



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SANTA



**UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SANTA
FACULTAD DE INGENIERÍA
ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE
INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL**



**“DETERMINACIÓN DE LAS CONCENTRACIONES DE ENZIMAS
Celulasa y β -*Glucosidasa* PARA LA OBTENCIÓN DE AZÚCARES
FERMENTABLES A PARTIR DE CASCARILLA DE ARROZ”**

**TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE
INGENIERO AGROINDUSTRIAL**

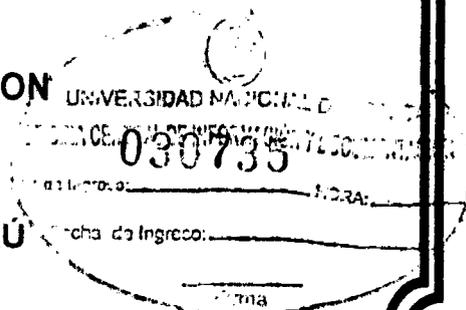
AUTORES:

**Bach. CHICO LEON HENRY GERMAN
Bach. SANDOVAL ROJAS DANIEL ALBERTO**

ASESOR:

Dr. AUGUSTO CASTILLO CALDERON

**NUEVO CHIMBOTE - PERÚ
2015**





UNS
UNIVERSIDAD
NACIONAL DEL SANTA

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SANTA

FACULTAD DE INGENIERIA

ESCUELA ACADEMICO PROFESIONAL DE INGENIERIA AGROINDUSTRIAL

HOJA DE CONFORMIDAD DE ASESOR

El presente trabajo de tesis titulado: **“DETERMINACION DE LAS CONCENTRACIONES DE ENZIMAS *Celulasa* Y *β-Glucosidasa* PARA LA OBTENCIÓN DE AZÚCARES FERMENTABLES A PARTIR DE CASCARILLA DE ARROZ”**, ha contado con el asesoramiento de quien deja constancia de su aprobación. Por tal motivo, firmo el presente trabajo en calidad de asesor, designado por RESOLUCION DECANATURAL N° 702-2013-UNS-FI.


Dr. AUGUSTO CASTILLO CALDERÓN
ASESOR



UNS
UNIVERSIDAD
NACIONAL DEL SANTA

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SANTA

FACULTAD DE INGENIERIA

ESCUELA ACADEMICO PROFESIONAL DE INGENIERIA AGROINDUSTRIAL

**TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE
INGENIERO AGROINDUSTRIAL**

**“DETERMINACION DE LAS CONCENTRACIONES DE ENZIMAS *Celulasa* Y β -
Glucosidasa PARA LA OBTENCIÓN DE AZÚCARES FERMENTABLES A
PARTIR DE CASCARILLA DE ARROZ”**

TESISTAS

Bach. Chico León Henry German

Bach. Sandoval Rojas Daniel Alberto

Revisado y aprobado el día 04 de Noviembre de 2015 por el siguiente Jurado Evaluador,
designado mediante Resolución Decanatural N° 353-2015-UNS-CFI:



Dr. GILBERT RODRÍGUEZ PAUCAR
PRESIDENTE



Ms. JORGE DOMÍNGUEZ CASTAÑEDA
SECRETARIO



Dr. AUGUSTO CASTILLO CALDERÓN
INTEGRANTE

DEDICATORIA

*Como todas las cosas de mi vida,
a Dios, por permitirme concluir esta etapa
y darme una oportunidad en cada minuto.*

*A mi madre, mi más grande apoyo
por toda su dedicación y sacrificio,
con el que me demuestra todo su cariño.*

Henry German.

*A Dios,
Por acompañarme siempre en todos los momentos
de dificultad, permitiéndome terminar
satisfactoriamente los proyectos a lo largo de mi
vida y cuidar a mi familia.*

*A mis padres,
Por darme una maravillosa formación, por todo su
amor y contagiarme de sus mayores fortalezas.*

Daniel Alberto.

AGRADECIMIENTOS

Queremos agradecer a Dios, por darnos la fortaleza para lograr esta meta, por estar en cada paso de nuestras vidas y por habernos puesto en el camino aquellas personas que han sido guía y compañía durante todo el periodo de estudio.

A nuestros padres por infundirnos la ética y el rigor que nos guían en el transitar de la vida.

Queremos también presentar nuestros agradecimientos a todos los docentes por compartir sus conocimientos, dedicación, tiempo y motivarnos a salir adelante y aquellos que gentilmente nos escucharon y aportaron en nuestra tesis con sus ideas; a nuestro asesor el M.Sc. Augusto Castillo Calderón por su asesoramiento científico, estímulo para seguir creciendo intelectualmente, por su apoyo y confianza en nuestro trabajo, su capacidad para guiar nuestras ideas ha sido un aporte invaluable, no solamente en el desarrollo de esta tesis, sino también en nuestra formación como profesionales por la disciplina que nos inculcó y la perseverancia ante los obstáculos. Las ideas propias, siempre enmarcadas en su orientación y rigurosidad, han sido la clave del buen trabajo que hemos realizado juntos. Le agradecemos también el habernos facilitado siempre los medios suficientes para llevar a cabo todas las actividades propuestas durante el desarrollo de esta investigación.

Al Ing. Williams Castillo Martínez por su incondicional apoyo en aclarar nuestras dudas, por sus sugerencias durante el desarrollo de la tesis y orientaciones en el análisis estadístico de los datos, por su amistad.

También para la Ing. Bereniz, cuyo apoyo fundamental en laboratorio nos facilitó el manejo de los instrumentos en todo momento e hizo un ambiente grato de trabajo.

A nuestro amigo y colega Lenin, y compañeros de clase por estar con nosotros en las buenas y en las malas, por hacer cada momento único e inolvidable. Y esperamos que esa amistad perdure por muchos años sin importar que ya no estemos en la universidad.

Por el soporte institucional dado para la realización de este trabajo, a la Universidad Nacional del Santa, que nos brindó la formación para ser buenos profesionales.

A todos ellos, gracias.

Henry G. – Daniel A.

RESUMEN

La presente investigación tiene como objetivo determinar las concentraciones de enzimas *celulasa* y *β-glucosidasa* para la obtención de azúcares fermentables a partir de la cascarilla de arroz. Donde, para el acondicionamiento del material lignocelulósico como etapa previa al hidrolizado, se sometió la cascarilla de arroz a un pretratamiento térmico – alcalino, con NaOH al 8% por 85 min y a una temperatura de 121°C, con el fin de disminuir su concentración de lignina. Resultado de este proceso se obtuvo la cascarilla de arroz pretratada, con una remoción de lignina del 66.55% de la concentración inicial.

Para la etapa de hidrólisis enzimática, los tratamientos de la investigación han sido planteados utilizando un Diseño Compuesto Central Rotable, donde el primer factor corresponde a la concentración de enzima *celulasa* (1 – 5%), y el segundo a la concentración de enzima *β-glucosidasa* (0.2 – 0.6%), ambas enzimas actuando de manera simultánea en cada medio de reacción; teniendo así un total de 12 tratamientos con 4 puntos centrales. Todos los experimentos se realizaron con un tiempo de hidrólisis de 48 horas. Al final de la hidrólisis se cuantificó azúcares reductores por el método DNS, y mediante un análisis estadístico se determinó la significancia de cada factor y su efecto en la formación de producto, además de la optimización de las concentraciones óptimas de enzimas en: *Celulasa* 5% y *β-glucosidasa* 0.2%. A partir de las concentraciones de enzimas óptimas se procedió a realizar un nuevo ensayo, donde se cuantificó azúcares reductores en 17.146 g/L. La caracterización de azúcares fermentables mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), permitió cuantificar rendimientos de 8.99g/L para glucosa y 2.83g/L para xilosa. La actividad enzimática fue 18.759 U/mg, los parámetros cinéticos $K_M = 21.103$ mg/ml, y baja reactividad, $V_{MÁX} = 0.0825$ g/L*min. Además, se realizó una fermentación con la cepa *Saccharomyces cerevisiae* por 8 horas, donde se validaron los resultados de la investigación obteniendo Bioetanol.

ABSTRACT

The present investigation has as object to determine the enzymes concentrations of *cellulase* and β -*glucosidase* to obtain fermentable sugars from rice husks. Where, for conditioning the lignocellulosic material as a prelude to the hydrolyzate, rice bran was subjected to a pretreatment thermic - alkaline with 8% NaOH to a temperature of 121°C during 85 min, in order to decrease its concentration lignin. Result of this process was obtained a lignin removal of 66.55% of the initial concentration.

For the enzymatic hydrolysis stage, the treatments have been propounded using a Compound Design Central Rotary, where the first factor corresponds to the concentration of *cellulase* enzyme (1-5%), and the second to the concentration of enzyme β -*glucosidase* (0.2 - 0.6%), both enzymes acting simultaneously in each reaction medium, with a total of 12 treatments with four center points. All experiments were performed with a hydrolysis time of 48 hours. At the end of hydrolysis was quantified the reducing sugar by the DNS method, also by statistical analysis was determined the significance of each factor and its effect on product formation, resulting in the optimal concentrations of enzymes: *Cellulase* 5% β -*glucosidase* 0.2%. Optimal concentrations of these enzymes were carried out a new test, where reducing sugars were quantified in 17.146 g/L. The characterization of fermentable sugars by high resolution liquid chromatography, allowed quantifying yields 8.99g/L glucose and 2.83g/L xylose. The enzyme activity was 9,167 U/mg, kinetic parameters $K_M = 10.87$ mg/ml, and low reactivity, $V_{MAX} = 0.0825$ g/L*min. Furthermore, of the hydrolysis product obtained with optimum concentrations of enzyme, a fermentation process was carried out with *Saccharomyces cerevisiae* for 8 hours, where the results of the investigation were validated by obtaining bioethanol.

ÍNDICE GENERAL

I. INTRODUCCION	14
II. REVISION BIBLIOGRAFICA	15
2.3. Lignina	19
2.4. Conceptos del Pretratamiento	20
2.4.1. Tipos de pretratamiento	21
2.5. Mecanismo de acción enzimática:	23
2.6. Cinética Enzimática:	25
2.7. Factores que influyen en la velocidad de las reacciones enzimáticas	27
2.8. Hidrólisis Enzimática	31
2.9. Azúcar Fermentable	33
2.9.1. Clasificación de Azúcares	33
2.9.2. Características de los Azúcares	34
2.9.3. Estructura	36
2.10. Fermentación	37
2.10.1. Fermentación de la glucosa: oxidación y producción de ATP	39
2.10.2. <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	39
2.11. Antecedentes:	40
2.12. Justificación e importancia del problema:	41
2.13. Objetivos	43
2.14. Problema	43
2.15. Hipotesis	43
III. METODOLOGIA	44
3.1. Diseño Experimental	44
3.1.1. Diagrama de Flujo Experimental	44
3.1.2. Esquema del Diseño Experimental	49

3.2. MATERIALES Y MÉTODOS	50
3.2.1. Materiales:	50
3.2.2. Equipos e instrumentos	52
3.3. Métodos:	53
3.3.1. Descripción de materia prima:	53
3.3.2. Análisis físico-químico:	53
3.3.3. Análisis con enzimas	56
3.3.4. Determinación de la composición proximal de azúcares del hidrolizado de cascarilla de arroz.	6^
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	64
4.1. Determinación de las características físico-químicas de la cascarilla de arroz	64
4.2. Selección del pretratamiento como etapa previa a la hidrólisis:	65
4.3. Hidrólisis enzimática de la cascarilla de arroz:	67
4.4. Determinación de las concentraciones óptimas de enzimas:	69
4.5. Determinación Cuantitativa de Glucosa	77
4.6. Caracterización del hidrolizado de cascarilla de arroz mediante HPLC.	77
V. CONCLUSIONES:	89
VI. RECOMENDACIONES	90
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	91

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Composición proximal de la cascarilla de arroz.	15
Tabla 2: Propiedades bioquímicas de la cascarilla de arroz en varios lugares del mundo.....	16
Tabla 3: Clasificación de monosacáridos basado en el número de carbonos	34
Tabla 4: Diseño Experimental de los tratamientos.....	49
Tabla 5: Composición de los medios de mantención, activación y cultivo para <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ATCC 4126.....	61
Tabla 6: Composición físico-químico de la cascarilla de arroz.	64
Tabla 7: Estadístico mostrando los 12 tratamientos con sus respuestas.....	68
Tabla 8: Análisis de Varianza (ANOVA) para Azúcares Reductores.....	70
Tabla 9: Coeficiente de regresión del modelo matemático	72
Tabla 10: Valores Críticos resultados de la optimización de los parámetros de concentración de enzimas	74
Tabla 11: Concentración de azúcares reductores en g/l producidos en el tiempo, a condiciones óptimas de concentración de enzimas.	75
Tabla 12: Determinación cuantitativa de glucosa en el hidrolizado de cascarilla de arroz pretratada, mediante kit Monlabtest.....	77
Tabla 13: Cromatograma de azúcares simples: Glucosa, xilosa y arabinosa en el hidrolizado de cascarilla de arroz pretratada, mediante HPLC.....	79
Tabla 14: Valores de producto para la determinación de actividad en el hidrolizado de cascarilla de arroz pretratada.....	81
Tabla 15: Obtención de la actividad enzimática para las concentraciones óptimas de enzimas	83
Tabla 16: Parámetros cinéticos de la enzima a las condiciones experimentales... 	84

Tabla 17: Resultados del análisis cromatográfico, % y concentración de Etanol. 87

INDICE DE FIGURAS

Figura 1: Estructura de la Celulosa	18
Figura 2: Curso de reacción enzimática.....	24
Figura 3: Cinética enzimática.....	26
Figura 4: Efecto del tiempo de hidrólisis.....	28
Figura 5: Efecto de la temperatura	29
Figura 6: Efecto de la concentración de Enzima	29
Figura 7: Efecto de la concentración de Sustrato	30
Figura 8: Efecto del pH.....	30
Figura 9: Enlaces Alfa	37
Figura 10: Enlaces Beta	37
Figura 11: Operaciones que intervienen para la obtención de azúcares fermentables.....	44
Figura 12: Molienda de la cascarilla de arroz.....	45
Figura 13: Tamizado de la cascarilla de arroz.....	46
Figura 14: Pretratamiento en autoclave de la cascarilla de arroz tamizada.	47
Figura 15: Sistema para la realización de la hidrólisis enzimática. Shaker.....	48
Figura 16: Centrifugado de la muestra.	48
Figura 17: Gráfica de Lineweaver-Burke o del doble recíproco.....	59
Figura 18: Diagrama de Pareto de los efectos estandarizados sobre la variable respuesta; Rendimiento de azúcares reductores.....	71
Figura 19: Superficie de respuesta tridimensional de los rendimientos de azúcares reductores en función a la concentración de enzimas utilizadas.	74
Figura 20: Representación gráfica de la cinética de reacción del complejo enzimático: Celulosa y β-glucosidasa a condiciones óptimas.	76

Figura 21: Cromatograma para determinación de azúcares simples en el hidrolizado de cascarilla de arroz pretratada: (a) Glucosa. (b) Xilosa. (c) Arabinosa	78
Figura 22: Representación gráfica de la actividad enzimática para las concentraciones óptimas de enzimas.	82
Figura 23: Parámetros Cinéticos $V_{m\acute{a}x}$ y K_m, para la concentración óptima de enzimas	84
Figura 24: Concentración de etanol en g/L, obtenido de la fermentación de <i>Sacharomyces cerevisiae</i> en el hidrolizado de cascarilla de arroz, durante 8 horas.	88

INDICE DE ANEXO

ANEXO 1: DIAGRAMA DE FLUJO	95
ANEXO 2: DETERMINACION DEL CONTENIDO DE CENIZAS	98
ANEXO 3: DETERMINACION DE LIGNINA METODO KLASON.....	99
ANEXO 4: DETERMINACION DE HOLOCELULOSA	101
ANEXO 5: DETERMINACION DE CELULOSA.....	103
ANEXO 6: CURVA DE CALIBRADO PARA PROTEINAS (METODO FRADBORD)	105
ANEXO 7: CURVA DE CALIBRADO PARA AZUCARES REDUCTORES (DNS).....	107
ANEXO 8: DETERMINACION CUANTITATIVA DE GLUCOSA, MEDIANTE EL METODO KIT MONLABTES.....	109
ANEXO 9: DETERMINACION DE LOS AZUCARES FERMENTABLES EN EL HIDROLIZADO DECASCARILLA DE ARROZ MEDIANTE HPLC	111
ANEXO 10: FICHA TECNICA DEL PROVEEDOR - NOVOZYMES	118
ANEXO 11. DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA DEL COMPLEJO ENZIMATICO – CELULASA COMPLEX + β - GLUCOSIDASA	121
ANEXO 12: DETERMINACION DE LOS PARAMETROS CINETICOS.....	123
ANEXO 13: REFERENCIA DE COMPOSICION DE MEDIOS DE MANTENCION, ACTIVACION Y CULTIVO PARA <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ATCC 4126.....	126
ANEXO 14: DETERMINACION DE ETANOL EN EL CROMATOGRAFO DE GASES	127

I. INTRODUCCION

En el mundo se llevan a cabo gran cantidad de estudios para desarrollar la producción a gran escala de alcohol a partir de biomasa lignocelulósica. Los materiales que más se han investigado son madera y residuos forestales, papel reciclado y residuos de la industria papelera, bagazo de caña, desechos agrícolas (hojas, ramas, hierba, frutas, paja, etc.) así como residuos sólidos urbanos. Se ha estimado un valor de 6 para la relación salida/entrada de energía en el caso de la producción de etanol a partir de biomasa, es decir, la relación entre la energía liberada durante la combustión de alcohol y la energía necesaria para su producción considerando todo el ciclo de vida del producto desde la extracción de las materias primas y los insumos requeridos, pasando por su transporte, hasta el proceso de transformación hasta bioetanol. Lo anterior hace a esta materia prima muy atractiva, en especial en países que no cuentan con la facilidad de producir grandes cantidades de caña de azúcar.

Las investigaciones están orientadas a producir etanol a partir de residuos lignocelulósicos o biomasa lignocelulósica la que está compuesta fundamentalmente de celulosa, hemicelulosa y lignina y otros componentes como pectina, azúcares solubles, vitaminas y minerales. (Cunningham, 1994)

II. REVISION BIBLIOGRAFICA

2.1. Características de la Cascarilla de Arroz

La agroindustria del arroz se inicia con la cosecha y deshidratación del arroz en cáscara, para luego ser enviado a las plantas de procesamiento denominadas «molinos». En este lugar se procede a la limpieza y selección del producto al granel, luego se le procesa por una serie de equipos que se encargan, primero, en retirar la cáscara y, luego, raspar y cepillar el grano. En esta última etapa se obtiene un subproducto denominado «polvillo de arroz».

Tabla 1: Composición proximal de la cascarilla de arroz.

Componente	Unidad	Valor promedio
Humedad Residual	% Peso	8.88
Material Volátil	% Peso	64.70
Cenizas	% Peso	13.06
Carbono Fijo	% Peso	13.36
Poder Calorífico Bruto	Kcal	3650
	Kcal	15275
Azufre total (como S)	% Peso	0.07
Lignina	% Peso	26.6
Celulosa	% Peso	38

Fuente: Guevara, Maribel. Caracterización y evaluación de la cascarilla de arroz como combustible. Bogotá: Trabajo de grado, 1995, p. 76

En el caso particular de nuestro país, el sector arrocero, genera una gran producción de residuos lignocelulósicos, dentro de los cuales se encuentra la cascarilla de arroz.

Específicamente la cascarilla de arroz está compuesta por lignina (15-20%), celulosa (35-40%) y hemicelulosa (15-20%), por lo que se considera un sustrato adecuado para la producción de azúcares fermentables y posteriormente etanol, dada su disponibilidad y bajo costo.

Cabe resaltar que uno de los elementos que se encuentra en mayor cantidad en la cascarilla de arroz es la celulosa siendo el principal componente de las fibras como se observan en la tabla 02, donde se muestra los valores porcentuales de la celulosa, hemicelulosa y lignina en Colombia y varias zonas de Canadá (Valverde, 2012).

Tabla 2: Propiedades bioquímicas de la cascarilla de arroz en varios lugares del mundo.

Valores en Porcentaje (%)					
Parámetros	Canadá				Colombia
	Zona 1	Zona 2	Zona 3	Zona 4	Zona 1
Celulosa	29.2	33.47	25.89	33.5	39.05
Hemicelulosa	20.1	21.03	18.1	21.35	27.06
Lignina	20.00	18.80	24360	18.20	22.8

Fuente: Valverde, 2012. Análisis comparativo de las características fisicoquímicas de la cascarilla de arroz.

