Enzimáticos Comerciales E9 y E10.....	86
7.5.1	Influencia de la Temperatura en la Actividad Enzimática de Celulasas.....	86

7.5.2	Influencia de la Temperatura en la Actividad Enzimática de Endocelulasas.....	87
7.5.3	Influencia de la Temperatura en la Actividad Enzimática de Exocelulasas.....	88
7.5.4	Influencia de la Temperatura en la Actividad Enzimática de β -glucosidasas.....	89
7.5.5	Influencia de la Temperatura en la Actividad Enzimática de Xilanasas.....	91
7.6	Resistencia enzimática a la inactivación térmica de los Cócteles Enzimáticos Comerciales E9 y E10.....	92
7.7	Efecto de Inhibidores en los Cócteles Enzimáticos Comerciales E9 y E10.....	94
7.7.1	Inhibición por Substrato en los Cócteles Enzimáticos Comerciales E9 y E10.....	94
7.7.2	Inhibición por Producto en los Cócteles Enzimáticos Comerciales E9 y E10.....	96
7.8	Tratamiento de la Muestra.....	99
7.8.1	Azúcares Totales del Licor después de Pretratamiento Básico-Oxidante para los tres Materiales.....	100
7.8.2	Hidrólisis Enzimática con los Cócteles Enzimáticos Comerciales E9 y E10.....	102
7.8.3	Grados de Polimerización de los 3 Residuos Lignocelulósicos con los dos los Cócteles Enzimáticos Comerciales E9 y E10.....	105
7.8.4	Cuantificación e Identificación de Azúcares mediante HPLC.....	107
7.8.5	Hidrólisis Enzimática con Variación de Temperaturas y Tiempos usando el Cóctel Enzimático Comercial E9.....	109
7.8.6	Grados de Polimerización de los 3 Residuos Lignocelulósicos con el Cóctel Enzimático Comercial E9 usando la Hidrólisis Enzimática con modificaciones.....	114
7.8.7	Cuantificación e Identificación de Azúcares mediante HPLC, después de la Hidrólisis Enzimática con modificaciones.....	118

8. CONCLUSIONES	121
9. BIBLIOGRAFÍA	122
10. ANEXOS	135
10.1 Anexo A. Elaboración de Curva Patrón de Glucosa para el Método DNS.....	135
10.2 Anexo B. Elaboración de Curva Patrón de Glucosa para el Método Fenol-Sulfúrico.....	136
10.3 Anexo C. Elaboración de Curva Patrón de Albúmina de Suero Bovina para el Método de Bradford.....	138
10.4 Anexo D. Cálculos para la cantidad de Buffer y de Enzima necesarios para la Hidrólisis Enzimática.....	139
10.5 Anexo E. Curvas de Calibración para el Método HPLC con Estándar Interno de los diferentes Azúcares.....	141
10.6 Anexo F. Cromatogramas de los 3 Materiales Lignocelulósicos.....	144

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Rutas tecnológicas para la producción de Bioetanol.....	12
Figura 2. Exportaciones de Bioetanol en Brasil 2009-2013 (Millones de Litros).....	14
Figura 3. Pasto Taiwán.....	17
Figura 4. Producción en México de Bagazo de Caña en la zafra 2004/05.....	19
Figura 5. Estructura de la biomasa lignocelulósica.....	21
Figura 6. Estructura de la cadena de celulosa.....	22
Figura 7. Estructura de la hemicelulosa.....	23
Figura 8. Estructura de la lignina de una madera suave.....	24
Figura 9. Monolignoles más comunes encontrados en los bloques de construcción de la lignina.....	25
Figura 10. Pretratamiento de los materiales lignocelulósicos.....	27
Figura 11. Esquema de la hidrólisis de celulosa a glucosa.....	35
Figura 12. Modelo tridimensional de una celobiohidrolasa actuando sobre una cadena de celulosa.....	36
Figura 13. Reacción de reducción del ácido 3,5-dinitrosalicílico al 3-amino-5-nitrosalicílico.....	44
Figura 14. Reacción de hidrólisis y condensación de carbohidratos.....	46
Figura 15. Determinación de la actividad FPU de celulasas de los cócteles enzimáticos comerciales E9 y E10.....	68
Figura 16. Determinación de la actividad enzimática de endocelulasas de los cócteles enzimáticos comerciales E9 y E10.....	69
Figura 17. Progreso de reacción de la actividad de celulasas para ambos cócteles enzimáticos comerciales (E9 y E10).....	73
Figura 18. Progreso de reacción de la actividad de endocelulasas para ambos cócteles enzimáticos comerciales (E9 y E10).....	74
Figura 19. Progreso de reacción de la actividad de exocelulasas para ambos cócteles enzimáticos comerciales (E9 y E10).....	75
Figura 20. Progreso de reacción de la actividad de β -glucosidasas para los cócteles enzimáticos comerciales E9 y E10.....	77

Figura 21. Progreso de reacción de la actividad de xilanasas para ambos cócteles enzimáticos comerciales (E9 y E10).....	78
Figura 22. Variación de la actividad enzimática con el pH.....	79
Figura 23. Influencia del pH en la actividad enzimática de celulasas para los cócteles enzimáticos comerciales E9 y E10.....	81
Figura 24. Influencia del pH en la actividad enzimática de endocelulasas para los cócteles enzimáticos comerciales (E9 y E10).....	82
Figura 25. Influencia del pH en la actividad enzimática de exocelulasas para los cócteles enzimáticos comerciales (E9 y E10).....	83
Figura 26. Influencia del pH en la actividad enzimática de β -glucosidasas para el cóctel enzimático comercial E9.....	83
Figura 27. Influencia del pH en la actividad enzimática de β -glucosidasas para el cóctel enzimático comercial E10.....	84
Figura 28. Influencia del pH en la actividad enzimática de xilanasas para los cócteles enzimáticos comerciales (E9 y E10).....	85
Figura 29. Variación de la actividad enzimática con la Temperatura.....	86
Figura 30. Influencia de la Temperatura en la actividad enzimática de celulasas para los cócteles enzimáticos comerciales E9 y E10.....	87
Figura 31. Influencia de la Temperatura en la actividad enzimática de endocelulasas para los cócteles enzimáticos comerciales (E9 y E10).....	88
Figura 32. Influencia de la Temperatura en la actividad enzimática de exocelulasas para los cócteles enzimáticos comerciales (E9 y E10).....	89
Figura 33. Influencia de la Temperatura en la actividad enzimática de β -glucosidasas para el cóctel enzimático comercial E9.....	90
Figura 34. Influencia de la Temperatura en la actividad enzimática de β -glucosidasas para el cóctel enzimático comercial E10.....	90
Figura 35. Influencia de la Temperatura en la actividad enzimática de xilanasas para los cócteles enzimáticos comerciales (E9 y E10).....	91

Figura 36. Resistencia enzimática a la inactivación térmica de los cócteles enzimáticos comerciales E9 y E10.....	93
Figura 37. Inhibición por Substrato del cóctel enzimático comercial E9 en la actividad enzimática de β -glucosidasas.....	95
Figura 38. Inhibición por Substrato del cóctel enzimático comercial E10 en la actividad enzimática de β -glucosidasas.....	96
Figura 39. Inhibición por Producto del cóctel enzimático comercial E9 en la actividad enzimática de β -glucosidasas.....	97
Figura 40. Inhibición por Producto del cóctel enzimático comercial E10 en la actividad enzimática de β -glucosidasas.....	98
Figura 41. Azúcares Totales presentes en los tres materiales después del pretratamiento básico-oxidante.....	101
Figura 42. Asociación de la lignina con polisacáridos.....	101
Figura 43. Azúcares Totales presentes en los materiales después de la hidrólisis enzimática con los cócteles enzimáticos comerciales E9 y E10.....	103
Figura 44. Azúcares Reductores presentes en los materiales después de la hidrólisis enzimática con los cócteles enzimáticos comerciales E9 y E10.....	104
Figura 45. Grados de Polimerización del Pasto Taiwán, el Bagazo de Caña y los Residuos de Malta con los cócteles enzimáticos comerciales E9 y E10.....	106
Figura 46. Comparación de la hidrólisis normal del Pasto Taiwán con la hidrólisis modificada para el cóctel E9.....	110
Figura 47. Comparación de la hidrólisis normal del Bagazo de Caña con la hidrólisis modificada para el cóctel E9.....	111
Figura 48. Comparación de la hidrólisis normal de los Residuos de Malta con la hidrólisis modificada para el cóctel E9.....	112
Figura 49. Comparación de los Grados de Polimerización obtenidos con la hidrólisis normal y con modificaciones usando el cóctel E9 para los 3 materiales.....	114

Figura 50.	Difractograma obtenido del Pasto Taiwán.....	115
Figura 51.	Difractograma obtenido del Bagazo de Caña.....	116
Figura 52.	Difractograma obtenido de los Residuos de Malta.....	116
Figura 53.	Estructura del Bagazo de Caña en ESEM.....	117
Figura 54.	Estructura del Pasto Taiwán en ESEM.....	117
Figura 55.	Estructura de los Residuos de Malta en ESEM	118
Figura 56.	Curva Patrón elaborada para el Método de DNS.....	136
Figura 57.	Curva Patrón elaborada para el Método de Fenol-Sulfúrico.....	137
Figura 58.	Curva Patrón elaborada para el Método de Bradford.....	139
Figura 59.	Curva de calibración de glucosa para el Método HPLC.....	141
Figura 60.	Curva de calibración de xilosa para el Método HPLC.....	141
Figura 61.	Curva de calibración de sacarosa para el Método HPLC.....	142
Figura 62.	Curva de calibración de celobiosa para el Método HPLC.....	142
Figura 63.	Curva de calibración de fructosa para el Método HPLC.....	143
Figura 64.	Curva de calibración de maltosa para el Método HPLC.....	143
Figura 65.	Cromatograma del jarabe obtenido a partir de la hidrólisis enzimática con el cóctel enzimático comercial E9 para el Pasto Taiwán.	144
Figura 66.	Cromatograma del jarabe obtenido a partir de la hidrólisis enzimática con el cóctel enzimático comercial E10 para el Pasto Taiwán.....	145
Figura 67.	Cromatograma del jarabe obtenido a partir de la hidrólisis enzimática con el cóctel enzimático comercial E9 para el Bagazo de Caña.....	146
Figura 68.	Cromatograma del jarabe obtenido a partir de la hidrólisis enzimática con el cóctel enzimático comercial E10 para el Bagazo de Caña	147
Figura 69.	Cromatograma del jarabe obtenido a partir de la hidrólisis enzimática con el cóctel enzimático comercial E9 para los Residuos de Malta.....	148

Figura 70. Cromatograma del jarabe obtenido a partir de la hidrólisis enzimática con el cóctel enzimático comercial E10 para los Residuos de Malta	149
---	-----

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Balance comunitario del sector del bioetanol desde 2006 a la actualidad.....	15
Tabla 2. Pretratamientos físicos de los residuos lignocelulósicos.....	28
Tabla 3. Pretratamientos químicos de los residuos lignocelulósicos.....	29
Tabla 4. Pretratamientos físico-químicos de los residuos lignocelulósicos.....	31
Tabla 5. Pretratamientos biológicos de los residuos lignocelulósicos.....	32
Tabla 6. Condiciones del Método de HPLC.....	63
Tabla 7. Contenido de Azúcares Totales, Azúcares Reductores y Proteína en los cócteles enzimáticos comerciales E9 y E10.....	65
Tabla 8. Actividades FPU volumétrica y específica de celulasas para los cócteles enzimáticos comerciales E9 y E10.....	68
Tabla 9. Actividades enzimáticas volumétricas y específicas de endocelulasas para los cócteles enzimáticos comerciales E9 y E10.....	69
Tabla 10. Actividades enzimáticas volumétricas y específicas de exocelulasas para los cócteles enzimáticos comerciales E9 y E10.....	70
Tabla 11. Actividades enzimáticas volumétricas y específicas de β -glucosidasas para los cócteles enzimáticos comerciales E9 y E10.....	71
Tabla 12. Actividades enzimáticas volumétricas y específicas de xilanasas para los cócteles enzimáticos comerciales E9 y E10.....	72
Tabla 13. Velocidades para las diferentes actividades enzimáticas determinadas en ambos cócteles enzimáticos (E9 y E10).....	78
Tabla 14. Valor de pH al cual se obtuvieron las máximas actividades enzimáticas para ambos cócteles enzimáticos comerciales (E9 y E10).....	85

Tabla 15. Temperatura a la cual se obtuvieron las máximas actividades enzimáticas para ambos cócteles enzimáticos comerciales (E9 y E10).....	91
Tabla 16. Humedad de los tres residuos lignocelulósicos determinada por el Método de Termobalanza.....	99
Tabla 17. Grados de polimerización de los tres materiales lignocelulósicos empleando los dos cócteles enzimáticos comerciales (E9 y E10).....	105
Tabla 18. Azúcares cuantificados e identificados mediante HPLC después de la hidrólisis enzimática con los cócteles E9 y E10 para el Pasto Taiwán.....	107
Tabla 19. Azúcares cuantificados e identificados mediante HPLC después de la hidrólisis enzimática con los cócteles E9 y E10 para el Bagazo de Caña.....	108
Tabla 20. Azúcares cuantificados e identificados mediante HPLC después de la hidrólisis enzimática con los cócteles E9 y E10 para los Residuos de Malta.....	109
Tabla 21. Comparación de los azúcares cuantificados e identificados mediante HPLC con las dos hidrólisis enzimáticas usando el cóctel E9 para el Pasto Taiwán.....	119
Tabla 22. Comparación de los azúcares cuantificados e identificados mediante HPLC con las dos hidrólisis enzimáticas usando el cóctel E9 para el Bagazo de Caña.....	119
Tabla 23. Comparación de los azúcares cuantificados e identificados mediante HPLC con las dos hidrólisis enzimáticas usando el cóctel E9 para los Residuos de Malta.....	120
Tabla 24. Datos para la elaboración de la curva patrón para el Método de DNS.....	135
Tabla 25. Datos para la elaboración de la curva patrón para el Método de Fenol-Sulfúrico.....	137

Tabla 26. Datos para la elaboración de la curva patrón para el Método de Bradford.....138

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

Å: Ångström	v: volumen
AR: Azúcares Reductores	
AT: Azúcares Totales	
E: Enzima	
ESEM: Microscopía Electrónica de Barrido	
FPU: Unidades Papel Filtro	
g: gramos	
h: hora	
IU: International Units	
Kg: kilogramo	
L: litro	
mg: miligramo	
min: minuto	
μmol: micromol	
mL: mililitro	
mm: milímetro	
mtra: muestra	
MW: Megawatt	
P: Proteína	
pNF: Paranitrofenol	
Pr: Producto	
θ: ángulo	
t: tonelada	
u.a.: unidad adimensional	

RESUMEN

El problema actual y creciente relacionado con la generación de emisiones de gases de efecto invernadero y la reducción de los mismos, ha obligado a la humanidad a tomar rutas alternas para su disminución, como la producción de biocombustibles. “Los biocombustibles son materiales capaces de liberar energía, obtenidos de la biomasa, o bien de materia orgánica proveniente de actividades como la agrícola, pecuaria, silvícola, acuacultura, algacultura, residuos de la pesca, domésticas, comerciales, industriales, de microorganismos, y de enzimas, así como sus derivados; son producidos por procesos tecnológicos sustentables que cumplen con las especificaciones y normas de calidad establecidas por la autoridad” (SAGARPA, 2013).

Es por ello que es importante el desarrollo u optimización de nuevas técnicas biotecnológicas y sustentables para la producción de biocombustibles como el bioetanol. Así, la presente tesis muestra los resultados de la caracterización cinética de dos diferentes cócteles enzimáticos comerciales (E9 y E10). Para ello, se determinó la actividad enzimática de cada cóctel en función de variables como la temperatura y pH, así como la determinación de la resistencia a la inactivación térmica y en presencia de inhibidores con el objeto de realizar una hidrólisis más eficiente y que involucre un menor costo en su uso.

De los ensayos realizados modificando todas las variables antes mencionadas, se busca obtener las condiciones experimentales en donde exista la mayor actividad enzimática para cada caso. A partir de ello, se empleará cada cóctel enzimático en el intervalo adecuado, tanto de pH como de temperatura, para que esos valores queden registrados y puedan ser empleados en el tratamiento de diferentes materiales lignocelulósicos.

Se determinaron las actividades enzimáticas de celulasas, endocelulasas, exocelulasas, β -glucosidasas y xilanasas para ambos cócteles, obteniendo actividades más altas para el cóctel enzimático E9 comparándolo con el cóctel enzimático E10.

INTRODUCCIÓN

El bioetanol es el biocombustible más común, representando más del 90% del total de biocombustibles empleados. Los más grandes productores a nivel mundial de bioetanol son Brasil (con etanol a partir de caña de azúcar) y Estados Unidos (con etanol a partir de maíz). El etanol es usado en pequeñas mezclas de 5 a 10% (v/v) con gasolina (E5, E10), aunque en Brasil, la gasolina debe contener un mínimo de 22% (v/v) de bioetanol (OECD/IEA, 2007).

Dadas las futuras tendencias del uso del bioetanol como un combustible para transporte y su demanda para una producción sostenible de energía, el uso de material lignocelulósico como materia prima para la producción limpia de etanol, parece ser una atractiva solución. Además, el bioetanol producido mediante residuos agrícolas ya existentes, evita el empleo de cultivos destinados a la alimentación (Singh *et al*, 2010).

Los materiales lignocelulósicos presentan una estructura compuesta principalmente por tres componentes (celulosa, hemicelulosa y lignina). En los procesos de degradación de materiales lignocelulósicos se pueden identificar algunos tratamientos comunes (pretratamiento, delignificación e hidrólisis) utilizados para la producción de azúcares fermentables. Estos tratamientos pueden ser físicos, químicos, enzimáticos o con microorganismos. Asimismo, la factibilidad de cada tratamiento depende del consumo de energía, selectividad, costos de procesos y velocidad de degradación (Sánchez, 2008).

La estructura química, el grado de entrecruzamiento de los componentes que forman los materiales lignocelulósicos y la composición de sus elementos principales, están relacionadas con el material de origen del cual proceden. Igualmente, la estructura de los materiales lignocelulósicos determina sus propiedades mecánicas, la resistencia al ataque de microorganismos, enzimas, agentes químicos y establece la dificultad de degradar este tipo de materiales. Por lo que se puede asegurar, que la naturaleza del sustrato y el método de

pretratamiento usado, influye sobre la eficiencia de degradación del material lignocelulósico cuando se utilizan enzimas (Singh *et al*, 2010).

Para la degradación biocatalítica, existe un gran espectro de enzimas degradadoras de polisacáridos que actúan en forma compleja (pectinasas, celulasas, oxidoreductasas y hemicelulasas). La acción de una enzima es restringida por la accesibilidad al sustrato. En el caso de las celulasas, disminuyen su acción sobre la celulosa por la presencia de otros polisacáridos. También es conocido que la combinación de enzimas degradadoras de polisacáridos actúa sinérgicamente en la degradación de la matriz de la pared celular (Beldman, 1984).

La velocidad y extensión de la hidrólisis de sustratos lignocelulósicos se ve influenciada no solamente por la eficiencia de las enzimas, sino también por las características fisicoquímicas y morfológicas, expresadas en la heterogeneidad de los sustratos lignocelulósicos. Por esto, se hace necesaria la utilización de sistemas muy selectivos (enzimas) para la degradación de este tipo de materiales. La hidrólisis enzimática puede ser una mejor alternativa que la hidrólisis ácida y tiene un potencial para el desarrollo y para mejoras de tecnologías tales como la producción etanol a partir de biomasa que puede ser competitivo con respecto otros combustibles (Martin y Thonson, 2007).

La naturaleza insoluble de la celulosa representa un reto para los sistemas de celulasas. Una característica general de la mayoría de las celulasas es su estructura modular que incluye generalmente dos módulos, uno catalítico y otro de unión al carbohidrato (CBMs). La presencia de estos CBMs es particularmente importante para el inicio y el posterior procesamiento de la celulosa llevado a cabo por las exoglucanasas (Lu-Chau y Pena, 2005).

Otra característica importante de las celulasas es su modo de acción sinérgico. Los sistemas enzimáticos de celulasas presentan una actividad enzimática colectiva mayor que la suma de las actividades individuales. Se conocen cuatro tipos de sinergismo:

- Sinergia endo-exo entre las endoglucanasas y exoglucanasas.
- Sinergia exo-exo entre exoglucanasas que procesan a la celulosa a partir de los extremos reductores y no reductores de la cadena de celulosa.
- Sinergia entre exoglucanasas y β -glucosidasas que remueven celobiosa como producto final de las dos primeras enzimas.
- Sinergia intramolecular entre los dominios catalíticos y los CBMs (Lu-Chau y Pena, 2005).

Compañías como Genecor International® y Novozymes Biotech®, han reportado desarrollos de tecnologías que han reducido los costos de celulasas desde 4.5 dólares por galón de etanol a 20 centavos por galón de etanol (Morreira, 2005).

1. ANTECEDENTES

1.1 BIOCOMBUSTIBLES

Los combustibles derivados del petróleo son reservas limitadas concentradas en ciertas regiones del mundo. El aumento dramático en el precio del petróleo, la naturaleza no renovable de los combustibles fósiles, las crecientes preocupaciones sobre el impacto ambiental, especialmente relacionadas con las emisiones de gases del efecto invernadero, y las consideraciones de salud y seguridad, han obligado a investigar nuevas fuentes de energía y maneras alternativas de alimentar al mundo de los vehículos de motor (Bocchini, 2011).

El término biocombustible se refiere a los combustibles sólidos, líquidos o gaseosos que son producidos predominantemente a partir de materias primas biorrenovables. Los biocombustibles líquidos son importantes para el futuro ya que reemplazarán a los combustibles provenientes del petróleo. Los biocombustibles, a diferencia del petróleo, no contaminan, se encuentran disponibles en diferentes localidades, son accesibles, sustentables y son seguros, ya que se obtienen de fuentes renovables (Demirbas, 2009).

En México, la ley en la materia, que es la Ley de Promoción y Desarrollo de los Biocombustibles, los define de la siguiente manera:

“Combustibles obtenidos de la biomasa provenientes de materia orgánica de las actividades, agrícola, pecuaria, silvícola, acuacultura, algacultura, residuos de la pesca, domésticas, comerciales, industriales, de microorganismos, y de enzimas, así como sus derivados, producidos, por procesos tecnológicos sustentables que cumplan con las especificaciones y normas de calidad establecidas por la autoridad”.

Ejemplos de biomasa empleada para producir biocombustibles son la caña de azúcar y su bagazo, las plantas oleaginosas, los desechos y componentes orgánicos así como los aceites de reúso (SAGARPA, 2011).

En general, los biocombustibles se dividen en tres grupos:

- Bioetanol
- Biodiesel
- Biogás

Existen globalmente dos combustibles líquidos biorrenovables para la transportación que pueden reemplazar a la gasolina y al diesel. Estos son el bioetanol y el biodiesel. El bioetanol es una buena alternativa de combustible ya que es producido casi por completo a partir de cultivos de alimentos. El biodiesel se ha convertido recientemente en una opción más atractiva debido a los beneficios ambientales. Se asume que el biodiesel es usado como un reemplazo del diesel proveniente de fósiles y el bioetanol es usado como un reemplazo de la gasolina (Demirbas, 2009).

Los dos biocombustibles más usados en el mundo son el bioetanol y el biodiesel. Se utilizan principalmente en los motores de vehículos como automóviles y camiones. El bioetanol generalmente se produce utilizando como materia prima la caña de azúcar, los cereales y el betabel (también llamado remolacha de azúcar). El biodiesel, que puede usarse en lugar del diesel convencional, se produce a partir de aceites vegetales o animales. Las especies más usadas para obtener biodiesel son la palma aceitera y la soya. El etanol representa cerca del 90% de la producción total de biocombustibles y el biodiesel el resto (Espinoza *et al*, 2009).

El biogás es una mezcla conformada principalmente por CH₄ (50%-70% v/v) y CO₂ (25%-40% v/v), que se genera por el proceso biológico de biodigestión anaerobia, que consta de una serie de reacciones bioquímicas en la que residuos orgánicos son degradados o consumidos por un conjunto de microorganismos. La acción de los microorganismos produce calor, mismo que se usa para mantener el proceso en su temperatura ideal (35°C). En el proceso también se generan efluentes líquidos y sólidos que pueden ser utilizados como fertilizante orgánico (Red Mexicana de Bioenergía, 2012).

1.1.1. VENTAJAS DEL USO DE BIOCOMBUSTIBLES

- ✓ Son renovables

Los biocombustibles son una alternativa conveniente frente a los combustibles fósiles en primer lugar porque son renovables. Proviene de materias primas agrícolas o ganaderas, que pueden cultivarse o criarse.

- ✓ Son más limpios

Una de sus grandes ventajas es que son más biodegradables que los combustibles fósiles, por lo que son potencialmente menos dañinos en caso de derrames. Adicionalmente, aunque la idea está todavía a debate, se cree que emiten menos elementos contaminantes a la atmósfera al momento de quemarse.

- ✓ Generan empleos

Son una alternativa para fomentar la inversión y el empleo en la agricultura y el campo. Algunos biocombustibles pueden emplear cultivos que se dan bien en tierras de baja productividad que actualmente están ociosas y, además, beneficiar a pequeños productores o cooperativas campesinas en condición de pobreza.

- ✓ Aprovechan materias tradicionalmente consideradas como desperdicio

La basura, las grasas animales o usadas y el excremento animal son materias primas para producir biocombustibles. Además, para el caso de la basura y los excrementos, su aprovechamiento evita que se emitan gases de invernadero a la atmósfera con un alto potencial de contaminación (SAGARPA, 2011).

1.1.2. DESVENTAJAS DEL USO DE BIOCOMBUSTIBLES

- × Balance energético y de contaminación atmosférica

Es motivo de debate qué tanta energía adicional aportan los biocombustibles; para obtener este balance es necesario calcular cuánta energía se debió invertir en su producción, desde el diesel que consumieron los tractores empleados en su cultivo

o en la producción de sus fertilizantes, hasta la energía consumida por la planta de procesamiento o su transporte al lugar final de su consumo.

Aunque son más limpios al quemarse, también hay dos posturas frente a qué tanto contaminan los biocombustibles cuando se compara la cantidad de gases de efecto invernadero emitida en el ciclo completo de producción y consumo con la que se requiere para procesar y transportar combustibles fósiles.

Para algunos autores este balance es todavía negativo y las tecnologías de producción de biocombustibles necesitan mejorar mucho. Para otros, en cambio, aunque no niegan el beneficio y la conveniencia de los avances tecnológicos futuros, los biocombustibles son un negocio rentable hoy.

Sin embargo, ambos bandos coinciden en que es necesario contar con fuentes alternativas de energía frente al agotamiento de las reservas de petróleo en el mundo, y que es necesario seguir experimentando y acumulando conocimientos en la producción de biocombustibles.

- × Efectos sobre la biodiversidad

Se ha señalado que la necesidad de contar con combustibles alternativos puede llevar a la ocupación de tierras boscosas o selváticas para la producción de cultivos energéticos.

En países como Malasia o Sumatra, grandes extensiones de tierra fueron deforestadas para plantar palma de aceite, materia prima de la producción de biodiesel. En estos casos no sólo se perdió la biodiversidad vegetal, sino que con ella se perdieron poblaciones de fauna local.

- × Efectos sobre el precio de los alimentos

Dedicar tierra cultivable a la producción de biocombustibles puede disminuir la destinada a producir alimentos para humanos y animales, impactando así su cantidad y elevando su precio.

Frente a ello, se están buscando nuevas formas de producir biocombustibles que no afecten la matriz alimentaria mediante la generación de tecnologías capaces de aprovechar desechos agrícolas y cultivos no destinados a la alimentación (SAGARPA, 2011).

1.1.3 TIPOS DE BIOCOMBUSTIBLES

Existen varios tipos de biocombustibles que se clasifican según la materia prima con que se producen y la tecnología que se emplea. Esta clasificación se realiza por generaciones que, hasta la fecha, son cuatro.

- **PRIMERA GENERACIÓN**

La materia prima es de procedencia agrícola. Se utilizan las partes alimenticias de las plantas con alto contenido en almidón, azúcares y aceites. Algunas de estas materias son la caña de azúcar, los granos de maíz, y diversos aceites: de semilla de girasol, de soya, de palma, de ricino, de semilla de algodón, de coco y de cacahuate. También se pueden utilizar grasas animales, aceites de desecho doméstico y desperdicios sólidos orgánicos.

En cuanto a la tecnología, para la producción de biocombustibles de primera generación se recurre a la fermentación (para azúcares y carbohidratos), transesterificación (para aceites y grasas), y la digestión anaerobia (para los desperdicios orgánicos).

A partir de los azúcares se obtiene etanol, metanol y n-butano; de los aceites resulta el biodiesel; y de la mezcla de gas natural y dióxido carbono de los desperdicios orgánicos se obtiene el biogás.

- ✓ Ventajas: su facilidad de procesamiento y sus bajas o nulas emisiones de gases de efecto invernadero, como son el monóxido de carbono (CO), metano (CH₄), óxido nitroso (N₂O), plomo (Pb₂) y ozono (O₃).
- ✗ Desventajas: el desvío de los recursos alimenticios hacia la producción de energéticos, lo cual resulta en el aumento de precios, por ejemplo.

- SEGUNDA GENERACIÓN

La materia prima de este tipo de biocombustibles son los residuos agrícolas o forestales compuestos por celulosa, por ejemplo la paja de trigo, el aserrín, el bagazo de la caña de azúcar, los tallos y las hojas del maíz, y las hojas y ramas secas de los árboles, entre otros.

Los procesos de producción son más complejos. Uno de ellos es el proceso GTL y proceso BTL, cuyas siglas en inglés provienen de “Gas To Liquids” y “Biomass To Liquids”. Estos procesos consisten en la gasificación del carbón y de la materia lignocelulósica de la biomasa, para obtener un combustible líquido, como el etanol. También se puede obtener el biodiesel a partir de algas, el bioetanol de la lignocelulosa de madera, paja y hierba, e incluso el biobutanol.

- ✓ Ventajas: Requieren menos recursos, desde agua y terrenos hasta fertilizantes y pesticidas para ser producidos; la energía obtenida es mucho mayor con respecto a los biocombustibles de primera generación; al disponer de más materias primas no comestibles, no habrá competencia con la industria alimenticia; pueden ser generados en terrenos no agrícolas y pueden servir para recuperar terrenos erosionados.
- ✗ Desventajas: Hay quienes consideran que los recursos dedicados a estos biocombustibles deberían destinarse a otras tecnologías más prometedoras, como la obtención de energía para la propia industria, alimentación animal o fabricación de materiales para construcción; además, las emisiones de gases de efecto invernadero durante el procesamiento de los insumos no disminuyen considerablemente en comparación de los de primera generación.

- TERCERA GENERACIÓN

Las materias primas son vegetales no alimenticios de crecimiento rápido y de alta densidad energética almacenada en sus componentes químicos. Se les denomina como “cultivos energéticos”. Algunos de estos insumos son los pastos perennes, árboles y plantas de crecimiento rápido, y las algas verdes y verdeazules. Los procesos continúan desarrollándose, pero ya se ha logrado producir biodiesel y etanol.

- ✓ Ventajas: La toma de CO₂ para la producción de los insumos y un balance positivo en la emisión de gases de efecto invernadero.
- ✗ Desventajas: El uso de tierras de cultivo de alimentos para sembrar las plantas, excepto las algas verdes.

- CUARTA GENERACIÓN

Estos biocombustibles se producen a partir de bacterias genéticamente modificadas. Se emplea dióxido de carbono o alguna otra fuente de carbono para la obtención del producto. Esta generación todavía se encuentra en desarrollo, pero por lo pronto se sabe que se puede obtener etanol (Servicios de Agua y Drenaje de Monterrey, 2011).

1.2 BIOETANOL

Como biocombustible el etanol es más puro que el empleado para los otros fines. Por ejemplo, mientras que la pureza del etanol o alcohol etílico para la medicina y las bebidas alcohólicas es de 96% (v/v), la del biocombustible debe ser del 99.5% al 99.9% (v/v). El etanol presenta algunas diferencias importantes con relación a los combustibles convencionales, derivados de petróleo. La principal de ellas, es la elevada concentración de oxígeno, que representa cerca del 35% de la masa de etanol. En general, las características del etanol permiten una combustión más limpia y un mejor desempeño de los motores (ciclo Otto), lo que conlleva a la reducción de las emisiones contaminantes.

Puede ser empleado directamente como combustible o como un añadido a la gasolina en distintas concentraciones. La mezcla más común es para oxigenar a la gasolina, en una concentración de alrededor de 5% (v/v), reemplazando a un oxigenante llamado éter metil ter-butílico (MTBE), que es altamente contaminante del suelo y del agua subterránea.

También se usa en otras concentraciones que van del 10% al 85% (v/v), pero en esos casos los vehículos deben contar con modificaciones especiales (vehículos *Flex Fuel*), debido a que el etanol puede corroer algunas partes plásticas de los sistemas de inyección en el vehículo (SAGARPA, 2011).

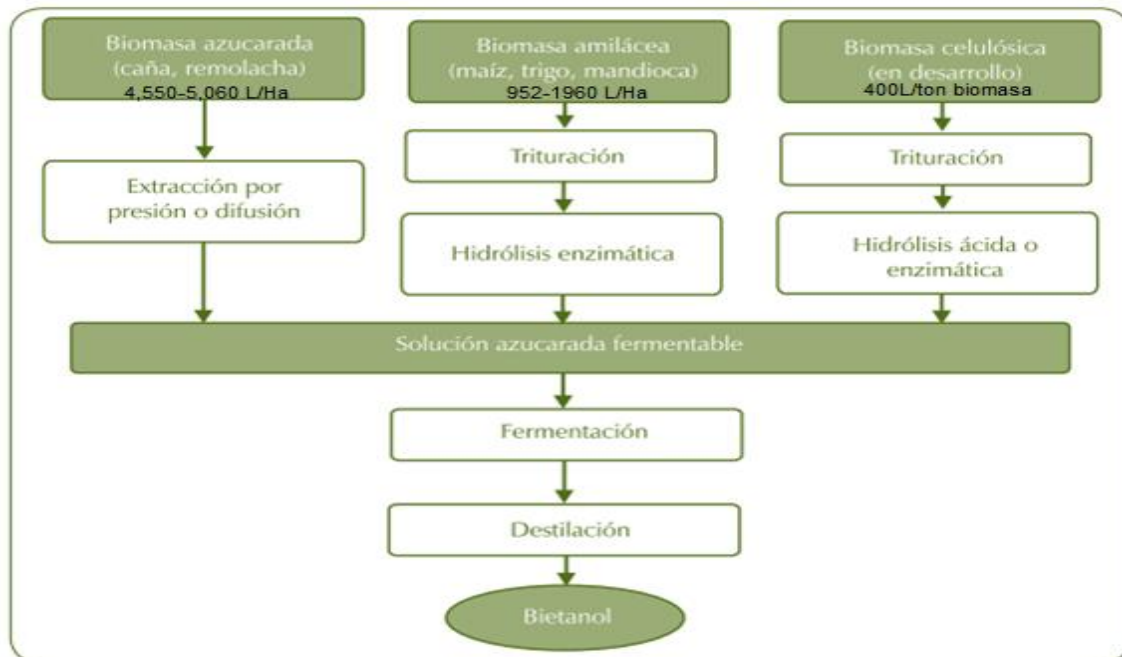
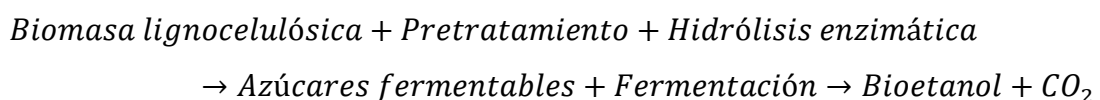


Figura 1. Rutas tecnológicas para la producción de bioetanol. (Fuente: Elaboración de Luiz Augusto Horta Nogueira). Los números mostrados debajo de cada material se refieren al rendimiento de bioetanol obtenido para cada caso.

En general, la producción de etanol puede ser resumida en la siguiente ecuación:



1.2.1 VENTAJAS DEL USO DE BIOETANOL

- ✓ Permite disminuir la dependencia del petróleo, lo que mejora la seguridad energética de los países, sobre todo para los países no productores de petróleo, dado que la mayoría del petróleo se encuentra en zonas de alta inestabilidad política, como el Medio Oriente.
- ✓ Al ser un oxigenante de las gasolinas, mejora su octanaje de manera considerable, reduciendo los gases causantes del efecto invernadero.
- ✓ Reemplaza a aditivos nocivos para la salud humana, como el plomo y el MTBE, los cuales han causado el incrementado del porcentaje de personas afectadas por cáncer (MTBE) y la disminución de capacidades mentales, especialmente en niños (plomo).
- ✓ El octanaje del etanol puro es de 113 y se quema mejor a altas compresiones que la gasolina, por lo que da más poder a los motores, pero sólo puede ser utilizado en motores que han sido modificados para su uso.
- ✓ El etanol actúa como un anticongelante en los motores, mejorando el arranque del motor en frío y previniendo el congelamiento.
- ✓ Aumenta el valor de los productos agrícolas de los que procede, mejorando así los ingresos de los habitantes rurales y, por ende, elevando su nivel de vida (Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura, 2007).

1.2.2 DESVENTAJAS DEL USO DE BIOETANOL

- ✗ El etanol se consume de un 25% a un 30% más rápidamente que la gasolina; para ser competitivo, por tanto, debe tener un menor precio por galón.
- ✗ Cuando es producido a partir de caña de azúcar, se quema la caña antes de la cosecha, lo que libera grandes cantidades de metano y óxido nitroso.
- ✗ Cuando el etanol es producido a partir de maíz, en su proceso de elaboración se está utilizando gas natural o carbón para producir vapor y en el proceso de cultivo se usan fertilizantes nitrogenados, herbicidas de

origen fósil y maquinaria agrícola pesada (Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura, 2007).

1.2.3 BIOETANOL EN MÉXICO Y EN EL MUNDO

La producción de bioetanol obtenido del maíz en EUA (primer país productor del mundo), junto con la producción obtenida a base de caña de azúcar en Brasil (segundo país productor del mundo), constituyen el 88% de la producción mundial. Los mejores rendimientos de la caña de azúcar en relación con los cereales principalmente de maíz, hace que el bioetanol obtenido a partir de la caña de azúcar sea más competitivo por sus bajos costos en comparación con el bioetanol obtenido a partir de los cereales. En ambos países, la utilización del bioetanol es para mezclas con gasolina para el uso en el transporte, siendo por tanto los principales consumidores de bioetanol en el mundo (equivalente al 6% del consumo de gasolina).

Las exportaciones de bioetanol de Brasil durante junio de 2013 se registraron en 279.5 millones de litros, cifra 115% superior al registro del mes anterior (130 millones de litros) y 103.8% al registro de junio de 2012 (137.2 millones de litros) (Figura 2).

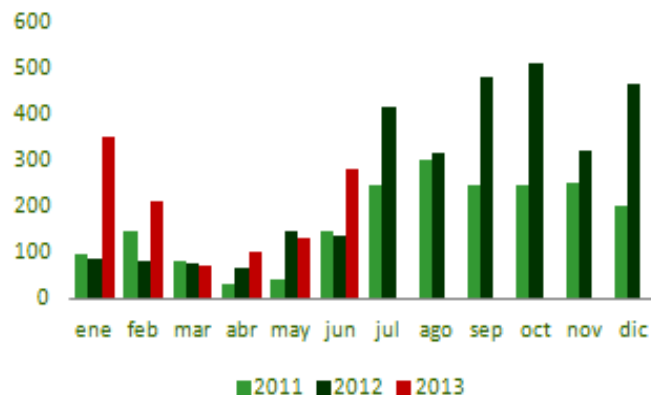


Figura 2. Exportaciones de Bioetanol en Brasil 2009-2013 (Millones de litros) (Fuente: Sector Azucarero Colombiano).

En la Tabla 1 se muestra el balance comunitario del sector de bioetanol desde 2006 a la actualidad (Maluenda, 2013).

Tabla 1. Balance de bioetanol en la UE (millones de litros)								
	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013
Stocks iniciales	700	633	1.048	1.644	1.711	1.291	1.394	1.441
Producción	1.608	1.803	2.816	3.702	4.258	4.450	5.000	5.380
Consumo	1.909	2.298	3.520	4.335	5.478	5.647	5.853	6.234
Importaciones	534	910	1.300	750	800	1.300	950	950
Exportaciones	0	0	300	0	0	50	95	95
Stocks finales	633	1.048	1.644	1.711	1.291	1.394	1.441	1.442

Tabla 1. Balance comunitario del sector del bioetanol desde 2006 a la actualidad (Fuente: Maluenda, 2013).

En México se producen aproximadamente 48 millones de toneladas métricas de caña, para obtener 5.5 millones de toneladas de azúcar y 1.9 millones de toneladas de melazas (Zafra 2007/08; SAGARPA, 2010), cuyos destinos finales es precisamente la producción de alcoholes de distintas calidades. En años recientes, se instalaron en dos destilerías de ingenios azucareros, columnas deshidratadoras para la obtención de alcohol anhidro, mejor conocido como Etanol, para uso como carburante asociado a las gasolinas convencionales. La iniciativa surgió del acuerdo suscrito entre la Cámara Nacional de las Industrias Azucarera y Alcoholera y el Gobierno del Distrito Federal, aunque sin la aprobación de PEMEX. Se acordó que serían destinados 10 millones de litros de etanol anhidro, para servir en las unidades del Gobierno del DF; recibiendo apoyos económicos los involucrados, mismos que serían liquidados en especie y en su momento. Desafortunadamente esta iniciativa fracasó (SAGARPA, 2010).

Si bien la producción de alcohol etílico en las 13 destilerías que operan en los ingenios del país alcanza una cifra cercana a los 60 millones de litros, en lo que respecta al Etanol anhidro, la producción es insignificante, destinándose fundamentalmente para fines distintos al energético. La capacidad instalada actualmente en las destilerías mexicanas es de unos 346,000 L/día, con rendimientos entre los 230 y 250 L/ton de melaza procesada. Por lo que respecta a las dos destilerías con posibilidad de producir etanol anhidro, ésta asciende a 115,000 L/día. Se encuentran ambas en el Estado de Veracruz en los ingenios La Gloria y San Nicolás (SAGARPA, 2010).

1.2.4 ALTERNATIVAS PARA LA PRODUCCIÓN DE BIOETANOL EN MÉXICO

1.2.5 PASTO TAIWÁN

El pasto Taiwán (*Pennisetum Purpureum Schum*) es un pasto de aspecto muy similar al King grass pero particularmente de un color púrpura muy acentuado y de talla un poco menor (Figura 3). Este es un pasto muy rústico (resistente a plagas y sequías prolongadas, que se adapta bien a suelos de fertilidad moderada a baja) y agresivo. Es exigente en nutrientes nitrogenados y minerales debido a que tiene tasas de extracción altas. Produce una inflorescencia en forma de espiga de grano abundante. Su crecimiento es erecto pero su follaje se dobla desde edades muy tempranas debido a su abundante biomasa. Su producción por unidad de área de cultivo o rendimiento de cosecha está tasado en un rango que varía según la región y época del año entre 50 y 120 toneladas de pasto fresco por hectárea por cosecha. A pesar de que su color predominante es el púrpura, de manera muy natural puede tornarse verde o ser verde durante todo su desarrollo dependiendo de la variedad (Rua, 2008).

