



EL SABER DE MIS HIJOS
HARÁ MI GRANDEZA

UNIVERSIDAD DE SONORA

DIVISIÓN DE INGENIERÍA

DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA
Y METALURGIA

***“CINÉTICA DE HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DE
PARTICULAS PRETRATADAS DE PALO BLANCO
(Ipomoea arborescens)”***

Tesis

Que para obtener el título de:

INGENIERO QUÍMICO

Presenta

Melissa Leyva Rodríguez

Hermosillo, Sonora

Febrero del 2017.

Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



**"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"**



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

DEPARTAMENTO DE INGENIERIA QUIMICA
DIVISION DE INGENIERIA
UNIVERSIDAD DE SONORA

Por medio de la presente, nos permitimos informar que se ha revisado detalladamente y se han hecho correcciones necesarias al trabajo de tesis de la carrera de Ingeniería Química que lleva por título “*CINÉTICA DE HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DE PARTICULAS PRETRATADAS DE PALO BLANCO (Ipomoea arborecens)*”, el cual fue realizado por Melissa Leyva Rodríguez.

En base a lo anterior acordamos dar nuestra aprobación para la impresión de dicho trabajo.

ATENTAMENTE
JURADO

Dr. Abraham Rogelio Martin García
Presidente

Dra. Esther Carrillo Pérez
Secretaria

Dr. Juan Antonio Noriega Rodríguez
Vocal

Dr. José Carlos Rodríguez Figueroa
Suplente

DEDICATORIA

A Dios que ha formado mi camino y me ha dirigido por el sendero correcto, por estar en todo momento conmigo ayudándome a aprender de mis errores y a no cometerlos otra vez. A el quien es el que guía el destino de mi vida.

A mi maestro, el Dr. Abraham Martin por transmitirme todos los conocimientos a los temas que corresponden a mi profesión, y ayudarme en el arduo trabajo que llevo la preparación de mi tesis.

A mi padre, con todo mi amor y cariño que desde el cielo me está protegiendo y sé que es un honor para el ver cumplir mis metas.

A mi madre por ser la mujer que me llena de orgullo y que me inspira a no darme por vencida, gracias por darme la vida, gracias por ser mi amiga fiel y mi confidente en todo momento.

ÍNDICE DE CONTENIDO

DEDICATORIA	i
ÍNDICE DE CONTENIDO	ii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	iv
ÍNDICE DE TABLAS	v
RESUMEN	vi
1. INTRODUCCIÓN	7
1.1 Objetivo General	8
1.2 Objetivos Específicos.....	8
1.2.1 Determinar el porcentaje de eficiencia de la hidrólisis ácida.	8
1.2.2 Determinar el porcentaje de eficiencia de la hidrólisis enzimática.....	8
1.2.3 Obtener los valores de los parámetros de la cinética enzimática Km y Vm para la hidrólisis de celulosa de tejidos pretratados de <i>Ipomoea arborecens</i> a 40°C y pH 4.5. 8	
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	9
2.1. Biomasa.....	9
2.2. Celulosa.....	11
2.3. Hemicelulosa.....	12
2.4. Lignina	13
2.5. Hidrólisis Ácida de la Biomasa	13
2.6. Hidrólisis Enzimática de la Biomasa.....	17
2.6.5. Hidrólisis enzimática	20
2.6.5.1 Celulasas	21
2.6.5.2 Fuentes de celulasa.....	22
2.7 Cinética Enzimática Homogénea.....	23
2.8 Mecanismo de Reacción	25
3 MATERIALES Y METODOS	29
3.1 Materia Prima.....	29
3.2 Preparación de la Materia Prima para la Hidrólisis Ácida.....	30
3.2.1. Secado	30
3.2.2 Reducción de tamaño de la biomasa y tamizado	31
3.3 Tejidos Pretratados de <i>Ipomoea arborecens</i> en la Hidrólisis Ácida.....	32
3.4 Hidrólisis enzimática.....	34
3.5 Análisis de Muestras Obtenidas en la Hidrolizada Ácida y Enzimática en el sistema de Cromatografía Líquida de Alta Presión (HPLC)	35
4. RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	37
4.1 Cuantificación de Glucosa y Xilosa	37
4.2 Hidrólisis Ácida.....	39
4.3 Hidrólisis Enzimática	40
4.4 Formas de Análisis de la Ecuación de Michaelis Menten.....	41
4.4.1 Método de Lineweaver-Burk	42
4.4.2 Método de Eadie-Hofstee	45

4.4.3	Método de Hanes-Woolf.....	46
4.4.4	Método de Regresión No Lineal.....	48
4.5	Comparación de los Parámetros Cinéticos Obtenidos por los Métodos Diferenciales.	50
4.6	Actividad Enzimática de la Enzima Celulasa Utilizada.....	53
5	CONCLUSIONES	55
6	BIBLIOGRAFÍA	56

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1: Esquema de Pared Celular de Biomasa Vegetal.	10
Figura 2: Estructura química de la celulosa.	12
Figura 3: Monosacáridos que forman la hemicelulosa	12
Figura 4: Descomposición química de hemicelulosa, xilosa y glucosa durante el proceso de hidrólisis ácida.	14
Figura 5: Cambio de concentración del producto en función de tiempo.....	24
Figura 6: Rapidez de la reacción en función de la concentración de la enzima. 25	
Figura 7: Rapidez inicial de la reacción en función de la concentración de sustrato.....	26
Figura 8: Horno de Secado con Convección de Aire	31
Figura 9: Material utilizado en la preparación de la hidrólisis ácida.	32
Figura 10: Reactor PARR de 2000 ml donde se llevó a cabo la hidrólisis ácida. 33	
Figura 11: Muestras tomadas durante el proceso de la hidrólisis ácida, y preparación de diluciones en una relación de volúmenes.	33
Figura 12: Materiales que intervinieron en el proceso de hidrólisis enzimática. 34	
Figura 13: El proceso de hidrólisis enzimática, en baño maría a temperatura constante a 40°C.....	34
Figura 14: (a) Equipo de análisis de HPLC e (b) Integrador y Graficador Shimadzu.....	36
Figura 15: Cromatograma que muestra el tiempo de retención y área de la solución de glucosa de concentración 0.1 g/L.	37
Figura 16: Cromatograma que muestra el tiempo de retención y área de una solución de xilosa de 0.1 g/L.	38
Figura 17: Concentración de glucosa y xilosa obtenidas durante la hidrólisis ácida de <i>Ipomoea arborecens</i>	39
Figura 18: Formación de glucosa durante la hidrólisis enzimática de tejidos pretratados con hidrólisis ácida de <i>Ipomoea arborecens</i> a 40°C, pH 4.5 y con una concentración de celulasa de 0.5 g/L.	40
Figura 19: Gráfica obtenida por el método de doble recíproco, obteniendo como resultado la concentración trasladada, S^*	44
Figura 20: Gráfica obtenida por el método Eadie-Hofstee plot, donde se aprecia la ecuación de la recta obtenida.	46
Figura 21: Gráfica obtenida por el método Hanes-Woolf plot, donde se obtiene la ecuación de la recta por este método.	47
Figura 22: Descripción de los datos experimentales por los valores de K_m y V_m obtenidos por el método Lineweaver-Burk.....	51
Figura 23: Descripción de los datos experimentales por los valores de K_m y V_m obtenidos por el método Eadie-Hofstee.	52
Figura 24: Descripción de los datos experimentales por los valores de K_m y V_m obtenidos por el método Hanes-Woolf.	52
Figura 25: Descripción de los datos experimentales por los valores de K_m y V_m obtenidos por el método Regresión No Lineal.	53

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla I: Composición de Celulosa, Hemicelulosa y Lignina en biomasa.....	11
Tabla II: Velocidades de formación de glucosa en la reacción en cada intervalo de tiempo y concentración de celulosa residual.	43
Tabla III: Resultados obtenidos de los parámetros de la regresión no lineal mediante la herramienta de análisis <i>Solver</i>	49
Tabla IV: Resultados obtenidos de K_m y V_m por el método Diferencial.....	50

RESUMEN

La presente investigación tiene como objetivo describir la cinética de la hidrólisis enzimática de celulosa de tallos de la planta de palo blanco (*Ipomoea arborecens*) a 40°C y a un pH de 4.5, y obtener los parámetros de dicha cinética como son la velocidad máxima de reacción (V_m) y la constante de Michaelis-Menten (K_m) obtenidos por los métodos diferenciales (Lineweaver-Burk, Eadie-Hoofstee, Hanes-Woolf y Regresión No Lineal). Estos parámetros se obtuvieron de la cinética enzimática, al momento de hidrolizar la celulosa de dicha biomasa. La biomasa de palo blanco primeramente fue sometida a un pretratamiento de hidrólisis ácida y posteriormente el residuo obtenido de la hidrólisis ácida y posteriormente el residuo obtenido de dicha hidrólisis fue sometido a una hidrólisis enzimática. Para el pretratamiento de hidrólisis ácida se utilizó un reactor PARR con un volumen de reacción de 1000 ml, se utilizaron 10 gramos de la biomasa triturada de *Ipomoea arborecens* de -25 +35 mallas con ácido sulfúrico con concentración 0.15 M a la temperatura de 120°C y presión de 1.96 atm el cual fue monitoreado cada 10 minutos durante un tiempo total de una hora. De este tratamiento ácido fue obtenido un residuo el cual se sometió a una hidrólisis enzimática en un volumen de reacción de 1000 ml de agua destilada a la que previamente se le ajustó el pH a 4.5 a una temperatura constante de 40°C, agregando por último 0.5 g de la enzima celulasa de *Aspergillus niger*, este sistema se monitoreo cada hora por un tiempo total de seis horas. Las muestras obtenidas de la hidrólisis ácida y enzimática se analizaron en un sistema de cromatografía líquida de alta presión (HPLC). Los resultados obtenidos por la hidrólisis ácida mostraron que la glucosa y xilosa tiene un tiempo de retención de 14.96 min y 15.88 min, respectivamente. La xilosa es producida a una rapidez de 0.0124 mol/(L*h) y la glucosa a una rapidez de 0.002 mol/(L*h), en la hidrólisis ácida del palo blanco. En la hidrólisis enzimática únicamente se espera obtener glucosa por lo que se pudo obtener gráfica en la cual se representaba la concentración de la glucosa con respecto al tiempo. Posteriormente al utilizar los distintos métodos diferenciales para la descripción de los análisis de resultados, el método de regresión no lineal fue el que mejor se adecuó a los datos experimentales. El cual arrojó valores de $K_m = 8.75 \times 10^{-6}$ mol/L de celulosa y $V_m = 1.01 \times 10^{-3}$ mol/(L*h) de glucosa. El estudio de las dos hidrólisis nos permitió obtener la eficiencia de los dos procesos, para la hidrólisis ácida el porcentaje de eficiencia fue de 49.48%, sin embargo el porcentaje de eficiencia para el proceso de la hidrólisis enzimática fue de 17%.

1. INTRODUCCIÓN

Actualmente estamos viviendo de manera acelerada, donde los patrones de consumo de combustibles fósiles están reduciendo drásticamente los recursos naturales con los que se cuenta y emitiendo grandes cantidades de emisiones entre las que se encuentran el metano (CH_4), óxido de nitrógeno (N_2O), dióxido de carbono (CO_2), que afectan directamente a la atmósfera, lo que conlleva a una problemática ambiental causando el calentamiento global, por este motivo fuentes alternativas de energía están siendo estudiadas. En el sector de consumo de energía para transportación, el bioetanol está siendo utilizado para los automotores que habitualmente utilizan gasolina. La mayoría del bioetanol que actualmente se usa en los automotores, proviene de productos relacionados con la alimentación humana (maíz, caña de azúcar); lo cual hace polémico su uso. Una alternativa para tratar de resolver esta problemática es la producción de Bioetanol. Bioetanol puede ser obtenido de biomasa, que el humano no utiliza como alimento. La biomasa lignocelulósica utilizada está compuesta de Hemicelulosa, Celulosa y Lignina. En la producción de bioetanol con material lignocelulósicos es necesario primeramente hidrolizar la hemicelulosa, generalmente por medio de hidrólisis ácida, y después hidrolizar la celulosa, generalmente por hidrólisis enzimática, para posteriormente realizar la fermentación y destilación. [1]

Bajo esta línea de investigación en el Departamento de Ingeniería Química y Metalurgia de la Universidad de Sonora, se realizó un proyecto de tesis de licenciatura titulado **“Producción de etanol a partir de Buffel”** por Torrecano (2009) [2]; en dicho trabajo se caracterizó la fermentación de los azúcares obtenidos por el pretratamiento con ácido sulfúrico diluido de Buffel (*Cenchrus ciliaris*); posteriormente, se realizaron dos proyectos de maestría, obteniendo la tesis **“Estudio cinético de la formación de xilosa por hidrólisis con ácido sulfúrico diluido de *Cenchrus ciliaris*”** por Encinas (2010) [3] y la tesis **“Determinación de los parámetros cinéticos del pretratamiento por hidrólisis ácida de *Ipomoea*”**

arborecens”” por Murillo (2010) [4]. Este último trabajo mostró que la composición de *Ipomoea arborecens* es de 25.73% de hemicelulosa, 41.47% de celulosa y 32.8% de lignina y reportó que las condiciones adecuadas de temperatura de operación para escalar el proceso de hidrólisis ácida de esta planta se encuentran entre 120 y 160°C. Durante el proceso de pretratamiento por hidrólisis ácida se obtiene como producto; glucosa y xilosa en solución, ya que el tejido de *Ipomoea arborecens* pretratado con la celulosa susceptible a la acción enzimática. Esta investigación fue dirigida al estudio de la hidrólisis enzimática de la celulosa, utilizando celulasa comercial, la cual se utiliza a pH de 4.5 y a 40°C.

1.1 Objetivo General

Obtener la cinética de la hidrólisis enzimática a 40°C y pH 4.5 de tejidos de *Ipomoea arborecens* pretratados por hidrólisis ácida.