Los rangos obtenidos para el análisis químico a nivel mundial corresponden a los siguientes: La celulosa 25.89% - 39.05%; hemicelulosa 18.10% - 27.06% y la lignina 18.20% - 24.60%.

2.2. Celulosa

La celulosa es el compuesto orgánico más abundante en la naturaleza, se presenta en las plantas superiores, algas, hongos y en los quistes de los protozoarios. Es un polímetro lineal de la celobiosa, la cual corresponde a un disacárido formado por la unión de dos moléculas de glucopiranos. El número de unidades de celobiosa que forman la celulosa varía con las especies vegetales.

La celulosa, es una molécula formada por unidades de glucosa unidas mediante enlaces β -1,4. Este tipo de enlace es la diferencia más clara con respecto al almidón, en que las moléculas de glucosa están unidas mediante enlace α -1,4. La diferencia de tipos de enlace y longitud de las cadenas determina que almidones y celulosas tengan propiedades tecnológicas y nutricionales muy distintas (Cubero, 2002).

Estructura

La celulosa se forma por la unión de moléculas de β -glucosa mediante enlaces β -1,4-O-glucosídico. Por hidrólisis de glucosa. La celulosa es una larga cadena polimérica de peso molecular variable, con fórmula empírica $(C_6H_{10}O_5)_n$, con un valor mínimo de $n=200$. ((Zeiger y Taiz; 2002)

- Estructura de la celulosa; a la izquierda, β -glucosa; a la derecha, varias β -glucosa unidas.

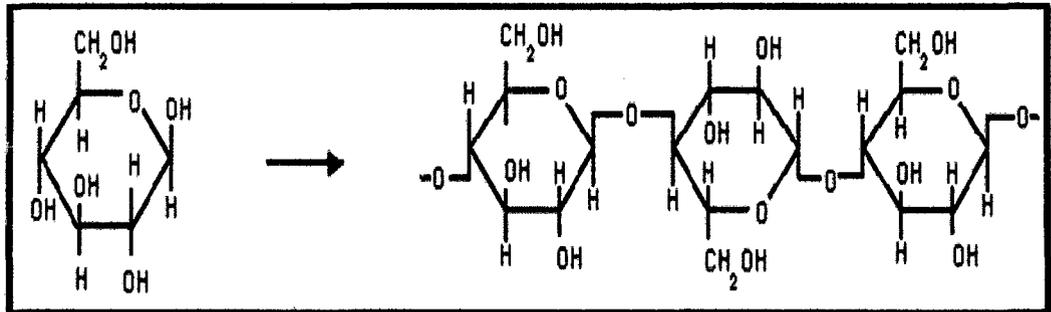


Figura 1: Estructura de la Celulosa

La celulosa tiene una estructura lineal o fibrosa, en la que se establecen múltiples puentes de hidrógeno entre los grupos hidroxilo de distintas cadenas yuxtapuestas de glucosa, haciéndolas impenetrables al agua, lo que hace que sea insoluble en agua, y originando fibras compactas que constituyen la pared celular de las células vegetales. (Zeiger y Taiz; 2002)

La celulosa es una microfibrilla fuertemente empaquetada de cadenas lineales de β -D-glucosa con enlaces (1- \rightarrow 4). Debido a la configuración espacial alternante de los enlaces glucosídicos que unen residuos de glucosa adyacentes, se considera que la unidad de repetición en la celulosa es la celobiosa, un disacárido β -D-glucosa con enlaces (1- \rightarrow 4). Las cadenas individuales de glucanos de celulosa están formadas por entre 2.000 y más de 25.000 residuos de glucosa. Cuando la Celulosa es degradada, primero se degradan las regiones amorfas, lo que provoca la liberación de pequeños dominios cristalinos de la microfibrilla. (Zeiger y Taiz; 2002)

2.3. Lignina

La lignina es un polímero tridimensional de fenilpropano con unidades que mantiene unidades por enlace éter y carbón-carbón. Tiene un alto peso molecular, es amorfa en la naturaleza y está concentrada en capas exteriores de fibras y proporciona rigidez estructural por endurecimiento y por mantener juntas las fibras de polisacáridos (Cowling y Kirk; 1976) es por ello que la encontramos en todas las fuentes de celulosa orgánica y por ser un polímero de esta magnitud es que hace una tarea difícil llevar a cabo la hidrólisis enzimática. Su estructura es amorfa, y consiste en unidades diferentes de fenilpropano. La función principal de la lignina es dar soporte estructural a la planta, impermeabilidad, resistencia contra ataques microbianos y al estrés oxidativo. Es insoluble en agua y ópticamente inactiva lo que la hace difícil de degradar. No contiene azúcares pero encierra a la celulosa y hemicelulosa que sí los contienen e impide que sean alcanzadas para ser hidrolizadas.

Los monómeros que forman la lignina se denominan alcoholes cinamílicos diferenciados entre sí por las diferentes sustituciones que presenta el anillo aromático. Estos alcoholes son el p-cumarílico, el alcohol coniferílico y el alcohol sinapílico. La lignina también puede ser utilizada para la generación de energía térmica, su valor energético depende de la fuente de biomasa y varía entre 20934 y 27912 kJ/kg. También, puede ser procesada, dependiendo de la calidad de la misma, en productos de alto valor económico como plastificantes, polímeros conductores de electricidad o resinas fenólicas (Hendricks y Zeeman, 2009)

2.4. Conceptos del Pretratamiento

El propósito del pretratamiento consiste en realizar el acondicionamiento de la materia prima, mediante operaciones mecánicas, físicas y química, para aumentar el rendimiento en la conversión de hidrólisis de cascarilla de arroz. El principio del pretratamiento es quitar la lignina, separándola de la hemicelulosa, reducir la región cristalina de la celulosa y aumentar la porosidad de los materiales.

El pretratamiento debe cumplir los siguientes requisitos:

- ✓ Mejorar los rendimientos de extracción de azúcares durante la hidrólisis.
- ✓ Evitar la degradación o pérdida de hidratos de carbono.
- ✓ Evitar la liberación de subproductos inhibidores del proceso fermentativo durante la hidrólisis, buscar métodos de tratamiento para inhibidores.

Por otra parte, es evidente que la elección del pretratamiento también afectará las propiedades fisicoquímicas de la biomasa. Estas propiedades también influirán sobre los procesos aguas abajo, en cuanto a la selección de enzimas microbianas, acondicionamiento, utilización de los subproductos, manejo de residuos y la recuperación de etanol si este fuera el producto. En consecuencia, la elección del pre-tratamiento tiene un impacto económico en cada uno de las siguientes etapas en una biorefinería. Estos aspectos hacen que el pre-tratamiento sea la unidad de operación primaria que define la plataforma biológica para la transformación de biomasa lignocelulósica a azúcares y posteriormente a combustibles y productos químicos (Costa Sousa et al., 2009). Sin embargo, la remoción de esas fracciones debe ocurrir sin causar degradación de la cadena celulósica, para que ésta

presente características adecuadas para su posterior utilización (Mussatto, 2006).

2.4.1. Tipos de pretratamiento

El pretratamiento que se realiza a la biomasa puede ser físico, químico o microbiológico, también, puede ser una combinación de ellos, los cuáles se enfocan en eliminar la lignina y hemicelulosa para mejorar el acceso a la celulosa.

- **Pretratamiento físico**

Se realiza para disminuir el tamaño de partícula de la biomasa mediante un proceso de trituración y extrusión. El objetivo de la trituración es reducir el tamaño de la partícula y la cristalinidad del material para incrementar la superficie específica y reducir el grado de polimerización. El material se pica, tritura o muele dependiendo del tamaño final de la partícula (Hendricks y Zeeman, 2009).

Los pretratamientos físicos, cuyo principal efecto es la reducción del tamaño de las partículas, producen un aumento en la tasa de hidrólisis, debido fundamentalmente a la disponibilidad de superficie para la adsorción de las enzimas hidrolíticas (Hills y Nakano, 1990)

Los requerimientos energéticos son altos dependiendo del tamaño final de la partícula y de las características de la biomasa, por lo que su aplicación depende del costo económico que represente.

- **Pretratamiento químico**

Hay diferentes métodos de pretratamiento químico, los que se utilizan comúnmente son el pretratamiento alcalino y ácido.

En el pretratamiento con ácido, el objetivo es solubilizar la hemicelulosa para que la celulosa esté más accesible para la etapa de hidrólisis. Se realiza tanto con ácidos concentrados como con ácidos diluidos. Aunque son un agente fuerte para la hidrólisis de la celulosa, los ácidos concentrados son tóxicos, corrosivos, peligrosos y se requieren reactores de materiales resistentes a la corrosión, por lo que el costo del pretratamiento es elevado (Kumar et al, 2009).

El uso de ácido diluido es más favorable para aplicaciones a nivel industrial, se realiza a altas temperaturas durante un periodo corto de tiempo o a bajas temperaturas con tiempos de retención mayores. La lignina también se solubiliza en este proceso. En el pretratamiento con ácido diluido, usualmente se utiliza ácido sulfúrico o ácido clorhídrico a concentraciones que van de 0,3-1,1% (m/m) (Kumar et al, 2009).

El pretratamiento alcalino, comparado con otras tecnologías para pretratamiento, se realiza a bajas temperaturas y presiones. Es posible llevar a cabo el proceso a condiciones ambientales pero puede tardar horas o días (Hendricks y Zeeman, 2009).

Comparado con el pretratamiento ácido el proceso alcalino causa menos degradación de azúcares y la sal caustica se puede recuperar o regenerar (Kumar et al, 2009). Además, la estructura de la celulosa después del pretratamiento es más densa y termodinámicamente más estable que la celulosa natural (Hendricks y Zeeman, 2009).

El pretratamiento con hidróxido de sodio diluido provoca que la biomasa se hinche aumentando la superficie interior mientras que el grado de

polimerización disminuye; se separan la lignina de los carbohidratos y se altera la estructura de la lignina (Kumar et al, 2009).

En estudios realizados con bagazo de caña se pretrató este material con hidróxido de sodio al 2,00% (m/v) por 90 minutos a 121 °C. (Torres, 2009), obtuvo un rendimiento de glucosa máximo de 42% con una concentración de enzima de 3,2 FPU/g en la etapa de hidrólisis.

López (2009), realizó una investigación para la selección del pretratamiento en aserrín de pino, donde comparó los métodos con NaOH, H₂SO₄ y explosión con vapor. De los métodos investigados concluyó que el pretratamiento con NaOH proporciona mejores resultados que los tratamientos con ácido sulfúrico diluido y por explosión con vapor a 121°C. La optimización del pretratamiento muestra parámetros de 8 % de NaOH durante 85 minutos a 120°C.

2.5. Mecanismo de acción enzimática:

Una enzima, por sí misma, no puede llevar a cabo una reacción, su función es modificar la velocidad de la reacción, entendiéndose como tal la cantidad de producto formado por unidad de tiempo. Tal variación se debe a la disminución de la energía de activación E_a ; en una reacción química, la E_a es la energía necesaria para convertir los reactivos en formas moleculares inestables denominadas especies en estado de transición, que poseen mayor energía libre que los reactivos y los productos. (Cacesa, 1990)

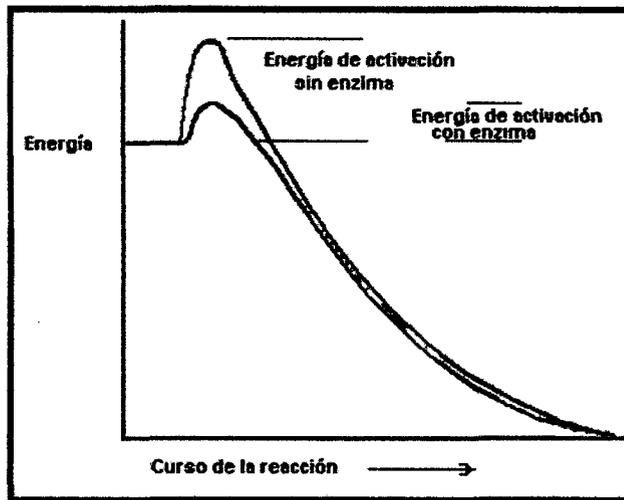


Figura 2: Curso de reacción enzimática

En el diagrama están representados los niveles de energía, durante el curso de la reacción, de moléculas intervinientes en una reacción tipo: $A + B \rightarrow C$. La curva azul muestra el curso de la reacción en ausencia de una enzima que facilite la reacción, mientras que la curva roja la muestra en presencia de la enzima específica de la reacción. La diferencia en el nivel de energía entre el estado inicial y la necesaria para iniciar la reacción (picos de las curvas) es la energía de activación. Tal como se observa la presencia de enzima baja la energía de activación. El complejo Enzima- sustrato posee menor energía de activación que las especies en estado de transición que la correspondiente reacción no catalizada. (Cacesa, 1990).

Orienta a los sustratos: parte de la energía de activación se utiliza para que los sustratos roten y se enfrenten con los átomos correctos para formar los enlaces. Agregan cargas a los sustratos: las cadenas laterales (R) de los aminoácidos de las enzimas pueden participar directamente haciendo a los sustratos químicamente más reactivos. (Cacesa, 1990)

Inducen la deformación en el sustrato: cuando una sustancia se une al sitio activo, la enzima puede causar que los enlaces se estiren, poniéndolo en un estado de transición inestable. Cambio de forma de la enzima al unirse al sustrato: el modelo de llave- cerradura de Fisher fue actualizado cuando se descubrió que las enzimas son flexibles y sus sitios activos pueden cambiar (expandirse) para acomodarse a sus sustratos. Este cambio de forma causado por la unión al sustrato se denomina ajuste inducido. En la Hexoquinasa puede observarse este ajuste inducido, con el sustrato (glucosa) y sin él. El ajuste inducido alinea las cadenas laterales reactivas del sitio activo de la enzima con los sustratos (Cacesa, 1990).

2.6. Cinética Enzimática:

La **cinética enzimática** estudia la velocidad de las reacciones químicas que son catalizadas por las enzimas. El estudio de la cinética de una enzima nos mostrará los detalles del mecanismo catalítico de esa enzima, su papel en el metabolismo, cómo es controlada su actividad en la célula y cómo puede ser inhibida su actividad por drogas o venenos o potenciada por otro tipo de moléculas (Valero, 1998).

El conocimiento adquirido acerca de la estructura de las enzimas ha sido de gran ayuda en la visualización e interpretación de los datos cinéticos. La estructura puede sugerir cómo permanecen unidos sustrato y producto durante la catálisis, cambios conformacionales ocurren durante la reacción, o incluso el papel en particular de determinados aminoácidos en el

mecanismo catalítico. Algunas enzimas modifican su conformación significativamente durante la reacción, en cuyo caso, puede ser crucial saber la estructura molecular de la enzima con y sin sustrato unido (se suelen usar análogos que se unen pero no permiten llevar a cabo la reacción y mantienen a la enzima permanentemente en la conformación de sustrato unido) (Valero, 1998).

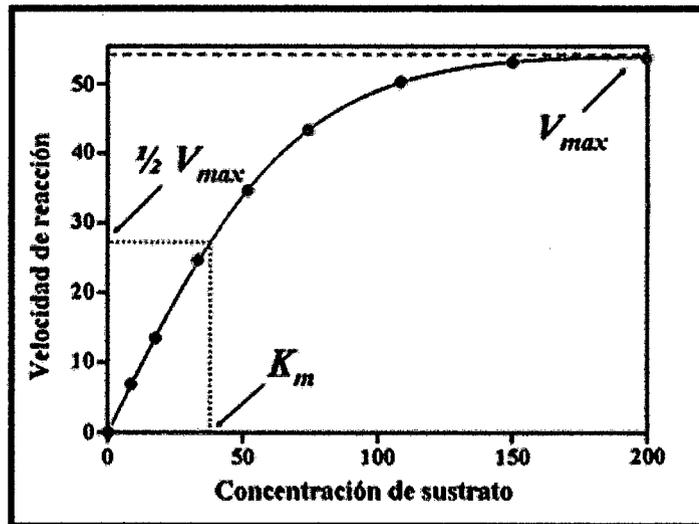


Figura 3: Cinética enzimática

Los mecanismos enzimáticos pueden ser divididos en mecanismo de único sustrato o mecanismo de múltiples sustratos. Los estudios cinéticos llevados a cabo en enzimas que solo unen un sustrato, como la triosa fosfato isomerasa, pretenden medir la afinidad con la que se une el sustrato y la velocidad con la que lo transforma en producto. Por otro lado, al estudiar una enzima que une varios sustratos, como la dihidrofolato reductasa, la cinética enzimática puede mostrar también el orden en el que se unen los sustratos y el orden en el que los productos son liberados (Cunningham, 1994).

Las dos propiedades cinéticas más importantes de una enzima son: el tiempo que tarda en saturarse con un sustrato en particular y su punto máximo de saturación. El conocimiento de estas propiedades nos permitirá hacer una hipótesis acerca del comportamiento de una enzima en el ambiente celular y cómo responderá frente a un cambio de esas condiciones. En principio, las consideraciones generales de la cinética química pueden aplicarse a las reacciones catalizadas enzimáticamente, a una concentración constante de enzima, si vemos el gráfico de la velocidad de la reacción catalizada enzimáticamente en función de la concentración del sustrato, es evidente que a bajas concentraciones del mismo la velocidad de formación de producto es proporcional a la concentración del sustrato. A medida que se aumenta la concentración de sustrato se aprecia una pérdida de la proporcionalidad, en esta zona la reacción es de orden mixto y finalmente, a altas concentraciones, la velocidad de la reacción es independiente de esta (Cunningham, 1994).

2.7. Factores que influyen en la velocidad de las reacciones enzimáticas

Tiempo de Hidrólisis: La cantidad de producto formado en una reacción enzimática es proporcional al tiempo de hidrólisis. La reacción es lineal en el tiempo hasta un periodo determinado en que se puede expresar la actividad en términos de velocidad, o sea la cantidad de producto formado por unidad de tiempo. Generalmente la velocidad se expresa como micromoles de producto formado por minuto. Los valores deben

estar comprendidos dentro de la parte proporcional o lineal de la reacción. Después de algún tiempo, la gráfica deja de ser lineal porque las reacciones son generalmente reversibles y tienden al equilibrio. La velocidad puede disminuir por agotamiento del sustrato, por desnaturalización de la enzima después de cierto tiempo o porque los productos de la reacción puedan tener efecto inhibitor sobre la actividad enzimática (Valero, 1998).

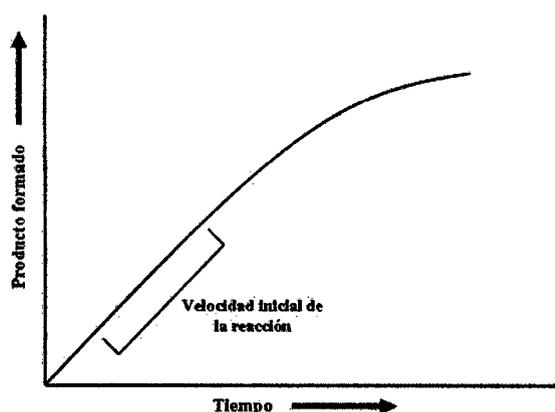


Figura 4: Efecto del tiempo de hidrólisis

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 (Valero, 1998).

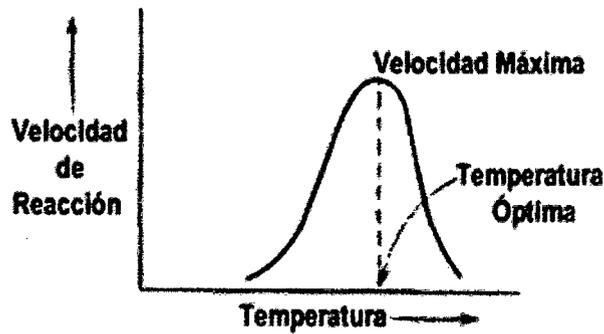


Figura 5: Efecto de la temperatura

Concentración de Enzima: Cuando el sustrato se encuentra en exceso, a concentraciones saturantes, la velocidad de la reacción es proporcional a la concentración de la enzima. Si se hace un gráfico, se obtiene una recta como se muestra en la figura (Valero, 1998).

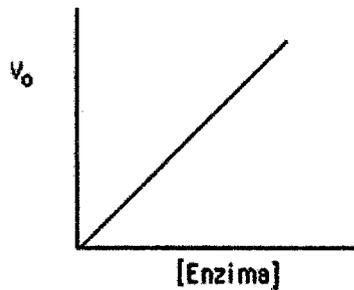


Figura 6: Efecto de la concentración de Enzima

Concentración de sustrato: Al aumentar la concentración de sustrato existen más centros activos ocupados y la velocidad de la reacción aumenta hasta que no quedan centros activos libres; a partir de ese momento, un aumento de la concentración del sustrato no supone un aumento de la velocidad de la reacción.