En climas cálidos, la siembra puede ser durante todo el año si se dispone de riego. Sin embargo, en áreas de temporal, lo más recomendable es realizar la siembra al inicio del periodo de lluvias. La siembra en climas fríos está condicionada a la presencia de heladas, de tal manera que las mejores siembras se dan en los meses de Abril y Mayo, bajo condiciones de riego y en Junio o Julio bajo condiciones de temporal. Los zacates más sobresalientes en 11 condiciones de riego son el Taiwán y King Grass, pero en condiciones de temporal se obtienen mejores resultados con el zacate Merkerón (Unión Ganadera Regional de Jalisco, 2011).

Los zacates perennes de corte como el Taiwán, Merkerón, Elefante y King Grass, son originarios de Países Africanos y algunos fueron introducidos por el Golfo de México al Estado de Veracruz, de donde los propios ganaderos se encargaron de multiplicarlo a otros Estados de la República (Unión Ganadera Regional de Jalisco, 2011).



Figura 3. Pasto Taiwán (Fuente: Rua, 2008).

La producción de biocombustibles propone el uso de otras plantas como el pasto Taiwán, cuyo destino actual es de alimento para ganado (Oxfam Internacional, 2009). En Colombia, los pastos Elefante y King grass (*Pennisetum purpureum* y *Pennisetum hybridum*) son materias primas potenciales para la obtención de bioetanol a partir de la fracción celulósica (Cardona *et al*, 2013).

1.2.6 BAGAZO DE CAÑA

Considerando el azúcar como el principal producto de una fábrica de azúcar de caña se puede decir que esta industria genera otros subproductos, los cuales no son menos importantes. Algunos de ellos se originan durante la cosecha, como el cogollo y la paja y otros se obtienen en el proceso industrial, entre los cuales se encuentran principalmente el bagazo, las mieles finales y la cachaza. Entre ellos, el de mayor volumen y que tiene un uso inmediato en la propia fábrica es el bagazo, el cual puede alcanzar entre un 26% a un 29% del peso de la caña molida (Roca *et al*, 2006). México ocupa el quinto lugar a nivel mundial en producción de caña de azúcar, y durante la extracción de jugo el 30 por ciento se transforma en bagazo. (Montes, 2014). Se distinguen dos características muy importantes en el bagazo: el alto contenido de humedad (46-52%) y la gran variedad de tamaños de partículas de diferente naturaleza física (Roca *et al*, 2006).

En México, la caña de azúcar es uno de los principales cultivos agrícolas. Su industrialización produce el azúcar de mesa (sacarosa). El bagazo es un subproducto del proceso de extracción del azúcar. Este material puede ser utilizado para la obtención de xilitol, el cual es un edulcorante que puede competir con los endulzantes artificiales y los jarabes de maíz ricos en fructosa que desplazan del mercado a la sacarosa. Un proceso biotecnológico optimizado permite producir xilitol de origen natural y con menos costo que el obtenido por síntesis química. (Rodríguez *et al*, 2007). En el caso de estado de Morelos, uno de sus principales cultivos es la caña de azúcar, que una vez que se procesa genera como residuo el bagazo de caña el cual se usa en diversas industrias tales como la papelera, maderera, entre otras; así como forraje para el ganado vacuno y porcino (Mbohwa, 2003; Lobo *et al*, 2007; Restuti y Michaelowa, 2007; Flores *et al*, 2008).

El potencial de biomasa en el sector azucarero es considerable si se toma en cuenta que por cada 100 toneladas de caña procesada se obtienen de 10 a 12 t de azúcar; de 25 a 30 t de bagazo; quedan en el campo de 10 a 20 t de residuos agrícolas y de 5 a 7 t se pueden recolectar como paja. Se considera una producción de 80 toneladas de caña por hectárea, una productividad de 85 litros de bioetanol por tonelada de caña procesada (azúcar) y la utilización del 30% del bagazo disponible; la paja también es convertida a bioetanol, a razón de 400 litros por tonelada de biomasa celulósica seca (Morales, 2013).

El estado con mayor producción de bagazo de caña en el año 2004 fue Veracruz (Figura 4). En México, seis ingenios –Constancia, San Nicolás, Tres Valles y La Gloria (en Veracruz); Huixtla (Chiapas) y Tala (Jalisco)– ya están interconectados para participar en la cogeneración de energía eléctrica y se estima que su capacidad de generación de energía sobrante durante temporada de zafra sea de 344 MW (Megawatts) a la red de la Comisión Federal de Electricidad (CFE), tres de ellos operan bajo el esquema de cogeneración con socios y los otros tres entregan su energía sobrante a CFE, después de satisfacer su carga local. Otros cuatro ingenios: Aarón Sáenz (Tamaulipas), San Miguel El Naranjo (San Luis

Potosí), Santa Rosalía (Tabasco) y Tamazula (Jalisco), se encuentran en proceso de interconectarse a la red para entregar su energía sobrante a CFE (70 MW) e iniciarán operaciones durante la zafra 2013-2014 (Morales, 2013).

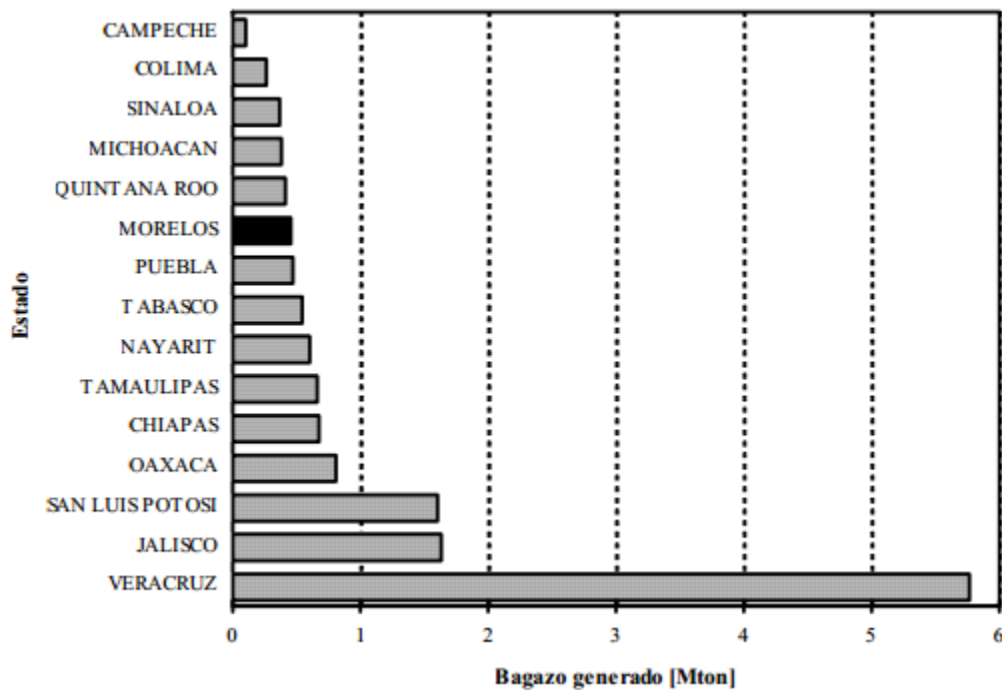


Figura 4. Producción en México de bagazo de caña en la zafra 2004/05 (Fuente: Flores *et al*, 2008).

1.2.7 RESIDUOS DE MALTA

En el proceso de elaboración de cerveza se obtienen varios subproductos de los cuales el de mayor volumen es la hez de malta, la cual está compuesta, casi en su totalidad, por los “residuos” de la malta luego de haber obtenido el mosto para elaborar la cerveza y se caracteriza por su alto valor nutritivo debido a su contenido de fibra, proteína y buen valor energético. Por cada 10 litros de cerveza elaborada se obtienen aproximadamente 2 Kg de hez de malta y a nivel nacional unas 700 t diarias. Sin embargo, a pesar de que existe una elevada disponibilidad de este producto, en la actualidad no se está aprovechando de manera apropiada (Sánchez *et al*, 2008).

La producción de cerveza a nivel mundial se concentra en países como China con un 18.5%, Estados Unidos 17.7%, Alemania 8%, Brasil con un 5%, el Reino Unido, Japón y México con una participación promedio de 4%. México ocupa el primer lugar en exportación de cerveza a nivel mundial a países como Estados Unidos, Canadá, Bélgica y España, por mencionar algunos. Estas exportaciones son del Grupo Modelo con 28.8 millones de hectolitros que, para lograr esa producción, el Grupo Modelo requiere sembrar más de 370 mil hectáreas de cebada, a lo que corresponde una producción aproximada de 770 mil toneladas, que a su vez genera aproximadamente la misma cantidad de residuo. La industria cervecera en México produce más de 800 mil toneladas de malta, residuo que se emplea en la alimentación animal y debe ser consumido antes de 15 días de producido por ser de rápida descomposición. Después de este tiempo se transforma en un residuo peligroso para la salud (Alaniz, 2008).

En muchos países el residuo sólido en forma de grano o cáscara que queda durante el proceso de elaboración de cerveza, específicamente en la etapa de filtración del mosto, está siendo subutilizado. Es potencialmente apto para su uso como materia prima en la producción de bioetanol, alimento para animales por su alto contenido en proteínas (26%) y biomasa microbiana a través del proceso de hidrólisis de los carbohidratos que contiene (Alaniz, 2008).

1.3 BIOMASA LIGNOCELULÓSICA

La biomasa lignocelulósica, es el producto primario de fotosíntesis y la fuente renovable más abundante a escala global en el planeta con producciones que llegan a las 2.2×10^{11} toneladas de peso seco de biomasa, lo que supone unas diez veces la demanda energética mundial (Himmel *et al*, 1994; Suesca, 2012). Debido a que la biomasa se produce en grandes proporciones, el desarrollo de productos utilizando biomasa como materia prima, es una alternativa atractiva que beneficia los procesos sostenibles (Suesca, 2012).

La lignocelulosa es el nombre dado al material presente en la pared celular de las plantas altas terrestres, hecha de microfibrillas de celulosa que se encuentran

dentro de una matriz amorfa de hemicelulosa y lignina (Figura 5) (Martínez *et al*, 2009; Bochinni *et al*, 2011).

Estos tres tipos de polímeros se encuentran fuertemente unidos uno con otro y representan más del 90% del peso seco de la célula vegetal. La cantidad presente de cada polímero varía de acuerdo a las especies, temporada de cosecha, y también cambia dependiendo de la parte de la planta. En general, las maderas suaves (gimnospermas como el pino y el cedro) tienen un mayor contenido de lignina que las maderas duras (angiospermas como el eucalipto y el roble). Sin embargo, el contenido de hemicelulosa es mayor en las gramíneas. En promedio, la lignocelulosa se conforma de 45% de celulosa, 30% de hemicelulosa y 25% de lignina (Glazer y Nikaido, 2007; Bocchini *et al*, 2011). Los materiales lignocelulósicos también incluyen residuos agrícolas (paja, rastrojo, tallos, mazorcas, bagazo, cáscaras), residuos industriales (desechos de la industria de alimentos) y desechos urbanos y domésticos (basura y aguas residuales) (Mtui, 2009; Bocchini *et al*, 2011).

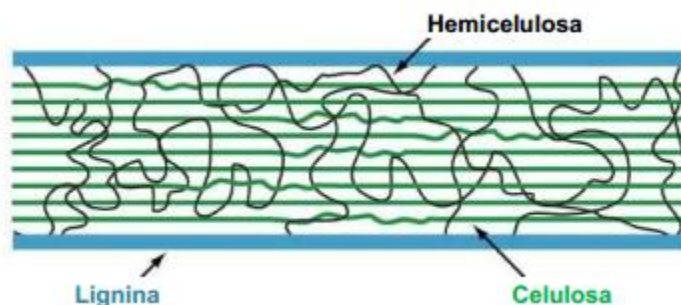


Figura 5. Estructura de la biomasa lingocelulósica (Fuente: Hector *et al*, 2008).

1.3.1 CELULOSA

La celulosa es el compuesto orgánico más abundante en la tierra y el principal componente de las paredes celulares de las plantas (Bocchini *et al*, 2011). Está conformada por subunidades de D-glucosa, unidas por enlaces β -1,4 glicosídicos (Fengel y Wegener, 1984; Sánchez *et al*, 2010). Un residuo de glucosa es la unidad monomérica de la celulosa y el dímero, celobiosa, es la unidad estructural

repetitiva de la cadena (Brown *et al*, 1996; Bocchini *et al*, 2011). La celulosa posee dos estructuras, una cristalina (organizada) y otra amorfa (Sánchez *et al*, 2010).

La cadena de celulosa presenta un grupo no reductor en un extremo, y en el extremo contrario presenta un grupo reductor. Las cadenas paralelas de celulosa interaccionan entre ellas por puentes de Hidrógeno y fuerzas de van der Waals, lo que producen microfibrillas, las cuales son agregados cristalinos extensos (Glazer y Nikaido, 2007; Somerville *et al*, 2004; Bocchini *et al*, 2011) (Figura 6).

Debido a que, como todo polímero, la cadena de celulosa tiene quiebres, dobleces y extremos libres, la malla cristalina presenta dislocaciones en algunas zonas, llamadas regiones amorfas. Estas regiones constituyen el 15% de la estructura celulósica y al estar más abiertas, son más susceptibles a la hidrólisis que las regiones cristalinas densamente empaquetadas, por lo tanto, la velocidad de hidrólisis es mucho mayor en la celulosa amorfa que en la cristalina (Cunningham y López, 1994; Suesca, 2012).

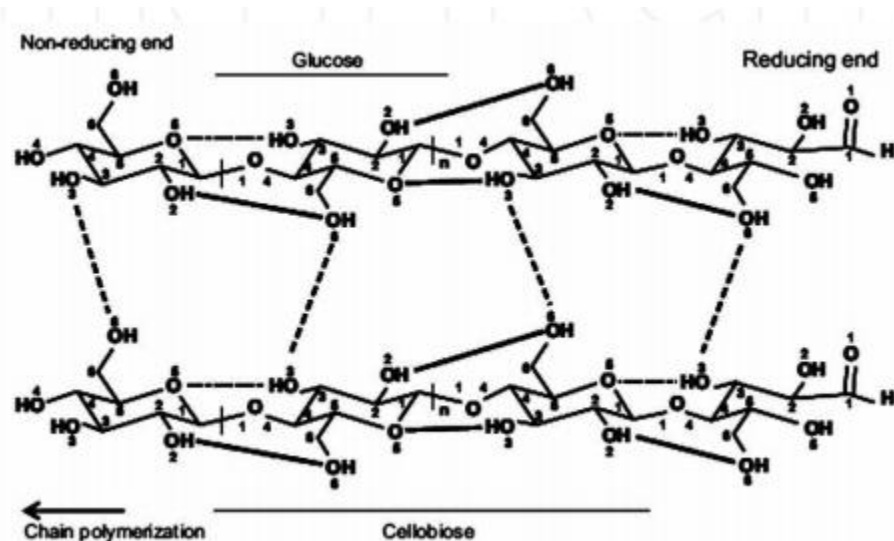


Figura 6. Estructura de la cadena de celulosa (Fuente: Festucci-Buselli *et al*, 2007).

1.3.2 HEMICELULOSA

Carbohidrato complejo y heterogéneo ya que su estructura posee diferentes polímeros como pentosas (como xilosa y arabinosa), hexosas (como manosa, glucosa y galactosa), azúcar y ácidos, entrelazadas entre sí glucosídicamente. Entre los productos de degradación se encuentran glucosa, manosa y galactosa, entre otros (Palacio, 1956; Sánchez, 2010).

Además presentan ramificaciones y sustituciones, por lo que no tienen una estructura regular, dándole una conformación amorfa y fácilmente soluble (Figura 7). A diferencia de la celulosa, la cual siempre tiene la misma estructura y composición, las cadenas de hemicelulosa pueden variar entre especies de plantas (Suesca, 2012).

El papel de la hemicelulosa es suministrar la unión entre la lignina y la celulosa. En estado natural existe en forma amorfa con un grado de polimerización que no excede de 200. Esta fracción es fácilmente hidrolizable ya que no presenta estructura cristalina; sin embargo, la xilosa, uno de sus componentes, es un azúcar que no pueden consumir muchos tipos de microorganismos como *S. cerevisiae* y *Z. mobilis* (Cunningham y López, 1994; Suesca, 2012). La hemicelulosa se une a la celulosa por puentes de hidrógeno y a la lignina y pectina por enlaces covalentes (Freudenberg, 1965; Bocchini; 2011).

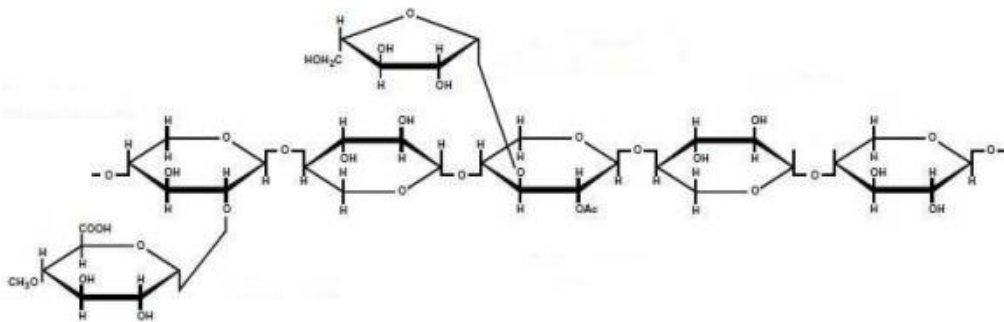


Figura 7. Estructura de la hemicelulosa (Fuente: Jacques *et al*, 2003).

1.3.3 LIGNINA

La lignina es uno de los biopolímeros más abundantes en las plantas y junto con la celulosa y la hemicelulosa conforma la pared celular de las mismas en una disposición regulada a nivel nano-estructural, dando como resultado redes de lignina-hidratos de carbono. La composición o distribución de los tres componentes en esas redes varía dependiendo del tipo de planta (Figura 8). En el caso de la composición de la madera, los rangos más comúnmente encontrados son: Celulosa: 38-50%; Hemicelulosa: 23-32% y Lignina: 15-25% (Sustainable Forestry for Bioenergy & Bio-based Products, 2007; Chávez-Sifontes y Domine, 2013).

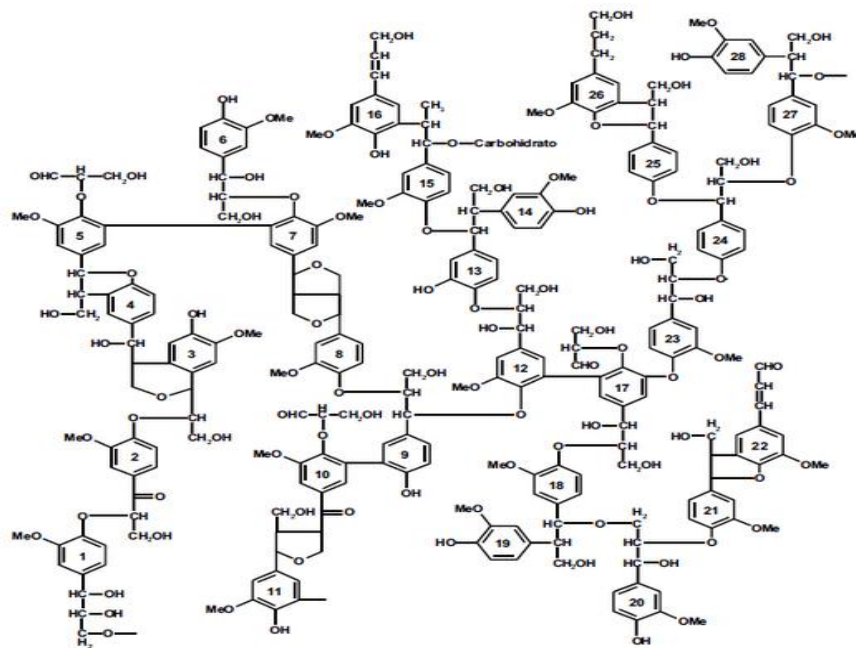


Figura 8. Estructura de la Lignina de una madera suave (Fuente: Ysambertt *et al*, 2009).

Es un heteropolímero amorfo que consta de tres diferentes unidades de fenilpropano (*p*-coumaril, coniferil y sinapil alcohol) que se mantienen unidos por diferentes enlaces. El heteropolímero amorfo no es soluble en agua y es ópticamente inactivo; todo esto hace que la degradación de la lignina sea muy complicada (Fenge y Wegener; 1984; Sánchez, 2010) (Figura 9).

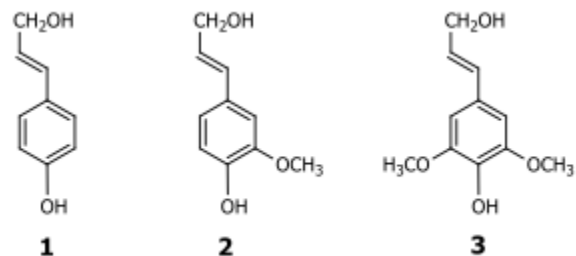


Figura 9. Monolignoles más comunes encontrados en los bloques de construcción de la lignina, 1:alcohol *p*-cumarílico, 2: alcohol coniferílico, 3: alcohol sinapílico (Fuente: Adaptada de Gellerstedt y Henrinksson, 2008).

Es la tercera fracción mayoritaria de la biomasa lignocelulósica. Se trata de un polímero tridimensional amorfo formado por la polimerización deshidrogenativa de unidades de fenilpropano ligadas por diferentes tipos de enlaces que se alternan de manera desordenada.

La lignina de gimnospermas (maderas blandas), está formada mayoritariamente por unidades de tipo guayacilo, mientras que la lignina de las angiospermas leñosas (maderas duras) está formada por unidades guayacilo y sirigilo. Esta alta proporción de unidades derivadas del alcohol sinapílico en las maderas duras determina la estructura y características de este tipo de lignina, ya que la presencia de los dos grupos metoxilo en posiciones 3 y 5 del anillo aromático reduce la formación de enlaces tipo éter y sobre todo los enlaces C-C, lo que se traduce en una reducción del grado de polimerización y en un menor grado de condensación. De esta forma las maderas duras son más fáciles de delignificar que las maderas blandas (Suesca, 2012).

1.4 PROCESO PARA LA OBTENCIÓN DE BIOETANOL A PARTIR DE LA BIOMASA LIGNOCELULÓSICA

La fermentación tradicional convierte a la glucosa en etanol, pero en el caso de los materiales lignocelulósicos, la celulosa debe ser primero convertida en azúcares simples por hidrólisis y entonces fermentada para producir etanol. Debido a esto, la materia prima lignocelulósica debe ser procesada por las etapas que se muestran a continuación (Viñals *et al*, 2012):

1. Preparación del material lignocelulósico
2. Pretratamiento (fraccionamiento de las hemicelulosas y parte de la lignina)
3. Purificación del hidrolizado (si es necesario)
4. Hidrólisis principal (fraccionamiento de la celulosa)
5. Purificación del hidrolizado (si es necesario)
6. Fermentación
7. Recuperación del etanol

1.5 PRETRATAMIENTO

Los residuos agrícolas requieren un pretratamiento para aumentar la digestibilidad de la biomasa y hacer que la celulosa se torne más accesible a las enzimas que convierten los carbohidratos en azúcares fermentables (Chang *et al*, 1997; Garzón y Gómez, 2007). El objetivo del pretratamiento es quebrar la barrera de la lignina y romper la estructura cristalina de la celulosa (Figura 10). Un pretratamiento eficaz se caracteriza por diversos criterios: evitar la necesidad de reducir el tamaño de las partículas de la biomasa, preservar las fracciones de la pentosa (hemicelulosa), limitar la formación de los productos de la degradación que inhiben el crecimiento de los microorganismos fermentativos y minimizar la demanda de energía (Garzón y Gómez, 2007).

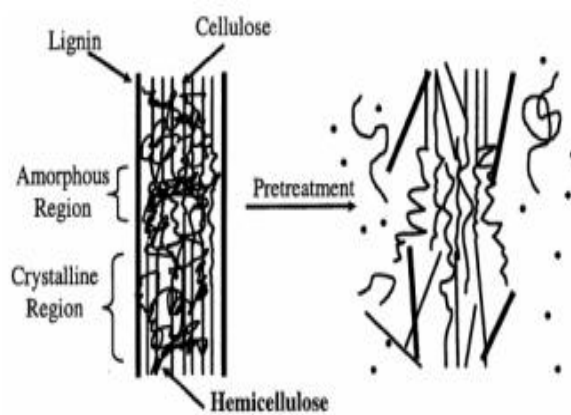


Figura 10. Pretratamiento de los materiales lignocelulósicos (Fuente: Hsu *et al*, 1980).

1.5.1 TIPOS DE PRETRATAMIENTOS

1.5.1.1 PRETRATAMIENTOS FÍSICOS

Los pretratamientos físicos se suelen dividir en dos categorías: mecánicos y no mecánicos. En los mecánicos, se utilizan las fuerzas de impacto y cizalladura, que conducen a materiales de baja cristalinidad, mayor superficie específica y densidad aparente más alta (Dekker, 1985; Almenares y Serrat, 2008). Entre estos pretratamientos, se tienen diferentes tipos de moliendas (molino de bolas, martillo, cuchillas, rodillos) así como procesos de molienda e hidrólisis simultáneas (Negro *et al*, 2003; Almenares y Serrat, 2008). Los pretratamientos de carácter físico no mecánico, someten al residuo celulósico a la acción de agentes externos que provocan alteraciones diversas del material de partida. Entre éstos se encuentran los tratamientos con radiación, la utilización de vapor a altas presiones y la pirólisis a temperaturas intermedias (Almenares y Serrat, 2008).

Tabla 2. Pretratamientos físicos de los residuos lignocelulósicos (Fuente: Sánchez y Cardona, 2005).

MÉTODOS	PROCEDIMIENTOS/ AGENTES	OBSERVACIONES
Trituración Mecánica	Reducción a astillas Trituración, molienda	Molinos: vibratorio de bolas (tamaño final: 0.2-2mm), cuchillas o martillo (tamaño final: 3-6 mm).
Pirólisis	T>300°C	Formación de productos volátiles y carbón. Residuos de la pirólisis pueden someterse a hidrólisis ácida suave (1N H ₂ SO ₄ , T=97°C, 2.5 h) para producir 80-85% AR (>50% de glucosa). Puede realizarse al vacío.

1.5.1.2 PRETRATAMIENTOS QUÍMICOS

El objetivo fundamental de estos pretratamientos es solubilizar la fracción de lignina y modificar la estructura de las cadenas celulósicas, de manera que sean fácilmente atacables por las enzimas. La mayoría de los pretratamientos químicos, persiguen la ruptura de los enlaces de hidrógeno en las regiones cristalinas de la fibra, con el objetivo de abrir la estructura, y permitir el paso de los agentes hidrolíticos (Almenares y Serrat, 2008).

Tabla 3. Pretratamientos químicos de los residuos lignocelulósicos (Fuente: Sánchez y Cardona, 2005).

MÉTODOS	PROCEDIMIENTOS/ AGENTES	OBSERVACIONES
Ozonólisis	Ozono, reacción a temperatura y presión ambientales.	Degradación principalmente de lignina. Conversión durante la hidrólisis de celulosa: 57% (aserrín). No se forman inhibidores.
Hidrólisis con ácido diluido	H ₂ SO ₄ , HCl, HNO ₃ al 1-5% (v/v). Procesos de flujo continuo para baja carga de sólidos (5-10% peso substrato/peso mezcla) a T=160-240°C; procesos por lotes a alta carga de sólidos (10-40%) a T=120-160°C. Presiones cercanas a 1 MPa.	Hidrólisis del 80-100% de la hemicelulosa, altas conversiones de xilano a xilosa. La alta temperatura es favorable para la hidrólisis de celulosa. Se requiere neutralizar el pH para la posterior hidrólisis enzimática. Ocurre cierta despolimerización de la celulosa. La lignina no se solubiliza o lo hace muy poco, pero se redistribuye.
Hidrólisis con ácido concentrado	H ₂ SO ₄ al 10-30% (v/v), 170-190°C, relación 1:1,6 sólido-líquido. Ácido peracético 21-60%,	Se requiere la recuperación del ácido. Tiempos de residencia mayores que en la hidrólisis con ácido diluido, debido a que la temperatura es menor (Sánchez, 2010).
		Remoción de lignina 24-55% para madera dura con contenido inicial de lignina del 20%, difícil remoción para maderas blandas con contenidos de lignina >26%. Hidrólisis de >50% de la

Hidrólisis alcalina	NaOH diluido, 24 h, 60°C	hemicelulosa. Sustancial hinchamiento de la celulosa. Conversión durante la hidrólisis de celulosa: 78.2% (paja de arroz), 67.1% (bagazo). Conversión durante la hidrólisis de celulosa: proceso convencional, aprox. 54%; NaOH+H ₂ O ₂ , aprox. 65% (hojas de caña de azúcar).
Deslignificación oxidativa	Peroxidasa y H ₂ O ₂ al 2% (v/v), 20°C, 8h.	Solubilización del 50% de la lignina y de casi la totalidad de la hemicelulosa. Conversión durante la hidrólisis de celulosa: 95% (aserrín).
Hidrólisis con peróxido de hidrógeno alcalino	H ₂ O ₂ al 7.5% con un pH de 11.5, ajustado con NaOH, 24 h, 50°C	El medio básico promueve la descomposición del H ₂ O ₂ a radicales más reactivos como hidroxilo (OH ⁻) y superóxido (O ₂ ⁻) (Mussato y Teixeira, 2010), los cuales son los responsables de la degradación de la lignina, aumentan la capacidad de absorción de agua del material y disminuyen hasta en un 50% la concentración de lignina presente, disminuyen la cristalinidad de la celulosa y aumentan la susceptibilidad al ataque químico-enzimático (Sun y Cheng, 2002).
Proceso de solventes orgánicos	Solventes orgánicos (metanol, etanol, acetona, etilenglicol, trietilenglicol, entre otros) o su mezcla con 1% de H ₂ SO ₄ o HCl, 125-185°C sin adición de catalizadores.	Ruptura de la lignina interior y de las uniones de hemicelulosa. Solubilización casi total de la lignina. Hidrólisis casi total de la hemicelulosa. Altos rendimientos de xilosa. Recuperación de solventes y su remoción del sistema para no inhibir los procesos biológicos subsiguientes.

Los pretratamientos oxidativos han sido usados para disolver los componentes de la matriz lignocelulósica y acelerar la hidrólisis enzimática y la biodegradación. La oxidación es utilizada para degradar la lignina y la hidrólisis para liberar los carbohidratos. El pretratamiento con peróxido de hidrógeno alcalino en residuos lignocelulósicos, como el bagazo de caña de azúcar, aumenta enormemente la

susceptibilidad para la hidrólisis enzimática y consecuentemente la producción de etanol (Azzam, 1989; Garzón y Gómez, 2007).

1.5.1.3 PRETRATAMIENTOS FÍSICO-QUÍMICOS

Tabla 4. Pretratamientos físico-químicos de los residuos lignocelulósicos (Fuente: Sánchez y Cardona, 2005).

MÉTODOS	PROCEDIMIENTOS/ AGENTES	OBSERVACIONES
Explosión a vapor	Vapor saturado a 160-260°C, P=0,69-4,85 MPa por varios segundos o minutos, luego descompresión hasta presión atmosférica	Altas concentraciones de sólidos. Hidrólisis del 80-100% de la hemicelulosa, destrucción de parte de la xilosa obtenida, formación de inhibidores (ácidos alifáticos, productos de degradación de azúcares y compuestos aromáticos de degradación de la lignina), se requiere posterior lavado con agua. Al combinarse con H ₂ SO ₄ , SO ₂ , o CO ₂ mejora la eficiencia de la posterior hidrólisis enzimática, disminuyendo inhibidores. Al combinarse con fuentes de nitrógeno aumenta el porcentaje de azúcares solubles. Reducción de tamaño de la biomasa con menor gasto energético comparado con pulverización. Ocurre cierta despolimerización de la celulosa. La lignina se solubiliza muy poco.
Agua Líquida Caliente (LHW)	Agua caliente presurizada, T=170-230°C, 1-46min.	Concentraciones de sólidos <20%. Ocurre cierta despolimerización de la celulosa. La hemicelulosa se solubiliza de la celulosa para hacerla más accesible y evitar la formación de inhibidores (productos de degradación que puede seguir catalizando la hidrólisis del material celulósico), manteniendo el pH entre 4 y 7 durante el pretratamiento (Kohlmann <i>et al</i> , 1995).
	Dosis 1-2kg de	Se requiere recuperación de amoníaco, no produce inhibidores.

Explosión de fibra con amoníaco.	amoniaco/kg de biomasa seca, 90°C, 30min.	Conversión durante la hidrólisis de celulosa >90% (bagazo y hierba de Bermuda). Para biomasa con alto contenido de lignina no es muy eficiente (conversión de celulosa <50%).Ocorre cierta despolimerización de la celulosa y cierta solubilización de lignina (~10-20%). Hidrólisis del 0-60% de la hemicelulosa en dependencia de la humedad, más del 90% oligómeros.
AFEX (Explosión con CO ₂).	Dosis de 4 kg CO ₂ /kg de fibra, p=5.62 MPa.	Conversión a glucosa durante la hidrólisis de celulosa >75% (alfalfa). No forma inhibidores enzimáticos para la sacarificación.

1.5.1.4 PRETRATAMIENTOS BIOLÓGICOS

Estos pretratamientos consisten en someter a la biomasa lignocelulósica a la acción de microorganismos que degradan la lignina y la hemicelulosa, con lo que se destruyen así las estructuras que protegen a la celulosa, haciéndola más accesible al ataque hidrolítico (Almenares y Serrat, 2008).

Tabla 5. Pretratamientos biológicos de los residuos lignocelulósicos (Fuente: Sánchez y Cardona, 2005).

MÉTODOS	PROCEDIMIENTOS/ AGENTES	OBSERVACIONES
Pretratamiento con hongos	Hongos de la pudrición blanca, blanda y parda. Producción de celulasas por fermentación en substrato sólido.	Los hongos producen celulasas, hemicelulasas y enzimas degradadoras de lignina: ligninasas, lignin-peroxidasas, polifenoloxidasas, lacasas y enzimas reductoras de quinonas. Proceso muy lento: <i>Pleurotus ostreatus</i> convierte el 35% de la paja de trigo en azúcares reductores en cinco semanas. Hongos de la pudrición parda degradan celulosa. Hongos de la pudrición blanca y blanda degradan celulosa y lignina.

Se han realizado algunas experiencias industriales con procesos ácido diluido. Alemania, Japón y Rusia han operado con hidrólisis ácido diluido en los pasados 50 años. En la actualidad se están analizando oportunidades comerciales para esta tecnología (Viñals *et al*, 2012).

1.6 HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA

La celulosa y la hemicelulosa pueden ser hidrolizadas a azúcares y fermentadas microbiológicamente a diferentes productos como etanol. El primer reto es que la glucosa en la celulosa se encuentra unida por enlaces beta en una estructura cristalina que es mucho más difícil de depolimerizar que los enlaces alfa. A pesar de que la estructura amorfa de la hemicelulosa hace más fácil la hidrólisis que la celulosa, la hemicelulosa está conformada de 5 diferentes azúcares (arabinosa, galactosa, glucosa, manosa y xilosa) así como de otros componentes como el ácido acético, glucurónico y ferúlico, que resultan difíciles de fermentar por algunos microorganismos. El 20-30% restante de la biomasa es en mayor proporción lignina, la cual no puede ser fermentada (Wyman *et al*, 2005).

Celulasas:

La hidrólisis enzimática de la celulosa es llevada a cabo por enzimas de tipo celulasas, las cuales son altamente específicas (Béguin y Aubert, 1994; Sun y Cheng, 2002). Los productos de la hidrólisis son normalmente azúcares reductores, incluyendo a la glucosa. El costo de utilidad de la hidrólisis enzimática es bajo comparado con la hidrólisis ácida o alcalina, debido a que la hidrólisis enzimática es llevada a cabo en condiciones suaves (pH 4.8 y temperatura de 45-50°C) y no presenta el problema de corrosión (Duff y Murray, 1996; Sun y Cheng, 2001). Tanto las bacterias como los hongos pueden producir celulasas para la hidrólisis de los materiales lignocelulósicos. Estos microorganismos pueden ser aerobios o anaerobios, mesofílicos o termofílicos (Sun y Cheng, 2002). Como los microorganismos anaerobios presentan una tasa de crecimiento muy baja y requiere de condiciones anaeróbicas para crecer, la mayor parte de las

investigaciones de las celulasas comerciales se han enfocado en la producción por hongos (Duff y Murray, 1996; Sun y Cheng, 2002).

Las celulasas son normalmente una mezcla de diferentes enzimas. Por lo menos, tres grupos de celulasas están involucradas en el proceso de hidrólisis (Figura 11):

1) La endoglucanasa o endocelulasa (EG, endo-1,4-D-glucanohidrolasa o EC 3.2.1.4) la cual ataca las regiones de baja cristalinidad en la fibra de celulosa (Coughlan y Ljungdahl, 1988; Sun y Cheng, 2002). La primera etapa de hidrólisis consiste en la degradación hidrolítica de las regiones amorfas por medio de estas enzimas (Carrillo; 2002). Actúan de forma azarosa sobre las regiones de celulosa amorfa dentro del polisacárido, por lo que generan oligosacáridos de diferentes tamaños y con ello, nuevas cadenas terminales (Martínez *et al*, 2008). Las endocelulasas son normalmente medidas por la detección de la disminución de la viscosidad o los grupos reductores liberados a partir de la carboximetilcelulosa (CMC) (Sieben, 1975; Wyman *et al*, 2005).

2) La exoglucanasa, celobiohidrolasa o exocelulasa (CBH, 1,4- β -D-glucan celobiohidrolasa o EC 3.2.1.91.) (Coughlan y Ljungdahl, 1988; Sun y Cheng, 2002). Actúan en los extremos reductores y no reductores en los extremos terminales del polímero, liberando ya sea moléculas de glucosa, las glucohidrolasas (1,4- β -D-glucan glucohidrolasas, EC 3.2.1.74) o celobiosa, las celobiohidrolasas (1,4- β -D-glucan celobiohidrolasas, EC 3.2.1.91) (Baldrian y Valaskova, 2008; Martínez *et al*, 2008). La diferenciación de estas clases de enzimas requiere de técnicas analíticas para distinguir a la glucosa y celobiosa y es normalmente llevada a cabo mediante HPLC o Cromatografía de Gases. Estas enzimas pueden ser distinguidas por su habilidad para liberar azúcares libres desde el extremo reductor o no reductor de la cadena de celulosa (Gilkes, 1997; Wyman *et al*, 2005).

3) Las β -glucosidasas (EC 3.2.1.21) hidrolizan las cadenas de celobiosa y celooligosacáridos solubles, produciendo glucosa. Este proceso no sólo completa la degradación de la celulosa, además, elimina la acumulación de celobiosa que

puede ser un inhibidor de las celobiohidrolasas, en la segunda etapa del mecanismo de hidrólisis (Carrillo, 2002). Son enzimas β -D-glucósido glucohidrolasas (EC 3.2.1.21), pertenecientes a la familia 1,3,5,9,30 Y 116 de las glucósido-hidrolasas (Henrissat, 1991). La medición de la actividad es llevada a cabo mediante HPLC o CG, e incluso por espectrofotometría directa o análisis fluorométrico de varios análogos cromogénicos y fluorogénicos de la celobiosa y celo-oligómeros (Wyman *et al*, 2005).

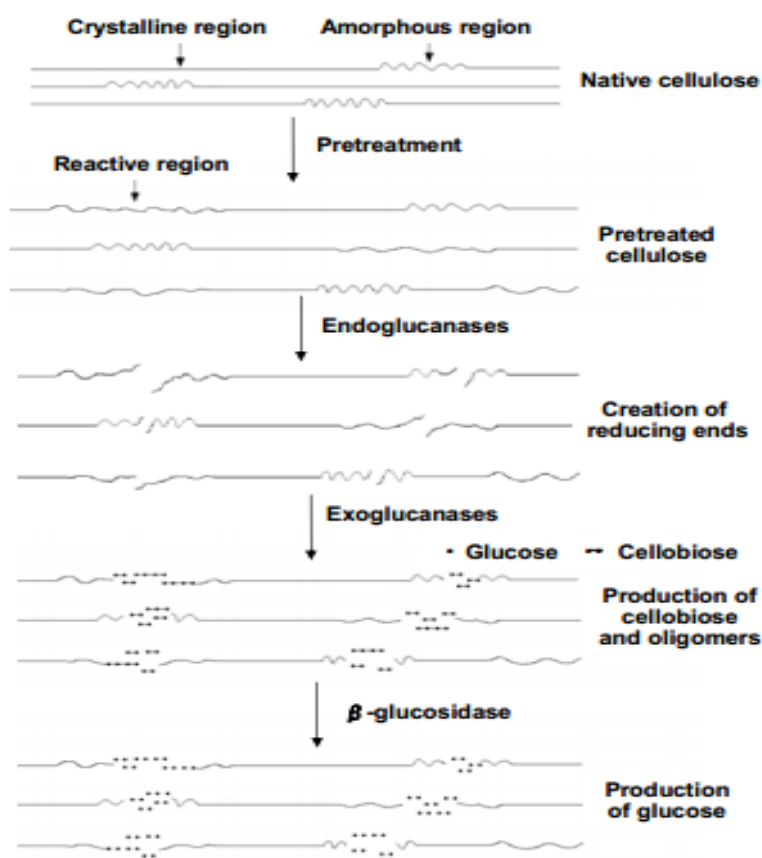


Figura 11. Esquema de la hidrólisis de celulosa a glucosa (Fuente: Taherzadeh y Karimi, 2007).

La hidrólisis enzimática de la celulosa, normalmente caracterizada por un reactivo insoluble (substrato celulósico) y un catalizados soluble (enzimas) no está únicamente influenciada por los rasgos estructurales del substrato sólido, sino también por los factores relacionados con la enzima, tales como el origen de la

enzima, la inhibición por producto, la inactivación térmica, el balance de actividad por sinergismo, la actividad específica, entre otros (Yang *et al*, 2011).

La naturaleza insoluble de la celulosa representa un reto para los sistemas de celulasas. Una característica general de la mayoría de las celulasas es su estructura modular que incluye generalmente dos módulos, uno catalítico y otro de unión al carbohidrato (CBMs). La presencia de estos CBMs es particularmente importante para el inicio y el posterior procesamiento llevado a cabo por las exoglucanasas (Lu-Chau y Pena, 2005).

Típicamente, un péptido no catalítico comprende el módulo con la función de unión a carbohidratos (conocido como CBM). Éste se une mediante una bisagra flexible de aminoácidos hidroxilados (Ser y Tre) y altamente glicosilados, al siguiente módulo en donde se encuentra el sitio catalítico de la enzima, aproximándolo íntima y prolongadamente al sustrato y potenciando su acción (Figura 12) (Linder y Teeri, 1996; Martínez *et al*, 2008).

