



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**“CARACTERIZACIÓN Y RENDIMIENTOS DE MONOSACÁRIDOS
PROVENIENTES DE LA HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DE MADERA DE
TECA (*TECTONA GRANDIS*)”**

TESIS

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

PRESENTA:

ANDREA KEILA TORRES HERNÁNDEZ



DIRECTOR DE TESIS

M. en C. María de los Ángeles Valdivia López

CIUDAD UNIVERSITARIA, Cd. Mx., 2019



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesora María de los Ángeles Valdivia López

VOCAL: Profesora Inés Miranda Martínez

SECRETARIO: Profesora Eva Patricia Bermúdez García

1er. SUPLENTE: Profesor Jonathan Trapala Reyna

2° SUPLENTE: Profesor Hiram Fernando Ramírez Cahero

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

Laboratorios 322 y 323, Conjunto E, Facultad de Química, Ciudad Universitaria

ASESOR DEL TEMA

M. en C. María de los Ángeles Valdivia López

SUPERVISOR TÉCNICO

Hiram Fernando Ramírez Cahero

SUSTENTANTE

Andrea Keila Torres Hernández

Contenido

| | |
|---|----|
| 1. Introducción..... | 5 |
| 2. Antecedentes | 6 |
| 2.1 Lignocelulosa | 9 |
| 2.2 Teca..... | 13 |
| 2.2.1. Clasificación..... | 13 |
| 2.2.2. Distribución | 13 |
| 2.2.3. Composición y características | 15 |
| 2.2.4. Usos..... | 17 |
| 2.2.5. Producción mundial | 17 |
| 2.2.6. Producción de Teca en México..... | 20 |
| 2.3. Celulosa | 22 |
| 2.4 Hemicelulosa..... | 25 |
| 2.5. Lignina | 29 |
| 2.6 Madera como materia prima para obtener etanol | 31 |
| 2.7 Conversión de lignocelulosa a etanol..... | 33 |
| 2.7.1. Pretratamiento | 34 |
| 2.7.2. Sacarificación enzimática | 38 |
| 2.7.3. Fermentación..... | 43 |
| 3. Justificación y objetivos | 44 |
| 3.1 Objetivos | 46 |
| 4. Metodología..... | 47 |
| 4.1 Caracterización de las muestras pre-tratadas..... | 47 |
| 4.2 Cuantificación de la proteína soluble de los sistemas enzimáticos | 48 |
| 4.3 Evaluación de la actividad enzimática hidrolítica | 50 |
| 4.4 Hidrólisis enzimática | 51 |
| 4.4.1 Efecto de la concentración de enzima | 52 |
| 4.4.2 Efecto del tiempo de hidrólisis | 52 |
| 4.5 Cuantificación de carbohidratos | 52 |
| 5. Resultados y discusión..... | 54 |
| 5.1 Evaluación de la actividad enzimática..... | 54 |

| | |
|--|----|
| 5.2 Efecto de la concentración de enzima en el rendimiento de reductores | 55 |
| 5.2.1 Ensayo con enzima Celluzyme XB y Zymafilt L-300 marca Enmex..... | 55 |
| 5.2.2 Ensayo con enzima Cellulase 50 XL (líquido) marca Enziquim | 59 |
| 5.2.3 Ensayo con enzima Cellulase 500 XP (polvo) marca Enziquim..... | 61 |
| 5.3 Efecto del tiempo de hidrólisis sobre el rendimiento de carbohidratos reductores empleando Cellulase 500 XP (polvo) marca Enziquim..... | 64 |
| 5.3.1 Análisis cromatográfico: concentración de glucosa y xilosa | 64 |
| 5.3.2 Efecto del tiempo de hidrólisis sobre el rendimiento de carbohidratos reductores, Cellulase 500 XP (polvo) Enziquim | 65 |
| 5.3.3 Efecto del tiempo de hidrólisis sobre el rendimiento de carbohidratos reductores, Cellulase 500 XP (polvo) Enziquim previamente hidratada | 68 |
| 6. Conclusiones..... | 72 |
| Perspectivas..... | 73 |
| 7. Referencias | 74 |

Agradecimientos

Agradezco al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT):

- **Proyecto IG100718** "Proceso de biorrefinación a partir de un proceso de deconstrucción ácida fase gas de materiales lignocelulósicos"
- **Proyecto IV100119** "Desarrollo de nuevas tecnologías de producción de lignosulfonatos, celulosa, ácido láctico, bioetanol y materiales híbridos a partir de residuos agroindustriales",

por las facilidades y recursos que permitieron llevar a cabo este trabajo.

1. Introducción

Con la disminución de las reservas mundiales de petróleo, se ha intensificado la búsqueda de alternativas energéticas para su reemplazo. En las últimas décadas, el etanol obtenido a partir de la fermentación de materia prima de origen biológico, o bioetanol, perteneciente a los llamados “biocombustibles de primera generación”, procedentes de cultivos anuales como la caña de azúcar y la remolacha, se ha empleado como una alternativa energética frente a los combustibles fósiles. No obstante, debido a problemáticas de orden alimentario, las recientes investigaciones en materia energética se enfocan en el desarrollo de biocombustibles de segunda, tercera y cuarta generación, según la materia prima con la que se producen.

En particular, los biocombustibles de segunda generación se obtienen de materias primas que no son de uso alimentario, tales como la biomasa lignocelulósica de residuos agrícolas o procedentes de madera, hojas y pastos (Honty, 2009; Faba, Díaz y Ordóñez, 2014). Las tendencias energéticas actuales implican el uso de estos biocombustibles debido a que los cultivos destinados a la obtención de bioetanol de primera generación no suplen las necesidades energéticas de bajo costo que hoy en día cubre el petróleo y derivados (Serna, Barrera y Montiel, 2011). De esta manera, una producción rentable de bioetanol mediante la hidrólisis enzimática de lignocelulosa de residuos agrícolas permitiría satisfacer la demanda de biocombustibles sin afectar la seguridad alimentaria. La producción mundial de bioetanol depende cada vez más del desarrollo de tecnologías para su obtención a partir de materiales lignocelulósicos ricos en celulosa y hemicelulosas (Viñals-Verde, Bell-García, Michelena-Álvarez y Ramil-Mesa, 2012). La lignocelulosa es el principal componente estructural de la madera y representa una fuente orgánica renovable (Irbe *et al.*, 2013). La fermentación tradicional convierte la glucosa en etanol, sin embargo, la materia lignocelulósica debe tratarse e hidrolizarse previamente.

La presente investigación tiene como fin establecer condiciones óptimas para la hidrólisis enzimática de madera de teca (*Tectona grandis*), previamente tratada en un proceso de deconstrucción gas/líquido, para lograr su conversión total de celulosa y hemicelulosa a glucosa y pentosas para su posterior fermentación alcohólica.

2. Antecedentes

Además de los problemas concernientes a la seguridad energética, el creciente nivel de las emisiones de dióxido de carbono (CO₂), ha propiciado el interés por la investigación de fuentes energéticas no basadas en petróleo y, como resultado de ésta, han surgido los biocombustibles (Ayala-Villalobos, 2013). El término biocombustible se refiere a un combustible sólido, líquido (bioetanol y biodiesel) o gaseoso (biogas) producido predominantemente a partir de biomasa (la biomasa es la materia orgánica de origen vegetal o animal, incluyendo residuos y desechos orgánicos, susceptible de ser aprovechada energéticamente) (Moreno-González, 2011; García Garrido, 2012).

Los biocombustibles son renovables y de bajo impacto ambiental, y son especialmente accesibles en países que disponen de tierras para su cultivo, mano de obra rural y aquellos en los que históricamente la biomasa tiene representación en su matriz energética (Vázquez-Bolaños, 2012; Ayala-Villalobos, 2013).

La biomasa es el único recurso de energía primaria adecuado y renovable que proporciona combustibles de transporte alternativos como el bioetanol o el biodiesel a corto plazo (Alvira, Tomás-Pejó, Ballesteros y Negro, 2010).

De acuerdo con el insumo o materia prima y tecnología empleada para producirlos, los biocombustibles se clasifican en (Ayala-Villalobos, 2013):

- De primera generación. Algunos de los insumos son de procedencia agrícola y están conformados por las partes alimenticias de las plantas. Los cultivos adecuados son los que tienen altas concentraciones de azúcares, como la caña de azúcar, el sorgo dulce o la remolacha, o altas concentraciones de almidón, como el maíz, yuca y papa, debido a que en estos productos los carbohidratos están muy disponibles y los pretratamientos son más económicos en comparación con materias primas de otras clasificaciones (Vázquez-Bolaños, 2012; Ayala-Villalobos, 2013; Cruz-Tamayo, 2015).

- De segunda generación. Los insumos son residuos agrícolas y forestales compuestos por celulosa, hemicelulosa y lignina, así como residuos de la madera o de cultivos alimenticios como maíz y trigo o el bagazo de la caña de azúcar. Su procesamiento requiere de tecnologías avanzadas, por lo que, en general, es más costoso que el de primera generación (Cruz-Tamayo, 2015).
- De tercera generación. Los insumos son vegetales que no son usados para consumo humano, de crecimiento rápido y con una alta densidad energética almacenada en sus componentes químicos, por lo que se les denomina “cultivos energéticos”. Entre éstos se encuentran los pastos perennes, árboles y plantas de crecimiento rápido, las algas verdes y las verde-azules (Ayala-Villalobos, 2013).
- De cuarta generación. Son aquellos donde la producción de etanol la realizan bacterias o levaduras genéticamente modificadas que utilizan CO₂ o alguna otra fuente de carbono para la obtención de biocombustibles. A diferencia de las generaciones anteriores, en este caso los microorganismos participan en todas las etapas de la producción de biocombustibles (Ayala-Villalobos, 2013; Cruz-Tamayo, 2015).

Dentro de esta gama de biocombustibles destaca el bioetanol de segunda generación, que ha sido propuesto como vía para el aprovechamiento de subproductos agrícolas (Ayala-Villalobos, 2013). La producción de bioetanol puede partir de cualquiera de las materias primas mencionadas anteriormente. El proceso general para su obtención implica la hidrólisis de la biomasa o la materia prima, ya sea de tipo enzimático o químico, y la posterior fermentación y destilación del producto hasta la obtención de etanol anhidro (Cruz-Tamayo, 2015).

La Figura 1 muestra el diagrama general de producción de bioetanol a partir de tres distintos tipos de biomasa: azucarada, proveniente de caña de azúcar o remolacha; amilácea, presente en cereales como maíz y trigo o en tubérculos como mandioca, y celulósica, de acuerdo con Diez y Garrido (2014). El primer tipo se extrae por presión o difusión, mientras que la biomasa amilácea y la de tipo celulósico se obtienen por trituración de la materia prima seguida de hidrólisis enzimática, de una

posterior fermentación y, finalmente, de una etapa de destilación para la recuperación de etanol.

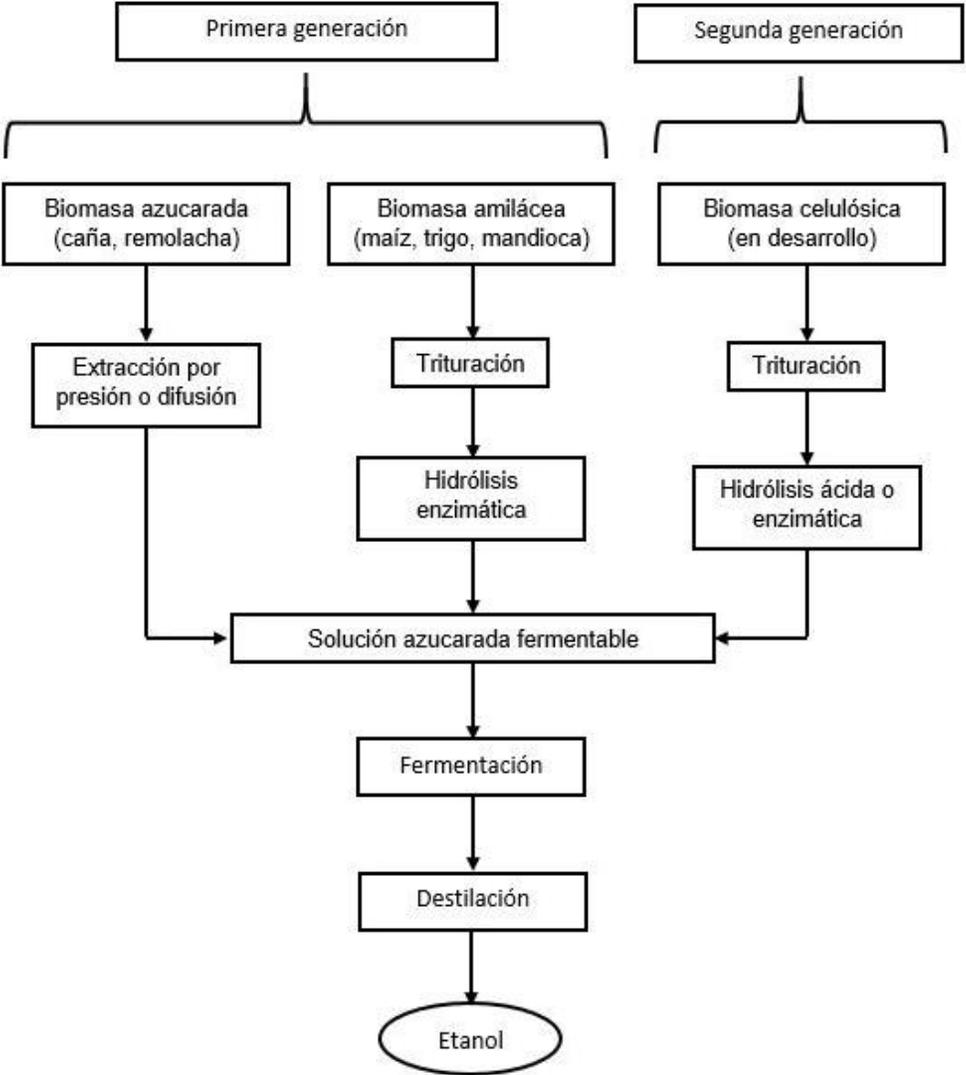


Figura 1. Diagrama general de producción de etanol a partir de diferentes tipos de biomasa (Diez y Garrido, 2014).

La producción actual de bioetanol se basa en la obtención del alcohol partiendo de almidón y azúcares, pero su sostenibilidad ha sido considerablemente debatida. En este contexto, el bioetanol producido a partir de biomasa lignocelulósica significa una alternativa interesante, ya que estos materiales no compiten con los cultivos alimenticios y son menos costosos que las materias primas convencionales, además, son accesibles y presentan una alta disponibilidad en cualquier parte del mundo (Alvira *et al.*, 2010; Cruz-Tamayo, 2015).

2.1 Lignocelulosa

La biomasa lignocelulósica está compuesta de polímeros de carbohidratos muy complejos no digeribles por los humanos (Sánchez-Toro y Cardona-Alzate, 2007).

Las fuentes celulósicas potencialmente utilizables son los desechos de la industria maderera, residuos de cosechas (bagazos), hierbas y aserrín (Cuervo, Folch y Quiroz, 2009). La lignocelulosa es la sustancia más abundante de la biomasa producida en la fotosíntesis, ya que forma parte de la pared celular vegetal, la cual está constituida por un entramado de microfibrillas de celulosa recubiertas por capas de hemicelulosa sobre las que se deposita la lignina, como se ilustra en la Figura 2. Esta pared permite sostener la estructura vegetal a la vez que favorece la absorción de radiación solar. Además, confiere una elevada resistencia mecánica frente a condiciones ambientales y al ataque de patógenos (Morales de la Rosa, 2015).

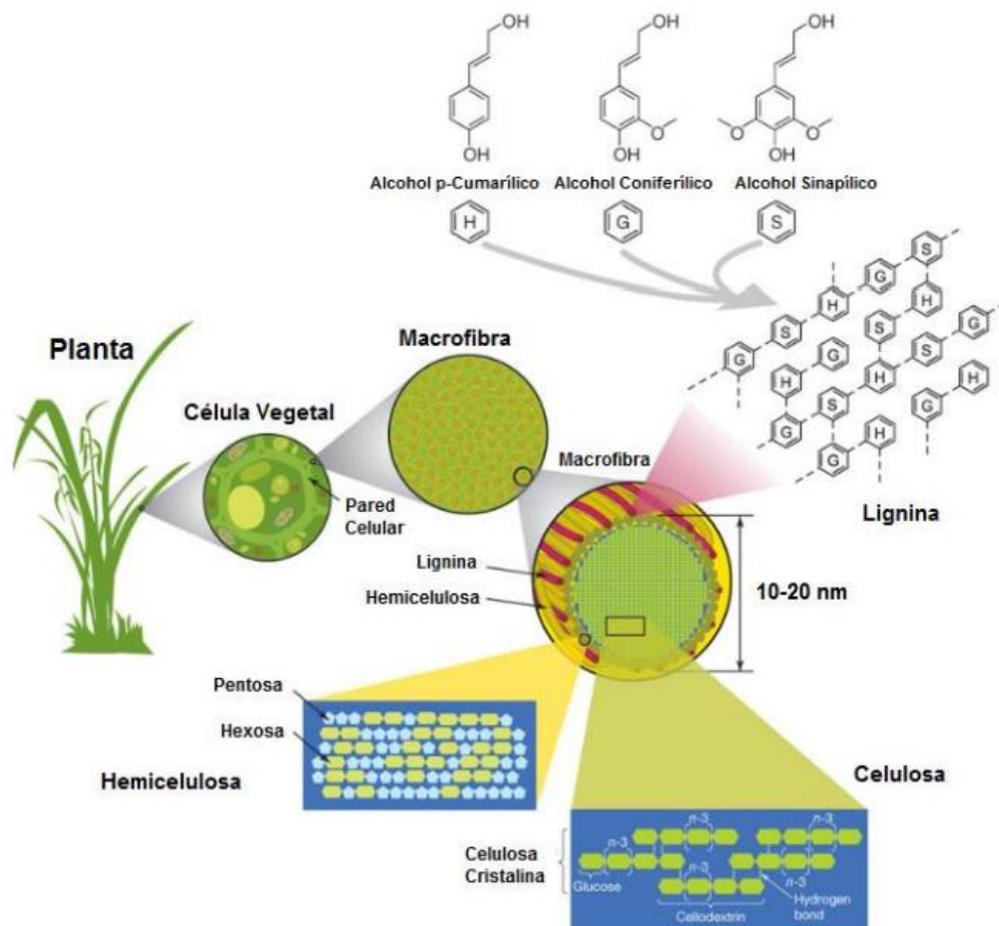


Figura 2. Estructura de biomasa lignocelulósica (Morales de la Rosa, 2015).

La Figura 2 muestra la estructura general de las fibras de celulosa dentro de una célula vegetal, en la que se encuentran hemicelulosa y lignina, esta última constituida por monómeros de alcohol *p*-cumarílico, coniferílico, y sinapílico.

La biomasa lignocelulósica comprende aproximadamente 50% de la biomasa en el mundo, y su producción anual ha sido estimada en 1×10^{10} millones de toneladas (Alvira *et al.*, 2010). Además de la generación de energía, esta biomasa permite el aprovechamiento de un amplio intervalo de residuos de las actividades domésticas, agrícolas e industriales. Aparte del etanol, es también un recurso procesable por diferentes vías para la obtención de una gran variedad de productos: gas de síntesis, metanol, hidrógeno y electricidad.

Dependiendo de su origen, los materiales lignocelulósicos pueden clasificarse de la siguiente manera (Sánchez-Toro y Cardona-Alzate, 2007):

- Residuos agrícolas. Comprenden aquellos materiales lignocelulósicos derivados del cultivo y recolección de especies vegetales de importancia económica.
- Residuos agroindustriales. Cabe destacar el bagazo o residuo de un material después de extraer su jugo.
- Biomasa herbácea. Materiales que provienen de las plantas que no generan madera, no presentan tallos ni raíces leñosos; por ejemplo, el pasto de pradera.
- Desechos celulósicos. Residuos generados como resultado de actividades industriales principalmente relacionadas con el procesamiento de papel.
- Residuos sólidos urbanos (fracción orgánica). Se compone de materiales con alto contenido del complejo lignocelulósico: papel, cartón, cáscaras de fruta y verduras, residuos de jardinería y artículos de madera.
- Maderas suaves. En este grupo se sitúan las maderas de árboles de gimnospermas, es decir, que no dan frutos, como el pino, abeto y cedro. Presentan un mayor contenido de lignina que las maderas duras.
- Maderas duras o leñosas. Constituyen un subgrupo aparte, debido, principalmente, a su composición contrastante con las maderas blandas o coníferas. Comprenden tanto a la madera como al aserrín, virutas y la biomasa recolectada en prácticas silvícolas, en particular las ramas y troncos.
A las maderas leñosas pertenece la procedente de especies angiospermas, es decir, que dan óvulos o frutos, tales como el roble, abedul, el palo de rosa, la caoba y la teca.

El material lignocelulósico consiste en 40-50% de celulosa, 20-40% hemicelulosa y 10-30% lignina (Chaminda y Kumar, 2011). Los porcentajes de los polímeros varían entre las diferentes especies de plantas, incluso entre la edad y la etapa de crecimiento (Cuervo *et al.*, 2009). Las propiedades fisicoquímicas de estos materiales dependen de las condiciones climáticas y del terreno donde se hayan cultivado (Ayala-Villalobos, 2013). Además, el material lignocelulósico también contiene componentes minoritarios como proteínas, lípidos y minerales (Morales de la Rosa, 2015). En la Tabla 1 se muestra el contenido de celulosa, hemicelulosa y lignina en residuos lignocelulósicos.

Tabla 1. Contenido de celulosa, hemicelulosa y lignina en residuos agrícolas comunes y desechos (Sun y Cheng, 2002).

| Material lignocelulósico | Celulosa (%) | Hemicelulosa (%) | Lignina (%) |
|---|---------------------|-------------------------|--------------------|
| Madera dura | 40-55 | 24-40 | 18-25 |
| Madera suave | 45-50 | 25-35 | 25-35 |
| Cáscara de nuez | 25-30 | 25-30 | 30-40 |
| Olote de maíz | 45 | 35 | 15 |
| Desechos de pastos | 25-40 | 35-40 | 18-30 |
| Papel | 85-99 | 0 | 0-15 |
| Paja de trigo | 30 | 50 | 15 |
| Hojas | 15-20 | 80-85 | 0 |
| Algodón | 80-95 | 0 | 0 |
| Papel periódico | 40-55 | 25-40 | 18-30 |
| Desecho de papel de pulpeos químicos (suspensiones de fibra en agua) | 60-70 | 10-20 | 5-10 |
| Desechos sólidos de aguas residuales | 8-15 | ND | 24-29 |
| Desechos animales | 6 | 28 | ND |
| Desechos sólidos de ganado | 1.6-4.7 | 1.4-3.3 | 2.7-5.7 |
| Hierba Bermuda | 25 | 35.7 | 64 |
| Pastos de crecimiento rápido | 45 | 31.4 | 12 |

ND: No disponible.