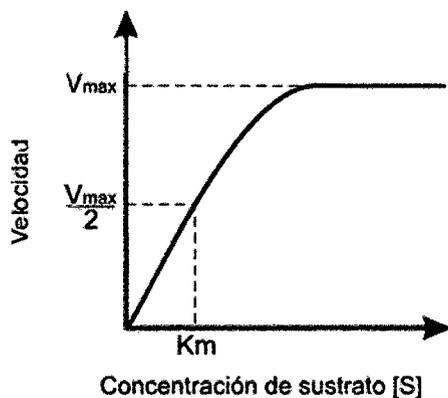


Figura 7: Efecto de la concentración de Sustrato

Efecto del pH: El pH no afecta la actividad enzimática directamente sino que modifica la concentración de protones. Los protones 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 (Valero, 1998).

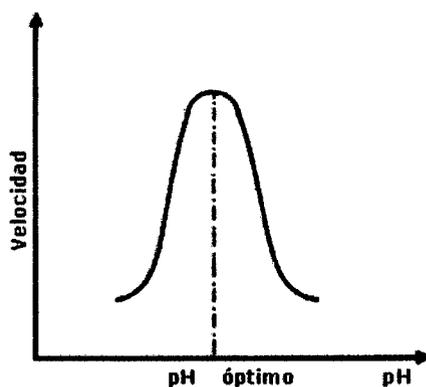
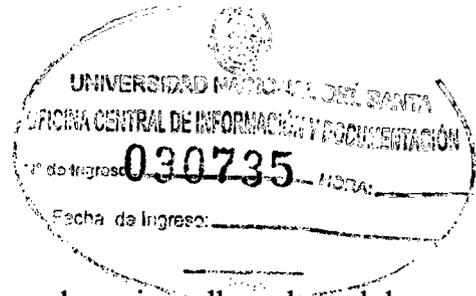


Figura 8: Efecto del pH



2.8. Hidrólisis Enzimática

Este proceso se lleva a cabo mediante el uso de enzimas llamadas celulasas las cuales son altamente específicas. Los productos son azúcares reductores incluyendo glucosa. Los costos de utilidad de este proceso de hidrólisis son bajos comparados con la hidrólisis ácida porque se realiza bajo condiciones medias (pH de 4,8 y temperatura de 40-50 °C) y no produce problemas de corrosión (Blume, 1991).

Zhu (2005) menciona que en comparación con la hidrólisis con ácido diluido, la hidrólisis enzimática tiene la ventaja de que puede lograr altos rendimientos y eliminar la formación de subproductos inhibidores.

Para la producción de celulasas se utilizan microorganismos como bacterias y hongos aeróbicos o anaeróbicos, mesófilos o termófilos aunque solo algunos de ellos producen la enzima celulasa capaz de hidrolizar la celulosa. El *Trichoderma reesei*, un hongo filamentoso ha sido el más estudiado y sus mutaciones son utilizadas para la producción comercial de hemicelulasas y celulasas (Zhang, 2006).

Las celulasas son una mezcla de varias enzimas, los grupos principales son: endogluconasa, exogluconasa o celobiohidrolasa y β -glucosidasa. Específicamente, los tres tipos de enzimas que incluye una celulasa son: la endo- β -1,4-glucanasa o 1,4- β -D-glucan glucanhidrolasa; la exo- β -1,4-glucanasa o 1,4- β -D-glucan celobiohidrolasa y la β -1,4-glucosidasa o β -Dglucósido glucohidrolasa (Zhang, 2006).

El mecanismo propuesto para la degradación de la celulosa se puede resumir en tres etapas.

Primero la endo β -1,4-glucanasa actúa sobre los enlaces β -1,4 glucosídicos internos presentes entre las unidades de glucosa que forman la molécula de la celulosa, y convierte las cadenas largas a oligosacáridos los cuales mantienen la configuración β de su estructura. La acción de esta enzima se da sobre las regiones amorfas de la molécula o sobre la superficie de las microfibrillas y tiene como resultado la disminución de la longitud de la cadena de celulosa y la creación de nuevos extremos reactivos (Zhang, 2006).

En la segunda etapa, la exo β -1,4-glucanasa corta las cadenas 1,4 β -D-glucano a partir del extremo no reductor de la molécula de celulosa y de las celodextrinas provocando la remoción de unidades de celobiosa o glucosa. Después de que las zonas amorfas son degradadas, la tercera etapa se da en la región cristalina como resultado de la acción sinérgica de la endogluconasa y la exogluconasa. Finalmente, se da la hidrólisis de la celobiosa mediante la acción de la β 1,4-glucosidasa.

La celobiosa inhibe la acción de las glucanasas limitando la degradación de la celulosa, por lo que es necesario utilizar celobiasa para su hidrólisis (Zhang, 2006).

2.9. Azúcar Fermentable

Se denomina técnicamente azúcares a los diferentes monosacáridos, disacáridos, y polisacáridos, que generalmente tienen sabor dulce, aunque por extensión se refiere a todos los hidratos de carbono; estos están compuestos solamente por carbono, oxígeno e hidrógeno (Barrow, 2000)

Los Azúcares reductores son aquellos azúcares que poseen su grupo carbonilo (grupo funcional) intacto, y que a través del mismo pueden reaccionar con otras especies.

2.9.1. Clasificación de Azúcares:

Los 'azúcares' se clasifican según el número de unidades de los que están formados:

Monosacáridos: Formados solo por una unidad, también se llaman azúcares simples. Los más presentes en la naturaleza son los siguientes: Glucosa, Fructosa, Galactosa, Ribosa y Manosa (WHO/FAO; 1998)

Disacáridos: Formados por dos monosacáridos, iguales o diferentes, también se llaman azúcares dobles. Los más presentes en la naturaleza son los siguientes: Maltosa, Lactosa, Sacarosa, Isomaltosa y Trehalosa (WHO/FAO; 1998)

Trisacáridos: Formados por tres monosacáridos, iguales o diferentes, también se llaman azúcares triples. Los más presentes en la naturaleza son los siguientes: Maltotriosa y Rafinosa. (WHO/FAO; 1998)

Tabla 3: Clasificación de monosacáridos basado en el número de carbonos

N° de Carbonos	Categoría	Ejemplos
4	Tetrosa	Eritrosa, Treosa
5	Pentosa	Arabinosa, Ribosa, Ribulosa, Xilosa, Xilulosa, Lixosa
6	Hexosa	Alosa, Altrosa, Fructosa, Galactosa, Glucosa, Gulosa, Idosa, Manosa, Sorbosa, Talosa, Tagatosa
7	Heptosa	Sedoheptulosa

Fuente: FAO

Las estructuras de los sacáridos se distinguen principalmente por la orientación de los grupos hidroxilos (-OH). Esta pequeña diferencia estructural tiene un gran efecto en las propiedades bioquímicas, las características organolépticas (sabor), y en las propiedades físicas como el punto de fusión y la rotación específica de la luz polarizada. Un monosacárido de forma lineal que tiene un grupo carbonilo (C=O) en el carbono final formando un aldehído (-CHO) se clasifica como una aldosa. Cuando el grupo carbonilo está en un átomo interior formando una cetona, el monosacárido se clasifica como una cetosa. (WHO/FAO; 1998)

2.9.2. Características de los Azúcares:

Todas las frutas naturales tienen cierta cantidad de glucosa (a menudo con fructosa), que puede ser extraída y concentrada para hacer un azúcar alternativo. Pero a nivel industrial, tanto la glucosa líquida (jarabe de glucosa) como la dextrosa (glucosa en polvo) se obtienen a partir de la

hidrólisis enzimática de almidón de cereales (generalmente trigo o maíz).
(Zhang, 2006)

La glucosa, libre o combinada, es el compuesto orgánico más abundante de la naturaleza. Es la fuente primaria de síntesis de energía de las células, mediante su oxidación catabólica, y es el componente principal de polímeros de importancia estructural como la celulosa y de polímeros de almacenamiento energético como el almidón y el glucógeno.

En su forma D-Glucosa, sufre una ciclación hacia su forma hemiacetalica para dar sus formas furano y pirano (D-glucofuranosa y D-glucopiranosa) que a su vez presentan anómeros alfa y beta. Estos anómeros no presentan diferencias de composición estructural, pero si diferentes características físicas y químicas. La D-(+)-glucosa es uno de los compuestos más importantes para los seres vivos, incluyendo a los seres humanos. (Zhang, 2006)

En su forma β -D-glucopiranosa, una molécula de glucosa se une a otra gracias a los -OH de sus carbonos 1-4 para formar celobiosa a través de un enlace β , y al unirse varias de estas moléculas, forman celulosa. (Zhang, 2006)

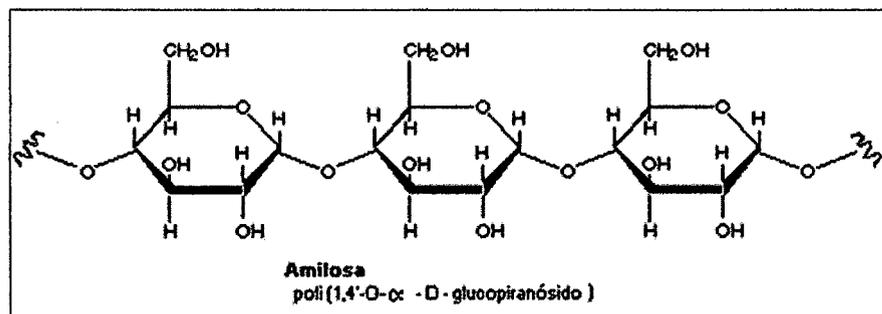
La glucosa ingresa a la célula por medio de un proceso de transporte mediado por moléculas de membrana que pertenecen a la familia de proteínas llamadas GLUT (por las siglas en inglés, Transportador de glucosa). La síntesis y activación de dichas proteínas es regulada por la hormona insulina, y por el receptor de insulina. (Zhang, 2006)

2.9.3. Estructura:

Sacarosa es un disacárido de glucosa y fructosa. Se sintetiza en plantas, pero no en animales superiores. Contiene 2 átomos de carbono anomérico libre, puesto que los carbonos anoméricos de sus dos unidades monosacáridos constituyentes se hallan unidos entre sí, covalentemente mediante un enlace O-glucosídico. Por esta razón, la sacarosa no es un azúcar reductor y tampoco posee un extremo reductor. (Barrow, 2000)

Su nombre abreviado puede escribirse como Glc(a -1à 2)Fru o como Fru(b 2à 1)Glc. La sacarosa es un producto intermedio principal de la fotosíntesis, en muchas plantas constituye la forma principal de transporte de azúcar desde las hojas a otras partes de la planta. En las semillas germinadas de plantas, las grasas y proteínas almacenadas se convierten en sacarosa para su transporte a partir de la planta en desarrollo. (Barrow, 2000)

Existen dos formas en las cuales los azúcares se polimerizan: enlaces alfa o beta:



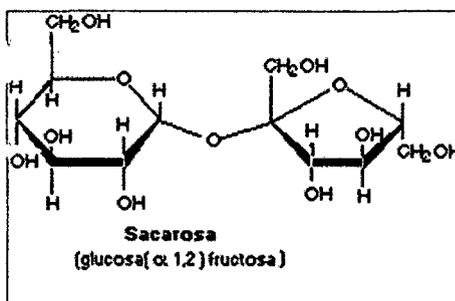


Figura 9: Enlaces Alfa

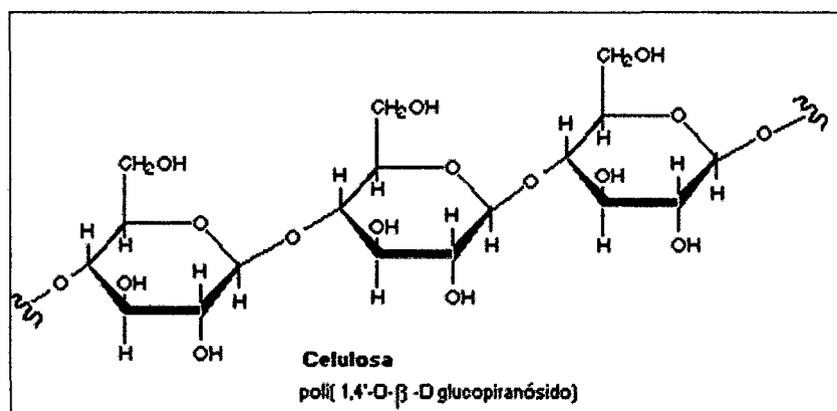


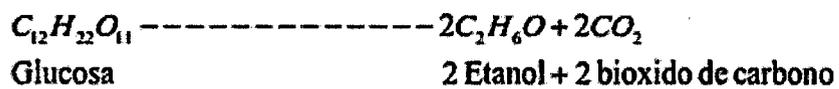
Figura 10: Enlaces Beta

2.10. Fermentación

“En ausencia de aceptor de electrones, muchos organismos efectúan reacciones redox balanceadas de algunos compuestos orgánicos, con liberación de energía. Este proceso se llama fermentación. Existen muchos tipos diferentes de fermentación, pero en procesos fermentativos solamente se efectúan una oxidación parcial de los átomos de carbono del compuesto orgánico y, por consiguiente una pequeña cantidad de energía se libera. La oxidación en una fermentación esta acoplada a la reducción posterior de un compuesto orgánico generado a partir del catabolismo del sustrato inicial

fermentable; así, no se requiere un aceptor de electrones suministrado exteriormente” (Van Buren, 1999).

El ATP se produce en las fermentaciones en un proceso que se llama fosforilización a nivel de sustrato, en la que el ATP se sintetiza durante etapas enzimáticas específicas en el catabolismo del compuesto orgánico. Un ejemplo de fermentación es el catabolismo de la glucosa por levaduras en ausencia de oxígeno



En esta reacción parte de los átomos de carbono terminan en CO₂, una forma más oxidada que la de los átomos de carbono de la molécula que partió, mientras que los otros átomos de carbono terminan en etanol, que es más reducido que la glucosa (Van Buren, 1999).

En esta reacción parte de los átomos de carbono terminan en CO, una forma más oxidada que la de los átomos de carbono de la molécula que partió, mientras que los otros átomos de carbono terminan en etanol, que es más reducido que la glucosa (Van Buren, 1999).

La energía liberada en la reducción de la glucosa a etanol es – 238.8 Kj/mol se conserva por fosforilaciones a nivel de sustrato en forma de enlaces fosfato de alta energía en el ATP, con una producción neta de dos de estos enlaces.

Se explicarán en la siguiente sección las etapas bioquímicas comprendidas en la fermentación de la glucosa a etanol y la forma en que parte de la

energía liberada se conserva en enlaces fosfato de alta energía (Van Buren, 1999).

2.10.1. Fermentación de la glucosa: oxidación y producción de ATP

La degradación de la glucosa se la puede dividir en tres etapas:

La etapa I es una serie de reacciones de re-acomodación que no implica oxidación-reducción y no se libera energía, pero que conducen a la producción de dos moléculas de un compuesto intermedio, el gliceraldehido-3-fosfato.

En la etapa II hay oxido-reducción, se produce un enlace fosfato alto en energía en forma de ATP y se forman dos moléculas de piruvato.

En la etapa III, ocurre una segunda reacción de óxido-reducción y se forman los productos de fermentación (etanol y CO₂). La vía metabólica de la glucosa a piruvato se llama glucolisis (ruptura de la glucosa) que se llama vía de Embder-Meyerhof, por su descubridor (Van Buren, 1999).

2.10.2. *Saccharomyces cerevisiae*

Es la especie de levadura utilizada para la obtención de etanol a partir de diversos materiales lignocelulósicos, tales como con bagazo de caña de azúcar, diferentes tipos de maderas como el roble rojo, álamo, pino, y eucaliptos. (Van Zyl et al., 1991 y Ferrari et al., 1992)

La temperatura corriente de cultivo de las levaduras se sitúa entre **25 y 30°C** que permite efectivamente el crecimiento de la mayor parte de las levaduras. Sin embargo, estas temperaturas no son rigurosamente las temperaturas óptimas de crecimiento que las levaduras encuentran en sus

hábitats naturales. En efecto, como los microorganismos, las levaduras pueden ser clasificadas en levaduras psicrófilas, mesófilas y termófilas según sus temperaturas límites de crecimiento. Así el rango de temperatura correspondiente para las levaduras termófilas se sitúa en 20 – 50°C. (Van Zyl et al., 1991 & Ferrari et al., 1992)

Todas las levaduras son capaces de desarrollarse en presencia de oxígeno: no hay levaduras anaerobias estrictas. Algunas levaduras son aerobias estrictas: son en particular las levaduras de los géneros *Krhodotorula*, *Rhodosporidium*, *Lipomyces*, *Saccharomyces*; *Cryptococcus* y *Sporobolomyces*, más algunas especies de los géneros *Hansenula*, *Pichia*, *Torulopsis* y *Debaryomyces*. (Van Zyl et al., 1991 & Ferrari et al., 1992).

No todas las levaduras presentan la misma sensibilidad al etanol. Según las cepas y el estado fisiológico del cultivo, el etanol es tóxico en concentraciones del 8 al 18% (p/v). La tolerancia al etanol depende de la composición en ácidos grasos de las membranas citoplasmáticas. (Van Zyl et al., 1991 & Ferrari et al., 1992).

2.11. Antecedentes:

Proyecto de Trabajo de Investigación “OPTIMIZACIÓN DEL PROCESO DE OBTENCIÓN ENZIMÁTICA DE AZÚCARES FERMENTABLES A PARTIR DE ASERRÍN DE PINO”. Se muestra como pretratamiento el uso de NaOH; pretratamiento que proporcionó mejores resultados que los tratamientos con ácido sulfúrico y por explosión con vapor. Se optimizó

el pretratamiento alcalino por el método de superficie de respuesta y se obtuvo las condiciones para el pretratamiento: 8 % de NaOH durante 85 minutos a 120°C.

Proyecto de Trabajo de Investigación: “DETERMINACIÓN DEL EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE LA BASE NaOH, DE LA CELULOSA Y CELOBIASA EN LA HIDRÓLISIS PARA LA PRODUCCIÓN DE ETANOL A PARTIR DEL RASTROJO DE LA PIÑA”. El objetivo de este proyecto fue determinar el efecto de la concentración hidróxido de sodio y de la concentración de celulosa y celobiasa en la hidrólisis para la producción de etanol a partir del rastrojo de la piña.

Proyecto de fin de carrera de Ingeniería Química: “DISEÑO DE UNA PLANTA PILOTO DE PROCESADO DE CASCARILLA DE ARROZ POR HIDRÓLISIS ÁCIDA”. Universidad de Cádiz. El objetivo del proyecto es el procesado de 4000 kg/día de cascarilla de arroz mediante hidrólisis ácida para la obtención de azúcares simples, que son susceptibles de transformarse mediante fermentación en bioetanol.

2.12. JUSTIFICACION E IMPORTANCIA DEL PROBLEMA:

La propuesta es utilizar material de desecho de fácil obtención y muy abundante, como la cascarilla de arroz en la Región, para la obtención de azúcares fermentables que posteriormente, por fermentación, conducen a productos utilizables como combustibles o como materias primas de interés industrial.

Los residuos lignocelulósicos de la agroindustria pueden ser considerados como biomasa residual. Puesto que la producción de este tipo de biomasa se localiza en puntos muy concretos, su acumulación puede dar problemas de contaminación y deterioro del medio ambiente.

El porcentaje de residuos puede oscilar desde valores muy elevados como en el caso de la alcachofa con un 70-65%, caña de azúcar con un 66.3 %, naranja 50 %, espárrago 45 %, tomates 25 %, papas 10 % entre otros.

Si bien estos residuos vienen utilizándose en su gran mayoría como alimento para animales y/o combustibles, existe un interés creciente por el estudio de nuevos procesos en los que, a partir de los residuos celulósicos, se obtengan productos de mayor valor.

La disponibilidad de materiales celulósicos en forma de residuos agroindustriales asegura sustratos abundantes y económicos, teniendo en cuenta el porcentaje de residuos producidos, hemos considerado de interés el estudio del aprovechamiento de la cascarilla de arroz orientándonos a determinar las condiciones biocatalíticas óptimas ambientales en las que se obtiene la mayor productividad de azúcares fermentables a partir de este residuo agroindustrial de mayor productividad.

2.13. Objetivos

Objetivo general: Determinar las concentraciones de enzimas *Celulasa* y *β -glucosidasa* para la obtención de azúcares fermentables a partir de cascarilla de arroz.