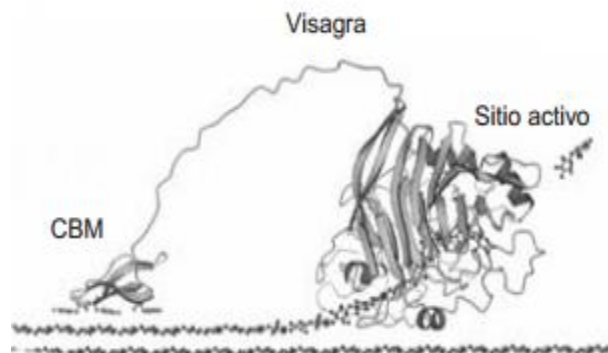


Figura 12. Modelo tridimensional de una celobiohidrolasa actuando sobre una cadena de celulosa. Se muestra el módulo catalítico en forma de túnel (liberando una molécula de celobiosa) (Fuente: Martínez *et al*, 2008).

Otra característica importante de las celulasas es su modo de acción sinérgico. Los sistemas enzimáticos de celulasas presentan una actividad enzimática colectiva mayor que la suma de las actividades individuales. Se conocen cuatro tipos de sinergismo:

- Sinergia endo-exo entre las endoglucanasas y exoglucanasas.
- Sinergia exo-exo entre exoglucanasas que procesan a partir de los terminales reductores y no reductores de la cadena de celulosa.
- Sinergia entre exoglucanasas y β -glucosidasas que remueven celobiosa como producto final de las dos primeras enzimas.
- Sinergia intramolecular entre los dominios catalíticos y los CBMs (Lu-Chau y Pena, 2005).

Xilanasas:

Además de los tres grupos de enzimas celulasas, también existen diferentes enzimas que atacan la hemicelulosa como la glucuronidasa, acetilesterasa, xilanasas, β -xilosidasa, galactomanasa y glucomanasa (Duff y Murray, 1996; Sun y Cheng, 2002).

La xilanasas (E.C. 3.2.1.8 o β -1,4-xilano hidrolasa) actúa en la naturaleza depolimerizando las moléculas de xilano en unidades de pentosas monoméricas, que son usadas por bacterias y hongos como fuente de carbono (Prade, 1996; Hernández y Paz-Lago, 2000). Estas hemicelulosas se encuentran, en cierta forma, en una situación intermedia entre las cadenas ordenadas de celulosa y la fracción amorfa de lignina (De la Rosa, 2003; Roncero *et al*, 2003).

1.7 FERMENTACIÓN

Una vez liberados los azúcares de la celulosa, el siguiente paso es la fermentación microbiana para la producción de etanol. La fermentación puede llevarse a cabo de dos maneras: simultánea a la sacarificación de los materiales celulósicos (SSF-*simultaneous saccharification and fermentation*) (Wingren *et al*, 2005; Martínez *et al*, 2008), o de manera independiente a la hidrólisis (SHF-*separate hydrolysis and fermentation*) (Tomás-Pejó *et al*, 2008; Martínez *et al*, 2008). Los microorganismos tradicionalmente usados en la industria del alcohol son la levadura *Saccharomyces cerevisiae* que llega a crecer hasta en 146 g/L de etanol (van

Maris *et al*, 2006; Martínez *et al*, 2008), y la bacteria *Zymomonas mobilis* que tiene una resistencia 2.5 veces más que la primera (Rogers *et al*, 2007; Martínez *et al*, 2008). Las dos especies derivan su energía de la glucosa, y el etanol es el último producto de las vías Embden-Meyerhof (en *S. cerevisiae*) (Willis, 1990; Martínez *et al*, 2008), y Entner-Doudoroff (en *Z. mobilis*) (Sprenger, 1996; Martínez *et al*, 2008).

Otras levaduras, tales como *Kluyveromyces fragilis*, *Kluyveromyces marxianus* y *Candida utilis* han mostrado fermentaciones con rendimientos máximos de entre 40 y 50 g/L de etanol (Lin y Tanaka, 2006; Martínez *et al*, 2008). *Pachysolen tannophilus* es una levadura que aunque menos eficiente (7.8 g/L), puede utilizar también xilosa como fuente de carbono, a diferencia de las anteriores (Martínez *et al*, 2008).

1.7.1 SACARIFICACIÓN Y FERMENTACIÓN SIMULTÁNEAS (SSF)

- ✓ La glucosa producida por la hidrólisis enzimática es consumida inmediatamente por el microorganismo fermentador presente en el medio.
- ✓ Los efectos de inhibición se minimizan por la baja concentración de azúcares en el medio.
- ✓ El riesgo de contaminación es menor, debido a que la presencia de etanol reduce la posibilidad de contaminación.
- ✗ Existe una diferencia entre las temperaturas óptimas de la sacarificación enzimática y las de los microorganismos fermentadores. La temperatura óptima para celulasas se encuentra entre 45 y 50°C, a diferencia de *S. cerevisiae*, que tiene un óptimo de temperatura entre 30 y 35°C (Tahezadeh y Karimi, 2007).

1.7.2 SACARIFICACIÓN Y FERMENTACIÓN SEPARADAS (SHF)

En este proceso, la lignocelulosa pretratada es hidrolizada a glucosa y fermentada a etanol, en etapas separadas.

- ✓ Es posible llevar a cabo la hidrólisis de la celulosa y la fermentación a sus propias temperaturas óptimas. La temperatura óptima de celulasas está usualmente entre 45 y 50°C, dependiendo del microorganismo que la haya producido (Olsson *et al*, 2006; Saha *et al*, 2005; Söderström *et al*, 2003; Wingren *et al*, 2003; Taherzadeh y Karimi, 2007). Sin embargo, la temperatura óptima de la mayor parte de los microorganismos productores de etanol está entre 30 y 37°C (Taherzadeh y Karimi, 2007).

- ✗ La inhibición de la actividad de las celulasas por azúcares reductores, tales como la celobiosa y la glucosa. En una concentración de celobiosa baja de 6 g/L, la actividad de celulasas se ve reducida en un 60%. Aunque la glucosa disminuye la actividad de celulasas también, el efecto inhibitorio de este azúcar es menor que el de celobiosa. Por otro lado, la glucosa es un fuerte inhibidor de la β -glucosidasa; en una concentración de 3 g/L de glucosa, la actividad de β -glucosidasas se ve reducida en un 75% (Philippidis y Smith, 1995; Taherzadeh y Karimi, 2007).

- ✗ La contaminación debido a que el proceso de hidrólisis es largo, de uno a cuatro días, y una dilución de glucosa siempre tiene riesgo de contaminación microbiana, aún a temperaturas de 45-50°C (Taherzadeh y Karimi, 2007).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo General

Caracterizar dos cócteles enzimáticos comerciales, evaluando sus actividades enzimáticas en función de factores como el pH y la temperatura, así como su resistencia a la inactivación térmica y el efecto de la presencia de inhibidores en dichos cócteles, con el objeto de establecer una hidrólisis eficiente del material lignocelulósico para la producción de jarabes azucarados.

2.2. Objetivos Particulares

- Determinar la concentración de azúcares totales, azúcares reductores y proteína en los cócteles enzimáticos comerciales E9 (20-30% de celulasas) y E10 (20-30% de xilanasas).
- Determinar las actividades enzimáticas de ambos cócteles enzimáticos (E9 y E10).
- Evaluar el efecto de la temperatura y del pH en las diferentes actividades enzimáticas para ambos cócteles (E9 y E10).
- Evaluar la resistencia enzimática a la inactivación térmica así como la presencia de inhibidores en los cócteles enzimáticos comerciales E9 y E10.
- Realizar un pretratamiento básico oxidante para tres diferentes residuos lignocelulósicos: Pasto Taiwán, Bagazo de Caña y Residuos de Malta.
- Evaluar y analizar la sacarificación enzimática de dichos residuos lignocelulósicos empleando los cócteles enzimáticos comerciales E9 y E10.

3. HIPÓTESIS

Establecer las condiciones óptimas de actividad (pH, temperatura e inhibidores) de los dos cócteles enzimáticos comerciales E9 y E10, permitirá dirigir la sacarificación enzimática de los materiales lignocelulósicos hacia la obtención de un jarabe con alto contenido de azúcares totales y reductores, así como con un grado de polimerización cercano a 1.0.

4. JUSTIFICACIÓN

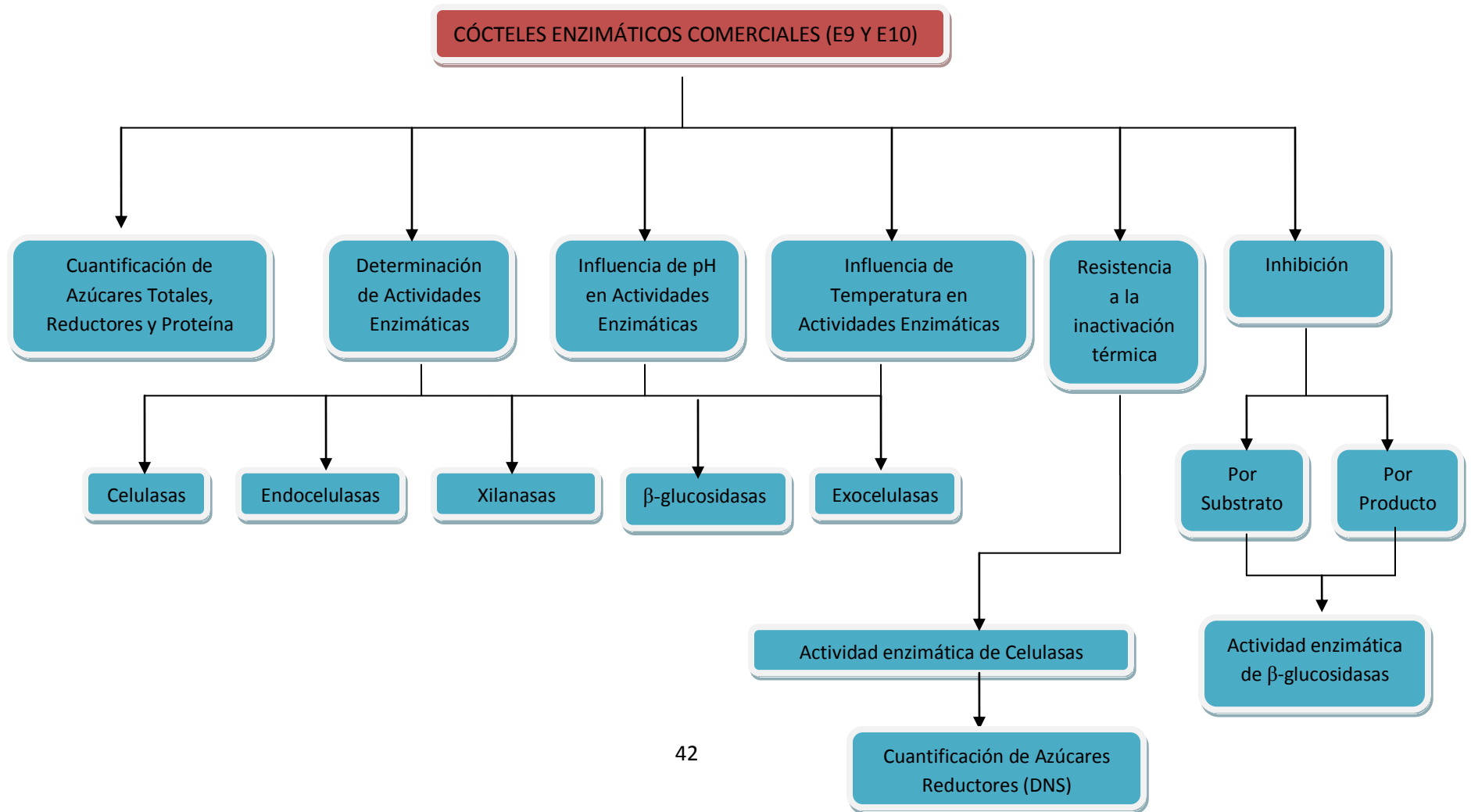
El problema actual relacionado con la emisión por fuentes móviles de gases del efecto invernadero es una situación que debe ser abordada desde diferentes aspectos. La producción de bioetanol para disminuir la emisión de dichos gases es una alternativa alentadora, y aunque desde hace tiempo ha sido estudiada, aún falta mucho para lograr que México logre situarse entre los principales países productores del mismo, como es el caso de Estados Unidos y Brasil.

El uso de materia prima que no incide en alimentación humana o animal, es una alternativa para la producción de bioetanol, ya que los residuos o materiales lignocelulósicos se pueden aprovechar para generar jarabes ricos con azúcares susceptibles de ser fermentados a bioetanol. Con esto se lograría tener una doble ventaja, darle un uso a aquellos residuos obtenidos en las diferentes industrias y con ello, hacer una mejora económica, que aunque al principio no resultará del todo costeable, después de un tiempo será una excelente opción para tener una fuente de energía sostenible y amigable con el medio ambiente.

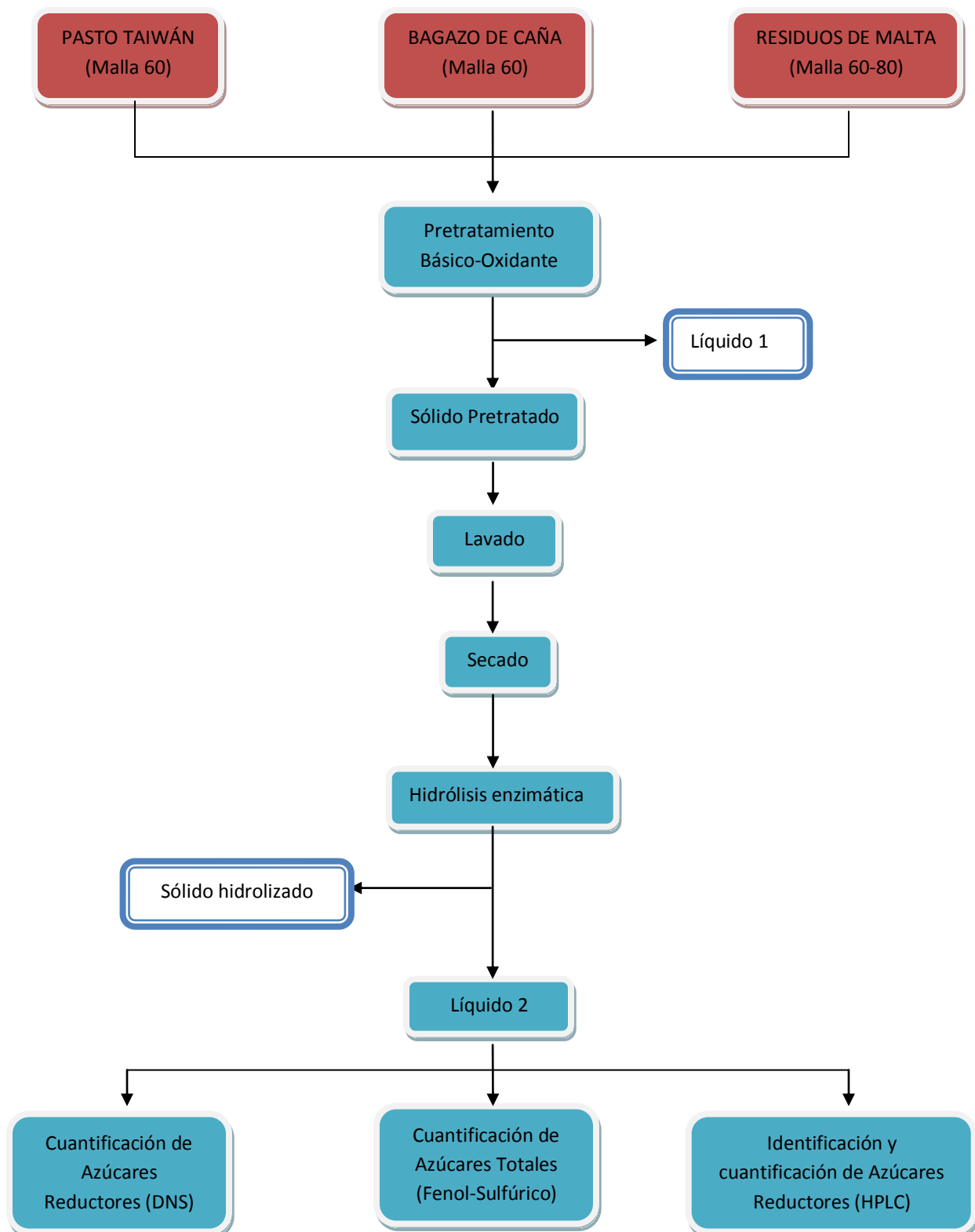
5. DIAGRAMAS DE ACTIVIDADES

Las actividades se dividieron en la caracterización de los cócteles enzimáticos y tratamiento de los materiales lignocelulósicos.

5.1 Cócteles enzimáticos comerciales E9 y E10



5.2 Materiales Lignocelulósicos



6. METODOLOGÍA

6.1. Determinación de Azúcares Reductores (Método DNS)

El método de DNS se basa en la reducción del DNS (de color amarillo) por la glucosa u otro azúcar reductor al ácido 3-amino-5-nitrosalicílico (de color rojo ladrillo; Chaplin, 1986), cuya presencia puede detectarse por lectura de la Absorbancia en la zona de 540-570 nm (Tena *et al*, 2009). La reacción que se lleva a cabo es la siguiente:

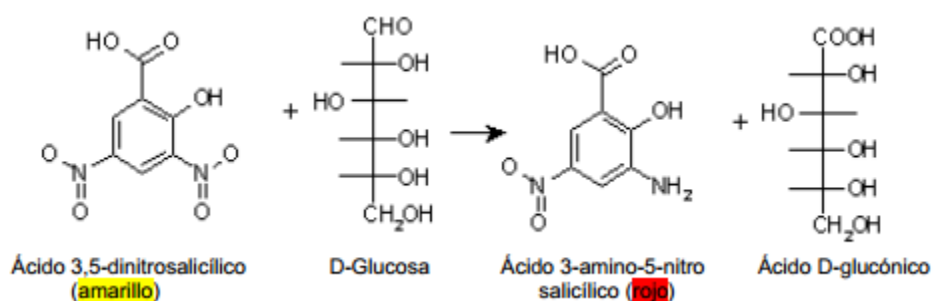


Figura 13. Reacción de reducción del ácido 3,5-dinitrosalicílico al ácido 3-amino-5-nitrosalicílico (Fuente: Jorrín y Tena, 2007).

- REACTIVOS

- Glucosa 99.99%
- Reactivos DNS*
- Agua destilada
- Hidróxido de Sodio
- Tartrato de sodio y potasio
- Ácido 3,5 dinitrosalicílico

- MATERIALES Y EQUIPO

- Espectrofotómetro Uv-VIS
- Tubos de ensaye con tapón de rosca 15 x 180 mm

- Vasos de precipitados de 100 y 1000 mL
- Micropipetas automáticas 10, 100 y 1000 μ L
- Pipetas automáticas 5 mL
- Probetas de 50 y 100 mL
- Gradilla
- Celdas de cuarzo
- Vórtex
- Recipiente para baño maría
- Espátula
- Balanza analítica
- Cronómetro

Procedimiento

Preparar previamente el reactivo de DNS y una curva patrón de glucosa (Anexo A). En caso de ser necesario, tomar el volumen pertinente de la muestra y llevar a un volumen final de 1 mL con agua destilada, para diluir la muestra original y lograr que la absorbancia detectada se encuentre en el intervalo de la curva patrón; de no ser necesario tome 1 mL de la muestra acuosa. Adicionar 1 mL del reactivo de DNS, agitar en el vórtex y calentar por 5 minutos en un baño de agua a ebullición, enfriar y diluir con 8 mL de agua destilada, homogenizar con el vórtex. Leer la absorbancia a 540 nm frente a un blanco. Cuantificar los azúcares reductores interpolando los valores de absorbancia obtenidos en la curva patrón elaborada previamente.

6.2. Determinación de Azúcares Totales (Método Fenol-Sulfúrico)

Método propuesto por Dubois en 1956 fundamentado en que los carbohidratos son particularmente sensibles a ácidos fuertes y altas temperaturas. Bajo estas condiciones una serie de reacciones toman lugar empezando con una deshidratación simple, si se continúa el calentamiento y la catálisis ácida se producen varios derivados del furano, que condensan consigo mismos y con otros subproductos para producir compuestos coloridos producto de la condensación de

compuestos fenólicos y con heterociclos con el nitrógeno como heteroátomo. La condensación más común es con fenol. Todos los azúcares como oligosacáridos y polisacáridos pueden ser determinados, recordando que éstos bajo hidrólisis ácida producen monosacáridos. Los carbohidratos en presencia de un medio ácido, se hidrolizan y se deshidratan dando lugar a la formación de furfural y 5-hidroxiacetilfurfural que al reaccionar con el fenol forman los compuestos coloridos que pueden ser leídos en una longitud óptica específica (Figura 14). En el caso de las pentosas, el color de la reacción debe ser leído a una longitud de onda de 480 nm y para las hexosas 490 nm (Nielsen, 2007). La reacción que se lleva a cabo es la siguiente:

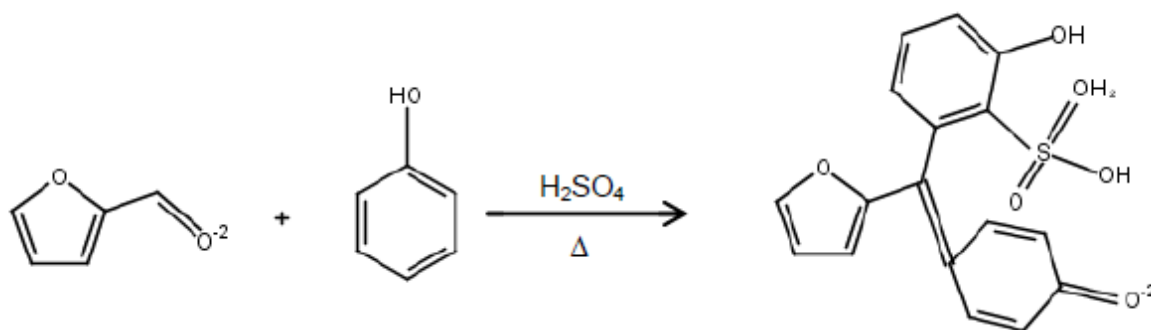


Figura 14. Reacción de hidrólisis y condensación de carbohidratos (Fuente: Aburto *et al*, 2012).

- REACTIVOS

- Glucosa 99.99%
- Ácido sulfúrico concentrado
- Solución de fenol al 5% (p/v)*
- Agua destilada

- MATERIALES Y EQUIPO

- Espectrofotómetro Uv-VIS
- Tubos de ensaye con tapón de rosca 15 x 180 mm

- Vasos de precipitados de 10, 100 y 250 mL
- Micropipetas 10, 100 y 1000 mL
- Pipetas automáticas 5 mL
- Matraces aforados de 10 y 100 mL
- Vórtex
- Gradilla
- Celdas de cuarzo
- Espátula
- Balanza analítica
- Campana de extracción
- Probeta de 50 y 100 mL

Procedimiento

Preparar previamente el Fenol al 5% y una curva patrón de glucosa (Anexo B). En caso de ser necesario tomar el volumen pertinente de la muestra y llevar a un volumen final de 1 mL con agua destilada, para diluir la muestra original y lograr que la absorbancia detectada se encuentre en el intervalo de la curva patrón. De no ser necesario tome 1 mL de la muestra acuosa y un tubo con 1 mL de agua destilada que servirá como blanco. Adicionar 1 mL de una solución de fenol al 5% (p/v), directamente en la muestra. Mezclar y adicionar en el centro del tubo 5 mL de ácido sulfúrico concentrado, tapar el tubo y homogenizar cuidadosamente con vórtex. Dejar enfriar la mezcla a temperatura ambiente y determinar la absorbancia a 490 nm, frente al blanco. Calcular la concentración de azúcares presentes en la muestra a partir de una curva patrón elaborada con anterioridad.

6.3. Determinación de Proteína (Método de Bradford)

El método de Bradford se basa en la unión de un colorante, Comassie Blue G-250 (también Serva Blue) a las proteínas. El colorante, en solución ácida, existe en dos formas una azul y otra naranja. Las proteínas se unen a la forma azul debido a que el colorante interacciona con aminoácidos básicos (especialmente arginina y aromáticos), para formar un complejo proteína-colorante con un coeficiente de

extinción mayor que el colorante libre. Este método es sensible (1-15 μg), simple, rápido, barato y pocas sustancias interfieren en su determinación. Entre las sustancias que interfieren están los detergentes y las soluciones básicas. (Fernández *et al*, 2009).

- REACTIVOS

- Reactivo de Bradford*
- Agua destilada
- Albúmina de suero bovina (BSA)

- MATERIALES Y EQUIPO

- Espectrofotómetro Uv-VIS
- Tubos de ensaye con tapón de rosca 15 x 180 mm
- Vasos de precipitados de 100 y 600 mL
- Micropipetas automáticas 100 y 200 μL
- Pipetas automáticas 5 mL
- Vórtex
- Gradilla
- Celdas
- Cronómetro
- Papel filtro Whatman No. 1

Procedimiento

Preparar previamente el reactivo de Bradford y una curva patrón de albúmina de suero bovina (Anexo C). En caso de ser necesario tomar el volumen pertinente de la muestra y llevar a un volumen final de 100 μL con agua destilada, para diluir la muestra original y lograr que la absorbancia detectada se encuentre en el intervalo de la curva patrón. De no ser necesario tomar 100 μL de la muestra. Adicionar 5 mL del reactivo de Bradford. Mezclar perfectamente con vórtex y esperar 5 minutos. Determinar la absorbancia a 595 nm. El color es estable por 1 hora.

6.4. DETERMINACIÓN DE ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS

6.4.1. Actividad de Celulasas

Este método está descrito por la International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC) para la determinación de la actividad de la celulasa. La actividad de la enzima ha sido designada en términos de “unidades de papel filtro” (FPU) por mililitro de la enzima original. Una “unidad de papel filtro” es aquella que produce 2 mg de azúcares reductores a partir de 50 mg de papel filtro (conversión 4%) en 60 min (Tapia, 2010).

- REACTIVOS
 - Celulasa
 - Buffer de citratos 0.05 M, pH 4.8
 - DNS

- MATERIALES Y EQUIPO
 - Papel filtro Whatman # 1
 - Tubos de ensaye
 - Evaporador (baño de temperatura con agitación) marca BÜCHI modelo Syncore P-101
 - Baño de agua a ebullición
 - Cronómetro
 - Balanza analítica
 - Filtros de 0.45 μm
 - Espectrofotómetro UV-Vis
 - Potenciómetro

Procedimiento

Preparar una serie de diluciones de la enzima (al menos 4). Pesar 50 mg de papel filtro Whatman # 1 (tira de aproximadamente 1 x 6.3 cm), doblar la tira en forma de escalones y colocarla en un tubo, adicionar 1 mL de buffer de citratos 0.05M, pH 4.8. Atemperar a 50°C y posteriormente agregar 0.5 mL de cada dilución de enzima. Colocar en un baño con agitación a 50° C, 180 rpm durante 60 minutos. Al final de la reacción inactivar la enzima sumergiendo los tubos en agua a temperatura en ebullición y posteriormente filtrar utilizando filtros de 0.22 µm. Determinar la cantidad de azúcares reductores, utilizando el método de DNS. Construir una gráfica de dilución vs azúcares reductores producidos por cada una de las diluciones y encontrar la ecuación de la recta. Las concentraciones de los azúcares totales producidos deben de estar entre 0.5 a 3 mg/mL. Utilizando la ecuación de la recta estimar la dilución de la enzima a la cual se producen 2 mg/0.5mL de enzima (Adney y Barker, 1996; Aburto *et al*, 2012).

Para calcular las FPU utilizar la siguiente fórmula:

$$FPU = \frac{0.37}{\text{Concentración de la enzima que libera 2 mg de glucosa}}$$

El factor 0.37 se obtiene de:

$$\frac{\frac{2 \text{ mg glucosa}}{0.18016 \text{ mg glucosa} / \mu\text{mol}}}{0.5 \text{ mL dilución de enzima} * 60 \text{ min}} = 0.37 \frac{\mu\text{mol}}{\text{min} * \text{mL}}$$

6.4.2. Actividad de Endocelulasas

La endocelulasa (EC 3.2.1.4) rompe de manera aleatoria enlaces intermoleculares β-1,4-glucosídicos en la superficie de la celulosa. La celulosa soluble en agua, tal como la carboximetilcelulosa (CMC) y la hidroximetilcelulosa (HEC) son comúnmente utilizados como sustratos en los ensayos de actividad enzimática,

ya que presentan mayor número de enlaces β -1,4-glucosídicos que la celulosa insoluble. La hidrólisis se puede determinar midiendo la aparición de azúcares reductores, cambios en la viscosidad o color.

La IUPAC recomienda el método de la CMCasa para determinar actividad de la enzima. Este método requiere 0.5 mg de glucosa absoluta liberada bajo las condiciones de reacción. Los azúcares reductores son cuantificados por DNS.

- REACTIVOS

- Buffer de citratos 50 mM, pH 4.8
- CMC al 2% (p/v) en buffer de citratos
- Endocelulasas
- Agua destilada
- NaOH
- Ácido cítrico monohidratado
- DNS

- MATERIALES Y EQUIPO

- Balanza analítica
- Tubos de ensaye de 25 mL
- Micropipeta 1000 μ L
- Pipeta automática de 5 y 10 mL
- Evaporador (baño de temperatura con agitación) marca BÜCHI modelo Syncore P-101
- Baño de agua a ebullición
- Baño de hielo
- Espectrofotómetro UV-Vis
- Potenciómetro
- Cronómetro

Procedimiento

Preparar una serie de diluciones de la enzima, hacer al menos dos diluciones para cada muestra, una dilución debe liberar poco más de 0.5 mg y otra poco menos de 0.5 mg de glucosa. En un tubo de ensaye de 25 mL de capacidad adicionar 0.5 mL de la solución diluida de enzima. Atemperar las soluciones de enzima y el sustrato a 50°C, pasar 0.5 mL de la solución de CMC al 2% a cada uno de los tubos de reacción y mezclar bien. Incubar a 50°C por 3 horas a 180 rpm. Adicionar 1 mL de reactivo de DNS y mezclar vigorosamente. Colocar los tubos en un baño de agua en ebullición durante 5 minutos. Enfriar los tubos en un baño de hielo para detener la reacción. Adicionar 8 mL de agua destilada tapar y mezclar. Leer la absorbancia a 540 nm usando un blanco de sustrato (Aburto *et al*, 2012).

6.4.3. Actividad de Exocelulasas

Las exocelulasas (CBH EC 3.2.1.91) pueden liberar moléculas de glucosa y/o celobiosa de los extremos de cadena de celulosa. En contraste con la β -glucosidasa y la endocelulasa, la exocelulasa es difícil de cuantificar debido a la falta de sustratos específicos y a la interferencia causada por componentes de otras celulasas. Por lo que para determinar su actividad las exocelulasas deben estar en forma pura. La actividad de las exocelulasas puras se cuantifica utilizando avicel, que es un buen sustrato para determinar dicha actividad. Es por esto que avecelasa es un sinónimo de exocelulasas o CBH.

- REACTIVOS
 - Avicel (FMC PH 101 o PH 105 o Sigmacell 20)
 - Buffer de acetato de sodio (0.1 M, pH 4.8)
 - Solución de fenol al 5%
 - Ácido Sulfúrico ~98%

- MATERIALES Y EQUIPO

- Balanza analítica
- Micropipetas 1000 μ L
- Tubos de ensaye
- Tubos para microcentrífuga
- Microcentrífuga
- Evaporador (baño de temperatura con agitación) marca BÜCHI modelo Syncore P-101
- Cronómetro
- Baño de agua helada
- Espectrofotómetro UV-Vis
- Potenciómetro

Procedimiento

Preparar una suspensión de Avicel al 1.25% (p/v) en buffer de acetatos 0.1 M, pH 4.8. (Avicel contiene aproximadamente 4-8% de humedad, por lo que es necesario ajustar el peso). Tomar 1.6 mL de esta suspensión y pasarla al tubo de reacción. Hacer una serie de diluciones de la enzima con buffer de acetatos. Equilibrar el substrato y la soluciones de enzima en un baño de agua a 50° C. Adicionar 0.4 mL de la solución de la enzima al substrato y mezclar bien. Incubar a 50°C a 180 rpm, durante 2 horas. Detener la reacción pasando los tubos a un baño de agua helada. Pasar 1 mL del hidrolizado a tubos para microcentrífuga y centrifugar a 13000 g por 3 minutos. Determinar azúcares totales en el sobrenadante por el método de fenol sulfúrico, usando el blanco de substrato como blanco.

Finalmente calcular la actividad de la enzima, considerando que una unidad de actividad de la exoglucanasa se define como la cantidad de enzima que libera una μ mol de glucosa equivalente por mL de enzima por minuto (Aburto *et al*, 2012).

6.4.4. Actividad de β -glucosidasas

Muchos microorganismos producen enzimas que hidrolizan los betaglucanos. Las beta-glucosidasas hidrolizan a la celobiosa, que es un dímero de glucosa de enlace beta 1,4 hidrosoluble, a glucosa. (Harris, 2007). Una unidad de actividad enzimática se define como la cantidad de la enzima que libera 1 μ mol de p-Nitrofenol por mL de enzima por minuto (Aburto *et al*, 2012).

- REACTIVOS
 - Buffer de acetato de sodio (0.1 M, pH 4.8)
 - Solución de p-Nitrofenol glucopiranósido 5 mM.
 - β -glucosidasas

- MATERIALES Y EQUIPO
 - Balanza analítica
 - Micropipetas 1000 μ L
 - Micropipetas 100 μ L
 - Espectrofotómetro UV-VIS
 - Recirculador de agua

Procedimiento

Determinar la cinética de la reacción basándose en la aparición de producto (p-Nitrofenol) que imparte color a 430 nm. El substrato de la enzima a hidrolizar son 0.333 mL de p-nitrofenil- β -D-glucopiranósido (pNPG) 5 mM en buffer de acetatos 0.1M, pH 4.8. Se adicionan 0.6 mL de buffer de acetatos 0.1M, pH 4.8 y 0.066 mL de una dilución conocida de enzima. Se utiliza un recirculador de agua para tener una temperatura de 50°C y se mide el cambio de color durante 5 minutos a 430 nm, emperando un blanco de substrato. Para cuantificar la producción de p-Nitrofenol se compara con una curva estándar de p-Nitrofenol, utilizando sólo la parte lineal de la cinética. (Aburto *et al*, 2012).

6.4.5. Actividad de Xilanasas

El mayor componente hemicelulósico en la pared de las células vegetales es el xilano, tiene un esqueleto de residuos xilopiranosos unidos por enlaces β -1,4 y contienen varios grupos laterales substituidos por diferentes grupos, por ejemplo acetil, larabinofuranosil y 4-*o*-metilglucuronil. Las enzimas involucradas en la hidrólisis de la cadena principal de xilano son la endoxilanasas (1,4- β -D-xilanzilanhidrolasa; EC 3.2.1.8), la β -xilosidasa (β -D-xilosidaxilohidrolasa; EC 3.2.1.47) y la acetilxilanesterasa (EC 3.1.1.72) (Kosugi *et al*, 2002).

- REACTIVOS
 - Xilanasas
 - Xilano de madera de abedul
 - Buffer de fosfatos pH 7, 50 mM
 - DNS

- MATERIALES Y EQUIPO
 - Tubos de ensaye
 - Cronómetro
 - Balanza analítica
 - Baño de agua a ebullición
 - Evaporador (baño de temperatura con agitación) marca BÜCHI modelo Syncore P-101
 - Baño de agua helada
 - Espectrofotómetro UV-Vis
 - Potenciómetro

Procedimiento

Preparar una solución de xilano de madera de abedul al 0.2% (p/v) con buffer de fosfatos (pH 7, 50 mM) a 37°C, adicionar una cantidad conocida de enzima al tubo de reacción con el substrato previamente atemperado y dejar reaccionar por 10 minutos, a 50°C, 180 rpm. Detener la reacción colocando la mezcla en hielo. Cuantificar los azúcares reductores producidos usando la técnica de DNS. Una unidad de actividad enzimática se define como la cantidad de la enzima que libera 1 μ mol de xilosa por mL de muestra por minuto (Kosugi, *et al*, 2002).

6.4.6 Progreso de la reacción de las actividades enzimáticas

✓ Celulasas

Para determinar el progreso de la reacción en la actividad enzimática de celulasas se preparó una dilución de enzima. Se pesan 1.5 g de papel filtro Whatman # 1, doblar la tira en forma de escalones y colocarla en un tubo, adicionar 50 mL de buffer de citratos 0.05M, pH 4.8. Atemperar a 50°C y posteriormente agregar 15 mL la dilución de enzima preparada previamente. Colocar en un baño con agitación a 50° C, 180 rpm y cada 6 minutos durante 60 minutos, tomar una alícuota de 2 mL, inactivándola inmediatamente con agua a ebullición, para su posterior refrigeración. Después de haber inactivado las 10 muestras, filtrar utilizando filtros de 0.22 μ m. Determinar la cantidad de azúcares reductores, utilizando el método de DNS. Construir una gráfica de concentración de azúcares producidos por mL de enzima vs tiempo.

✓ Endocelulasas

En un tubo de ensaye de 50 mL de capacidad adicionar 25 mL de la solución diluida de enzima. Atemperar la solución de enzima y el substrato a 50°C, pasar 25 mL de la solución de CMC al 2% al tubo de reacción y mezclar bien. Incubar a 50°C, a 180 rpm y cada 15 minutos durante 180 minutos, tomar una alícuota de 2 mL, inactivándola inmediatamente con agua a ebullición, para su posterior refrigeración. Después de haber inactivado las 9 muestras, adicionar 1 mL de

reactivo de DNS y mezclar vigorosamente. Colocar los tubos en un baño de agua en ebullición durante 5 minutos. Enfriar los tubos en un baño de hielo para detener la reacción. Adicionar 8 mL de agua destilada tapar y mezclar. Leer la absorbancia a 540 nm usando un blanco de sustrato. Construir una gráfica de concentración de azúcares producidos por mL de enzima vs tiempo.

✓ Exocelulasas

Preparar 50 mL de una suspensión de Celulosa microcristalina al 1.25% (p/v) en buffer de acetatos 0.1 M, pH 4.8. Tomar 40 mL de esta suspensión y pasarla al tubo de reacción. Hacer una dilución de la enzima con buffer de acetatos. Equilibrar el sustrato y la solución de enzima en un baño de agua a 50° C. Adicionar 10 mL de la solución de la enzima al sustrato y mezclar bien. Incubar a 50°C, a 180 rpm y cada 10 minutos durante 120 minutos, tomar una alícuota de 2 mL, inactivándola inmediatamente con agua a ebullición, para su posterior refrigeración. Después de haber inactivado las muestras, pasar 1 mL del hidrolizado a tubos para microcentrifuga y centrifugar a 13000 g por 3 minutos. Determinar azúcares totales en el sobrenadante por el método de fenol sulfúrico, usando el blanco de sustrato como blanco, debido a que esta enzima libera celobiosa y oligosacáridos, los cuales pueden ser cuantificados por este método. Construir una gráfica de concentración de azúcares producidos por mL de enzima vs tiempo.

✓ β -glucosidasas

Repetir la metodología descrita previamente para la determinación de dicha actividad, recordando que el fundamento de ésta es la medición de la cinética de aparición de producto (p-nitrofenol) a partir de p-nitrofenil- β -D-glucopiranosido (pNPG).

✓ Xilanasas

Preparar 25 mL de una solución de xilano de madera de abedul al 0.2% (p/v) con buffer de fosfatos (pH 7, 50 mM) a 37°C y adicionar 25 μ l de una dilución de enzima al tubo de reacción, atemperado previamente con el sustrato. Incubar a 50°C, 180 rpm, y cada 2 minutos durante 10 minutos, tomar una alícuota de 2 mL, inactivándola inmediatamente con agua a ebullición, para su posterior refrigeración. Después de haber inactivado las muestras, cuantificar los azúcares reductores producidos usando la técnica de DNS. Construir una gráfica de concentración de azúcares producidos por mL de enzima vs tiempo.

6.4.7 Influencia de pH en Actividades enzimáticas

Para observar la influencia del pH sobre cada actividad enzimática, se determinaron las diferentes actividades (celulasas, xilanasas, β -glucosidasas, endocelulasas y exocelulasas) siguiendo la metodología desarrollada previamente, cambiando únicamente el pH del buffer (pH 2, 3, 4, 5, 6 y 7), tanto de acetatos, como de fosfatos y citratos, dependiendo de la actividad enzimática. Todas las determinaciones se realizaron a 50°C durante el tiempo especificado en la metodología para cada actividad.

6.4.8 Influencia de Temperatura en Actividades enzimáticas

Para analizar la influencia de la temperatura, se determinan las 5 actividades enzimáticas antes descritas (celulasas, xilanasas, β -glucosidasas, endocelulasas y exocelulasas) siguiendo la metodología desarrollada previamente, cambiando únicamente la temperatura del Syncore durante el tiempo de reacción (30, 40, 50 y 60°C). Se utilizó el pH y el tiempo indicado en la metodología para cada actividad.

6.4.9 Resistencia enzimática a la inactivación térmica

En la determinación de la resistencia enzimática a la inactivación térmica se realizan diferentes diluciones de enzima, las cuales se atemperan previamente durante una hora a diferentes temperaturas (20, 30, 40, 50 y 60°C), usando este

intervalo de temperaturas con la finalidad de observar el cambio en la actividad desde una temperatura ambiente, hasta una temperatura cercana a la hidrólisis enzimática. Después se determinó la actividad enzimática de celulasas, siguiendo la metodología para ello, a 50°C, con un buffer de citratos 0.05M, pH 4.8.

6.4.10 Inhibición por Substrato

Se determina la inhibición de la enzima por sustrato mediante la actividad de β -glucosidasas, basándose en una reacción de cinética por la aparición de *p*-nitrofenol a partir de *p*-nitrofenil- β -D-glucopiranosido (pNPG), utilizando además, una solución de celobiosa a diferentes concentraciones (5, 10, 20, 40, 60, 80 y 100 mM), partiendo de la más concentrada para hacer diluciones con buffer de acetatos 0.1 M pH 4.8. El sustrato de la enzima a hidrolizar son 0.333 mL de *p*-nitrofenil- β -D-glucopiranosido (pNPG) 5 mM en buffer de acetatos 0.1M, pH 4.8. Se adicionan 0.6 mL de las diferentes concentraciones de celobiosa en buffer de acetatos 0.1M, pH 4.8 y 0.066 mL de una dilución conocida de enzima. Se utiliza un recirculador de agua para tener una temperatura de 50°C y se mide el cambio de color durante 5 minutos a 430 nm, empujando un blanco de sustrato. Para cuantificar la producción de *p*-Nitrofenol se compara con una curva estándar de *p*-Nitrofenol, utilizando sólo la parte lineal de la cinética. (Aburto *et al*, 2012).

6.4.11 Inhibición por Producto

Se determina la inhibición de la enzima por producto mediante la actividad de β -glucosidasas. Se emplea una solución de glucosa a diferentes concentraciones (0.005, 0.01, 0.02 y 0.03 M), partiendo de la más concentrada para hacer diluciones con buffer de acetatos 0.1 M pH 4.8. El sustrato de la enzima a hidrolizar son 0.333 mL de *p*-nitrofenil- β -D-glucopiranosido (pNPG) 5 mM en buffer de acetatos 0.1M, pH 4.8. Se adicionan 0.6 mL de las diferentes concentraciones de glucosa en buffer de acetatos 0.1M, pH 4.8 y 0.066 mL de una dilución conocida de enzima. Se utiliza un recirculador de agua para tener una temperatura de 50°C y se mide el cambio de color durante 5 minutos a 430 nm, empujando un blanco de sustrato. Para cuantificar la producción de *p*-Nitrofenol se compara con

una curva estándar de p-Nitrofenol, utilizando sólo la parte lineal de la cinética. (Aburto *et al*, 2012).