1.2 Objetivos Específicos

- 1.2.1 Determinar el porcentaje de eficiencia de la hidrólisis ácida.
- 1.2.2 Determinar el porcentaje de eficiencia de la hidrólisis enzimática.
- 1.2.3 Obtener los valores de los parámetros de la cinética enzimática K_m y V_m para la hidrólisis de celulosa de tejidos pretratados de *Ipomoea arborecens* a 40°C y pH 4.5.
- 1.2.4 Determinar la actividad enzimática de la enzima utilizada en la hidrólisis enzimática.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. *Biomasa*

La biomasa es el nombre dado a cualquier materia orgánica de origen animal o vegetal formada por vía biológica. La biomasa vegetal puede utilizarse directamente como combustible para calefacción y para la preparación de alimentos por medio de la combustión de la madera; o indirectamente convirtiéndola en un combustible líquido o gaseoso, por medio de la fermentación como es el caso del etanol obtenido de la caña de azúcar o el biogás obtenido a partir de los desechos orgánicos de origen animal. [5]

Existen dos tipos o dos distribuciones de la biomasa según su origen:

- Biomasa primaria: aquella que procese de la función fotosintética, es decir, de los vegetales que, a partir de CO₂, H₂O y radiación solar generan materia orgánica vegetal. [6]
- Biomasa secundaria: es la que proviene de biomasa primaria, es decir, los residuos de los seres vivos y sus transformaciones.[6]

La biomasa primaria es la más abundante en la naturaleza, presenta un potencial enorme para convertirse en materia prima de combustibles y aprovechamiento de productos químicos derivados. [6]

La materia orgánica vegetal está formada por celulosa que es un polímero lineal cubierto por una red de hemicelulosa y la lignina principalmente es lo que cubre a la pared celular. (Figura 1) [7-11].

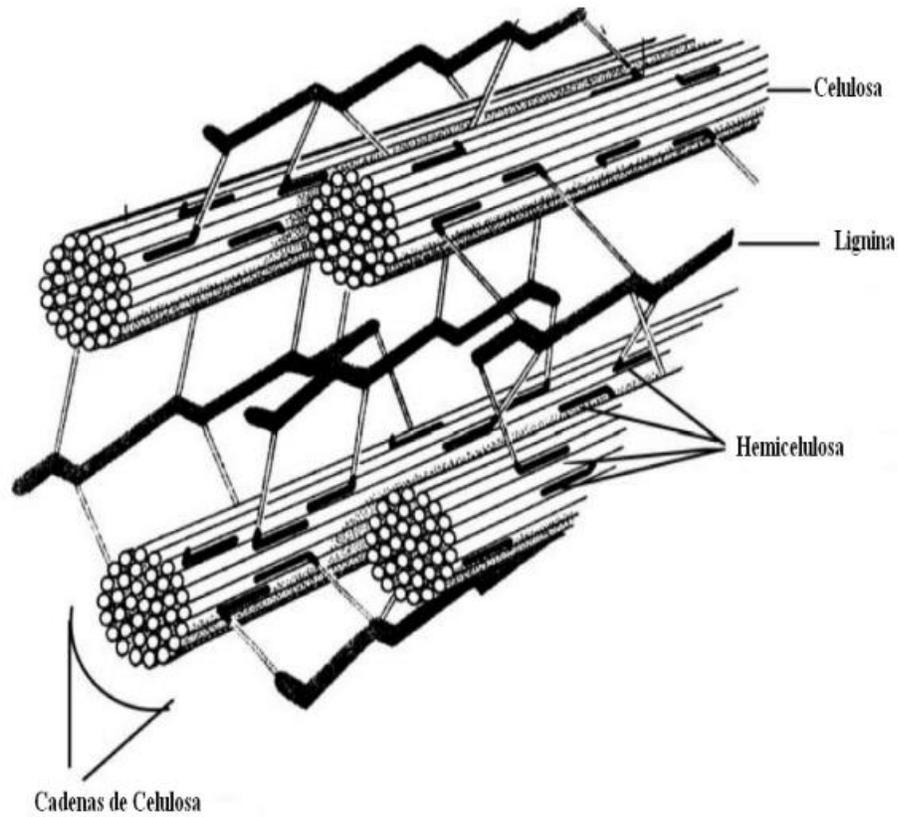


Figura 1: Esquema de pared celular de biomasa vegetal.

La composición de diferentes tipos de materiales se muestra en la Tabla I. La composición total se complementa por cenizas, compuestos inorgánicos, aceites y proteínas. La composición de compuestos inorgánicos varía ampliamente en los diferentes tipos de biomasa. (Figura 1) [7]-11.

Tabla I: Composición de Celulosa, Hemicelulosa y Lignina en biomasa.

	Composición		
	Celulosa (%)	Hemicelulosa (%)	Lignina (%)
Tallo de Maderas Duras	40-55	24-40	18-25
Tallo de Maderas Suaves	45-55	25-35	25-35
Mazorca de Maíz	45	35	15
Canas y hojas de maíz	40	25	17
Paja de Arroz	35	25	12
Paja de Trigo	30	50	20
Remolacha de Caña de Azúcar	40	24	25
Papel	85-99	0	0-15
Papel Periódico	40-55	25-40	18-30
Cascaras de Nuez	25-30	25-30	30-40
Patos	25-40	35-50	10-30
Semilla de algodón	80-95	5-20	0
Estiércol de ganado	1.6-4.7	1.4-3.3	2.7-5.7
Residuos de porcicultura	6	28	ND
ND= No Disponible			

Fuente: (Dewes and Hunsche 1998; Reshamwala et al. 1995; S Cheung and B. Anderson 1997; Saha 2003; Sun and Cheng 2002)

2.2. Celulosa

La celulosa es un homopolímero de unidades de glucosa unidas por enlaces β -(1-4), tiene una estructura lineal o fibrosa, en la que se establecen múltiples puentes de hidrogeno entre los grupos hidroxilo de distintas cadenas yuxtapuestas de glucosa, haciéndolas impenetrables al agua, lo que hace que sea insoluble en agua, originando fibras compactas que constituyen la pared celular de las células vegetales. (Figura 2). [12]

Alrededor del 95% de la producción de celulosa es utilizado en la industria papelera, derivado de las operaciones de pulpeo de madera. La madera contiene de 40-50% de celulosa en su masa [12]. La celulosa es considerada el biopolímero más abundante y renovable de la tierra, comprendiendo más de la mitad de todo el carbono orgánico existente en la biósfera.

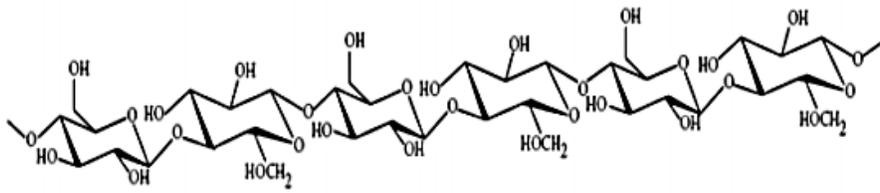


Figura 2: Estructura química de la celulosa.

2.3. Hemicelulosa

La hemicelulosa es el componente de la pared celular de las plantas, la cual representa el 20-25% del tejido de plantas leñosas. Es un polímero ramificado que puede contener diferentes tipos de monómeros, hexosas y pentosas, en donde la xilosa siempre se encuentra presente en mayor cantidad. Los monómeros de azúcar incluyen glucosa, manosa, galactosa, arabinosa y ácido glucurónico la Figura 3 muestra las estructuras de estos monómeros. En contraste con la celulosa, la hemicelulosa es fácilmente hidrolizada a sus monómeros que la constituyen. [13].

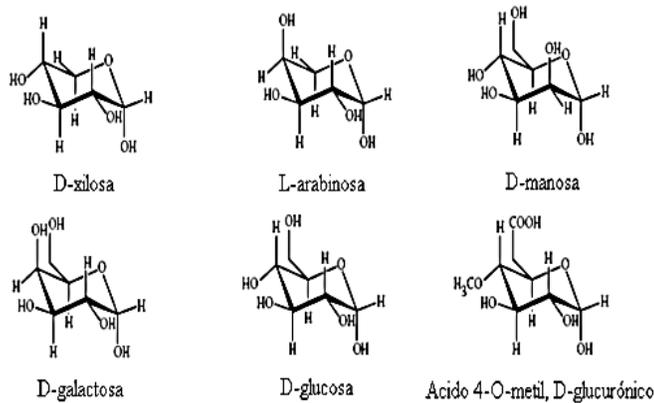


Figura 3: Monosacáridos que forman la hemicelulosa

2.4. Lignina

La lignina es el tercer polímero estructural más abundante en las paredes celulares de la planta, comprende del 20-30% en la biomasa. La lignina cubre a la hemicelulosa y a la celulosa, estas estructuras le confieren protección a las células vegetales contra la degradación química y enzimática. [13].

La molécula de lignina presenta un elevado peso molecular, que resulta de la unión de varios ácidos y alcoholes fenil-propílicos. Debido a su naturaleza, esta porción de la biomasa no puede ser fermentada debido a que después de la hidrólisis permanece en estado sólido, lo que se sugiere que pueda ser utilizada de otra manera principalmente como combustible en procesos de calentamiento o producción de electricidad. [13].

La celulosa, que representa una gran fracción en materiales lignocelulósicos, y la hemicelulosa pueden ser hidrolizados con agentes químicos y/o enzimas para obtener como productos monómeros de azúcares los cuales subsecuentemente son convertidos biológicamente a biocombustibles. Lo que representaría un aprovechamiento de alrededor del 80% del material total para la producción de etanol.[13]. A continuación se explica el proceso de producción de etanol a partir de biomasa lignocelulósica.

2.5. Hidrólisis Ácida de la Biomasa

La hidrólisis ácida de biomasa tiene por objetivo degradar la hemicelulosa de los tejidos vegetales para exponer las fibras de celulosa a procesos subsecuentes de hidrólisis; los cuales culminan con la fermentación de los carbohidratos para producción de etanol.

La hidrólisis de la celulosa y hemicelulosa a glucosa y xilosa, respectivamente, puede ser llevada a cabo por una variedad de ácidos, entre los que se han utilizado

para este propósito se encuentran el ácido sulfúrico, clorhídrico, fluorhídrico y nítrico. El proceso de hidrólisis es representado por las series de reacciones 1 y 2.



Si las condiciones de la hidrólisis son severas, por ejemplo temperatura y concentraciones de ácido altas, una gran fracción de los azúcares son degradados a otros productos como furfural y a hidroximetilfurfural [14]. En la Figura 4 se ilustra la descomposición química en la hidrólisis ácida de la hemicelulosa.

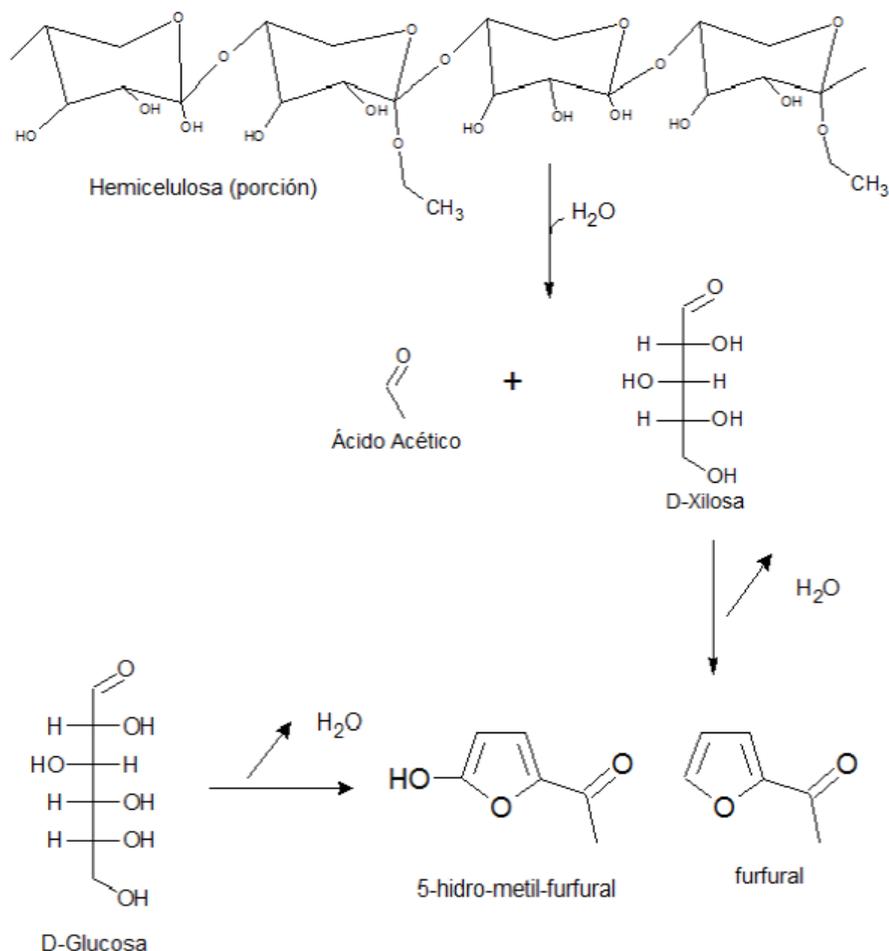


Figura 4: Descomposición química de hemicelulosa, xilosa y glucosa durante el proceso de hidrólisis ácida.

Originalmente la utilización de ácidos concentrados como el ácido sulfúrico y el clorhídrico han sido utilizados en el pretratamiento de materiales lignocelulosos. Este procedo requiere de reactores especiales ya que los ácidos concentrados son tóxicos, altamente corrosivos y peligrosos. Por lo que la alternativa de una hidrólisis ácida diluida, en donde la concentración del agente ácido es menos agresiva y con ayuda de temperatura se consigue realizar un pretratamiento efectivo de la biomasa, además permite que el proceso sea económicamente factible [14].

Existen principalmente dos tipos de procesos de pretratamiento con ácido diluido: a altas temperaturas, mayores a los 160 °C, en flujo continuo para cargas de 5-10% de peso de sustrato en relación al peso de la mezcla a reaccionar. El otro tipo es a bajas temperaturas, menores a 160° C, en reactores intermitentes para cargas entre el 10-40% p/p. También se ha demostrado que a temperaturas moderadas la producción de azúcares fermentables es baja [11].

Canettieri y Rocha reportaron en 2007 la hidrólisis de residuos de *Eucalyptus grandis* con ácido sulfúrico diluido [15]. Los autores investigaron la cinética de la reacción de hidrólisis empleando 0.65% de H₂SO₄, relación de materia prima a ácido de 1/9 (p/p), temperaturas de 130, 140, 150 y 160 °C, y tiempos de reacción de 20-100 minutos. Ellos resaltan que la variación de la temperatura y los tiempos de reacción tuvieron una fuerte influencia sobre la remoción de la hemicelulosa y muy poco efecto en la degradación de lignina y celulosa. La extracción máxima de la xilosa fue del 87.6% a 160 °C después de 70 minutos de reacción con la formación de productos de degradación de 2.8% de ácido acético, 0.6% de furfural y 0.06% de 5-hidroxi-metil-furfural se observó en el intervalo de 170 a 200° C. A temperaturas entre 130 y 140°C, con un tiempo de acción de 100 minutos obtuvieron extracciones de xilosa de 54.1 y de 69.9%, respectivamente.