Objetivos específicos:

- Determinar la composición química proximal de la cascarilla de arroz.
- Realizar un pretratamiento alcalino para deslignificación de la cascarilla de arroz.
- Determinar las concentraciones de enzimas *Celulasa* y *β -glucosidasa* en relación a la hidrólisis Enzimática.
- Realizar la caracterización del hidrolizado de cascarilla de arroz.
- Realizar una fermentación del hidrolizado de cascarilla de arroz pretratado.

2.14. Problema

¿Cuáles serán las concentraciones de enzimas *Celulasa* y *β -glucosidasa* para la obtención de azúcares fermentables a partir de cascarilla de arroz?

2.15. Hipótesis

Los parámetros para la obtención enzimática de azúcares fermentables a partir de cascarilla de arroz son

Variables Independientes	[Enzima Celulasa] : (1 - 5) % [Enzima β - Glucosidasa] : (0,2 - 0,6) %
Variable Dependiente	Azucres Totales (10 - 20 g/L)

III. METODOLOGÍA

3.1. Diseño Experimental

3.1.1. Diagrama de Flujo Experimental

Al material lignocelulósico seco se le realizará análisis de azúcares reductores (DNS), con la finalidad de obtener datos iniciales (testigos) de modo que no influyan sobre los resultados del proceso hidrolítico, además de un análisis proximal para caracterizar las muestras.

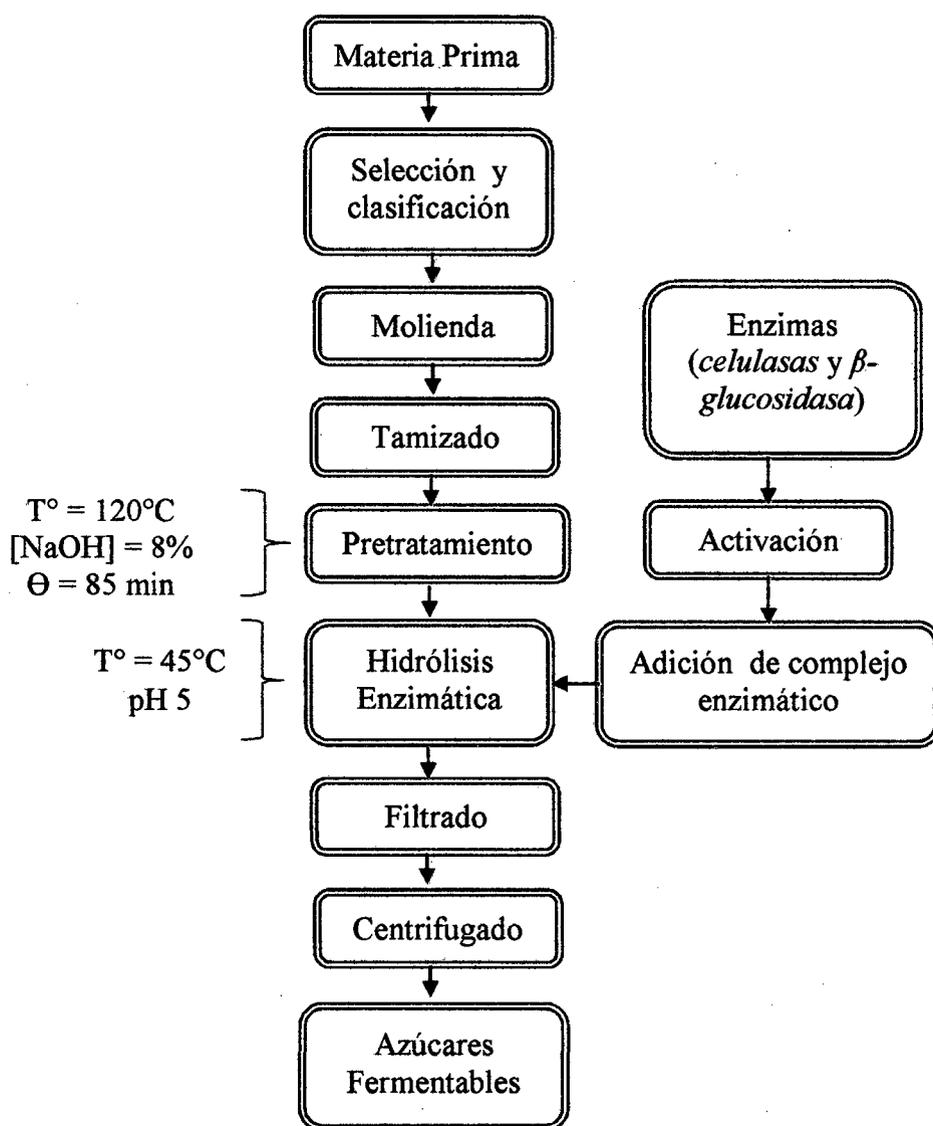


Figura 11: Operaciones que intervienen para la obtención de azúcares fermentables.

a) **Materia prima:**

Se utilizó cascarilla de arroz de la variedad NIR-I proveniente del Valle de santa, para la realización de este estudio.

b) **Selección y Clasificación de la materia prima:**

Se realizó una selección para verificar que la materia prima proveniente, no se encontrara con presencia de hongos, ni partículas extrañas.

c) **Molienda:**

El material seco fue molido hasta obtener partículas finas. El equipo usado para este fin fue en un molino automatizado de martillo.

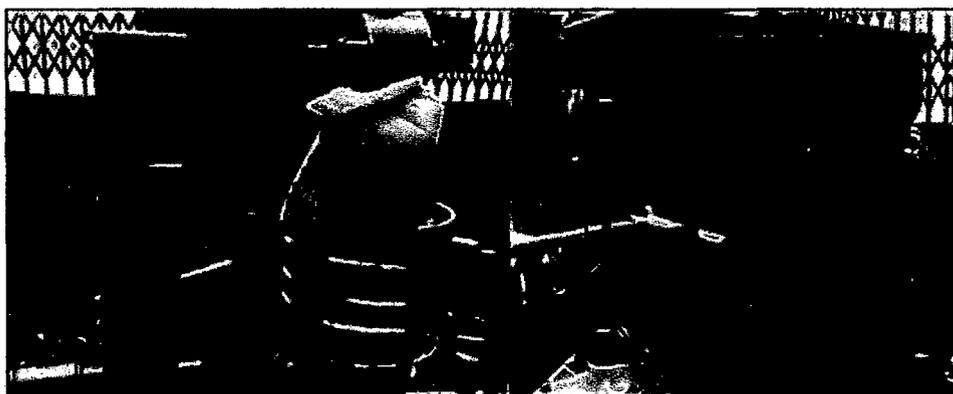


Figura 12: Molienda de la cascarilla de arroz

d) **Tamizado:**

Se tamizó para obtener un tamaño de partícula a través de tamiz N° 60, el cual diluye sin problemas en el agua y facilita la hidrólisis por la ampliación del área de contacto (MEJIA, 2007).



Figura 13: Tamizado de la cascarilla de arroz

e) **Pretratamiento:**

Este proceso consistió en someter la cascarilla de arroz tamizada a condiciones de alta temperatura, 120°C , en un medio alcalino con hidróxido de sodio a una concentración del 8% durante una hora. Al término el material fue lavado hasta obtener un pH neutro.

La materia prima se sometió a secado con el fin de remover residuos de agua. El secado del material se prolongó hasta extraer aproximadamente el 80 % de la humedad. El proceso de secado se realizó en una estufa a una temperatura de 60°C por 12 horas.

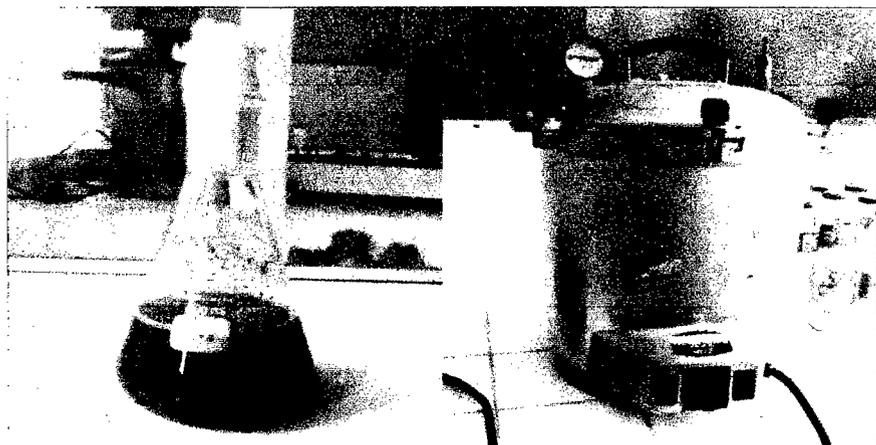




Figura 14: Pretratamiento en autoclave de la cascarilla de arroz tamizada.

f) **Hidrólisis enzimática:**

Los tratamientos realizados para la hidrólisis enzimática se han realizado en condiciones de T° y pH definidos por el proveedor, para ello se utilizó un Matraz Erlenmeyer de 500ml de capacidad como reactor, en un Shaker a 160 rpm de agitación, tomándose como parámetros iniciales: enzima celulasa a una concentración establecida (entre 1 a 3 g/L), y beta – glucosidasa (entre 0.2 y 0.6 g/L) y la relación del peso volumen de la muestra igual 2.5% del volumen, trabajándose con 40ml para todos los tratamientos. Éstos tuvieron un tiempo de 24 horas por tratamiento, y al finalizar la hidrólisis se desactivó la enzima sometiéndolas a ebullición por 3 minutos y luego a bajas temperaturas, 4 °C durante 0.5 horas.



Figura 15: Sistema para la realización de la hidrólisis enzimática. Shaker

g) Filtrado

El sobrenadante se filtró para reducir la cantidad de sólidos de la muestra.

h) Centrifugado

Se tomó el sobrenadante filtrado de los tratamientos y fueron llevados a centrifugación por 15 minutos a velocidad de 4800 rpm.

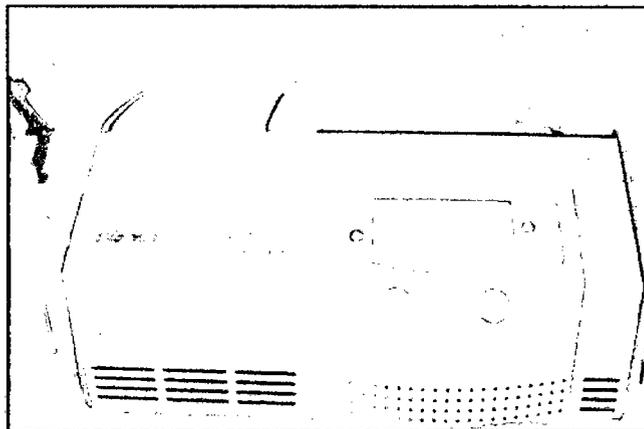


Figura 16: Centrifugado de la muestra.

3.1.2. Esquema del Diseño Experimental

Diseño Compuesto Central Rotable con 4 puntos centrales. El diseño deberá ser corrido en un solo bloque. El orden de los experimentos ha sido aleatorizado.

Tabla 4: Diseño Experimental de los tratamientos

Nº de Tratamiento	BLOQUE	Enzima Celulasa	Enzima Glucosidasa	Azucares Totales
		%	%	g/L
1	1	3	0.4	
2	1	3	0.4	
3	1	3	0.6	
4	1	5	0.3	
5	1	2	0.6	
6	1	2	0.3	
7	1	1	0.4	
8	1	5	0.4	
9	1	3	0.4	
10	1	5	0.6	
11	1	3	0.2	
12	1	3	0.4	

3.2. Materiales y Métodos

3.2.1. Materiales:

3.2.1.1. Materia prima

A) Cascarilla de Arroz

La cascarilla de arroz es proveniente del valle de Santa, ubicado en el Departamento de Ancash.

B) Enzimas:

Las enzimas corresponden a un preparado comercial adquirido por medio de la empresa Novozyme.

- Cellulase Complex (Celulasa)

Especificaciones:

Actividad Enzimática : 1000 BHU(2)/g

BHU = Biomass Hydrolisys Unit

Temperatura : 45 °C

pH : 5.0

- β - Glucosidasa

Especificaciones:

Actividad Enzimática : 250 CBU/g

Temperatura : 45 – 70 °C

pH : 2.5 – 6.5

B) Microorganismo:

Saccharomyces cerevisiae ATCC 4126

3.2.1.2. Reactivos:

Buffer citrato (pH 5)

- Ácido cítrico 0.1 M
- Citrato de sodio 0.1 M

Reactivo Bradford

- 0.1 azul coomassie 6-250
- 50 ml. ETHOH (95%)
- 100 ml H₃PO₄ (85%)
- 1 Lt agua destilada

H₂SO₄ a 72% (50ml)

Ácido acético glacial (0.6ml)

Peróxido de hidrogeno (1.8ml)

NaOH 17.5%

Reactivo DNS

- 30 gr NaK
- 1.6 NaOH
- 100 ml agua destilada

3.2.1.3. Materiales de vidrio y otros:

- a) Pipetas
- b) Micro pipeta
- c) Varilla de vidrio
- d) Vaso de precipitados
- e) Matraz Erlenmeyer
- f) Probetas
- g) Tubos de ensayo
- h) Tubos de centrifugación
- i) Tubos para espectrofotómetro

j) Viales

3.2.2. Equipos e instrumentos

- 3.2.2.1. Shaker:** SARTORIUS STEDIUM BIOTECH CERTOMAT
- 3.2.2.2. Centrifuga:** SIGMA (2 – 16 pk) SARTORIUS
- 3.2.2.3. Refrigerador**
- 3.2.2.4. pH metro:** marca Inolab, pH (-2,000 + 16.000), temperatura (-5 100 °C)
- 3.2.2.5. Agitador magnético:** marca NuVOVA
- 3.2.2.6. Brix I157 AUTOMATIC REFRACTOMET**
- 3.2.2.7. Baño maría:** marca Biotron BTR-65, temperatura de trabajo (25-80°C)
- 3.2.2.8. Espectrofotómetro:** Marca UNICO 2800 UV/VIS
- 3.2.2.9. Balanza analítica:** Marca Climatec S. A.
- 3.2.2.10. Horno:** Marca P-selecta temperatura de trabajo (0-220°C)
- 3.2.2.11. Agitador de tubos:** Marca Maxi Mix II, vortex Mixer series 871, modelo M37615.
- 3.2.2.12. Cromatógrafo de Gas Shimadzu modelo 2010:** Con detector de ionización de flama (GC-FID), equipado con columna capilar de Silice fundida PAG Restek, de carácter multipolar, con las siguientes dimensiones: (30 m de comprimido x 0.25 mm de diámetro interno). Se usara el Helio como gas de arrastre, gas de hidrogeno y aire, todos con alto grado de pureza (99.99 %).

3.3. Métodos:

3.3.1. Descripción de materia prima:

Las materias primas serán tomadas de molinos del valle de santa, teniendo en cuenta la ausencia de hongos u otro factor que pudiera alterar el proceso enzimático.

3.3.2. Análisis físico-químico:

En el análisis físico-químico se determinarán los porcentajes de lignina, holocelulosa, celulosa, cenizas totales y agua.

3.3.2.1. Determinación de Humedad (Método AOAC 14.003)

3.3.2.2. Determinación del contenido de Cenizas (Método AOAC 14.006)

3.3.2.3. Determinación de Lignina (Método Klason, Schwanninger et al., 2002)

Procedimiento

Se pesa un gramo con precisión de 0.0001gr, se mezcla bien con 15ml de H₂SO₄ 72% y se deja reposar 24 horas.

Se trasvasa el contenido del vaso a un matraz de 1000 ml y se añaden 560 ml de agua destilada para pasar de H₂SO₄ 72% a H₂SO₄ 3% se mantiene en ebullición durante 4 horas, al cabo de las cuales se deja sedimentar el sólido y se filtra en una placa filtrante.

El sólido filtrado se lava con agua destilada caliente hasta que el pH del agua de lavado no sea ácido, se seca en estufa a 105°C durante 12 horas y se pesa. Se toma unos 100 mg de sólido y se calcina en mufla a 430°C durante 24

horas, obteniéndose así un porcentaje en materia orgánica (MOling)

Humedad operativa: $100/(100 - \text{Humedad de muestra})$

$$\text{lignina (\%)} = \frac{P_3 - P_2 * (\%MOling)}{P_1 * (100 - \%H)} * 100$$

- P_1 : Peso inicial de la muestra
 P_2 : Peso papel filtro
 P_3 : Peso sólido después de las 12 horas
%MOling : Materia Orgánica
% H : Humedad Operativa

3.3.2.4. Determinación de Holocelulosa (Técnica descrita por Browning 1967)

Procedimiento

Se pesan 4 gr de muestra con precisión de 0.0001 gr en un erlenmeyer de 250 ml de capacidad y se añaden 63 ml de agua destilada.

A la suspensión se le añaden 0.2 ml de ácido acético glacial y 0.6 ml de peróxido de hidrogeno.

Se cubre y se introduce a baño maria (70-80°C), agitando de vez en cuando. Este proceso se repite dos veces más. Al finalizar la tercera hora, se coloca en baño de agua –hielo hasta que la temperatura baje a los 10°C.

Se filtra en placa filtrante, y se lava con agua destilada hasta la eliminación de la coloración amarilla.

Después se deja secar a 60°C y se pesa. Al sólido obtenido se le determina porcentajes de humedad (% Holo) y de materia orgánica (%MOholo)

$$\text{Holoceulosa}(\%) = \frac{(P_3 - P_2) \times (100\% - \%H_{\text{holo}}) \times (\%MO_{\text{holo}})}{P_1 \times (100 - \%H)}$$

- P_1 : Peso inicial de la muestra
 P_2 : Peso papel filtro
 P_3 : Peso sólido después de secar
 $\%H_{\text{holo}}$: % de humedad del sólido obtenido
 $\%MO_{\text{holo}}$: % de materia orgánica obtenida
 $\%H$: Humedad Operativa

3.3.2.5. Determinación de Celulosa (Norma ANSI/ASTM, 1977b)

Procedimiento

Se pesa 1gr de holocelulosa, con precisión de 0.0001 gr, en un Erlenmeyer de 100 ml. Se añaden 5ml de NaOH 17.5% hasta consumir un total de 12.5 ml y se mantiene 30 minutos a temperatura ambiente. Se añaden 16.5 ml de agua destilada a 20°C para pasar de NaOH 17.5% a 8.3%, se mezclan bien y se mantiene durante 1 hora a temperatura ambiente.

A continuación se filtra en placa filtrante y se lava con 50 ml de NaOH 8.3% y posteriormente con agua destilada. Se repite el lavado con NaOH 8.3% y agua destilada dos veces. Se corta la succión y se añaden 7.5 ml de ácido acético 10% y se deja en contacto 3 minutos. Se vuelve a conectar el

vacío y se lava con agua destilada hasta la neutralidad del filtrado. Se seca a 105°C en estufa durante 12 horas se pesa. Se calcula el contenido en materia orgánica del sólido obtenido (%MOcel), y el contenido en celulosa se calcula de acuerdo con la expresión:

$$Celulosa (\%) = \frac{(P_3 - P_2) \times (\%MOcel) \times (\%Holocelulosa)}{P_1 \times (\%MOholo) \times (100 - \%Hholo)} \times 100$$

P₁ : Peso inicial de la muestra

P₂ : Peso papel filtro

P₃ : Peso sólido después de secar 12 horas

%MOcel: de humedad del sólido obtenido

%Holocelulosa : Holocelulosa en porcentaje

%Hholo : % de humedad del sólido obtenido de la Holocelulosa

%MOholo : % de materia orgánica obtenida de la Holocelulosa

3.3.3. Análisis con enzimas

3.3.3.1. Determinación con Proteínas de Bradford (método Bradford, 1976)

A. Fundamento:

El método se basa en la Unión directa del colorante azul brillante de Coomassie G-250, con la estructura terciaria de las proteínas y aminoácidos específicos (enzima), lo que produce un incremento en la absorbancia en relación directa con la concentración.

B. Preparación del reactivo:

Se disuelve 100 mg de Azul brillante de Coomassie G-250 en 50 ml de etanol (95% de pureza) Agitando continuamente para evitar la formación de grumos. Se le añade luego 100 ml de ácido fosfórico (85% w/v). Se enrasa hasta volumen final de 1 litro con agua destilada.