6.5 TRATAMIENTO DE LAS MUESTRAS

6.5.1 Muestras

Para la segunda parte experimental, se escogieron 3 residuos lignocelulósicos: Pasto Taiwán (Malla 60), Bagazo de Caña (Malla 60) y Residuos de Malta (Malla 60-80), a los cuales se les determinó la humedad con Termobalanza MB 35 Halogen marca OHAUS, pesando un mínimo de 500 mg.

6.5.2 Pretratamiento

Al analizar los resultados obtenidos en diferentes investigaciones, se escogió un tratamiento básico-oxidante para los 3 materiales. El pretratamiento con peróxido de hidrógeno (agente oxidante) aumenta la susceptibilidad a la hidrólisis enzimática al eliminar cerca del 50% de la lignina y la mayoría de la hemicelulosa, las cuales son solubilizadas liberando la glucosa durante la sacarificación (Azzam, 1989; Cuervo, 2009). Además, el hidróxido de sodio produce un hinchamiento, permitiendo un incremento en el área de superficie interna reduciendo el grado de polimerización y cristalinidad de la celulosa, causando la separación de las uniones estructurales entre la lignina y los carbohidratos (Fan *et al*, 1987; Cuervo, 2009).

- **REACTIVOS**

- NaOH
- H₂O₂ al 7.5%
- Agua destilada
- Fenol al 5% (p/v)
- H₂SO₄ concentrado

- MATERIALES Y EQUIPO

- Potenciómetro
- Vasos de precipitado de 50 y 100 mL
- Espátula
- Agitador
- Matraz aforado de 100 mL
- Pipetas de 5 y 10 mL
- Evaporador (baño de temperatura con agitación) marca BÜCHI modelo Syncore P-101
- Tubos para microcentrífuga
- Microcentrífuga
- Estufa

Procedimiento

Preparar una solución de H₂O₂ al 7.5%, con un pH de 11.5, ajustándolo con NaOH. Pesar en un tubo 1 g de cada material y agregar 6.65 mL de la solución de H₂O₂ al 7.5%, pH 11.5. Agitar moderadamente e incubar a 50°C, por 24 horas a 150 rpm. Pasado el tiempo, pasar la muestra a tubos eppendorf y centrifugar a 13000 rpm durante 10 minutos. Medir el volumen de sobrenadante obtenido, al cual se le determinan azúcares totales. El material sólido se lava con buffer de citratos pH 4.8 0.05 M, hasta que el filtrado tenga el mismo pH del buffer, para después someterlo a secado en estufa a 30°C, durante 24 horas. El pasto Taiwán y el bagazo de caña se sometieron a secado; para los residuos de malta se trabajó con el material en base húmeda.

6.5.3 Hidrólisis Enzimática

Dentro del proceso de obtención de etanol a partir de residuos lignocelulósicos, la hidrólisis enzimática es un paso fundamental para obtener azúcares utilizables en la fermentación. Sin embargo, este procedimiento biotecnológico también puede aplicarse al aprovechamiento integral de los agorresiduos con la finalidad de

obtener productos de mayor valor agregado y como una alternativa verde y sustentable dentro de los procesos industriales. (López *et al*, 2011).

Del material pretratado y secado, se pesaron 50 mg en un tubo y se añadieron 455 μ L de buffer de citratos, pH 4.8 0.05 M. Se atemperó durante 5 minutos a 50°C y se agregaron 45 μ L de cada cóctel enzimático original (E9 y E10), a razón de 0.9 μ L de cóctel por cada gramo de material. Se dejó reaccionar por una hora, a 50°C, 180 rpm. Pasado el tiempo, se inactivó la reacción sumergiendo los tubos en agua a ebullición. Se realizó un aforo a 5 mL y se centrifugó a 13000 rpm durante 10 minutos. Al sobrenadante se le determinaron azúcares reductores y totales y se filtró con un filtro de 0.22 μ m para ser analizado en el HPLC.

6.5.4 Cuantificación e Identificación de Azúcares mediante Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (HPLC)

Se utilizó una columna con una fase estacionaria polar aminada marca Restek, Ultra C18 de 5 μ m, 250X4.6 mm. La fase móvil empleada fue una mezcla de acetonitrilo y agua. Se llevó a cabo una elución en gradiente de la fase móvil, que consiste en el cambio continuo de la composición del eluyente en sentido de aumento de fuerza eluyente. En una separación de fase normal, los componentes menos polares aparecen primero, debido a que relativamente son los más afines a la fase móvil. La fuerza eluyente aumenta a medida que el disolvente se hace más polar, es decir, disminuye el tiempo de retención de los compuestos (Harris, 2007; Gomis, 2008).

El analito se pasa a través de la columna con la fase estacionaria bombeando la fase móvil líquida con alta presión. La muestra se introduce en pequeños volúmenes a la corriente de la fase móvil y allí se retarda por medio de interacciones químicas con la fase estacionaria mientras atraviesa la columna. Este retardo se conoce como tiempo de retención, único para cada analito y el cual depende de la naturaleza del analito, de la fase estacionaria y de la composición de la fase móvil (Gómez y Serrano, 2006). La identificación y determinación de los analitos se realizó mediante un detector de dispersión de luz

(ELSD). El efluente de la columna se pasa a un nebulizador donde se convierte en una fina niebla mediante un flujo de nitrógeno. Las finas gotitas se llevan a través de un tubo de conducción a temperatura controlada donde tiene lugar la evaporación de la fase móvil, lo que origina unas finas partículas de analito. La nube de partículas de analito pasa a través de un haz de láser. Mediante un fotodiodo de silicio se detecta la radiación dispersada perpendicularmente al flujo (Gomis, 2008). Usar HPLC con ELSD elimina la necesidad de usar bases fuertes o alto pH, convirtiéndose en un método no destructivo (Gómez y Serrano, 2006).

Tabla 6. Condiciones del Método de HPLC

PARÁMETRO	CONDICIÓN
Temperatura del detector	80°C
Ganancia	7
Filtro	4
Presión detector	3.5 bar
Temperatura de la Columna	30°C
Flujo	1mL/min
Tiempo de corrida	17 min
Volumen de inyección	10 µL
Fase móvil	Agua 31%, Acetonitrilo 69%
Rampa	Relación de Acetonitrilo final 69%

Procedimiento

Se empleó el método del estándar interno (EI). Este método es conocido como calibración relativa o indirecta; para ello, relación de masas conocidas de un patrón de la muestra y de un estándar deber ser preparadas e inyectadas al cromatógrafo para luego determinar las relaciones de área. (Universidad Central

de Venezuela, 2008). Se prepararon previamente curvas de calibración con diferentes concentraciones de azúcares tales como xilosa, fructosa, manosa, glucosa, sacarosa, celobiosa y maltosa, en concentraciones de 0.1 a 1 mg/mL. (Anexo E), con la finalidad de obtener las relaciones de área para cuantificar los azúcares y los tiempos de retención para identificarlos. Las muestras a analizar fueron filtradas con filtros de 0.22 μm , usando como estándar interno la alanina en una concentración de 300 $\mu\text{g/mL}$. El ensayo se realizó con 900 μL de la muestra a analizar y 100 μL de la alanina. De las áreas obtenidas, se compararon con las curvas de calibración para identificar y cuantificar los azúcares.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 Azúcares Totales, Azúcares Reductores y Cantidad de Proteína en los cócteles enzimáticos comerciales E9 y E10

Los jarabes enzimáticos comerciales contienen azúcares ya que funcionan como crioprotectores, los cuales son de bajos pesos moleculares y no permeables, tales como la galactosa, la glucosa, la sacarosa y la trehalosa, entre otros azúcares. Los crioprotectores son necesarios debido a que previenen el daño enzimático tanto en el proceso de enfriamiento como en el de calentamiento (CryoBioTech, 2009). De los dos cócteles enzimáticos comerciales E9 y E10, se determinaron la cantidad de azúcares totales por el Método de Fenol-Sulfúrico, azúcares reductores por el Método de DNS y la cantidad de Proteína por el Método de Bradford. Las primeras dos determinaciones se hicieron con la finalidad de conocer la cantidad de azúcares presentes en ambos cócteles y con ello hacer un ajuste en cada una de las mediciones de las actividades realizadas posteriormente, es decir, trabajar dichos valores como blancos de enzima. Es importante resaltar que para cuantificar los azúcares totales y azúcares reductores el cóctel no recibió ningún tratamiento, por lo que se hizo una dilución conocida de enzima y directamente se cuantificaron azúcares totales y reductores por los métodos antes mencionados. La proteína fue cuantificada ya que es necesario conocer la cantidad de la misma para calcular las actividades específicas de los dos cócteles.

CÓCTEL ENZIMÁTICO	AZÚCARES TOTALES (mgAT/mLE)	AZÚCARES REDUCTORES (mgAR/mLE)	PROTEÍNA (mgP/mLE)
E9	723.65 ± 2.47	110.15 ± 1.43	98.69 ± 1.54
E10	613.83 ± 1.64	329.83 ± 1.88	132.16 ± 0.47

Tabla 7. Contenido de Azúcares Totales, Azúcares Reductores y Proteína en los cócteles enzimáticos comerciales E9 y E10. Cada determinación se realizó por triplicado.

De acuerdo a los resultados obtenidos, se observa que ambos cócteles tienen un alto contenido de azúcares, los cuales son necesarios para prevenir el daño enzimático a causa de cambios térmicos por conservación. El uso comercial de azúcares como crioprotectores de los cócteles enzimáticos está permitido, pero es necesario realizar blancos de enzima para que al determinar las diferentes actividades enzimáticas, no sean cuantificados. En el caso de los azúcares totales se encontraron grandes concentraciones comparándolos con los azúcares reductores, donde la concentración es menor, lo que indica que los cócteles tienen como crioprotector sacarosa.

El cóctel E9 presentó un menor contenido de azúcares reductores comparado con E10, el cual presenta más del doble del E9; pero en azúcares totales, E9 fue el cóctel que presentó un mayor contenido de azúcares. Esto es posible, ya que por el método DNS se cuantifican únicamente carbohidratos reductores y por el método Fenol-Sulfúrico se cuantifican todos los azúcares, como monosacáridos, oligosacáridos y polisacáridos.

En cuanto al contenido de proteína, el cóctel enzimático E10 obtuvo un valor más alto que el cóctel E9, lo que es importante considerar, ya que incluso el contenido de proteína influye en el cálculo de las actividades enzimáticas específicas, debido a que para calcular dicha actividad, se considera el contenido de proteína en el cóctel. Es importante recordar que las enzimas son proteínas, por lo que la cantidad de proteína se utiliza para determinar la actividad específica, que es el número de unidades de enzima por miligramo de proteína (U/mg proteína); es decir, conocer qué actividad presenta el cóctel enzimático tomando en cuenta la cantidad de proteína en cada caso.

7.2 Determinación de las diferentes Actividades Enzimáticas para los cócteles enzimáticos comerciales E9 y E10

7.2.1 Actividad Enzimática de Celulasas (FPU)

Las celulasas son proteínas derivadas de los procesos naturales de fermentación, capaces de degradar la celulosa. En realidad, el término celulasa implica una mezcla de diversos componentes enzimáticos, formando lo que se denomina un “complejo enzimático”, que actúa de forma sinérgica en la degradación de la celulosa (Carrillo, 2002). Por lo descrito anteriormente, se debe de considerar que la actividad enzimática de celulasas, representada por los FPU/mL (Filter Paper Unit), abarca todas las actividades relacionadas con la hidrólisis de la celulosa, es decir, endocelulasas, exocelulasas, hemicelulasas y β -glucosidasas.

Para esta determinación es necesario realizar diferentes diluciones de enzima y determinar los azúcares reductores generados, con la finalidad de tener puntos cercanos a la producción de 2 mg de azúcares por medio mL de enzima; con dichos valores se elabora una regresión lineal para que, mediante la ecuación de la recta, se calcule la dilución de enzima a la cual se producen 2 mg de glucosa por cada 0.5 mL de enzima (Figura 15). Con los resultados obtenidos se observa que el cóctel comercial enzimático E9 presenta una mayor actividad celulolítica comparada con la del cóctel enzimático E10 (Tabla 8), lo que indica que es probable que usando dicha enzima se tengan mejores resultados en la hidrólisis enzimática, en dado caso de que el substrato a degradar sea la celulosa.

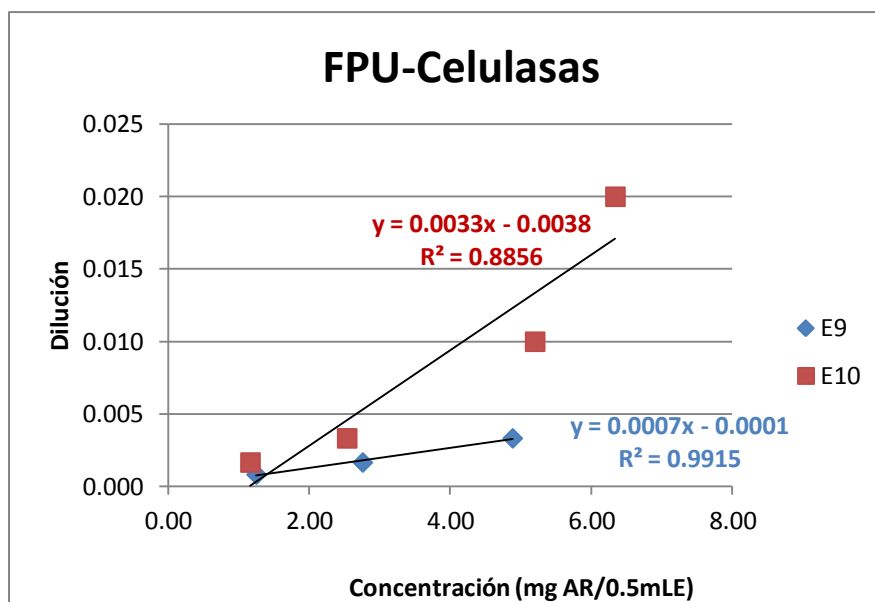


Figura 15. Determinación de la actividad FPU de celulasas de los cócteles enzimáticos comerciales E9 y E10. Se realizó un ensayo a diferentes diluciones, graficándose únicamente los puntos cercanos a los 2 mg de glucosa necesarios.

CÓCTEL ENZIMÁTICO	ACTIVIDAD VOLUMÉTRICA		ACTIVIDAD ESPECÍFICA	
	(FPU/mL)	(IU/mL)	(FPU/mgP)	(IU/mgP)
E9	284.62	274.17±4.52	2.88	2.77±0.04
E10	132.14	134.92±8.16	1.00	1.02±0.06

Tabla 8. Actividades FPU volumétrica y específica de celulasas para los cócteles enzimáticos comerciales E9 y E10.

7.2.2 Actividad Enzimática de Endocelulasas

Las endocelulasas, también llamadas endoglucanasas, actúan sobre las regiones internas de la celulosa amorfa en el interior del polisacárido, generando oligosacáridos de diferentes tamaños y, por lo tanto, nuevas cadenas terminales (Martínez *et al*, 2008). Esta actividad es importante en la degradación de la celulosa debido a que ayuda a formar azúcares de menor tamaño, y además, al dejar nuevas cadenas terminales favorece la acción sinérgica con otras enzimas.

Para la determinación de actividad de endocelulasas se realizan diferentes diluciones del cóctel para hacer una regresión lineal con la finalidad de ver a qué dilución de enzima se producen 0.5 mg de glucosa por mL de enzima (Figura 16). En este caso, el cóctel enzimático E9 obtuvo una mayor actividad enzimática de endocelulasas en comparación con el cóctel E10 (Tabla 9), lo que indica que el cóctel E9 puede presentar mayor actividad sinérgica, y con ello facilitar la acción de otras enzimas como son las exocelulasas y posteriormente las β -glucosidasas, y por ende, la formación de azúcares de menor tamaño, lo que es favorable para los microorganismos en la posterior fermentación.

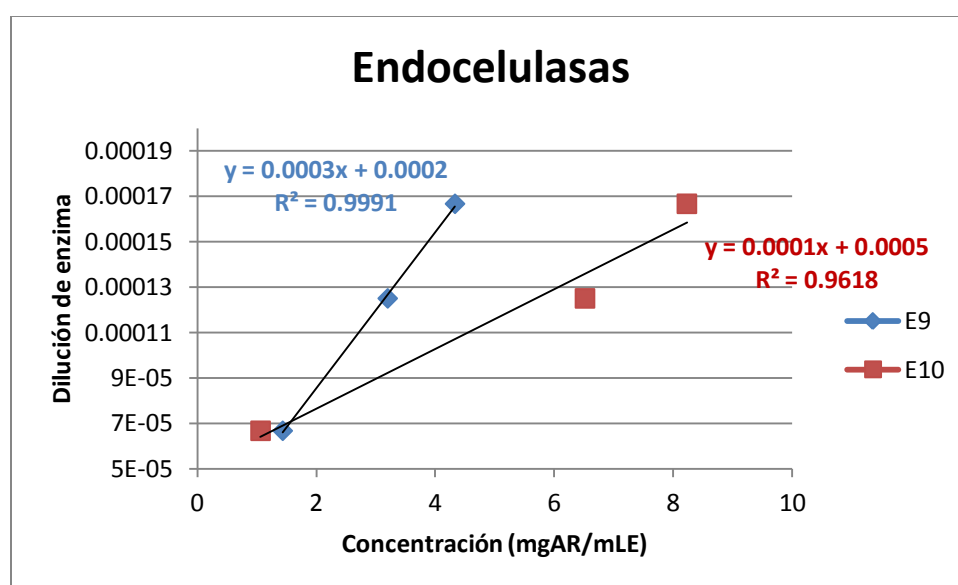


Figura 16. Determinación de la actividad enzimática de endocelulasas de los cócteles enzimáticos comerciales E9 y E10. Se realizó un ensayo a diferentes diluciones, graficándose únicamente los puntos cercanos a los 0.5 mg de glucosa necesarios.

CÓCTEL ENZIMÁTICO	ACTIVIDAD VOLUMÉTRICA IU/mL	ACTIVIDAD ESPECÍFICA IU/mgP
E9	881.05	8.93
E10	560.67	4.24

Tabla 9. Actividades enzimáticas volumétricas y específicas de endocelulasas para los cócteles enzimáticos comerciales E9 y E10 calculadas utilizando la pendiente de la gráfica para la actividad de Endocelulasas.

*NOTA: International Units (IU)= μ mol glucosa/min.

7.2.3 Actividad Enzimática de Exocelulasas

Las exocelulasas son también conocidas como exoglucanasas y actúan en los extremos terminales del polímero liberando moléculas de glucosa o de celobiosa (Baldrian y Valaskova, 2008; Martínez *et al*, 2008). Esta actividad es la responsable de liberar celobiosa, y actuar sinérgicamente con las β -glucosidasas, proveyéndole el substrato necesario para su actividad.

En este caso, el cóctel enzimático comercial E9 presentó una mayor actividad enzimática de exocelulasas comparado con el cóctel enzimático E10 (Tabla 10). Lo que indica que esta enzima libera más extremos terminales, y por consiguiente, genera más glucosa o celobiosa a partir de los oligosacáridos presentes, lo que ayuda a formar azúcares de menor tamaño y a favorecer la posterior conversión a glucosa con la ayuda de otra enzima (β -glucosidasas). En este caso es importante notar que el ajuste de blanco de enzima se realiza con el valor previamente obtenido de azúcares totales en ambos cócteles enzimáticos (Tabla 7).

CÓCTEL ENZIMÁTICO	ACTIVIDAD VOLUMÉTRICA (IU/mL)	ACTIVIDAD ESPECÍFICA (IU/mgP)
E9	116.69 \pm 2.22	1.18 \pm 0.02
E10	74.60 \pm 2.72	0.56 \pm 0.02

Tabla 10. Actividades enzimáticas volumétricas y específicas de exocelulasas para los cócteles enzimáticos comerciales E9 y E10. Cada determinación se realizó por triplicado. *NOTA: International Units (IU)= μ mol glucosa/min.

7.2.4 Actividad Enzimática de β -glucosidasas

La β -glucosidasa es un tipo de enzima que se encarga de degradar la celobiosa a monómeros de glucosa (Schmid y Wandrey, 1987; Lynd *et al*, 2002; Baldrian y Valaskova, 2008; Martínez *et al*, 2008). Es por ello que es importante que al degradar la celulosa, la actividad enzimática de β -glucosidasa se favorezca, ya

que gracias a ella se genera la glucosa necesaria para el crecimiento microbiano y la producción de bioetanol.

Como el sustrato de dicha enzima es la celobiosa, requiere de la acción sinérgica de las demás celulasas (endo y exocelulasas), para que con los cortes realizados por las dos enzimas, se genere dicho sustrato. Con los resultados obtenidos se observa que el cóctel enzimático comercial E9 presenta una mayor actividad de β -glucosidasas, al ser comparado con el cóctel enzimático E10 (Tabla 11), lo que favorece la producción de glucosa en la hidrólisis enzimática de la celulosa.

CÓCTEL ENZIMÁTICO	ACTIVIDAD VOLUMÉTRICA (IU/mL)	ACTIVIDAD ESPECÍFICA (IU/mgP)
E9	7088.66 \pm 18.48	71.83 \pm 0.19
E10	667.37 \pm 54.29	5.05 \pm 0.41

Tabla 11. Actividades enzimáticas volumétricas y específicas de β -glucosidasas para los cócteles enzimáticos comerciales E9 y E10. Cada determinación se realizó por triplicado.

*NOTA: International Units (IU)= μ mol p -nitrofenol/min.

7.2.5 Actividad Enzimática de Xilanasas

Las xilanasas actúan depolimerizando las moléculas de xilano en unidades de pentosas monoméricas, que son usadas por bacterias y hongos como fuente de carbono (Hernández y Paz, 2000). Son enzimas que catalizan la hidrólisis de los enlaces glicosídicos de hemicelulosas, como el xilano, presentes en las fibras celulósicas. Estas hemicelulosas se encuentran, en cierta forma, en una situación estructural intermedia entre las cadenas ordenadas de celulosa y la fracción amorfa de lignina. El efecto positivo de la xilanasas en la hidrólisis del material lignocelulósico se atribuye a la eliminación de estos xilanos, haciendo que desaparezca la unión existente entre celulosa y lignina (De la Rosa, 2003; Roncero *et al*, 2003). Es por ello, que además de necesitar a las celulasas para degradar a los residuos lignocelulósicos, también se requiere de las xilanasas para

favorecer el ataque de las celulasas al haber depolimerizado el xilano, convirtiéndolo en carbohidratos más simples.

Al evaluar la actividad de xilanasas en los dos cócteles enzimáticos comerciales, se obtuvo que el cóctel E10 presenta una mayor actividad volumétrica (Tabla 12), pero si se considera la cantidad de proteína en cada enzima, y se comparan las actividades específicas, el cóctel E9 es el que presenta una mayor actividad enzimática de xilanasas, al tener un menor contenido de proteína. En este caso se comprueba que es más certero el comparar las actividades en función de su actividad específica, y no de la actividad volumétrica. Además se comprueba que el hecho de que el cóctel presente una mayor cantidad de proteína no significa que su actividad sea más alta, ya que la xilanasas no es la única proteína presente en el cóctel.

CÓCTEL ENZIMÁTICO	ACTIVIDAD VOLUMÉTRICA IU/mL	ACTIVIDAD ESPECÍFICA IU/mgP
E9	319.32 ± 6.45	3.24 ± 0.07
E10	364.58 ± 7.62	2.76 ± 0.06

Tabla 12. Actividades enzimáticas volumétricas y específicas de xilanasas para los cócteles enzimáticos comerciales E9 y E10. Cada determinación se realizó por triplicado.

*NOTA: International Units (IU)= $\mu\text{mol xilosa/min}$.

7.3 Determinación del progreso de reacción de los cócteles enzimáticos comerciales E9 y E10

Se realizaron experimentos preliminares en los que se determinó el progreso de reacción para cada tipo de actividad enzimática, con la finalidad de saber el orden de reacción, y en su caso, reducir o aumentar el tiempo de reacción, para cerciorarse de que la actividad enzimática se midiera en el tiempo indicado.

7.3.1 Progreso de reacción de la actividad enzimática de Celulasas

En la figura 17 se observa que para ambos cócteles enzimáticos comerciales (E9 y E10), se tiene aún un aumento lineal en la producción de azúcares reductores por la enzima transcurridos los 50 minutos de la reacción, lo que significa que el tiempo al que se está determinando la actividad enzimática de celulasas es el indicado, debido a que la relación entre la concentración y el tiempo es lineal, por lo que la velocidad de la reacción es constante a lo largo de los primeros 50 minutos. Aunque la determinación de la actividad de FPU para Celulasas especifica que el ensayo debe realizarse a una hora de reacción (Aburto *et al*, 2012), se puede llevar a cabo en un tiempo menor, ya que la medición realizada demuestra que el comportamiento de la reacción durante esa hora es de primer orden, es decir, que la velocidad de la reacción es proporcional a la concentración de sustrato, por lo que la velocidad específica, representada por la pendiente, es constante durante este tiempo.

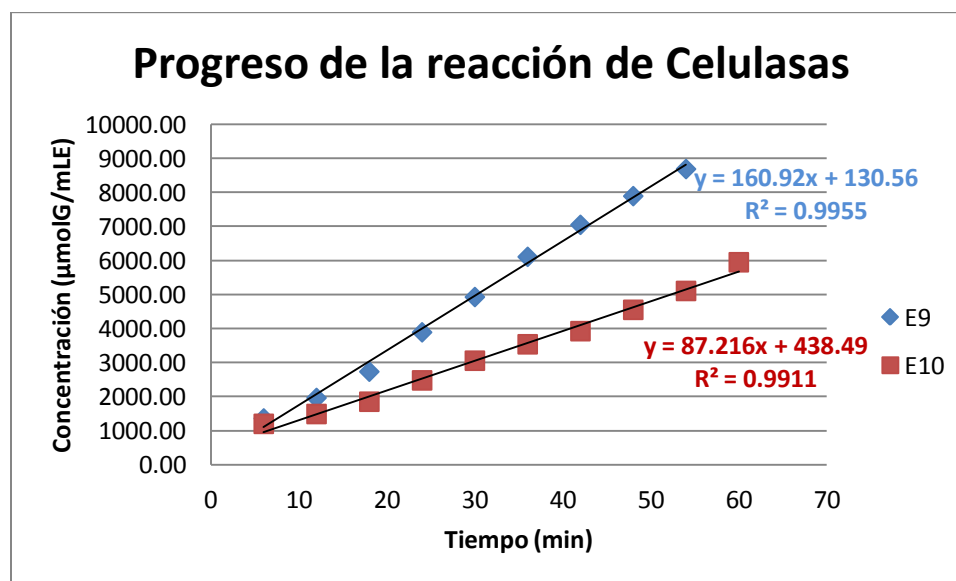


Figura 17. Progreso de la reacción de la actividad de Celulasas para ambos cócteles enzimáticos (E9 y E10). Sólo se realizó un ensayo para cada cóctel enzimático.

7.3.2 Progreso de la reacción de la actividad enzimática de Endocelulasas

Para el cóctel enzimático comercial E9, se observa que la concentración de azúcares reductores generados con el paso del tiempo va incrementando de manera lineal, hasta alcanzar los 100 minutos de reacción (Figura 18), lo que indica que la velocidad de la reacción es constante al tener una correlación lineal entre la concentración de producto generado y el tiempo, o incluso que la enzima se ha inactivado.

En cambio, para el cóctel enzimático comercial E10, se tiene un incremento de azúcares en los primeros 45 minutos, y después se observa un decremento de azúcares a los 60 minutos, pero que incrementa linealmente con el paso del tiempo, hasta alcanzar los 180 minutos; este descenso de azúcares puede deberse al error experimental, ya que dicha determinación sólo se realizó una vez (experimento preliminar). Es importante resaltar que a diferencia de E9, E10 presentó un comportamiento lineal hasta el final de la reacción, es decir, transcurridos los 180 minutos.

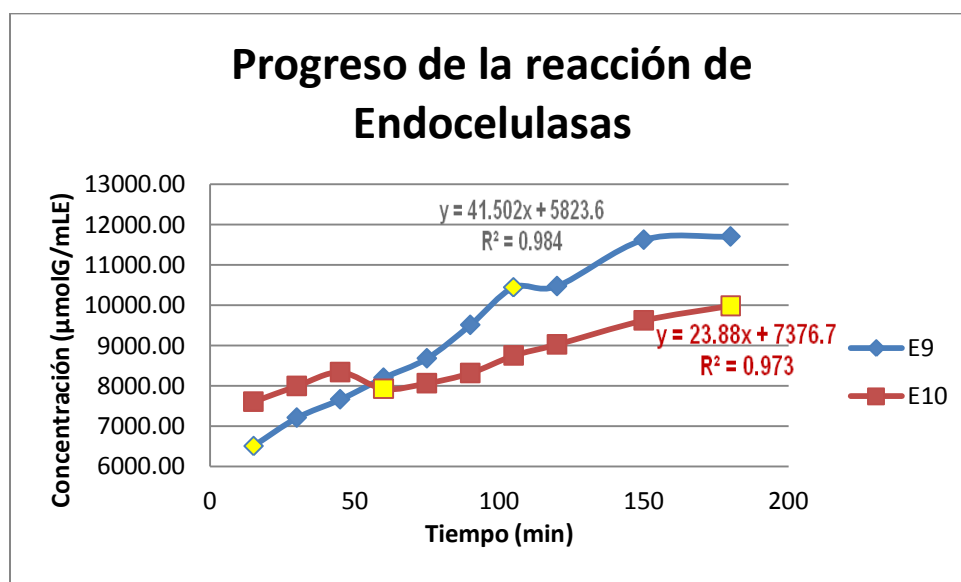


Figura 18. Progreso de la reacción de la actividad enzimática de Endocelulasas para ambos cócteles enzimáticos (E9 y E10). Cada determinación sólo se realizó una vez. Los recuadros amarillos indican de qué punto a qué punto se realizó la

regresión lineal. La velocidad inicial para el E9 fue de 34.10 $\mu\text{molG/mLE}$ y para E10 de 14.00 $\mu\text{molG/mLE}$.

7.3.3 Progreso de la reacción de la actividad enzimática de Exocelulasas

Como se puede observar en la figura 19, el cóctel enzimático comercial E10 aún sigue presentando incremento de azúcares reductores pasados los 120 minutos de reacción, lo que significa que la enzima aún sigue hidrolizando a la celulosa microcristalina, por lo existe suficiente sustrato para la actividad de exocelulasas. En cambio, para el cóctel enzimático comercial E9, la producción de azúcares presenta una tendencia lineal hasta los 100 minutos, y entre los 100 y 120 minutos de reacción, la concentración de azúcares totales producidos no incrementan significativamente, lo que indica que el sustrato presente en la reacción está en pequeñas cantidades, o incluso que la enzima se encuentra inactiva a este tiempo.

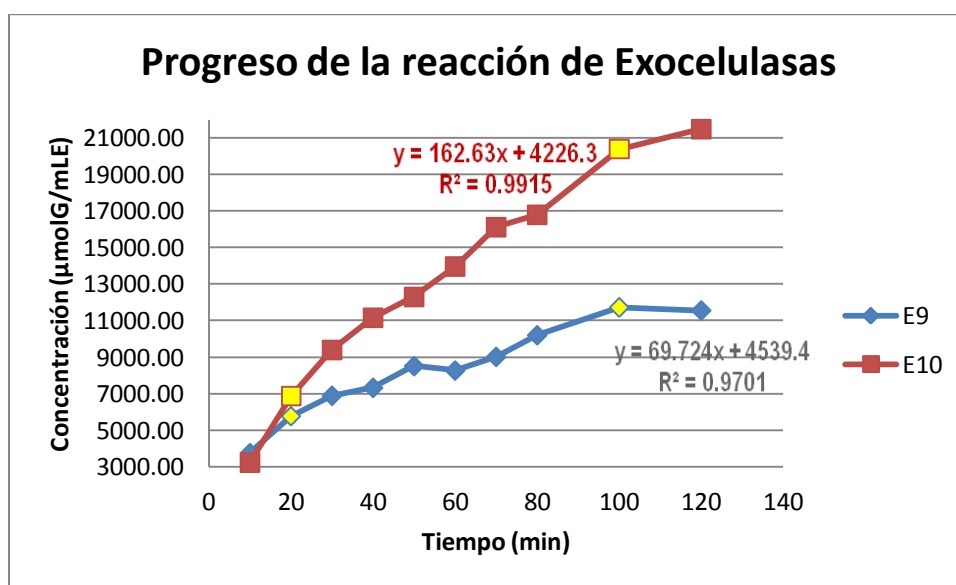


Figura 19. Progreso de la reacción de la actividad de Exocelulasas para ambos cócteles enzimáticos (E9 y E10). Cada determinación sólo se realizó una vez. Los recuadros amarillos indican de qué punto a qué punto se realizó la regresión lineal. La velocidad inicial para el E9 fue de 68.65 $\mu\text{molG/mLE}$ y para E10 de 161.41 $\mu\text{molG/mLE}$.

7.3.4 Progreso de la reacción de la actividad enzimática de β -glucosidasas

Para el cóctel enzimático E9, el progreso de la reacción durante los primeros 43 segundos es lineal (Figura 20), lo que indica que la enzima está hidrolizando al sustrato presente en la reacción. Después de ese tiempo, el comportamiento comienza a ser de curva hiperbólica, lo que indica que el sustrato presente en el medio de reacción comienza a disminuir, al ser hidrolizado por la enzima conforme pasa el tiempo. Es por esto, que la determinación de la actividad de β -glucosidasas puede realizarse en un tiempo menor, para determinarla en la parte lineal de la curva, o incluso se puede hacer una dilución mayor al cóctel enzimático, con la finalidad de que la parte lineal de la curva se prolongue por más tiempo.

En cambio, para el cóctel enzimático comercial E10 el progreso de la reacción es lineal durante los 5 minutos de reacción (Figura 20), lo que indica que la enzima aún tiene sustrato por hidrolizar y por ende, que la velocidad durante ese tiempo es constante, por lo que se puede reducir el tiempo de reacción. El cambio en el comportamiento de ambas enzimas se debe a que el cóctel E9 hidroliza al sustrato en un menor tiempo, es decir, la velocidad es mayor; en cambio, el cóctel E10 tarda más tiempo en hidrolizar el sustrato, por lo que la velocidad es menor.

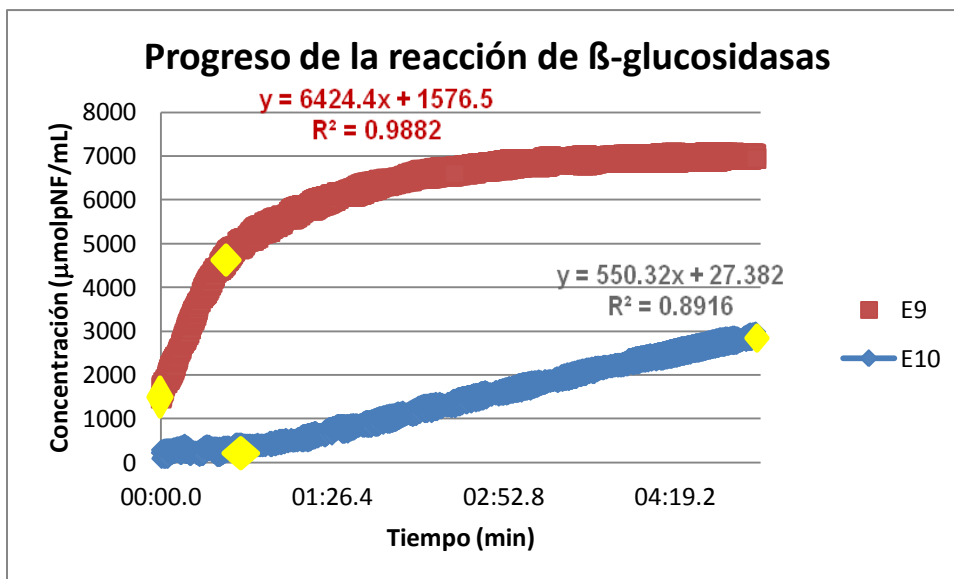


Figura 20. Progreso de la reacción de la actividad de β-glucosidasas para los cócteles enzimáticos comerciales E9 y E10. Cada determinación sólo se realizó una vez. Los recuadros amarillos indican de qué punto a qué punto se realizó la regresión lineal.

7.3.5 Progreso de la reacción de la actividad enzimática de Xilanasas

Como se puede observar, para el caso del cóctel enzimático E9, el progreso de la reacción para la actividad de xilanasas después de los 10 minutos establecidos en la bibliografía, demuestra que se siguen generando azúcares reductores como producto de la hidrólisis del xilano, siendo algo parecido a lo que ocurre con el cóctel enzimático E10 (Figura 21). A pesar de que se para la reacción pasados los 10 minutos, la figura muestra que la enzima sigue hidrolizando substrato, pero al ser la parte lineal de la curva, la pendiente es la misma, por lo que no existe diferencia significativa en la velocidad, que representa la cantidad de glucosa que se forma por unidad de tiempo.

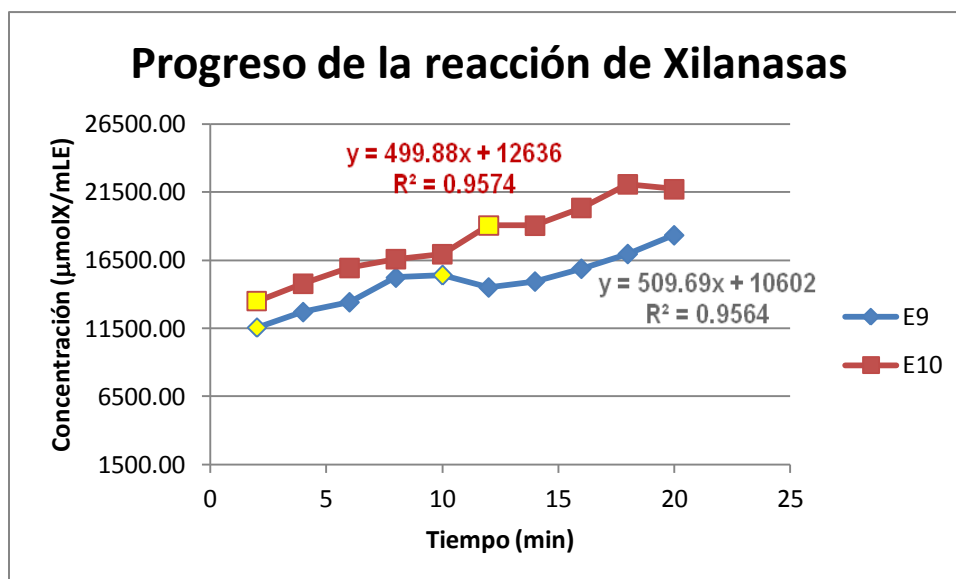


Figura 21. Progreso de reacción de la actividad de Xilanasas para ambos cócteles enzimáticos (E9 y E10). Cada determinación sólo se realizó una vez. Los recuadros amarillos indican de qué punto a qué punto se realizó la regresión lineal. La velocidad inicial para el E9 fue de 307.81 $\mu\text{molG}/\text{mLE}$ y para E10 de 475.18 $\mu\text{molG}/\text{mLE}$.

Tabla 13. Velocidades para las diferentes actividades enzimáticas determinadas en ambos cócteles enzimáticos (E9 y E10).

ACTIVIDAD ENZIMÁTICA	VELOCIDAD CÓCTEL E9 $\left(\frac{\mu\text{molPr}}{\text{mL}\cdot\text{min}}\right)$	VELOCIDAD CÓCTEL E10 $\left(\frac{\mu\text{molPr}}{\text{mL}\cdot\text{min}}\right)$
Celulasas	160.92	87.22
Endocelulasas	41.50	23.88
Exocelulasas	162.63	69.72
β -glucosidasas	6424.40	550.32
Xilanasas	509.69	499.88

NOTA 4: Los μmol de producto dependen de la actividad enzimática.

Al analizar las velocidades iniciales de las diferentes actividades enzimáticas se observa que el cóctel enzimático comercial E9 presenta en todas las actividades una mayor velocidad inicial, lo que indica que dicho cóctel realiza la hidrólisis del sustrato a producto en un menor tiempo, a diferencia del cóctel enzimático comercial E10, el cual presenta velocidades considerablemente menores, con excepción de la actividad de xilanasas, donde la diferencia entre ambos cócteles fue de 10 μmol de xilosa, por lo que se concluye que el cóctel E9 es el que presenta enzimas con mayor actividad y por ende, que realizan la correspondiente hidrólisis en un menor tiempo.

7.4 Influencia del pH en las diferentes Actividades Enzimáticas de los cócteles enzimáticos comerciales E9 y E10

La actividad de una enzima se ve afectada por el pH al cual se lleva a cabo la reacción. La curva de actividad enzimática contra pH puede ser diferente para cada tipo de enzima, pero en general tiene forma de campana, presentando una actividad máxima en el denominado pH óptimo. La relación entre el pH y la actividad depende del comportamiento ácido-base de la enzima y, sabiendo que las enzimas son proteínas, cualquier cambio brusco de pH puede alterar el carácter iónico de los grupos amino y carboxilo en la superficie proteica, afectando así las propiedades catalíticas de una enzima. A pH alto o bajo se puede producir la desnaturalización de la enzima y, en consecuencia, su inactivación (Figura 22).

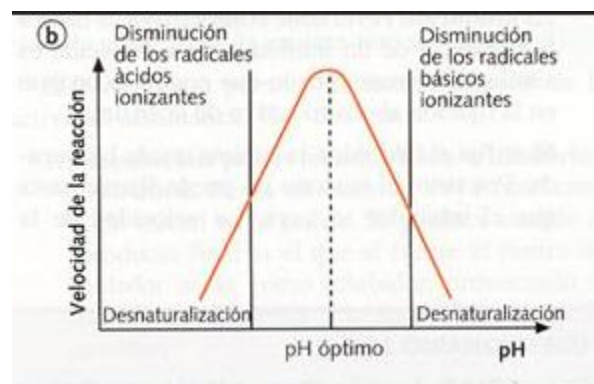


Figura 22. Variación de la actividad enzimática con el pH. (Fuente: Biología Sur, 2010).

7.4.1 Influencia del pH en la Actividad enzimática de Celulasas

Como se puede observar (Figura 23), para el caso del cóctel E9, la máxima actividad enzimática se obtuvo a un pH de 5, que es cercano al que se usó para determinar la actividad enzimática en FPU, que es de 4.8. Esto significa que a este valor de pH, las interacciones entre el grupo amino y carboxilo, así como de los grupos ionizables de la proteína hacen que su estado iónico sea el más adecuado para llevar a cabo la hidrólisis enzimática.

En cambio, para el cóctel enzimático comercial E10, la actividad más alta se obtuvo en un pH de 3.07, el cual está una unidad por debajo de lo sugerido en la bibliografía para la determinación de dicha actividad (Aburto *et al*, 2012); por lo que es necesario realizar una modificación al pH para favorecer la interacción iónica entre la enzima y el sustrato, es decir, que los grupos ionizables presentes en la enzima favorezcan su interacción con el sustrato para llevar a cabo la hidrólisis. (Figura 23). La presencia de dos picos es debido a que, al ser un cóctel, se encuentran diferentes enzimas presentes en el mismo, por lo que es probable que en un pH cercano a 5 se favorezca una actividad diferente, siendo probablemente la de endocelulasas.