En un estudio estadístico de los efectos de las condiciones de reacción como la temperatura, concentración de ácido y tiempo de reacción en los componentes de desechos de celulosa, hemicelulosa, lignina y nitrógeno durante el tratamiento con

ácido diluido del estiércol de ganado vacuno, se encontró que el ácido fue el factor que más influyó en la descristalinización de todos los componentes, es decir que estos componentes fueron degradados a los monosacáridos que los conforman. Las condiciones óptimas para la acumulación de la celulosa fueron de 2.8 horas de tiempo de reacción, 140° C y una concentración de 1% de ácido. Bajo esas condiciones se alcanzó un 31.0% peso de celulosa, mientras que la hemicelulosa, lignina y nitrógeno fueron de 3.2%, 20.8% y 2.4%, respectivamente [16].

En otro estudio realizado por Neureiter en 2003, se hidrolizaron diferentes tipos de materiales derivados del pasto y el ensilaje con ácido sulfúrico diluido para recuperar azúcares derivados de la hemicelulosa. La producción más alta observada fue de 16.43 g/100g de materia seca los cuales representan aproximadamente el 25% de las azúcares disponibles y el 60% de la fracción de la hemicelulosa. Se diseñó un experimento estadístico con el extracto del ensilaje/hierba para estimar los efectos de la temperatura, tiempo y la relación solido/liquido de material seco. Las concentraciones de ácido y material seco tuvieron el mayor efecto sobre la producción de azúcar, donde la temperatura y la concentración de ácido fueron los principales responsables para la formación de productos de degradación de la hemicelulosa. Estos se encuentran de acuerdo a las teorías cinéticas recientes. Las producciones en este experimento son comparables con otros materiales lignocelulosos [17].

En trabajos con residuos del maíz que fueron sometidos intervalos de 15 a 25% de ácido sulfúrico desde 40°C hasta 103°C. Se describen los efectos de la concentración de ácido, temperatura, intervalo de temperatura, tiempo de secado. El pretratamiento del material lignoceluloso mostro un 90% de conversión de celulosa con un consumo correspondiente a 1.50 gramos de H₂SO₄ por gramo de glucosa y las concentraciones de azucares en la hidrólisis fue de 6.5% en peso en el mejor de los casos [18].

En trabajos con maderas de roble, se hidrolizó hemicelulosa utilizando 0.2% de H_2SO_4 , a condiciones de reacción de 150 °C y 90 minutos, obteniendo 83% de producción de xilosa. Similares resultados se obtuvieron en la hidrólisis ácida de la oaja de arroz, en donde se alcanzó un 77% de extracción de xilosa con 1% de H_2SO_4 , a temperatura de 121°C y 27 minutos de reacción [15].

En la paja Brava, materia prima de Bolivia, se obtuvo una extracción de xilosa del 83%, esta fue hidrolizada con 0.5% de ácido sulfúrico, la temperatura que registraron fue de 190°C con un tiempo de residencia de 5 minutos [19].

Mientras que para la hidrólisis ácida del bagazo de caña de azúcar utilizando una reacción de 100 miligramos de ácido por gramo de materia prima seca, a 140°C y 20 minutos de reacción, se obtienen una extracción de xilosa del 83.3% [20]. Los parámetros óptimos de operación: temperatura, concentración y tiempo de residencia dependen básicamente del tipo de reactor utilizado para la hidrólisis y la composición química de la biomasa. Estas dos variables influyen en la degradación de la hemicelulosa.

2.6. Hidrólisis Enzimática de la Biomasa.

La palabra “enzima” se deriva del griego que significa “en las levaduras”. Una enzima es un catalizador biológico y, como todos los catalizadores, las enzimas aumentan la rapidez de una reacción química sin sufrir un cambio químico permanente en sí misma. Las enzimas son catalizadores específicos: cada enzima cataliza un solo tipo de reacción, y casi siempre actúa sobre un único sustrato o sobre un grupo muy reducido de ellos. En una reacción catalizada por una enzima:

- La sustancia sobre la que actúa la enzima se llama sustrato.
- El sustrato se une a una región concreta de la enzima, llamada centro activo.

El centro activo comprende de (1) un sitio de unión formado por los aminoácidos que están en contacto directo con el sustrato y (2) un sitio catalítico, formado por los aminoácidos directamente implicados en el mecanismo de la reacción

- Una vez formados y liberados los productos la enzima puede comenzar un nuevo ciclo de reacción

Las enzimas se utilizan en un gran número de sectores industriales, de los cuales el más grande es la industria alimentaria. Otras áreas son los detergentes, productos médico-farmacéuticos y textiles. Se conocen unas 2000 enzimas y han sido clasificadas. Kindel en 1981 [21] estimó que existen más de 25000 enzimas en la naturaleza. Por lo tanto se puede observar el grado de potencial de aplicación de las enzimas. Hay muchas razones para la aplicación de las enzimas en la industria. En particular, las enzimas tienen muchas ventajas sobre los catalizadores tradicionales, como son:

- Alto poder catalítico; se logra un aumento de hasta 10^9 a 10^{12} en la rapidez sobre la actividad no enzimática
- En tanto que las enzimas individuales tiene una alta especificidad por su substrato, las enzimas, como un todo, tienen un intervalo amplio de actividad.
- Las reacciones se pueden realizar en condiciones moderadas de pH, temperatura y presión.
- Se puede crear un centro quiral dentro de un centro proquiral.

A pesar de todas estas ventajas y de un conocimiento bastante detallando en un gran número de enzimas, solamente 14 de ellas se usan a escalas comercial. Como se enlistan a continuación:

2.6.1. Carbohidrasas

2.6.1.1 α -amilasa

2.6.1.2 β -amilasa

2.6.1.3 Gluco-amilasa

2.6.1.4 Invertasa

2.6.2. Proteasas

2.6.2.1 Proteasas en general (obtenidas de hongo/bacterias)

2.6.2.2 Pancretina

2.6.2.3 Renuna

2.6.2.4 Pepsina

2.6.2.5 Papaína

2.6.3. Lipasas

2.6.3.1 Lipasas

2.6.4. Otras

2.6.4.1 Glucosasa isómera

2.6.4.2 Glucosasa oxidasa

2.6.4.3 Pectinasas

Las mayorías de las enzimas usadas industrialmente son hidrolasas (85 % del total); el 15% restante se divide entre oxidorreductasas e isomerasas. De las hidrolasas, 70% hidrolizan proteínas, 26% hidrolizan carbohidratos y 4% hidrolizan lípidos [22].

La Comisión sobre Enzimas ha definido una unidad internacional de la actividad enzimática, el katal, el cual es la cantidad de enzima que transforma un mol de sustrato por segundo bajo condiciones experimentales estándar. Esta es una unidad de valor elevado: por ello se utiliza más corrientemente submúltiplos de ella; microkatal (μkat) [23].

Es difícil comparar la rapidez de reacción de las reacciones catalizadas por enzimas con la rapidez de reacción que ocurre en ausencia de la misma enzima bajo condiciones similares de temperatura, pH, etc. Esto se debe principalmente a las dificultades para medir las bajas velocidades de las reacciones no catalizadas por enzimas.

Otra característica importante que tiene las enzimas es su capacidad para funcionar como catalizadores en un intervalo moderado de temperaturas (~ 300 K), pH (2-10) y presión (~ 1 atm.). Otra propiedad importante de las enzimas es que, a diferencia de la catálisis química, su actividad a menudo se puede regularse mediante iones o moléculas pequeñas [23].

La actividad enzimática es influida por el efecto de la temperatura y el pH:

Efecto de la Temperatura: Un aumento en la temperatura provoca un aumento de la velocidad de reacción hasta cierta temperatura óptima, ya que después de aproximadamente 45° C se comienza a producir la desnaturalización térmica. Las enzimas de muchos mamíferos tienen una temperatura óptima de 37°C, por encima de esa temperatura comienzan a inactivarse y se destruyen. Sin embargo existen especies de bacterias y algas que habitan en fuentes de aguas termales y en el otro extremo ciertas bacterias árticas tienen temperaturas óptimas cercanas a 0 °C.

Efecto del pH: El pH modifica la concentración de protones; estos además de alterar la estructura de la enzima y el sustrato, pueden participar también en la reacción como sustrato o producto. En esos casos, la concentración de protones afecta directamente la velocidad de la reacción. Cualquier cambio brusco de pH, sabiendo que las enzimas son proteínas, puede alterar el carácter iónico de los grupos amino y carboxilo en la superficie proteica, afectando así las propiedades catalíticas de una enzima. A pH alto o bajo se puede producir la desnaturalización de la enzima y en consecuencia su inactivación [23].

2.6.5. Hidrólisis enzimática

Se entiende por hidrólisis enzimática la hidrólisis que se produce mediante un grupo de enzimas llamadas hidrolasas. Estas enzimas ejercen un efecto catalítico hidrolizante, en todos aquellos enlaces que fueron formados por la liberación de una molécula de agua. Los constituyentes de la materia prima para producir etanol (biomasa) son principalmente celulosa, hemicelulosa y lignina. Siendo la celulosa y la hemicelulosa formadas por la reacción de un grupo OH con un grupo aldehído ($R-C(=O)H$) o un grupo cetona ($R-C(=O)-R'$), con la liberación de una molécula de agua. Siendo de esta manera, estas sustancias susceptibles de ser degradadas por

enzimas hidrolíticas. La aplicación de enzimas hidrolíticas en la producción de etanol consiste en el uso de hemicelulasas y celulasas. Con la finalidad de degradar la fracción de hemicelulosa, se utilizan las hemicelulasas para producir carbohidratos de 5 y 6 carbonos así como también ayuda a liberar celulosa. Las celulasas se emplean con la finalidad de degradar celulosa y producir glucosa [24]. Menon y colaboradores en 2010 [25] utilizaron xiloglucanasas para obtener carbohidratos de tejidos de tamarindo, obteniendo conversiones en el rango de 55% a 78% a una temperatura de 50°C y un tiempo de 50 horas. Wan y Li, en 2010 [26] demostraron que la lignina de los residuos de maíz puede ser hidrolizada por enzimas producidas de *Cerrioposipsis subvermispora*, permitiendo en pasos posteriores obtener conversiones de glucosa de 57% a 66%. Duan, Prakash y colaboradores en 2010 [27] utilizaron xilanasas termoestables para hidrolizar la hemicelulasas de residuos agrícolas. Ellos encontraron que a 60 % al 50% de la hemicelulasas de trigo fue hidrolizado a 50°C. Person y colaboradores en 2009 [28], utilizaron celulasas para hidrolizar la paja de trigo y centeno obteniendo de 80% a 90% de conversión después de 72 horas. Karin y colaboradores en 2008 [29] reportaron el uso de celulasas de *Trichoderma reesie* en el rango de 45 a 50°C en el proceso de fermentación y sacarificación secundarias.

2.6.5.1 Celulasas

El término celulasas involucra un complejo enzimático de por lo menos tres tipos de enzimas con funciones diferentes, las que a su vez existen en una multiplicidad de formas para llevar a cabo la hidrólisis total de la celulosa. De esta manera las endo β -1,4-glucanasas rompen al azar los enlaces internos de la molécula en las regiones amorfas, producen un rápido decremento en la longitud de la cadena y un lento incremento de los grupos reductores libres. Las exo- β -1,4-glucanasas remueven unidades de glucosa o celobiosa a partir del extremo libre no reductor de la cadena de celulosa, dando como resultado un incremento rápido en los azúcares o grupos reductores y poco cambio en el tamaño del polímero. Finalmente la β -glucosidasa hidroliza la celobiosa producida por las actividades anteriores, dando

como producto final la glucosa [30]. La degradación enzimática de la celulosa es un proceso complicado debido a la naturaleza del sustrato, ya que, en forma nativa la celulosa está compuesta por largas cadenas cristalinas unidas por puentes de hidrógeno. Estas fibras están cubiertas por una matriz de hemicelulosa y lignina lo que reduce su accesibilidad a las enzimas celulolíticas. Los microorganismos que degradan la celulosa poseen un sistema enzimático con una variedad de enzimas, diferentes en cuanto a especificidad y modo de acción, los cuales actúan de manera sinérgica en la hidrólisis de celulosa. La celulasa es un complejo enzimático, formado por lo menos dos enzimas, C_1 y C_x cuya función no está perfectamente definida. Kim en año 2008 [31] desarrollo un modelo cinético basado en los siguientes postulados:

- a) C_1 es una enzima que reduce las uniones entre las cadenas de celulosa abriendo la estructura cristalina y convirtiendo la celulosa cristalina en amorfa y/o reactiva. C_x (endo y exo- β -glucanasas) hidrolizan la celulosa más reactiva eliminando las unidades de glucosa a partir de los extremos reductores (exo) y por rompimiento aleatorio de las cadenas largas (endo).
- b) C_x actúa en la celulosa cristalina generando extremos libres, que son más susceptibles al ataque enzimático; C_1 es una enzima que hidroliza los extremos reactivos de la celulosa producidos por la acción de C_x .
- c) Se considera que la solución de la enzima como de un solo componente y las distintas actividades catalíticas aparecen cuando la celulosa es adsorbida en diferentes porciones de la matriz de la celulasa. Se postula que la enzima que rompe las uniones cristalinas tiene una forma compleja de $C_1 + C_x$ o C_1 y C_x actúan en el ciclo de hidrólisis para producir azúcares reductores.

2.6.5.2 Fuentes de celulasa

Los microorganismos producen una amplia gama de enzimas útiles a nivel industrial, muchas de las cuales son segregadas al exterior celular. Estos microorganismos son capaces de desarrollarse fácil y rápidamente en su medio de cultivo cuya tecnología se encuentra hoy bien establecida. La optimización de la producción de enzimas a partir de microorganismo depende de una serie de factores

interrelacionados, lo que significa que una enzima solo puede sintetizarse durante parte del crecimiento. Algunos microorganismos de importancia industrial empleados para la obtención de metabolitos son los correspondientes al género de Deuteromicetos (Deuteromicotina), entre los cuales están *Aspergillus Niger*, *Penicillium notatum-chrysogenum* y *Trichoderma viride* [30]. Las celulasas son de las enzimas que tiene una gran importancia por sus grandes aplicaciones dentro de la industria, como ejemplos tenemos la industria textil, la industria de producción de detergente, la producción de alimentos y en la industria farmacéutica. Las celulasas son producidas por una gran variedad de microorganismos entre los que se encuentran hongos y bacterias como lo es *Aspergillus niger* [32]. La mayoría de los microorganismos celulolíticos son capaces de producir tanto celulasas como xilanasas; sin embargo, algunos otros sólo producen celulasas o xilanasas. A partir de los estudios realizados tanto en hongos como bacterias se ha propuesto un modelo general de regulación controlado por dos mecanismos. Por un lado, la inducción que se lleva a cabo por sus sustratos naturales celulosa y xilan para las celulasas y xilanasas, respectivamente, y por otro la represión por fuentes de carbono de bajo peso molecular como glucosa y celobiosa para el caso de las celulasas y por otra parte la xilosa, arabinosa o xilobiosa para el caso de las xilanasas.