C. Procedimiento:

Se prepara una solución matriz de la enzima a realizar el análisis con el buffer acetato, pH: 5.0 a una concentración de 0.1 (mg/ml). En un tubo de ensayo se agregan 0.5 ml de la disolución matriz y se añade 5ml del reactivo de Bradford, se lleva a un agitador de tubos. Se deja reposar por 5 minutos. Después se realiza la lectura en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 595nm.

3.3.3.2. Determinación de azúcares reductores (método DNS-Miller, 1959)

A. Fundamento:

El ácido 3,5 dinitrosalicílico en presencia de calor reduce el ácido 3-amino-5 nitrosalicílico por los azúcares reductores presentes, desarrollándose un color amarillo café el cual es estable hasta por 24 horas. La lectura se realiza a 540nm. Este método permite medir las unidades reductoras presentes en los azúcares. La lectura se realizará en un espectrofotómetro tipo Spectronic 21 DV, Milton Roy company.

3.3.3.3. Determinación del rango de linealidad

A. Fundamento:

La reacción es Lineal en el tiempo hasta un periodo en el que se puede expresar la actividad enzimática en términos de velocidad (cantidad de producto formado por unidad de tiempo)

B. Procedimiento:

Se realiza con la enzima y la muestra que teóricamente tuviera más celulosa a diferentes concentraciones de enzima resultados del análisis estadístico en mg/ml con respecto a la muestra molida en base seca, tomándose como muestra 1 ml cada 60 minutos

3.3.3.4. Determinación de actividad enzimática:

Una unidad de actividad enzimática (símbolo U) es la cantidad de enzima que cataliza la conversión de 1 μmol de sustrato por minuto. Se utiliza también en combinación con otras unidades (U/mg o U/ml) para señalar respectivamente la actividad enzimática

A. Procedimiento:

Se realiza con la concentración de enzima que presente mayor formación de producto en un menor tiempo, se procede a calcular su actividad enzimática, tomándose como datos la cantidad de producto formado y el tiempo, en el punto donde la gráfica deja de ser lineal reportándose los datos en ($\mu\text{mol}/\text{min}$)

3.3.3.5. Determinación de parámetros cinéticos:

La velocidad de transformación de los sustratos de una reacción en los correspondientes productos en una reacción enzimática que

transcurra en condiciones de estado estacionario es dependiente tanto de las concentraciones de la enzima como de los sustratos.

Normalmente, esa dependencia puede expresarse matemáticamente por la ecuación de Michaelis-Menten:

$$v = V_{\max} [S] / (K_m + [S])$$

La forma usual es a través de mediciones de velocidad inicial de reacción a diferentes concentraciones de aquellas sustancias que la afectan. La manera más adecuada de obtenerlos es por linealización de las ecuaciones cinéticas.



A través de la medición de intercepto o pendiente de la recta resultante es posible evaluar los parámetros V_{\max} y K_m , como indica la gráfica 06. En el método Lineweaver- Burke.

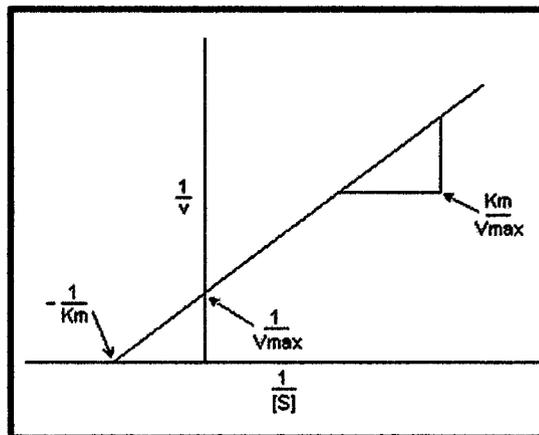


Figura 17: Gráfica de Lineweaver-Burke o del doble recíproco.

La gráfica de Lineweaver-Burk o representación de doble recíproco es la forma más común de mostrar los datos cinéticos. El resultado de este tipo de representación es una línea recta cuya ecuación es $y = mx + c$, siendo el punto de corte entre la recta y el eje de ordenadas equivalente a $1/V_{max}$, y el punto de corte entre la recta y el eje de abscisas equivalente a $-1/K_m$.

3.3.4. Determinación de la composición proximal de azúcares del hidrolizado de cascarilla de arroz.

Mediante el método de determinación de azúcares reductores DNS, obtuvimos la concentración de azúcares reductores totales en el hidrolizado de cascarilla de arroz pretratada.

Se desarrolló mediante un análisis cromatográfico, usando un equipo HPLC – Cromatografía Líquida de Alta Resolución.

3.3.4.1. Método de Análisis Cromatográfico – HPLC

A. Preparación de curvas patrón de Glucosa, Xilosa y Arabinosa.

El contenido de glucosa, xilosa, y arabinosa, se realizó por HPLC, utilizando una columna Synchronis Amino (150x4.6mm), temperatura 30°C, fase móvil acetonitrilo:agua 75:25%, a un flujo isocrático de 1.00 mL/min, detector de Índice de Refracción. Los patrones utilizados fueron reactivos grado HPLC marca Sigma.

La preparación de los patrones (Glucosa, Xilosa y Arabinosa) se realizó a concentraciones de: 5%, 10%, y 15% (azúcar: agua) para cada azúcar.

La cuantificación fue realizada por el software haciendo la interpolación de los puntos para construir las curvas patrón, y comparando las áreas obtenidas en el tiempo de retención de cada uno de los azúcares analizados.

3.3.4.2. Fermentación del hidrolizado de cascarilla de arroz

Se llevaron a cabo las fermentaciones con la cepa *Sacharomyces cerevisiae* ATCC 4126. Se realizó la experiencia por duplicado y tomaron muestras cada hora.

Se reportaron los resultados comparando rendimientos de etanol vs tiempo, para un tiempo de fermentación de 8 horas.

3.3.4.3. Referencias de composición de medios de mantención, activación y cultivo para *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 4126.

Tabla 5: Composición de los medios de mantención, activación y cultivo para *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 4126.

Medio	Nutriente	Concentración (g/l)
Sólido de mantención (YM sólido)	Extracto de levadura	3
	Peptona	5
	Extracto de malta	3
	Agar	20
	Glucosa	10

Activación	Glucosa	15
	Extracto de levadura	3
	Extracto de malta	5
	Solución de sales	5 ml/L
Fermentación	Glucosa	1,8
	Extracto de levadura	
	(NH ₄) ₂ SO ₄	
	KH ₂ PO ₄	
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	10 ml/L
	Solución de sales	100 ml/L
	Tampón citrato pH 4,2	

Composición elemental m.o.: C 45%; N 9%; Mg 0,4%; K 0,5% y P 2,0%

U_{máx} = 0,37 h⁻¹ en glucosa a 35°C (Lane, M. y Morrissey, J. 2010)

Composición de la solución de sales 100 veces concentrado, utilizadas en los medios de cultivo en g/L: 1,12 CaCl₂·2H₂O; 0,11 ZnSO₄·7H₂O; 0,06 FeSO₄·7H₂O; 0,05 CuSO₄·5H₂O; 0,01 CoCl₂·6H₂O; 0,0005 MoO₃; 0,027 MnCl₂·6H₂O y 0,28 NaCl

Condiciones de cultivo: Temperatura 35° y velocidad de agitación de 180 rpm en el agitador orbital (Shaker).

3.3.4.4. Metodología para el Análisis Cromatográfico – Cromatografía de Gases.

A. Preparación de curvas patrón de Etanol.

Se preparó soluciones patrón para cada uno de los alcoholes superiores en concentraciones de: (0.2%, 0.6%, 1%, 1.4%) en solución etanol/agua (40:60 v/v), la cuantificación será realizada por interpolación de las curvas patrón. El patrón solo fue etanol.

B. Condiciones cromatográficas.

Las condiciones cromatográficas usadas serán las siguientes: temperatura del inyector 200°C; temperatura del detector 200°C, velocidad de gas de arrastre (He) a 30mL/min; flujo de hidrogeno 40.0mL/min; flujo de aire 399.8 mL/min; radio de división (split) de 300.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Determinación de las características físico-químicas de la cascarilla de arroz

En la tabla 05 se muestra la composición química de la cascarilla de arroz, donde la celulosa es el componente más abundante, seguido de la hemicelulosa.

Ahora, si se observan los rangos para el análisis químico a nivel mundial, estos corresponden a los siguientes valores: La celulosa 25.89 – 35.5 %; Hemi- celulosa 18.1 – 21.35 % y la Lignina 18.20 – 24.6 % (Valverde, 2007).

Tabla 6: Composición físico-químico de la cascarilla de arroz.

Composición	Porcentaje (%)
Humedad	15
Cenizas	18
Celulosa	25.03
Hemicelulosa	18
Lignina	19.49
Azúcares	1.89

Elaboración en base a datos experimentales. (Anexo 2, 3, 4 y 5).

Contrastando los valores obtenidos en el presente trabajo se muestra una composición de la cascarilla de arroz en 19.5% de lignina, 25% de

celulosa y 18% de hemicelulosa. Por lo citado, se determina que se trabajó dentro del rango, a excepción del contenido de celulosa con un valor menor al 1% dentro del rango mundial, por lo que se considera dentro de los márgenes establecidos considerando error por método utilizado al igual que por variedad usada.

4.2. Selección del pretratamiento como etapa previa a la hidrólisis:

Otro de los aspectos fundamentales a tener en cuenta para que un proceso de hidrólisis enzimática de la celulosa sea viable, lo constituye la necesidad de encontrar el pretratamiento más efectivo para cada tipo de sustrato. Hills y Nakano (2009) señalan que se han desarrollado muchos tratamientos para hacer los materiales lignocelulósicos más susceptibles a la sacarificación, y agrega que en ellos se incluyen los tratamientos físicos, químicos y enzimáticos". (p.285).

Los pretratamientos físico-químicos, cuyo principal efecto es la reducción del tamaño de las partículas, producen un aumento en la tasa de hidrólisis, debido fundamentalmente a la disponibilidad de superficie para la adsorción de las enzimas hidrolíticas, y si esta fase es la limitante del proceso, supone finalmente un beneficio para el proceso general, produciendo menores tiempos de retención y tamaños de reactor menores, razón por la que se realizó el molido de la muestra de cascarilla de arroz, puesto que disminuye el índice de cristalinidad, el grado de polimerización de la celulosa, y permite aumentar la superficie de contacto con reactivos y enzimas (Colina, 2008, p.179). Obteniendo

finalmente un tamaño de partícula a través del tamiz N° 60 para una mejor dilución y una superficie de contacto mayor.

McMillan (1994) sugiere que para separar las fibras de celulosa a partir de cualquier material lignocelulósico, es necesaria la solubilización de la lignina y de las poliosas en el medio reaccional (McMillan, 1994, p.292). Según Alfonset et al. (1986), la presencia de lignina y existencia de zonas cristalinas en las fibras celulósicas hacen imprescindible pretratar por métodos físicos o químicos los sustratos lignocelulósicos antes de efectuar su hidrólisis, con objeto de alterar su estructura y facilitar el posterior ataque por las enzimas.

Los pretratamientos que incrementan la digestibilidad de la biomasa lignocelulósica son los siguientes: mecánicos, térmicos (explosión con vapor y agua caliente), ácidos, alcalinos, de oxidación y combinaciones de estos (Hendriks et al., 2008). Sin embargo, los tratamientos ácidos degradan mayor cantidad de celulosa y no necesariamente convirtiéndolos a azúcares, sino que transforma en otro tipo de compuestos tales como ácido acético, furfural e hidroximetil furfural y compuestos derivados de la lignina que pueden inhibir un eventual proceso de fermentación posterior (Ballesteros, 2004). Por ello descartamos el uso de un tratamiento ácido como etapa previa a la hidrólisis.

Por otro lado, la disminución de lignina en los materiales se puede atribuir al efecto que tiene el pretratamiento alcalino de remover o modificar la lignina, favoreciendo la accesibilidad de las enzimas y

mejorando la digestibilidad de la celulosa (Wang et al.,2008); sin embargo, la efectividad del pretratamiento alcalino depende de las condiciones de temperatura, tiempo y concentración de NaOH, que pueden llevar a la hidrólisis de la celulosa y hemicelulosa, disminuyendo la cantidad de sólido recuperado para las etapas posteriores de hidrólisis y fermentación.

Piñeros y Otálvaro (2011), muestran en el pretratamiento con NaOCl de cascarilla de arroz, que del contenido de lignina klason libre de cenizas para los residuos pretratados la concentración fue un 16% menos comparado con los residuos sin tratar.

Finalmente, el pretratamiento aplicado con NaOH en la experiencia permitió una disminución del contenido de lignina en un 33.45%, teniendo un valor inicial de 19.49% de la muestra de cascarilla de arroz sin pretratamiento a 6.52% de la muestra pretratada. (Ver Anexo 3).

4.3. Hidrólisis enzimática de la cascarilla de arroz:

Después de que la biomasa lignocelulósica ha sido pretratada, la celulosa y hemicelulosa son removidas del complejo formado con la lignina. Las estructuras de celulosa se abren y los carbohidratos están disponibles en su forma simple para la fermentación. Esto puede hacerse utilizando enzimas tales como complejos celulásicos, que son selectivas para la reacción de celulosa a glucosa.

Las dos enzimas usadas fueron celulasas y β -glucosidasas. En el caso de las primeras catalizan la degradación de celulosa a “glucosa y celobiosa”, y la segunda enzima (también llamada celobiasa) hidroliza la

celobiosa a “glucosa”. Para el presente proyecto, ambas enzimas son comerciales y se trabajó con las especificaciones técnicas del proveedor – Novozymes: pH 5 y temperatura 45°C. Y con el fin de incrementar la concentración de azúcares fermentables, se diseñó un experimento de optimización de la hidrólisis enzimática de la cascarilla de arroz pretratada.

En cuanto a la concentración de sólidos (sustrato con respecto al medio de reacción), Mejía y Martínez (2007) señalan que “la mejor dilución de la muestra para la hidrólisis es una solución de 2.5% p/v”. Además, la ficha técnica del proveedor – Novozymes, indica una concentración entre 2 – 5 %. Por ello se tomó valor de 2.5% p/v de sustrato en relación al medio reactante – solución buffer citrato.

Los tratamientos realizados se presentan con el Diseño Compuesto Central Rotable (DCCR) con 4 puntos centrales. Elaborado y optimizado en 12 corridas con el software estadístico STATGRAPHICS CENTURION XV. Después de cada tratamiento se efectuaron pruebas de concentración de azúcares reductores, los que se observan en la Tabla 07.

Tabla 7: Estadístico mostrando los 12 tratamientos con sus respuestas.

Tratamiento	<i>Celulasa</i>	<i>β-Glucosidasa</i>	Azúcares Reductores (g/L)
1	3%	0.40%	11.422
2	3%	0.40%	12.856

3	3%	0.60%	12.208
4	5%	0.30%	15.417
5	2%	0.60%	13.095
6	2%	0.30%	11.388
7	1%	0.40%	6.812
8	5%	0.40%	16.169
9	3%	0.40%	12.720
10	5%	0.60%	15.178
11	3%	0.20%	13.232
12	3%	0.40%	13.266

Se observa que los tratamientos que presentan valores más altos en azúcares reductores son aquellos con mayor concentración de celulasa, mientras los que tienen menor concentración de esta enzima presentan menores rendimientos. El tratamiento N° 8 fue la de más alta concentración de azúcares reductores: 16.17 g/L.

4.4. **Determinación de las concentraciones óptimas de enzimas:**

Piñeros y Otálvaro (2011) en su investigación denominada: “Evaluación de la producción de etanol a partir de cascarilla de arroz pretratada con NaOCl, mediante hidrólisis y fermentación simultáneas”; recomendaron para la mejora de los resultados de su trabajo utilizar enzimas con actividad β -glucosidasa, con el fin de aumentar la cantidad de glucosa disponible. Además del aporte en la ficha técnica del proveedor – Novozymes (Ver Anexo 8), en la que recomienda el uso combinado de

las enzimas Celulasa y β -glucosidasa para optimizar la obtención de azúcares fermentables en el hidrolizado.

A partir de los resultados presentados en la tabla 7 se elaboró un análisis de varianza. La tabla ANOVA descompone la variabilidad de Azúcares Reductores en contribuciones debidas a varios factores. Los valores-P prueban la significancia estadística de cada uno de los factores. Cuando un valor-P es menor que 0.05, este factor tiene un efecto estadísticamente significativo sobre Azúcares Reductores. Por lo observado en el Cuadro ANOVA, la variable estadísticamente significativa para la investigación a un nivel de confianza del 95% es la enzima *Celulasa*.

Tabla 8: Análisis de Varianza (ANOVA) para Azúcares Reductores

Fuente	Suma de Cuadrados	GL	Cuadrado Medio	F	Valor-P
A:Enzima Celulasa	33.9592	1	33.9592	25.08	0.0024
B:Enzima Glucosidasa	0.010882	1	0.010882	0.01	0.9315
AA	2.51878	1	2.51878	1.86	0.2216
AB	1.56767	1	1.56767	1.16	0.3233
BB	1.25066	1	1.25066	0.92	0.3737
Error total	8.12523	6	1.3542		
Total (corr.)	64.4511	11			

Tal como se muestra en el diagrama de Pareto (Figura 18) este tipo de análisis permite estudiar la influencia de las variables sobre la respuesta (producción de azúcares fermentables) y las interacciones entre ellas. Se puede observar que la concentración de enzima Celulasa, su forma lineal, es el componente que influye sobre la producción de azúcares reductores, sin embargo el efecto cuadrático tanto de esta misma variable como de la concentración de enzima β -Glucosidasa, al igual que la combinación de ambos no causarían ningún efecto significativo en la variable respuesta.

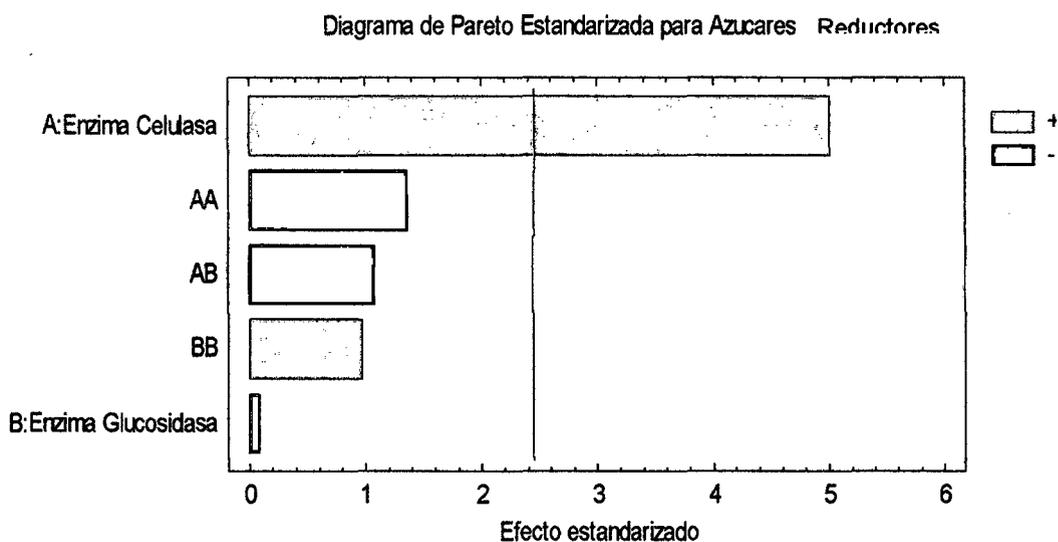


Figura 18: Diagrama de Pareto de los efectos estandarizados sobre la variable respuesta; Rendimiento de azúcares reductores.

Es importante aclarar que el signo que presentan los coeficientes determina la forma como la variable influye en el sistema y da una idea de la dirección a seguir en los experimentos para ubicar el óptimo. Un signo positivo para una variable determinada, indica que el incremento de la concentración de enzimas en su forma lineal de estos componentes

puede aumentar la producción de azúcares, y del mismo modo el signo negativo indica su disminución.

Tabla 9: Coeficiente de regresión del modelo matemático

Coeficiente	Estimado
constante	4.24708
A:Enzima Celulasa	4.68371
B:Enzima Glucosidasa	-7.76674
AA	-0.284118
AB	-2.66585
BB	20.0204

La ecuación de regresión que se ha ajustado a los datos es:

$$\begin{aligned}
 \text{Azúcares Totales} = & 4.24708 + 4.68371 * [\text{Celulasa}] - \\
 & 7.76674 * [\beta - \text{Glucosidasa}] - 0.284118 * [\text{Celulasa}]^2 - \\
 & 2.66585 * [\text{Celulasa}] * [\beta - \text{Glucosidasa}] + 20.0204 * \\
 & [\text{Celulasa}]
 \end{aligned}$$

Donde los valores de las variables están especificados en sus unidades originales.