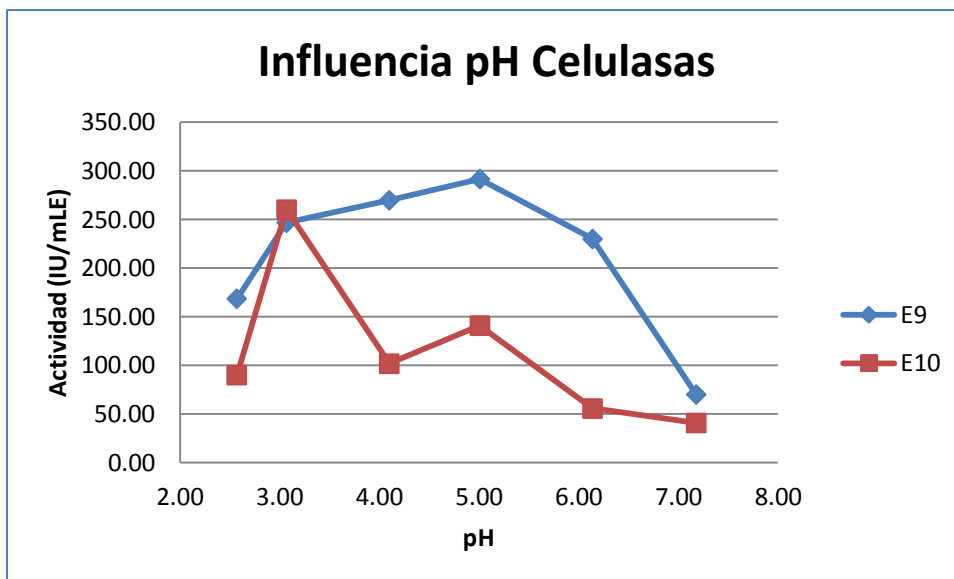


Figura 23. Influencia del pH en la actividad enzimática de celulasas para los cócteles enzimáticos comerciales E9 y E10. Cada determinación se realizó por triplicado.

7.4.2 Influencia del pH en la Actividad enzimática de Endocelulasas

Para esta actividad enzimática, ambos cócteles enzimáticos comerciales (E9 y E10) presentaron un comportamiento parecido, obteniéndose una actividad enzimática máxima a un pH de 4.94 (Figura 24), donde los grupos ionizables de la enzima se encuentran en estado iónico en donde la interacción enzima-sustrato resulta ser óptima, obteniéndose la mayor actividad enzimática para ambos cócteles. Esto concuerda con el valor sugerido en la bibliografía, que es de 4.8 para la determinación de esta actividad (Aburto *et al*, 2012).

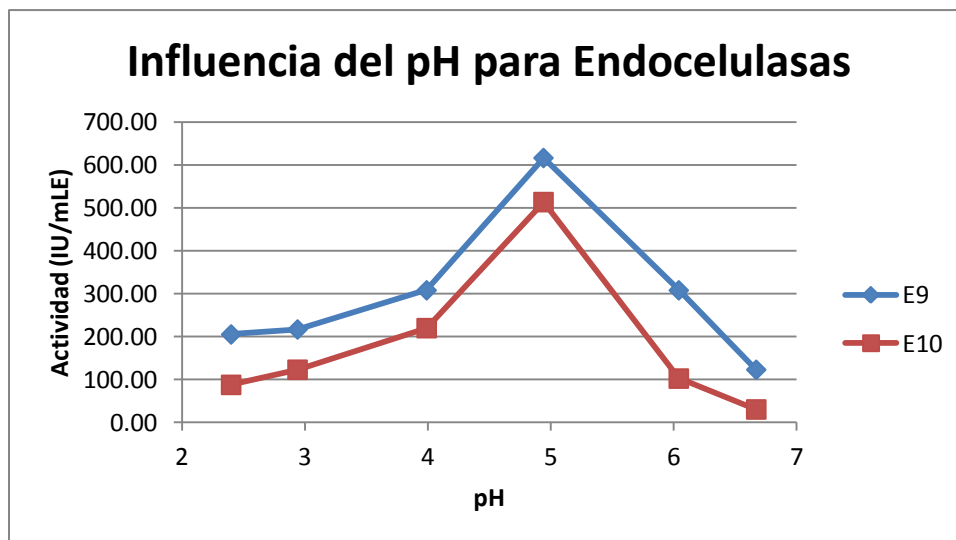


Figura 24. Influencia del pH en la actividad enzimática de endocelulasas para los cócteles enzimáticos comerciales (E9 y E10). Para cada pH se realizó un ensayo a diferentes diluciones, graficándose únicamente los puntos cercanos a los 0.5 mg de glucosa necesarios, para después realizar una regresión lineal.

*NOTA: International Units (IU)= μmol glucosa/min.

7.4.3 Influencia del pH en la Actividad enzimática de Exocelulasas

En la determinación de la influencia del pH sobre la actividad enzimática de exocelulasas, se observó que ambos cócteles enzimáticos comerciales (E9 y E10) presentan el mismo comportamiento al cambio del pH. A pesar de que el valor de pH recomendado en la literatura es de 4.8 (Aburto *et al*, 2012), ambas enzimas presentaron una actividad máxima a un pH de 5.96, es decir, una unidad por arriba de lo sugerido (Figura 25). En un pH cercano a 6, la concentración de protones presentes favorecen que el substrato interaccione con la enzima, y por ende, se lleve a cabo la hidrólisis enzimática; con ello, se logra obtener la actividad enzimática de exocelulasas más alta, logrando una degradación más eficiente del substrato.

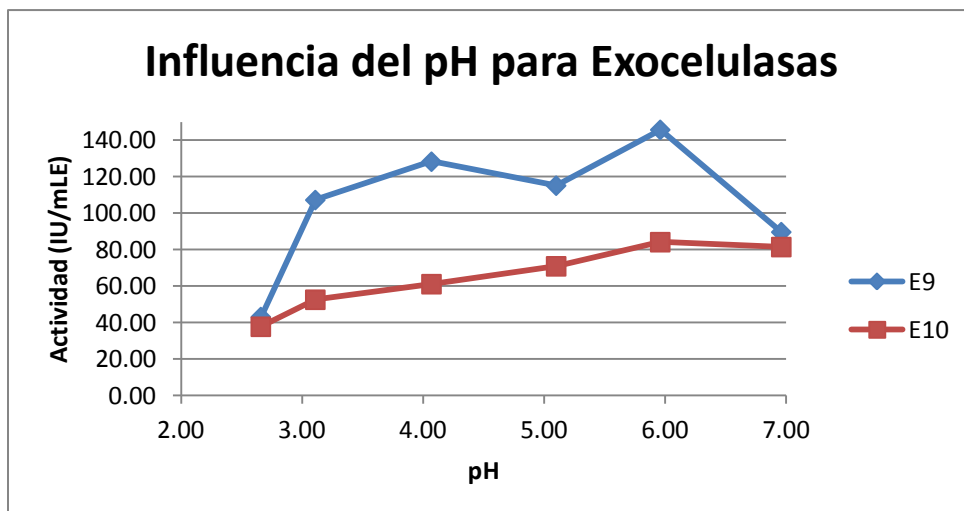


Figura 25. Influencia del pH en la actividad enzimática de exocelulasas para los cócteles enzimáticos comerciales (E9 y E10). Cada determinación se realizó por triplicado.

*NOTA: International Units (IU)= μmol glucosa/min.

7.4.4 Influencia del pH en la Actividad enzimática de β -glucosidasas

Como se observa en la Figura 26, el cóctel enzimático comercial E9 presentó la máxima actividad enzimática de β -glucosidasas a un pH de 5.1, lo que se encuentra cercano al valor indicado en la literatura, que es de 4.8 (Aburto *et al*, 2012).

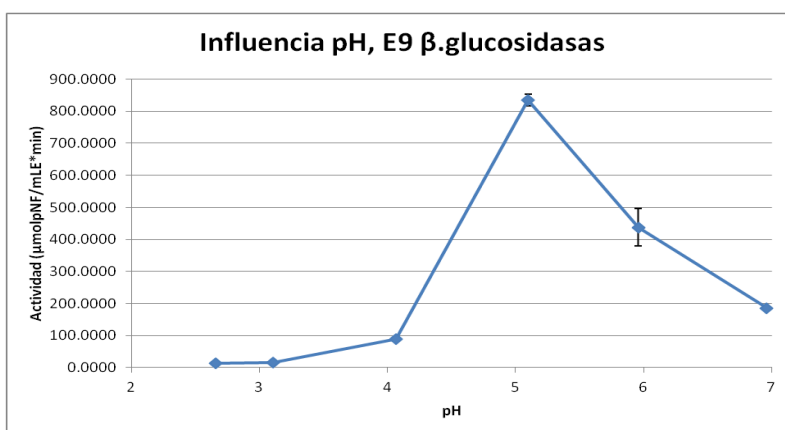


Figura 26. Influencia del pH en la actividad enzimática de β -glucosidasas para el cóctel enzimático comercial E9. Cada determinación se realizó por triplicado.

En cambio, para el cóctel enzimático comercial E10, la mayor actividad enzimática de β -glucosidasas se encuentra a un pH de 5.96 (Figura 27), una unidad arriba de lo recomendado en la literatura (Aburto *et al*, 2012). Con ello se observa que los grupos ionizables de ambos cócteles enzimáticos presentan un comportamiento distinto frente al pH, lo que indica que las enzimas presentes en cada cóctel son diferentes.

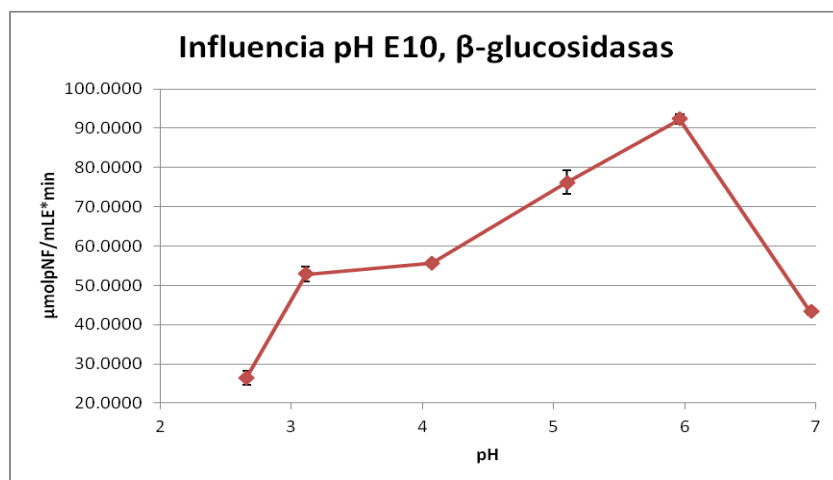


Figura 27. Influencia del pH en la actividad enzimática de β -glucosidasas para el cóctel enzimático comercial E10. Cada determinación se realizó por triplicado.

7.4.5 Influencia del pH en la Actividad enzimática de Xilanasas

Para xilanasas, ambos cócteles enzimáticos comerciales (E9 y E10) presentaron el mismo comportamiento ante la variación del pH. Tanto E9 como E10 tienen la máxima actividad enzimática en un pH de 6.76 (Figura 28), es decir, cercano a 7, lo que concuerda con la metodología sugerida (Aburto *et al*, 2012). Además, se sabe que la mayoría de las xilanasas muestran actividad a un pH neutro o ligeramente ácido (Montoya *et al*, 2010), lo que corresponde con lo obtenido experimentalmente. El pH neutro representa una ventaja, ya que si se realizó un pretratamiento básico, solo basta con neutralizarlo, a diferencia de las actividades enzimáticas previas, donde el material debe acidificarse.

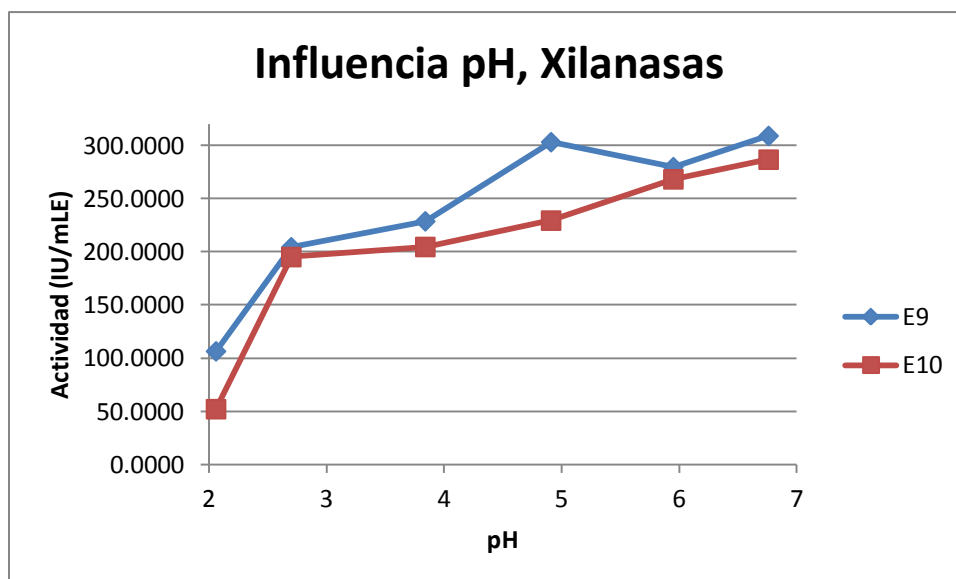


Figura 28. Influencia del pH en la actividad enzimática de xilanasas para los cócteles enzimáticos comerciales (E9 y E10). Cada determinación se realizó por triplicado.

ACTIVIDAD ENZIMÁTICA	pH CÓCTEL E9	pH CÓCTEL E10
Celulasas	4.8	3.07
Endocelulasas	4.94	4.94
Exocelulasas	5.96	5.96
β -glucosidasas	5.1	5.96
Xilanasas	6.76	6.76

Tabla 14. Valor de pH al cual se obtuvieron las máximas actividades enzimáticas para ambos cócteles enzimáticos comerciales (E9 y E10).

En el caso del cóctel comercial E9, utilizando un pH cercano a 5 se obtuvieron las máximas actividades enzimáticas para 3 de ellas (celulasas, endocelulasas y β -glucosidasas), a diferencia del cóctel comercial E10, donde solo en dos casos (exocelulasas y β -glucosidasas) se obtuvo la máxima actividad al mismo pH, siendo éste cercano a 6. Esto indica que el comportamiento entre ambos cócteles varía dependiendo del pH, debido al estado de los grupos ionizables en cada cóctel y la interacción que presentan con el sustrato.

7.5 Influencia de la Temperatura en las diferentes Actividades Enzimáticas de los cócteles enzimáticos comerciales E9 y E10

El aumento de la temperatura provoca en las moléculas un incremento de su energía cinética, los movimientos de las mismas son más rápidos, y la frecuencia de las colisiones entre moléculas aumenta, lo que produce una mayor velocidad de reacción. Esto es, la velocidad de una reacción enzimática se incrementa al aumentar la temperatura dentro de un determinado rango, alcanzando un valor máximo a la denominada temperatura óptima. A valores superiores a ésta, la actividad disminuye debido a que la enzima como cualquier otra proteína, sufre procesos de desnaturalización y, por lo tanto, de inactivación (Jorrín y Tena, 2007).

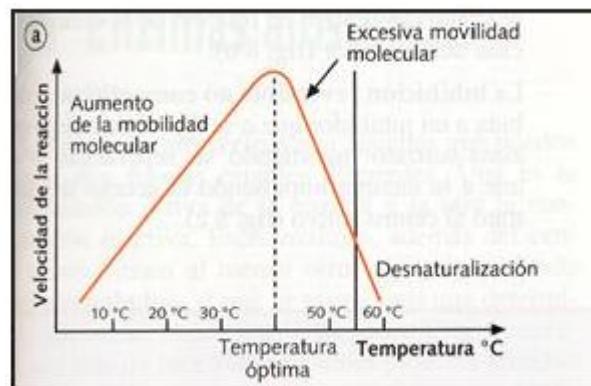


Figura 29. Variación de la actividad enzimática con la Temperatura. (Fuente: Biología Sur, 2010).

7.5.1 Influencia de la Temperatura en la Actividad enzimática de Celulasas

Para ambos cócteles enzimáticos comerciales (E9 y E10) se observa que en el rango de temperaturas empleadas, la actividad enzimática más alta se obtiene a los 60°C, pero al no haber hecho un estudio con temperaturas superiores, no se puede determinar si para ambas enzimas la máxima actividad se presenta a dicha temperatura. El comportamiento esperado se observa en ambos cócteles (Figura 30), ya que conforme aumenta la temperatura, la actividad enzimática incrementa.

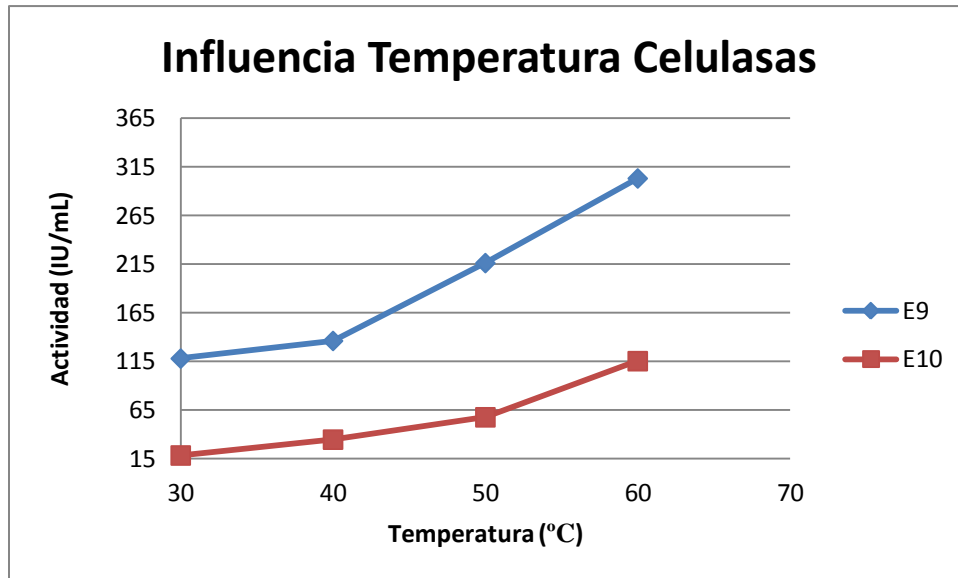


Figura 30. Influencia de la Temperatura en la actividad enzimática de celulasas para los cócteles enzimáticos comerciales E9 y E10. Cada determinación se realizó por triplicado.

7.5.2 Influencia de la Temperatura en la Actividad enzimática de Endocelulasas

En el caso de la influencia de la temperatura en la actividad enzimática de endocelulasas, se observa que el punto máximo de actividad para los dos cócteles enzimáticos comerciales se encuentra a los 50°C, ya que al elevar 10°C esta temperatura, la actividad comienza a descender (Figura 31), esto debido a la desnaturalización de las proteínas y a la pérdida de la estructura tridimensional de las enzimas, con lo que la hidrólisis enzimática comienza a disminuir, observándose el comportamiento de campana descrito en la literatura.

A diferencia de las celulasas, la temperatura óptima para las endocelulasas se encuentra en la temperatura reportada en la literatura (Aburto *et al*, 2012), es decir, llevando a cabo la reacción a 50°C. Este factor es importante, ya que si se realiza por arriba de su temperatura óptima, se cambia la conformación

tridimensional de la enzima, y por ende, la actividad comienza a descender, disminuyendo la eficiencia de la enzima.

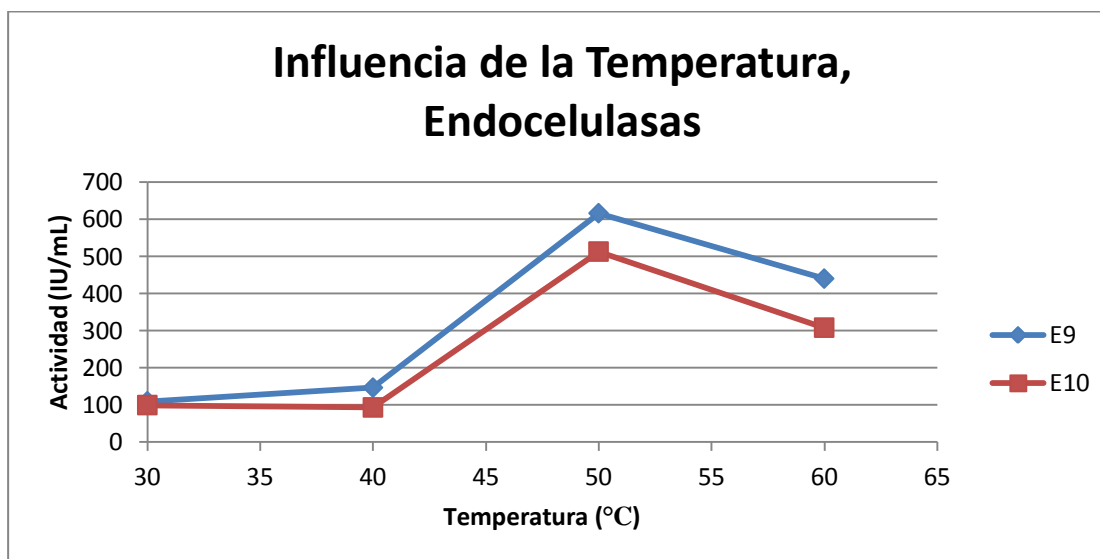


Figura 31. Influencia de la Temperatura en la actividad enzimática de endocelulasas para los cócteles enzimáticos comerciales (E9 y E10). Para cada pH se realizó un ensayo a diferentes diluciones, graficándose únicamente los puntos cercanos a los 0.5 mg de glucosa necesarios, para después realizar una regresión lineal. *NOTA: International Units (IU)= μmol glucosa/min.

7.5.3 Influencia de la Temperatura en la Actividad enzimática de Exocelulasas

La máxima actividad enzimática de exocelulasas se obtuvo a los 50°C, lo que también corresponde con lo reportado en la metodología (Aburto *et al*, 2012). Como se puede observar en la figura 32, los dos cócteles enzimáticos comerciales (E9 y E10) presentan el mismo comportamiento, donde la actividad enzimática aumenta, hasta llegar a los 50°C, y al aumentar la temperatura 10°C, la actividad enzimática comienza a descender. La actividad de la enzima comienza a disminuir debido a la desnaturalización de ésta, lo que ocasiona que su conformación cambie, y disminuya la hidrólisis enzimática de los residuos lignocelulósicos para la formación de nuevos oligosacáridos.

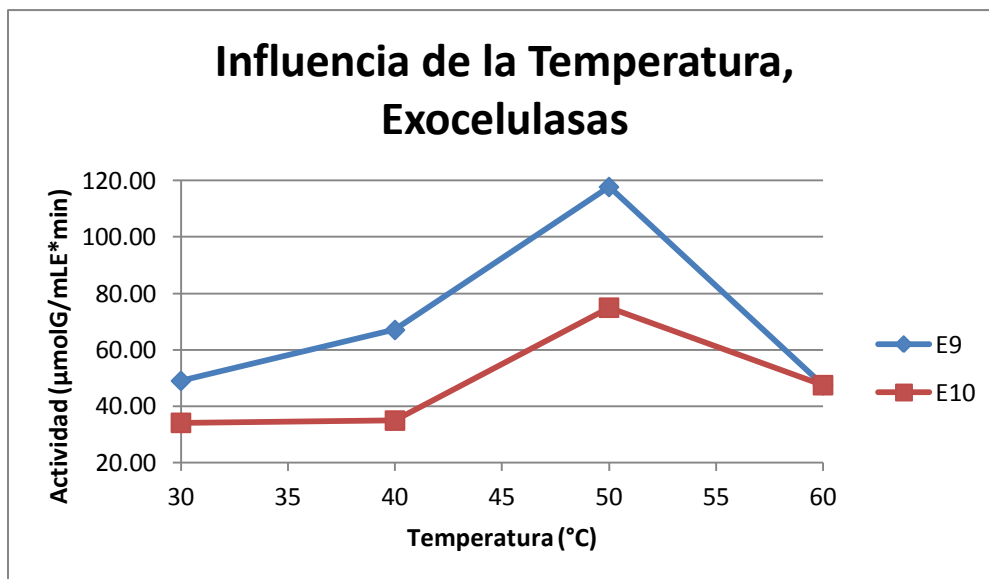


Figura 32. Influencia de la Temperatura en la actividad enzimática de exocelulasas para los cócteles enzimáticos comerciales (E9 y E10). Cada determinación se realizó por triplicado. *NOTA: International Units (IU)= µmol glucosa/min.

7.5.4 Influencia de la Temperatura en la Actividad enzimática de β-glucosidasas

En la actividad enzimática de β-glucosidasas, se observa que tanto el cóctel enzimático comercial E9, como E10, en el rango de temperaturas empleadas presentan la actividad enzimática más alta a los 60°C (Figuras 33 y 34); al igual que en el caso de las celulasas, no se puede determinar que la temperatura óptima para esta actividad es a los 60°C, ya que no se realizaron mediciones de la actividad a temperaturas más altas, por lo que ésta puede mantenerse, incrementar o incluso descender, observándose el comportamiento de campana descrito en la literatura.

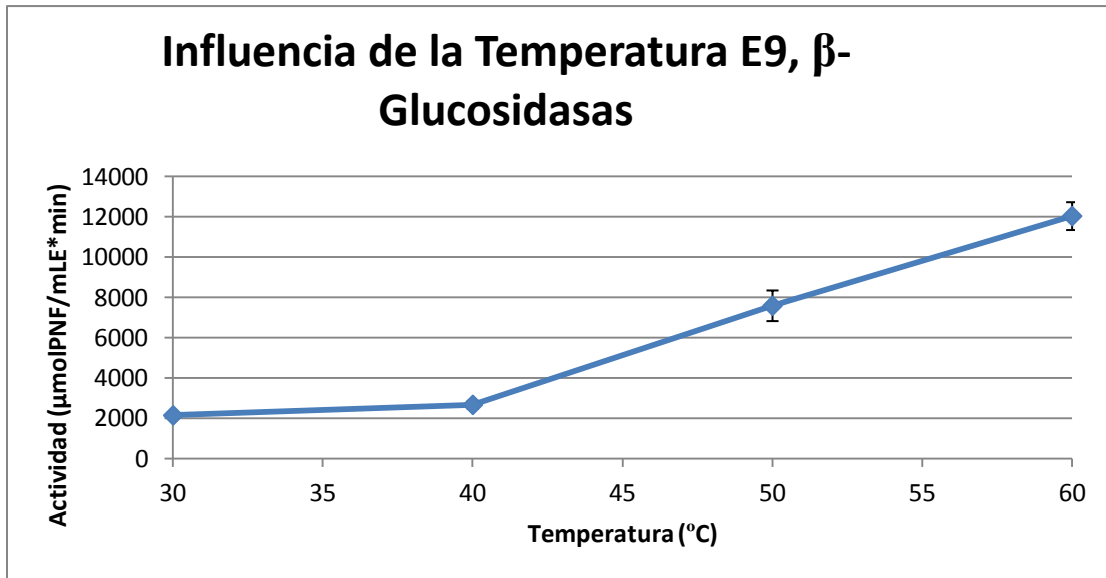


Figura 33. Influencia de la Temperatura en la actividad enzimática de β -glucosidasas para el cóctel enzimático comercial E9. Cada determinación se realizó por triplicado.

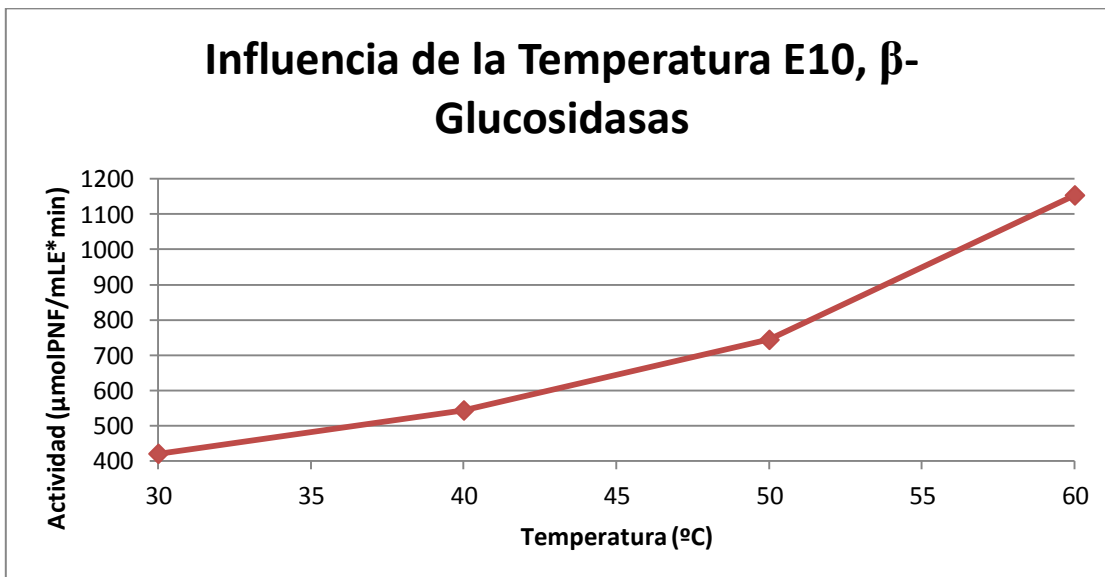


Figura 34. Influencia de la Temperatura en la actividad enzimática de β -glucosidasas para el cóctel enzimático comercial E10. Cada determinación se realizó por triplicado.

7.5.5 Influencia de la Temperatura en la Actividad enzimática de Xilanasas

En el estudio de la influencia de la temperatura en la actividad enzimática de xilanasas, se observa que para ambos cócteles enzimáticos comerciales (E9 y E20) la temperatura óptima es a 50°C, donde se presenta la mayor actividad enzimática, para después comenzar a disminuir (Figura 35).

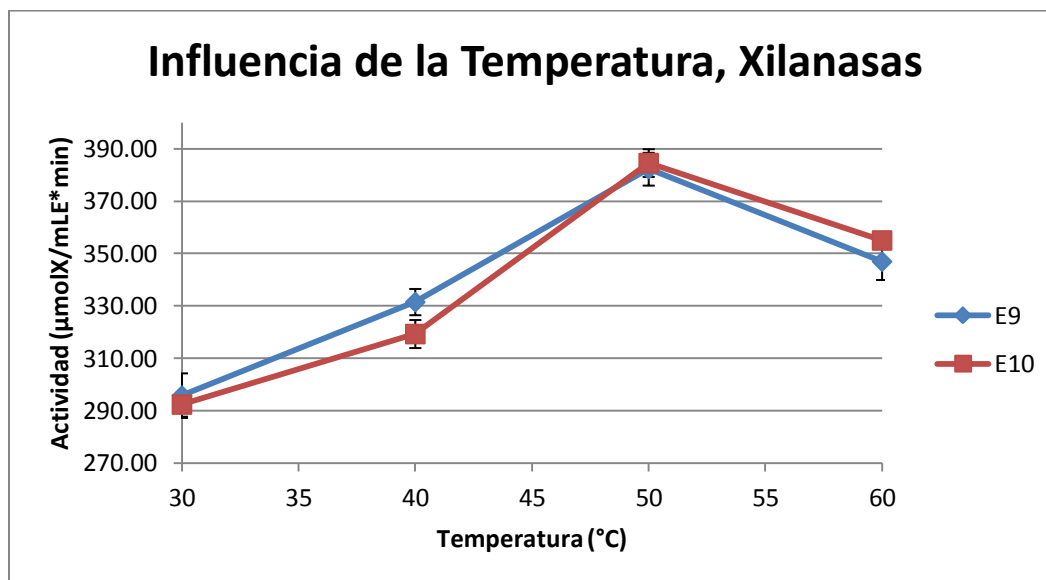


Figura 35. Influencia de la Temperatura en la actividad enzimática de xilanasas para los cócteles enzimáticos comerciales (E9 y E10). Cada determinación se realizó por triplicado.

ACTIVIDAD ENZIMÁTICA	Temperatura (°C) CÓCTEL E9	Temperatura (°C) CÓCTEL E10
Celulasas	60	60
Endocelulasas	50	50
Exocelulasas	50	50
β-glucosidasas	60	60
Xilanasas	50	50

Tabla 15. Temperatura a la cual se obtuvieron las máximas actividades enzimáticas para ambos cócteles enzimáticos comerciales (E9 y E10).

Al analizar la influencia de la temperatura en la actividad enzimática de los dos cócteles enzimáticos comerciales (E9 y E10) se observó que comparando ambos casos, el comportamiento en las diferentes actividades era el mismo. Las actividades de endocelulasas, exocelulasas y xilanasas fueron máximas a 50°C, a diferencia de las actividades de celulasas y β -glucosidasas, donde el máximo se presentó a 60°C.

Se debe de tomar en cuenta que la actividad enzimática de celulasas representa a todas las actividades enzimáticas presentes en la degradación de la celulosa, por lo que al observar que de las 3 actividades, la única que se favorece a los 60°C es la actividad enzimática de β -glucosidasas se puede inferir que la actividad predominante en la determinación de la actividad enzimática de celulasas es la de β -glucosidasas, por lo que la temperatura máxima también fue de 60°C.

7.6 Resistencia enzimática a la inactivación térmica de los cócteles enzimáticos comerciales E9 y E10

Para determinar la resistencia enzimática a la inactivación térmica de ambos cócteles, cada cóctel se somete a diferentes tratamientos térmicos durante una hora, para después llevar a cabo la reacción de la actividad enzimática de celulasas realizada a 50°C, en un buffer de citratos 0.1M pH 4.8, a 180 rpm por una hora. La resistencia enzimática, o actividad residual, es reportada como el porcentaje de actividad medido después de someter a diferentes tratamientos térmicos a los cócteles, comparándose con la actividad enzimática determinada sin atemperar cada cóctel enzimático, es decir, de 284.62 FPU/mLE para el cóctel E9 y de 132.14 FPU/mLE para el cóctel E10 (Tabla 8).

Esta determinación se realizó con la finalidad de analizar qué efecto presenta el someter a los dos cócteles enzimáticos a una temperatura superior a la cual se conserva (aproximadamente 4°C), y de qué manera influye en la actividad enzimática de celulasas, para cada caso.

Los resultados muestran que para el cóctel enzimático comercial E9, el incubar el cóctel enzimático a una temperatura menor a 60°C ocasiona que la actividad aumente, esto debido a que durante el período de incubación la energía cinética de las moléculas aumenta, por lo que existe una mayor velocidad de reacción ocasionando que la actividad enzimática aumente; en cambio, para el cóctel E10 conforme la temperatura de incubación aumenta, la actividad enzimática disminuye (Figura 36), debido a que las enzimas son proteínas, que como se mencionó anteriormente, a valores superiores de temperatura sufren procesos de desnaturalización, por lo que la actividad enzimática disminuye.

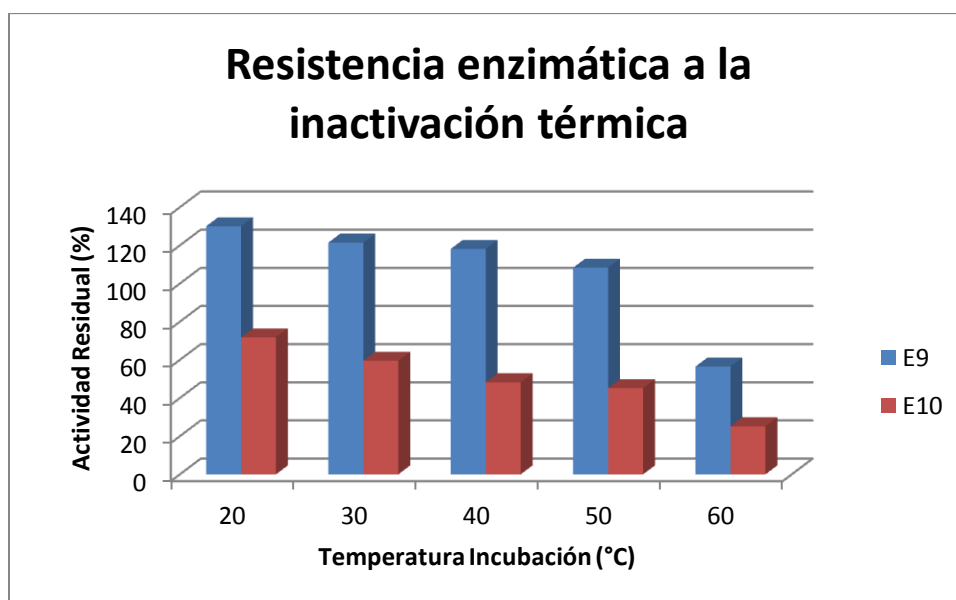
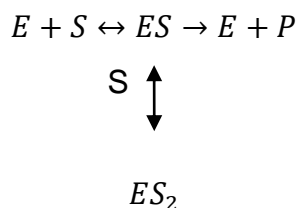


Figura 36. Resistencia enzimática a la inactivación térmica de los cócteles enzimáticos comerciales E9 y E10. Para cada temperatura se realizó un ensayo a diferentes diluciones, graficándose únicamente los puntos cercanos a los 2 mg de glucosa necesarios, para después realizar una regresión lineal.

7.7 Efecto de Inhibidores en los cócteles enzimáticos comerciales E9 y E10

7.7.1 Inhibición por Substrato en los cócteles enzimáticos comerciales E9 y E10

La inhibición enzimática que se presenta al tener un exceso de sustrato en el medio provoca una pérdida en la actividad enzimática; en este tipo de inhibición, una segunda molécula de sustrato, puede unirse al complejo E-S (Enzima-Substrato), dando lugar a la formación del complejo (E-S₂), que no da el producto esperado:



En general se da este tipo de inhibición cuando el sustrato se encuentra en grandes concentraciones y reacciona con la proteína enzimática en un lugar diferente al de la unión del sustrato (Porto, 2012).

Para analizar el efecto de la inhibición por sustrato, se determinó la actividad de β -glucosidasas, pero a diferencia de la primera medición, se añadió en el medio de reacción celobiosa, que es el sustrato que emplea el cóctel enzimático para la realización de la actividad de β -glucosidasas. Se optó por estudiar el efecto de la inhibición con esta actividad enzimática debido a que esta determinación es la única en la que el sustrato se encuentra en estado completamente líquido, por lo que la transferencia de masa entre la enzima y el sustrato se favorece, presentando menos dificultades en el medio de reacción.

Como se puede observar en la figura 37, para el cóctel enzimático comercial E9, al incrementar la concentración de sustrato presente en el medio de reacción, es decir, la celobiosa, la actividad enzimática de β -glucosidasas disminuye, por lo que el porcentaje de inhibición aumenta.

INHIBICIÓN POR SUSTRATO PARA E9

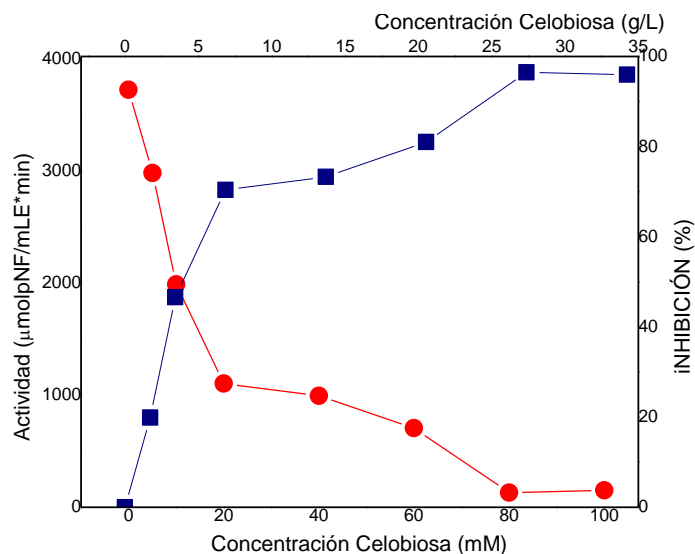


Figura 37. Inhibición por sustrato del cóctel enzimático comercial E9 en la actividad enzimática de β -glucosidasas. Cada determinación se realizó por triplicado. Los círculos rojos representan la actividad enzimática y los cuadros azules el porcentaje de inhibición.

En el caso del cóctel enzimático comercial E10 presentó un comportamiento similar al cóctel E9; al aumentar la concentración de celobiosas (sustrato de la reacción), la actividad enzimática disminuye y el porcentaje de inhibición aumenta (Figura 38). Para ambos casos se observa que los cócteles enzimáticos se inhiben al ir incrementado la concentración de sustrato presente, pero comparando ambos cócteles, en el caso de E9 presenta un mayor efecto inhibitorio al incrementar la concentración de sustrato (casi 100%); en cambio E10 sí presenta inhibición, pero es menor (aproximadamente del 60%)

INHIBICIÓN POR SUSTRATO PARA E10

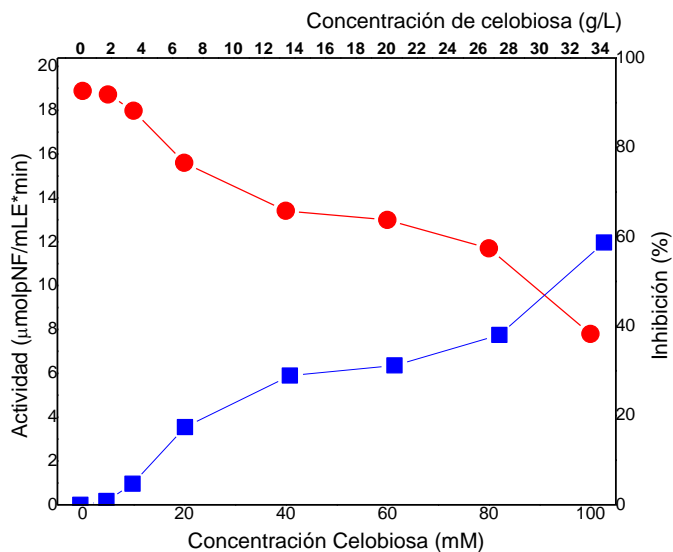


Figura 38. Inhibición por sustrato del cóctel enzimático comercial E10 en la actividad enzimática de β -glucosidasas. Cada determinación se realizó por triplicado. Los círculos rojos representan la actividad enzimática y los cuadros azules el porcentaje de inhibición.

7.7.2 Inhibición por Producto en los cócteles enzimáticos comerciales E9 y E10

Un caso de inhibición es aquella que se presenta por el producto final, también llamada retroinhibición o control feed-back. En ella, el producto final inhibe alostéricamente a la enzima que cataliza la reacción, interrumpiendo así su propia síntesis cuando ésta ya no es necesaria o cuando el producto se encuentra en exceso y no ha sido retirado de la reacción enzimática (Porto, 2012).

Se puede observar en la figura 39, que para el cóctel enzimático comercial E9, la actividad enzimática de β -glucosidasas disminuyó conforme la concentración de glucosa iba aumentando, es decir, la actividad disminuyó al incrementar la

concentración de producto, obteniéndose al final de la reacción un 30% de inhibición..