2.2 Teca

2.2.1. Clasificación

La teca (*Tectona grandis* L. f.) es un árbol grande y frondoso de hoja caduca y copa redondeada que corresponde a la familia *Verbenaceae*, la cual pertenece al grupo de las angiospermas o maderas duras (Pandey y Brown, 2000; Fonseca, 2004; Miranda-Valencia y Quiñones-Castro, 2018). Se le conoce con varios nombres, por ejemplo, sehún y sagon en la India, y sak en Tailandia, pero el más conocido es teca, y su nombre internacional de mercadeo es *teak* (International Society of Tropical Foresters [ISTF], 2009; Muñoz, Sáenz y Rueda, 2012). Es una madera de rápido crecimiento (Miranda-Valencia y Quiñones-Castro, 2018). En su lugar de origen los árboles pueden alcanzar más de 50 metros de altura y dos metros de diámetro. Su división taxonómica se muestra en la Tabla 2.

Tabla 2. Descripción taxonómica de *Tectona grandis* L. f. (Ypushima-Pinedo, 2015).

| Descripción taxonómica de <i>Tectona grandis</i> | |
|--|------------------------------|
| Reino | Plantae |
| División | Angiosperma |
| Clase | Dicotyledonae |
| Subclase | Asteridae |
| Orden | Lamiales |
| Familia | Verbenaceae |
| Género | <i>Tectona</i> L. f. |
| Especie | <i>Tectona grandis</i> L. f. |

2.2.2. Distribución

La zona de distribución natural de la teca son los bosques de tipo monzónico incluyendo bosque seco tropical y bosque húmedo tropical (Fonseca, 2004; Muñoz *et al.*, 2012). En la Figura 3 se puede observar una plantación de teca en Ecuador.



Figura 3. Plantación de teca en Ecuador (Ecuador forestal, 2010).

Los árboles de teca son nativos de países del sureste asiático: India, Myanmar (Birmania), República Democrática Popular de Lao y Tailandia; se han aclimatado en Java (Indonesia), donde probablemente se introdujeron desde hace 400-600 años. También, se han cultivado en toda la zona tropical de Asia, en África tropical (Costa de Marfil, Nigeria, Sierra Leona, la República Unida de Tanzania y Togo), y en varios países de América Latina y el Caribe (Costa Rica, Colombia, Brasil, Ecuador, El Salvador, Panamá, Trinidad y Tobago y Venezuela) (Pandey y Brown, 2000; Muñoz *et al.*, 2012; Vincent, 2018). Asimismo, se ha introducido en algunas islas de la región del Océano Pacífico (Papúa Nueva Guinea, Fiji y las Islas Salomón) y en el norte de Australia en forma experimental (Flórez, Trugilho, Tarcisio-Lima, Gherardi-Hein, & Moreira da Silva, 2014).

En América Tropical fue introducida primero en Trinidad, de donde se exportaron semillas a Belice, Antigua, República Dominicana, Jamaica, Costa Rica, Cuba, Colombia, Venezuela, Haití, Puerto Rico, Ecuador, Guayana Francesa y México (Fonseca, 2004). Sin embargo, las principales plantaciones de teca se encuentran en África y en algunos países de América como Trinidad, Venezuela, Honduras y Ecuador (Vincent, 2018).

2.2.3. Composición y características

La madera de teca está definida como un biopolímero tridimensional compuesto principalmente por celulosa y hemicelulosa, los cuales representan entre 65-75%, y la lignina, presente entre 18-35%. La composición química varía dependiendo del origen, clima, edad, condiciones del suelo y parámetros fisicoquímicos como la temperatura (Miranda-Valencia y Quiñones-Castro, 2018). Por ejemplo, Abarca, Blanco y Solano (2005) informan un 64.8% en base seca de holocelulosa (celulosa y hemicelulosa) y 30% de lignina para árboles de seis años y Pardo-Sequeira (2013) informa 57.9% de holocelulosa, y 31.8% de lignina para árboles de 17 años, ambos cultivados en Costa Rica. Por otro lado, Fengel y Wegener (1989) indican que la composición de material lignocelulósico proveniente del Congo es 66.9% de holocelulosa y 29.3% de lignina, y de 64.5% de holocelulosa y 32.8% de lignina para teca proveniente de Tailandia.

La teca es una madera tropical dura de tipo frondoso de las más importantes en el mundo. Es, junto con el cedro (*Cedrela odorata*) y la caoba, una materia prima fina de gran valor en el mercado (Pandey y Brown, 2000; Flórez *et al.*, 2014; Proteak uno, 2015). La teca es valiosa por su belleza, color, ligereza, durabilidad, fuerza y resistencia a la intemperie; no se deteriora al contacto con el agua ni metales gracias a su alto contenido de aceites y resinas naturales, que contribuyen a su resistencia al ataque de insectos y hongos, y a la temperatura y humedad (ISTF, 2009; Muñoz *et al.*, 2012; Alabi y Oyeku, 2017; Miranda-Valencia y Quiñonez-Castro, 2018; Pandey y Brown, 2000; Hallett, Díaz-Calvo, Villa-Castillo y Wagner, 2011; Vergara-Cordoba, Cardona-Ayala, Murillo-Gamboa, Jarma-Orozco y Araméndiz-Tatis, 2013; Pérez-Miranda, 2015). Además, la parte más compacta o duramen de la teca combina cualidades como resistencia a las termitas, a la pudrición, al agua de mar y a organismos marinos como moluscos, debido a que contiene silicatos que preservan la madera y evitan la corrosión (Hallett *et al.*, 2011). Dichas características la hacen prácticamente insustituible en el sector de la construcción naval (Vergara *et al.*, 2013). Posee, asimismo, una notable facilidad para trabajarla con herramientas como el torno (Muñoz *et al.*, 2012; Flórez *et al.*, 2014; Pérez-Miranda, 2015; Directorio Forestal Maderero [DFM], 2018).

La teca posee una corteza gruesa que le permite resistir el calor de los incendios. Una vez que los árboles alcanzan alturas de ocho a diez metros y diámetros mayores de 10 o 15 centímetros, la madera se ha desarrollado lo suficiente para tener una buena resistencia frente a ese tipo de siniestros (ISTF, 2009). Estas propiedades convierten a la teca en la madera tropical con mayor demanda y valor de sus productos en el mercado internacional (Baez-Daeza, 2018).

Actualmente, el mercado de la madera tiene un gran interés por los extractos de teca, debido, en parte, a que inhiben el desarrollo de ciertas plagas. Al respecto, se ha confirmado su contenido en quinonas con actividad antitermítica (Lukmandaru, 2012; Alabi y Oyeku, 2017). En particular, la durabilidad del duramen de teca se atribuye a la proporción de tectoquinona (2-metil-9,10-antraquinona) y 1,4-naftoquinona (Miranda-Valencia y Quiñones-Castro, 2018). La 1,4-naftoquinona presenta actividad antifúngica contra *Polyporus palustris* y *Gloeophyllum trabeum*, hongos de pudrefacción parda (Berrocal-Jiménez y Rojas-Acuña, 2007; Sigoillot *et al.*, 2012; Ypushima-Pinedo, 2015). Por su parte, Thulasidas y Bhat (2006) detectaron tres antraquinonas: tectoquinona, 2-hidroximetilantraquinona y ácido antraquinona-2-carboxílico; dos naftoquinonas: lapachol, 1,4-naftoquinona y un compuesto no identificado denominado P1. Los autores encontraron una fuerte correlación entre la resistencia a la pudrición y la presencia de compuestos tipo P1, 2-hidroximetilantraquinona y tectoquinona en el duramen (Amaya, 2014; Ypushima-Pinedo, 2015). Haupt *et al.* (2003) concluyeron que la tectoquinona es un compuesto bioactivo que inhibe a *Coniophora puteana*, hongo causante de la pudrición húmeda (Gijaba, 1998). En la Figura 4 se muestran algunas estructuras de las quinonas mencionadas.

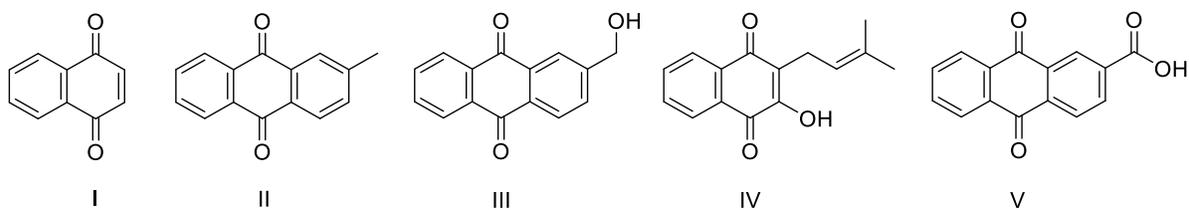


Figura 4. Estructuras de 1,4-Naftoquinona (I), tectoquinona (II), 2-hidroximetilantraquinona (III), lapachol (IV) y ácido antraquinona-2-carboxílico (V).

2.2.4. Usos

Las maderas finas son principalmente utilizadas para la fabricación de muebles y construcciones exteriores. En esta categoría destacan las maderas duras tropicales como la caoba, el cedro rojo y la teca (Proteak uno, 2015). La teca se emplea también en la construcción de puentes y muelles, edificios, travesaños, vagones y durmientes de ferrocarril, muebles de lujo y de exteriores, carpintería, pisos, enchapado y contra-enchapado, madera para parquet, compuertas en agua dulce, pisos expuestos al tránsito de peatones, postes de líneas de transmisión eléctrica, instrumentos musicales, juguetes, y es excelente para la fabricación de barriles para almacenar productos químicos (Fonseca, 2004; Hallett *et al.*, 2011; Proteak uno, 2015).

Por otro lado, las poblaciones de teca cumplen importantes funciones ambientales, ya que pueden utilizarse en programas agroforestales y en la recuperación de bosques. Por esa razón, ha despertado mucho interés en proyectos de reforestación, y su uso ha ido en aumento debido a su buen crecimiento inicial y a la calidad de la madera. Estas características hacen de la teca uno de los árboles más cultivables y económicamente más rentables en todo el mundo (Muñoz *et al.*, 2012; Vázquez-García, Muñiz-Castro, Salcedo-Pérez, Hernández-Álvarez y Díaz-Echavarría, 2012). La posición de la teca entre las maderas ha sido comparada a la del oro entre los metales y a la del diamante entre las piedras preciosas (Hallett *et al.*, 2011).

2.2.5. Producción mundial

Los géneros que más se plantan a nivel mundial son *Pinus*, con el mayor porcentaje: 20%, *Eucalyptus* con 10%, *Hevea* con 5%, *Acacia* con 4%, y *Tectona* con 3% (Vázquez-García *et al.*, 2012). Respecto a las plantaciones de maderas duras (*hardwoods*), se estima que 74% del total en el mundo son de teca, con una superficie aproximada de 5.8×10^6 hectáreas (ha); sin embargo, de acuerdo con la reseña bienal 2015-2016 de la Organización Internacional de Maderas Tropicales (International Tropical Timber Organization, por sus siglas en inglés) (ITTO, 2016), sólo el 8% de la superficie total de las plantaciones forestales a nivel mundial es de teca. Dentro de este comparable, el 82.8% de las mismas se encuentra en Asia, que es la región donde se concentra la mayor demanda, en China e India, principalmente (Flórez *et al.*, 2014; Proteak uno, 2015).

A nivel mundial, Malasia e Indonesia son los principales productores de maderas tropicales, abarcando más del 58% de la producción. Myanmar es el único productor asiático que permite la exportación de trozas de teca con pocas limitaciones (Proteak uno, 2015). El otro exportador importante de trozas es Costa de Marfil. Varios países africanos y algunos de América Latina: Trinidad y Tobago, y Ecuador exportan volúmenes bajos de este insumo (Fonseca, 2004).

La oferta mundial de teca madura de bosque natural está siendo suplida por los países productores tradicionales: Myanmar, India, Indonesia, Sri Lanka, Bangladesh, Trinidad y Tobago, mientras que otros producen madera en rollo madura procedente de plantaciones (Fonseca, 2004). En los últimos diez años, las plantaciones de teca más importantes provienen de Iberoamérica, exportando troncos jóvenes hacia India, Europa y Estados Unidos (Vázquez-García *et al.*, 2012). Los principales fabricantes de productos de teca son Indonesia, Tailandia, India y China. Las industrias de elaboración de teca en China y Tailandia trabajan con madera en rollo, siendo los principales importadores. Por su parte, Indonesia procesa toda la teca cultivada en plantaciones y exporta gran parte de su producción en forma de artículos a Europa y América del Norte (Proteak uno, 2015). India produce madera aserrada para la construcción y tableros decorativos prácticamente sólo para su consumo interno. A pesar de ser uno de los mayores productores de teca, importa grandes cantidades de madera en troza y aserrada procedente de África y América Latina para satisfacer su demanda de chapas y contrachapas (Pandey y Brown, 2000; Fonseca, 2004).

En 2012, la producción mundial de maderas tropicales se incrementó 0.7%, mientras que la demanda aumentó en 10.2%. Aunque existe una creciente demanda de estas maderas, la mayor parte de la producción proviene de fuentes no sustentables (bosques naturales) (Proteak uno, 2015). En el caso de la teca, el consumo mundial ha ido en ascenso con la alarmante reducción de sus bosques naturales, mientras que su oferta se ha reducido significativamente. Los grandes bosques de teca restantes en el mundo están ubicados en Burma (Birmania), pero ese gobierno puede depredarlos indiscriminadamente, por lo que la demanda mundial tendrá que satisfacerse con las plantaciones restantes de otros países (Muñoz-Flores, Sáenz-Reyes, & Rueda-Sánchez, 2012).

Las políticas y la legislación prohíben o restringen estrictamente la explotación de bosques naturales en todos los países comprendidos en el área de distribución de la teca (Pandey y Brown, 2000), disminuyendo progresivamente la oferta de esta madera. Consecuentemente, muchas industrias forestales han establecido plantaciones en tierras privadas con la ayuda de agricultores a los que proporcionan asistencia financiera y técnica, por lo que se espera que en un futuro esas plantaciones lleguen a ser la fuente primaria de teca. Muchas de esas plantaciones de teca han establecido en América Latina: Trinidad, Venezuela, Honduras, Ecuador y México. También se encuentran plantaciones importantes en África (Fonseca, 2004; Hallett *et al.*, 2011; Vincent, 2018).

La alta demanda de la madera de teca ha atraído la atención de inversionistas en todo el mundo. Algunos reportan altas tasas de dividendos que comienzan en poco tiempo, por ejemplo, de cinco años en Costa Rica y México (Hallett *et al.*, 2011). La prohibición de la comercialización de madera en las naciones donde se obtiene teca de bosques naturales ha promovido las importaciones. Es decir, aunque la oferta de teca proveniente de bosques naturales está disminuyendo, su demanda ha aumentado. Este desajuste entre la oferta y la demanda mundial ha generado incrementos constantes en los precios desde hace más de 40 años. De acuerdo con ITTO (2016), los precios del rollo de teca de alta calidad han superado los US\$2,800/m³, debido a que no se ha encontrado ningún material sintético que pueda sustituir efectivamente sus propiedades, siendo la única opción la teca de plantaciones (Proteak uno, 2015).

Por otro lado, la madera para aserrío tiene un alto valor comercial (Vázquez-García *et al.*, 2012). A ese respecto, existe un amplio intervalo en la valuación de la madera, ya que el precio está determinado por la oferta/demanda, diámetro de la troza, calidad y fletes. En septiembre de 2016, el precio internacional de la teca se ubicaba entre \$1918 MX (US\$98) y \$2094 MX (US\$107) /m³ (Proteak uno, 2015; ITTO, 2016). Los principales mercados para la madera de teca son Norteamérica, Europa y Japón, teniendo gran demanda para la construcción de casas sometidas a condiciones ambientales extremas y en el recubrimiento de superficies exteriores e interiores de yates (Muñoz *et al.*, 2012; Alabi y Oyeku, 2017).

2.2.6. Producción de Teca en México

Con más de 269,600 hectáreas plantadas de diferentes especies maderables en México, los estados de Veracruz, Tabasco, Campeche, Chiapas y Puebla son líderes en el esquema de Plantaciones Forestales Comerciales con especies como caoba, eucalipto, melina y teca al concentrar más del 65% del total (Comisión Nacional Forestal, 2014).

La teca es un árbol que, por su rápido crecimiento y alto valor económico de su madera, se ha plantado en grandes extensiones en México en los últimos años, principalmente en el sureste del país en forma de plantaciones forestales comerciales (PFC), las cuales cubren más de 118,000 ha (Camacho-Linton, Ramírez-Maldonado, De los Santos-Posadas, y Zamudio-Sánchez, 2013).

La teca se introdujo en el país en 1945 en los estados de Chiapas, Veracruz, Tabasco, Campeche y Quintana Roo (Ypushima-Pinedo, 2015). También, se han establecido plantaciones en Michoacán, Nayarit y Jalisco (Vázquez-García *et al.*, 2012). En 2011, la empresa mexicana Bienes Ecoforestales (Bieeco) comenzó una plantación de 840 ha de teca en Tizimín, Yucatán (Miranda, 2018). En Nayarit, las plantaciones se han establecido desde 1995, principalmente en tierras de cultivo abandonadas, tales como sembradíos de plátano y mango, y en tierra desgastada planeada para restauración o reforestación. En la Figura 5 se muestra una plantación de teca de 13 años en el estado de Nayarit.



Figura 5. Plantación de teca de trece años en Nayarit, México (Hallett *et al.*, 2011).

Como se ha indicado, las plantaciones de teca proveen una alternativa económicamente atractiva para el uso de tierras de cultivo abandonadas, áreas dominadas por especies invasivas y áreas que necesitan protección, y se consideran sistemas alternativos a los cultivos agrícolas, revirtiendo un futuro promisorio a mediano plazo, puesto que tiene mercado internacional y el apoyo potencial de las instituciones gubernamentales (Hallett *et al.*, 2011; Vincent, 2018).

Se estima que el consumo anual de teca en México es de $12.5 \times 10^6 \text{ m}^3$, mientras que la producción local es de $9.4 \times 10^6 \text{ m}^3$, lo que impone la necesidad de importación. Actualmente el costo/ m^3 en México va de los \$295 a \$808 dólares (ITTO, 2018). Al 2014 existían 25,324 ha plantadas de teca, cuya distribución por estado productor se muestra en la Figura 6 (Proteak uno, 2015):

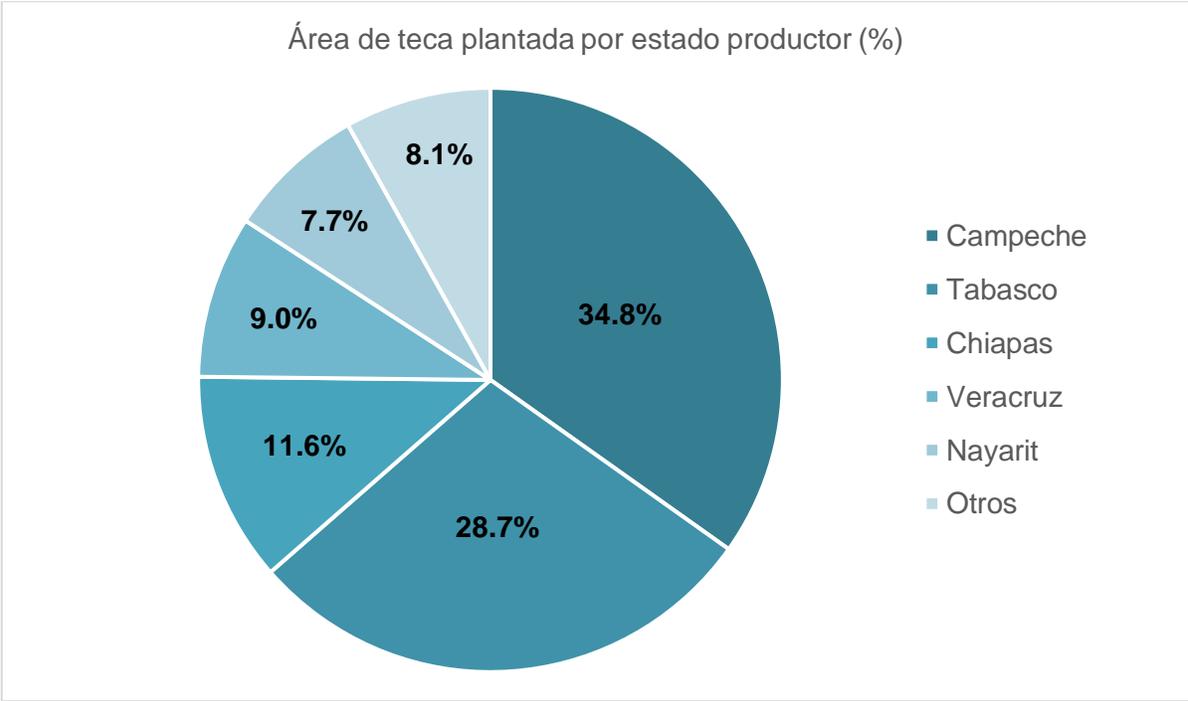


Figura 6. Área de teca plantada por estado productor (Proteak uno, 2015).

2.3. Celulosa

La celulosa es el principal componente estructural de la materia vegetal. Es un polisacárido insoluble en agua, disolventes orgánicos o en ácidos y álcalis diluidos. No obstante, su hidrólisis puede realizarse mediante ciertos procesos ácidos o enzimáticos (Oliva-Domínguez, 2003). La celulosa representa entre 40-60% del contenido de la pared celular de los vegetales (Fonseca-Maldonado, 2006). Químicamente es un polímero lineal de alta masa molar que consiste en unidades de D-glucosa unidas por enlaces glucosídicos β -(1,4). La fórmula es $(C_6H_{10}O_5)_n$, donde n puede ser mayor a 500 monosacáridos por cadena de polisacárido. La unidad básica que se forma es el disacárido celobiosa. A su vez, la unión repetida de n celobiosas forma la celulosa. Las unidades de celobiosa se estructuran en largas cadenas lineales denominadas microfibrillas, formadas por unas 50 moléculas de celulosa orientadas con la misma polaridad, unidas por puentes de hidrógeno y fuerzas de van der Waals intramoleculares, formando una estructura cristalina resistente a la hidrólisis y regiones amorfas susceptibles a la degradación enzimática (Gong, Cao, Du y Tsao, 1999; Cuervo *et al.*, 2009; Eveleigh, Mandels, Andreotti y Roche, 2009). En la Figura 7 se muestra la estructura molecular de una unidad de celobiosa presente en una cadena de celulosa.