De la función que describe el modelo de segundo orden se calculó el punto estacionario de manera teórica, derivando esta ecuación. Las coordenadas de este punto obtenidas por este método, se sustituyeron en la ecuación general para calcular la cantidad de azúcares fermentables producida en las condiciones del punto óptimo. De ello resultó que la concentración de azúcares fermentables obtenida teóricamente era de

17.1443 g/L. Este valor calculado de azúcares fermentables indica que se trata del punto óptimo.

La figura 19, permite visualizar la superficie de respuesta en un espacio tridimensional, en el que la tercera dimensión representa el rendimiento de azúcares sobre el plano bidimensional definido por las combinaciones de los niveles de los dos factores (concentración enzimática de celulasa y β -glucosidasa). Analizando esta superficie de respuesta se observa que a una concentración enzimática de *celulasas* del 5% favorece la producción de azúcares reductores, mostrándose la existencia de un máximo local en la misma. De igual forma sucede con la enzima *β -glucosidasa*, teniendo su punto máximo en 0.2%. Si nos alejamos de este punto, aumentando o disminuyendo los valores de concentración, el valor esperado decrece. Por tanto para alcanzar el porcentaje de rendimiento óptimo en el proceso de hidrólisis enzimática que estamos considerando, debemos trabajar con los valores de concentración enzimática que nos indica el punto óptimo.

Superficie de Respuesta Estimada

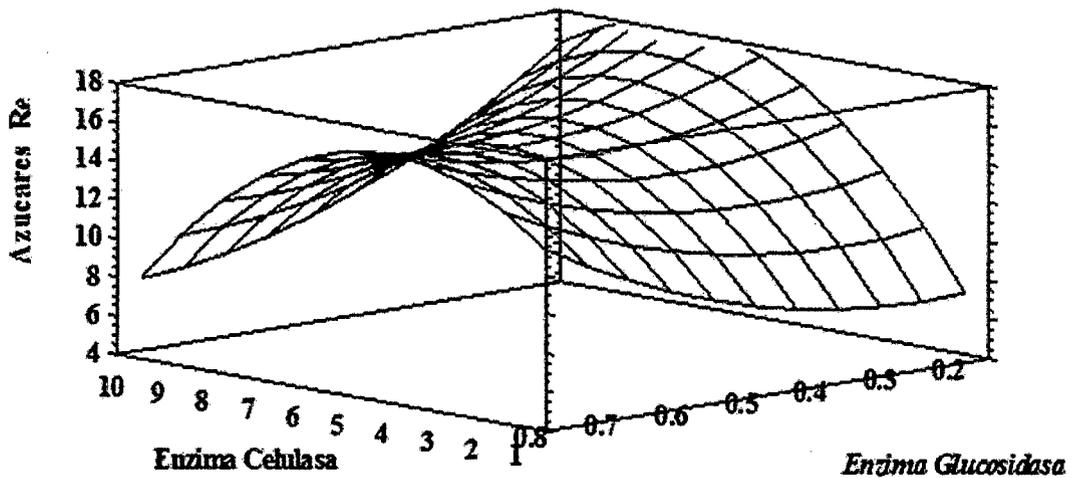


Figura 19: Superficie de respuesta tridimensional de los rendimientos de azúcares reductores en función a la concentración de enzimas utilizadas.

Al Optimizar la respuesta tenemos:

Valor óptimo = 17.1443 g/L

A continuación se muestra la combinación de los niveles de los factores, la cual maximiza la obtención de Azúcares Reductores sobre la región indicada.

Tabla 10: Valores Críticos resultados de la optimización de los parámetros de concentración de enzimas

Valores Críticos; Variable: Rendimiento de Azúcares Reductores

Concentración	Observación mínima	Valor Óptimo	Observación Máxima
<i>Celulasa</i>	1.0	5.0	5.0
<i>B-Glucosidasa</i>	0.2	0.2	0.6

Para validar la optimización enzimática mediante el software estadístico, realizamos un ensayo de hidrólisis enzimática a partir de las concentraciones óptimas de enzimas Celulasa y β -glucosidasa en la cascarilla de arroz pretratada, en la Tabla 11 se muestran los valores de producto (azúcares reductores en g/L) durante el tiempo de reacción.

Tabla 11: Concentración de azúcares reductores en g/l producidos en el tiempo, a condiciones óptimas de concentración de enzimas.

T (min)	ABSORBANCIA	Azúcares (Dilución)	Azúcares Reductores
0	0.003	0.003	0.026
30	0.101	0.170	1.699
60	0.192	0.325	3.253
90	0.253	0.429	4.294
120	0.303	0.515	5.148
180	0.401	0.682	6.821
240	0.499	0.849	8.494
300	0.576	0.981	9.809
360	0.698	1.189	11.892
480	0.446	0.759	15.178
600	0.503	0.856	17.125
720	0.503	0.856	17.125
840	0.499	0.849	16.988
960	0.502	0.855	17.091
1080	0.502	0.855	17.091
1200	0.501	0.853	17.057

1320	0.504	0.857	17.146
1440	0.503	0.856	17.125

La curva que representa la obtención de azúcares reductores se muestra en el figura 20, con una reacción en un tiempo de 1440 minutos, donde se describe el rendimiento máximo alcanzado en un valor de 17.146 g/L correspondiente al minuto 600 de la hidrólisis, manteniendo en tiempos posteriores concentraciones constantes de producto.

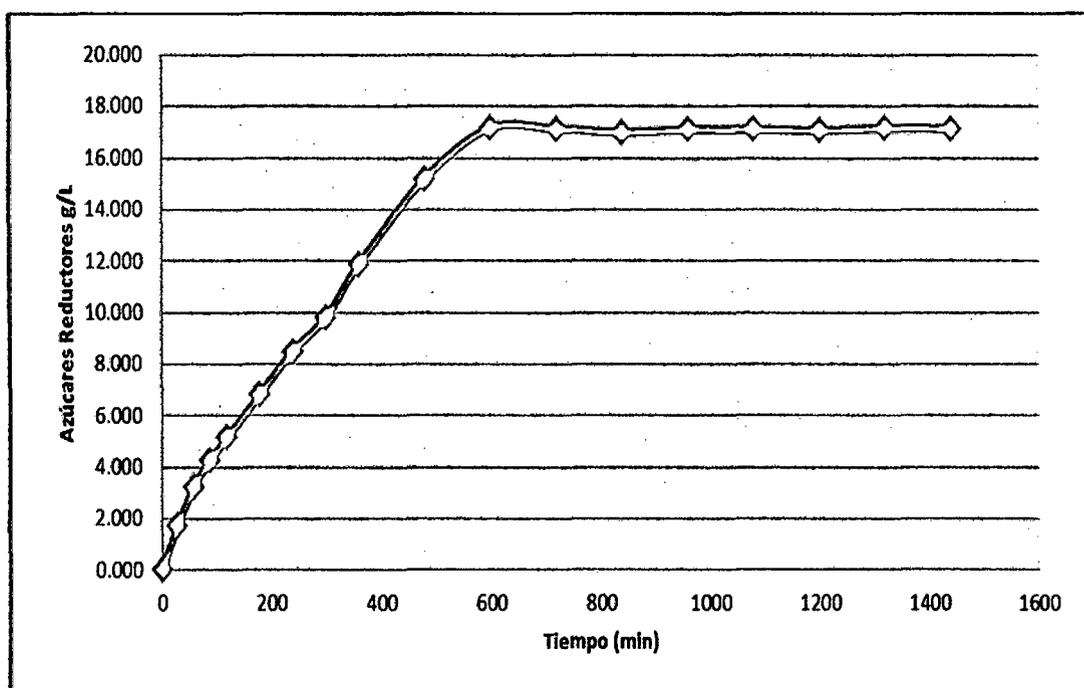


Figura 20: Representación gráfica de la cinética de reacción del complejo enzimático: Celulasa y β -glucosidasa a condiciones óptimas.

4.5. Determinación Cuantitativa de Glucosa

Como parte de la caracterización del hidrolizado de cascarilla de arroz pretratada, determinamos la concentración de glucosa en el hidrolizado obtenido de las concentraciones óptimas de enzimas. (Ver Anexo 8)

El valor promedio de glucosa presentado en la Tabla 12, muestra que en el hidrolizado de cascarilla de arroz, de un total de 17.146 g/L de azúcares reductores, existe 9.06 g/L de glucosa, es decir una relación de 52.82% de glucosa con respecto al total de azúcares reductores.

Tabla 12: Determinación cuantitativa de glucosa en el hidrolizado de cascarilla de arroz pretratada, mediante kit Monlabtest.

Muestra	ABS	Glucosa g/L	Promedio g/L
1	0.373	9.142	9.05624
2	0.366	8.970	

4.6. Caracterización del hidrolizado de cascarilla de arroz mediante HPLC.

En la figura 21 se presenta el cromatograma de azúcares simples para glucosa, xilosa y arabinosa. Los resultados del análisis por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), muestran que la concentración de glucosa es 8.991 g/L (comparado a un valor de 9.06g/L determinados en el apartado anterior, se validan los resultados con el uso de ambos métodos) y xilosa 2.838 g/L obtenida del hidrolizado de cascarilla de arroz pretratada (siendo la concentración de azúcares reductores totales de 17.146 g/L). También se realizó la determinación de arabinosa en el licor hidrolizado, sin embargo no reporta ningún resultado positivo.

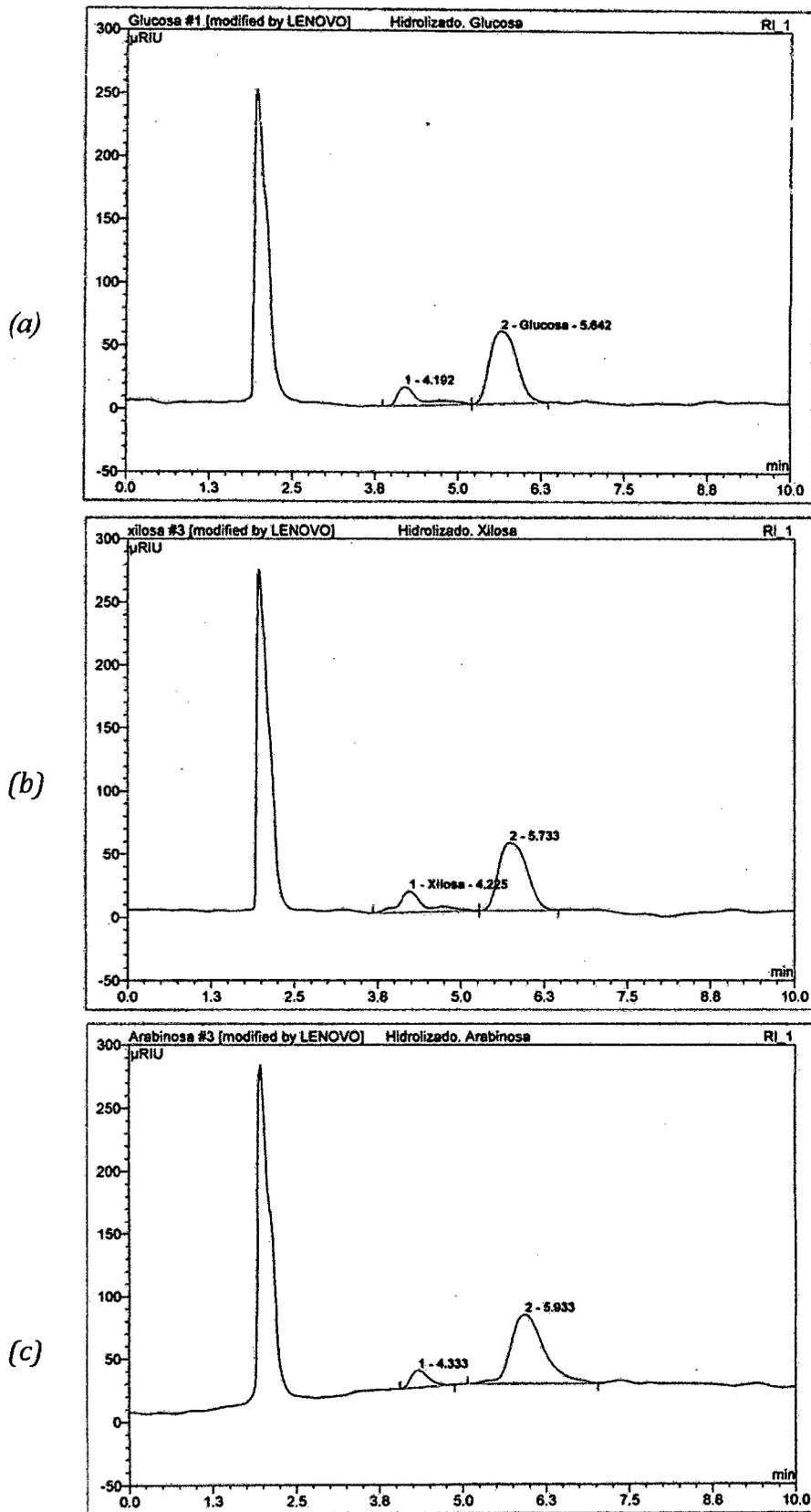


Figura 21: Cromatograma para determinación de azúcares simples en el hidrolizado de cascarilla de arroz pretratada: (a) Glucosa. (b) Xilosa. (c) Arabinosa

La tabla 13, muestra un resumen del cromatograma, describiendo sus tiempos de retención, áreas y concentración en g/L.

Tabla 13: Cromatograma de azúcares simples: Glucosa, xilosa y arabinosa en el hidrolizado de cascarilla de arroz pretratada, mediante HPLC.

Nº	Ret.Time min	Peak Name	Height µRIU	Area µRIU*min	Area %	Amount g/L
1	5.64	Glucosa	57.162	27.042	81.82	8.991
2	4.23	Xilosa	16.428	7.299	21.72	2.838
3	4.33	Arabinosa	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.

Elaborado a partir del reporte cromatográfico. Anexo 13

De acuerdo con estos resultados, la cascarilla de arroz es una importante fuente de azúcares reductores por su alto contenido en celulosa (Yufera, 2002); sin embargo, en cuanto a xilosa las concentraciones alcanzadas son bajas comparadas con resultados obtenidos en otros materiales lignocelulósicos como bagazo de caña de azúcar, eucalipto y paja de trigo, los cuales presentaron concentraciones de xilosa de 22,7; 24,32 y 10,65 g /L, respectivamente (Martínez et al., 2002). Esto permite concluir que las características del hidrolizado de cascarilla de arroz pretratada en el presente estudio condicionan al uso de cepas de fermentación con una vía de metabolismo de hexosas (Melo y Cuamatzi, 2006).

4.7. Determinación de la Actividad Enzimática.

Para la determinación de la actividad enzimática se tomaron los valores en un tiempo de 60 minutos. En este periodo puede expresarse la actividad enzimática en función de la velocidad máxima. La velocidad de reacción puede disminuir por agotamiento del sustrato o por saturación de producto (Bergmeyer, 1974, p239).

Para el análisis se utilizaron los parámetros seleccionados para la obtención de azúcares fermentables a condiciones óptimas, las concentraciones fueron de: 5% de celulasa y 0.2% de β -glucosidasa (pH 5.0 y temperatura de 45°C). Con un volumen de reacción de 100ml a concentración pre-establecida de sustrato de 2.5% del volumen de reacción a un tiempo de una hora. Se tomó muestras cada 10 minutos y se le determinó contenido de azúcares reductores.

En la Tabla 14 se muestran los valores de azúcares reductores en g/l. El valor más alto alcanzado del producto fue de 3.451g/L al término de la reacción. La misma que describe un comportamiento lineal como se muestra en la figura 22.

Tabla 14: Valores de producto para la determinación de actividad en el hidrolizado de cascarilla de arroz pretratada.

Tiempo	Producto g/L
0	0.000
10	0.695
20	1.339
30	1.936
40	2.489
50	2.990
60	3.451

La pérdida de actividad puede deberse a la absorción de las enzimas por la celulosa y la lignina (Sutcliffe, 1986 y Chernoglazov, 1988), o ser consecuencia de la inhibición por presencia de azúcares luego de la hidrólisis de la celulosa. Algunas investigaciones han mostrado que los monosacáridos como glucosa, entre otros, y los disacáridos de celobiosa inhiben la actividad enzimática, ya que son los productos de la actividad celulasa (Holtzapfle, 1990; Linde et al., 2007). Además, las enzimas por ser proteínas, a partir de cierta temperatura se empiezan a desnaturalizar por el calor. La velocidad de reacción por encima de la temperatura óptima decrece por la pérdida de actividad catalítica debido a la desnaturalización térmica, y la actividad enzimática decrece rápidamente hasta anularse.

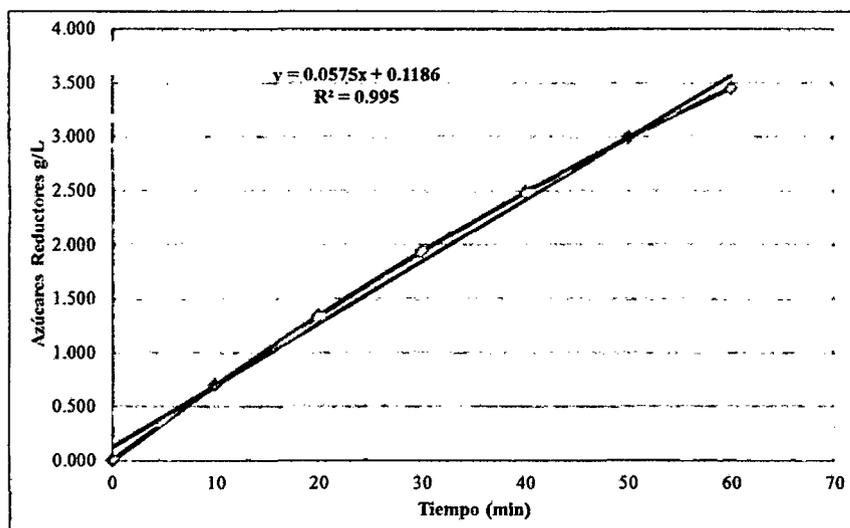


Figura 22: Representación gráfica de la actividad enzimática para las concentraciones óptimas de enzimas.

Al seguir la velocidad de aparición de producto (o de desaparición del sustrato) en función del tiempo se obtiene la llamada curva de avance de la reacción, o simplemente, la cinética de la reacción (González, 2007).

A medida que la reacción transcurre, la velocidad de acumulación del producto va disminuyendo porque se va consumiendo el sustrato de la reacción como se observa en la figura 20. Para evitar esta complicación se procede a medir la velocidad inicial de la reacción (V_0).

La velocidad inicial de la reacción es igual a la pendiente de la curva de avance a tiempo cero (González, 2007). De esta forma, la medida de V_0 se realiza antes de que se consuma el 10% del total del sustrato, de forma que pueda considerarse la $[S]$ como esencialmente constante a lo largo del experimento.

Tabla 15: Obtención de la actividad enzimática para las concentraciones óptimas de enzimas

[5%] Celulasa - [2%] β- glucosidasa	
Act. U/L	319.33
Act. Enzimática (U/mg)	18.759

4.8. Determinación de parámetros cinéticos de los valores optimizados de concentraciones enzimáticas para la obtención de azúcares fermentables.

En el análisis se utilizaron los parámetros seleccionados para la obtención de azúcares fermentables a condiciones óptimas con una concentración de celulasa del 5% del volumen de reacción; y de β -glucosidasa de 0.2%. Así como también una concentración pre-establecida de enzima de 5% del sustrato (45; 35; 25; 15; 10 g/L), en un volumen de 25 ml, durante 60 minutos. Se tomaron muestras al final de la hidrólisis y se le determinó contenido azúcares reductores producidos, por duplicado. En la tabla 13 se muestran los valores de producto en g/L.

Dónde:

V =Velocidad de reacción

[S] = Concentración de sustrato

1/V = Inversas de la Velocidad de reacción

1/[S] = Inversas de la Concentración de sustrato

En la figura 23, se representan los interceptos de las inversas de la velocidad y la concentración del producto formado por medio del método de linealización de Lineweaver-Burke, con la finalidad de obtener los parámetros cinéticos de constante de Michaelis de sustrato y Velocidad máxima de reacción, con un coeficiente de correlación de 0.993 para una línea de regresión lineal.