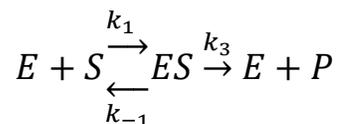
2.7 Cinética Enzimática Homogénea

El objetivo de la cinética enzimática es el estudio de las enzimas en su funcionamiento. Se propone, en particular, establecer las relaciones que existen entre la velocidad de la reacción enzimática y las concentraciones del sustrato y de la enzima, así como la influencia de algunos factores: pH, temperatura, entre otros. [23].

La cinética enzimática simple se basa en tres principios experimentales:

1. Que el sustrato, S, forma un complejo intermediario enzima-sustrato, ES, con la enzima, E.

2. Que la rapidez de la reacción a tiempo, t (es decir, la rapidez de desaparición del substrato, $-dS/dt$, o bien, la rapidez de formación del producto, dP/dt) se representa con la pendiente de la curva P o $S=f(t)$ (Figura 5). Estas pendientes varían con el tiempo durante el curso de la reacción, debido a la desaparición del substrato. Las mediciones sintéticas se basan generalmente en la parte lineal de la curva, es decir, la velocidad inicial o la rapidez inicial de la reacción. En esta región es extremadamente pequeña la concentración del producto y, en consecuencia la descomposición del producto a substrato es insignificante (determinado por la constante de rapidez, k_2) y se puede escribir:



Ec.(3)

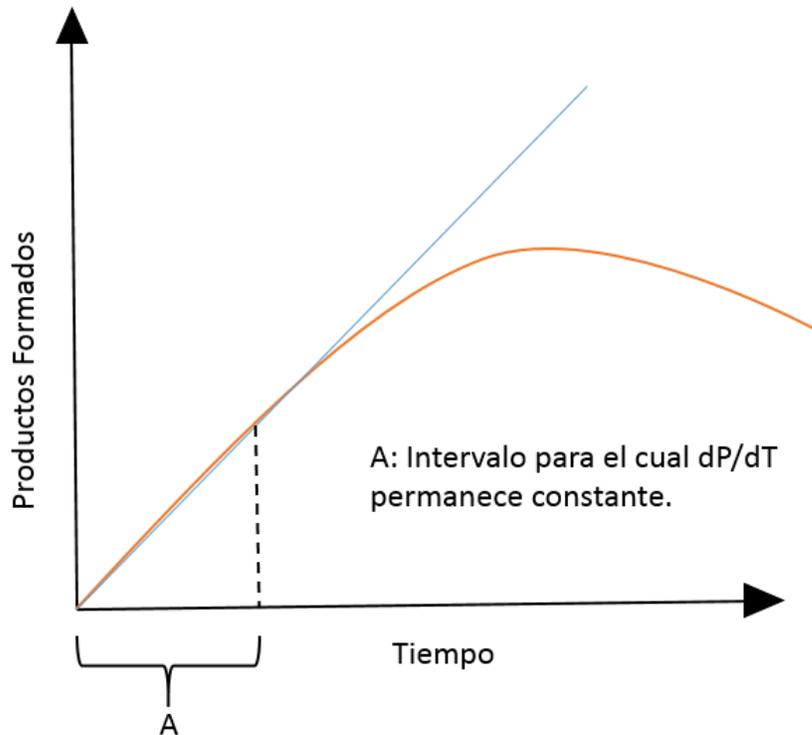


Figura 5: Cambio de concentración del producto en función de tiempo

3. Para una concentración dada de sustrato, la determinación de la variación en la rapidez de reacción como función de la concentración de la enzima no es lineal, sino asintótica (Figura 6). Esto se debe a que todo está formado por un complejo enzimático enzima-sustrato [ES] a altas concentraciones de la enzima. En consecuencia, la rapidez inicial de la reacción como función de la concentración de la enzima permanece constante en estas condiciones. Para estudios cinéticos es necesario situarse en las condiciones que corresponden al principio de la curva, donde es lineal, es decir, a concentraciones bajas de enzimas. [23].

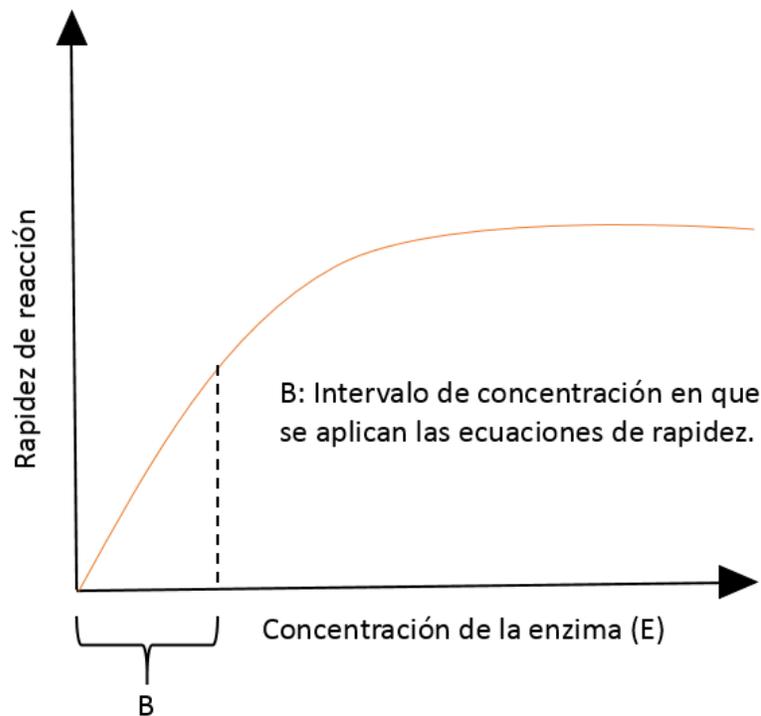


Figura 6: Rapidez de la reacción en función de la concentración de la enzima

2.8 Mecanismo de Reacción

La cinética de Michaelis-Menten describe la velocidad de reacción de muchas reacciones enzimáticas. Su nombre es en honor a Leonor Michaelis y Maude Menten. Las reacciones catalizadas por enzimas exhiben cinética de saturación. A bajas concentraciones de sustrato, la velocidad de la reacción es proporcional a la concentración de sustrato y la reacción es de primer orden con respecto al

substrato. A medida que la concentración de substrato aumenta, la rapidez de la reacción disminuye y ya no es proporcional a la concentración de substrato; la reacción es de orden mixto. A concentraciones aún más altas la rapidez de reacción es constante e independiente de la concentración del substrato, la reacción se vuelve de orden cero (Figura 7).

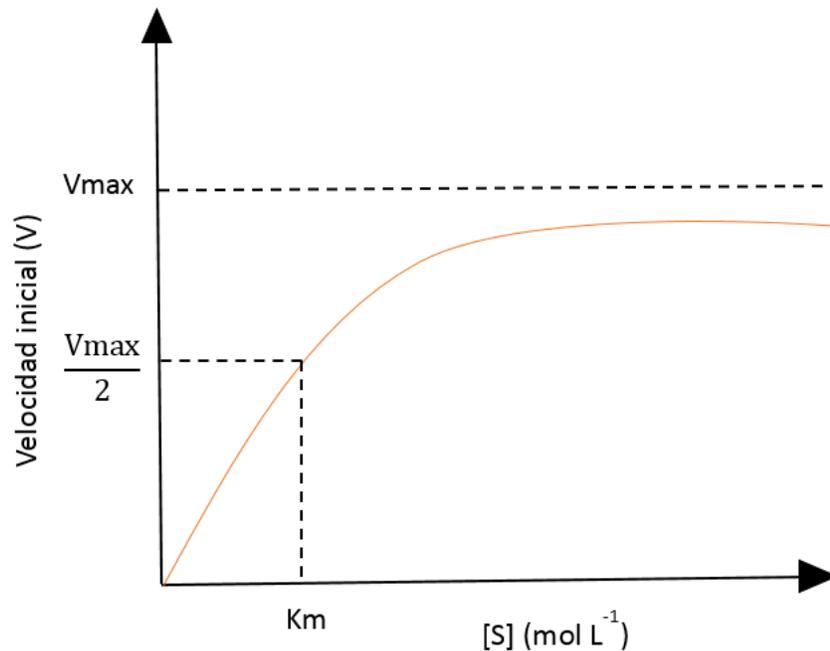


Figura 7: Rapidez inicial de la reacción en función de la concentración de substrato.

Estos factores llevaron a Michaelis y Menten en 1913, a proponer una teoría general de las cinéticas enzimáticas que más tarde fue extraída por Briggs y Haldane. Estas teorías se basan en tres suposiciones principales:

1. Que la concentración de la enzima [E] es mucho más baja que la concentración de substrato [S], de modo que el cambio en [S] durante la reacción es insignificante.
2. Que la concentración del producto P es cero.
3. Que la liberación de S a partir del complejo ES es mucho más rápido que la liberación de los productos y, en consecuencia, E y S pueden considerarse en equilibrio.



Por lo tanto

$$k_1 [E] [S] = k_{-1} [ES] \text{ puesto que } k_3 \ll k_{-1}$$

$$[E] = [ES] \frac{k_{-1}}{k_1 [S]} \quad \text{Ec.(4)}$$

Así la ecuación contiene dos incógnitas, [E] y [ES], ya que es imposible determinar concentraciones a cualquier tiempo dado de estas especies, sin embargo se conoce la concentración total de la enzima, E_T :

$$E_T = [E] + [ES] \quad \text{Ec.(5)}$$

Sustituyendo ecuación (5) en la ecuación (4), se obtiene:

$$E_T = [ES] \left[1 + \frac{k_{-1}}{k_1 [S]} \right] \quad \text{Ec.(6)}$$

La rapidez de reacción es $V = k_3 [ES]$, como reacción inversa puede ser ignorada (k_{-3}); en consecuencia:

$$V = \frac{k_3 E_T}{1 + \frac{k_{-1}}{k_1 [S]}} = \frac{k_3 E_T [S]}{[S] + \frac{k_{-1}}{k_1}} \quad \text{Ec.(7)}$$

Esta ecuación relaciona la rapidez de reacción con la concentración total de la enzima, E_T , y la concentración de sustrato, S. los términos de rapidez k_1 , k_{-1} , k_3 , son constante y, por lo tanto, la relación de k_{-1}/k_1 también lo es y puede representarse por el término K_m , la constante de Michaelis. Además $k_3 E_T$ es la rapidez máxima de reacción y entonces, la expresión se puede escribir de la forma como se muestra en la Ec. 8: [32]:

$$V = \frac{V_{max}[S]}{K_m + [S]} \quad \text{Ec.(8)}$$

Donde:

V= es la velocidad de reacción.

V_{max}= es la velocidad máxima de la reacción.

[S]= es la concentración del sustrato.

K_m= es la constante de Michaelis-Menten.

3 MATERIALES Y METODOS

3.1 Materia Prima

Ipomoea arborencens es conocido comúnmente como: palo blanco, palo santo, palo del muerto, cazahuate, ozoete, cazahuate blanco, palo bobo y palo cabra. En la presente investigación, la muestra de esta planta se obtuvo del municipio de Banamichi, Sonora, siendo recolectados únicamente tallos de *Ipomoea arborencens* para la extracción de azúcares de xilosa y celulosa por medio de la hidrólisis ácida y enzimática. El árbol que llega a medir hasta 12 metros de altura, representa un tallo liso y su corteza es blanca. Su tallo crece en forma de anillos, las flores son blancas, largas en forma de embudo que llegan a medir entre 4 y 5 centímetros de longitud y amplitud. El tamaño de sus hojas varía entre los 3 y 8 centímetros de ancho y de 8 a 20 centímetros de longitud. Según McPherson los tallos producen látex blanco en estudios publicados en 1982 (Turner 1995) [33].

El palo blanco crece en laderas rocosas y planicies con grava. En esta investigación se utilizó como materia prima el palo blanco (*Ipomoea arborencens*) el cual se puede obtener muestras dentro del desierto de Sonora donde la humedad es escasa y la temperatura alcanza valores cercanos a 50°C. Existe la variedad "*pachylutea*" que puede ser más común en zonas más elevadas que la forma típica. En un estudio de crecimiento de plantas en la zona central de Arizona se demostró que la planta es susceptible de sufrir daño por heladas a 4.4 °C en las ramas, aparentemente las heladas limitan la existencia de la especie hacia el norte. Mientras que al oeste de Sonora y Arizona, la planta está limitada por las escasas lluvias de verano [33].

Las flores de *Ipomoea arborencens* comienzan a brotar entre Noviembre y Abril en la variedad del extremo norte de *Ipomoea arborencens*. Se sospecha que la sequía sea un requisito indispensable para que las flores aparezcan. Las hojas aparecen después de las flores y persisten durante todo el verano, hasta la llegada del mes de Octubre cuando pierde sus hojas. En el sur de Sonora, las flores aparecen en

invierno, en los meses entre Noviembre y Enero, mientras las hojas aparecen hasta que llega el verano. [33].

3.2 Preparación de la Materia Prima para la Hidrólisis Ácida

Antes de proceder a la hidrólisis ácida para la extracción de azúcares, la materia prima fue sometida a dos procesos previos, primero se sometió a un secado para eliminar el contenido de agua libre en la planta y después se sometió a una molienda para obtener un tamaño de partícula apropiado para la extracción de los azúcares xilosa y glucosa.

3.2.1. Secado

La materia prima utilizada del palo blanco (*Ipomoea arborencens*) se sometió a un proceso de secado con la finalidad de eliminar la humedad antes de iniciar las hidrólisis para tener la certeza que la cantidad de materia prima utilizada en los experimentos correspondiera solamente a *Ipomoea arborencens*. En el proceso de secado, se midió el peso inicial de cada uno de los tallos de *Ipomoea arborencens* sometidos a secado. Utilizando el método de probeta, que consiste en tomar una muestra de madera, pesarla con precisión y secarla en un horno, poco a poco, monitoreando el peso, comparando peso final contra el peso anterior registrado.

El proceso de secado se realizó en un horno de convección de aire que se encontraba en el laboratorio de Ingeniería de Alimentos de la Universidad de Sonora el cual se muestra en la Figura 9. Las condiciones a las cuales se llevó el secado fueron a una temperatura de 85°C por un tiempo de 48 horas, tiempo en el cual el peso de las muestras no varió. Las muestras de *Ipomoea arborencens* se introdujeron en un soporte de mallas, para asegurar un secado uniforme de los troncos, previamente pesados cada uno de ellos.