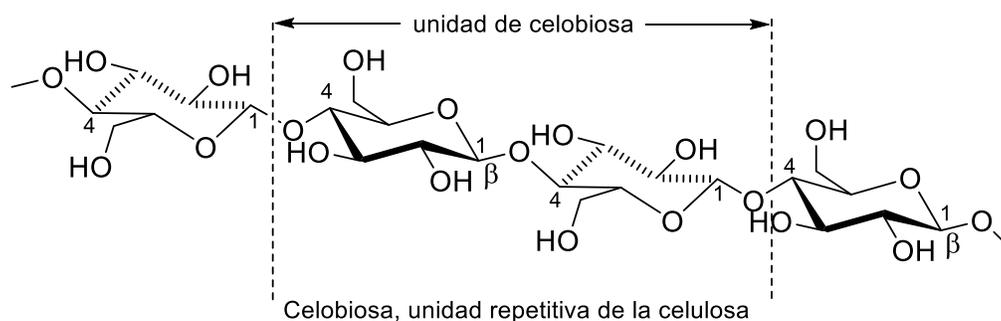


Figura 7. Estructura molecular de la celulosa (Bruice, 2008).

Estructura de la pared celular

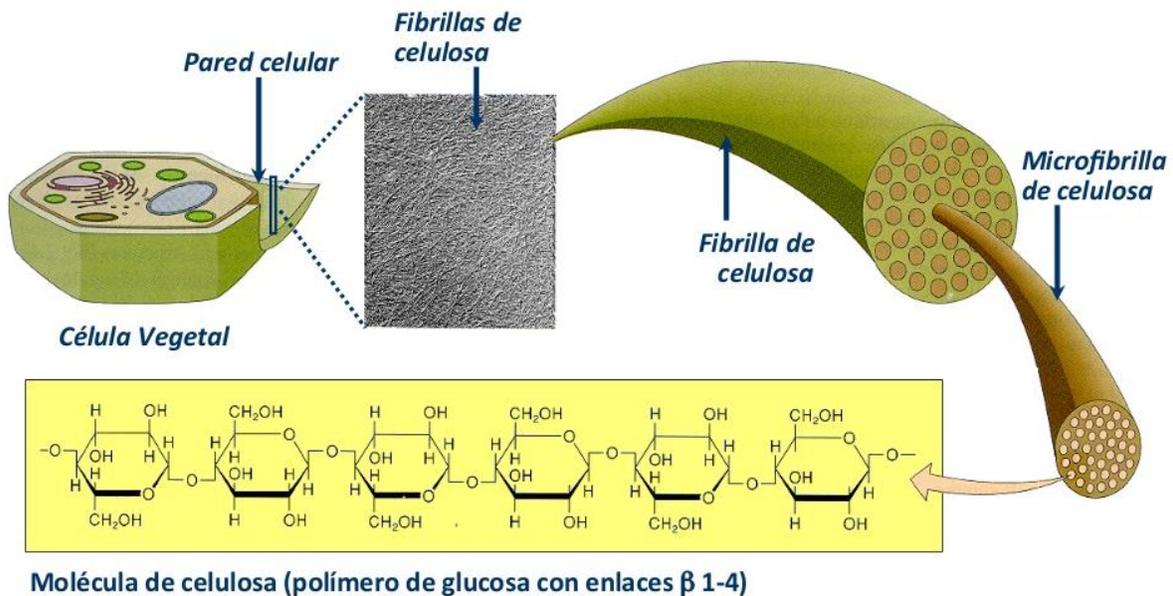


Figura 8. Estructura de la pared celular vegetal (García-Breijo, 2015).

En la Figura 8 se muestra la estructura general de la pared de una célula vegetal, la cual consta de fibrillas y microfibrillas de celulosa. Tanto las microfibrillas como las fibrillas están compuestas por zonas cristalinas y zonas amorfas. Las zonas cristalinas se producen cuando las moléculas se enlazan con un alto grado de ordenación, mientras que las regiones amorfas no presentan dicha característica (Damodaran, Parkin y Fennema, 2008). Estas últimas son más accesibles y, por tanto, más susceptibles a todas las reacciones químicas (Roncero-Vivero, 2001). Por otro lado, son, precisamente, las zonas cristalinas las que dificultan la hidrólisis para la obtención de azúcares fermentables. Adicionalmente, en la Figura 9, se ilustra la organización de las moléculas de celulosa en los materiales lignocelulósicos, la presencia de pectina y hemicelulosa, así como la disposición de las zonas cristalinas y las regiones amorfas.

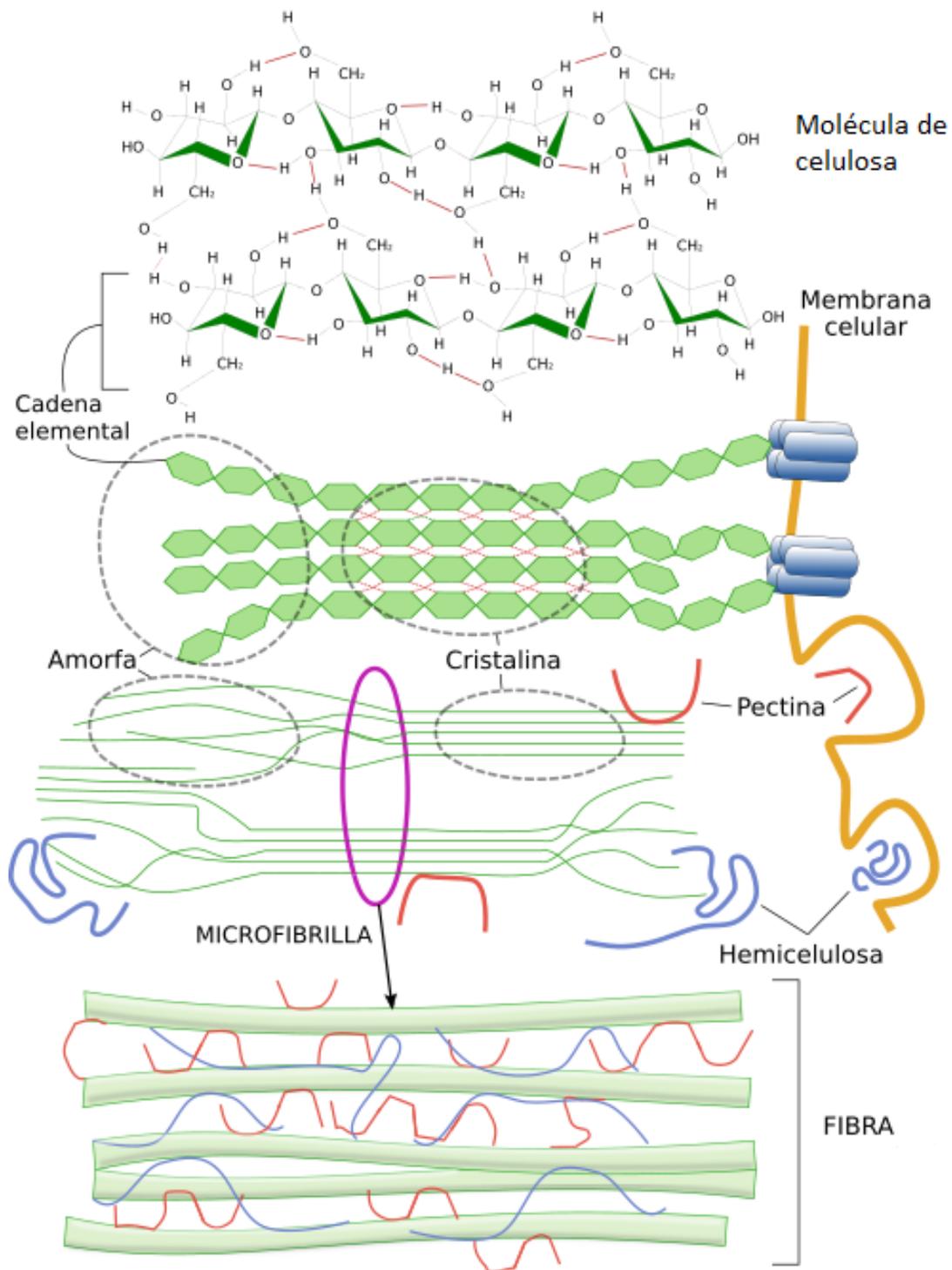


Figura 9. Organización de las moléculas de celulosa en los materiales lignocelulósicos (Megías, Molist y Pombal, 2019).

2.4 Hemicelulosa

La hemicelulosa es un polímero complejo de heteropolisacáridos de cadenas ramificadas, de aproximadamente 200 azúcares, y de menor peso molecular que la celulosa. Con respecto a ésta, es mucho más fácil de hidrolizar debido a que en estado natural existe en forma amorfa (Gong *et al.*, 1999; Oliva-Domínguez, 2003; Sánchez-Toro y Cardona-Alzate, 2007; Morales de la Rosa, 2015). Está formada por pentosas: D-xilosa y L-arabinosa, y en menor cantidad hexosas: D-glucosa, D-manosa y D-galactosa, L-ramnosa, L-fucosa, y los ácidos 4-O-metilglucurónico, D-galacturónico y D-glucurónico (Zaldivar, Nielsen y Olson, 2001; Cuervo *et al.*, 2009). Sus propiedades físicas y químicas dependen de su composición, así como de las condiciones climáticas y del terreno de producción (Ayala-Villalobos, 2013). Los azúcares están unidos por enlaces β -1,4 y, ocasionalmente, por enlaces β -1,3. A diferencia de la celulosa, la hemicelulosa contiene grupos acetilo que esterifican algunos de los OH de sus distintos azúcares.

Una clasificación de las hemicelulosas se basa en la cadena principal que conforma sus moléculas: xilanos, xiloglucanos, mananos y glucomananos, siendo las uniones predominantes los enlaces β -1,4 (Scheller y Ulvskov, 2010). Las principales cadenas son xilanos y glucomananos, y las primeras son las más abundantes, representando entre 20-30% de la madera dura y plantas herbáceas. Se pueden encontrar grandes cantidades de xilanos en residuos forestales y agrícolas, y en la madera e industrias papeleras (Gírio *et al.*, 2010). Los glucomananos son polímeros lineales de glucosa y manosa unidas por enlaces β -1,4 con predominio de manosas que no presentan ramificaciones ni sustituyentes (Oliva-Domínguez, 2003; Vázquez-Bolaños, 2012).

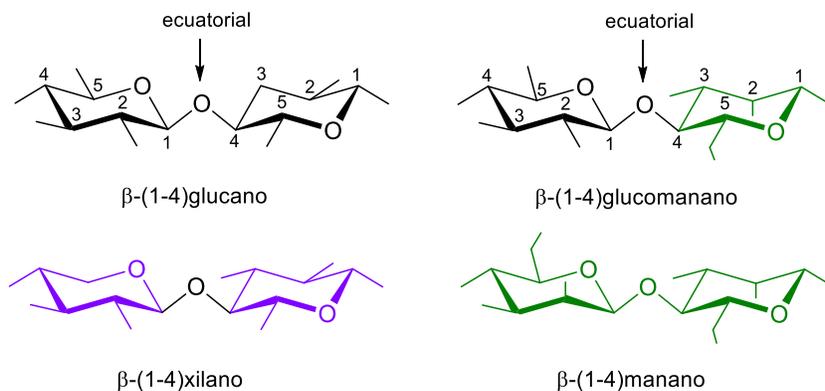


Figura 10. Estructura de las principales unidades de disacáridos de la hemicelulosa (Scheller y Ulvskov, 2010).

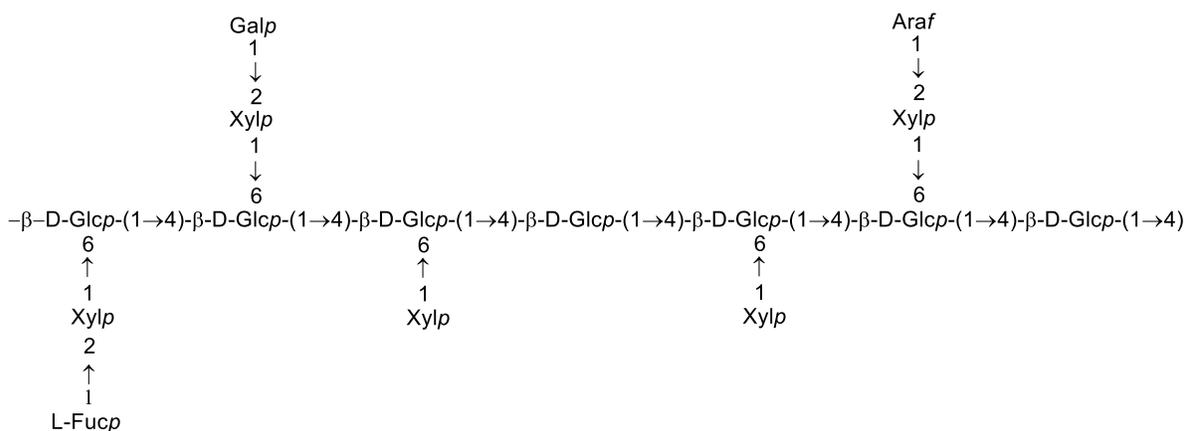


Figura 11. Sección de la estructura de un xiloglucano (Belitz, Grosch y Schieberle, 2009).

Los xilanos se encuentran en la mayoría de las células de las plantas, están compuestos por cadenas lineales de β -D-xilosa con enlaces 1,4-glucosídicos. Las cadenas constan de 30 a 100 unidades de xilosa y presentan diversas ramificaciones y sustituciones. Algunos xilanos también presentan arabinosa, glucosa, galactosa y glucuronato (Carrillo, 2003), mientras que los xiloglucanos presentan moléculas de xilopiranosas (Xylp) unidas a la posición 6 de glucopiranosas (Glc p). Asimismo, las moléculas de xilopiranosas presentan diversas sustituciones en la posición 2 de azúcares como L-fucopiranosas (L-Fuc p), galactopiranosas (Gal p) y arabinofuranosas (Araf). En la Figura 11 se indica la estructura de un xiloglucano.

Las cadenas de hemicelulosa no se agregan entre ellas, sino que forman puentes de hidrógeno con moléculas de celulosa para proveer integridad estructural a las paredes vegetales. Su papel es fungir como puente entre la lignina y la celulosa (Roncero-Vivero, 2001). Para incrementar la digestibilidad de la celulosa, y así obtener azúcares fermentables, la hemicelulosa debe ser removida, ya que limita la disponibilidad de las fibras de celulosa para la hidrólisis. Debido a la diversidad en azúcares de la hemicelulosa, se requiere de un amplio grupo de enzimas para alcanzar su hidrólisis completa. Sin embargo, las hemicelulosas son relativamente sensibles a las condiciones químicas de algunos pretratamientos madereros, por lo que parámetros como la temperatura y el tiempo de reacción deben controlarse eficazmente para evitar la formación de productos indeseables, como el furfural y el 5-hidroximetil-2-furfuraldehído (HMF), que inhiben el posterior proceso de fermentación (Mood *et al.*, 2013). En la Figura 12 se muestra la estructura de la hemicelulosa y su unión con lignina (Moreno-González, 2011).

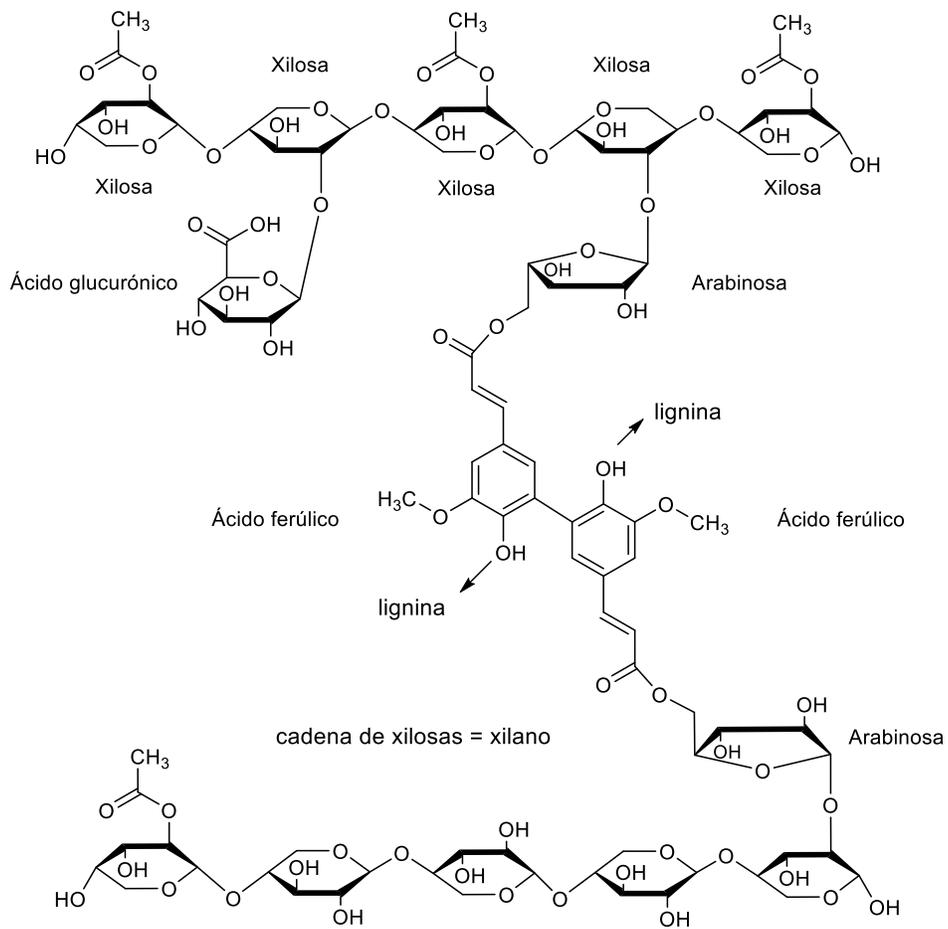


Figura 12. Estructura de la hemicelulosa (Moreno-González, 2011).

2.5. Lignina

La lignina es el segundo polímero más abundante en la Tierra después de la celulosa. Es un heteropolímero amorfo, tridimensional, ópticamente inactivo y ramificado que está conformado por fenoles que le confieren soporte estructural, rigidez, impermeabilidad y protección a los polisacáridos celulosa y hemicelulosa; es altamente resistente a la degradación química y biológica, y se encuentra enlazado covalentemente a xilanos de la hemicelulosa (Roncero-Vivero, 2001). Desde el punto de vista químico, la lignina muestra un alto grado de variabilidad estructural, dependiendo de la especie, tejido y tipo de célula. Es el polímero fenólico natural más abundante. Los tres fenoles monoméricos (lignoles) que la conforman son los alcoholes cinamílicos *p*-cumarílico, coniferílico y sinapílico (Zaldivar *et al.*, 2001), cuya estructura se muestra en la Figura 13, que se diferencian por las sustituciones en el anillo aromático; por ello, la lignina no presenta una estructura única (Oliva-Domínguez, 2003). La mayor parte se encuentra en la corteza media de los árboles. Dependiendo del tipo de madera, el contenido de lignina es variable; por ejemplo, las maderas de coníferas contienen de 25-33%, y las maderas frondosas de 18-34% (Jones, Ennos y Turner, 2001). En particular, la lignina de las maderas duras está formada por unidades de guayacilo y siringilo, que determinan características como el grado de polimerización y condensación. De esta forma, las maderas duras son más fáciles de deslignificar que las maderas blandas (Oliva-Domínguez, 2003). En la Figura 14 se muestra la estructura de dos distintos tipos de cadena de lignina.

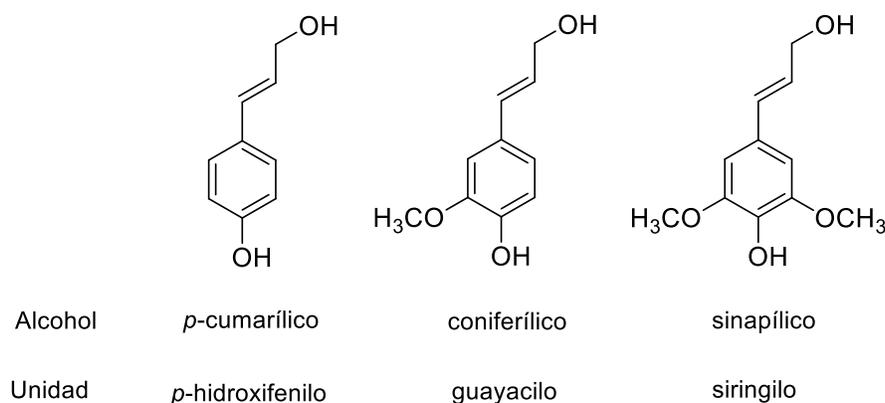


Figura 13. Alcoholes cinamílicos precursores de lignina (Oliva-Domínguez, 2003).