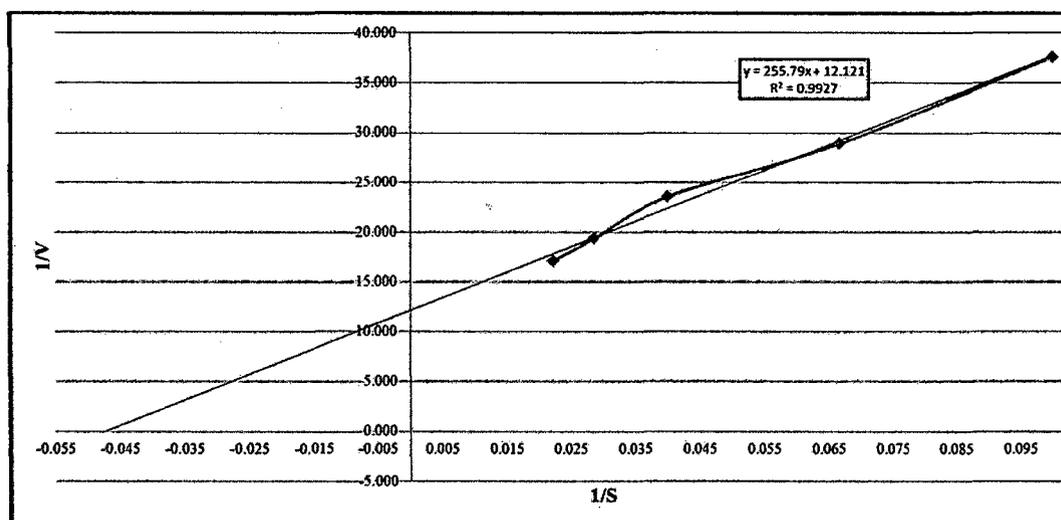


Figura 23: Parámetros Cinéticos $V_{m\acute{a}x}$ y K_m , para la concentración óptima de enzimas

De la ecuación: $y = 255.79x + 12.121$

$1/V_{m\acute{a}x} = 12.121$; $K_m/V_{m\acute{a}x} = 255.79$

Tabla 166: Parámetros cinéticos de la enzima a las condiciones experimentales.

Parámetros cinéticos	
$V_{m\acute{a}x}$	0.0825g/L*min
K_m	21.103 mg/ml

Según Cacesa (1990), para predecir el comportamiento de un sistema enzimático es necesario determinar $V_{m\acute{a}x}$ y K_m para la enzima particularmente empleada; esto puede realizarse midiendo la velocidad inicial de reacción en un rango de concentración reactante; por ello con los parámetros hallados K_m y $V_{m\acute{a}x}$, a condiciones óptimas de los parámetros de concentración de enzimas estudiadas, pueden ser usados como parámetros de operación en el diseño de reactores enzimáticos, usando la combinación de las enzimas celulasa y β -glucosidasa para la obtención de azúcares fermentables a partir de cascarilla de arroz. Según González (2007), el valor de K_M da idea de la afinidad del enzima por el sustrato: A menor K_M , mayor afinidad del enzima por el sustrato, y a mayor K_M , menor afinidad.

Además, si la K_M es muy baja comparada con la concentración de sustrato, la enzima estará siempre, casi completamente saturada, y variaciones en la concentración de sustrato tendrán poco efecto. Si la K_M es muy alta, la enzima tendrá mayor sensibilidad a los cambios en la concentración de sustrato, pero operará solamente una pequeña fracción de su capacidad catalítica.

Entonces, de los parámetros cinéticos presentados en la Tabla 18, tenemos un valor de K_M de 21.103mg/ml que comparada a un valor de 45mg/mL del sustrato con mayor concentración, define una alta afinidad de la enzima por el sustrato. No obstante, la

velocidad máxima de reacción con un valor de 0.0825 g/L*min muestra una baja reactividad.

4.9. Fermentación del hidrolizado de cascarilla de arroz

Macek (2008), señala que la fermentación se refiere al proceso metabólico energético que comprende la descomposición de moléculas, tales como carbohidratos, y este proceso es producido por acción de las enzimas, las cuales producen cambios químicos en las sustancias orgánicas.

El rendimiento teórico estequiométrico para la transformación de glucosa en etanol es de 0.511 g de etanol y 0.489 g de CO₂ por 1g de glucosa. Este valor fue cuantificado por Gay Lussac. En la realidad es difícil lograr este rendimiento, porque la levadura utiliza también la glucosa para la producción de otros metabolitos. El rendimiento experimental varía entre 90% y 95% del teórico, es decir, de 0.469 a 0.485 g/g (Boudarel, 1984). Otro parámetro importante es la productividad (g/l/h), la cual se define como la cantidad de etanol producido por unidad de tiempo y de volumen. (Vázquez. H y Dacosta. O, 2007).

En la experiencia, se llevó a cabo la fermentación con la cepa *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 4126, realizándola por duplicado, con la finalidad de validar los resultados obtenidos en la hidrólisis enzimática de cascarilla de arroz pretratada para obtener azúcares fermentables.

4.9.1. Análisis Cromatográfico del etanol

Para la determinación de la concentración de etanol, se utilizó la Cromatografía de Gases y Headspace.

Los resultados se muestran en la Tabla 19. En el tiempo inicial ya se tenía una concentración inicial de 0.616 g/L de etanol, esto puede atribuirse a una producción en la fase de activación de la cepa. Mientras a un tiempo de 480 minutos de fermentación, ya en el hidrolizado de cascarilla de arroz pretratada, se obtiene una concentración máxima de 3.356 g/L de etanol. Concentración que equivale a una conversión del 19.57% de azúcares a etanol.

Tabla 177: Resultados del análisis cromatográfico, % y concentración de Etanol

Tiempo (min)	% de Etanol	g/L
0	0.06156	0.61564
30	0.11526	1.1526
60	0.15919	1.5919
120	0.20601	2.0601
180	0.25531	2.5531
300	0.28337	2.8337
480	0.33559	3.3559

En la Figura 24, se presenta la curva de los resultados del análisis cromatográfico de las muestras tomadas a diferentes tiempos durante la fermentación del hidrolizado de cascarilla de arroz pretratada. Los resultados muestran un resultado positivo en la obtención de etanol, validando la fermentación del hidrolizado obtenido, no obstante, cabe resaltar que los parámetros de fermentación se mantuvieron constantes, ya que no fueron variables de estudio.

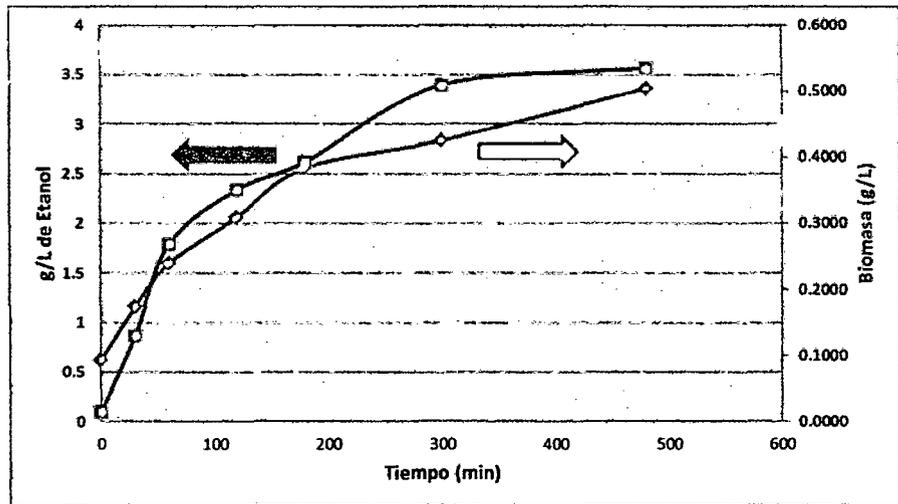


Figura 24: Concentración de etanol (g/L) y biomasa (g/L), obtenido de la fermentación de *Sacharomyces cerevisiae* en el hidrolizado de cascarilla de arroz, durante 8 horas.

V. CONCLUSIONES:

- De la caracterización fisicoquímica de la cascarilla de arroz, se determinó que la celulosa es el componente más abundante, seguido de la hemicelulosa.
- Del pretratamiento térmico – alcalino de la cascarilla de arroz, se logró reducir la concentración de lignina en un 66.55%, mejorando sus condiciones para su posterior hidrólisis enzimática.
- Se determinó que las concentraciones de enzimas óptimas para la hidrólisis enzimática de la cascarilla de arroz pretratada, están en una relación de 25:1 de *celulasa* respecto a *β -glucosidasa*.
- Los valores de los parámetros cinéticos para las condiciones óptimas del proceso indican alta afinidad del sustrato por la enzima y baja reactividad.
- La hidrólisis de la cascarilla de arroz pretratada, a las concentraciones óptimas de enzimas, dieron un rendimiento del 68.0% en azúcares reductores.
- Se determinó que el hidrolizado de cascarilla de arroz pretratada contiene un 52.43% de glucosa, y 16.55% de xilosa respecto a la concentración de azúcares reductores.
- Se comprobó que el hidrolizado enzimático obtenido fue fermentado a etanol.

VI. RECOMENDACIONES

- Realizar un proceso de deslignificación biológica usando *Pleurotus ostreatus*, proceso que sería ambientalmente amigable, con la que se pueden generar productos adicionales, como hongos comestibles y complejos enzimáticos con actividades ligninasas.
- Realizar la experiencia de la hidrólisis enzimática en un bioreactor automatizado.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agustin Valverde, Bienvenido Sarria y José Monteagudo, 2007. Análisis comparativo de las características fisicoquímicas de la cascarilla de arroz. Colombia.
- Colina, G., J. Ferrer, G. Páez, Z. Mármol, G. Urbaneja, L. Arenas Y L. Sandoval. (1998). Tratamiento de los desechos generados en la producción del grano de café (pulpa de café) para la obtención de carbohidratos por hidrólisis ácida. Rev. Téc. Ing. Univ. Zulia. 21 (3): 179- 187.
- Van Zyl et al., (1991): Desechos del sector agricultura: Fundamentos para el Aprovechamiento de un Recurso Promisorio pag.51-58. Editorial Carrasco, lima Perú, 6ta Edición.
- Singh, A., K. Das, Y D. Sharma. (1984). Production of xylose, furfural fermentable sugars and ethanol from agricultural residues. J. Chem. Biotechnol. Vol.34: 51-56.
- Taiz, I. and Zeiger, E. (2002) Fisiología vegetal tercera edición. Editada en por Sinauer Associates INC. 300.
- Cunningham R. LÓPEZ G.(1994) Etanol de lignocelulósicos tecnología y perspectivas, Santiago de Compostela, universidad, servicio de publicación e intercambio científico, Programa CYTED 1994
- Valero, F. (1998) Módulo de Enzimas, Ingeniería Bioquímica. Departamento de Ingeniería Química.

- Zhang, Y., Himmel, M. y Mielenz, J. (2006) Outlook of cellulase improvement: screening and selection strategies. *Biotechnology Advances*. Vol. 24, 452-48.
- Blume J.E. and Herberl Ennis (1991). A Dictyosteliurn discoideurn Cellulase Is a Member of a Spore Germination-specific Gene Family. *The Journal Of Biological chemistry*. Issue of August 15. 15432-15437.1991
- Barrow G. (2000), *Química general*, editorial reverté.
- Cacesa, P., Hubble, J. (1990); *Tecnología de las Enzimas*; editorial acriba S.A. Zaragoza – España.
- Cubero, N., Monferrer, A. y Villalta, J. (2002) *Aditivos Alimentarios*. Editorial Mundi-Prensa. Madrid. 21-23, 48-49.
- Van Buren. (1999). *Biotechnology & Chemical Engineering Anoverviewof Fermentation Process*.
- WHO/FAO (1998) *Carbohydrates in human nutrition*. FAO food and nutrition paper no. 66. FAO, Rome.
- Kumar, P., Barret, D. M., Delwiche, M. J., & Stroeve, P. (2009). Methods for Pretreatment of Lignocellulosic Biomass for Efficient Hydrolysis and Biofuel Production. *Ind. Eng. Chem. Res.*, 48, 3713-3729.
- Hendricks, A., & Zeeman, G. (2009). Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*, 100, 10-18.
- McMillan, J. D. (1994). Pretreatment of lignocellulosic biomass. In: M. E. Himmel, J. O. Baker, R. P. Overend (eds.). *Conversion of*

hemicellulose hydrolyzates to ethanol (pp.292–324). Washington: American Chemical Society Symposium.

- Linde M., Galbe, M., Zacchi, G. (2007). Simultaneous saccharification and Fermentation of steam-pretreated barley straw at low enzyme loadings and low yeast. *Enzyme Microb Technol.* 40, 1100-1107.

PROYECTOS DE TESIS:

- Proyecto de Trabajo de Investigación: “DETERMINACIÓN DEL EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE LA BASE NaOH, DE LA CELULASA Y CELOBIASA EN LA HIDRÓLISIS PARA LA PRODUCCIÓN DE ETANOL A PARTIR DEL RASTROJO DE LA PIÑA. Ciudad Universitaria Rodrigo Facio San José, Costa Rica – 2011
- Proyecto de Trabajo de Investigación: “OPTIMIZACIÓN DEL PROCESO DE OBTENCIÓN ENZIMÁTICA DE AZÚCARES FERMENTABLES A PARTIR DE ASERRÍN DE PINO”. Instituto Tecnológico de Durango, Felipe Pescador 1830 Ote., Col. Nueva Vizcaya, Durango, Dgo., México.
- TORRES, J.F.(2009). “Evaluación del rendimiento de la hidrólisis enzimática de la celulosa a glucosa, con pretratamiento alcalino”. Proyecto de graduación para optar por el grado de Licenciatura en Ingeniería Química, Escuela de Ingeniería Química, Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica.
- AMADOR, J.L. (2009). “Evaluación del efecto del tamaño de partícula, tiempo de pretratamiento y concentración de hidróxido de sodio en la hidrólisis enzimática del bagazo de caña de azúcar”. Proyecto de

graduación para optar por el grado de Licenciatura en Ingeniería Química, Escuela de Ingeniería Química, Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica.

- Virginia Melo Ruiz y Oscar Cuamatzi Tapia. Bioquímica de los Procesos Metabólicos. México 2006. Editorial Reverté S.A. – Barcelona.

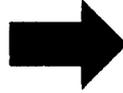
PÁGINAS WEB:

- http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleURL&_udi=B6T3C-42M78M9-2&_user=10021791&_coverDate=04%2F27%2F2001&_rdoc=1&_fmt=full&_orig=search&_origin=search&_cdi=4943&_sort=d&_docanchor=&view=c&_searchStrId=1599882693&_rerunOrigin=scholar.google&_acct=C000123417&_version=1&_urlVersion=0&_userid=10021791&md5=5f927c27f053e2cdf852c4a8f4cc0893&searchtype=a#toc1
- http://193.43.36.125/XML_Output/1992/US/US92008.xml
- https://books.google.com.pe/books?id=A4FlhoNWTn8C&pg=PA141&pg=PA141&dq=valores+de+Vm+para+celulasa+km&source=bl&ots=fHrWopIuTu&sig=Lqz4GiuzJ3ILfL_4p4i27GvRDFk&hl=es-419&sa=X&ved=0CDcQ6AEwA2oVChMI_tSD37bJxwIVSXE-Ch2G7wPb#v=onepage&q=valores%20de%20Vm%20para%20celulasa%20km&f=false

ANEXO 1

DIAGRAMA DE FLUJO

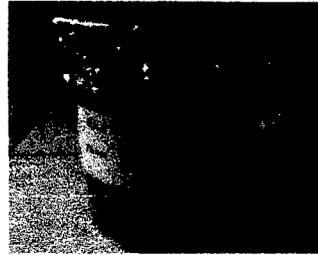
Selección de Materia Prima



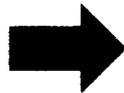
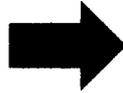
Molienda



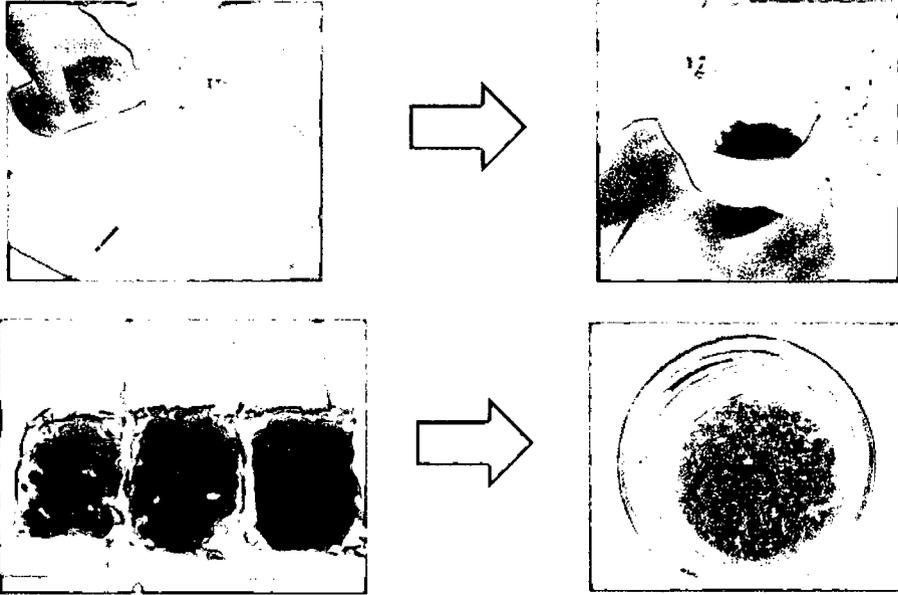
Tamizado



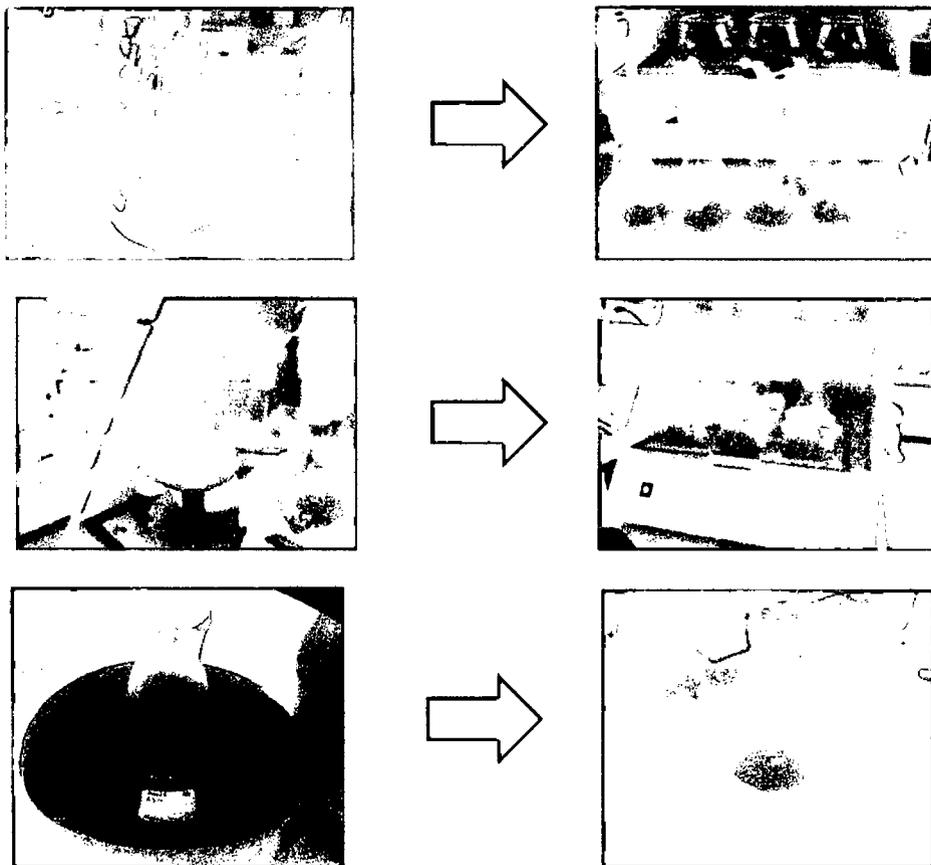
Pre tratamiento alcalino



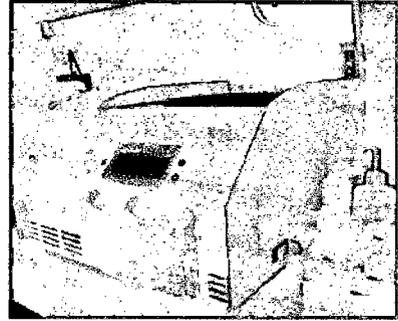
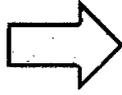
Lavado y Secado de la Muestra Pretratada