Después de 3 horas se monitoreo el peso, se registró y se comparó con el peso inicial hasta que después de 48 horas la variación del peso registrado a una hora solo fue de 0.05 gramos.



Figura 8: Horno de secado con convección de aire

3.2.2 Reducción de tamaño de la biomasa y tamizado

La mayoría de las veces la hidrólisis ácida diluida de materiales lignocelulosos se ayuda con un tratamiento mecánico previo, fue el caso de la pulverización. El proceso de reducción de tamaño se realizó con una sierra de disco para madera de 4 pulgadas acoplado a un taladro. Después de obtener la materia prima pulverizada se procedió a clasificarla con diferentes tamices.

El tamizado es un método utilizado para separar una mezcla de partículas en dos o más fracciones de tamaño, los materiales de mayor tamaño son atrapados por encima del tamiz, mientras que los más pequeños los atraviesan.

Las escalas utilizadas para clasificar los tamaños de partícula son la Serie US Tamiz y el Equivalente Tyler, algunas veces llamado tamaño de Malla Tyler o Series de Tamiz Estándar Tyler. La clasificación por tamaños de partículas fue realizada mediante diferentes tamices de la Serie US Sieve que cuenta con la especificación ASTM E-11.

Las reacciones de hidrólisis ácida diluida se realizaron con tamaños de partículas Equivalente Tyler de -25+35 mallas, lo cual corresponde a un diámetro de partícula mayor a 0.500 milímetros (malla 35) y menor a 0.707 milímetros (malla 25).

3.3 Tejidos Pretratados de *Ipomoea arborecens* en la Hidrólisis Ácida.

Para llevar a cabo la hidrólisis ácida se pesó 10 gramos de los tejidos de palo blanco (*Ipomoea arborecens*) de -25 a +35 mallas, se preparó una solución de ácido sulfúrico de 0.15 M en un volumen de 1000 ml. Figura 9.



Figura 9: Material utilizado en la preparación de la hidrólisis ácida.

En un reactor PARR de 2000 ml, se colocó la solución de ácido sulfúrico 0.15 M previamente preparada junto con los 10 g de palo blanco. Durante el proceso de pretratamiento se hizo un monitoreo de siete muestras de 5 ml a intervalos de

tiempo de 10 minutos ($t_0, t_{10}, t_{20}, t_{30}, t_{40}, t_{50}, t_{60}$) una vez, que el reactor alcanzo la temperatura de 120°C Figura 10.



Figura 10: Reactor PARR de 2000 ml donde se llevó acabo la hidrólisis ácida.

De cada muestra monitoreada se tomó 200 y se adicionó un mililitro de agua destilada y se depositó en un matraz Erlenmeyer realizando diluciones en una relación de volúmenes de 1:6 de muestra y agua destilada. Figura11.



Figura 11: Muestras tomadas durante el proceso de la hidrólisis ácida, y preparación de diluciones en una relación de volúmenes.

3.4 Hidrólisis enzimática

Los tejidos pretratados de *Ipomoea arborecens* después de la hidrólisis ácida fueron filtrados a través de un embudo conectado a un matraz kitazato operando al vacío, para obtener la biomasa restante del pretratamiento. Figura 12.



Figura 12: Materiales que intervinieron en el proceso de hidrólisis enzimática.

La biomasa recuperada en la filtración al vacío, tuvo un peso de 7.07 g, la cual se depositó en un vaso de precipitado de 2000 ml, se adicionó 1000 ml de agua destilada y 0.5 g de celulasa de *Aspergillus niger*. Ajustando el pH a 4.5 y se colocó este nuevo sistema en un baño maría a temperatura constante de 40°C. Figura 13.



Figura 13: El proceso de hidrólisis enzimática, en baño maría a temperatura constante a 40°C.

Durante el proceso de la hidrólisis enzimática se monitoreó el sistema a intervalos de una hora por un periodo de seis horas en donde se tomaron muestras de 200 µl y se colocaron en tubos hependorf de 1.5 ml con 1 ml de agua destilada, análogo a la hidrólisis ácida obteniendo así disoluciones en una relación de volumen de 1:6.

3.5 Análisis de Muestras Obtenidas en la Hidrolizada Ácida y Enzimática en el sistema de Cromatografía Líquida de Alta Presión (HPLC)

Las muestras tomadas durante la hidrólisis ácida y enzimática fueron centrifugadas a 13000 rpm durante 15 minutos; del sobrenadante se tomó un volumen de 200 µl de cada muestra, se depositó un microtubo ependorf y se adiciono un mililitro de agua destilada, para obtener una dilución de 1:6. Después cada una de las diluciones fueron filtradas mediante un filtro Pall de Nylon con un tamaño de 0.45 µm. Se inyectaron volúmenes de 25 µl de cada una de las muestras para su análisis en el sistema HPLC.

Las condiciones de operación del sistema HPLC fueron: la separación de los carbohidratos se realizó en una columna Hi-Plex a una temperatura de 65°C, con una velocidad de flujo de 0.6 ml/ min utilizando agua grado HPLC como fase móvil. La salida de la columna fue acoplada a un detector de refracción Varian Star 9040 utilizando un factor de atenuación de 256×10^{-6} RIU/F a 35°C. A su vez el equipo de índice de refracción se acopló a un integrador Shimadzu, donde se graficaron los espectros de los carbohidratos obtenidos en las hidrólisis ácida y enzimática para obtener sus áreas de concentración, operando a una velocidad de 5 mm/min y factor de 7.5. Figura 14.



(a)

(b)

Figura 14: (a) Equipo de análisis de HPLC e (b) Integrador y Graficador Shimadzu.

La concentración de xilosa y glucosa fue determinada analizando una muestra de concentración conocida de estas sustancias, utilizando los parámetros del método descrito anteriormente. Con este procedimiento fue obtenido un valor de área para una concentración dada de xilosa y glucosa. Las concentraciones de las soluciones obtenidas durante el procedimiento experimental fueron calculadas utilizando la proporcionalidad entre el área obtenida de la muestra experimental, el área y concentración de la solución preparada.

4. RESULTADOS Y DISCUSIONES

4.1 Cuantificación de Glucosa y Xilosa

Se analizó una solución de glucosa de 0.1 g/L y una solución de xilosa de 0.1g/L; la señal de área bajo la curva de estas sustancias asociada a su concentración fue de 140918 para glucosa y de 137218 para xilosa. El análisis por HPLC muestra que la glucosa tiene un tiempo de retención de 14.97 minutos y la xilosa un tiempo de retención de 15.88 minutos. En la Figura 15 y 16 se muestra los tiempos de retención y áreas correspondientes glucosa y xilosa.

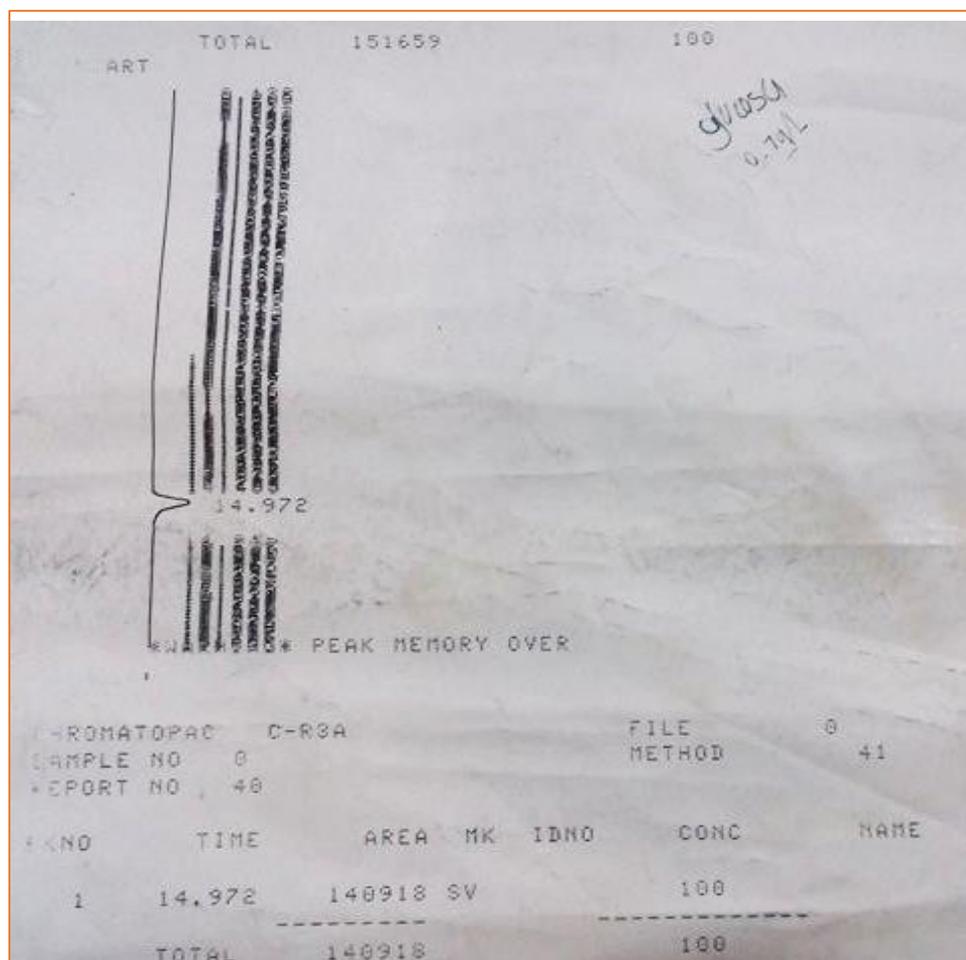


Figura 155: Cromatograma que muestra el tiempo de retención y área de la solución de glucosa de concentración 0.1 g/L.

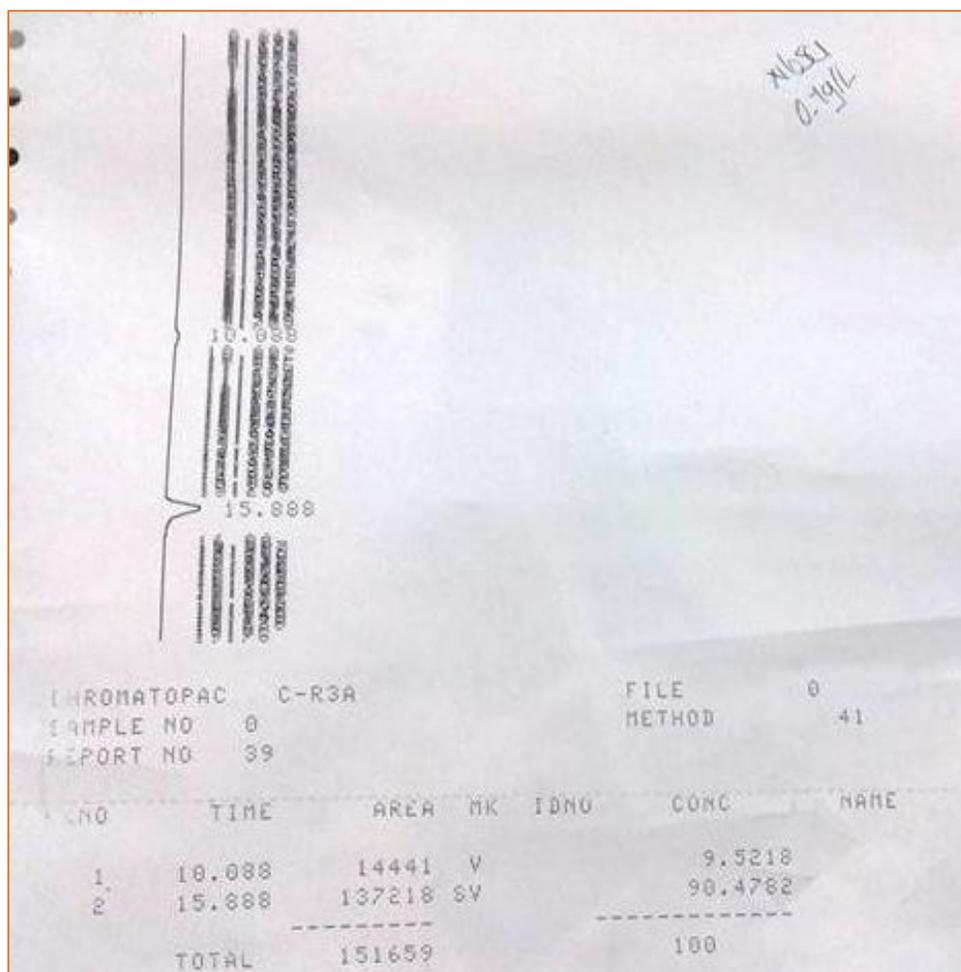


Figura 16: Cromatograma que muestra el tiempo de retención y área de una solución de xilosa de 0.1 g/L.

4.2 Hidrólisis Ácida

Los resultados obtenidos por HPLC para la hidrólisis ácida son mostrados en la figura 17.

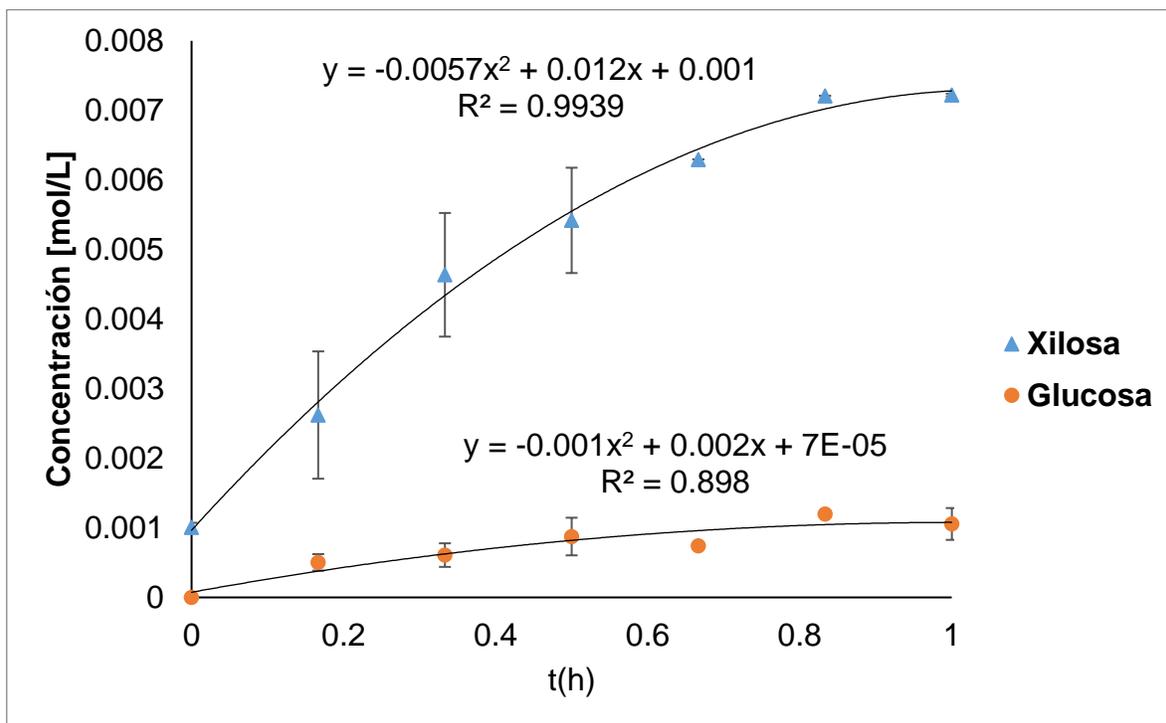


Figura 17: Concentración de glucosa y xilosa obtenidas durante la hidrólisis ácida de *Ipomoea arborecens*.