INHIBICIÓN POR PRODUCTO PARA E9

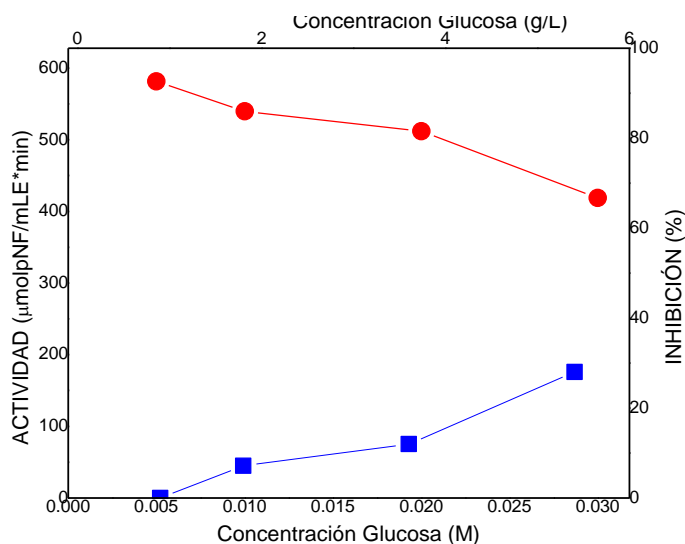


Figura 39. Inhibición por producto del cóctel enzimático comercial E9 en la actividad enzimática de β -glucosidasas. Cada determinación se realizó por triplicado. Los círculos rojos representan la actividad enzimática y los cuadros azules el porcentaje de inhibición.

Para el cóctel enzimático comercial E10 se observa un comportamiento parecido al cóctel E9; conforme la concentración de glucosa aumenta, el porcentaje de inhibición también aumenta, presentando al final de la reacción aproximadamente un 30% de inhibición, lo que sí puede influir en la hidrólisis enzimática, ya que la actividad enzimática se ve disminuida al inhibirse la enzima, y por ende, la producción de azúcares reductores es menor a la esperada (Figura 40).

INHIBICIÓN POR PRODUCTO PARA E10

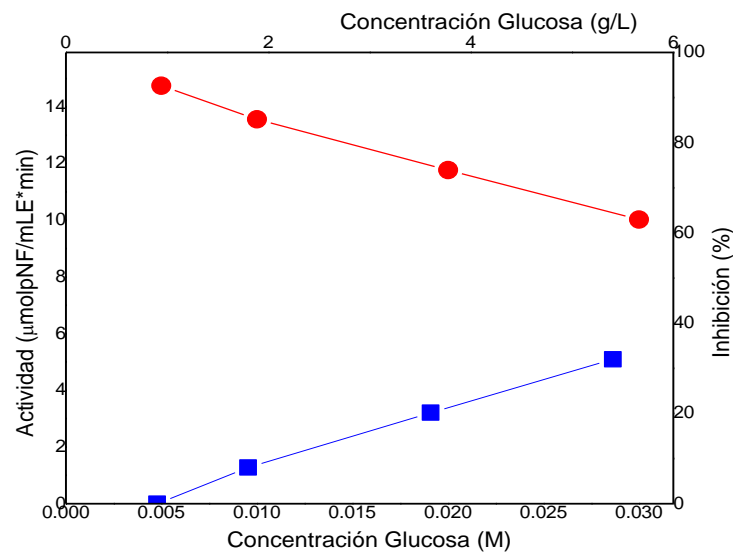


Figura 40. Inhibición por producto del cóctel enzimático comercial E10 en la actividad enzimática de β -glucosidasas. Cada determinación se realizó por triplicado. Los círculos rojos representan la actividad enzimática y los cuadros azules el porcentaje de inhibición.

Si se planea hacer un sistema continuo en la hidrólisis enzimática de los residuos lignocelulósicos, es importante considerar que el producto de la sacarificación debe de extraerse del sistema, ya que de lo contrario, la enzima presentará una inhibición por producto, y con ello una actividad enzimática más baja, lo que sí es significativo para llevar a cabo la fermentación, ya que la fuente de carbono de los microorganismos es principalmente la glucosa.

7.8 Tratamiento de la Muestra

Para evaluar la capacidad de hidrólisis de los cócteles sobre material lignocelulósico crudo, el contenido de agua de las tres muestras a utilizar (Bagazo de caña malla 60, Pasto Taiwán malla 60 y Residuos de Malta malla 60-80) se determinó la humedad por el método de Termobalanza.

Este método se basa en evaporar de manera continua la humedad de la muestra y el registro continuo de la pérdida de peso, hasta que la muestra se sitúe a peso constante. El error de pesada en este método se minimiza cuando la muestra no se expone constantemente al ambiente. (Nollet, 1996; Iturbe y Sandoval, 2011). Es un método semiautomático y automático y la muestra no es removida, por lo tanto, el error de pesada es mínimo (Iturbe y Sandoval, 2011).

MATERIAL	PASTO TAIWÁN	BAGAZO DE CAÑA	RESIDUOS DE MALTA
Humedad (%)	5.55	6.85	6.60

Tabla 16. Humedad de los tres Residuos Lignocelulósicos, determinada por el Método de Termobalanza. Cada determinación se realizó sólo una vez.

El medio básico utilizado en el pretratamiento es para promover la descomposición del H_2O_2 , y como consecuencia, se producen radicales más reactivos como hidroxilo (OH^\cdot) y superóxido (O_2^\cdot) (Mussatto y Teixeira, 2010), los cuales son los responsables de la degradación de la lignina, éstos aumentan la capacidad de absorción de agua del material y disminuyen hasta en un 50% la concentración de lignina presente, decrecen la cristalinidad de la celulosa y aumentan la susceptibilidad al ataque químico-enzimático (Sun y Cheng, 2002).

Se aplicó un pretratamiento básico-oxidante para los tres materiales debido a que se analizaron previamente los pretratamientos realizados anteriormente en el Instituto Mexicano del Petróleo a cargo del Dr. Jorge Arturo Aburto Anell, y para el bagazo de caña, el pasto Taiwán y los residuos de malta, este pretratamiento era

el que daba mejores resultados en la producción de azúcares totales y azúcares reductores.

7.8.1 Azúcares Totales del licor después del Pretratamiento básico-oxidante para los 3 materiales

Para determinar qué tan eficiente fue el pretratamiento realizado, es necesario cuantificar los azúcares totales presentes en el licor obtenido, ya que éstos nos dan una idea de qué tanto se dañó la estructura de los residuos lignocelulósicos en estudio.

En la Figura 41, se puede observar que el Pasto Taiwán es el material que presenta un menor contenido de azúcares totales después del pretratamiento, con 98.08 mg de Azúcares Totales por gramo de muestra, a diferencia de los residuos de malta, que mostraron el mayor contenido de azúcares totales después del pretratamiento, con 300.21 mg de azúcares totales por gramo de muestra. Se cuantificaron también los azúcares reductores, pero como era de esperarse, no se encontraron. Esto debido a que durante el pretratamiento se liberan polisacáridos y lignina que se encuentran en los materiales (Figura 42), pero los azúcares más pequeños se forman con la hidrólisis enzimática posterior.

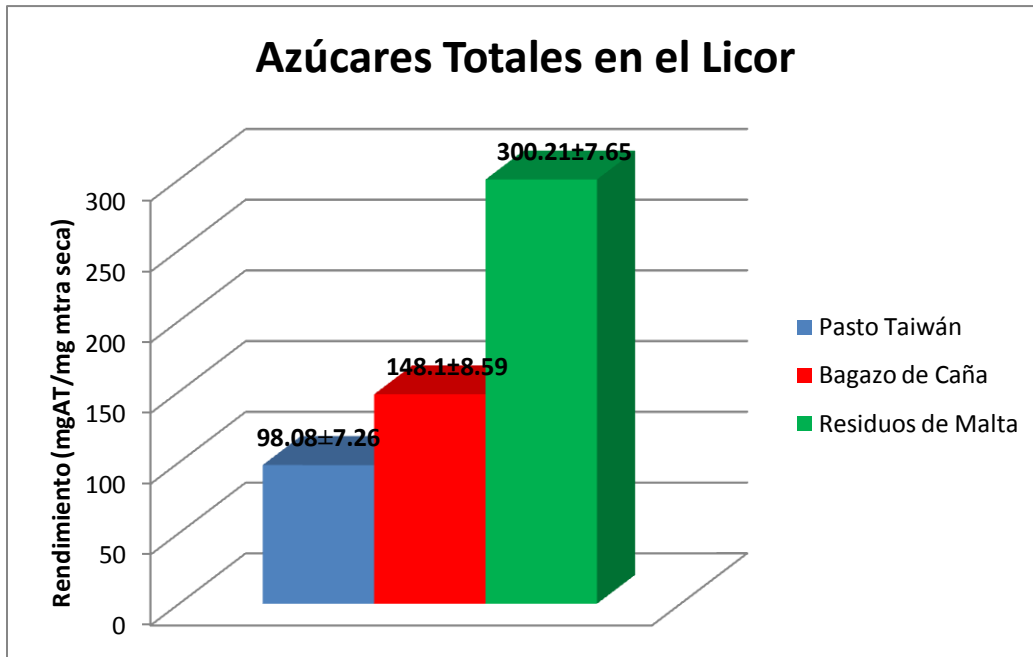


Figura 41. Azúcares Totales presentes en los tres materiales después del pretratamiento básico-oxidante. Cada determinación se realizó por triplicado.

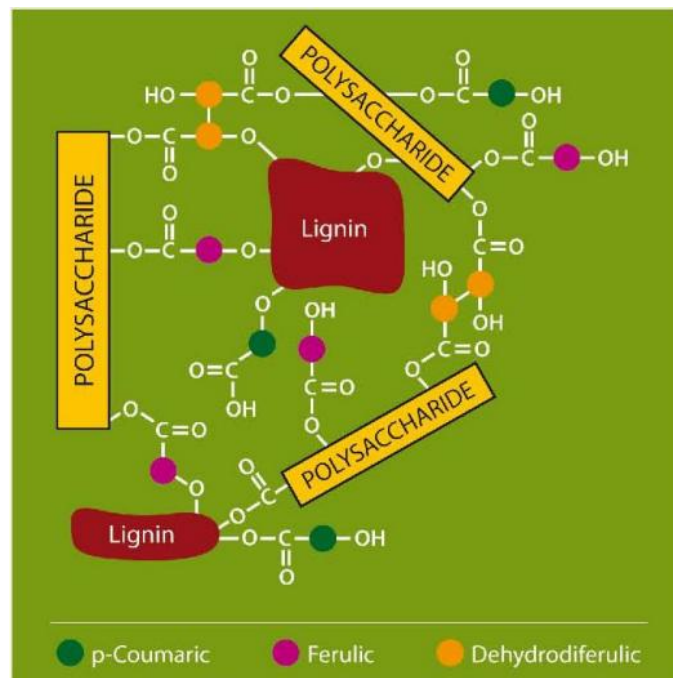


Figura 42. Asociación de la lignina con polisacáridos (Fuente: Iiyama *et al*, 1994).

7.8.2 Hidrólisis Enzimática con los cócteles enzimáticos comerciales E9 y E10

Para los 3 casos se realizó una sacarificación con las enzimas E9 y E10, añadiendo 45 μ L del cóctel enzimático original a 50 mg de material seco y pretratado, en las condiciones sugeridas en la bibliografía (Aburto *et al*, 2012), es decir, a 50°C durante 1 hora, a un pH de 4.8 a 180 rpm. Al sobrenadante obtenido se le cuantificaron azúcares totales y azúcares reductores, para determinar qué tan eficiente fue la sacarificación en cada uno de los materiales. Al haber aplicado un pretratamiento y después haber realizado la sacarificación enzimática, se espera que el porcentaje de azúcares tanto reductores como totales sea cercano al 100%.

En la determinación de Azúcares Totales, se observa que utilizando el cóctel E9, el material que mostró un mayor rendimiento en la sacarificación fue el Bagazo de caña, seguido por el Pasto Taiwán, y los residuos de malta, que muestran un alto contraste con los otros dos materiales (Figura 43). Tanto el bagazo de caña como el pasto Taiwán están en rendimientos cercanos al 100%, y al compararlos con los residuos de malta, que sólo obtuvieron un 17%, se puede inferir que el no haber secado el material, como se hizo con los otros dos casos puede influir en los azúcares obtenidos. Esto resulta contrario a lo que se esperaba, ya que al secar el material, se provoca que la conformación estructural que adquirió después del tratamiento se cambie, volviéndose más compacto y menos disponible al ataque enzimático; en cambio, al no secar el material, la conformación adquirida a causa del pretratamiento se conserva, con lo que la hidrólisis enzimática debería favorecerse.

Con el cóctel enzimático comercial E10, tanto para el bagazo de caña como para los residuos de malta, se obtuvieron menor cantidad de azúcares totales, a diferencia del pasto Taiwán, que presentó una mayor cantidad de azúcares totales, con aproximadamente un 80% de rendimiento (Figura 43). A pesar de que

los residuos de malta presentan un rendimiento del 50%, si se comparan ambos cócteles, el cóctel enzimático comercial E10 tiene mayor efectividad al hidrolizar los polisacáridos y oligosacáridos presentes en dichos residuos lignocelulósicos.

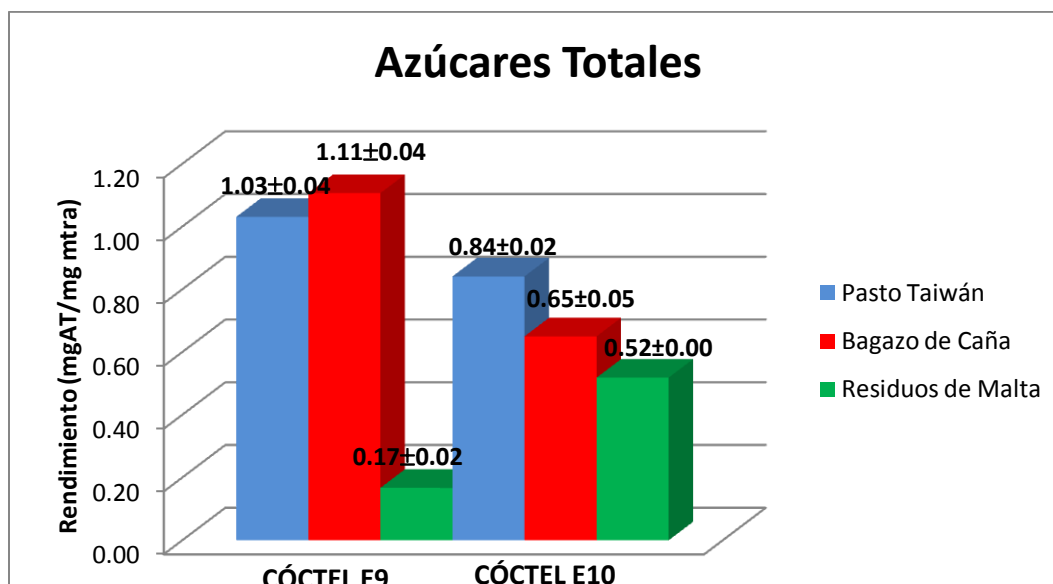


Figura 43. Azúcares Totales presentes en los materiales después de la hidrólisis enzimática con los cócteles enzimáticos comerciales E9 y E10. Cada determinación se realizó por triplicado.

En cuanto a los azúcares reductores obtenidos en los 3 materiales con el cóctel enzimático E9, para el pasto Taiwán se obtuvo un 57% de azúcares totales, lo que indica que la hidrólisis de los azúcares totales no se llevó a cabo por completo, sucediendo algo parecido para los residuos de malta, donde se obtuvo alrededor del 5% de los azúcares reductores, por lo que en este caso tampoco se hidrolizaron todos los azúcares totales presentes (Figura 44). En cambio, para el bagazo de caña, los azúcares reductores obtenidos son alrededor del 100%, lo que indica que el cóctel enzimático comercial llevó a cabo adecuadamente la hidrólisis enzimática.

También se cuantificaron los azúcares reductores obtenidos a partir de la sacarificación enzimática por el cóctel enzimático comercial E10 (Figura 44),

donde el Pasto Taiwán tuvo aproximadamente un 50% de azúcares reductores, lo que indica que aún quedaron azúcares totales sin hidrolizar, al igual que para el bagazo de caña, con un porcentaje similar. En el caso de los residuos de malta, el porcentaje de azúcares reductores obtenidos fue de 30% aproximadamente, siendo mayor al obtenido con la enzima E9, lo que indica que para este material, este cóctel realiza una mejor hidrólisis de dicho material lignocelulósico.

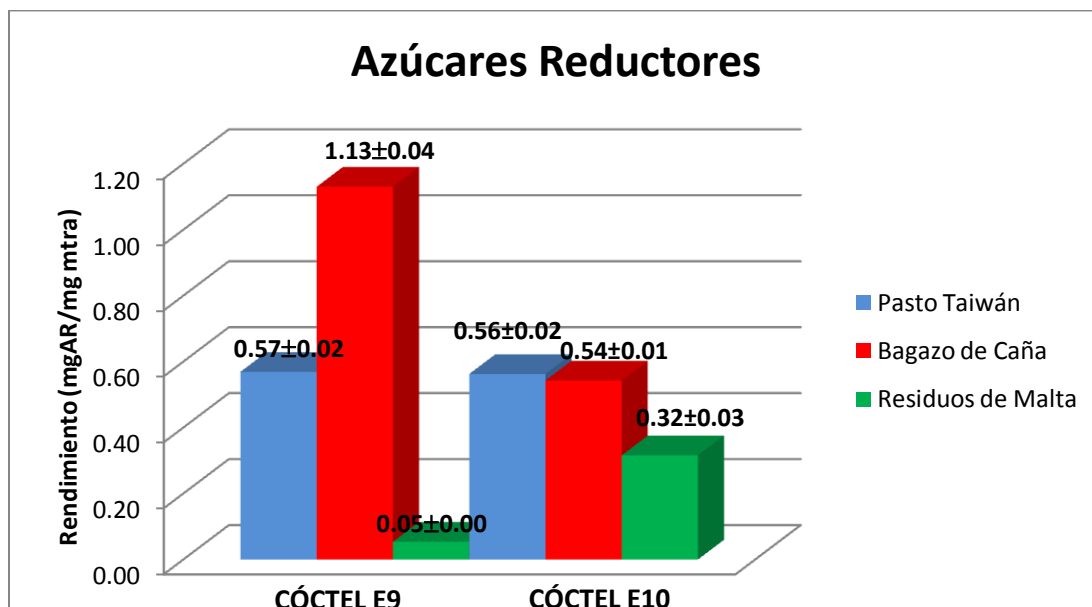


Figura 44. Azúcares Reductores presentes en los materiales después de la hidrólisis enzimática con los cócteles enzimáticos comerciales E9 y E10. Cada determinación se realizó por triplicado.

Al parecer, el pH del agua presente en el material sin secar interfiere en la hidrólisis enzimática, lo que puede ser causado por el pretratamiento realizado, ya que aunque se hacen lavados del sobrenadante comprobando que el pH sea cercano al del buffer, en realidad no se comprueba el pH como tal de los residuos lignocelulósicos, lo que puede estar inhibiendo a la enzima. De acuerdo a los resultados obtenidos anteriormente, se sabe que el pH óptimo de este cóctel se encuentra cercano a 5, ya que al aproximarse a un pH neutro, la actividad enzimática disminuye considerablemente.

7.8.3 Grados de Polimerización de los 3 Residuos Lignocelulósicos con los dos cócteles enzimáticos comerciales (E9 y E10)

El grado de polimerización se define como el número de unidades monoméricas en una macromolécula o una molécula oligomérica, un bloque o una cadena (IUPAC, 2012). En este caso, se usa el grado de polimerización como referencia, para ver la efectividad de la hidrólisis enzimática y la consecuente generación de azúcares reductores. El grado de polimerización se calcula empleando la siguiente fórmula:

$$GP = \frac{AT}{AR}$$

Donde,

GP: Grado de Polimerización

AT: Azúcares Totales

AR: Azúcares Reductores.

La interpretación que se le da al grado de polimerización es que mientras más cercano a 1 sea, la hidrólisis enzimática fue más eficiente; es decir, si tenemos un valor cercano a 1 eso significa que todos los azúcares totales presentes fueron hidrolizados y convertidos a azúcares reductores, como algunos monosacáridos y disacáridos, entre ellos la glucosa.

MATERIAL	GRADO DE POLIMERIZACIÓN CÓCTEL E9	GRADO DE POLIMERIZACIÓN CÓCTEL E10
Pasto Taiwán	1.81 ± 0.10	1.50 ± 0.08
Bagazo de caña	0.98 ± 0.00	1.26 ± 0.13
Residuos de malta	3.10 ± 0.09	1.65 ± 0.15

Tabla 17. Grados de polimerización de los tres materiales lignocelulósicos empleando los dos cócteles enzimáticos comerciales (E9 y E10).

Para el cóctel enzimático comercial E9, se observa que el material que obtuvo el menor grado de polimerización fue el bagazo de caña, con un grado de polimerización cercano a 1, lo que resulta ideal, ya que indica que además de tener una alta eficiencia en la producción de azúcares, la actividad de la enzima está logrando hidrolizar a todo el sustrato, generando monosacáridos. El Pasto Taiwán tuvo un grado de polimerización cercano a 2, lo que indica que aún hay sustrato por hidrolizar, y que la enzima no está realizando la sacarificación por completo, es decir, que no se están obteniendo azúcares fermentables. Y por último, los Residuos de Malta obtuvieron un grado de polimerización de 3, debido a que las actividades enzimáticas de endo y exocelulasas no están generando los oligosacáridos y por ende los disacáridos necesarios para la generación de glucosa a partir de la actividad enzimática de β -glucosidasas (Figura 45).

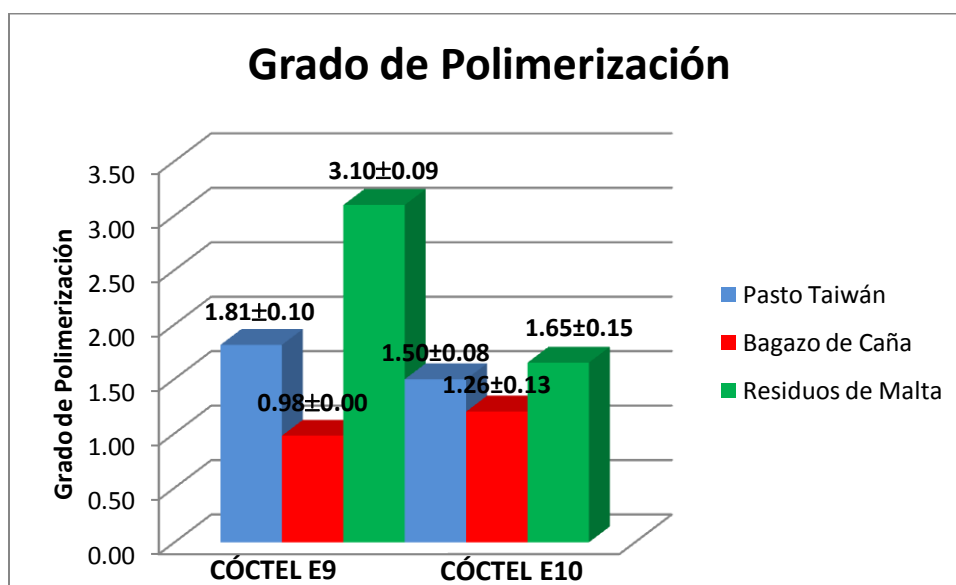


Figura 45. Grados de Polimerización del Pasto Taiwán, el Bagazo de Caña y los Residuos de Malta con los cócteles enzimáticos comerciales E9 y E10.

Los resultados obtenidos para el cóctel enzimático comercial E10 muestran que para el bagazo de caña se obtiene nuevamente el grado de polimerización más bajo, lo que se interpreta como una eficiente hidrólisis enzimática, ya que logra hidrolizar el sustrato generando azúcares reductores; el pasto Taiwán obtuvo un grado de polimerización de 1.5 (Figura 45), lo que indica que aunque la

sacarificación enzimática es buena, aún quedan polisacáridos u oligosacáridos por hidrolizar. Por último, para los residuos de malta el grado de polimerización fue de 1.65, un valor muy cercano al obtenido por el Pasto Taiwán, y a diferencia del cóctel E9, en ambos materiales el grado de polimerización fue menor.

7.8.4 Cuantificación e Identificación de Azúcares mediante HPLC

Para el Pasto Taiwán usando el cóctel enzimático comercial E9, se identificaron monosacáridos como xilosa, fructosa, glucosa y sacarosa, siendo ésta un disacárido formado por glucosa y fructosa. El azúcar que se encuentra en mayor proporción es la glucosa, con 0.2899 mg de ésta por miligramo de muestra, seguida por la sacarosa, la xilosa y la fructosa, siendo el azúcar con menor concentración, con 0.0216 mg de fructosa por miligramo de muestra. Comparando estos resultados con los obtenidos con el cóctel enzimático comercial E10, se observa que la glucosa es en ambos casos el azúcar con mayor concentración, pero se comprueba que la actividad de β -glucosidasas para el cóctel E9 es mayor que para el cóctel E10, al generar más glucosa en la sacarificación enzimática (Tabla 18). Además, usando el cóctel enzimático E10 no se obtienen cantidades cuantificables de fructosa, a diferencia del cóctel enzimático E9, que aunque da concentraciones muy bajas, si se logran cuantificar.

PASTO TAIWÁN				
CÓCTEL ENZIMÁTICO	XILOSA (mg/gmtra)	FRUCTOSA (mg/gmtra)	GLUCOSA (mg/gmtra)	SACAROSA (mg/gmtra)
E9	0.0789	0.0216	0.2899	0.0580
E10	0.0220	0.0000	0.2326	0.0363

Tabla 18. Azúcares cuantificados e identificados mediante HPLC después de la hidrólisis enzimática con los cócteles E9 y E10 para el Pasto Taiwán. Cada determinación se realizó sólo una vez.

Para el caso del bagazo de caña se observa que la glucosa vuelve a ser el azúcar con mayor concentración usando los dos cócteles enzimáticos comerciales, presentando una mayor concentración con el cóctel E9. La mayor concentración de fructosa se obtiene usando al cóctel E9, y el azúcar con menor concentración fue la xilosa para ambos casos (Tabla 19). Con el cóctel E10 también se identificó celobiosa, cosa que no ocurre con ninguno de los otros dos materiales usando ambas enzimas; esto significa que la actividad de exocelulasas sí realizó cortes al extremo generando celobiosa, y las β -glucosidasas presentes en el cóctel, no lograron hidrolizar toda la celobiosa a glucosa.

BAGAZO DE CAÑA					
CÓCTEL ENZIMÁTICO	XILOSA (mg/gmtra)	FRUCTOSA (mg/gmtra)	GLUCOSA (mg/gmtra)	SACAROSA (mg/gmtra)	CELOBIOSA (mg/gmtra)
E9	0.0778	0.2363	0.3172	0.2808	0.0000
E10	0.0229	0.0000	0.2347	0.0363	0.1353

Tabla 19. Azúcares cuantificados e identificados mediante HPLC después de la hidrólisis enzimática con los cócteles E9 y E10 para el Bagazo de Caña. Cada determinación se realizó sólo una vez.

Por último, para los residuos de malta, se encontró que usando el cóctel enzimático E9, el azúcar en mayor concentración es la sacarosa, con 0.3091 mg de ésta por miligramo de muestra, a diferencia de los casos anteriores, donde el azúcar mayoritario había sido la glucosa; además, al igual que en el bagazo de caña, el azúcar con menor concentración fue la xilosa, lo que difiere con la hidrólisis realizada con el cóctel E10, donde sólo se identificó glucosa y sacarosa, siendo la primera la que presentó una mayor concentración, con 0.1567 mg de glucosa por miligramo de muestra (Tabla 20).

RESIDUOS DE MALTA				
CÓCTEL ENZIMÁTICO	XILOSA (mg/gmtra)	FRUCTOSA (mg/gmtra)	GLUCOSA (mg/gmtra)	SACAROSA (mg/gmtra)
E9	0.0198	0.0242	0.1467	0.3091
E10	0.0000	0.0000	0.1567	0.0366

Tabla 20. Azúcares cuantificados e identificados mediante HPLC después de la hidrólisis enzimática con los cócteles E9 y E10 para los Residuos de Malta. Cada determinación se realizó sólo una vez.

Con los azúcares identificados y cuantificados mediante el método de HPLC se observa que las diferencias en azúcares y en concentraciones dependen del residuo lignocelulósico que se esté estudiando, pero sobre todo del cóctel enzimático comercial que se esté utilizando, ya que los azúcares cuantificados son los que se generan a partir de la hidrólisis enzimática de los materiales.

7.8.5 Hidrólisis Enzimática con variación de Temperaturas y Tiempos usando el cóctel enzimático comercial E9

Se analizaron los parámetros estudiados previamente de cada una de las actividades (pH, temperatura, cinética, presencia de inhibidores), y se optó por realizar modificaciones a la metodología. Sólo se realizaron estos cambios en el cóctel enzimático comercial E9, ya que con los estudios realizados previamente de las actividades enzimáticas de celulasas (Tabla 8), endocelulasas (Tabla 9), exocelulasas (Tabla 10) y β -glucosidasas (Tabla 11), se concluye que la actividad del cóctel enzimático comercial E10 es considerablemente menor a la del cóctel E9, por lo que no resulta costeable realizar modificaciones en los parámetros, debido a que la diferencia en cuanto a la hidrólisis enzimática y sus actividades no sería significativa.

Analizando los grados de polimerización y las eficiencias obtenidas para cada caso se realizaron dichas modificaciones. En general, las actividades enzimáticas

determinadas para el cóctel enzimático comercial, fueron máximas al emplear el pH al cual se está trabajando, de 4.8, por lo que este parámetro no se modificó.

En el caso del pasto Taiwán, se obtuvo un grado de polimerización de 1.81, por lo que se buscó incrementar la actividad tanto de endocelulasas, ya que generan nuevos oligosacáridos, y por ende se favorece la actividad de exocelulasas (que se encargan de hacer cortes en los extremos), como de β -glucosidasas, que se encargan de hidrolizar a la celobiosa en 2 monómeros de glucosa. Como la actividad de endocelulasas se favorece a los 50°C y la de β -glucosidasas a 60°C, se optó por realizar una hidrólisis enzimática con una rampa de temperatura, donde los primeros 30 minutos de la reacción se llevan a cabo a 50°C, y los últimos 30 minutos a 60°C, con la finalidad de incrementar ambas actividades y con ello, obtener un mayor grado de producción al generar más azúcares reductores.

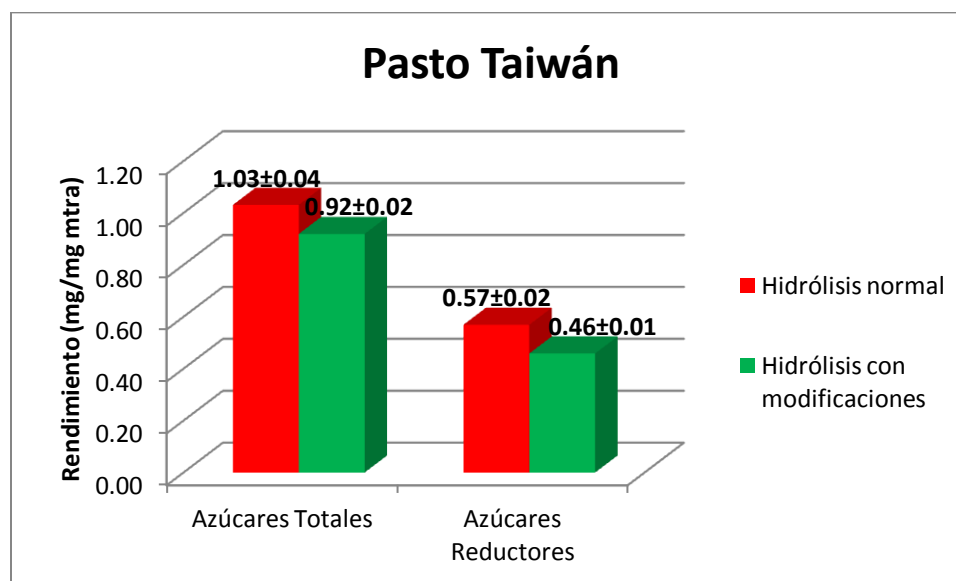


Figura 46. Comparación de la hidrólisis normal del pasto Taiwán con la hidrólisis modificada para el cóctel E9. Cada determinación se realizó por triplicado.

Como se muestra en la Figura 46, con la hidrólisis que se realizó modificando el tiempo y la temperatura, se obtuvo una menor concentración tanto de azúcares reductores como de azúcares totales, obteniéndose en cada caso,

aproximadamente 10 mg de azúcares menos, tanto totales, como reductores. Esto puede ser debido a que como se disminuye el tiempo en el cual la reacción se encuentra a 50°C, de 1 hora a 30 minutos, tanto las endocelulasas como las exocelulasas no generan los oligosacáridos y disacáridos necesarios, y por ende, las β -glucosidasas disminuyen su actividad al no tener sustrato por hidrolizar, obteniendo una menor concentración de azúcares reductores.

Para el Bagazo de caña, el grado de polimerización fue de 1, obteniendo la eficiencia óptima hidrolizar los polisacáridos y oligosacáridos presentes en el material. La modificación que se realizó fue de tiempo, ya que en el progreso de reacción de celulasas realizado previamente (Figura 47), en los primeros 30 minutos de reacción, el comportamiento es lineal, por lo que la velocidad de la reacción es constante, y si al disminuir el tiempo se obtiene un grado de polimerización cercano a 1, esto indica que no es necesario hacer la hidrólisis enzimática durante una hora.

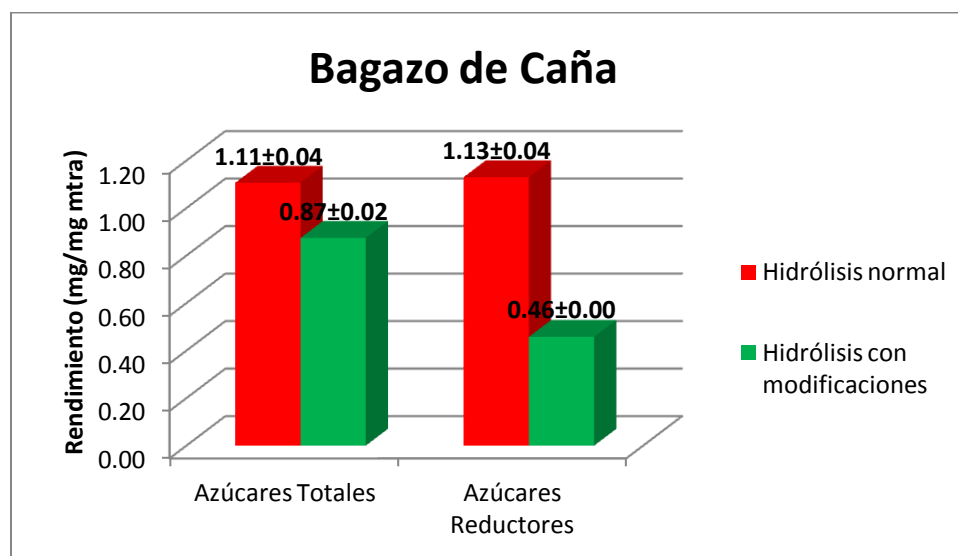


Figura 47. Comparación de la hidrólisis normal del bagazo de caña con la hidrólisis modificada para el cóctel E9. Cada determinación se realizó por triplicado.

Como se puede observar en la Figura 47, las concentraciones de azúcares totales disminuyen en aproximadamente 20 mg por miligramo de muestra, y los azúcares reductores disminuyen a más de la mitad, por lo que al reducir el tiempo de reacción, el rendimiento en la generación de azúcares reductores disminuye, ya que las enzimas no realizan la hidrólisis enzimática por completo, por lo que es necesario realizar la sacarificación con una hora como tiempo de reacción, para que el cóctel enzimático logre hidrolizar por completo los substratos presentes.

El grado de polimerización obtenido con los residuos de malta fue de aproximadamente 3, por lo que en este caso se requiere favorecer la actividad de las endocelulasas, por consiguiente a las exocelulasas y también a las β -glucosidasas, para la generación de glucosa. En este caso también se realizará una rampa de temperatura, empezando con una hidrólisis durante hora y media a 50°C para favorecer la actividad de las endocelulasas y exocelulasas, seguida por un incremento de temperatura a 60°C durante media hora más, donde se favorece la actividad de β -glucosidasas.

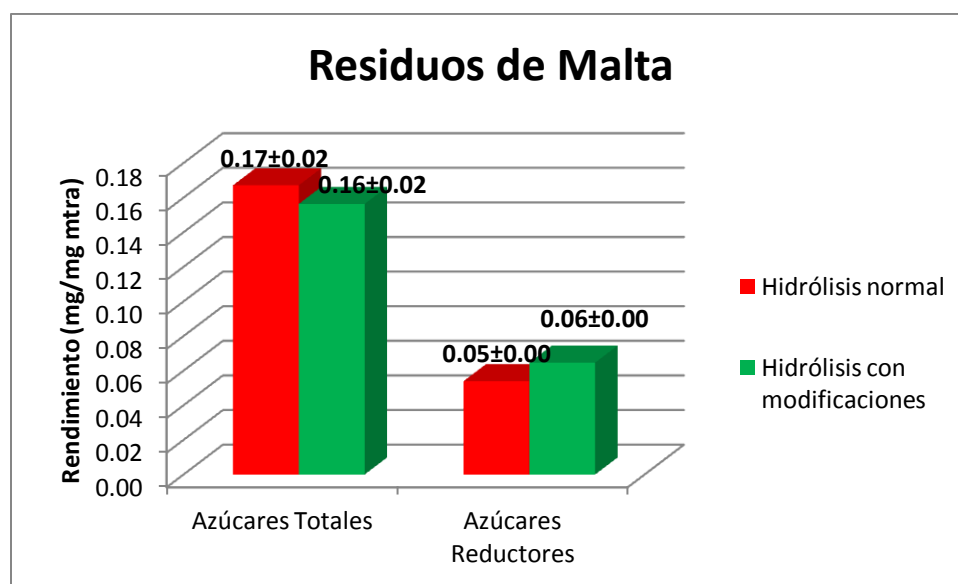


Figura 48. Comparación de la hidrólisis normal de los residuos de malta con la hidrólisis modificada para el cóctel E9. Cada determinación se realizó por triplicado.

Al analizar la comparación de ambas hidrólisis enzimáticas (Figura 48), se puede observar que el incrementar el tiempo de reacción a una hora y media usando una temperatura de 50°C no favoreció la actividad de endocelulasas, ya que la cantidad de azúcares producidos fue similar a la obtenida en la hidrólisis normal, es decir, dejando la reacción durante una hora a 50°C; al no favorecer la actividad ni de endocelulasas ni de exocelulasas, los disacáridos presentes fueron mínimos, por lo que la actividad de β -glucosidasas no tuvo fue considerable, lo que se refleja en el incremento mínimo de azúcares reductores generados. Es poco probable que se deba a una inhibición por producto, ya que el cóctel enzimático E9 da resultados muy favorables para el bagazo de caña, aunque debe de considerarse que la naturaleza de los materiales es distinta. Además, a diferencia de los otros dos materiales, los residuos de malta no fueron secados, por lo que probablemente el agua presente modificó la accesibilidad del material, lo que causó que los residuos de malta estuvieran menos propensos al ataque enzimático, o incluso que el cóctel enzimático no hidrolice la sacarosa presente en glucosa y fructosa.

Hernández, en el 2010, menciona que el pretratamiento ácido diluido resulta ser una opción viable para los residuos de malta, obteniendo 47% de azúcares reductores y 147% de azúcares totales; con los antecedentes obtenidos y utilizando el cóctel enzimático E9 se pueden obtener mejores resultados en azúcares reductores, ya que como se ha dicho, es un cóctel que presenta muy buenas actividades enzimáticas. Además, la adición de H_2SO_4 mejora la posterior hidrólisis enzimática y disminuye la producción de compuestos inhibitorios. (Cuervo, 2009).

7.8.6 Grados de Polimerización de los 3 Residuos Lignocelulósicos con el cóctel enzimático comercial E9 usando la Hidrólisis Enzimática con modificaciones

Como se puede observar en la Figura 49, el pasto Taiwán obtuvo un menor grado de polimerización al realizar la hidrólisis durante una hora a 50°C, lo que indica que las modificaciones a la hidrólisis no lograron mejorar la sacarificación del material. En el caso del bagazo de caña, al reducir el tiempo de reacción a la mitad, no se logra una hidrólisis eficiente por parte del cóctel enzimático, por lo que el grado de polimerización aumentó. En cambio, para los residuos de malta sí existe una disminución en el grado de polimerización, lo que indica que el aumentar el tiempo de reacción y utilizar una rampa de temperatura sí causa que se tenga una mejor hidrólisis enzimática.

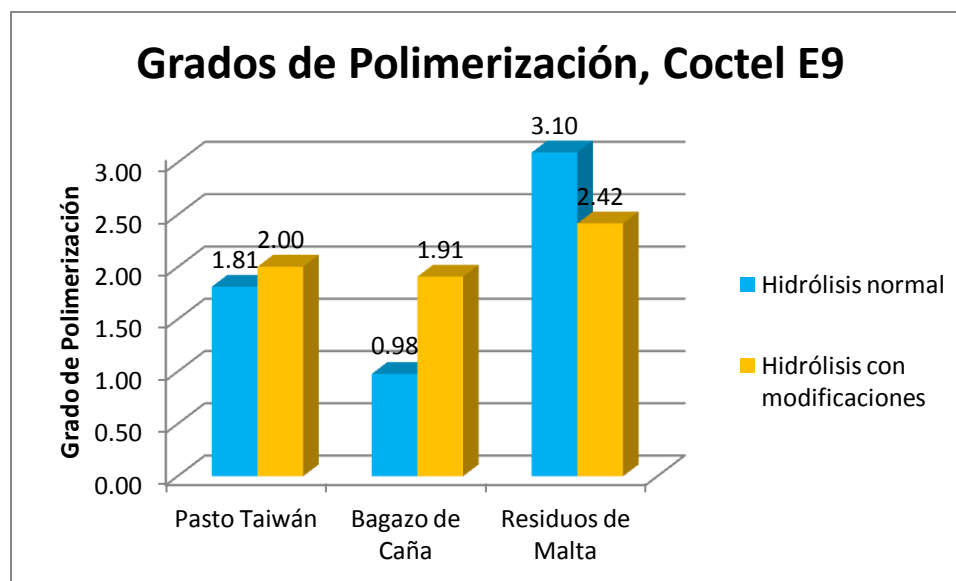


Figura 49. Comparación de los grados de polimerización obtenidos con la hidrólisis normal y con modificaciones usando el cóctel E9 para los 3 materiales. Para el pasto Taiwán se empleó una rampa de temperatura (30 minutos a 50°C y 30 minutos a 60°C); el tiempo de reacción del bagazo de caña se redujo a 30 minutos y para los residuos de malta se empleó una rampa de temperatura (90 minutos a 50°C y 30 minutos a 60°C).