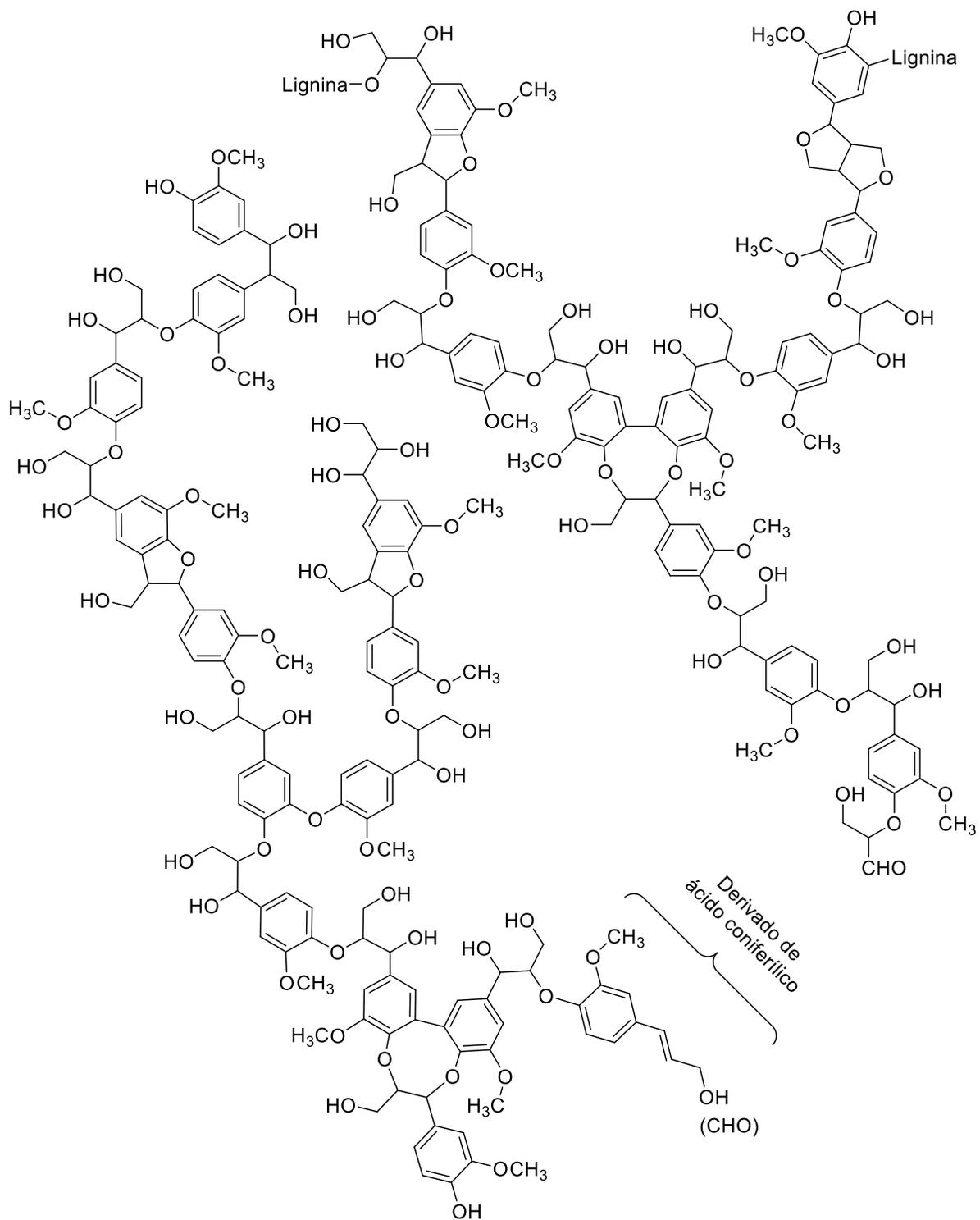


Figura 14. Estructura de la lignina (Oliva-Domínguez, 2003).

2.6 Madera como materia prima para obtener etanol

Los bosques y las selvas son las principales fuentes de madera. Durante años, la madera se ha utilizado en la elaboración de muebles y material para la construcción, además de emplearse como combustible. Diversas industrias y aserraderos han considerado los residuos de madera como un subproducto complicado, con su consiguiente eliminación para relleno de terrenos o incinerándolos en quemadores. Sin embargo, los problemas ambientales, así como el aumento de los costos energéticos, ha motivado que las industrias se planteen el uso de este material como fuente alternativa de combustible (FAO, 1991). Además, los residuos madereros pueden aprovecharse para la obtención de productos con alto valor agregado, tal es el caso del bioetanol. En estos residuos la lignocelulosa es el principal componente químico, y constituye una fuente importante de materia orgánica renovable (Ayala-Villalobos, 2013; Irbe *et al.*, 2013). En particular, los residuos de la industria forestal pueden dividirse en dos clases: los que proceden de su recolección y extracción en bosques, y aquellos generados directamente por la industria serradora, y de madera procesada.

Existen diversas clasificaciones de la madera, siendo la más común por su dureza en relación con su peso específico, la cual varía en función del contenido de lignina, que depende del tipo de árbol o planta y de la edad de éste (Ayala-Villalobos, 2013). Taxonómicamente, las maderas pueden clasificarse en dos categorías (Fonseca-Maldonado, 2006):

- a) Gimnospermas. También llamadas coníferas, resinosas, no porosas o maderas suaves. Por ejemplo, el pino y el abeto.

- b) Angiospermas. También llamadas foliosas, porosas o maderas duras. Por ejemplo, el roble, el cerezo, el nogal, la teca.

Tabla 3. Características anatómicas de maderas suaves y maderas duras (León-Hernández y Espinoza de Pernia, 2001).

| Maderas suaves (gimnospermas) | Maderas duras (angiospermas) |
|--|--|
| <ul style="list-style-type: none"> • Plantas con flores poco vistosas • No tienen frutos • Conservan sus hojas todo el año (hoja perenne) • Su tallo siempre es leñoso • La mayoría son coníferas, ej. pino | <ul style="list-style-type: none"> • Plantas con flores muy vistosas • Poseen frutos (alimentos de origen vegetal) • Hojas perennes o caducas • Tallo leñoso o herbáceo • Grupo heterogéneo |

Tanto las maderas duras como las blandas contienen dos tipos de hemicelulosas: los xilanos y los glucomananos. En el primer caso, las hemicelulosas predominantes son los xilanos, un polímero de β -xilopiranosas unidas por enlaces β -1,4, mismo que presenta ligeras ramificaciones. Los grupos hidroxilo pueden estar sustituidos por residuos de ácido 4-O-metilglucurónico unidos por enlaces α -1,2, y por grupos acetilo unidos mediante enlaces éster a las posiciones 2 y 3 del anillo de pentosa (Figura 15). Los glucomananos de maderas duras son polímeros lineales de glucosa y manosa unidas mediante enlaces β -1,4 en los que predominan las manosas, los cuales carecen de sustituyentes laterales. Por otro lado, en los xilanos de maderas blandas, el esqueleto polimérico es idéntico al presente en las maderas duras, es decir, contienen sustituyentes 4-O-metilglucuronilo unidos por enlaces α -1,2. Por otro lado, presentan restos de arabinosa unidas por enlaces α -1,3. Los glucomananos de maderas blandas tienen mayor cantidad de manosa que los de las maderas duras, y tiene dos tipos de sustituyentes: grupos O-acetilo unidos por enlaces éster a la posiciones 2 y 3 del esqueleto de azúcar, y galactosa, unida mediante enlaces α -1,6, por lo que se denominan galactoglucomananos (Oliva-Domínguez, 2003).

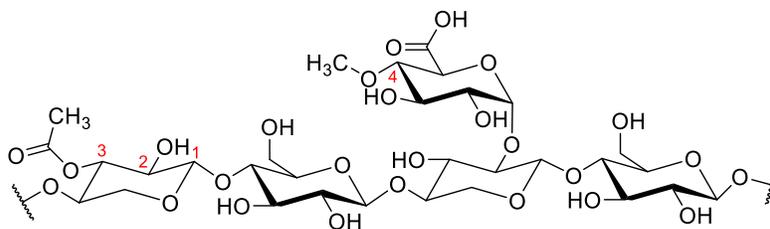


Figura 15. Estructura del O-acetil-4-O-metilglucuronoxilano (Oliva-Domínguez, 2003).

2.7 Conversión de lignocelulosa a etanol

Existen tres pasos principales en el proceso de conversión de la lignocelulosa:

1. Pretratamiento: mejora el acceso de las enzimas a la celulosa.
2. Sacarificación enzimática: uso de celulasas y ocasionalmente hemicelulasas.
3. Fermentación de los azúcares liberados.

En la Figura 16 se muestra un diagrama con las principales etapas de la producción de etanol a partir de material lignocelulósico.

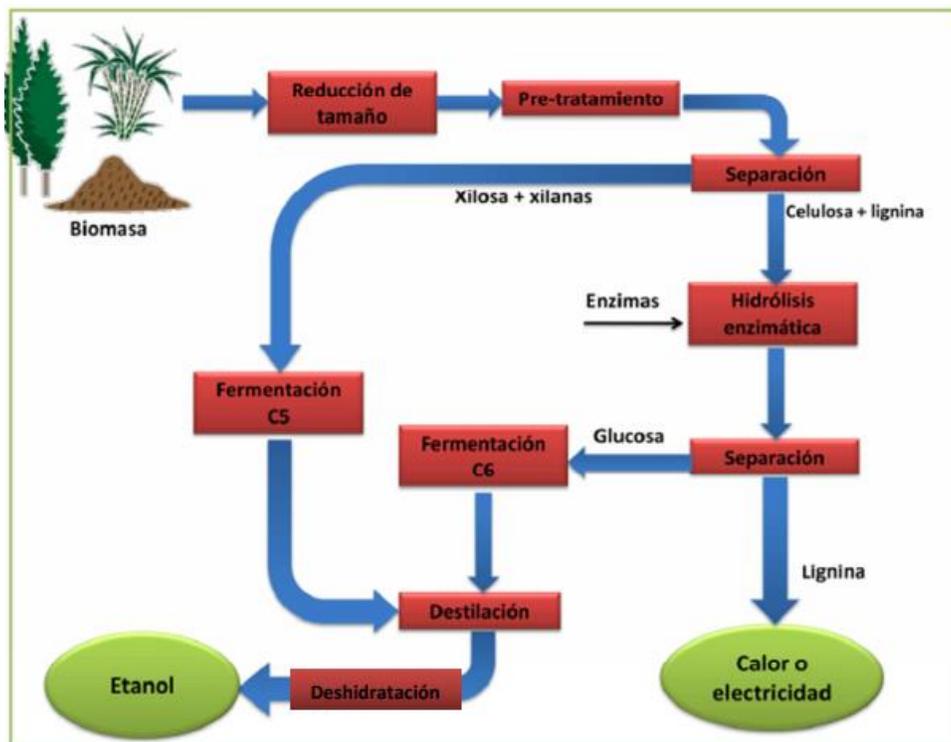


Figura 16. Etapas de la producción de etanol a partir de material lignocelulósico (Ayala-Villalobos, 2013).

2.7.1. Pretratamiento

La biomasa lignocelulósica representa la fuente más abundante en la naturaleza de azúcares fermentables no solamente para la producción de alcohol carburante, sino de una amplia gama de productos de fermentación. Sin embargo, para que este recurso renovable se pueda aprovechar, es necesario someter el complejo lignocelulósico a un pretratamiento para romper su estructura con el fin de que sus azúcares y polisacáridos constituyentes estén disponibles para la acción tanto de las enzimas hidrolíticas como de los microorganismos fermentadores, así como del ataque químico (Sánchez-Toro y Cardona-Alzate, 2007; Viñals-Verde *et al.*, 2012).

La estructura de la biomasa lignocelulósica es compleja, ya que la lignina y la hemicelulosa forman un empaque que cubre a la celulosa. Además, la estructura cristalina de la celulosa le confiere una gran estabilidad y resistencia a la hidrólisis, mientras que la presencia de lignina refuerza, mediante puentes de hidrógeno, la matriz que forma la hemicelulosa con las microfibrillas de celulosa. De esta manera, factores como el grado de cristalinidad de la celulosa, el área superficial disponible (relacionada con la porosidad del material), la protección de la celulosa por parte de la lignina, el resguardo tipo “vainas” que le ofrece la hemicelulosa a la celulosa y el carácter heterogéneo de las partículas de biomasa contribuyen a la resistencia hidrolítica de los materiales lignocelulósicos (Sánchez-Toro y Cardona-Alzate, 2007).

Considerando lo anterior, el pretratamiento del material lignocelulósico tiene los siguientes objetivos (Oliva-Domínguez, 2003):

- Rompimiento de la matriz de celulosa-hemicelulosa.
- Reducción en el grado de cristalinidad de la celulosa y aumento de la fracción de celulosa amorfa.
- Hidrólisis de la hemicelulosa.
- Liberación y degradación parcial de lignina.
- Aumento de la porosidad del material lignocelulósico.
- Disminución de la presencia de sustancias que dificultan la hidrólisis.

En la Figura 17 se representa el cambio estructural de la biomasa lignocelulósica después de un pretratamiento de fragmentación (Vázquez-Bolaños, 2012). El pretratamiento de esta biomasa es una etapa clave en el proceso de producción de alcohol carburante, y también una de las más costosas (Sánchez-Toro y Cardona-Alzate, 2007). Para que un pretratamiento sea efectivo debe cumplir con lo siguiente (Gupta y Verma, 2015):

- Formación de azúcares directa o subsecuentemente por hidrólisis.
- Evitar la pérdida y/o degradación de los azúcares formados.
- Limitar la formación de productos inhibitorios.
- Reducir las demandas de energía.
- Minimizar los costos.

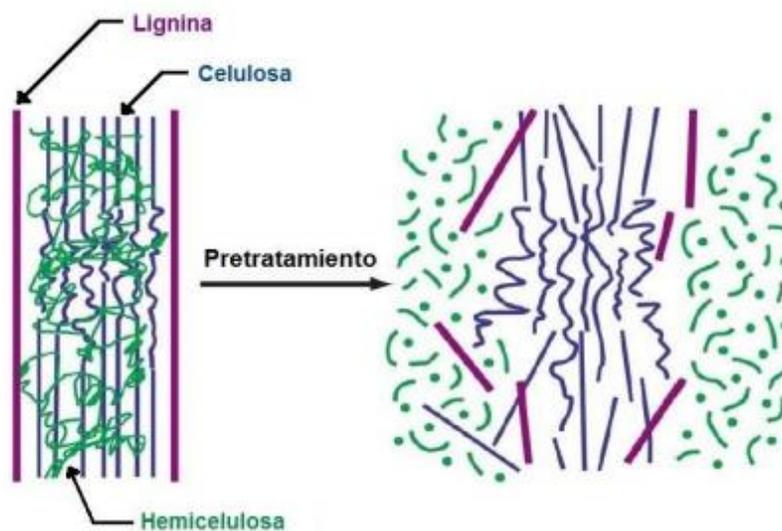


Figura 17. Cambio estructural de biomasa lignocelulósica con un pretratamiento de fragmentación (Vázquez Bolaños, 2012).

Existen diversos procesos para el pretratamiento de materiales lignocelulósicos, pueden ser métodos físicos, químicos, fisicoquímicos o biológicos. Debido a que existen biomasa lignocelulósicas con diferentes características, es necesario adoptar un pretratamiento adecuado para cada una (Moreno-González, 2011).

En las Tablas 4-7 se resumen las ventajas y desventajas de los pretratamientos de materia lignocelulósica más comúnmente usados:

Tabla 4. Métodos físicos para el pretratamiento del material lignocelulósico.

| Métodos Físicos | | | | |
|------------------------|--------------------------------------|---|--|--|
| Método | Condiciones | Ventajas | Desventajas | Referencias |
| Fragmentación mecánica | Troceado, astillado, molienda | <ul style="list-style-type: none"> • Reduce la cristalinidad de celulosa • Aumenta la superficie específica | <ul style="list-style-type: none"> • Elevado requerimiento energético | Oliva-Domínguez (2003); Sánchez-Toro y Cardona-Alzate (2007) |
| Pirólisis | T>300°C, enfriamiento y condensación | <ul style="list-style-type: none"> • Reduce la cristalinidad de celulosa | <ul style="list-style-type: none"> • Elevado requerimiento de energía | Morales de la Rosa (2015) |

Tabla 5. Métodos fisicoquímicos para el pretratamiento del material lignocelulósico.

| Métodos Fisicoquímicos | | | | |
|--|--|--|--|--|
| Método | Condiciones | Ventajas | Desventajas | Referencias |
| Explosión a vapor | Vapor saturado a 160-290°C, 0.69-4.85 MPa | <ul style="list-style-type: none"> • Degradación de hemicelulosa y lignina | <ul style="list-style-type: none"> • Degradación de azúcares • Generación de inhibidores microbianos • Alta toxicidad | Oliva-Domínguez (2003); Alvira <i>et al.</i> (2010); Mood <i>et al.</i> (2013) |
| Explosión de fibra con amoníaco (AFEX) | 1-2 kg amonio/kg biomasa seca, 90°C, 30 min, 1.12-1.36 MPa | <ul style="list-style-type: none"> • Nula formación de inhibidores • Aumenta la superficie de acceso | <ul style="list-style-type: none"> • No es eficiente para biomasa rica en lignina • El amonio debe ser reciclado | Sun y Chen (2002) |
| Explosión con CO ₂ | 4 kg CO ₂ /kg, 5.62 MPa | <ul style="list-style-type: none"> • Degradación de lignina • No produce residuos tóxicos | <ul style="list-style-type: none"> • No es eficiente para biomasa rica en lignina | Sun y Chen (2002) |
| Agua caliente | Agua caliente > 5 MPa, 170-230°C | <ul style="list-style-type: none"> • Baja o nula formación de inhibidores • Económico | <ul style="list-style-type: none"> • No logra la deslignificación total | Sánchez-Toro y Cardona-Alzate (2007); Tomás-Pejó, Alvira, Ballesteros y Negro (2011) |

Tabla 6. Métodos químicos para el pretratamiento del material lignocelulósico (Adaptado de Morales de la Rosa, 2015).

| Métodos Químicos | | | | |
|----------------------------|--|---|---|---|
| Método | Condiciones | Ventajas | Desventajas | Referencias |
| Ozonólisis | Ozono, T ambiente | <ul style="list-style-type: none"> • Reduce el contenido de lignina • Nula formación de inhibidores | <ul style="list-style-type: none"> • Requiere grandes cantidades de O₃ • Costoso | Tomás-Pejó <i>et al.</i> (2011) |
| Hidrólisis ácida | HCl/HNO ₃ 0.75-5.0%, 160-200°C; H ₂ SO ₄ 10-30%, 170-190°C | <ul style="list-style-type: none"> • Hidroliza la hemicelulosa a xilosa y otros azúcares • Altera la estructura de la lignina | <ul style="list-style-type: none"> • Corrosión del equipo • Requiere neutralización • Formación de sustancias tóxicas • Costoso | Sun y Chen (2002) |
| Hidrólisis alcalina | NaOH (dil.), 24 h, 60 °C; Ca(OH) ₂ , 4 h, 120°C | <ul style="list-style-type: none"> • Elimina hemicelulosa y lignina • Aumenta la superficie de acceso • No hay degradación de azúcares a HMF | <ul style="list-style-type: none"> • Requiere largos tiempos de residencia • Formación de sales irrecuperables y que se incorporan a la biomasa | Tomás-Pejó <i>et al.</i> (2011); Mood <i>et al.</i> (2013) |
| Deslignificación oxidativa | Peroxidasa y H ₂ O ₂ (2%), 20°C, 8 h | <ul style="list-style-type: none"> • Solubiliza la mayor parte de la hemicelulosa y lignina • Disminuye la cristalinidad de la celulosa | <ul style="list-style-type: none"> • En algunos casos el oxidante no es selectivo y ocasiona pérdidas de hemicelulosa y celulosa | Cuervo <i>et al.</i> (2009); Quintero, Rincón y Cardona (2011); Ayala Villalobos (2013) |
| Oxidación húmeda | 1.2 MPa de presión de O ₂ , 195°C, 15 min | <ul style="list-style-type: none"> • Solubilización de la hemicelulosa y lignina • Poca o nula generación de HMF y furfural (inhibidores) | <ul style="list-style-type: none"> • Costoso (gran requerimiento de O₂) | Tomás-Pejó <i>et al.</i> (2011) |
| Disolventes orgánicos | Disolventes orgánicos o mezclas de ellos, pH 2.0-3.4, 30-60 min | <ul style="list-style-type: none"> • Hidrólisis de la hemicelulosa y la solubilización de lignina | <ul style="list-style-type: none"> • Los disolventes deben drenarse del reactor, evaporarse, condensarse y reciclarse • Alto costo | Sánchez-Riaño, Gutiérrez-Morales, Muñoz-Hernández y Rivera-Barrero (2010) |

Tabla 7. Métodos biológicos para el pretratamiento de material lignocelulósico.

| Métodos Biológicos | | | | |
|------------------------|---|---|--|---|
| Método | Condiciones | Ventajas | Desventajas | Referencias |
| Pretratamiento fúngico | Hongos de la pudrición parda, blanca y blanda | <ul style="list-style-type: none"> • Degradación de la lignina y hemicelulosa • Requiere poca energía • Moderadas condiciones de proceso | <ul style="list-style-type: none"> • Hidrólisis lenta • Requiere de un control de las condiciones de crecimiento | Oliva-Domínguez (2003); Sánchez-Riaño <i>et al.</i> (2010); Morales de la Rosa (2015) |

2.7.2. Sacarificación enzimática

Después del pretratamiento, se lleva a cabo la conversión de celulosa a azúcares fermentables en un proceso llamado sacarificación o hidrólisis (Binod *et al.*, 2011).

Los procesos de conversión de celulosa a azúcares fermentables y, posteriormente, a etanol, pueden dividirse en dos grandes grupos:

a) Procesos en dos etapas. La hidrólisis -ácida o enzimática- y la fermentación se realizan por separado (HFS). La ventaja de este proceso es que, al estar separada la etapa de hidrólisis de la fermentación, ambas pueden realizarse en sus condiciones óptimas. La principal desventaja del proceso de HFS es que, la celobiosa y la glucosa liberadas durante la hidrólisis enzimática inhiben la actividad de las enzimas implicadas en el proceso, obteniéndose bajos rendimientos (Oliva-Domínguez, 2003).

b) Procesos en una etapa. En este tipo de procesos, la hidrólisis y la fermentación se realizan en el mismo reactor. La principal ventaja es que se reduce la inhibición por producto final que se produce en la operación en dos etapas. La principal desventaja es que requiere de diferentes condiciones de pH y temperatura para la etapa de hidrólisis y fermentación. Por ello, es necesario realizar el proceso en condiciones compatibles para ambas etapas.

Por su parte, los procesos en una etapa se pueden dividir en dos grupos: aquellos en los que el mismo microorganismo produce las enzimas y realiza la fermentación, proceso conocido como conversión directa por microorganismo (CDM); y procesos de sacarificación y fermentación simultánea (SFS), en los que se emplean celulasas provenientes de un microorganismo celulolítico (normalmente un hongo), junto con la presencia de un microorganismo productor de etanol.

La celulosa también se puede hidrolizar de forma química con la ayuda de ácidos diluidos o concentrados, sin embargo, las desventajas de este proceso implican la formación de una gran cantidad de subproductos en el caso de la hidrólisis con ácido diluido, mientras que la recuperación del ácido implica mucha energía y es un proceso costoso en el caso de la hidrólisis con ácido concentrado. Además, ambos procesos se realizan a altas temperaturas (100-200°C), lo que degrada los azúcares, reduciendo la fuente de carbono para la enzima, disminuyendo así el rendimiento de etanol (Viñals-Verde *et al.*, 2012).