En la hidrólisis ácida de palo blanco, la xilosa es producida a una rapidez de 0.0124 mol/(L*h) y la glucosa es producida a una rapidez de 0.002 mol/(L*h). En la Figura 16 la concentración de xilosa obtenida a una hora fue de 7×10^{-3} mol/L y de 1×10^{-3} mol/L de glucosa; lo anterior corresponde a una concentración de 1.05 g/L de xilosa y de 0.18 g/L de glucosa. Estos dos carbohidratos provienen de la hemicelulosa de *Ipomoea arborecens*; considerando la composición de esta planta (25.73 % en peso de hemicelulosa) y la cantidad de muestra analizada fue de esta al sistema fue de 10 g de palo blanco, se obtiene que la cantidad máxima de xilosa y glucosa

esperada en un litro es de 2.573 g (cantidad máxima esperada de azúcares por la hidrólisis de la hemicelulosa); en el proceso de hidrólisis ácida fueron obtenidos 1.05 g de xilosa y de 0.18 g esto es 1.23 g de carbohidratos. Esto implica que el porcentaje de eficiencia de la hidrólisis ácida fue del 47.85% ($1.23/2.573 \times 100\%$).

4.3 Hidrólisis Enzimática

Como resultado de esta etapa de hidrólisis enzimática se espera obtener únicamente glucosa; dado que las celulasas hidrolizan celulosa; la cual está compuesta de glucosa. Los resultados obtenidos son mostrados en la Figura 18.

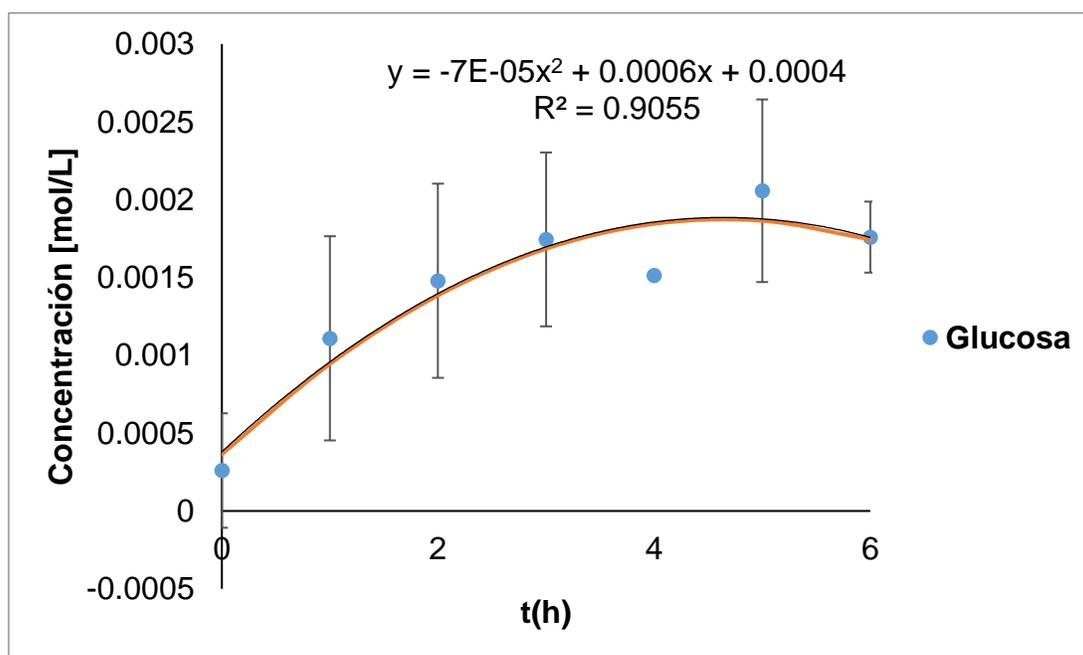


Figura 18: Formación de glucosa durante la hidrólisis enzimática de tejidos pretratados con hidrólisis ácida de *Ipomoea arborecens* a 40°C, pH 4.5 y con una concentración de celulasa de 0.5 g/L.

Cabe mencionar que la velocidad experimental que se obtuvo 0.0006 mol/(L*h) como se muestra en la figura anterior. La concentración máxima de glucosa expresada en g/l fue de 0.002 mol/L. Considerando el peso molecular de la glucosa

igual a 180 g/mol, la concentración máxima de glucosa obtenida fue de 0.36 g/l de glucosa. Respecto a la hidrólisis ácida, si esta hubiera sido 100 por ciento efectiva, la cantidad máxima de celulosa sería de 4.147 g, como se degradaron aproximadamente el 50% de hemicelulosa por hidrólisis ácida, este proceso expuso el 50% de la hemicelulosa contenida (2.073 g); considerando esta información y la cantidad de glucosa obtenida durante la hidrólisis enzimática, la eficiencia de este proceso fue de 17% ($0.36/2.073 \times 100\%$).

En un artículo realizado por Nanssou (2016) [34]. Mencionaron que el rendimiento para la hidrólisis enzimática del tallo de yuca obtenido bajo las condiciones óptimas fue de 73.1% y 86.6% de eficiencia según los estudios experimentales.

Martin-Davison en 2015 [35], estudió el álamo híbrido H-29 para la producción de bioetanol donde el porcentaje de rendimiento para la hidrólisis enzimática fue del 67% eficiencia aproximadamente.

Haciendo una comparación de los resultados obtenidos de la eficiencia de la hidrólisis enzimática con los de la bibliografía, la relación sólido-líquido utilizada en esta investigación fue de aproximadamente de 7g/L, mientras que en las hidrólisis mencionadas anteriormente, se utilizó una relación sólido-líquido de 4 gramos en 50 ml, obteniendo una eficiencia más elevada a la de este estudio.

Los datos presentados en la Figura 18 fueron analizados mediante el método diferencial de la ecuación de Michaelis-Menten para obtener los valores de (V_m) y la constante (K_m) por Michaelis-Menten.

4.4 Formas de Análisis de la Ecuación de Michaelis Menten.

Existen varios métodos diferenciales con los cuales son posibles obtener los parámetros de la cinética enzimática como la velocidad máxima de reacción (V_m) y la constante de Michaelis-Menten (K_m), los métodos diferenciales utilizados en

esta investigación fueron: Lineweaver-Burk, Edie-Hofstee, Hanes-Woolf, y de Regresión No lineal.

4.4.1 Método de Lineweaver-Burk

Se puede linealizar la ecuación en forma de doble recíproco

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{V_m} + \frac{K_m}{V_m} \frac{1}{[S]}$$

Ec.(9)

Sabiendo que

$$X = \frac{1}{S}$$

Ec.(10)

$$Y = \frac{1}{V}$$

Ec.(11)

De los datos mostrados en el gráfico de la Figura 18. Se obtuvo la velocidad de reacción a cada tiempo muestreado; esto es la derivada en ese punto. Para realizar lo anterior se ajustó un polinomio de segundo grado, derivado y evaluado a los tiempos correspondientes. El polinomio que describe la concentración de glucosa en función del tiempo fue obtenido en la Tabla II.

Tabla II: Velocidades de formación de glucosa en la reacción en cada intervalo de tiempo y concentración de celulosa residual.

	Velocidad de formación de glucosa	Concentración de celulosa a cada tiempo
Tiempo (h)	dG/dt (mol/(L*h))	Ccel (mol/L)
0	0.00065	0.000115146
1	0.00051	0.00010776
2	0.00037	0.000104543
3	0.00023	0.000102234
5	0	9.95E-05

Al derivar la ecuación mostrada en la figura 17 se obtiene que

$$\frac{dC_{glucosa}}{dt} = -14 \times 10^{-5} t + 0.0006$$

Ec.(12)

Sustituyendo el tiempo en la ecuación anterior obtenemos la velocidad de reacción en cada tiempo.

Con la información mostrada en la literatura se sabe que al graficar la velocidad de reacción contra la concentración de cualquier sistema, la curva debe iniciar en el origen. Observando la Tabla II se puede apreciar que los datos obtenidos no inician desde el origen, por lo cual se debe realizar una traslación de eje, esto significa que a la concentración de cada instante le restamos la concentración correspondiente a la velocidad de reacción menor.

Los resultados presentados de esta manera fueron analizados mediante el método de Doble recíproco (Lineweaver-Burk). De la tabla anterior se sabe que la concentración con la cual se obtiene la velocidad mínima de la reacción es (S_0), que es igual a 9.95×10^{-5} mol/L, la concentración trasladada es:

$$S^* = (S - 9.95 \times 10^{-5})$$

Ec.(13)

Sustituyendo los valores en las expresiones de X y Y, para cada valor de velocidad con la concentración (S^*), se procede a graficar obteniendo un resultado como la Figura 19.

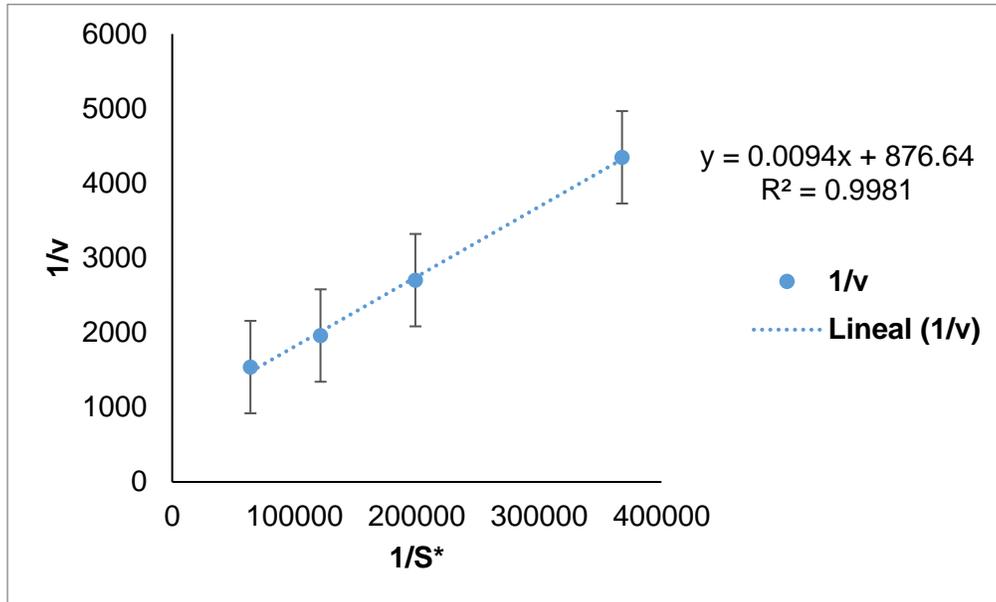


Figura 19: Gráfica obtenida por el método de doble recíproco, obteniendo como resultado la concentración trasladada, S^* .

Los resultados obtenidos en la figura 19 nos pueden ayudar para obtener los valores de K_m y V_m .

Por lo tanto

$$pendiente = \frac{K_m}{V_m} \tag{Ec.(14)}$$

De la gráfica se obtuvo que

$$pendiente = \frac{K_m}{V_m} = 0.0094 \tag{Ec.(15)}$$

Del mismo modo que

$$interseccion = \frac{1}{V_m}$$

Ec.(16)

Al sustituir los valores se obtuvo que

$$876.64 = \frac{1}{V_m}$$

Ec.(17)

Despejando V_m , resulta

$$V_m = \frac{1}{876.64} = 1.14 \times 10^{-3} \text{ mol}/(L * h)$$

Ec.(18)

De la primera ecuación se despejó K_m , sabiendo que la *pendiente* = 0.0094 y que $V_m = 0.0011$, por lo que la ecuación nos quedaría

$$K_m = (\text{pendiente})(0.0011) = (0.0094)(0.0011) = 1.07 \times 10^{-5} \text{ mol}/L$$

Ec.(19)

4.4.2 Método de Eadie-Hofstee

La siguiente ecuación es un reajuste de la ecuación, $v = \frac{V_m[S]}{K_m + [S]}$ por lo que se obtiene la siguiente expresión

$$v = V_m - K_m \frac{v}{[S]}$$

Ec.(20)

En esta ecuación decimos que

$$X = \frac{V}{[S]}$$

Ec.(21)

$$Y = V$$

Ec.(22)

Conociendo los resultados de los valores de X y Y, se obtiene la ecuación de la recta.

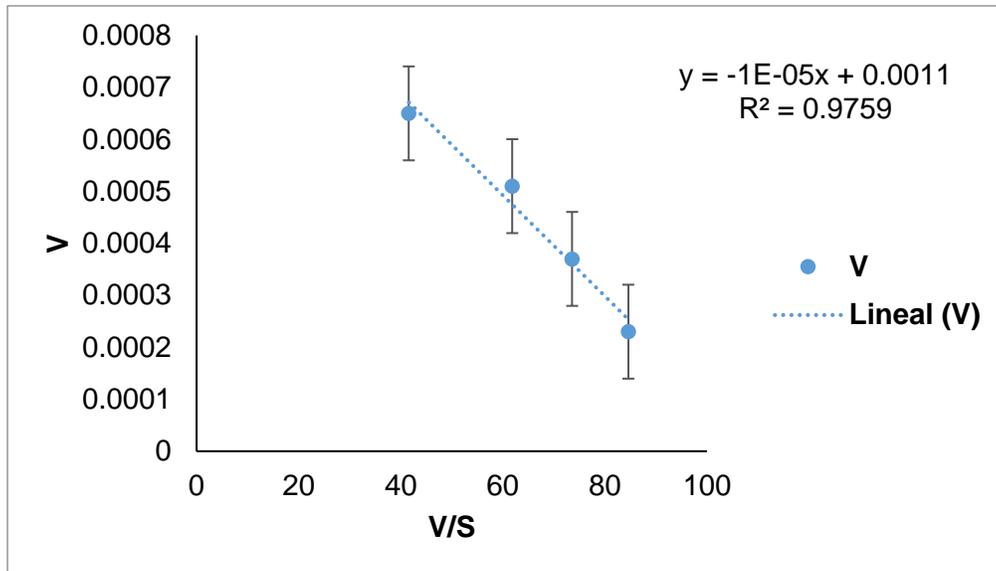


Figura 20: Gráfica obtenida por el método Eadie-Hofstee plot, donde se aprecia la ecuación de la recta obtenida.