De acuerdo a los estudios de Difracción de Rayos X encontrados en la literatura (Aburto, 2013), para el pasto Taiwán como para el bagazo de caña, se puede observar que el material presenta una estructura cristalina (Figuras 50 y 51) ya que ambos materiales tienen una banda característica, lo que indica que hay una parte del material que es cristalina, a diferencia de los residuos de malta, donde esta banda no se observa y por ende indica que sólo existe parte amorfa de celulosa. (Figura 52). Se esperaría que los residuos de malta obtuvieran mayor eficiencia en la hidrólisis enzimática, debido a que sólo presenta una fracción amorfa; en cambio, para el pasto Taiwán y para el bagazo de caña, en los difractogramas se observa una fracción cristalina para ambos materiales, lo que indica que la hidrólisis enzimática no se favorece, ya que las enzimas sólo pueden degradar a la parte amorfa de la celulosa. Estas suposiciones no corresponden con los resultados experimentales, ya que el material que presentó un menor grado de polimerización es el bagazo de caña, seguido por el pasto Taiwán.

Esto se debe probablemente a que en la difracción de rayos X no se observa la lignina, que es un heteropolímero amorfo, tridimensional y ramificado formado por alcoholes aromáticos, que da soporte estructural, rigidez, impermeabilidad y protección a los polisacáridos estructurales (celulosa y hemicelulosa) y es altamente resistente a la degradación química y biológica (Aro *et al*, 2005; Cuervo *et al*, 2009), lo que puede estar causando que la sacarificación enzimática no sea tan eficiente como se espera.

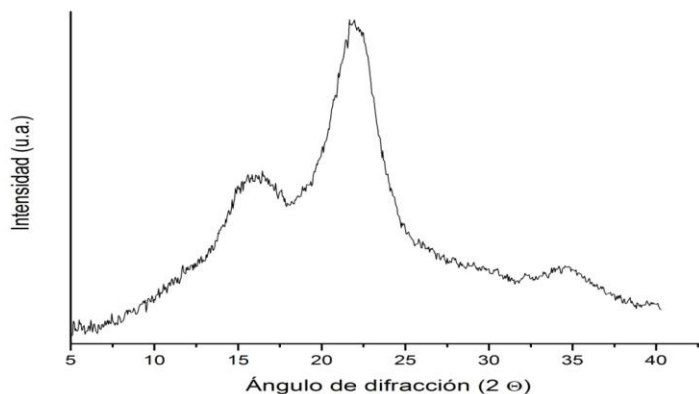


Figura 50. Difractograma obtenido del Pasto Taiwán.

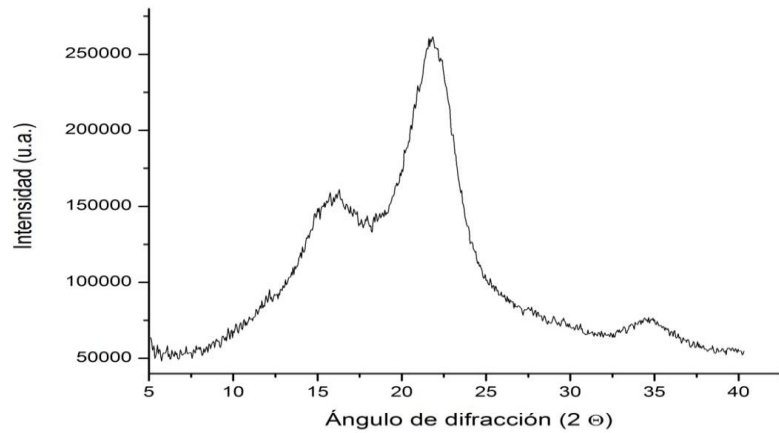


Figura 51. Diffractograma obtenido del Bagazo de Caña.

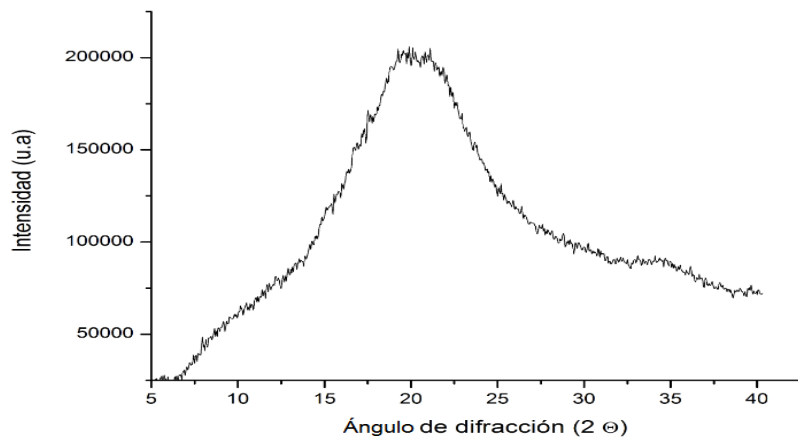


Figura 52. Diffractograma obtenido de los Residuos de Malta.

Además, en los estudios encontrados en la bibliografía con respecto a la Microscopía Electrónica de Barrido Ambiental (ESEM; Aburto, 2013), el bagazo de caña presenta una estructura fibrosa, lo que muestra que el material se encuentra en una estructura tridimensional sin deterioro notable, presentando una superficie lisa y no porosa (Figura 53); el pasto Taiwán, al igual que el bagazo de caña presenta una estructura de fibras, y una superficie lisa, aunque a diferencia del bagazo de caña, sí presenta algunas porosidades (Figura 54). En cambio, para los residuos de malta, se observa que tiene una menor disposición fibrilar, siendo más compacta la estructura, con una superficie menos lisa y con un mayor grado de deterioro (Figura 55).

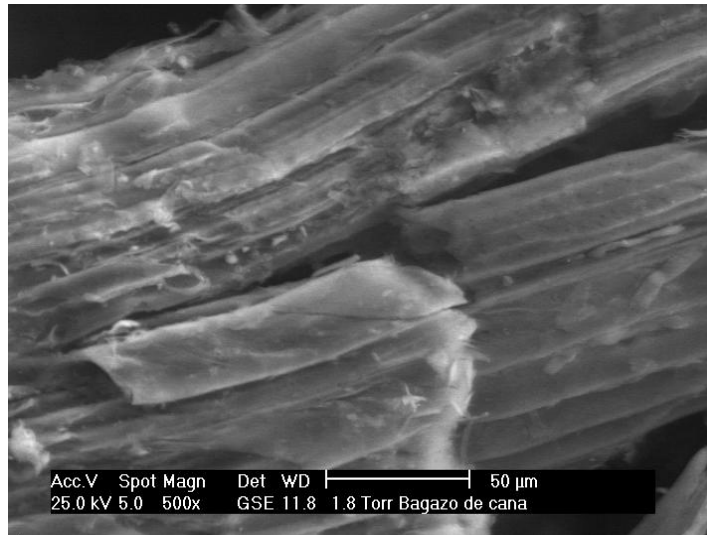


Figura 53. Estructura del bagazo de caña en ESEM.

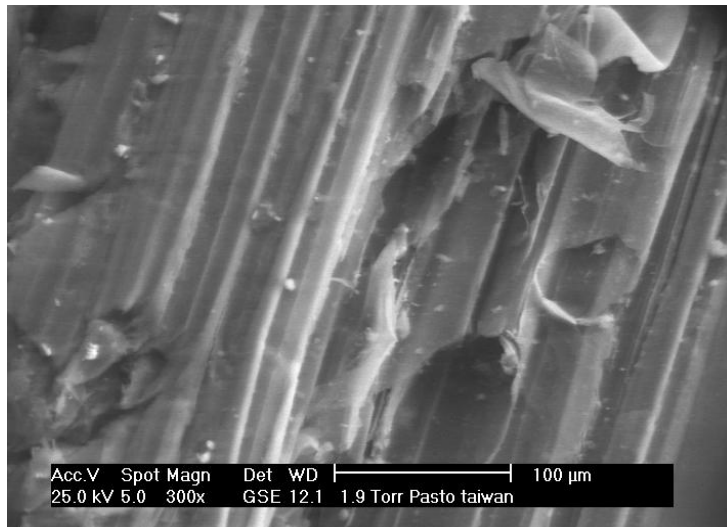


Figura 54. Estructura del pasto Taiwán en ESEM

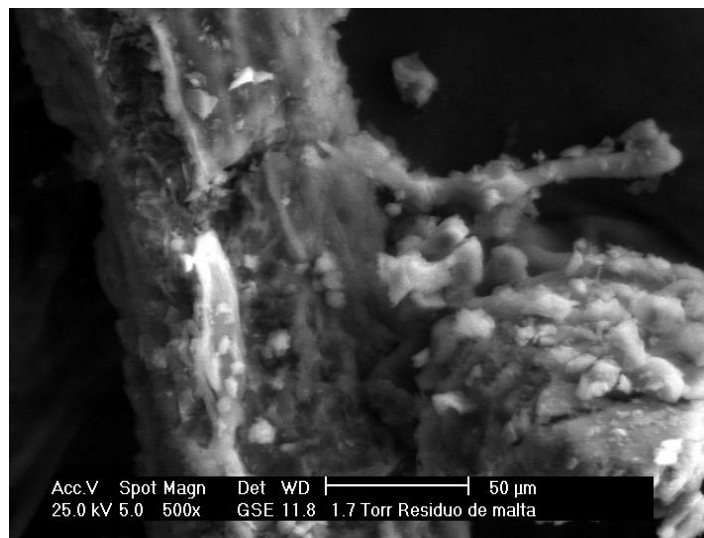


Figura 55. Estructura del bagazo de caña en ESEM.

Al comparar la Microscopía Electrónica de Barrido Ambiental para los tres materiales, se observa que la estructura del bagazo de caña, así como del pasto Taiwán, es muy parecida, ya que ambas presentan fibrillas y una superficie lisa, con la única diferencia de que el pasto Taiwán presenta ciertas porosidades. En cambio, los residuos de malta no presentan la estructura fibrilar, y su conformación es más compacta, lo que puede indicar un mayor deterioro a comparación de los otros dos materiales, lo cual puede estar interfiriendo en la producción de azúcares reductores y totales.

7.8.7 Cuantificación e Identificación de Azúcares mediante HPLC, después de la Hidrólisis Enzimática con modificaciones

En el caso del pasto Taiwán, al comparar ambas hidrólisis (Tabla 21) se puede observar que tanto para xilosa, glucosa y sacarosa se obtiene una mayor concentración que con la hidrólisis normal, lo indica de que se produjeron una mayor cantidad de monosacáridos y disacáridos, pero aún quedaron oligosacáridos y polisacáridos por hidrolizar, ya que el grado de polimerización es de 2.

PASTO TAIWÁN, CÓCTEL E9				
HIDRÓLISIS	XILOSA (mg/gmtra)	FRUCTOSA (mg/gmtra)	GLUCOSA (mg/gmtra)	SACAROSA (mg/gmtra)
Normal	0.0789	0.0216	0.2899	0.0580
Con modificaciones	0.2616	0.0000	0.5382	0.4681

Tabla 21. Comparación de los azúcares cuantificados e identificados mediante HPLC con las dos hidrólisis enzimáticas usando el cóctel E9 para el Pasto Taiwán. Cada determinación se realizó una vez.

Para el bagazo de caña, las concentraciones de xilosa y de glucosa son las mismas en ambas hidrólisis enzimáticas, lo que indica que para las β -glucosidasas, como para las xilanasas, los 30 minutos son suficientes para llevar a cabo la hidrólisis de los azúcares (Tabla 22). En cuanto a la concentración de fructosa es drástico el cambio, ya al disminuir 30 minutos el tiempo de reacción, no se obtiene fructosa. Por último, la sacarosa mostró una mayor concentración al reducir el tiempo, lo que indica que aún quedaron disacáridos sin hidrolizar.

BAGAZO DE CAÑA, CÓCTEL E9				
HIDRÓLISIS	XILOSA (mg/gmtra)	FRUCTOSA (mg/gmtra)	GLUCOSA (mg/gmtra)	SACAROSA (mg/gmtra)
Normal	0.0778	0.2363	0.3172	0.2808
Con modificaciones	0.0843	0.0000	0.3186	0.3202

Tabla 22. Comparación de los azúcares cuantificados e identificados mediante HPLC con las dos hidrólisis enzimáticas usando el cóctel E9 para el Bagazo de Caña. Cada determinación se realizó una vez.

Por último se analizó la comparación entre ambas hidrólisis para los residuos de malta (Tabla 23), donde se observa que al incrementar el tiempo de reacción la

concentración de fructosa aumenta, disminuyendo en cambio la de xilosa, glucosa y sacarosa. Esto nos puede indicar que aunque el pretratamiento utilizado puede ser un factor que influya en las bajas eficiencias, puede ser que los residuos de malta estén generando inhibidores durante la reacción, lo que impide la generación de azúcares reductores, aspecto que se ve reflejado con las bajas concentraciones tanto de xilosa, como de fructosa.

RESIDUOS DE MALTA, CÓCTEL E9				
HIDRÓLISIS	XILOSA (mg/gmtra)	FRUCTOSA (mg/gmtra)	GLUCOSA (mg/gmtra)	SACAROSA (mg/gmtra)
Normal	0.0198	0.0242	0.1467	0.3091
Con modificaciones	0.0000	0.0643	0.0852	0.3005

Tabla 23. Comparación de los azúcares cuantificados e identificados mediante HPLC con las dos hidrólisis enzimáticas usando el cóctel E9 para los Residuos de Malta. Cada determinación se realizó una vez.

8. CONCLUSIONES

La caracterización de los cócteles enzimáticos demostró que el cóctel E9 presentó actividades enzimáticas mayores en comparación con el cóctel E10, teniendo los valores más altos en valores de pH cercano a 4.8. En cambio, la influencia de la temperatura resultó ser un factor importante, ya que ciertas actividades se vieron favorecidas a 50°C mientras que otras lo hicieron a 60°C.

Al realizar la hidrólisis enzimática de los tres materiales lignocelulósicos, el bagazo de caña fue con el que se obtuvieron mejores resultados, con un grado de polimerización cercano a 1, presentando un rendimiento ideal con generación de azúcares totales y reductores cercanos al 100%, a diferencia de los residuos de malta, que fueron los que presentaron el menor rendimiento y la menor eficiencia, por lo que se sugiere realizar un pretratamiento ácido diluido en lugar del básico oxidante con la finalidad de aumentar la eficiencia del proceso y evitar la generación de inhibidores.

Además, tanto para el pasto Taiwán, como para el bagazo de caña, la mejor sacarificación enzimática se obtuvo con el cóctel E9, a diferencia de los residuos de malta, los cuales obtuvieron un mejor rendimiento empleando el cóctel E10, por lo que probablemente el cóctel enzimático empleado también influya en el alto grado de polimerización obtenido para los residuos de malta, lo que indica que la hidrólisis no fue eficiente.

9. BIBLIOGRAFÍA

- Aburrá, R. (2007). *Evaluación y control de los impactos generado por sustancias y residuos no convencionales*. Córdoba: Editorial Brujas.
- Aburto, J., Barrera, I., Gualo, N. (2012). *Manual de técnicas analíticas para la producción de bioetanol a partir de residuos lignocelulósicos*. México: IMP, 38-48.
- Adney, B., Baker, J. (1996). *Measurement of Cellulase Activities*. Colorado: National Renewable Energy Laboratory.
- Alaniz, D. (2008). *Adición de residuo de la industria cervecera al ensilaje de maíz como alternativa de forraje para ganado*. Tesis. Durango: Instituto Politécnico Nacional.
- Almenares, J., Serrat, M. (2008). *Aspectos Tecnológicos Generales para la conversión a Etanol de la biomasa lignocelulósica*. *Tecnología Química*, 28(3), 63-70.
- Aro, N., Pakula, T., Penttila, M. (2005). *Transcriptional regulation of plant cell wall degradation by filamentous fungi*. *FEMS Microbiology*, 29, 791-739.
- Azzam, A. (1989). *Pretreatment of cane bagasse with hydrogen peroxide for enzymatic hydrolysis of cellulose and ethanol fermentation*. *Journal of Environmental Science and Health*, 24(2), 421-433.
- Baldrian, P., Valaskova, V. (2008). *Degradation of cellulose by basidiomycetous fungi*. *FEMS Microbiology*, 32(3)-501-521.
- Barrow, G. (1976). *Química Física para las ciencias de la vida*. Barcelona: Reverté.
- Béguin, P., Aubert, J. (1994). *The biological degradation of cellulose*. *FEMS Microbiology*, 13, 25-28.
- Beldman, G., Pilnik, W., Rombouts, F.M., Voragen, A.G. (1984). *Application of cellulose and pectinase from fungal origin for the liquefaction and saccharification of biomass*. *Enzyme and Microbial Technology*, 6, 503-507.
- Bender, M., Brubacher, L. (1977). *Catálisis y acción enzimática*. Barcelona: Reverté.
- Biología Sur. (2010). *Regulación de la actividad enzimática: temperatura, pH, inhibidores*. . [En línea]. Disponible en:

<http://www.biologiasur.org/apuntes/base-fisico-quimica/base/enzimas/regulacion.html> [Último acceso el 18 de febrero de 2014].

- Bocchini, D., Ferreira, H., Simoes, R., Ferreira, H., De Souza, M., Da Silva, R., Gomes, E. (2011). *Agroindustrial Wastes as Substrates for Microbial Enzymes Production and Source of Sugar for Bioethanol*. Croacia: Mr. Sunil Kumar, 319-360.
- Brown, R., Saxena, I., Kudlicka, K. (1996). Cellulose Biosynthesis in Higher Plants. *Trends in Plant Science*, 1(5), 149-156.
- Cardonna, E., Rios, J., Peña, J., Rios, L. (2013). *Pretratamiento Alcalino de Pasto Elefante (*Pennisetum sp*) y King Grass (*Pennisetum hybridum*) cultivados en Colombia para la producción de Bioetanol*. *SciELO*, 24(5), 69-80.
- Carrillo, F. (2002). *Estudio del comportamiento de la fibra lyocell frente a la hidrólisis enzimática con celulasas*. *Reference Review*, 123-163.
- Castillo, F., Roldán, M., Blasco, F., Huertas, M., Caballero, F., Moreno, C., Martínez, M. (2005). *Biotecnología Ambiental*. Madrid: Tébar.
- Chang, V., Burr, B., Holtzapple, M. (1997). *Lime pretreatment of switchgrass*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 63(65), 3-19.
- Chaplin, M. (1986). *Monosaccharides*. En M. Chaplin, J. Kennedy. Eds. *Carbohydrate Analysis: A Practical Approach*. Oxford: Academic Press, 1-36.
- Chávez-Sifontes, M., Domine, M. (2013). *Lignina, Estructura y Aplicaciones: Métodos de Despolimerización para la obtención de derivados aromáticos de interés industrial*. *Avances en Ciencias e Ingeniería*, 4(4), 15-46.
- Coughlan, M., Ljungdahl, L. (1988). *Comparative biochemistry of fungal and bacterial cellulolytic enzyme system*. In: J. Aubert, P. Béguin. Eds. *Biochemistry and Genetics of Cellulose Degradation*. London: Academic Press, 11-30.
- Cryobiotech. (2009). *Crioprotectores*. [En línea]. Disponible en: http://laplace.us.es/cryobiotech/index.php?option=com_content&view=article&id=15:crioprotectores&catid=8:introduccion&Itemid=38 [Último acceso el 10 de febrero de 2014].
- Cuervo, L., Folch, J., Quiroz, R. (2009). *Lignocelulosa como fuente de azúcares para la Producción de Etanol*. *BioTecnología*, 13(3), 11-25.

- Cunningham, R., López, G. (1994). *Etanol de lignocelulósicos: tecnología y perspectivas*. Santiago de Compostela: Programa CYTED, 298,311.
- De la Rosa, A. (2003). *Utilización papelera de fibras no madereras (kenaf y Miscanthus sinensis). Estudio de secuencias de blanqueo ECF y TCF*. Terrasa: Universidad Politécnica de Cataluña.
- Debandi, M., Francios, N., Daraio, M. (2011). *Evaluación de distintas membranas para liberación In Vitro de principios activos anticelulolíticos*. Avances en Ciencias e Ingeniería, 2(2), 97-105.
- Dekker, R. (1985). *Pretreatment options for the enzymatic saccharification of lignocellulose*. New Zeland: Symposium on the pretreatment of lignocellulosics materials.
- Demirbas, A. (2009). *Biofuels*. Londres: Springer, 87-88.
- Dufey, A. (2006). *Producción y comercio de biocombustibles y desarrollo sustentable: los grandes temas*. Londres: IIED, 3.
- Duff, S., Murray, W. (1996). *Bioconversion of forest products industry waste cellulosics to fuel ethanol: a review*. Bioresource Technology, 55, 1-33.
- EBBAM. ERG (2005). *Biofuels Analysis Meta-Model. Release 1.0*. University of California, Berkeley.
- Espinoza, W., Goddard, M., Gutiérrez, C., Bonfil, C.(2009). *Los biocombustibles. ¿Cómo ves?* 123, 4-6.
- Fan, L., Gharpuray, M., Lee, Y. (1987). *Cellulose Hydrolysis Biotechnology Monographs*. Berlín: Springer, 57.
- Fengel, D., Wegener, C. (1984). *Wood chemistry, ultrastructure, reactions*. Berlin: Walter de Gruyter.
- Fernández. E., Galván, A. (2009). *Métodos para la cuantificación de proteínas*. En M. Tena, G. Dorado, J. Jorrín, M. Fernández. *Bioteología*. Córdoba: Universidad de Córdoba.
- Festucci-Buselli, R., Otoni, W., Joshi, C. (2007). *Structure, organization, and functions of cellulose synthase complexes in higher plants*. Brazilian Journal of Plant Physiology, 19(1), 1-13.

- Flores, R., Muñoz-Ledo, R., Flores, B., Cano. K. (2008). *Power Generation from Biomass Estimation for Projects of the Clean Development Mechanism Program*. Revista Mexicana de Ingeniería Química, 7(1), 35-39.
- Freudenberg, K. (1965). *Lignin: Its Constitution and Formation from ρ -Hydroxycinnamyl Alcohols*. Science, 148(3670), 595-600.
- Garzón, L., Gómez., S, (2007). *Optimización del pretratamiento con peróxido de hidrógeno alcalino del bagazo de caña de azúcar para la producción de glucosa*. Tesis. Bucaramanga: Universidad Industrial de Santander.
- Gellerstedt, G., Henriksson, G. (2008). *Lignins: Major sources, structure and properties*. Amsterdam: Elsevier B.V., 201-224.
- Gilkes, N., Kwan, E., Kilburn, D., Miller, R., Warren, J. (1997). *Attack of carboxymethylcellulose at opposite ends by two cellobiohydrolases from Cellulomonas fimi*. Journal Biotechnology, 57, 83.
- Glazer, A., Nikaido, H. (2007). *Microbial Biotechnology: Fundamentals of Applied Microbiology*. New York: Cambridge University Press, 430-445.
- Gomis, V. (2008). *Cromatografía de líquidos de alta resolución*. Alicante: Universidad de Alicante, Departamento de Ingeniería.
- Harris, D. (2007). *Valoraciones Redox*. En *Análisis Químico Cuantitativo*. 3era Edición. Zaragoza: Reverté.
- Hector, R., Hughes, S., Liang-Li, X. (2008). *Developing Yeast Strains for Biomass-to-Ethanol Production*. [En línea]. Disponible en: <http://biomassmagazine.com/articles/1533/developing-yeast-strains-for-biomass-to-ethanol-production> [Último acceso el 12 de marzo de 2014].
- Henrissat, B. (1991). *A classification of glycosyl hydrolases based on amino-acid sequence similarities*. Biochemistry Journal, 280, 309-316.
- Hernández, M., Paz-Lago, D. (2000). *Purificación y caracterización parcial de la enzima xilanasa a partir del preparado comercial Novoban 240*. Cultivos Tropicales, 21(2), 27-31.
- Hernández. P. (2010). *Evaluación del pretratamiento básico-oxidante, ácido diluido y de la sacarificación enzimática mediante E6 de diferentes materiales*

lignocelulósicos en la obtención de azúcares reductores y totales. Tesis. México: Universidad Politécnica de Puebla.

- Himmel, M. E., Baker, J. O., Overend, R. P. (1994). *Enzymatic conversion of biomass for fuels production*. American Chemical Society, 315(5813), 804-807.
- Horta, L. *Bioetanol de Caña*. [En línea]. Disponible en: <http://www.bioetanoldecana.org/es/download/cap3.pdf> [Último acceso el 27 de febrero de 2014].
- Hsu, T., Ladisch, M., Tsao, T. (1980). *Alcohol from Cellulose*. CHEMTECH, 10, 315-319.
- Iiyama, K., Lam, T., Stone, B. (1994). *Covalent Cross-Links in the Cell Wall*. Plant Physiology, 104(2), 318.
- Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura. (2007). *Preguntas y respuestas más frecuentes sobre Biocombustibles*. San José: IICA, 5-6.
- Iturbe, F., Sandoval, J. (2011). *Análisis de Alimentos. Fundamentos y Técnicas*. México, D.F.: Facultad de Química, UNAM.
- IUPAC (2012). *Degree of Polymerization*. [En línea]. Disponible en: <http://goldbook.iupac.org/D01569.html> [Último acceso el 20 de febrero de 2014].
- Jacques, K., Lyons, T., Kelsall, D. (2003). *The alcohol Textbook*. 4th Edition. Nottingham: Nottingham University Press, 371.
- Jorrín, J., Tena, M. (2007). *Extracción y ensayo de la actividad invertasa de levadura de panadería*. En M. Tena, G. Dorado, J. Jorrín, M. Fernández. *Biotecnología*. Córdoba: Universidad de Cordoba.
- Kohlmann, K., Westgate, P., Sarikaya, A. (1995). *Enhanced enzyme activities on hydrated lignocellulosic substrates*. American Chemical Society National Meeting, 127(618), 237–255.
- Koolman, J., Röhm, H. (2004). *Bioquímica: texto y atlas*. 3era Edición. Madrid: Médica Panamericana.
- Kosugi, A., Murashima, K., Doi, R. (2002). *Xylanase and Acetyl Esterase Activities of XynA, a Key Subunit of the *Clostridium cellulovorans* Cellulosome for Xylan Degradation*. Applied and Environmental Microbiology, 12, 6399-6402.

- Lin, Y., Tanaka, S. (2006). *Ethanol fermentation from biomass resources: current state and prospects*. Applied Microbiology Biotechnology, 69, 627-642.
- Linder, M., Teeri, T. *The cellulose-binding domain of the major cellobiohydrolase of Trichoderma reesei exhibits true reversibility and a high exchange rate on crystalline cellulose*. Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 93, 12251-12255.
- Lobo, P., Jaguaribe, E., Rodrigues, J., Da Rocha, F. (2007). *Economics of alternative sugar cane milling options*. Applied Thermal Engineering, 27, 1405-1413.
- López, R., Espinosa, S., Hernández, M., Campos, J., Reyes, D. (2011). *Hidrólisis enzimática de agrorresiduos para el aprovechamiento integral de la biomasa en el proceso de producción de bioetanol lignocelulósico*. Querétaro: XIV Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería.
- Lu-Chau, T, Pena, R. (2005). *Proceso de hidrólisis y fermentación aplicados a la producción de bioetanol*. Tesis. Santiago de Compostela: Universidad de Santiago de Compostela.
- Lynd, L., Weimer, P., Van Zyl, W., Pretorius, I. (2002). *Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology*. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 66, 506-577.
- Madrid, J., Madrid, A., Moreno, G. (2003). *Análisis de vinos, mostos y alcoholes*. Madrid: A. Madrid Vicente, Ediciones.
- Maluenda, M. (2012). *Bioetanol. Perspectivas para el 2012*. [En línea]. Disponible en: <http://www.agrodigital.com/Documentos/bioetanolmz12.pdf> [Último acceso el 4 de marzo de 2014].
- Maluenda, M. (2013). *Perspectivas del Bioetanol en la UE hasta el 2020*. [En línea]. Disponible en: <http://www.agrodigital.com/Documentos/bioetanolab13.pdf> [Último acceso el 4 de marzo de 2014].
- Martin, C., Thonson, B.A. (2007). *Next oxidation pretreatment of lignocellulosic residues of sugarcane, rice, cassava and peanuts for ethanol production*. Journal Technol Biotechnol, 82, 174 – 181.

- Martínez, A., Ruiz-Dueñas, F., Martínez, M. Del Río, J., Gutiérrez, A. (2009). *Enzymatic Delignification of Plant Cell Wall: From Nature to Mill*. Current Opinion in Biotechnology, 20(3), 348-357.
- Martínez, C., Balcázar, E., Dantán, E., Folch, J. (2008). *Celulasas fúngicas: Aspectos biológicos y aplicaciones en la industria energética*. Revista Latinoamericana de Microbiología, 50(3,4), 119-131.
- Mbohwa, C. (2007). *Bagasse energy cogeneration potential in the Zimbabwean sugar industry*. Renewable Energy, 28, 91-204.
- Micic, M., Radotic, K., Benitez, I., Ruano, M., Moy, V., Mabrouki, M., Leblanc, R. (2001). *Topographical characterization and surface forcé spectroscopy of the photochemical lignin model compound*. Biophysical Chemistry, 94, 257-263.
- Montes, P. (2014). *Estudia el IPN el uso de bagazo de caña para hacer concreto hidráulico*. México: La Jornada.
- Montoya, A., Sánchez, M., Gómez, A. (2010). *Detección de enzimas con actividad xilanasa en Bacillus flexus*. Nuevo León: Universidad Autónoma de Nuevo León.
- Morales, C. (2013). *Ingenios de Veracruz generan Energía Eléctrica*. [En línea] (Actualizado al 13 de agosto de 2013). Disponible en: <http://www.zafranet.com/2013/08/ingenios-de-veracruz-generan-energa-elctrica/> [Último acceso el 5 de marzo de 2014].
- Moreira N. (2005). *Growing expectations: new technology could turn fuel into a bump crop*. Sci News Online, 168 (14), 209-224.
- Mtui, G. (2009). *Recent Advances in Pretreatment of Lignocellulosic Wastes and Production of Value Added Products*. African Journal of Biotechnology, 8(8), 1398-1415.
- Mussatto, S., Teixeira, J. (2010). *Lignocellulose as raw material in fermentation processes*. Applied Microbiology and Microbial Biotechnology, 897-907.
- Negro, M., Manzanares, P., Oliva, J. (2003). *Changes in various physical/parameters of Pinus pinaster wood after steam explosion pretreatment*. Biomass. Bioenergy, 25, 301-308.

- Nelson, D., Cox, M. (2005). *Principios de Bioquímica Lehninger*. 4ta Edición. Madrid: Omega.
- Neri, R., Solís, L., Villegas, H. (2008). *Estudio de la consolidación ósea en rata por microscopía electrónica de barrido ambiental*. *Veterinaria México*, 39(2),18-24.
- Nielsen, S. (2007). *Análisis de los alimentos: manual de laboratorio*. 2nda Edición. Zaragoza: Acribia.
- Nollet, L. (1996). *Handbook of Food Analysis*. New York: M. Dekker.
- OECD/IEA (2007). *Biofuel Production*. Energy Technology Essentials, 4.
- Olsson, L., Soerensen, H., Dam, B., Christensen, H., Krogh, K., Meyer, A. *Separate and simultaneous enzymatic hydrolysis and fermentation of wheat hemicelluloses with recombinant xylose utilizing Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Biochemistry Biotechnology*, 129(132), 117-129.
- Oxfam Internacional (2009). *Vamos al Grano ¿Combustible o Alimento?* México; Rostros y Voces, 7.
- Palacio, H. (1959). *Fabricación del alcohol*. Barcelona: Salvat Editores, 279-305.
- Peña, A., Arroyo, A., Gomez, A., Tapia, R. (2004). *Bioquímica*. 2nda Edición. México, D.F.: Limusa.
- Philippidis, G., Smith, T. (1995). *Limiting factors in the simultaneous saccharification and fermentation process for conversion of cellulosic biomass to fuel ethanol*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 51(52), 117-124.
- Porto, A. (2012). *Curso de Biología*. [En línea]. Disponible en: <http://www.bionova.org.es/biocast/tema14.htm> [Último acceso el 27 de febrero de 2014].
- Prade, R. (1996). *Xylanase biology to biotechnology*. *Biotechnology Genetic Engineering Review*, 13, 101-131.
- Pradny, M., Lesny, P., Fiala, J., Vasic, J., Slouf, M., Michálek, J., Sykova, E. (2003). *Macroporous hydrogels based on 2-hydroxyethyl methacrylate with methacrylic acid*. *Collection of Czechoslovak Chemical Communications*, 68, 812-822.

- Red Mexicana de Bioenergía (2012). *Biogás*. [En línea]. Disponible en: <http://www.rembio.org.mx/inicio/index.php/biogas> [Último acceso el 27 de febrero de 2014].
- Restuti, D., Michaelowa, A. (2007). *The economic potential of bagasse cogeneration as CDM projects in Indonesia*. Energy Policy, 35, 3952-3966.
- Roca, G., Glauco, C., Olivares, E., Barbosa, L. (2006). *Caracterización del bagazo de la caña de azúcar. Parte I. Características físicas*. Scielo, 6, 25-40.
- Rodríguez, N., Ramírez, J., Vázquez, M., Velázquez, G., Téllez, S. (2007). *Aprovechamiento de bagazo de caña en la producción biotecnológica de Xilitol por Candida parapsilosis*. Revista Digital Universitaria de Tamaulipas, 2(2), 1-2.
- Rogers, P., Jeon, Y., Lee, K., Lawford, H. (2007). *Zymomonas mobilis for Fuel Ethanol and Higher Value Products*. Advances in Biochemical Engineering, 108, 263-288.
- Roncero, M., Torres, A., Colom, J., Vidal, T. (2003). *Effect of xylanase on ozone bleaching kinetics and properties of Eucalyptus kraft pulp*. Journal of Chemical Technology and Biotechnology, 78, 1023-1031.
- Rostros y Voces, FDS, A.C. *Biocombustibles... Cuando la solución es parte del problema*. México, D.F.:Oxfam Internacional, 7.
- Rua, M. (2008). *Pastos de Corte para el Trópico*. [En línea]. Disponible en: <http://www.engormix.com/MA-ganaderia-leche/articulos/pastos-corte-tropico-t2047/p0.htm> [Último acceso el 27 de febrero de 2014].
- SAGARPA (2010). *Bases técnicas para el fomento a la Producción de Biocombustibles en el País a partir de Caña de Azúcar*. [En línea]. Disponible en: http://www.infocana.gob.mx/materiales/Web_BIOCOMBUSTIBLES.pdf [Último acceso el 4 de marzo de 2014].
- SAGARPA (2011). *Biocombustibles. Definición, Ventajas y Desventajas*. [En línea] (Actualizado al 12 de junio de 2011). Disponible en: <http://www.bioenergeticos.gob.mx/index.php/introduccion/definicion-ventajas-y-desventajas.html> [Último acceso el 27 de febrero de 2014].
- SAGARPA (2013). *Ley de Promoción y Desarrollo de los Biocombustibles. ¿Qué son los biocombustibles?* [En línea] (Actualizado al 12 de junio de 2011).

Disponible en: <http://www.bioenergeticos.gob.mx/index.php/introduccion/que-son-los-biocombustibles.html> [Último acceso el 19 de noviembre de 2013].

- Saha, B., Iten, L., Cotta, M., Wu, Y. (2005). *Dilute acid pretreatment, enzymatic saccharification, and fermentation of rice hulls to ethanol*. *Biotechnology Progress*, 21(3), 816-822.
- Sanchez, C. (2008). *Lignocellulosic residues: biodegradation and bioconversion by fungi*. *Biotechnology Advances* 27, 185-294.
- Sánchez, E., Fornés, D., Canepare, C., Apro, N. (2008). *Hez de malta: en busca de su valor agregado*. [En línea] Disponible en: <http://www.inti.gob.ar/sabercomo/sc63/inti6.php> [Último acceso el 27 de febrero de 2014].
- Sánchez, O., Cardona, C. (2005). *Producción biotecnológica de alcohol carburante I: obtención a partir de diferentes materias primas*. *SciELO*, 30(11), 17-34.
- Sanchez, R., Gutiérrez, A., Muñoz, J., Barrero, J. (2010). *Producción de bioetanol a partir de subproductos agroindustriales lignocelulósicos*. *Revista Tumbaga*, 5, 61-91.
- Schmid, G., Wandrey, C. (1987). *Purification and partial characterization of a cellodextrin glucohydrolase (β -glucosidase) from *Trichoderma reesei* strain QM 9414*. *Biotechnology Bioengineering*, 30, 571-585.
- Sector Azucarero Colombiano. (2013). *Perspectivas del Mercado Azucarero Mundial para la Temporada 2012/2014*. Asocaña, 4-5.
- SENER (2006). *Potenciales y Viabilidad del Uso de Bioetanol y Biodiesel para el Transporte en México*. [En línea]. Disponible en: http://www.sener.gob.mx/res/PE_y_DT/pub/Biocombustibles_en_Mexico_Estudio_Completo.pdf [Último acceso el 4 de marzo de 2013].
- Servicios de Agua y Drenaje de Monterrey, I.P.D. (2011). *Cuatro generaciones de biocombustible en búsqueda de la sustentabilidad*. [En línea]. Disponible en <http://www.sadm.gob.mx/PortalSadm/jsp/prensa.jsp?id=313> [Último acceso el 27 de febrero de 2014].

- Sieben, A. (1975). *Cellulase and other hydrolytic enzyme assays using an oscillating tube viscometer*. Analytical Biochemistry, 63(1), 214-219.
- Singh, A., Pant, D., Korees, N., Nizami, A., Prasad, S., Murphy, J. (2010). *Key issues in life cycle assessment of ethanol production from lignocellulosic biomass: Challenges And Perspectives*. Bioresource Technology, 101, 5003–5012.
- Söderström, J., Pilcher, L., Galbe, M., Zacchi, G. (2003). *Combined use of H₂SO₄ and SO₂-impregnated mixed softwoods for ethanol production*. Journal of Chemical Technology and Biotechnology, 105(108), 127-140.
- Somerville, C., Bauer, S., Brininstool, G., Facette, M., Hamann, T., Milne, J., Osborne, E., Paradez, A., Person, S., Raab, T., Vorwerk, S., Youngs, H. (2010). *Towards a System Approach to Understanding Plant Cell Walls*. Science, 306(5707), 2206-2211.
- Sprenger, G. (1996). *Carbohydrate metabolism in Zymomonas mobilis: a catabolic highway with some scenic routes*. FEMS Microbiology, 145, 301-307.
- Suesca, A. (2012). *Producción de enzimas celulolíticas a partir de cultivos de Trichoderma sp con biomasa lignocelulósica*. Tesis. Bogotá: Universidad Nacional de Colombia.
- Sun, Y., Cheng, J. (2002). *Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review*. Elsevier, 83, 1-11.
- Sustainable Forestry for Bioenergy and Bio-based Products (2007). *Biomass Learning Modules*. . [En línea]. Disponible en <http://learn.forestbioenergy.net/> [Último acceso el 12 de marzo de 2014].
- Taherzadeh, M., Karimi, K. (2007). *Enzyme-based hydrolysis processes for ethanol from lignocellulosic materials: a review*. Bioresources, 2(4), 707-738.
- Tanford, C. (1961). *Physical Chemistry of Macromolecules*. New York: Wiley.
- Tapia, E. (2010). *Sacarificación enzimática de diferentes materiales lignocelulósicos*. México: Universidad Politécnica de Puebla.
- Tena, M., Dorado, G., Jorrín, J., Fernández, M. (2009). *Biotecnología*. Córdoba: Universidad de Cordoba.

- Tomás-Pejó, E., Olivia, J., Ballesteros, M., Olsson, L. (2008). *Comparison of SHF and SSF processes from steam-exploded wheat straw for ethanol production by xilose-fermenting and robust glucose-fermenting Saccharomyces cerevisiae strains*. *Biotechnology Bioengineering*, 100(6), 1122-1131.
- Unión Ganadera Regional de Jalisco (2010). *Zacates Perennes de Corte*. [En línea]. Disponible en: http://www.ugrj.org.mx/index.php?option=com_content&task=view&id=200&Itemid=140 [Último acceso el 5 de marzo de 2014].
- Universidad Central de Venezuela (2008). *Guía de Cromatografía*. . [En línea]. Disponible en: <http://www.ciens.ucv.ve:8080/generador/sites/LIApregrado/archivos/Guia%20para%20cromatografia.pdf> [Último acceso el 7 de febrero de 2014].
- Van Maris, A., Abbott, D., Bellissimi, E., Van den Brink, J., Kuyper, M., Luttik, M., Wisselink, H., Scheffers, W., Van Dijken, J., Pronk, J. (2006). *Alcoholic fermentation of carbon sources in biomass hydrolysates by Saccharomyces cerevisiae: current status*. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 90, 391-418.
- Viñals, M., Bell, M., Michelena, G., Ramil, M. (2012). *Obtención de etanol a partir de biomasa lignocelulósica*. *Redalyc*, 46(1), 7-16.
- Voet, D., Voet, J. (2006). *Bioquímica*. 3era Edición. Buenos Aires: Médica Panamericana, 502.
- Willis, C. (1990). *Regulation of sugar and ethanol metabolism in Saccharomyces cerevisiae*. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 25, 245-280.
- Wingren, A., Galbe, M., Zacchi, G. (2003). *Techo-economic evaluation of producing ethanol from softwood: Comparison of SSF and SHF and identification of bottlenecks*. *Biotechnology Progress*, 19(4), 1109-1117.
- Wingren, A., Galbe, M., Roslander, C., Rudolf, A., Zacchi, G. (2005). *Effect of the reduction in yeast and enzyme concentrations in a simultaneous-saccharification-and-fermentation-based bioethanol process*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 122, 485-499.
- Wyman, C., Decker, S., Himmel, M., Brady, J., Skopec, C., Viikari, L. (2005). *Hydrolysis of Cellulose and Hemicellulose* En: M. Dekker. Ed. *Polysaccharides*.

Structural Diversity and Functional Versatility. 2nd Edition. New York: Severian Dimitriu, 995-1034.

- Yang, B., Dai, Z., Ding, S., Wyman, C. (2011). *Enzymatic hydrolysis of cellulosic biomass*. *Biofuels*, 2(4), 421-450.
- Ysambertt, F., Delgado, N., González, T., Bravo, B., Chávez, G., Márquez, N., Infante, M. (2009). *Reacciones de esterificación-sulfonación asistidas por microondas de ligninas kraft: Influencia de los cambios estructurales sobre la tensión superficial*. *Scielo*, 17(3), 1315-2076.
- Zafra. (2008). *Precio Tonelada de Caña*. . [En línea]. Disponible en <http://www.zafranet.com/tag/precio-tonelada-de-cana/page/4/> [Último acceso el 4 de marzo de 2014].

10. ANEXOS

10.1 ANEXO A. Elaboración de Curva Patrón de Glucosa para el Método DNS

❖ Preparación del reactivo DNS

En un vaso de precipitados de 250 mL disolver 1 g de ácido 3,5 dinitrosalicílico en 50 mL de agua a los que se les ha adicionado 20 mL de una solución de hidróxido de sodio 2 N. Una vez disuelto lo anterior adicionar 30 g de tartrato de sodio y potasio. Agitar hasta lograr una mezcla homogénea y aforar a un volumen final de 100 mL con agua destilada. Conservar en un frasco ámbar a temperatura ambiente.

❖ Elaboración de Curva Patrón

Pesar 0.01 g de glucosa y disolver en 10 mL de agua destilada, para obtener una solución con una concentración de 1000 µg/mL (1 mg/mL). Tomar de esta solución los volúmenes especificados en la Tabla 24, para lograr las concentraciones requeridas para la curva. Preparar una curva patrón en concentraciones de 100 a 1000 µg/mL de glucosa de acuerdo a la tabla. Calentar por 5 minutos en un baño a ebullición, enfriar y diluir con 8 mL de agua destilada y homogeneizar los tubos en el vórtex. Leer la absorbancia a 540 nm. Construir una gráfica de absorbancia contra concentración de glucosa y mediante una regresión lineal, encontrar la ecuación de la recta (Figura 56).