En el caso de la hidrólisis enzimática, ésta es una reacción altamente selectiva que permite convertir grandes polisacáridos en unidades más pequeñas. Las celulasas reemplazan el ácido concentrado en la etapa de hidrólisis y las temperaturas son de 30-50°C, lo cual reduce la degradación de azúcares. Aunque el tiempo de reacción es mayor en un proceso enzimático y el costo de las enzimas es elevado, en muchos casos se prefiere este método por su potencial de mejora continua.

Para el desarrollo y control de la cinética de hidrólisis enzimática se deben considerar cuatro factores relevantes: la estructura y propiedades fisicoquímicas del sustrato, las propiedades y el mecanismo de acción de la enzima, el modo de interacción entre las moléculas de enzima y celulosa, y las condiciones del medio del sistema reaccionante (Navarrete, 2002). Para poder hidrolizar vía enzimática un material lignocelulósico, existen dos tipos de sistemas enzimáticos extracelulares: los que producen hidrolasas, que degradan la celulosa (celulasas) y la hemicelulosa (hemicelulasas), y los que despolimerizan la lignina por reacciones de oxidación (peroxidasas y lacasas).

Las celulasas son enzimas capaces de degradar la celulosa que se derivan de algunos procesos naturales de fermentación microbiana. En realidad, una enzima celulasa es una mezcla de diversos componentes enzimáticos, formando lo que se denomina un “complejo enzimático”, el cual actúa de forma sinérgica en la degradación de celulosa, hidrolizando los enlaces glucosídicos β -1,4 del polisacárido (Navarrete, 2002; Pérez, Muñoz-Dorado, de la Rubia y Martínez, 2002). Este complejo está formado por tres tipos de enzimas: 1) las endoglucanasas (EGs), que hidrolizan azarosamente en regiones amorfas de la celulosa, 2) las exoglucanasas o celobiohidrolasas (CBHs), que actúan sobre las cadenas de celulosa liberando glucosa o celobiosa, ésta última de los extremos no reductores de la cadena y de las celodextrinas (Uhlig, 1998), y 3) las β -glucosidasas, que hidrolizan la celobiosa y las celodextrinas (fragmentos de celulosa de tres a seis residuos de glucosa) para liberar dos moléculas de glucosa. A continuación, se detalla el modo de acción de los tres tipos de enzimas:

- Endoglucanasas (endo- β -(1-4)-glucanasas) (EGs). Cortan azarosamente enlaces glucosídicos β -1,4 internos de la celulosa atacando regiones amorfas accesibles, generando oligosacáridos de varias longitudes y una disminución en el largo de la cadena de celulosa, así como un ligero aumento de azúcares reductores. Son las primeras enzimas que actúan sobre la celulosa produciendo nuevos extremos reactivos para el siguiente paso, la acción de la celobiohidrolasa (Uhlig, 1998; Ballesteros, 2010; Gupta y Verma, 2015). No actúan de forma significativa sobre las regiones cristalinas (Lynd, Weimer, van-Zyl y Pretorius, 2002).
- Exoglucanasas o celobiohidrolasas (CBHs). Representan del 40-70% del componente total del sistema celulasa siendo capaces de hidrolizar celulosa cristalina. Actúan tanto en el extremo reductor como en el no reductor de la celulosa y celodextrinas liberando celobiosa como producto principal. Este paso crucial debido a que la celobiosa en alta concentración inhibe la acción de la exoglucanasa (celobiohidrolasa) (Uhlig, 1998; Gupta y Verma, 2015).

- β -glucosidasa. Esta enzima hidroliza la celobiosa y otras celodextrinas para producir glucosa. A veces se emplea para reducir la inhibición por producto final en condiciones donde se acumula celobiosa (Ballesteros, 2010; Gupta y Verma, 2015).

En la Figura 18 se muestra un esquema donde se resume el mecanismo de acción del complejo Celulasa.

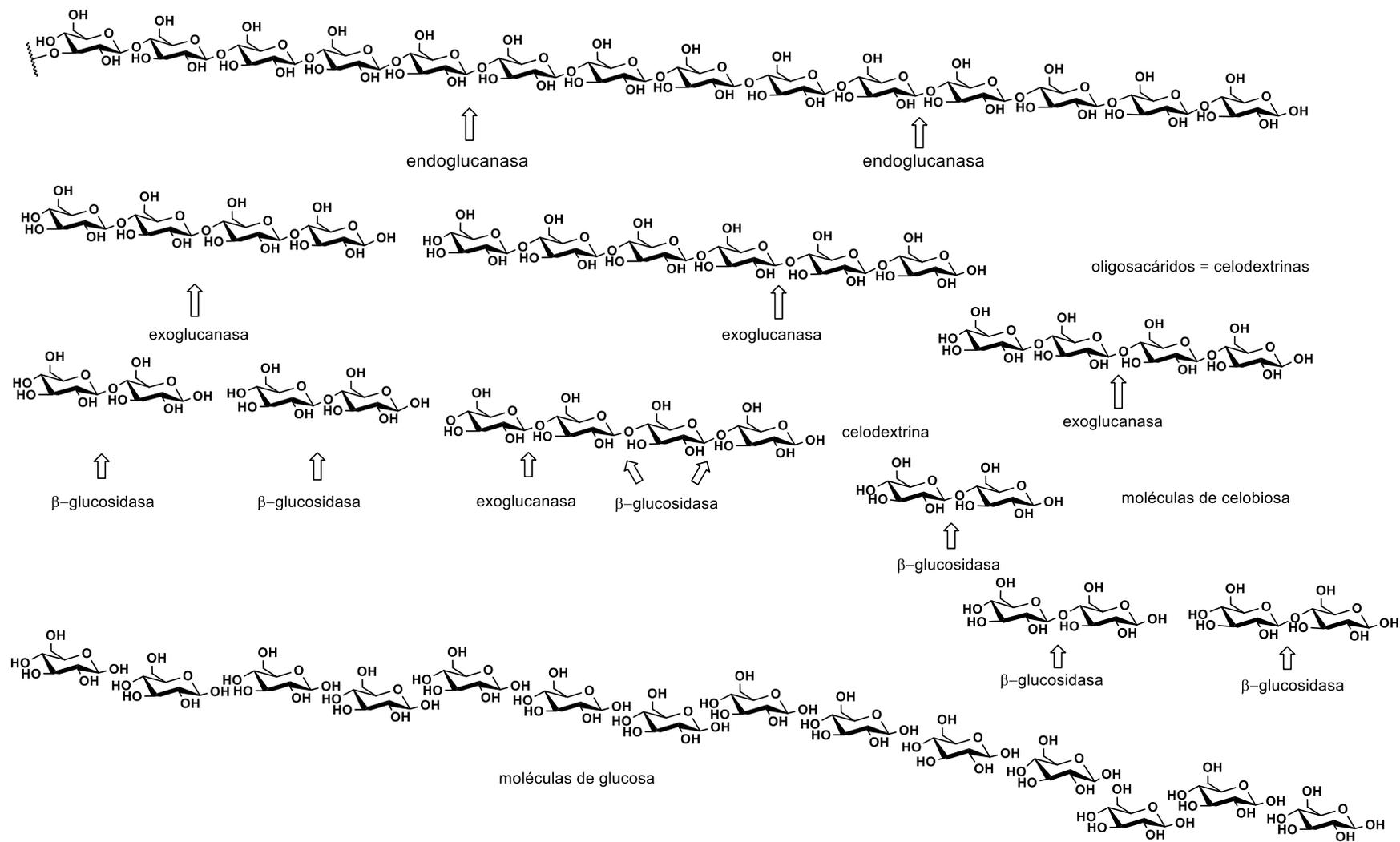


Figura 18. Representación de la hidrólisis de celulosa.

2.7.3. Fermentación

La producción de etanol derivado de almidón ha sido comercialmente dominada por la levadura *S. cerevisiae*. Sin embargo, los azúcares derivados de la biomasa son una mezcla de hexosas, principalmente glucosa, y de pentosas, mayoritariamente xilosa. Debido a que la producción de bioetanol a partir de materiales lignocelulósicos requiere que tanto las hexosas como las pentosas sean fermentadas y ya que, la mayoría de las cepas de *S. cerevisiae* no metabolizan la xilosa, las investigaciones han tomado dos enfoques para aumentar los rendimientos de la etapa de fermentación.

El primer enfoque ha sido modificar los genes de algunas levaduras por ingeniería genética, de modo que puedan también fermentar pentosas; el segundo, mejorar los rendimientos de etanol mediante la ingeniería genética de microorganismos que tienen la capacidad de fermentar tanto hexosas como pentosas. Sin embargo, aún no se han alcanzado los rendimientos para hacerlo comercialmente viable. Además, a diferencia de los hidrolizados derivados de almidón y sacarosa, los hidrolizados derivados de la biomasa suelen tener inhibidores de la fermentación, como ácido acético y furfural, que deben ser removidos cuando las concentraciones son altas (Gray, Zhao y Emptage, 2006; Sigoillot y Faulds, 2016).

3. Justificación y objetivos

Los biocombustibles de segunda generación se obtienen a partir de materias primas que no tienen usos alimentarios, biomasa lignocelulósica como residuos agrícolas o procedentes de la madera, hojas y pastos (Honty et al., 2009; Faba et al., 2014).

La madera se encuentra entre las materias lignocelulósicas con mayor disponibilidad en el mundo y en los últimos años los principales países productores de madera han centrado su interés en la búsqueda de alternativas para la gestión y la utilización de los residuos derivados de las actividades forestales (Gómez, Ríos y Peña, 2012).

A diferencia de la mayor parte de las otras industrias, la industria maderera tiene la ventaja de poder utilizar sus residuos para contribuir a cubrir sus necesidades energéticas. Sin embargo, para poder aprovechar de manera eficaz los residuos es necesario estudiar los factores que pueden influir en la viabilidad económica, tales como la disponibilidad y fiabilidad de los suministros de residuos, el costo de capital del equipo necesario para tratar los residuos, entre otros. Sólo realizando un estudio profesional de estos elementos es como podría diseñarse un sistema eficaz de manipulación y tratamiento de residuos (FAO, 1991).

Como resultado del incremento en la demanda de productos forestales y estrategias de protección de los bosques naturales, la superficie de plantaciones forestales comerciales (PFC) en el mundo va en aumento. Desde hace varios años existe en México un esfuerzo empresarial para plantar maderas finas como teca, cedro y caoba. El gobierno mexicano ha apoyado el establecimiento de más de 20,000 hectáreas de PFC (Asociación de Investigación de las Industrias de la Madera [AITIM], 2003; Balám, Gómez, Vargas, Aldrete y Obrador, 2015). En el periodo del 2001 al 2017, con apoyos de la Conafor, se han establecido 29,302 hectáreas de PFC, de las cuales la teca ocupa el tercer lugar en importancia por superficie establecida (Espino Ortega y Montiel Aguirre, 2019).

La teca es una especie importante por el alto precio que alcanza su madera; la rapidez de su crecimiento es más rápida que la del cedro y la caoba y tiene una gran resistencia a plagas (Asociación de Investigación de las Industrias de la Madera [AITIM], 2003; Camacho-Linton, Ramírez-Maldonado, De los Santos-Posadas, y Zamudio-Sánchez, 2013).

Aproximadamente del 45 al 55 por ciento de las trozas que entran en un aserradero o fábrica de contrachapados se convertirá en residuos. Todos estos residuos de la madera y su corteza tienen valor como combustible, por lo que sería incongruente no aprovecharlos (FAO, 1991). Por ello, los residuos de *Tectona grandis* potencialmente pueden considerarse como una materia prima para la producción de biocombustibles.

3.1 Objetivos

Objetivo general

- Establecer condiciones de hidrólisis enzimática de madera de teca (*Tectona grandis L. f.*), previamente tratada en un sistema fase gas líquido, para obtener la máxima conversión de celulosa a glucosa, para su posterior conversión a bioetanol mediante fermentación.

Objetivos particulares

- Evaluar la actividad hidrolítica de tres diferentes sistemas enzimáticos comerciales para conocer su efectividad en el proceso de sacarificación de la madera de teca.
- Evaluar el efecto de la concentración de enzima sobre el rendimiento de carbohidratos reductores.
- Evaluar el efecto del tiempo del proceso de hidrolisis enzimática de madera de teca sobre el rendimiento de carbohidratos reductores.

4. Metodología

La metodología consistió en cinco etapas: 1) caracterización de las muestras pre-tratadas, 2) cuantificación de la proteína soluble de los sistemas enzimáticos, 3) evaluación de la actividad enzimática, 4) optimización de la hidrólisis, que comprendió el estudio del efecto de la concentración enzimática y del tiempo de hidrólisis sobre los rendimientos, y 5) la cuantificación de carbohidratos. La identificación y cuantificación de carbohidratos específicos se realizó mediante Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (HPLC, por sus siglas en inglés). Todas las determinaciones se realizaron al menos por duplicado, comenzando por la gravimetría de las muestras pre-tratadas.

4.1 Caracterización de las muestras pre-tratadas

La madera de teca fue molida y se sometió a un pre-tratamiento en un reactor a presión en un sistema gas-líquido, desarrollado en la Facultad de Química (Patente en trámite), utilizado para deconstruir la lignina y perturbar la estructura cristalina de la celulosa (Alvira *et al.*, 2010). A las muestras obtenidas se les realizó la determinación de carbohidratos reductores por el método del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) (Ghose, 1987), que se basa en la reducción de uno de los grupos φ -NO₂ del DNS (reactivo de color amarillo) por el grupo aldehído de los azúcares reductores, con la consecuente formación de un producto de color rojo ladrillo en solución alcalina, el ácido 3-amino-5-nitrosalicílico, cuya producción se puede detectar espectrofotométricamente a λ 540 nm (Vázquez-Bolaños, 2012; Iturbe y Sandoval, 2013). Para realizar dicha determinación, se registró el peso de la muestra y se preparó una suspensión acuosa de volumen conocido, la cual se centrifugó a 6000 rpm por 15 min. El sobrenadante se diluyó a una concentración comprendida entre \approx 0.2-2 mg/mL para, posteriormente, realizar la reacción de acuerdo con lo descrito por Iturbe y Sandoval (2013) y conocer la concentración de reductores mediante el método de la curva patrón del carbohidrato mayormente esperado, en este caso la glucosa. La absorbancia se midió en un espectrofotómetro Perkin Elmer UV/VIS Lambda 3B.

Considerando la coloración parduzca de las muestras pre-tratadas, además de la medición de un blanco de muestra, se midió la absorbancia de un blanco de DNS, de tal modo que la absorbancia debida a la presencia de carbohidratos reductores se calculó como sigue: $Abs\ 540\ nm = Abs\ blanco\ muestra - Abs\ blanco\ DNS$.

4.2 Cuantificación de la proteína soluble de los sistemas enzimáticos

En total, se probaron tres sistemas enzimáticos comerciales para la hidrólisis de la madera pre-tratada de teca, cuyos datos se indican en la Tabla 8.

Tabla 8. Datos de los sistemas enzimáticos comerciales empleados.

| Sistema enzimático comercial |
|--|
| Celluzyme XB y Zymafilt L-300 (líquido, proporción 1.5:0.5) marca Enmex |
| Cellulase 500 XP (polvo) marca Enziquim |
| Cellulase 50 XL (líquido) marca Enziquim |

Para establecer las cantidades de cada sistema enzimático que se emplearía en las hidrólisis, se cuantificó la concentración de proteína soluble, partiendo del supuesto de que proteína soluble y concentración enzimática presentes en dichas formulaciones son equivalentes. Para tal propósito, se empleó el método de Lowry, que se fundamenta en la formación de un complejo colorido estable entre proteínas y Cu(II) en medio básico con la reducción del reactivo de Folin-Ciocalteu (mezcla de fosfomolibdato $[PMo_{12}O_{40}^{3-}]$ y fosfotungstato $[O_{40}PW_{12}^{3-}]$) por la oxidación de tirosina, triptófano, cisteína y cistina de las cadenas polipeptídicas (Sánchez-Nieto, 2012; Iturbe y Sandoval, 2013). Cabe mencionar que el principal constituyente del reactivo de Folin-Ciocalteu es el ácido fosfomolibdotúngstico, de color amarillo, que al ser reducido por los grupos fenólicos de los residuos de tirosina da lugar a un complejo de color azul intenso, el cual se puede medir espectrofotométricamente a $\lambda = 750\ nm$ (Lowry, Rosebrough, Farr y Randall, 1951).

Para cada sistema enzimático se preparó una solución de 1 mg/mL, a la que se agregaron 3 mL del reactivo denominado C (50 mL de reactivo A + 2 mL de reactivo B). El reactivo A consiste en una solución de Na₂CO₃ al 2% y tartrato de sodio al 0.02%, que se afora con NaOH 1 M; el reactivo B es una solución al 0.5% de Na₂SO₄•5H₂O. Después de 10 min de reposo, se adicionaron 0.3 mL del reactivo de Folin- Ciocalteu previamente diluido (una parte de dicho reactivo + una parte de agua destilada) a la mezcla de reacción, la cual se homogeneizó con vórtex.

La nueva mezcla de reacción se dejó reposar a temperatura ambiente durante 30 min para después medir la absorbancia. Igualmente, se midió la absorbancia de un blanco preparado mediante el mismo protocolo. La absorbancia se calculó como sigue: $Abs\ 750\ nm = Abs\ muestra - Abs\ blanco$, y la concentración de proteína se calculó a partir de una curva patrón preparada con albúmina bovina sérica en concentraciones de 10-100 µg/mL tratadas de la forma descrita. La Tabla 9 muestra los resultados de la determinación de proteína soluble para cada sistema enzimático:

Tabla 9. Concentración de proteína soluble en los sistemas enzimáticos comerciales.

| Sistema enzimático comercial | % de proteína soluble (m/m o m/v) y su equivalencia (mg/g o mL) |
|---|--|
| Celluzyme XB y Zymafilt L-300 (líquido, proporción 1.5:0.5) marca Enmex | 18% (90 mg/mL) |
| Cellulase 500 XP (polvo) marca Enziquim | 46% (90 mg/0.2 g) |
| Cellulase 50 XL (líquido) marca Enziquim | 29% (90 mg/mL) |

4.3 Evaluación de la actividad enzimática hidrolítica

Se evaluaron distintas concentraciones de los tres diferentes sistemas enzimáticos comerciales mediante el ensayo de papel filtro descrito por Eveleigh *et al.* (2009). La composición y actividad hidrolasa especificada en la etiqueta de cada sistema se indica en la Tabla 10.

Tabla 10. Actividad hidrolítica de los sistemas enzimáticos empleados.

| Nombre comercial | Actividad de la mezcla |
|---|--|
| Celluzyme XB y Zymafilt L-300 (líquido, proporción 1.5:0.5) marca Enmex | Celulasa, xilanasa y β -glucanasa |
| Cellulase 500 XP (polvo) marca Enziquim | Endo- y exo-celulasa, β -glucanasa, β -glucosidasa |
| Cellulase 50 XL (líquido) marca Enziquim | Endo- y exo-celulasa, β -glucanasa, β -glucosidasa |

Para cada evaluación de la actividad enzimática hidrolítica, se pesaron 50 mg de papel filtro Whatman No. 1. En el caso de los sistemas enzimáticos líquidos, se agregaron 0.5 mL de la formulación y 0.5 mL de una solución amortiguadora de citrato de sodio 0.05 M (pH=4.8) al papel filtro previamente troceado, incubándose por 1 h a 50°C sin agitación. La actividad enzimática, calculada como azúcares reductores mediante el método de DNS, se expresó como unidades de papel filtro (PFU). Esta medición se obtuvo al multiplicar los mg de azúcares reductores/mL por la constante 0.185 UI/mL que corresponde a las unidades internacionales de enzima/mL equivalentes a la concentración enzimática μ M que libera 1 mg de glucosa/ mL•min (μ mol/mL•min) (Jaen, Alvarez, Angulo y Moreno, 1986; Bath y Maheshwari, 1987; Eveleigh *et al.*, 2009).

En el caso de la enzima en polvo, no se preparó suspensión, sino que se agregaron 0.2 g de sólido enzimático, equivalentes a 90 mg de proteína soluble (Tabla 9), a un medio de reacción conformado por 0.5 mL de la solución amortiguadora mencionada, 0.5 mL de agua destilada y 50 mg de papel filtro Whatman No. 1.

4.4 Hidrólisis enzimática

La hidrólisis enzimática de las muestras de teca se llevó a cabo en un baño de agua con agitación *Boekel Scientific Large Shaking Water Bath*, 290400, 28 Liter Laboratory Shaking Water Bath (115V/230V), empleando una temperatura del agua de $50\pm 1^{\circ}\text{C}$ y agitación constante de 100 rpm. El pH se ajustó a 4.5-5.0 -dependiendo del sistema enzimático- con NaOH 1 M antes de comenzar la hidrólisis y se reajustó repetidamente durante la misma hasta concluir el proceso.

Las condiciones de preparación de los sistemas enzimáticos fueron las siguientes:

1. La mezcla enzimática Celluzyme XB y Zymafilt L-300 marca Enmex se preparó antes de agregarla al sustrato.
2. Para el sistema Cellulase 500 XP en polvo, primero se pesó la cantidad correspondiente a 0.5, 1.0, 100, 200 y 300 mg enzima/g de biomasa (Tabla 11), y en el mismo recipiente se pesó la cantidad de biomasa a hidrolizar.
3. La Cellulase 50 XL líquida se agregó directamente al medio de reacción.

El sistema enzimático que se seleccionó para hidrolizar las muestras pre-tratadas fue la enzima Cellulase 500 XP en polvo, misma que se deriva de una cepa no genéticamente modificada del hongo *Trichoderma reesei* (Jaen *et al.*, 1986), puesto que, de acuerdo con la prueba del papel filtro, presentó el mayor número de PFU (ver Tabla 12, en Resultados). A ese respecto, se modificaron dos parámetros del proceso para conocer sus efectos sobre el rendimiento de carbohidratos reductores: la concentración de la enzima y el tiempo de hidrólisis, como se describe a continuación (4.4.1 y 4.4.2).

En el caso del sistema Cellulase 500 XP en polvo, se observaron problemas de dispersión del sólido. Por esta razón, se preparó una suspensión dejando hidratar el polvo (10.87 g polvo) durante 12 h con 20 mL de agua destilada sin agitación. Posteriormente, se añadió la muestra problema a esta suspensión de enzima y se acondicionó como los demás sistemas.

4.4.1 Efecto de la concentración de enzima

Se utilizaron diferentes concentraciones para los tres sistemas enzimáticos con el fin de conocer su efecto sobre el rendimiento de carbohidratos reductores, como se muestra en la Tabla 11.