De la figura 20 se sabe que

$$\text{pendiente} = -K_m \quad \text{Ec.(23)}$$

Por lo que

$$-\text{pendiente} = K_m = 1 \times 10^{-5} \text{ mol/L} \quad \text{Ec.(24)}$$

También de la gráfica se sabe que

$$\text{interseccion} = V_m = 1.10 \times 10^{-3} \text{ mol/(L * h)} \quad \text{Ec.(25)}$$

4.4.3 Método de Hanes-Woolf

De la misma forma la ecuación que se utilizó para el reareglo, en el método anterior, se puede obtener

$$\frac{[S]}{v} = \frac{K_m}{V_m} + \frac{1}{V_m} [S] \quad \text{Ec.(26)}$$

Expresando los valores

$$X = [S] \quad \text{Ec.(27)}$$

$$Y = \frac{[S]}{V} \quad \text{Ec.(28)}$$

Con estos valores se puede obtener el siguiente gráfico, expresado en la figura 20.

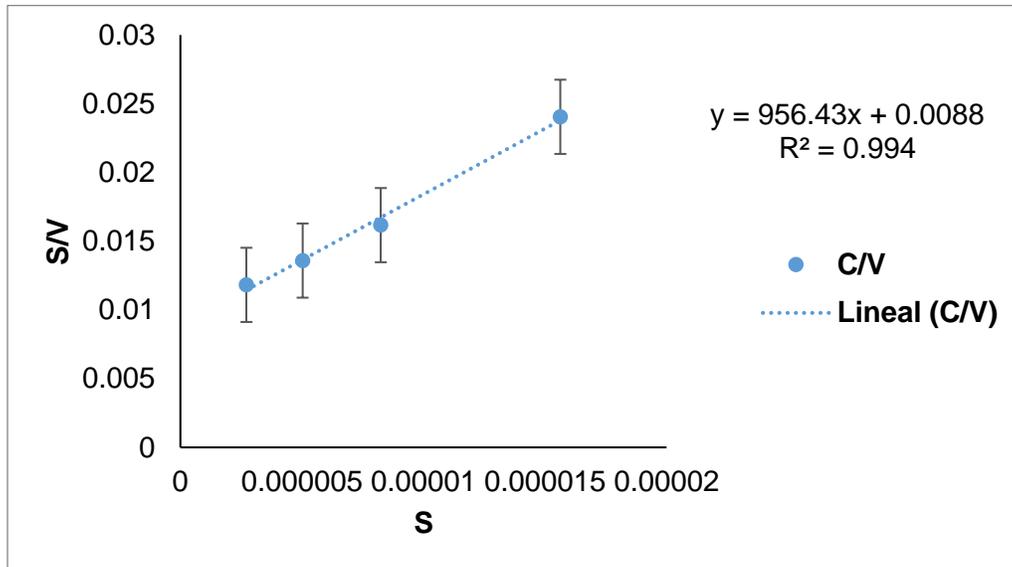


Figura 21: Gráfica obtenida por el método Hanes-Woolf plot, donde se obtiene la ecuación de la recta por este método.

De la gráfica sabemos que

$$\text{pendiente} = \frac{1}{V_m} \quad \text{Ec.(29)}$$

Por lo que

$$956.43 = \frac{1}{V_m} \quad \text{Ec.(30)}$$

Despejando el V_m obtenemos

$$V_m = \frac{1}{956.43} = 1.04 \times 10^{-3} \text{ mol}/(L * h) \quad \text{Ec.(31)}$$

Del mismo modo sabemos que

$$interseccion = \frac{K_m}{V_m} \quad \text{Ec.(32)}$$

Por lo que

$$0.0088 = \frac{K_m}{0.00105} \quad \text{Ec.(33)}$$

Despejando el valor de K_m

$$K_m = (0.0088)(0.00105) = 9.2 \times 10^{-6} \text{ mol/L} \quad \text{Ec.(34)}$$

4.4.4 Método de Regresión No Lineal

Existe también un método diferencial el cual consiste en una regresión no lineal, para obtener resultados que describan de una mejor forma los datos obtenidos.

Una descripción más adecuada de los datos se obtiene al realizar una regresión no lineal y mínimos cuadrados; el procedimiento consiste en variar los valores de K_m y V_{max} hasta que se obtenga un mínimo valor de la suma de las diferencias cuadradas de los datos experimentales y los datos dados por el modelo.

Con ayuda del método de doble recíproco sabemos que al graficar $1/V$ vs $1/S^*$, obtenemos los valores de $K_m = 1.07 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ y $V_m = 0.0011 \text{ mol/(L}^* \text{h)}$, con ellos se obtendrá una nueva velocidad la cual serán las velocidades del siguiente modelo de ecuación.

$$V = \frac{(V_m)(S^*)}{K_m + S^*} \quad \text{Ec.(35)}$$

Siguiendo los pasos mencionados anteriormente y con la ayuda de la herramienta de análisis de Excel (solver), se pudo obtener los datos de los valores de K_m y V_m correspondientes que mejor nos describan la regresión no lineal, estos datos son mostrados en la tabla III.

Tabla III: Resultados obtenidos de los parámetros de la regresión no lineal mediante la herramienta de análisis *Solver*.

S*	V EXP	V MODELO	 (VEXP-VMOD)
1.56E-05	0.00065	6.50E-04	7.56E-12
8.25E-06	0.00051	4.92E-04	1.81E-05
5.03E-06	0.00037	3.70E-04	1.16E-08
2.72E-06	0.00023	2.40E-04	1.04E-05
0	0	0.00E+00	0
			2.85E-05

Los resultados arrojados por la herramienta de análisis de Excel (solver), fueron que los valores de $k_m = 8.75 \times 10^{-6}$ mol/L y $V_m = 1.01 \times 10^{-3}$ mol/(L*h).

El coeficiente de correlación fue obtenido correlacionando los valores de velocidades experimentales con los valores obtenidos utilizando los parámetros de V_m y K_m de la Regresión No Lineal. Posteriormente el coeficiente de correlación (R) obtenido de los datos de la Regresión No Lineal fue elevado al cuadrado para obtener el coeficiente de determinación al cuadrado (R^2), el cual sería 0.9985.

4.5 Comparación de los Parámetros Cinéticos Obtenidos por los Métodos Diferenciales.

La siguiente tabla resume los resultados obtenidos de los valores de K_m y V_m , de cada método diferencial utilizado.

Tabla IV: Resultados obtenidos de K_m y V_m por el método Diferencial.

Tipo	Método de Análisis	R^2	$K_m = \left(\frac{\text{mol}}{L}\right)$	$V_m = \left(\frac{\text{mol}}{L * h}\right)$
Diferencial	Doble Recíproco $\frac{1}{v} = \frac{1}{V_m} + \frac{K_m}{V_m} \frac{1}{[S]}$	0.9981	1.07×10^{-5}	1.14×10^{-3}
	Eadie-Hofstee plot $v = V_m - K_m \frac{v}{[S]}$	0.9759	1×10^{-5}	1.10×10^{-3}
	Hanes-Woolf plot $\frac{[S]}{v} = \frac{K_m}{V_m} + \frac{1}{V_m} [S]$	0.9940	9.2×10^{-6}	1.04×10^{-3}
	Regresión no lineal $v = \frac{V_m [S]}{K_m + [S]}$	0.9985	8.75×10^{-6}	1.01×10^{-3}

En base a los valores obtenidos de los parámetros de K_m y V_m de cada uno de los métodos diferenciales utilizados y mostrados en la tabla IV, se puede realizar una comparación de las curvas; tomando como referencia los valores de velocidad obtenidos al calcular $dC_{glucosa}/dt$.

Analizando todos los métodos diferenciales utilizados, se pudo saber que el método de regresión no lineal es el que más se asemeja a las velocidades obtenidas experimentalmente, siendo este el más adecuado para la cinética de reacción utilizada.

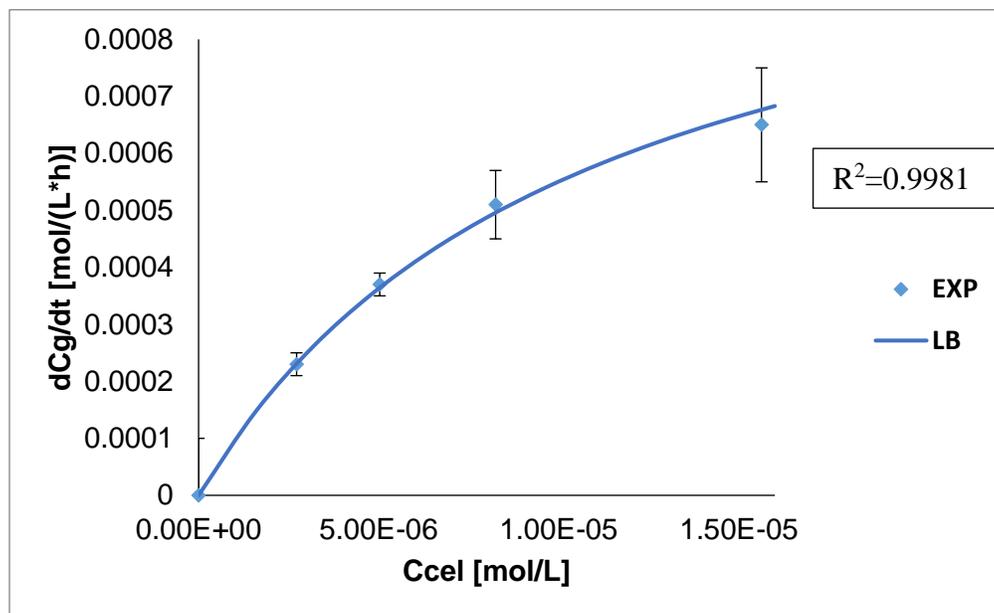


Figura 22: Descripción de los datos experimentales por los valores de K_m y V_m obtenidos por el método Linewaver-Burk.

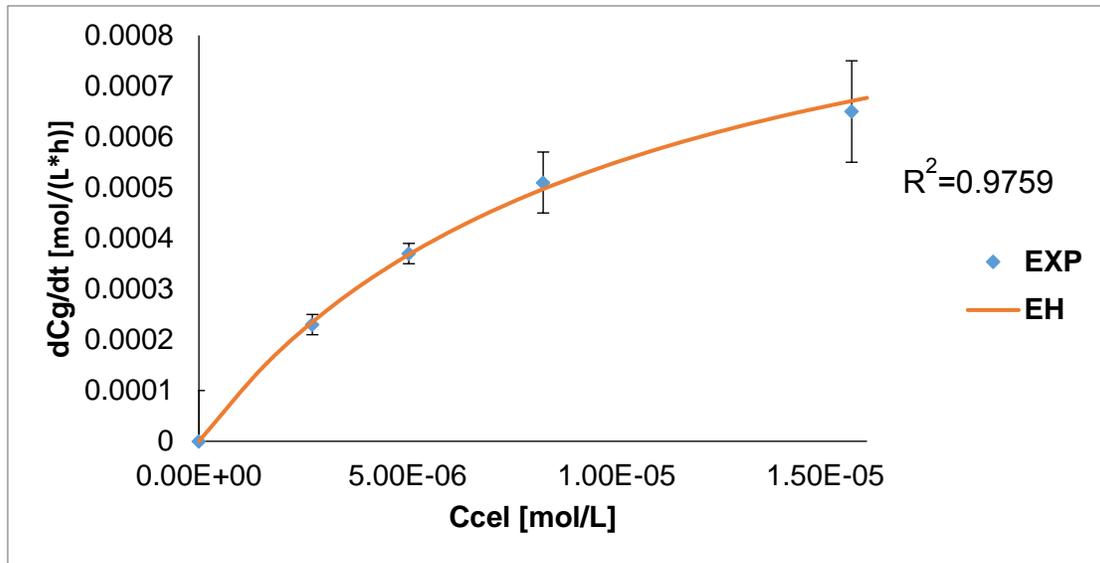


Figura 23: Descripción de los datos experimentales por los valores de K_m y V_m obtenidos por el método Eadie-Hofstee.

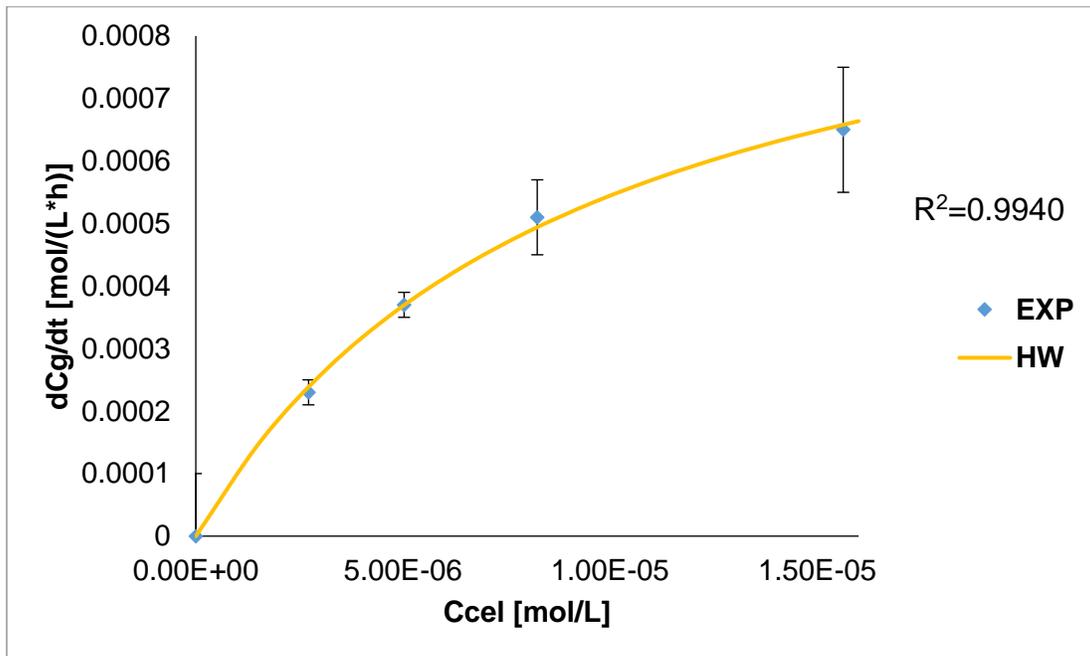


Figura 24: Descripción de los datos experimentales por los valores de K_m y V_m obtenidos por el método Hanes-Woolf.