MUESTRA	SOLUCIÓN DE GLUCOSA 1 mg/mL (µL)	AGUA (µL)	DNS (mL)
Blanco	0	1000	1
1	100	900	1
2	200	800	1
3	300	700	1
4	400	600	1
5	500	500	1
6	600	400	1
7	700	300	1
8	800	200	1
9	900	100	1
10	1000	0	1

Tabla 24. Datos para la elaboración de la curva patrón para el método de DNS.

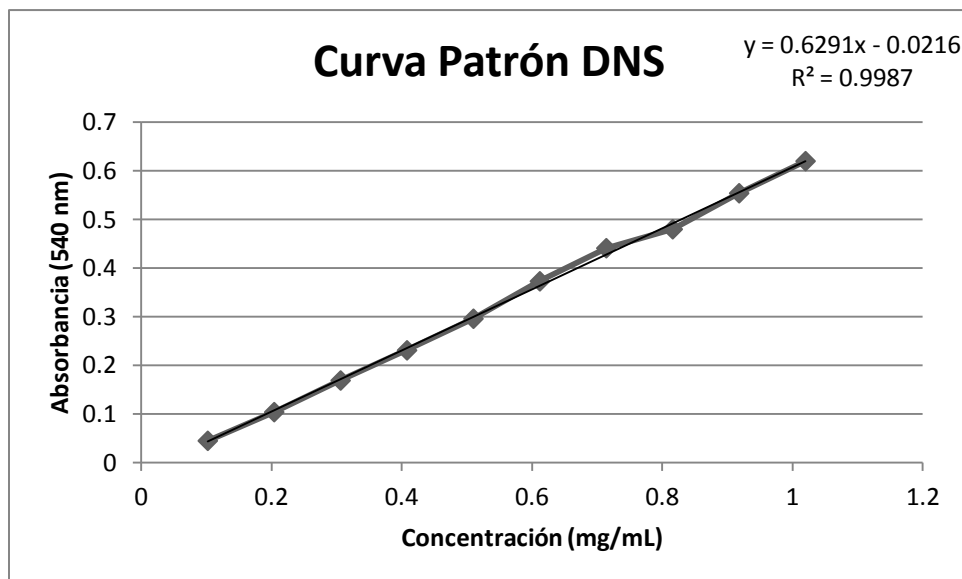


Figura 56. Curva patrón elaborada para el método de DNS.

10.2 ANEXO B. Elaboración de Curva Patrón de Glucosa para el Método Fenol-Sulfúrico

❖ Preparación del reactivo de Fenol al 5% (p/v)

Pesar 5 g de fenol, disolverlo en agua. Trasvasar a un matraz aforado de 100 mL y aforar.

❖ Elaboración de Curva Patrón

Pesar 0.01g de glucosa y disolver en 10 mL de agua destilada. Tomar de esta solución 1 mL y aforarla con 10 mL, para obtener una solución de 100 µg/mL. Utilizar esta última solución para preparar la curva patrón. Preparar una curva patrón de glucosa en concentraciones de 10 a 100 µg/mL como se especifica en el Tabla 25. Añadir 1 mL de la solución de fenol al 5%, adicionar cuidadosamente 5 mL de ácido sulfúrico concentrado y homogenizar con vórtex. Dejar enfriar la mezcla a temperatura ambiente y determinar la absorbancia de la mezcla a 490 nm, frente al blanco. Construir una gráfica de absorbancia contra concentración de glucosa y mediante una regresión lineal, encontrar la ecuación de la recta (Figura 57).

MUESTRA	SOLUCIÓN DE GLUCOSA 1 mg/mL (μL)	AGUA (μL)	FENOL AL 5% (p/v) (mL)	H ₂ SO ₄ CONCENTRADO (mL)
Blanco	0	1000	1	5
1	100	900	1	5
2	200	800	1	5
3	300	700	1	5
4	400	600	1	5
5	500	500	1	5
6	600	400	1	5
7	700	300	1	5
8	800	200	1	5
9	900	100	1	5
10	1000	0	1	5

Tabla 25. Datos para la elaboración de la curva patrón para el método de Fenol-Sulfúrico.

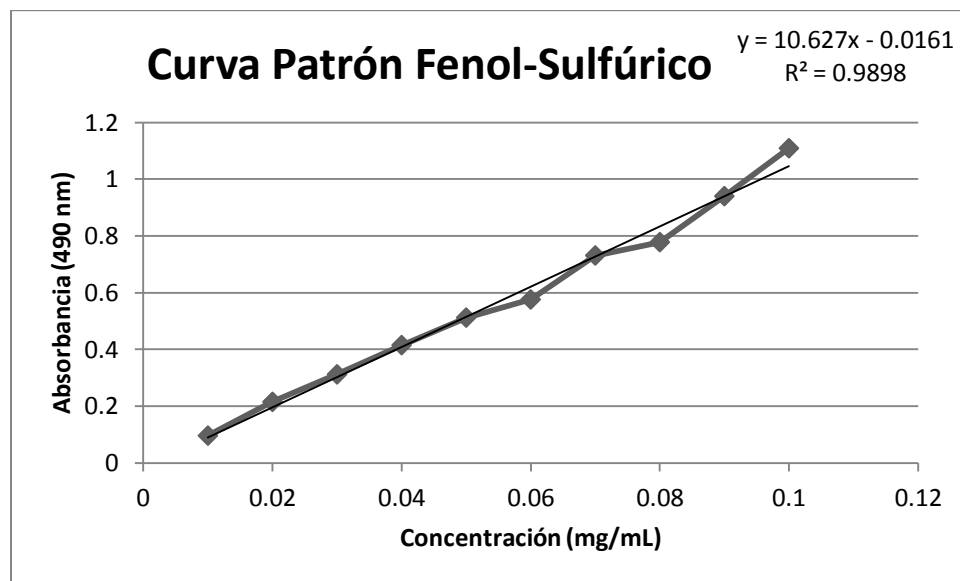


Figura 57. Curva patrón elaborada para el método de Fenol-Sulfúrico.

10.3 ANEXO C. Elaboración de Curva Patrón de Albúmina de Suero Bovina para el método de Bradford

❖ Preparación del reactivo Bradford

Diluir 1 parte del Dye Reagent Concentrate con 4 partes de agua destilada. Filtrar con papel Whatman

no. 1.

❖ Elaboración de Curva Patrón

Tomar 0.65 mL de solución de Albúmina de Suero Bovina (BSA) 1.38 mg/mL y adicionarle 0.35 mL de aguadestilada. De esta manera se tendrá una solución de BSA de 0.9 mg/mL. Preparar una serie de tubos para la curva patrón, cuya concentración de BSA ira de 0.2 mg/mL a 0.9 m/mL, de acuerdo a la Tabla 26. Construir una gráfica de absorbancia contra concentración BSA y mediante una regresión lineal, encontrar la ecuación de la recta (Figura 58).

MUESTRA	SOLUCIÓN BSA (mg/mL)	BSA (μ L)	AGUA (μ L)	REACTIVO DE BRADFORD (mL)
Blanco	0	0	100	5
1	0.225	25	75	5
2	0.36	40	60	5
3	0.54	60	40	5
4	0.72	80	20	5
5	0.9	100	0	5

Tabla 26. Datos para la elaboración de la curva patrón para el método de Bradford.

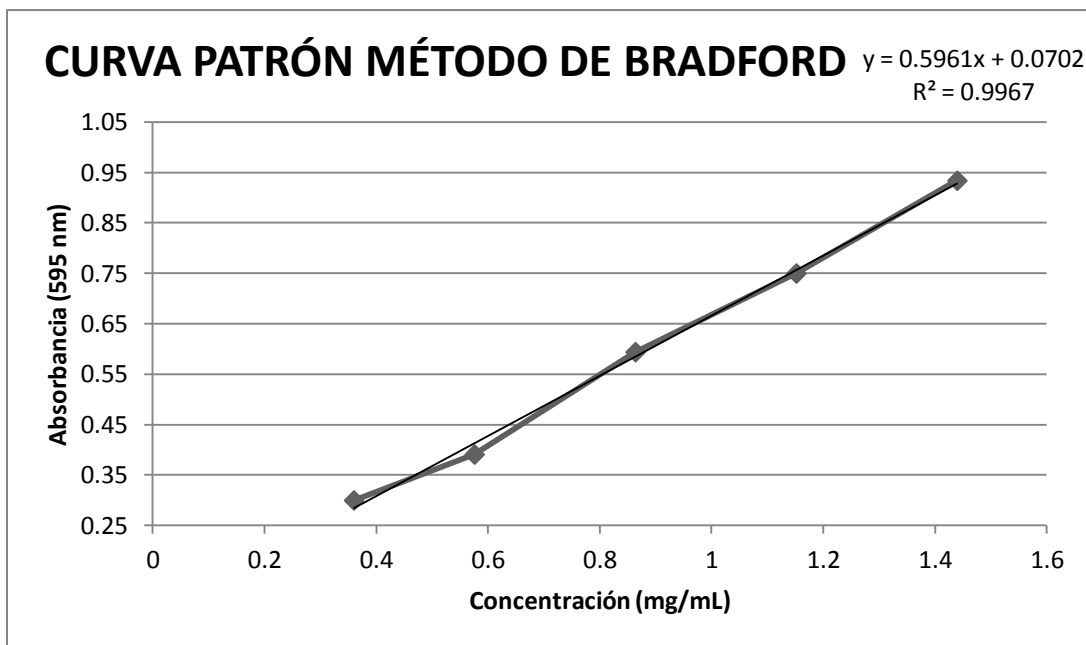


Figura 58. Curva patrón elaborada para el método de Bradford.

10.4 ANEXO D. Cálculos para la cantidad de Buffer y de Enzima necesarios para la Hidrólisis Enzimática

Para la hidrólisis enzimática, es necesario pesar 50 mg de la muestra en base seca. En dado caso de que la muestra se encuentre húmeda, se determina la humedad de la misma y se realiza el siguiente ajuste:

Si se tiene que la muestra tiene una humedad de 72.55 %, significa que se tienen 27.45 mg de muestra seca por cada 100 mg de muestra húmeda:

$$\frac{100 \text{ mg base húmeda}}{27.45 \text{ mg base seca}} * 50 \text{ mg base seca} = 182.15 \text{ mg base húmeda}$$

Por lo que se tienen que pesar 182.15 mg de la muestra húmeda.

Además, en el ajuste de la cantidad de enzima se considera que se requieren 900µL de enzima por cada 1000 mg de muestra, por lo que se realiza el siguiente cálculo:

$$\frac{900 \mu L \text{ Enzima}}{1000 \text{ mg muestra}} * 50 \text{ mg muestra} = 45 \mu L \text{ Enzima}$$

La hidrólisis enzimática se realiza con un 10% de sólidos, por lo que para saber el volumen de buffer a añadir se calcula lo siguiente:

$$\begin{aligned} 50 \text{ mg} &\rightarrow 10\% \\ x &\rightarrow 100\% \end{aligned}$$

Donde x es el volumen de buffer a añadir, siendo en este caso 500 µL.

Y después de realizar la hidrólisis enzimática se realiza un aforo a 5 mL, considerando que la reacción tiene 500 µL de buffer de citratos 0.05 M pH 4.8, 45 µL de enzima, por lo que se agregan:

$$5000 \mu L \text{ de aforo} - 500 \mu L \text{ de buffer de citratos} - 45 \mu L \text{ de enzima} = 4455 \mu L$$

10.5 ANEXO E. Curvas de Calibración para el Método HPLC con Estándar Interno de los diferentes Azúcares

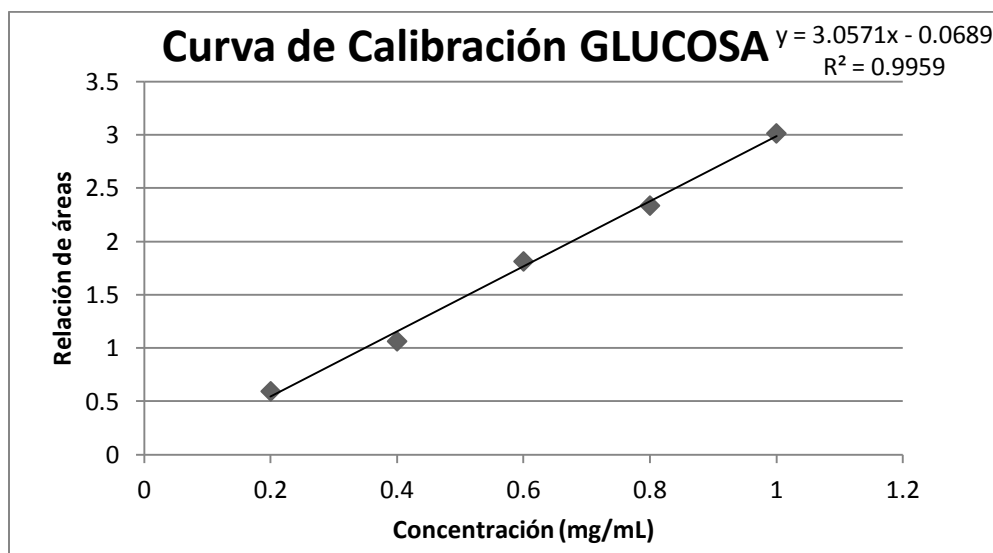


Figura 59. Curva de calibración de glucosa para el método HPLC.

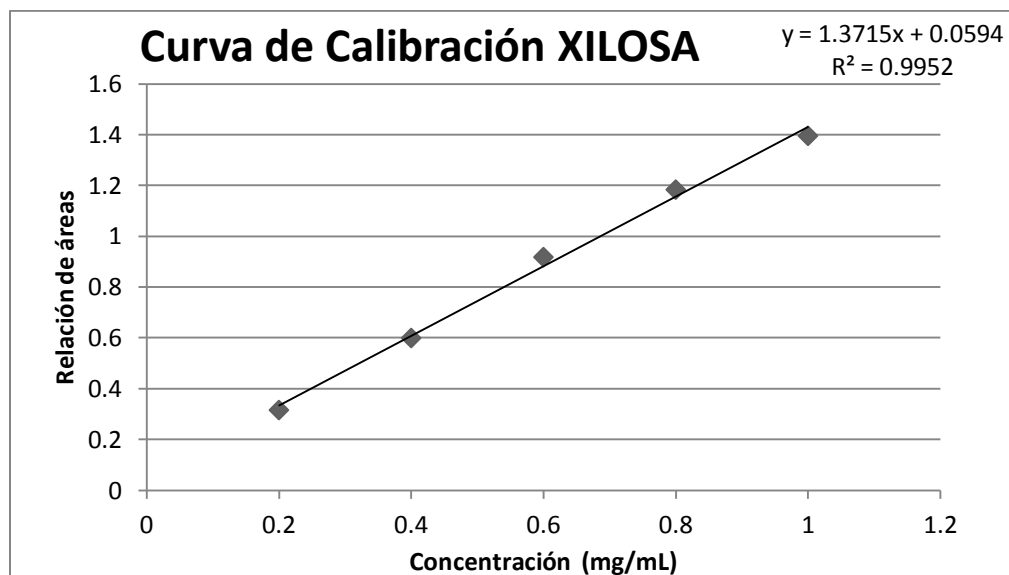


Figura 60. Curva de calibración de xilosa para el método HPLC.

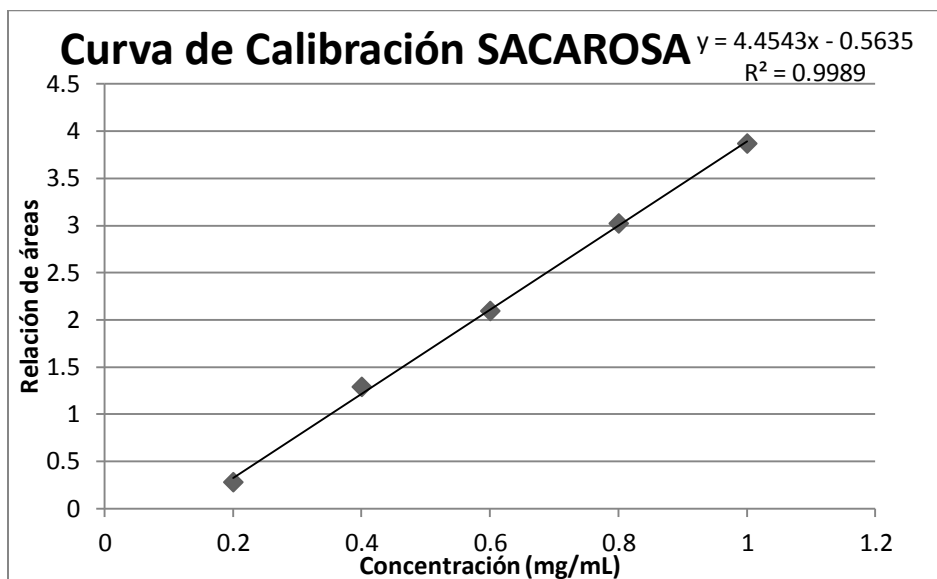


Figura 61. Curva de calibración de sacarosa para el método HPLC.

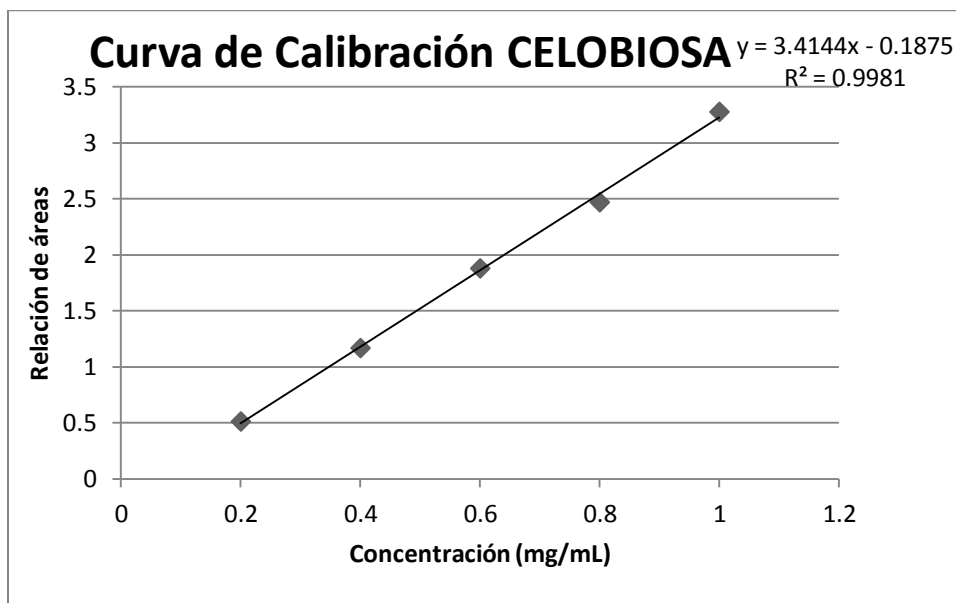


Figura 62. Curva de calibración de celobiosa para el método HPLC.

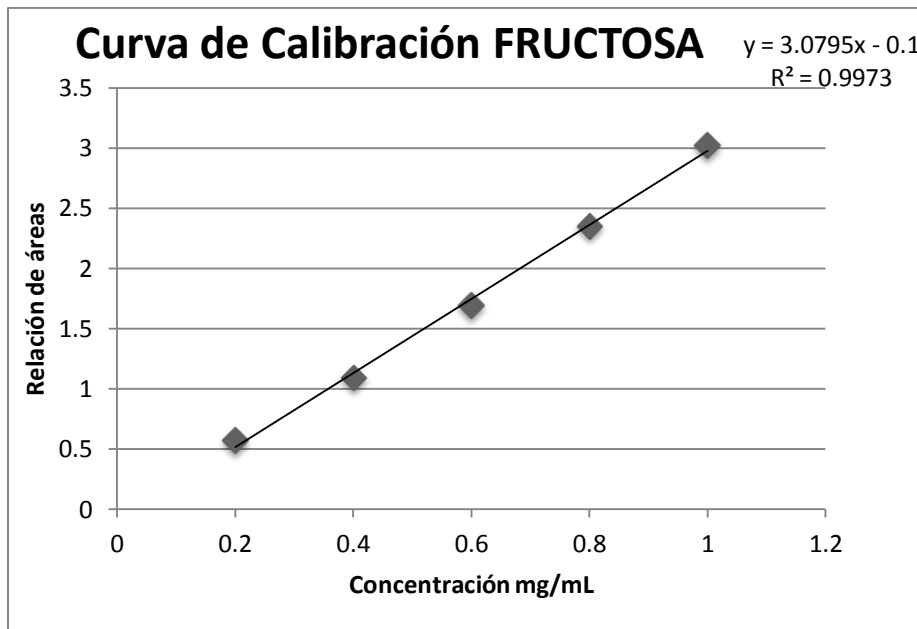


Figura 63. Curva de calibración de fructosa para el método HPLC.

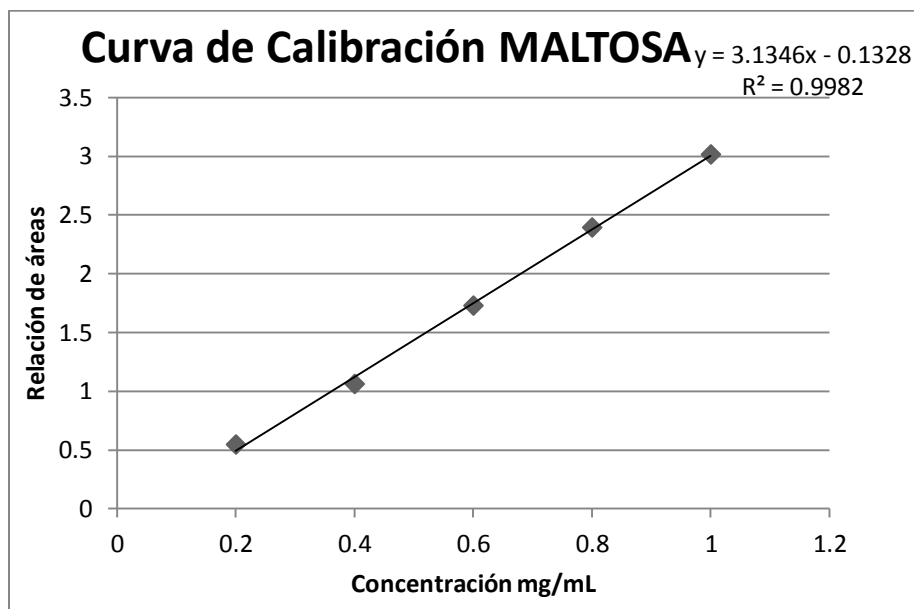


Figura 64. Curva de calibración de maltosa para el método HPLC.

10.6 ANEXO E. Cromatogramas de los 3 Materiales Lignocelulósicos

Figura 65. Cromatograma del jarabe obtenido a partir de la hidrólisis enzimática con el cóctel enzimático comercial E9 para el Pasto Taiwán. Se utilizó una columna con fase estacionaria polar aminada marca Restek, y una fase móvil con mezcla de acetonitrilo y agua.

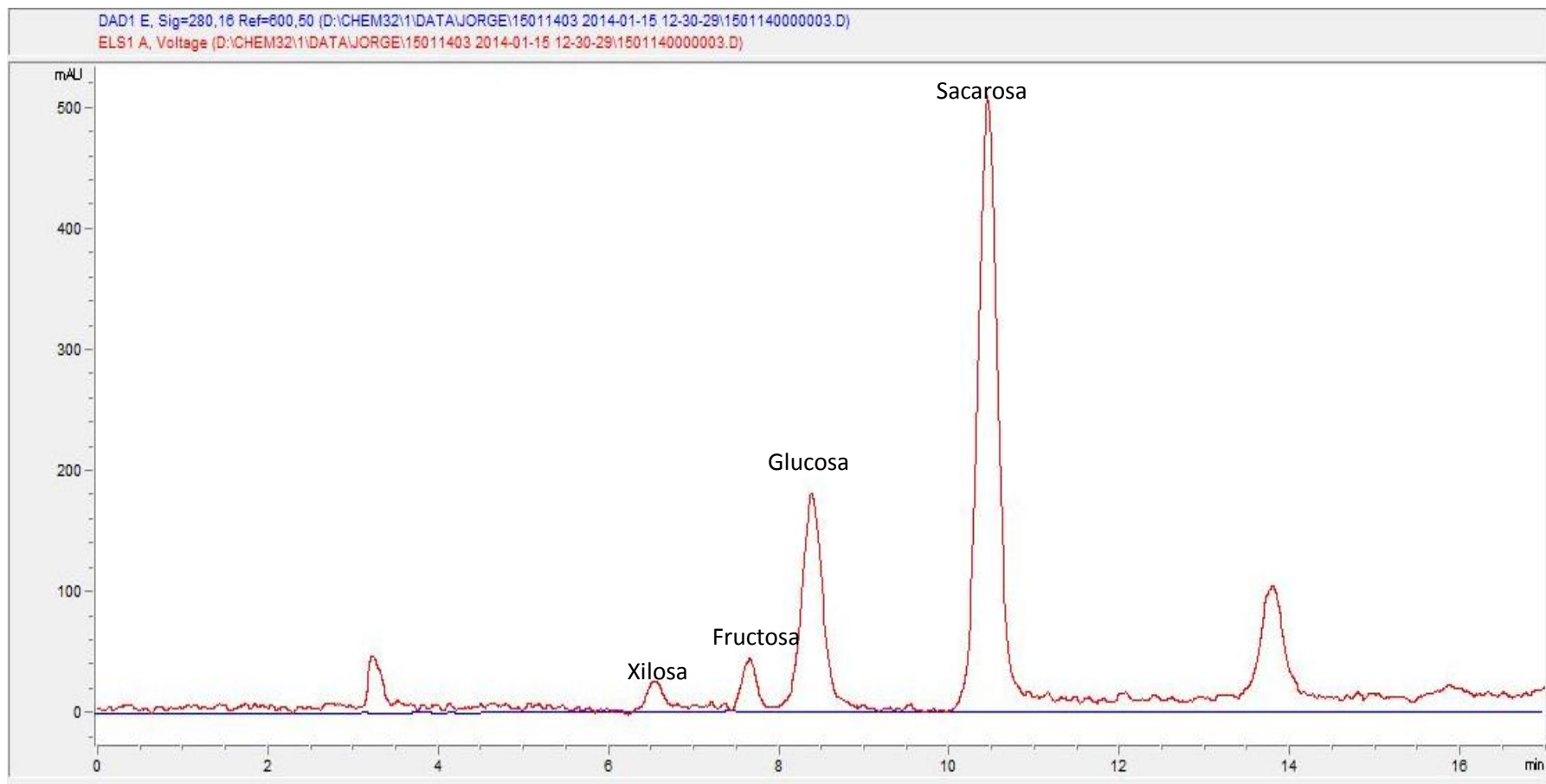


Figura 66. Cromatograma del jarabe obtenido a partir de la hidrólisis enzimática con el cóctel enzimático comercial E10 para el Pasto Taiwán. Se utilizó una columna con fase estacionaria polar aminada marca Restek, y una fase móvil con mezcla de acetonitrilo y agua.

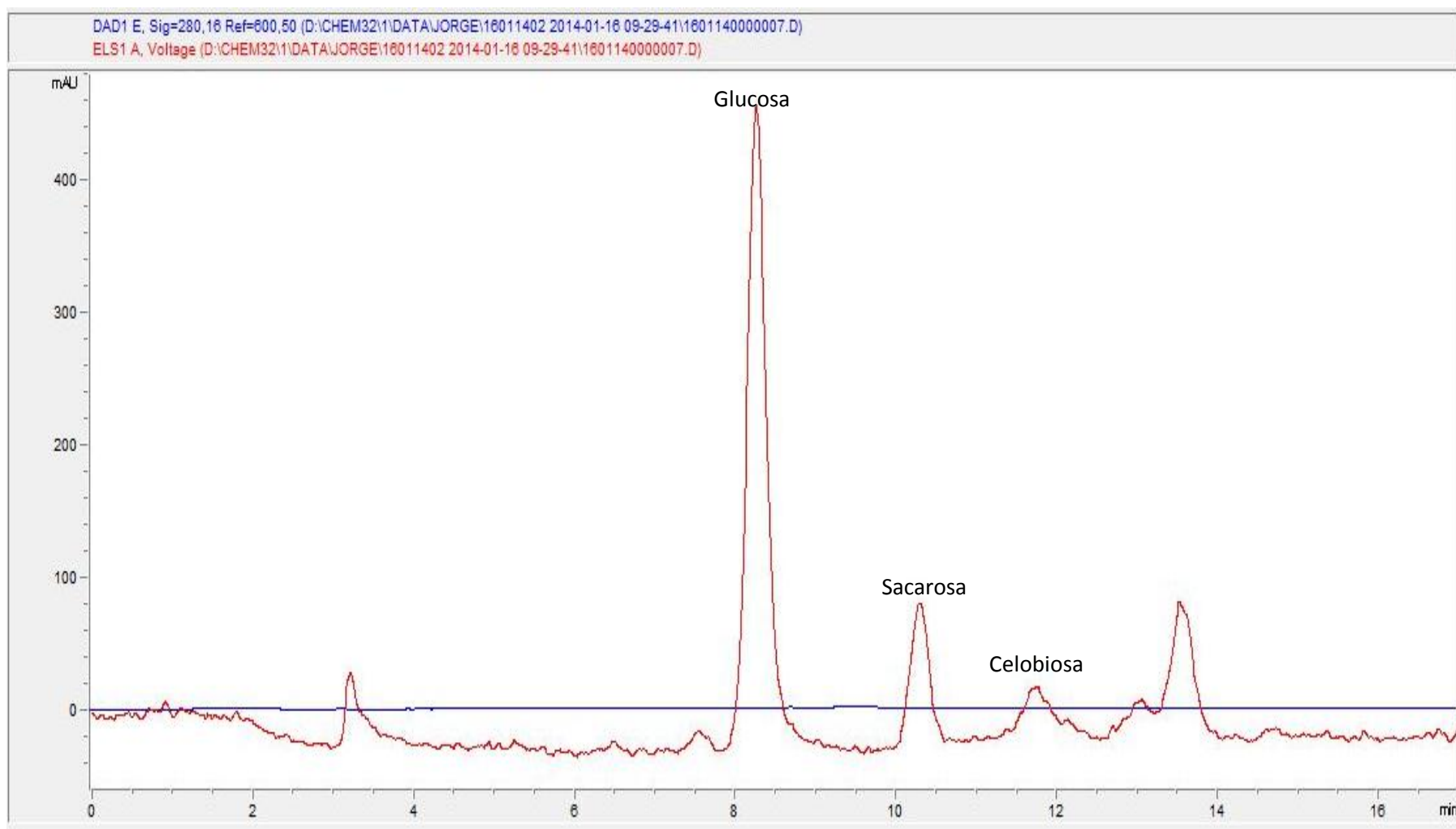


Figura 67. Cromatograma del jarabe obtenido a partir de la hidrólisis enzimática con el cóctel enzimático comercial E9 para el Bagazo de Caña. Se utilizó una columna con fase estacionaria polar aminada marca Restek, y una fase móvil con mezcla de acetonitrilo y agua.

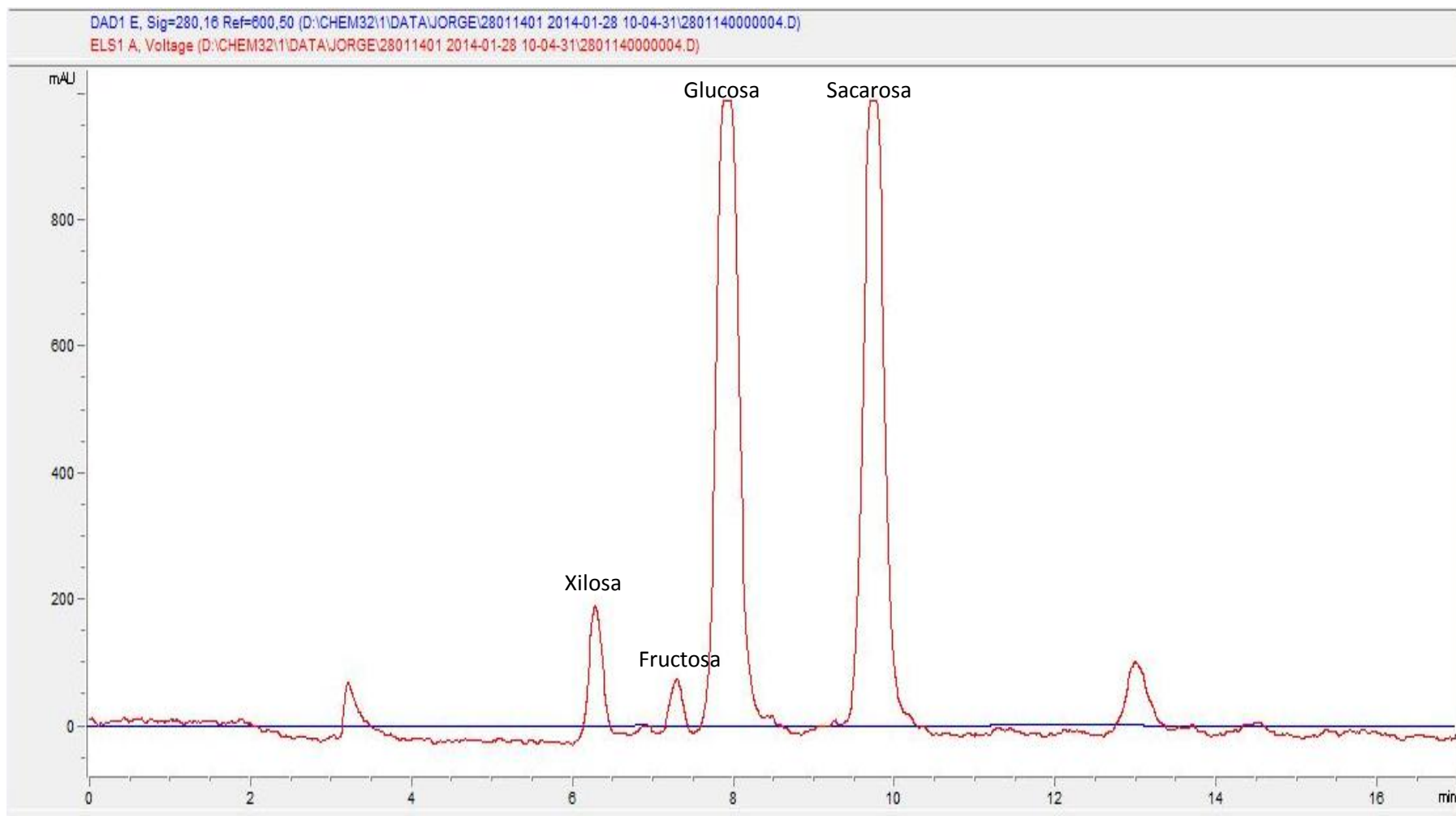


Figura 68. Cromatograma del jarabe obtenido a partir de la hidrólisis enzimática con el cóctel enzimático comercial E10 para el Bagazo de Caña. Se utilizó una columna con fase estacionaria polar aminada marca Restek, y una fase móvil con mezcla de acetonitrilo y agua.

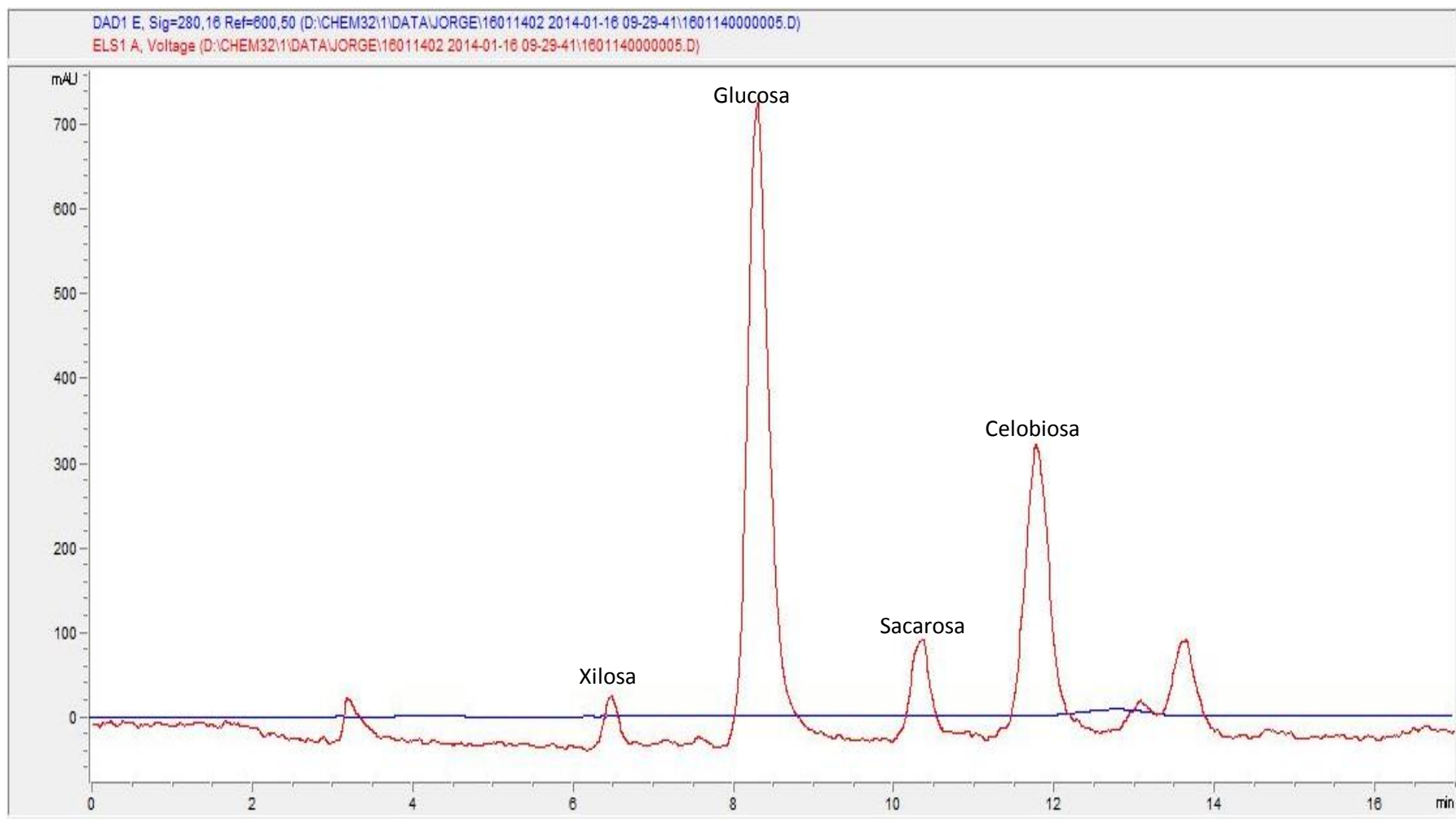


Figura 69. Cromatograma del jarabe obtenido a partir de la hidrólisis enzimática con el cóctel enzimático comercial E9 para los Residuos de Malta. Se utilizó una columna con fase estacionaria polar aminada marca Restek, y una fase móvil con mezcla de acetonitrilo y agua.

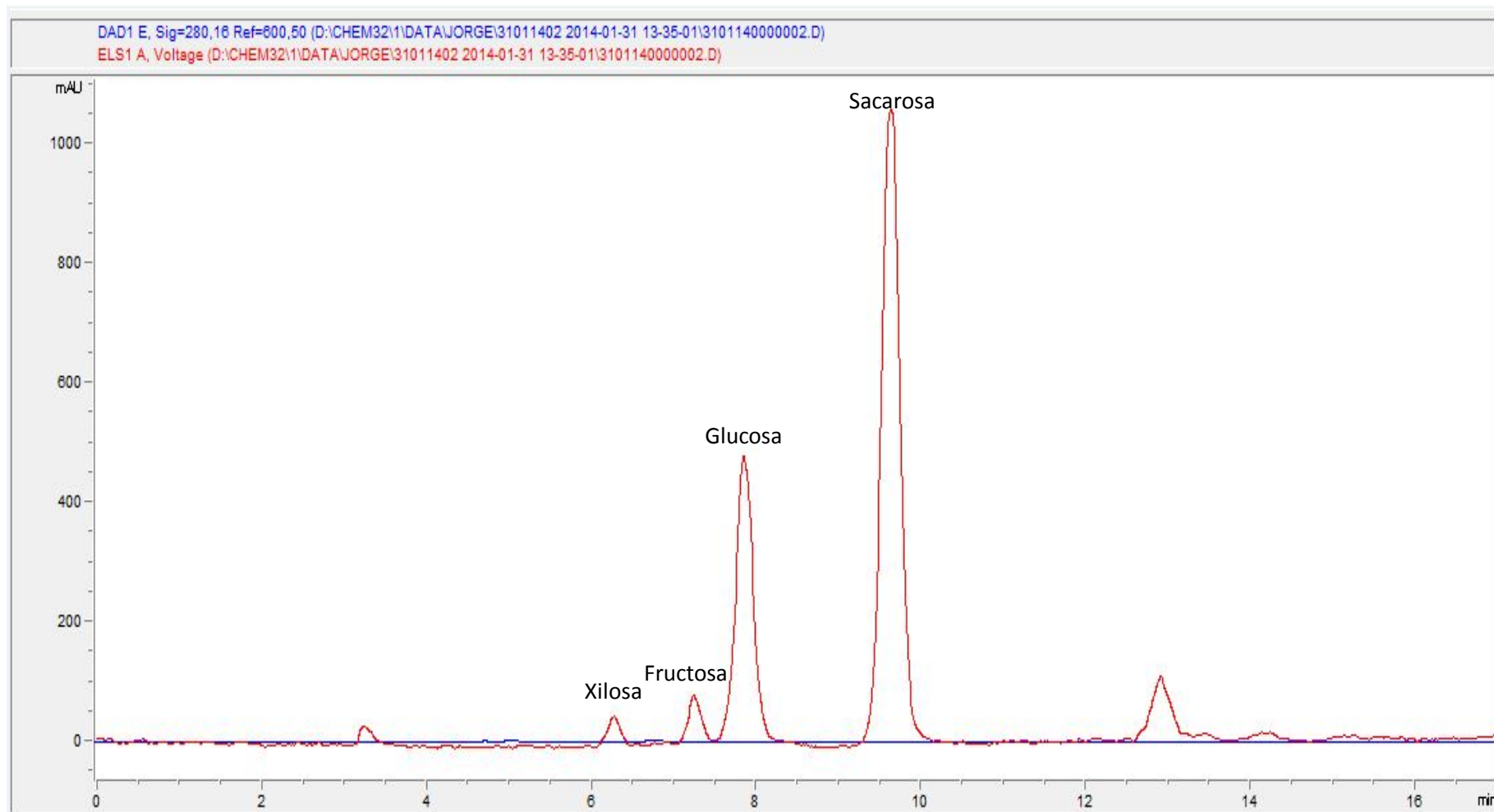


Figura 70. Cromatograma del jarabe obtenido a partir de la hidrólisis enzimática con el cóctel enzimático comercial E10 para los Residuos de Malta. Se utilizó una columna con fase estacionaria polar aminada marca Restek, y una fase móvil con mezcla de acetonitrilo y agua.