Tabla 11. Concentraciones de enzima empleadas en el proceso hidrolítico de la madera de teca.

| Sistema enzimático comercial | Concentración de enzima (mg/g de biomasa) |
|---|--|
| Celluzyme XB y Zymafilt L-300 (líquido, proporción 1.5:0.5) marca Enmex | 100, 300, 400, 600, 800 |
| Cellulase 500 XP (polvo) marca Enziquim | 0.5, 1.0, 100, 200, 300 |
| Cellulase 50 XL (líquido) marca Enziquim | 50, 100 |

4.4.2 Efecto del tiempo de hidrólisis

Se realizó una cinética de hidrólisis enzimática que comprendió tiempos entre 12, 36, 48, 72, 96 y 110 h tomando en cuenta las condiciones óptimas de estabilidad de cada sistema enzimático en cuanto a temperatura y pH; la finalidad fue conocer el tiempo de hidrólisis que producía el mayor rendimiento de carbohidratos reductores.

4.5 Cuantificación de carbohidratos

La concentración de azúcares reductores se midió mediante el método de DNS, de acuerdo con las etapas descritas en la sección 4.1, mientras que aquella de carbohidratos como glucosa y xilosa se determinó mediante HPLC. Las condiciones de preparación de muestra y análisis cromatográfico fueron las siguientes:

- Preparación de las muestras: Se pesó una fracción de material lignocelulósico de teca pre-tratada con la que se preparó una suspensión con agua destilada. Dicha suspensión se trasladó a un tubo Falcon® para su centrifugación a 6000 rpm por 15 min; posteriormente, se tomó 1 mL del sobrenadante que, a su vez, se centrifugó en tubos Eppendorf por 7 min a 11,000 rpm. A la porción acuosa resultante se agregaron aproximadamente 30 mg de ácido 5-sulfosalicílico para precipitar el material proteínico, el cual fue decantado. Nuevamente, se centrifugó a la misma velocidad, repitiéndose el proceso hasta que no hubiese precipitado

alguno después de agregar ácido 5-sulfosalicílico. La solución coloidal obtenida fue pasada a través de un acrodisco de 0.45 micras y 25 mm de diámetro. Finalmente, se tomó 1 mL de la solución filtrada para realizar una extracción en fase sólida empleando cartuchos Oasis WCX 1cc Cartridge con 30 mg de adsorbente, 30 μm de tamaño de partícula, Sep-PAK marca Waters, los cuales se acondicionan previamente con 1 mL de acetonitrilo ($\text{CH}_3\text{-C}\equiv\text{N}$) grado HPLC (J. T. Baker) y, subsiguientemente, con 1 mL de agua destilada. La extracción de los componentes solubles se efectuó con ayuda de un equipo Extraction Manifold, 20 pos, 13x75 mm tubes [WAT200606]. Por último, se realizaron diluciones 0.5/10 mL, las cuales se analizaron mediante el equipo de HPLC.

- Condiciones cromatográficas: se utilizó un Equipo AZURA® Analytical HPLC marca Knauer, con detector de índice de refracción (IR) en conexión con un horno de la misma marca. La fase estacionaria fue una columna Aminex HPX-87P 300 x 7.8 mm, 9 μm ; la separación de glucosa y xilosa se llevó a cabo a 85°C con un flujo de 0.6 mL/min utilizando agua desionizada como fase móvil y un volumen de inyección de 5 μL , como se indica en la ficha técnica del fabricante. Como estándar interno se empleó D-galactosa, un isómero de glucosa, obteniendo 99.9% de “recobro”.

5. Resultados y discusión

5.1 Evaluación de la actividad enzimática

Se evaluaron tres diferentes enzimas comerciales mediante el ensayo de papel filtro (Eveleigh *et al.*, 2009). Los resultados se muestran en la Tabla 12, donde se puede observar que el sistema enzimático con mayor actividad es la Cellulase 500 XP (24.01 PFU). En estos sistemas, las enzimas actúan de manera sinérgica en una hidrólisis eficiente. Al respecto, se han descrito cuatro tipos de sinergia, uno de ellos entre exoglucanasas y β -glucosidasas, es decir, entre exo- y endoglucanasas, que, de modo respectivo, producen celodextrinas y celobiosa (Gutiérrez-Rojas, Moreno-Sarmiento y Montoya, 2015). Aunque la xilanasas presente en la mezcla enzimática marca Enmex interviene en la hidrólisis, la actividad de la β -glucosidasa es de mayor importancia, pues esta última enzima, además de actuar de manera sinérgica con las exoglucanasas, es responsable de hidrolizar las celodextrinas y la celobiosa a glucosa (Figura 18), carbohidrato con mayor poder reductor que los oligosacáridos. Lo anterior se refleja en los valores de actividad enzimática de la Tabla 12, donde se observa que la mezcla Enmex tiene una actividad menor que los dos sistemas Cellulase. En el caso del sistema Enmex, los datos sugieren la presencia de oligosacáridos sin hidrolizar, por lo que se puede mencionar que las β -glucosidasas son indispensables en el sistema enzimático para obtener un mayor rendimiento de celodextrinas, y para la transformación de celobiosa a glucosa.

Tabla 12. Actividad enzimática (PFU) de los tres sistemas enzimáticos evaluados.

| Nombre comercial | Actividad de la mezcla | Unidades de papel filtro (PFU) |
|---|--|--------------------------------|
| Celluzyme XB y Zymafilt L-300 (líquido, proporción 1.5:0.5) Enmex | Celulasa, xilanasas y β -glucanasa | 2.78 |
| Cellulase 500 XP (polvo) Marca Enziquim | Endo- y exo-celulasa, β -glucanasa, β -glucosidasa | 24.01 |
| Cellulase 50 XL (líquido) Marca Enziquim | Endo- y exo-celulasa, β -glucanasa, β -glucosidasa | 3.02 |

5.2 Efecto de la concentración de enzima en el rendimiento de reductores

5.2.1 Ensayo con enzima Celluzyme XB y Zymafilt L-300 marca Enmex

Zulueta (2016) concluyó rendimientos de 51.6% de carbohidratos reductores para bagazo de agave pre-tratado con ácido diluido utilizando la mezcla enzimática Celluzyme XB y Zymafilt L-300 Enmex en proporción 1.5:0.5, por lo que, para la presente investigación con madera de teca se decidió probar este mismo sistema. No obstante, el nuevo sustrato fue sometido a un pretratamiento diferente al del ácido diluido (sección 4.1). Para la madera de teca, la hidrólisis se realizó a pH 4.5 por 24 h empleando 100 mg enzima/g biomasa, equivalente a 3.09 PFU. Con estas condiciones, se obtuvo un rendimiento de 7.92% de reductores, un valor inferior al reportado para el agave (Zulueta, 2016). Considerando que el bagazo de agave es un sustrato menos resistente a la degradación enzimática, a diferencia de la teca, que es una madera dura, sí se esperaban diferencias, en particular, una mayor conversión de celulosa a carbohidratos reductores en el caso del bagazo. Esto último, debido a que el sistema Celluzyme XB y Zymafilt L-300 Enmex 1.5:0.5 con actividad de celulasa, hemicelulasa y β -glucanasa tiene el potencial para hidrolizar el material lignocelulósico.

Por otro lado, Navarrete (2002) menciona que cuando hay una elevada concentración de enzima, el proceso de hidrólisis de celulosa se lleva a cabo más rápidamente. Por esa razón, se procedió a aumentar la concentración del sistema enzimático mencionado, a fin de saber si el porcentaje de carbohidratos reductores se incrementaba sin necesidad de extender el tiempo de hidrólisis. Para ello, se probaron 300, 400, 600 y 800 mg enzima/g biomasa, cuyas equivalencias en PFU se muestran en la Tabla 13 y los resultados en la Figura 19.

Tabla 13. Equivalencia de mg enzima/g biomasa en PFU

| mg enzima/g biomasa | PFU |
|----------------------------|------------|
| 300 | 9.28 |
| 400 | 12.37 |
| 600 | 18.56 |
| 800 | 24.74 |

Como se puede observar en la Figura 19, cuando se empleó una concentración de 300 mg enzima/g biomasa, se obtuvo el mayor rendimiento de azúcares reductores (8.86%), y cuando se emplearon 100 mg enzima/g biomasa, se obtuvo una concentración aritmética menor (7.92%). Para saber si existía diferencia significativa entre ambas concentraciones, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de un solo factor con un nivel de significancia de $\alpha = 0.05$. Los resultados se muestran en la Tabla 14, donde se observa que el valor crítico de F es mayor que el valor F calculado, por lo que se puede afirmar que no existe una diferencia estadísticamente significativa ($\alpha = 0.05$) respecto a la producción de carbohidratos reductores cuando se compara el uso de las concentraciones de 300 y 100 mg de enzima/g de biomasa.

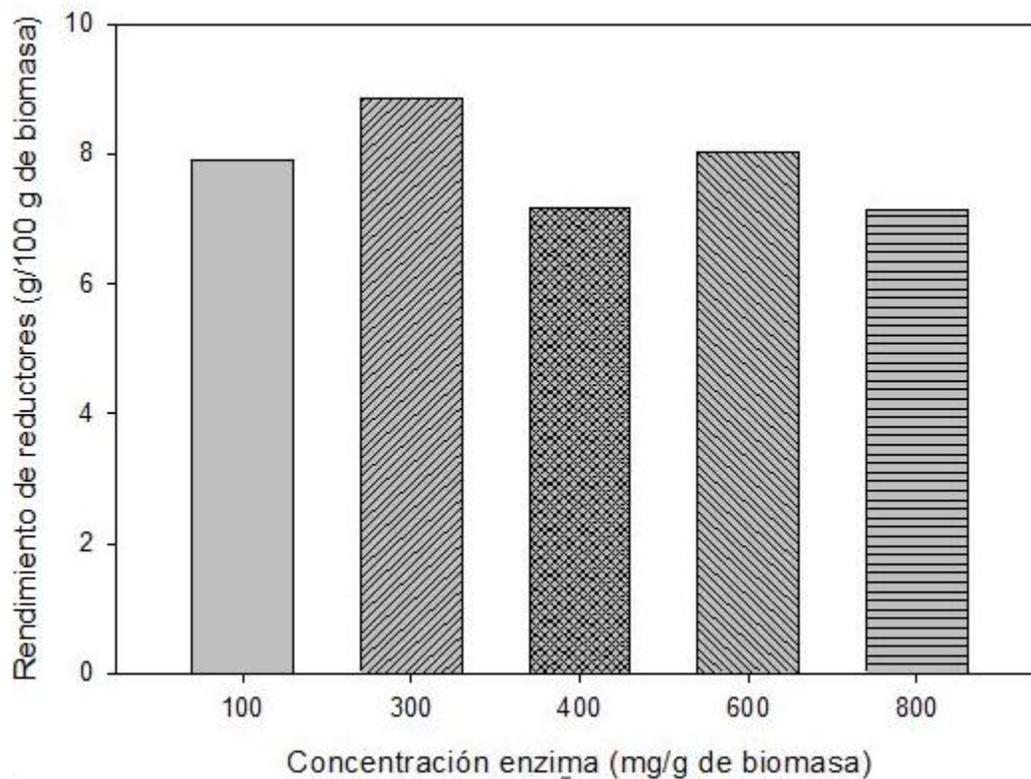


Figura 189. Efecto de la concentración de enzima en el rendimiento de azúcares reductores; mezcla enzimática Enmex, proporción 1.5:0.5, 24 h de hidrólisis.

Tabla 144. ANOVA de un factor para 300 y 100 mg enzima/g biomasa de mezcla Enmex.

| ANÁLISIS DE VARIANZA | | | | | | |
|---------------------------|-------------------|--------------------|---------------------------|-----------------|--------------|-------------------|
| Origen de las variaciones | Suma de cuadrados | Grados de libertad | Promedio de los cuadrados | $F_{calculada}$ | Probabilidad | Valor crítico F |
| Entre grupos | 2.33 | 1 | 2.33 | 1.39 | 0.36 | 18.51 |
| Dentro de los grupos | 3.35 | 2 | 1.67 | | | |
| Total | 5.67 | 3 | | | | |

Respecto a las demás concentraciones de enzima, cuando se emplearon 800 mg de enzima/g de biomasa, no se obtuvo el mayor rendimiento de carbohidratos reductores (Figura 19), por el contrario, fue menor en comparación con el sistema de 300 mg de enzima/g de biomasa, y prácticamente igual al obtenido para una concentración de 400 mg de enzima/g de biomasa. Por su parte, la concentración de 600 mg enzima/g biomasa produjo el mayor rendimiento de reductores, sólo después de aquella de 300 mg enzima/g biomasa. Para saber si existía diferencia significativa entre estas dos concentraciones (300 y 600 mg enzima/g biomasa), se realizó un ANOVA de un solo factor con un nivel de significancia de $\alpha= 0.05$. Los resultados se muestran en la Tabla 15, donde se observa que el valor crítico de F es mayor que el valor F calculado, por lo que se puede afirmar que no existe una diferencia estadísticamente significativa ($\alpha= 0.05$) respecto a la producción de carbohidratos reductores cuando se compara el uso de las concentraciones de 300 y 600 mg de enzima/g biomasa.

Tabla 155. ANOVA de un factor para 300 y 600 mg enzima/g biomasa de mezcla enzimática Enmex.

| ANÁLISIS DE VARIANZA | | | | | | |
|---------------------------|-------------------|--------------------|---------------------------|---------------|--------------|-------------------|
| Origen de las variaciones | Suma de cuadrados | Grados de libertad | Promedio de los cuadrados | F calculada | Probabilidad | Valor crítico F |
| Entre grupos | 0.6889 | 1 | 0.6889 | 1.00 | 0.42 | 18.51 |
| Dentro de los grupos | 1.378 | 2 | 0.689 | | | |
| Total | 2.0669 | 3 | | | | |

En resumen, el hecho de que no haya habido un aumento en el rendimiento de azúcares reductores al aumentar la concentración de enzima a más de 300 mg/g de biomasa es un comportamiento que podría justificarse con la saturación de la superficie de reacción de la enzima (Navarrete, 2002).

Por otro lado, para saber si se podía obtener un mayor rendimiento de reductores, se probaron otros sistemas enzimáticos: una mezcla de endo- y exo-celulasas, β -glucanasa y β -glucosidasa, la cual se comercializa en dos presentaciones que, según el fabricante, tienen la misma actividad, con la única diferencia de que una es líquida (Cellulase 50 XL) y la otra es un polvo (Cellulase 500 XP). Ambos sistemas se probaron para evaluar si había diferencia en la actividad hidrolítica sobre el sustrato lignocelulósico y en el rendimiento de reductores.

5.2.2 Ensayo con enzima Cellulase 50 XL (líquido) marca Enziquim

Se evaluaron las concentraciones sugeridas en la ficha técnica del producto Cellulase 50 XL (líquido) Enziquim: 50 y 100 mg enzima/g biomasa, equivalentes, de modo respectivo, a 1.68 y 3.36 PFU. En la Tabla 16, se muestra el rendimiento de reductores después de 24 h de hidrólisis a pH 5.0 (valor óptimo, según el fabricante), para el sistema Cellulase 50 XL (líquida) y el de Cellulase 500 XP (polvo).

Tabla 16. Efecto de la concentración de enzima Cellulase 50 XL en el rendimiento de reductores, 24 h de hidrólisis.

| Concentración de enzima (mg/g biomasa) | Rendimiento de azúcares reductores (g/100 g biomasa) |
|---|---|
| 50 | 10.38 |
| 100 | 10.29 |

Para saber si existía diferencia significativa entre estas dos concentraciones (50 y 100 mg enzima/g biomasa), se realizó un ANOVA de un solo factor con un nivel de significancia de $\alpha = 0.05$. Los resultados se muestran en la Tabla 17, donde se puede observar que para la enzima líquida Cellulase 50 XL no hay diferencia significativa ($\alpha = 0.05$) en el rendimiento de carbohidratos reductores cuando se comparan las concentraciones 50 y 100 mg enzima/g biomasa ya que, el valor crítico de F es mayor que el valor F calculado. Al mismo tiempo, con la presentación líquida de la enzima se observó el mismo inconveniente que con la enzima en polvo: para aumentar la concentración de enzima es necesario agregar un volumen muy grande de ésta, lo que resultaría muy costoso.

Tabla 16. ANOVA de un factor para 50 y 100 mg enzima/g biomasa de Cellulase 50 XL

| ANÁLISIS DE VARIANZA | | | | | | |
|---------------------------|-------------------|--------------------|---------------------------|-------------|--------------|-----------------|
| Origen de las variaciones | Suma de cuadrados | Grados de libertad | Promedio de los cuadrados | F calculada | Probabilidad | Valor crítico F |
| Entre grupos | 0.00903 | 1 | 0.009025 | 0.0871 | 0.796 | 18.51 |
| Dentro de los grupos | 0.207 | 2 | 0.104 | | | |
| Total | 0.216 | 3 | | | | |

Por lo anterior, se evaluó la actividad hidrolítica de ambos sistemas enzimáticos para identificar el más eficiente en cuanto a la fragmentación del material lignocelulósico. Dicha actividad se midió por el método del papel filtro conforme a la descripción de Mandels, Andreotti y Roche (1976), y de Jaen *et al.* (1986), empleando las condiciones mencionadas en la sección 4.2: pH=4.8, amortiguador de citrato de sodio 0.05 M, 50°C, 1 h de reacción. Cabe mencionar que las PFU son una medida de la actividad conjunta de los diferentes tipos de enzima sobre el sustrato, dato coincidente con lo descrito por Zulueta-Santoyo (2016). En la Tabla 18 se muestra la actividad hidrolítica (PFU) de los sistemas enzimáticos Cellulase 50 XL (líquido) y Cellulase 500 XP (polvo).

Tabla 17. Actividad enzimática (PFU) de los dos sistemas enzimáticos de Cellulase.

| Sistemas enzimáticos | Unidades de papel filtro (PFU) |
|---------------------------|--------------------------------|
| Cellulase 50 XL (líquido) | 3.02 |
| Cellulase 500 XP (polvo) | 24.01 |

De las dos presentaciones comerciales de la Tabla 18, la que muestra mayor actividad enzimática es la presentación en polvo, Cellulase 500 XP, porque rindió 24.01 PFU, dato que sugiere que es una opción viable para obtener una conversión eficaz del sustrato a carbohidratos reductores.

De acuerdo con la información dada por el fabricante, tanto la presentación en polvo como la líquida poseen actividad de endo- y exo-celulasas, así como de β -glucanasa y β -glucosidasa, sin embargo, el sistema líquido muestra una actividad enzimática ocho veces menor con respecto al sistema en polvo. Considerando que ambas enzimas fueron evaluadas empleando las mismas condiciones de reacción, la diferencia en actividad puede deberse a su diferente capacidad de adsorción sobre el sustrato en cuestión (Navarrete, 2002; Fockink, Urio, Chiarello, Sánchez, y Pereira-Ramos, 2016), pero, sobre todo, a la actividad intrínseca de cada sistema enzimático.

5.2.3 Ensayo con enzima Cellulase 500 XP (polvo) marca Enziquim

Se probaron las concentraciones sugeridas en la ficha técnica del producto Cellulase 500 XP en polvo Marca Enziquim: 1 y 0.5 mg enzima/g biomasa, equivalentes, de manera respectiva, a 0.27 y 0.13 PFU; Tabla 19.

Tabla 18. Equivalencia de 0.5 y 1 mg enzima en polvo/g biomasa en PFU.

| mg enzima/g biomasa | PFU |
|---------------------|------|
| 0.5 | 0.27 |
| 1.0 | 0.13 |

Debido a la obtención de valores bajos de PFU (Tabla 19), se decidió evaluar el rendimiento de reductores aumentando la concentración a 50 y 100 mg enzima/g biomasa que, como lo muestra la Tabla 20, correspondieron a los valores de PFU de 13.34 y 28.68.

Tabla 19. Equivalencia de 50 y 100 mg enzima en polvo/g biomasa en PFU.

| mg enzima/g biomasa | PFU |
|---------------------|-------|
| 50 | 13.34 |
| 100 | 28.68 |

En la Tabla 21 se resumen los resultados del rendimiento de carbohidratos reductores correspondientes al uso del sistema Cellulase 500 XP en polvo.

Tabla 20. Efecto de la concentración de Cellulase 500 XP (polvo) sobre el rendimiento de reductores.

| Cellulase 500 XP (polvo) | |
|--|--|
| concentración enzima (mg/g de biomasa) | rendimiento de reductores (g/100 g de biomasa) |
| 0.5 | 4.28 |
| 1 | 4.29 |
| 50 | 8.68 |
| 100 | 24.31 |

En la Figura 20 se muestra el rendimiento de reductores después de 24 h de hidrólisis a pH 5.0, valor óptimo para esta forma comercial según la información dada por el fabricante. No obstante, las concentraciones de 1 y 0.5 mg enzima/g de biomasa recomendadas produjeron un bajo rendimiento de reductores, por lo que no se considera una concentración adecuada para la hidrólisis de las muestras.

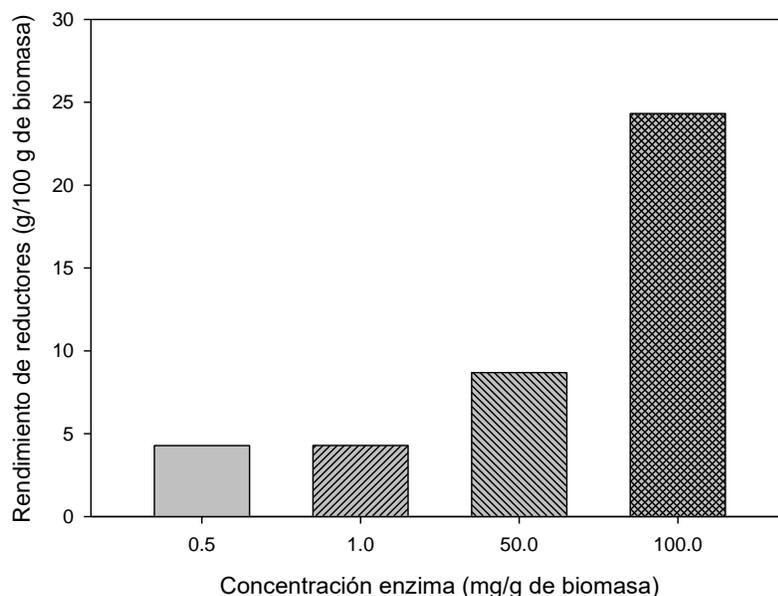


Figura 20. Efecto de la concentración de Cellulase 500 XP (polvo) sobre el rendimiento de reductores; 24 h hidrólisis.