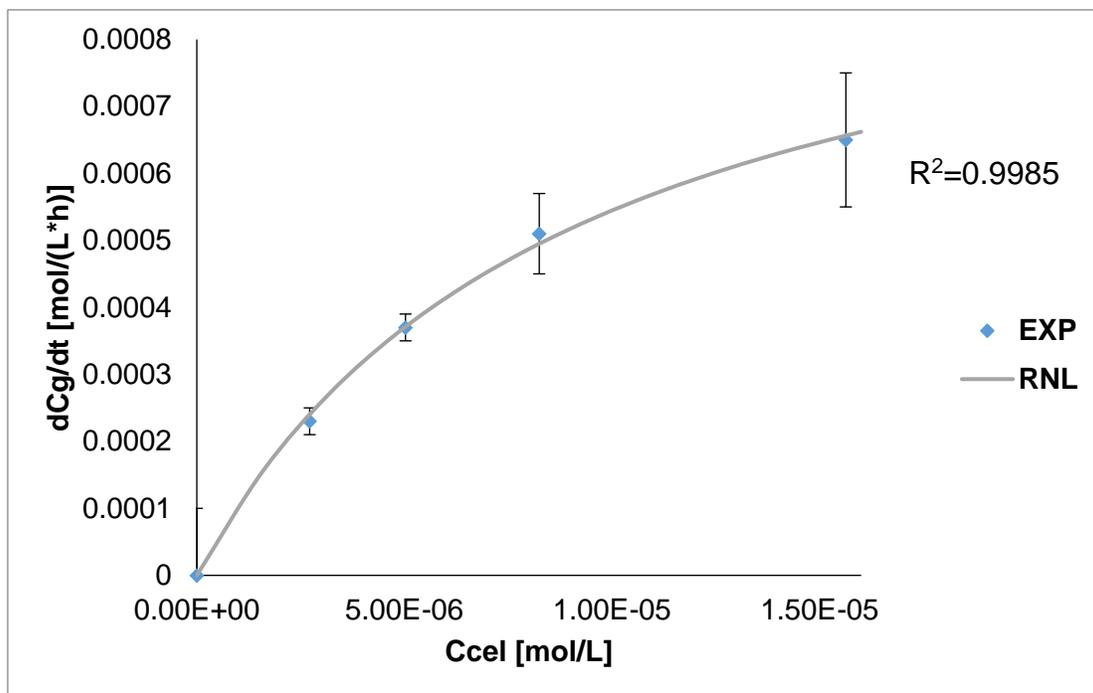


Figura 25: Descripción de los datos experimentales por los valores de Km y Vm obtenidos por el método Regresión no Lineal.

4.6 Actividad Enzimática de la Enzima Celulasa Utilizada.

La unidad de actividad enzimática (U) es la cantidad de enzima que cataliza la conversión de 1 μmol de sustrato en un minuto, recientemente el Sistema Internacional de Unidades (SI), la define como la cantidad de enzima que transforma 1 mol de sustrato por segundo. A la cual esta unidad se le denomina como katal (kat). Como 1 mol son 10^6 μmoles y 1 minuto son 60 segundos, resulta que 1 katal equivale a $60 \times 10^6 \text{U}$. Esta unidad es muy grande, de forma que se utilizan frecuentemente los submúltiplos como el microkatal (μkat , 10^{-6} kat) o el nanokatal (nkat, 10^{-9} kat).

De los datos obtenidos de la presente investigación conocemos que la velocidad experimental de formación de la glucosa es $6 \times 10^{-4} \frac{\text{mol de Glucosa Producida}}{\text{L} \cdot \text{h}}$. A la hidrólisis enzimática se le agregaron 0.5 g de celulasa en un litro de agua, por lo que para obtener los moles de dicha celulasa se dividió por el peso molecular de ella misma:

$$\left(0.5 \frac{g \text{ de celulosa}}{L}\right) \left(\frac{1 \text{ mol de celulosa}}{48000 \text{ g de celulosa}}\right) = 1.04 \times 10^{-5} \frac{\text{mol de celulosa}}{L}$$

Ec.(37)

Encinas en 2015 [3], reportó que la fórmula empírica de la hemicelulosa de *Cenchrus ciliaris* tenía una composición empírica de 115 unidades de glucosa por mol de celulosa.

Con esta información y la velocidad de producción de glucosa de $6 \times 10^{-4} \frac{\text{mol de Glucosa Producida}}{L \cdot h}$ es estimada la velocidad de degradación de celulosa,

la cual es $5.21 \times 10^{-6} \frac{\text{mol de Celulosa Producida}}{L \cdot h}$. Dividiendo la velocidad de degradación

de celulosa entre la concentración de celulosa agregada en mol por litro, se obtiene el número de moles de celulosa que pueden ser degradados por mol de celulosa en la unidad de tiempo; esto es una cantidad igual a 0.5 mol de celulosa/(mol de celulosa*h). Definiendo la cantidad catalítica como la cantidad de enzima necesaria para degradar 1 micromol de celulosa en un minuto se obtiene que la actividad de la enzima es de 8333 micromol de celulosa /minuto por mol de celulosa. Por lo tanto la cantidad de enzima necesaria para degradar un micromol de celulosa en un minuto es de $1/8333 = 1.2 \times 10^{-4}$ mol de celulosa.

5 CONCLUSIONES

Las conclusiones del trabajo presentado se basan en los objetivos generales y específicos que se resaltaron con anterioridad.

1. Al realizar el proceso de hidrólisis ácida, se obtuvo que el porcentaje de eficiencia de dicho proceso fue de 49.48%.
2. Para la hidrólisis enzimática se obtuvo un rendimiento del 17% .
3. Asumiendo un sistema pseudohomogeneo la cinética de la hidrólisis enzimática a 40°C y pH 4.5 es caracterizada por $K_m = 8.75 \times 10^{-6}$ mol/l de celulosa y $V_m = 1.01 \times 10^{-3}$ mol/(L*h) de glucosa obtenidas mediante la metodología de regresión no lineal.
4. Observando las curvas de los diferentes métodos utilizados resulta evidente que la curva de regresión no lineal es la que más se asemeja o se ajusta a los datos experimentales.
5. La actividad enzimática de la celulasa utilizada mostro que para degradar un micromol de celulosa en un minuto es necesario 1.2×10^{-4} mol de celulasa.

6 BIBLIOGRAFÍA

- [1]. Ureña, M. J. C. (2009). Generación de energía a partir de residuos biomásicos mediante la técnica de gasificación: alternativa para la reducción de la contaminación por residuos sólidos y la emisión de gases efecto invernadero. Costa Rica.
- [2]. Torrecano, J.M.A. (2009). Producción de etanol a partir de buffel. (Tesis de Pregrado). Universidad de Sonora, Hermosillo, México.
- [3]. Encinas, K.K.S. (2010). Estudio cinético de la formación de xilosa por hidrólisis con ácido sulfúrico diluido de *Cenchrus ciliaris*. (Tesis de Maestría) . Universidad de Sonora, Hermosillo, México.
- [4]. Murillo, A.E.L. (2010). Determinación de los parámetros cinéticos del pretratamiento por hidrólisis ácida de "Ipomoea arborecens" (2010). (Tesis de Maestría). Universidad de Sonora, Hermosillo, México.
- [5]. Contreras, L. M., López, L., & Romero, O. (2006). Producción de biogás con fines energéticos. De lo histórico a lo estratégico. *Revista futuros*, 16(4), 1-8.
- [6]. McMillan, J. D. (1994). Pretreatment of lignocellulosic biomass. In *ACS symposium series (USA)*.
- [7]. Dewes, T., & Hünsche, E. (1998). Composition and microbial degradability in the soil of farmyard manure from ecologically-managed farms. *Biological agriculture & horticulture*, 16(3), 251-268.
- [8]. Reshamwala, S., Shawky, B. T., & Dale, B. E. (1995). Ethanol production from enzymatic hydrolysates of AFEX-treated coastal bermudagrass and switchgrass. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 51(1), 43-55.

- [9]. Cheung, S. W., & Anderson, B. C. (1997). Laboratory investigation of ethanol production from municipal primary wastewater solids. *Bioresource technology*, 59(1), 81-96.
- [10]. Saha, B. C. (2003). Hemicellulose bioconversion. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 30(5), 279-291.
- [11]. Sun, Y., & Cheng, J. (2002). Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresource technology*, 83(1), 1-11.
- [12]. Mussatto, S., Dragone, G., Fernandes, M., Rochan, G., & Robert, I. (2006). Efecto de los tratamientos de hidrólisis ácida e hidrólisis alcalina en la estructura del bagazo de malta para liberación de fibras de celulosa. *XXII Interamerican Confederation of Chemical Engineering. V. Asociación Argentina de Ingenieros Químicos. Resumen en extenso*, 357.
- [13]. Turley, D. B., Booth, E., Green, M., Karp, A., Shield, I., Stock, D., & Turley, D. (2008). Technology and policy requirements in the drive towards improving bioenergy efficiency. *Aspects of Applied Biology*, (90), 3-10.
- [14]. Katzen, R., & Schell, D. J. (2006). Lignocellulosic feedstock biorefinery: history and plant development for biomass hydrolysis. *Biorefineries-Industrial Processes and Products: Status Quo and Future Directions*, 129-138.
- [15]. Canettieri, E. V., de Moraes Rocha, G. J., De Carvalho, J. A., & e Silva, J. B. D. A. (2007). Optimization of acid hydrolysis from the hemicellulosic fraction of *Eucalyptus grandis* residue using response surface methodology. *Bioresource Technology*, 98(2), 422-428.

- [16]. Liao, W., Liu, Y., Frear, C., & Chen, S. (2008). Co-production of fumaric acid and chitin from a nitrogen-rich lignocellulosic material—dairy manure—using a pelletized filamentous fungus *Rhizopus oryzae* ATCC 20344. *Bioresource technology*, 99(13), 5859-5866.
- [17] Neureiter, M., Danner, H., Frühauf, S., Kromus, S., Thomasser, C., Braun, R., & Narodoslawsky, M. (2004). Dilute acid hydrolysis of presscakes from silage and grass to recover hemicellulose-derived sugars. *Bioresource technology*, 92(1), 21-29.
- [18]. Bienkowski, P. R., Ladisch, M. R., Voloch, M., & Tsao, G. T. (1984, January). Acid hydrolysis of pretreated lignocellulose from corn residue. In *Biotechnol. Bioeng. Symp.:(United States)* (Vol. 16, No. CONF-840509-). Purdue Univ., West Lafayette, IN.
- [19]. Sanchez, G., Pilcher, L., Roslander, C., Modig, T., Galbe, M., & Liden, G. (2004). Dilute-acid hydrolysis for fermentation of the Bolivian straw material Paja Brava. *Bioresource Technology*, 93(3), 249-256.
- [20]. Pessoa Jr, A., Mancilha, I. M., & Sato, S. (1997). Acid hydrolysis of hemicellulose from sugarcane bagasse. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 14.
- [21]. Kindel, S. (1981), Enzymes, the bio-industrial revolution. *Technology* 1, 62-74.
- [22]. Ryu, S., & Karim, M. N. (2009). One Step Cellulosic Ethanol Production. In *The 2009 Spring National Meeting*.
- [23]. Scriban, R. (1985). *Biotecnología. Ed. Manual moderno.*(583-588)

- [24]. Macarrón, L. R. (1992). *Purificación y caracterización de endoglucanasa III de Trichoderma reesei "QM9414"* (Doctoral dissertation, Tesis doctoral). Universidad Complutense de Madrid).
- [25]. Menon, V., Prakash, G., & Rao, M. (2010). Enzymatic hydrolysis and ethanol production using xyloglucanase and *Debaromyces hansenii* from tamarind kernel powder: galactoxyloglucan predominant hemicellulose. *Journal of biotechnology*, 148(4), 233-239.
- [26]. Wan, C., & Li, Y. (2010). Microbial pretreatment of corn stover with *Ceriporiopsis subvermispora* for enzymatic hydrolysis and ethanol production. *Bioresource Technology*, 101(16), 6398-6403.
- [27]. Yangkai, D., Shen, T., Yong, Y., Guixiong, Z., & Xiushan, Y. (2009). MODIFIED TECHNOLOGY OF SWITCHGRASS PRETREATMENT FOR ETHANOL PRODUCTION [J]. *Acta Energiæ Solaris Sinica*, 12, 026.
- [28]. Persson, T., Ren, J. L., Joelsson, E., & Jönsson, A. S. (2009). Fractionation of wheat and barley straw to access high-molecular-mass hemicelluloses prior to ethanol production. *Bioresource technology*, 100(17), 3906-3913.
- [29]. Ryu, S., & Karim, M. N. (2009). One Step Cellulosic Ethanol Production. In *The 2009 Spring National Meeting*.
- [30]. Dustet, J., Carmenate, M., & Haramboure, T. (2000). Obtención de celulasas de *Aspergillus niger*, técnica de cultivo y método de separación. *Cuba. Pág.* 1-50.
- [31]. Mamman, A. S., Lee, J. M., Kim, Y. C., Hwang, I. T., Park, N. J., Hwang, Y. K., ... & Hwang, J. S. (2008). Furfural: Hemicellulose/xyloxyderived biochemical. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 2(5), 438-454.

- [32]. Villena, G. K., & Gutiérrez-Correa, M. (2003). Biopelículas de *Aspergillus niger* para la producción de celulasas: algunos aspectos estructurales y fisiológicos. *Revista peruana de Biología*, 10(1), 78-87.
- [33]. Turner, B., Skole, D., Sanderson, S., Fischer, G., Fresco, L., & Leemans, R. (1995). Land-use and land-cover change. In *International Geosphere-Biosphere Programme, Stockholm; Report*, 35.
- [34]. Nanssou, P. A. K., Nono, Y. J., & Kapseu, C. (2016). Pretreatment of cassava steams and peelings by thermohydrolysis to enhance hydrolysis yield of cellulose in bioethanol process. *Renewable Energy*, 97, 252-265
- [35]. Martín-Davison, J. S., Ballesteron, M., Manzanares, P., Sepúlveda, X. P. B., & Vergara-Fernandez A. (2015). Effects of temperature on steam explosion pretreatment of poplar hybrids with different lignin contents in bioethanol production. *International Journal of Green Energy*, 12(8), 832-842.