Según la Figura 20, el rendimiento de reductores aumenta cuando se usan concentraciones mayores a las recomendadas en la ficha técnica, lo que podría explicarse por la complejidad del sistema teca, que son muestras pre-tratadas con bastante material insoluble, encontrándose tanto celulosa amorfa como microcristalina, y considerando que las especificaciones pueden referirse a muestras celulósicas de menor complejidad. Respecto a la relación 100 mg de enzima/g de biomasa, se obtuvo el mayor porcentaje de reductores, confirmándose una aceleración de la reacción (Ballesteros, 2010; Fockink *et al.*, 2016); sin embargo, se tendría que utilizar una gran cantidad de mezcla enzimática/muestra para obtener 100 mg enzima/g biomasa. En vez de ello, se utilizaron 50 mg enzima/g biomasa dejando la hidrólisis por más tiempo.

5.3 Efecto del tiempo de hidrólisis sobre el rendimiento de carbohidratos reductores empleando Cellulase 500 XP (polvo) marca Enziquim

5.3.1 Análisis cromatográfico: concentración de glucosa y xilosa

Después de conocer el porcentaje de carbohidratos reductores en las muestras pretratadas de teca, se evaluó la conversión de celulosa a glucosa, y de hemicelulosa a xilosa, mediante HPLC. La Figura 21 corresponde al cromatograma de los azúcares reductores glucosa y xilosa provenientes de la hidrólisis enzimática en la que se empleó Cellulase 500 XP en polvo en concentración de 50 mg/g biomasa para una muestra pretratada de madera de teca.

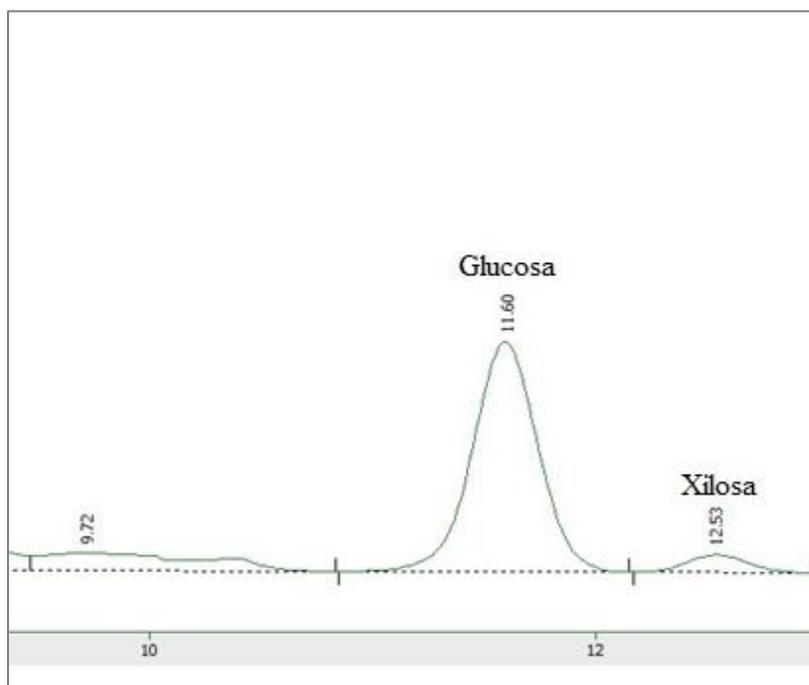


Figura 191. Cromatograma de glucosa y xilosa en muestra hidrolizada de teca.

La Figura 21 muestra el cromatograma de glucosa y xilosa para teca hidrolizada. La separación se llevó a cabo a 85°C con un flujo de 0.6 mL/min utilizando agua desionizada y volumen de inyección de 5 µL. Los picos cromatográficos corresponden a una concentración de 6.35% de glucosa y 0.68% de xilosa. La suma de estas concentraciones no corresponde a la cantidad total de carbohidratos reductores, lo que indica la presencia de otros oligosacáridos con poder reductor.

5.3.2 Efecto del tiempo de hidrólisis sobre el rendimiento de carbohidratos reductores, Cellulase 500 XP (polvo) Enziquim

La cinética de hidrólisis de las muestras pre-tratadas de madera de teca se realizó con la enzima en polvo Cellulase 500 XP en concentración de 50 mg enzima/g de biomasa (equivalente a 13.34 PFU, Tabla 20) a 50°C durante 64 h. Los rendimientos de carbohidratos reductores y, en particular de los azúcares glucosa y xilosa, se muestran en la Tabla 22 y en la gráfica de la Figura 22.

Tabla 21. Rendimiento de reductores, glucosa y xilosa del sistema en polvo Cellulase 500 XP, sin hidratación previa.

| Tiempo hidrólisis (h) | % Reductores (g/100 g de biomasa) | Glucosa (g/100 g de biomasa) | Xilosa (g/100 g de biomasa) |
|------------------------------|--|-------------------------------------|------------------------------------|
| 20 | 10.78 | 5.73 | 0.67 |
| 36 | 8.68 | 9.91 | 1.15 |
| 46 | 10.47 | 6.00 | 0.69 |
| 64 | 8.61 | 5.72 | 0.71 |

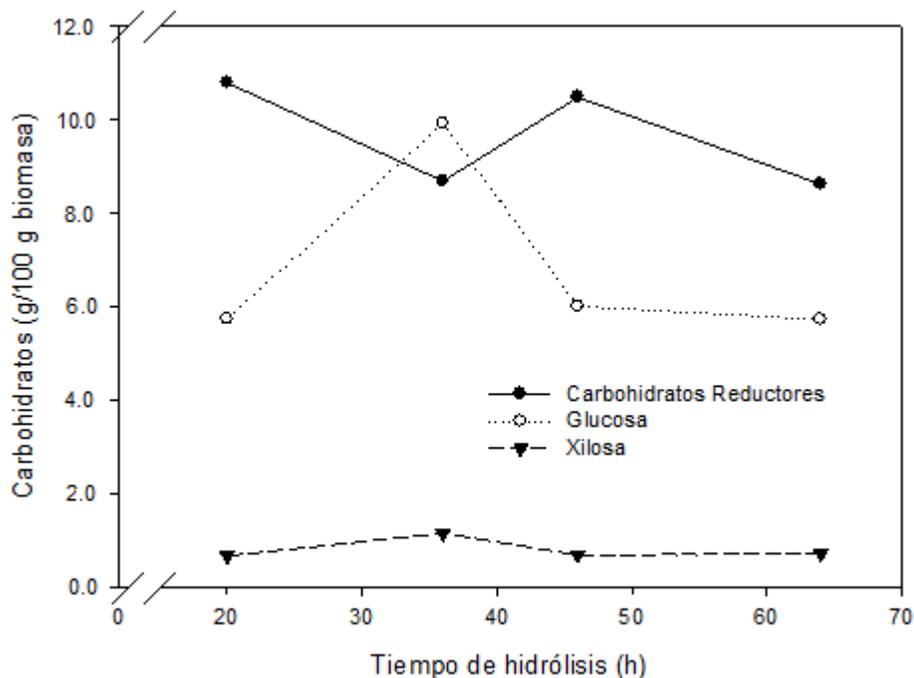


Figura 22. Efecto del tiempo de hidrólisis sobre el rendimiento de carbohidratos reductores empleando 50 mg de Cellulase 500XP/g biomasa sin previa hidratación.

De acuerdo con la Figura 22, a las 46 h de hidrólisis enzimática se alcanzó el mayor rendimiento de reductores, mientras que la mayor conversión de celulosa a glucosa se registró a las 36 h. Asimismo, a partir de 46 h disminuyó progresivamente la concentración de reductores, resultado que puede deberse a factores relacionados con el catalizador, como son la adsorción irreversible enzima-sustrato, la inactivación térmica de la enzima, y la inhibición por productos de reacción. Por otro lado, una progresiva disminución de reductores durante la hidrólisis enzimática puede ser consecuencia de factores relacionados con la complejidad del sustrato, como se mencionó en la sección 5.2.3. En ese contexto, antes de la hidrólisis, la enzima tiene que adsorberse a la materia prima (Mansfield, Mooney y Sandler, 1999), siendo esta etapa determinante en el proceso (Ballesteros, 2010). Con lo anterior, es posible plantear que algunas cadenas y fragmentos de hemicelulosa periféricos a las microfibrillas de celulosa (Figura 9) impidan parcialmente la adsorción de la enzima tanto en muestras pre-tratadas como sin pretratamiento.

Para comprobar que la complejidad del material lignocelulósico era un factor limitante en la hidrólisis, se realizó un experimento paralelo a partir de celulosa pura: se sometió β -celulosa cristalina a las mismas condiciones hidrolíticas y cinéticas empleadas para la madera de teca (50°C, pH 5.0 y agitación constante a 100 rpm y tiempos de 24, 48 y 72 h). Los resultados fueron rendimientos muy altos de reductores y glucosa para el polisacárido puro: de 71.67, 98.83 y 100% para reductores en los respectivos tiempos de 24, 48 y 72 h, y de 53.72, 71.28 y 84.51% para glucosa en los mismos periodos. Estos hallazgos sustentan la afirmación de que algunos compuestos en el medio de reacción limitan la adsorción enzimática. Por ejemplo, durante el pretratamiento de las muestras de teca se utiliza SO₂, un hecho que explica la formación de compuestos como sulfitos, ácido sulfónico y lignosulfonatos. En particular, estos últimos se adsorben a la superficie de la celulosa haciéndola menos accesible a la acción enzimática. Por su parte, los sulfitos pueden reaccionar con puentes disulfuro (Damodaran *et al.*, 2008), en este caso de las enzimas, inactivándolas parcialmente. Del mismo modo, en estas condiciones, esencialmente ácidas, se generan furfurales provenientes de la deshidratación de azúcares, que pueden afectar la actividad enzimática.

5.3.3 Efecto del tiempo de hidrólisis sobre el rendimiento de carbohidratos

reductores, Cellulase 500 XP (polvo) Enziquim previamente hidratada

Para descartar inconvenientes debido a una homogeneización inadecuada del sistema enzimático en polvo, de manera preliminar, se preparó una suspensión con la cantidad necesaria de Cellulase 500 XP para obtener una concentración de 50 mg de enzima/g de biomasa, la cual se dejó hidratar durante un mínimo de 12 horas sin agitación. Posteriormente, se añadió la muestra problema de teca a la suspensión de enzima y se sometió a hidrólisis a pH 5.0 con el ajuste periódico del mismo. En la Tabla 23 y en la gráfica de la Figura 23, se muestran los resultados: el porcentaje de reductores, glucosa y xilosa a tiempos de 24, 48, 96 y 110 h a 50°C.

Tabla 22. Rendimiento de reductores, glucosa y xilosa empleando Cellulase 500 XP (polvo) previamente hidratada.

| Tiempo hidrólisis (h) | Reductores (g/100 g de biomasa) | Glucosa (g/100 g de biomasa) | Xilosa (g/100 g de biomasa) |
|-----------------------|---------------------------------|------------------------------|-----------------------------|
| 24 | 11.01 | 5.06 | 0.62 |
| 48 | 10.30 | 5.60 | 0.64 |
| 96 | 11.09 | 5.39 | 0.30 |
| 110 | 11.40 | 6.35 | 0.68 |

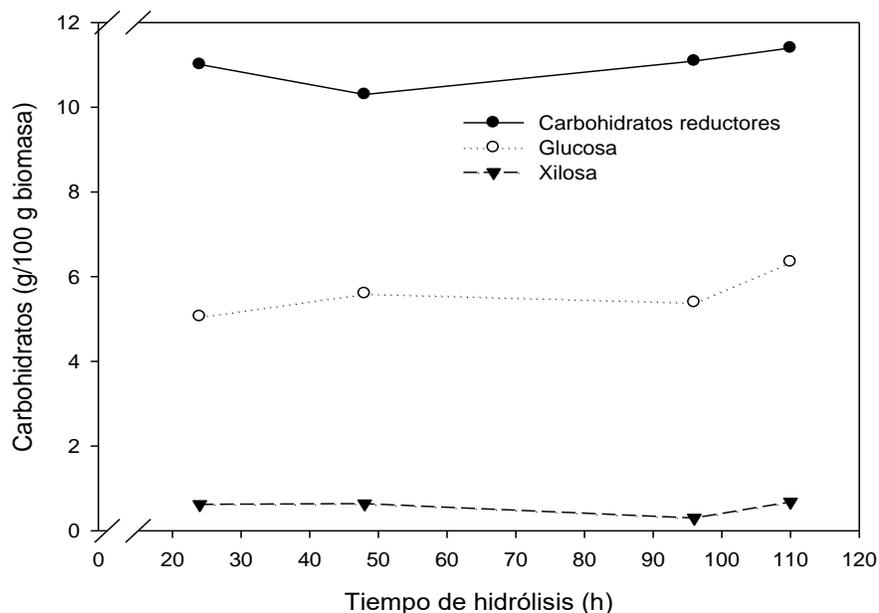


Figura 203. Efecto del tiempo de hidrólisis sobre el rendimiento de carbohidratos reductores, glucosa y xilosa; concentración de enzima: 50 mg/g biomasa; enzima hidratada previamente.

Comparando las Figuras 22 y 23, se observa que, a mayor tiempo de hidrólisis e hidratando previamente el sistema enzimático, el rendimiento de reductores aumenta ligeramente. También, se aprecia una mayor producción de glucosa, especialmente entre los periodos de 20-50 y 95-110 h de hidrólisis. En ese sentido, se puede observar el efecto positivo de la hidratación, ya que, aunque, en realidad, no se alcanza un mayor rendimiento de reductores para 110 h de hidrólisis, sino sólo concentraciones similares a las obtenidas con el sistema enzimático sin hidratar (Tablas 22 y 23), sí se registró mayor homogeneidad en la cinética de reacción.

Cabe mencionar que, aunque es deseable un rendimiento alto de reductores, el objetivo de este proyecto es maximizar la concentración de glucosa, por lo que las mejores condiciones de hidrólisis son aquellas que favorecen una mayor conversión del material lignocelulósico a ese monosacárido, resultado que se alcanza partiendo del sistema enzimático Cellulase 500 XP en polvo, en concentración de 50 mg enzima/g biomasa, con hidratación previa. Adicionalmente, el rendimiento de reductores indica la presencia de una cantidad considerable de compuestos con poder reductor distintos a xilosa y glucosa, por ejemplo, celodextrinas y celobiosa.

Por otro lado, a partir de los datos de las Tablas 22 y 23, se puede decir que no todos los carbohidratos reductores corresponden a glucosa, sino sólo la mitad, pues la suma de glucosa + xilosa no corresponde en ningún tiempo de hidrólisis al número total de reductores, ni para el sistema enzimático sin hidratar ni para el hidratado. También se observa que los reductores disminuyen en el periodo de 0-24 horas, es decir, se van degradando. Este resultado puede deberse, en parte, a que las celodextrinas producidas por la acción de las endo- y exoglucanasas (Figura 18) reaccionan con los grupos amino de las moléculas enzimáticas, observándose un bajo rendimiento de carbohidratos reductores. Y esa puede ser la razón por la que una elevada concentración de celulasas no necesariamente significa una mayor producción de reductores, como se constató para los sistemas líquidos Celluzyme XB-Zymafilt L-300, y Cellulase 50 XL (secciones 5.2.1 y 5.2.2), debido a una ralentización de la catálisis debido a la reacción de los grupos laterales enzimáticos con los reductores recién formados, ya sea celodextrinas, celobiosa o glucosa.

Respecto al periodo de 48-96 h se verifica la hidrólisis simultánea de largas cadenas de celodextrinas por parte de las exoglucanasas, produciendo en consecuencia celodextrinas de menor masa molar, celobiosa y glucosa, incrementando con ello la producción de carbohidratos reductores. Por otro lado, la disminución de glucosa en este periodo puede explicarse por su degradación a furfurales como el 5-(hidroximetil)furfural (HMF) (Damodaran *et al.*, 2008), reacción favorecida a pH ácido y altas temperaturas. En lo que se refiere a la xilosa, los resultados de las Figuras 22 y 23 para el tiempo de 96-110 h, sugieren cierta actividad celulolítica de la mezcla enzimática sobre la hemicelulosa de teca al hidrolizar posiblemente enlaces glucosídicos donde estén involucradas xilosa y glucosa, por ejemplo, aquellas uniones β -1,6 (Figura 11, Sección 2.4), liberando ambos monosacáridos. Dicha actividad es, sin embargo, menos cuantitativa y veloz con respecto a la hidrólisis de los enlaces glucosídicos β -1,4 entre unidades de glucosa, ya que la unión xilosa-(β -1,6)-glucosa no es un sustrato específico para las celulasas empleadas. Además, el impedimento estérico debido a la presencia de largas cadenas de celulosa, que limita el acceso a más sitios de hidrólisis, disminuye conforme avanza la reacción, permitiendo de manera progresiva el acceso enzimático a otras zonas del polisacárido sin hidrolizar.

En síntesis, la variable que más influye en la actividad hidrolítica del sistema Cellulase 500 XP en polvo es su concentración (mg enzima/g de biomasa), en contraste con el tiempo de hidrólisis, que no muestra un efecto importante sobre la producción de reductores. De hecho, los rendimientos de reductores, glucosa y xilosa no aumentan con el tiempo de reacción, pues se observaron en promedio aproximadamente 11% de reductores, aproximadamente 6% de glucosa y aproximadamente 0.6% de xilosa a lo largo de toda la cinética.

Las condiciones óptimas de hidrólisis de la madera pre-tratada de teca fueron la hidratación del sistema enzimático Cellulase 500 XP en polvo en concentración de 50 mg enzima/g biomasa, 50°C, pH 5.0 y 24-48 h de hidrólisis, con las que se logró el mayor rendimiento de reductores y de glucosa en el menor lapso posible.

Finalmente, la hidratación previa del sistema enzimático en polvo es un factor importante en la generación de reductores, evitando así la escasa integración de las enzimas a la mezcla de reacción.

6. Conclusiones

- La mezcla enzimática Enmex, la cual tiene actividad celulasa, xilanasas y β -glucanasa, no es adecuada para hidrolizar la madera pre-tratada de teca debido a los bajos rendimientos que genera de carbohidratos reductores.
- El sistema enzimático Enziquim de Cellulase 50 XL (líquido) y el sistema Cellulase 500 XP (polvo) permiten la hidrólisis de la madera pre-tratada de teca en distintos grados.
- Con el sistema enzimático en polvo Cellulase 500 XP se logró el mayor rendimiento de carbohidratos reductores, ya que presentó la mayor actividad enzimática.
- Un hallazgo importante relacionado con una baja variabilidad en la producción de carbohidratos reductores fue la hidratación previa del sistema enzimático Cellulase 500XP en polvo.
- Se estableció que no hay efecto de un tiempo de hidrólisis de 96 y 110 horas de las muestras de teca utilizando el sistema enzimático Cellulase 500 XP en polvo previamente hidratado.
- Las condiciones óptimas de hidrólisis de la madera pre-tratada de teca fueron la hidratación del sistema enzimático Cellulase 500 XP en polvo en una concentración de 50 mg enzima/g biomasa, 50°C, pH 5.0 y 24-48 horas de hidrólisis, con las que se logró el mayor rendimiento de carbohidratos reductores y de glucosa en el menor lapso posible.
- La presencia de β -glucosidasa, además de β -endo- y β -exoglucanases, es esencial para incrementar la producción de carbohidratos reductores y consecuentemente de glucosa en las muestras pre-tratadas de madera teca.
- La cinética de la hidrólisis empleando el sistema Cellulase 500XP en polvo refleja el orden predominante de actividad enzimática: β -endoglucanases > β -exoglucanases > β -glucosidasas.

Perspectivas

- Se establecieron las condiciones óptimas de hidrólisis de la madera pre-tratada de teca, sin embargo los resultados obtenidos sugieren que no se obtuvo la conversión total de celulosa a carbohidratos reductores, por lo que es importante evaluar el efecto de otros sistemas enzimáticos sobre este sustrato con los cuales se obtengan mayores rendimientos de carbohidratos reductores para su posterior fermentación.
- En un estudio paralelo realizado con β -celulosa cristalina a las mismas condiciones hidrolíticas y cinéticas empleadas para la madera de teca (50°C, pH 5.0 y agitación constante a 100 rpm y tiempos de 24, 48 y 72 h), se obtuvieron rendimientos muy altos de reductores y glucosa, lo que sugiere la presencia de compuestos en el medio de reacción que limitan la adsorción o la actividad de la enzima sobre la celulosa. Por lo tanto, es importante investigar la naturaleza de dichos compuestos para saber de qué manera se pueden eliminar del medio de reacción o evitar o controlar su formación y así optimizar la etapa de hidrólisis de las fibras de teca.

7. Referencias

1. Abarca, E. R., Blanco, R. L., & Solano, S. P. (2005). Composición química de *Tectona grandis*. Laboratorio de Productos Forestales. Universidad de Costa Rica.
2. Alabi, K., & Oyeku, T. (2017). The chemical constituents extractable from teak tree (*Tectona grandis* Linn) obtained from Fountain University, Osogbo. *Nigerian Journal of Basic and Applied Sciences*, 25(1), 73–80. <https://doi.org/10.4314/njbas.v25i1.10>
3. Alvira, P., Tomás Pejó, E., Ballesteros, M., & Negro, M.J. (2010). Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review. *Bioresource Technology*, 101, 4851-4861.
4. Amaya, A. (2014). Antraquinona. Obtenido de: <https://es.slideshare.net/Annyamaya16/antraquinonas-31411234>
5. Asociación de Investigación de las Industrias de la Madera [AITIM] (2003). *Comercio exterior de carpintería*. Recuperado de: https://infomadera.net/uploads/articulos/archivo_4649_13683.pdf
6. Ayala-Villalobos, J. J. (2013). *Estudio del pretratamiento y sacarificación de residuos forestales para la optimización de la producción de azúcares fermentables a etanol*. (Tesis de licenciatura). Facultad de Química, UNAM, México.
7. Baez-Daeza, E. (2018). *Producción y aporte de nutrientes en la hojarasca de las especies abarco (*Cariniana piryformis* M), teca (*Tectona grandis* L.f.) y cacao (*Theobroma cacao* L.) en un sistema agroforestal en los municipios de Rionegro, Santander y Muzo, Boyacá*. (Tesis de Maestría). Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientales U. D. C. A., Bogotá. Recuperado de: <https://repository.udca.edu.co/handle/11158/1026>

8. Balám, M., Gómez, A., Vargas, J., Aldrete, A. & Obrador, J. (2015). Fertilización inicial de plantaciones comerciales de teca (*Tectona grandis* Linn F.) en el sureste de México. *Revista fitotecnia mexicana*, 38(2), 205-212. Recuperado de:
http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0187-73802015000200011&lng=es&tlng=es.
9. Ballesteros, S. (2010). Enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass. En: Waldron, K. (Ed.), *Bioalcohol production* (pp. 159-177). USA: Woodhead Publishing.
10. Belitz, H.-D., Grosch, W., & Schieberle, P. (2009). *Food Chemistry*. Berlin, Alemania: Springer.
11. Berrocal-Jiménez, A., & Rojas-Acuña, L. V. (2007). Resistencia de la madera de teca (*Tectona grandis* L. f.) proveniente de plantaciones forestales ante el ataque de termitas de madera seca *Cryptotermes brevis* (Walker). *Kurú: Revista Forestal*, 4(10). Recuperado de:
<http://revistas.tec.ac.cr/index.php/kuru/article/view/496>
12. Binod, P., Janu, K. U., Sindhu, R., & Pandey, A. (2011). Hydrolysis of Lignocellulosic Biomass for Bioethanol Production. En Binod, P., Janu, K. U., Sindhu, R., & Pandey, A. (Eds.), *Biofuels: alternative feedstocks and conversion processes* (229-250). USA: Academic Press.
13. Bruice, P. Y. (2008). *Química Orgánica* (5ta. ed.). México: Pearson.
14. Camacho-Linton, A., Ramírez-Maldonado, H., De los Santos-Posadas, H., & Zamudio-Sánchez, F. (2013). Tablas de crecimiento para teca (*Tectona grandis* L.) en el estado de Campeche. *Revista Mexicana de Ciencias Forestales*, 4(19), 92-101.
15. Carrillo, L. (2003). *Microbiología Agrícola*. Argentina: Editorial Universidad Nacional de Salta.
16. Chaminda, P., & Kumar, S. (2011). Biomass-derived Syngas Fermentation into Biofuels. En Binod, P., Janu, K. U., Sindhu, R., & Pandey, A. (Eds.) *Biofuels: alternative feedstocks and conversion processes* (pp. 79-98). USA: Academic Press.

17. Comisión Nacional Forestal (2014). *México cuenta con 270 mil hectáreas de Plantaciones Forestales Comerciales* (Boletín 77). Recuperado de <http://www.conafor.gob.mx:8080/documentos/ver.aspx?articulo=5752&grupo=7>
18. Cruz-Tamayo, R. F. (2015). *Estado del arte de la conversión de materiales vegetales para la producción de bioetanol*. (Tesis de licenciatura). Facultad de Química, UNAM, México.
19. Cuervo, L., Folch, J., & Quiroz, R. (2009). Lignocelulosa como fuente de azúcares para la producción de etanol. *BioTecnología*, 13(3), 11-25.
20. Damodaran, S., Parkin, K. L., & Fennema, O. R. (Eds.). (2008). *Fennema's Food Chemistry*. Boca Raton, Florida: CRC Press.
21. Díez, T. F., & Garrido, C. N. (2014). Bagazo de caña de azúcar: ¿Energía o etanol carburante? Dos casos de estudio. *Derivados de la Caña de Azúcar (ICIDCA)*. La Habana, Cuba, p. 18.
22. Directorio Forestal Maderero [DFM]. (2018). Forestal Maderero. <https://www.forestalmaderero.com/articulos/item/teca.html>
23. Ecuador Forestal (2010). Seminario Internacional “Melina y Teca, especies con éxito en el Ecuador”. Recuperado de: <http://ecuadorforestal.org/actualidad-forestal/seminario-internacional-%E2%80%9Cmelina-y-teca-especies-con-exito-en-el-ecuador%E2%80%9D/>
24. Espino Ortega, V. y Montiel Aguirre, G. (2019). Plantaciones forestales comerciales de teca, en México (II). *El economista*. Recuperado de: <https://www.economista.com.mx/opinion/Plantaciones-forestales-comerciales-de-teca-en-Mexico-II-20190110-0137.html>
25. Eveleigh, D. E., Mandels, M., Andreotti, R., & Roche, C. (2009). Measurement of saccharifying cellulase. *Biotechnology for Biofuels*, 2(21). DOI:10.1186/1754-6834-2-21.

26. Faba, L., Díaz, E., & Ordóñez, S. (2014). Transformación de biomasa en biocombustibles de segunda generación. *Madera y Bosques*, 20(3). 11-24. Recuperado de:
http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1405-04712014000300002&lng=es&tlng=pt
27. FAO (1991). Conservación de energías en las Industrias Mecánicas y Forestales. Estudio FAO. Editorial FAO: Roma, Italia.
28. Fengel, D., & Wegener, G. (1989). *Wood*. Recuperado de:
<https://books.google.com.mx/books?hl=es&lr=&id=x1B4ulTKnt0C&oi=fnd&pg=PA1&>
29. Flórez, J.-B., Trugilho, P. F., Tarcisio-Lima, J., Gherardi-Hein, P. R., & Moreira da Silva, J. R. (2014). Caracterización de la madera joven de *Tectona grandis* L. f. plantada en Brasil. *Madera y Bosques*, 20(1), 11-20.
30. Fockink, D. H., Urio, M. B., Chiarello, L. M., Sánchez, J. H., & Pereira-Ramos, L. (2016). Principles and challenges involved in the Enzymatic Hydrolysis of Cellulosic Materials at High Total Solids. En: Soccol, C., Brar, S., Faulds, C. & Pereira, L. (Eds), *Green Fuels Technology* (pp. 147-174). Switzerland: Springer.
31. Fonseca-Maldonado, M. R. (2006). *Determinación de la composición química de pino candelillo (Pinus maximinoi H. E. Moore) procedente de la finca Río Frío, Tactic, Alta Verapaz*. (Trabajo de grado). Facultad de Ingeniería, Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala.
32. Fonseca, W. (2004). *Manual para productores de teca (Tectona grandis L. f) en Costa Rica*. Recuperado de: http://www.sirefor.go.cr/Documentos/Reforestacion/2004_Fonseca_ManualProductoresTeca.pdf
33. García-Breijo, F. J. (2015). Estructura de la pared celular. Figura. Recuperado de: <https://es.slideshare.net/FranciscoGarciaBreijo/tema-1-introduccion-a-la-celula-eucariota-43987783>
34. García Garrido, S. (2012). *Centrales termoeléctricas de biomasa*. Recuperado de: <http://www.plantasdebiomasa.net/que-es-la-biomasa.html>

35. Ghose, T. K. (1987). Measurement of Cellulase Activity. *Pure and Applied Chemistry*, 59(2), 257-268.
36. Gijaba, S. (1998). *Pigmentos naturales quinónicos*. Recuperado de: <https://books.google.com.mx/books?id=dYmFO6lpsmsC&pg=PA72&lpg=PA72&dq=tectoquinona&source=bl&ots=QfTRlzb-57&sig=SSDbzWHdFje8uRY1m51KrsSljlk&hl=es-419&sa=X&ved=2ahUKEwjaw7LaldzeAhXng1QKHRWNDyIQ6AEwAHoEC AEQAQ#v=onepage&q=tectoquinona&f=false>
37. Gírio, F. M., Fonseca, C., Carvalheiro, F., Duarte, L. C., Marques, S., & Bogel-Lukasik, R. (2010). Hemicelluloses for fuel ethanol: A review. *Bioresource Technology*, 101(13), 4775-4800. DOI: 10.1016/j.biortech.2010.01.088
38. Gómez, E., Ríos, L. & Peña, J. (2012). Madera, un potencial material lignocelulósico para la producción de biocombustibles en Colombia. *Información Tecnológica*, 23(6), 73-86. <http://dx.doi.org/10.4067/S0718-07642012000600009>
39. Gong, C. S., Cao, N. J., Du, J., & Tsao, G. T. (1999). Advances in Biochemical Engineering/ Biotechnology. *Ethanol Production from Renewable Resources*, 65, 208-238. Recuperado de: https://link.springer.com/chapter/10.1007/3-540-49194-5_9
40. Gray, K. A., Zhao, L., & Emptage, M. (2006). Bioethanol. *Current Opinion in Chemical Biology*, 10, 141-146. DOI: 10.1016/j.cbpa.2006.02.035.
41. Gupta, A., & Verma, J. P. (2015). Sustainable bio-ethanol production from agro-residues: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 41(C), 550-567.
42. Gutiérrez-Rojas, I., Moreno-Sarmiento, N., & Montoya, D. (2015). Mecanismos y regulación de la hidrólisis enzimática de celulosa en hongos filamentosos: casos clásicos y nuevos modelos. *Revista Iberoamericana de Micología*, 32(1), 1-12. DOI: 10.1016/j.riam.2013.10.009

43. Hallett, J. T., Díaz-Calvo, J., Villa-Castillo, J., & Wagner, M. R. (2011). Teak Plantations: Economic Bonanza or Environmental Disaster? *Journal of Forestry*, 109 (5), 288–292. <https://doi.org/10.1093/jof/109.5.288>
44. Haupt, M., Leithoff, H., Meier, D., Puls, J., Richter, H.-G., & Faix, O. (2003). Heartwood extractives and natural durability of plantation-grown teak wood (*Tectona grandis* L.) a case study. *Holz Roh Werkst*, 61(6), 473-474.
45. Honty, G. (2009). Tecnología y Biocombustibles de Segunda generación: una Herramienta para la Toma de Decisiones. Reunión Regional de Expertos de la UNESCO, Montevideo, Uruguay.
46. International Society of Tropical Foresters (ISTF). (2009). *Manejo de plantaciones de la teca para productos sólidos*. Recuperado de: http://www.istf-bethesda.org/specialreports/teca_teak/teca.pdf
47. Irbe, I., Elisashvili, V., Asatiani, M.-D., Janberga, A., Andersone, I., Andersons, B., Biziks, V., & Grinins, J. (2013). Lignocellulolytic activity of *Coniophora puteana* and *Trametes versicolor* in fermentation of wheat bran and decay of hydrothermally modified hardwoods. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 86(B), 71-78.
48. Organización Internacional de las Maderas Tropicales [ITTO] (2016). *Reseña bienal y evaluación de la situación mundial de las maderas 2015-2016*. (ISBN 978-4-86507-037-8). Recuperado de: https://www.itto.int/es/annual_review/
49. Iturbe, F., & Sandoval, J. (2013). *Análisis de Alimentos. Fundamentos y Técnicas*. Facultad de Química, UNAM, México.
50. Jaen, M., Alvarez, M. J., Angulo, R., & Moreno, C. (1986). Actividad enzimática del complejo celulolítico producido por *Trichoderma reesei*. Hidrólisis enzimática de la celulosa. Centro de Investigaciones Energéticas, Medioambientales y Tecnológicas.
51. Jones, L., Ennos, R. A., & Turner, S. R. (2001). Cloning and characterization of irregular xylem4 (irx4): a severely lignin-deficient mutant of Arabidopsis. *The Plant Journal*, 26(2), 205-216.

52. León-Hernández, W., & Espinoza de Pernía, N. (2001). *Anatomía de la madera*. Recuperado de: https://www.researchgate.net/publication/44368335_Anatomia_de_la_madera_Williams_Jose_Leon_Hernandez_Narcisana_Espinoza_de_Pernia
53. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., & Randall, R. J. (1951). Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193, 265-275.
54. Lukmandaru, G. (2012). Antitermite activity of the bark extracts of Teak. Documento presentado en: Proceeding of the Fifth International Symposium of Indonesian Wood Research Society, Yogyakarta, Indonesia. Recuperado de: http://teknologihutan.fkt.ugm.ac.id/userfiles/download/ANTITERMITIC_ACTIVITY_OF_THE_BARK_EXTRACTS_OF_TEAK.pdf
55. Lynd, L. R., Weimer, P. J., van Zyl, W. H., & Pretorius, I. S. (2002). Microbial Cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 66(3), 506-577. DOI: 10.1128/MMBR.66.3.506-577.2002.
56. Mandels, M., Andreotti, R., & Roche, C. (1976). Measurement of saccharifying cellulase. *Biotechnology and Bioengineering Symposium*, 6(42), 21-33.
57. Mansfield, S. D., Mooney, C., & Sandler, J. N. (1999). Substrate and enzyme characteristics that limit cellulose hydrolysis. *Biotechnol. Prog*, 15(5), 804-816.
58. Megías, M., Molist, P. & Pombal, MA. (2019). *Atlas de histología vegetal y animal. La célula*. Vigo, España: Facultad de Biología de la Universidad de Vigo. Recuperado de: <http://mmegias.webs.uvigo.es/5-celulas/inicio.html>
59. Miranda, F. (2018). Bieeco "reverdece" desarrollo en Yucatán con plantación de teca. *Milenio*. Recuperado de: <http://www.milenio.com/negocios/mas-negocios/bieeco-reverdece-desarrollo-yucatan-plantacion-teca>

60. Miranda-Valencia, N. A., & Quiñonez-Castro, G. C. (2018). *Evolución de la actividad antimicrobiana de extractos obtenidos a partir de los residuos de corteza de la teca (Tectona grandis L. f.)* (Tesis de licenciatura). Facultad de Ciencias Químicas. Universidad de Guayaquil. Recuperado a partir de: <http://repositorio.ug.edu.ec/handle/redug/34632>
61. Montiel-Castelán, P., Castillo-Martínez, C. R., Gómez-Reyes, L. A., Valle-Arizaga, M., & Jasso Mata, J. (2016). Conservación *in vitro* por crecimiento mínimo de *Swietenia macrophylla* King, y *Tectona grandis* L. *Agroproductividad*, 9(2), 20-25. Recuperado de: https://www.colpos.mx/wb_pdf/Agroproductividad/2016/AGROPRODUCTIVIDAD_II_2016.pdf
62. Mood, S. H., Golfeshan, A. M., Tabatabaei, M., Jouzani, G. S., Najafi, G. H., Gholami, G., & Ardjmand, M. (2013). Lignocellulosic biomass to bioetanol, a comprehensive review with a focus on pretreatment. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 27, 77-93.
63. Morales de la Rosa, S. (2015). *Hidrólisis ácida de celulosa y biomasa lignocelulósica asistida con líquidos iónicos*. (Tesis doctoral). Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, España.
64. Moreno-González, M. (2011). *Pretratamiento de residuos lignocelulósicos (Bagazo de Agave) para su enriquecimiento en celulosa y valoración de azúcares reductores*. (Tesis licenciatura). Facultad de Química, UNAM, México.
65. Muñoz-Flores, H. J., Sáenz-Reyes, J. T., & Rueda-Sánchez, A. (2012). Monografías de especies forestales para plantaciones comerciales en clima tropical de Michoacán. Libro Técnico Núm. 15. SAGARPA-INIFAP-CIRPAC-Campo Experimental Uruapan. Michoacán, México. 202 p.
66. Navarrete, F. C. (2002). *Caracterización estructural de fibras lyocell y su comportamiento frente a procesos de degradación*. (Tesis doctoral). Universidad Politécnica de Catalunya. Recuperado de: <https://upcommons.upc.edu/handle/2117/93739>

67. Oliva-Domínguez, J. M. (2003). *Efecto de los productos de degradación originados en la explosión por vapor de biomasa de chopo sobre Kluyveromyces marxianus*. (Tesis doctoral). Universidad Complutense de Madrid, Madrid, España.
68. Organización Internacional de las Maderas Tropicales [ITTO] (2018). *Tropical Timber Market Report*, 22(20). Recuperado de: <https://www.itto.int/es/mis/>
69. Pandey, D., & Brown, C. (2000). La teca una visión global. *Revista Internacional de Silvicultura e Industrias Forestales*, 51(2), 3-13.
70. Pardo-Sequeira, T. (2013). *Evaluación del efecto de la concentración de anhídrido acético, temperatura y tiempo en la reacción de acetilación para la modificación química de Tectona grandis y Gmelina arborea* (Tesis de licenciatura). Facultad de Ingeniería, Universidad de Costa Rica. Costa Rica. Recuperado de: <http://repositorio.sibdi.ucr.ac.cr:8080/jspui/bitstream/123456789/1747/1/35051.pdf>
71. Pérez, J., Muñoz-Dorado, J., de la Rubia, T., & Martínez, J. (2002). Biodegradation and Biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview. *International Microbiology*, 5, 56-63. DOI: 10.1007/s10123-002-0062-3
72. Pérez-Miranda, M. (2015). *La aplicación de beneficios tributarios en nuevas inversiones en el cantón el empalme. Caso: cultivo, industrialización y comercialización de madera de teca (Tectona grandis L.f.)*. (Tesis de maestría). Facultad de Ciencias Económicas. Universidad de Guayaquil. Ecuador. Recuperado de: <http://repositorio.ug.edu.ec/bitstream/redug/8972/1/Tesis%20Teca.pdf>
73. Proteak uno, SA de CV (2015). Resumen Ejecutivo [PDF file]. Recuperado de: <http://proteak.com/files/analistas/SignumResearchTEAK240615.pdf>
74. Quintero, J. A., Rincón, L. E., & Cardona, C. A. (2011). Production of Bioethanol from Agroindustrial Residues as Feedstocks. En: Pandey, A., Larroche, C., Ricke, S. C., Dussap, C. & Gnansounou, E. (Eds.), *Biofuels: Alternative Feedstocks and Conversion Process* (pp.251-285). USA: Academic Press.

75. Roncero-Vivero, M. (2001). *Obtención de una secuencia "TCF" con la aplicación de O₃ y enzimas, para el blanqueo de pastas madereras y de origen agrícola. Optimización de la etapa Z. Análisis de los efectos en la fibra celulósica y sus componentes.* (Tesis doctoral). Universidad Politécnica de Cataluña, España. Recuperado de: <http://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/6489/16Brv16de20.pdf?sequence=16>
76. Sánchez-Nieto, S. (2012). Material de apoyo para los estudiantes del curso de Bioquímica experimental. Recuperado de: http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/MATERIALAPOYOANTECEDENTES_22427.pdf
77. Sánchez-Riaño, A. M., Gutiérrez-Morales, A. I., Muñoz-Hernández, J. A., & Rivera-Barrero, C. A. (2010). Producción de bioetanol a partir de subproductos agroindustriales lignocelulósicos. *Revista Tumbaga*, 1(5), 61-91.
78. Sánchez-Toro, O. J., & Cardona-Alzate, C. A. (2007). *Producción de Alcohol Carburante: una alternativa para el desarrollo agroindustrial.* Manizales, Caldas, Colombia: Artes Gráficas Tizan Ltda.
79. Scheller, H. V., & Ulvskov, P. (2010). Hemicelluloses. *Annual Review Plant Biology* 61, 263-289. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042809-112315>
80. Serna, F., Barrera, L., & Montiel, H. (2011). Impacto social y económico en el uso de biocombustibles. *Journal of Technology Management and Innovation*, 6(1), 100-114.
81. Sigoillot, J. C., Berrin, J. G., Bey, M., Lesage-Meessen, L., Levasseur, A., Lomascolo, A., Record, E., & Uzan-Boukhris, E. (2012). Fungal Strategies for Lignin Degradation. En Jouanin, L. & Lapierre, C. (Eds.), *Lignins Biosynthesis, Biodegradation and Bioengineering* (pp. 263-308): Elsevier.
82. Sigoillot, J. C., & Faulds, C. (2016). Second Generation Bioethanol. En: Soccol, C., Brar, S., Faulds, C. & Pereira, L. (Eds), *Green Fuels Technology* (pp. 213-239). Switzerland: Springer.
83. Sun, Y., & Chen, J. (2002). Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresource Technology*, 83, 1-11.

84. Thulasidas, P. K., & Bhat, K. M. (2006). Chemical extractive compounds determining the brown-rot decay resistance of teak wood. *Holz als Roh- und Werkstoff*, 65(2), 121–124. <https://doi.org/10.1007/s00107-006-0127-7>
85. Tomás-Pejó, E., Alvira, P., Ballesteros, M., & Negro, M. J. (2011). Pretreatment Technologies for Lignocellulose-to-Bioethanol Conversion. En: Pandey, A., Larroche, C., Ricke, S. C., Dussap, C. & Gnansounou, E. (Eds.), *Biofuels: Alternative Feedstocks and Conversion Process* (pp. 149-176). USA: Academic Press.
86. Uhlig, H. (1998). *Industrial enzymes and their applications*. USA: Wiley Interscience.
87. Vázquez-Bolaños, T. R. (2012). *Evaluación de la hidrólisis enzimática de bagazo de sorgo para la obtención de azúcares fermentables a etanol y efecto de diferentes pretratamientos*. (Tesis de licenciatura). Facultad de Química, UNAM, México.
88. Vázquez-García, J. A., Muñoz-Castro, M. A., Salcedo-Pérez, E., Hernández-Álvarez, E., & Díaz-Echavarría, N. (Eds.). (2012). *Recursos forestales en el Occidente de México*. México: Centro Universitario de Ciencias Exactas e Ingenierías, Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, Universidad de Guadalajara.
89. Vergara-Cordoba, C., Cardona-Ayala, C., Murillo-Gamboa, O., Jarama-Orozco, A. de J., & Araméndiz-Tatis, H. (2013). Valor de mercado de plantaciones de teca (*Tectona grandis* Linn) en el departamento de Córdoba. *Temas agrarios*, 18(1), 9-22.
90. Vincent, V. (2018). *Estimación de biomasa y carbono en plantaciones de teca (Tectona grandis L. f.) por método indirecto y mapeo mediante sistemas de información geográfica*. (Tesis de Maestría). Centro Universitario de Ciencias Exactas e Ingenierías. Universidad de Guadalajara, México. Recuperado de: https://mx.boell.org/sites/default/files/uploads/2018/01/tesis_de_valdimir_vincent_maestria_en_ciencia_de_productos_forestales.pdf

91. Viñals-Verde, M., Bell-García, A., Michelena-Álvarez, G., & Ramil-Mesa, M. (2012). Obtención de etanol a partir de biomasa lignocelulósica. *ICIDCA. Sobre los derivados de la caña de azúcar*, 46(1), 7-16.
92. Ypushima-Pinedo, A. L. (2015). *Caracterización biológica y química de la madera de teca (Tectona grandis) en dos condiciones edafoclimáticas y su relación con el crecimiento* (Tesis Doctoral). Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias. Universidad de Guadalajara. México. Recuperado de:
http://repositorio.cucba.udg.mx:8080/xmlui/bitstream/handle/123456789/5885/Medina_Jauregui_Eduardo.pdf?sequence=1&isAllowed=y
93. Zaldivar, J., Nielsen, J., & Olsson, L. (2001). Fuel ethanol production from lignocellulose: a challenge for metabolic engineering and process integration. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 56, 17-34. DOI: 10.1007/s002530100624
94. Zulueta-Santoyo, L. (2016). *Efecto de la composición de materiales lignocelulósicos sobre el rendimiento de glucosa y pentosas obtenidas por métodos enzimáticos*. (Tesis de Licenciatura). Facultad de Química, UNAM, México.