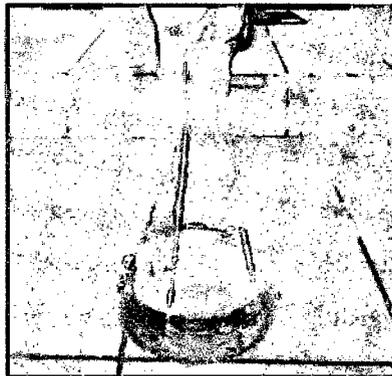
Hidrólisis enzimática



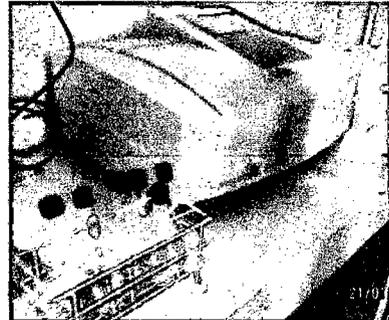
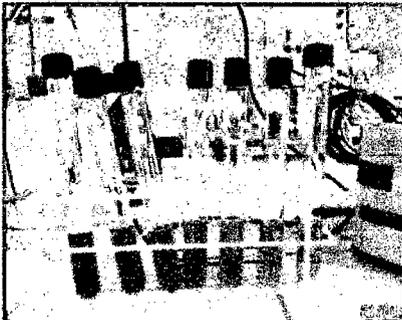
Filtrado y centrifugado



Hidrolizado



Análisis de azúcares reductores y cuantificación de glucosa



ANEXO 2

DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE CENIZAS

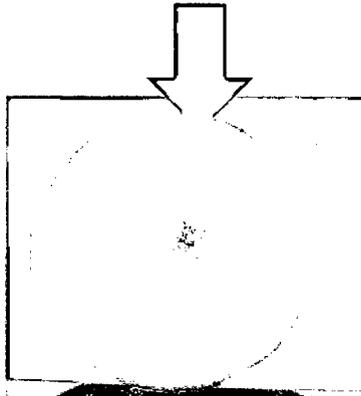
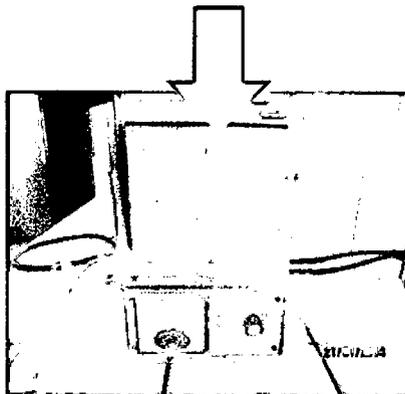
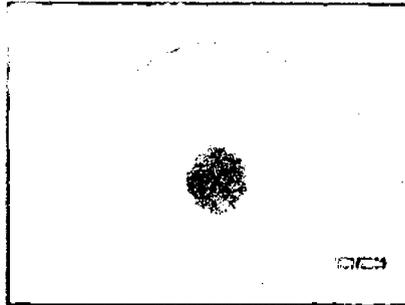


Tabla A2. Contenido de Ceniza

Muestra	% Ceniza
Cascarilla de arroz (sin pretratamiento)	18

ANEXO 3

DETERMINACIÓN DE LIGNINA MÉTODO KLASON

Se pesa un gramo con precisión de 0.0001gr, se mezcla bien con 15ml de H₂SO₄ 72% y se deja reposar 24 horas.

Se trasvasa el contenido del vaso a un matraz de 1000 ml y se añaden 560 ml de agua destilada para pasar de H₂SO₄ 72% a H₂SO₄ 3% se mantiene en ebullición durante 4 horas, al cabo de las cuales se deja sedimentar el sólido y se filtra en una placa filtrante.

El sólido filtrado se lava con agua destilada caliente hasta que el pH del agua de lavado no sea ácido, se seca en estufa a 105°C durante 12 horas y se pesa. Se toma unos 100 mg de sólido y se calcina en mufla a 430°C durante 24 horas, obteniéndose así un porcentaje en materia orgánica (MOling)

Humedad operativa: $100/(100 - \text{Humedad de muestra})$

$$\text{lignina}(\%) = \frac{P_3 - P_2 * (\%MOling)}{P_1 * (100 - \%H)} \times 100$$

P₁ : Peso inicial de la muestra

P₂ : Peso papel filtro

P₃ : Peso sólido después de las 12 horas

%MOling: Materia Orgánica

% H : Humedad Operativa

Cascarilla de arroz sin pretratamiento:

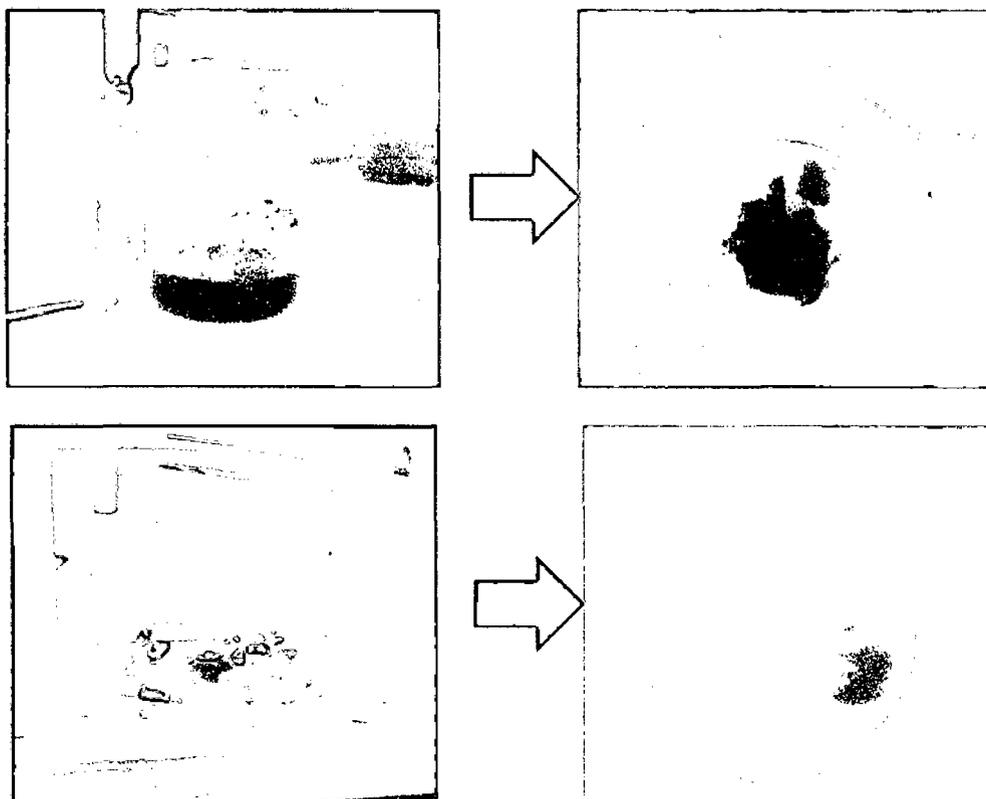
$$\text{lignina} (\%) = \frac{(0.9921 - 0.7332) \times 64}{1.00001 \times (100 - 15)} \times 100$$

$$\text{lignina} (\%) = 19.49$$

Cascarilla de arroz pretratada:

$$\text{lignina (\%)} = \frac{(0.8925 - 0.7641) \times 62}{1.00001 \times (100 - 15)} \times 100$$

$$\text{lignina (\%)} = 6.52$$



ANEXO 4

DETERMINACIÓN DE HOLOCELULOSA

Se pesan 4 gr de muestra con precisión de 0.0001 gr en un Erlenmeyer de 250 ml de capacidad y se añaden 63 ml de agua destilada.

A la suspensión se le añaden 0.2 ml de ácido acético glacial y 0.6 ml de peróxido de hidrógeno.

Se cubre y se introduce a baño María (70-80°C), agitando de vez en cuando.

Este proceso se repite dos veces más. Al finalizar la tercera hora, se coloca en baño de agua –hielo hasta que la temperatura baje a los 10°C.

Se filtra en placa filtrante, y se lava con agua destilada hasta la eliminación de la coloración amarilla.

Después se deja secar a 60°C y se pesa. Al sólido obtenido se le determina porcentajes de humedad (% Holo) y de materia orgánica (%MOholo)

$$\text{Holocelulosa}(\%) = \frac{(P_3 - P_2) \times (100\% - \%H_{\text{holo}}) \times (\%MO_{\text{holo}})}{P_1 \times (100 - \%H)}$$

P₁ : Peso inicial de la muestra

P₂ : Peso papel filtro

P₃ : Peso sólido después de secar

%Hholo: % de humedad del sólido obtenido

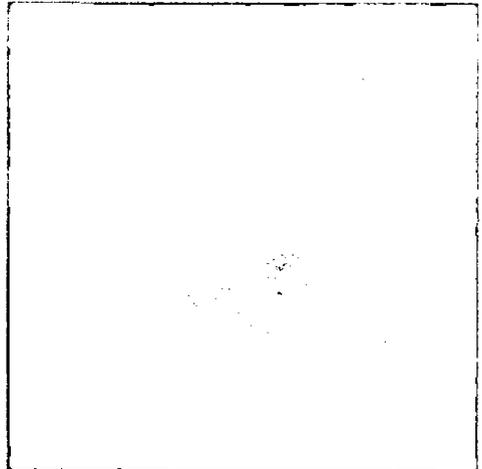
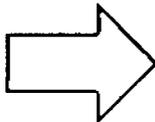
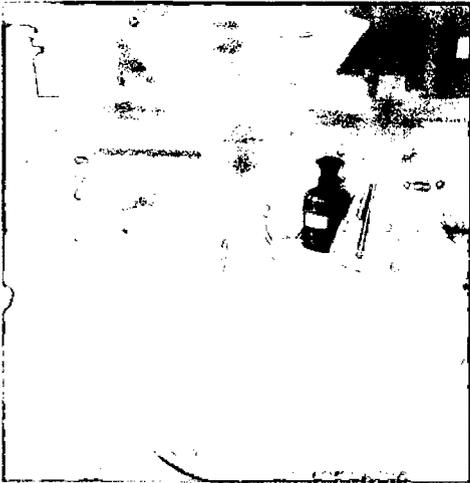
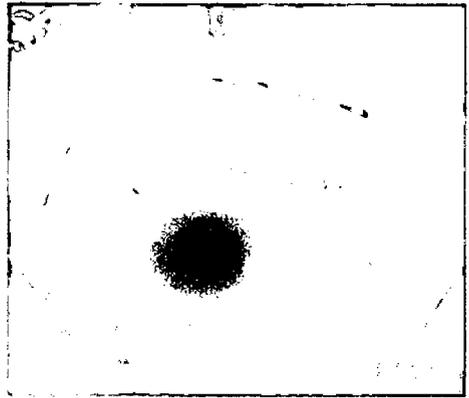
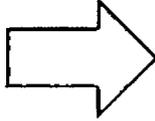
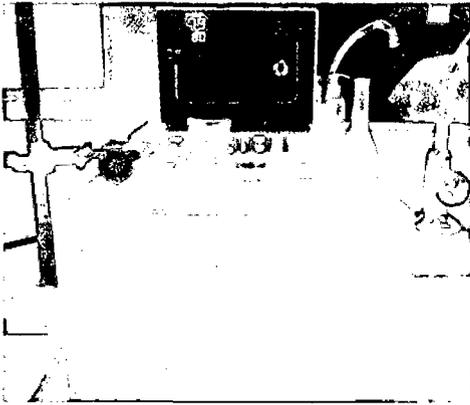
%MOholo: % de materia orgánica obtenida

% H : Humedad Operativa

Cascarilla de arroz:

$$\text{Holocelulosa}(\%) = \frac{(3.9844 - 0.8695) \times (1 - 0.19) \times (58)}{4.00009 \times (100 - 15)} \times 100$$

$$\text{Holocelulosa}(\%) = 43.031$$



ANEXO 5

DETERMINACIÓN DE CELULOSA

Se pesa 1gr de holocelulosa, con precisión de 0.0001 gr, en un Erlenmeyer de 100 ml. Se añaden 5ml de NaOH 17.5% hasta consumir un total de 12.5 ml y se mantiene 30 minutos a temperatura ambiente. Se añaden 16.5 ml de agua destilada a 20°C para pasar de NaOH 17.5% a 8.3%, se mezclan bien y se mantiene durante 1 hora a temperatura ambiente.

A continuación se filtra en placa filtrante y se lava con 50 ml de NaOH 8.3% y posteriormente con agua destilada. Se repite el lavado con NaOH 8.3% y agua destilada dos veces. Se corta la succión y se añaden 7.5 ml de ácido acético 10% y se deja en contacto 3 minutos. Se vuelve a conectar el vacío y se lava con agua destilada hasta la neutralidad del filtrado. Se seca a 105°C en estufa durante 12 horas se pesa.

Se calcula el contenido en materia orgánica del sólido obtenido (%MOcel), y el contenido en celulosa se calcula de acuerdo con la expresión:

$$Celulosa(\%) = \frac{(P_3 - P_2) \times (\%MOcel) \times (\%Holocelulosa)}{P_1 \times (\%MOholo) \times (100 - \%Hholo)} \times 100$$

P₁ : Peso inicial de la muestra

P₂ : Peso papel filtro

P₃ : Peso sólido después de secar 12 horas

%MOcel: de humedad de el sólido obtenido

%Holocelulosa: Holocelulosa en porcentaje

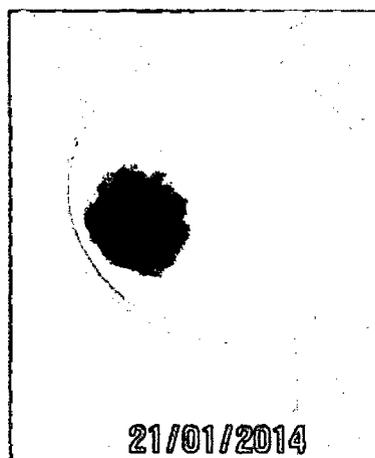
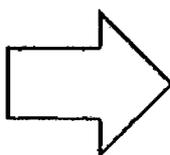
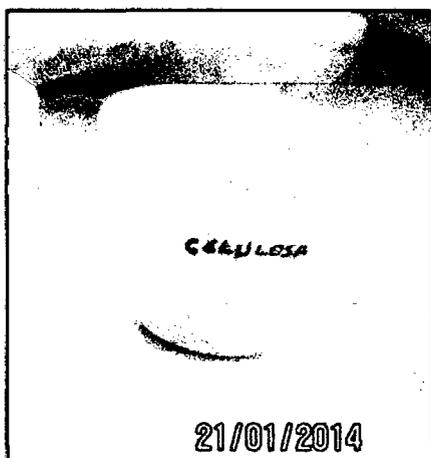
%Hholo: % de humedad del sólido obtenido de la Holocelulosa

%Moholo: % de materia orgánica obtenida de la Holocelulosa

Cascarilla de Arroz:

$$\text{Celulosa (\%)} = \frac{(2.1684 - 1.1205) \times (14) \times (43.03)}{1.0001 \times 58 \times (100 - 15)} \times 100$$

$$\text{Celulosa (\%)} = 25.028$$



ANEXO 6

CURVA DE CALIBRADO PARA PROTEÍNAS (MÉTODO BRADFORD)

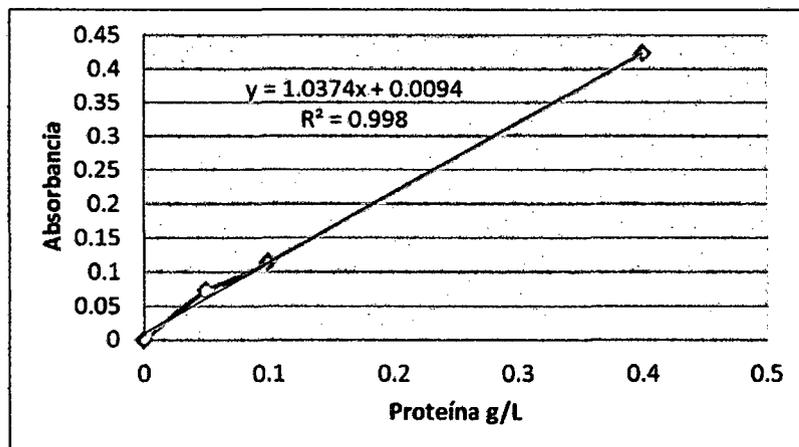
El principio de la metodología se basa en la unión directa del colorante azul brillante de coomassie G-250, con la enzima (estructura terciaria de las proteínas y aminoácidos específicos), lo que produce un incremento en la absorbancia en relación directa con la concentración.

Preparación del reactivo Bradford:

Se disuelve 100mg. De azul de coomassic G-250 en 50 ml. De etanol (95% de pureza), agitando continuamente para evitar la formación de grumos. A esta disolución resultante se aforo hasta 1 litro, con agua destilada.

Procedimiento:

Se preparó un solución madre de la enzima a analizar con el buffer citrato, pH: 5.0 a una concentración de 0.1 mg/ml. Luego en un tubo de ensayo se agregan 0.5 ml de la solución madre y se añade 5ml del reactivo Bradford, se llevo a un agitador de tubos. Luego se dejo reposar por 5 min. Para realizar la lectura en el espectrofotómetro a 595 nm.



GRÁFICA: Curva de Calibrado para la determinación de proteínas

A	=	1.0374
B	=	0.0094

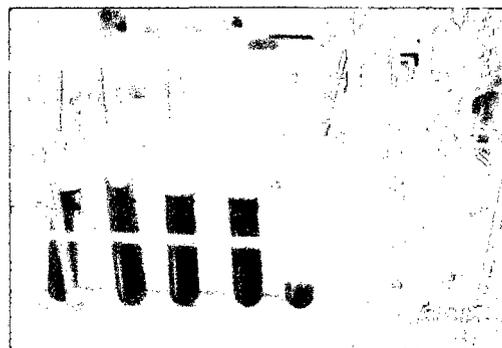
$$[\text{proteína}] = \frac{\text{absorbancia} + \text{intersección}}{\text{pendiente}}$$

$$\% \text{proteína} = \frac{[\text{proteína}]}{\left[\text{enzima} \left(\frac{\text{mg}}{\text{ml}} \right) \right] \times 1000 \left(\frac{\text{ml}}{\text{L}} \right)} \times 100$$

Tabla A6: Resultados del análisis con las enzimas Celulasa complex y β -glucosidasa

Muestra	Factor de dilución	ABS (595 nm)	Proteína g/l	Proteína %	Contenido de proteína del complejo
Celulasa Complex (0.128g/ml)	1:4	0.443	17.44	13.63	17.023
β -glucosidasa (0.15g/ml)	1:2	0.328	6.5	4.64	

FiguraA6: Preparación de curva de calibrado para proteínas



ANEXO 7

CURVA DE CALIBRADO PARA AZÚCARES REDUCTORES

(MÉTODO DNS)

El principio de la metodología se fundamenta en la reacción del 3.5 dinitrosalicílico que actúa como agente oxidante a la presencia del grupo reductor (aldehído) del azúcar, en un medio alcalino (NaOH), que aporta el medio para que se produzca la reacción redox y el tartrato de sodio –potasio impide la disolución del oxígeno en la reacción. Por lo tanto el 3.5 dinitrosalicílico que actúa como agente oxidante pasa a reducirse en ácido 3-amino, 5-nitrosalicílico y el azúcar que tiene un agente reductor se oxida por el lado del aldehído cambiando a grupo carboxílico.

La reacción resulta en forma de un compuesto coloreado (marrón) según la ley de Lambert y Beer, la intensidad de este color es proporcional a la concentración de azúcares presentes.

Preparación del reactivo DNS

- 1.6 mL / L de NaOH 2N
- 1 g /L de ácido 3,5 dinitrosalicílico (DNS)
- 30 g/L de tartrato de sodio y potasio tetrahidratado

Para la preparación del reactivo, se disolvió el tartrato en aproximadamente 15 ml de agua destilada juntamente con el hidróxido de sodio, y luego se le agregó a los 50 ml de agua destilada que está en constante agitación, posteriormente cuando la mezcla calentó se le agregó el DNS poco a poco conforme se fue disolviendo, siempre en constante agitación. Luego se le agregó al matraz aforo hasta completar los 100 ml con agua destilada posteriormente se agitó y se le colocó en una botella que fue cubierto rápidamente con papel de aluminio ya que este reactivo tiende a reaccionar con la luz.

Procedimiento:

Se preparó una solución madre de glucosa a una concentración de 2 g/l. Se colocó en los tubos de ensayo, con sus respectivas diluciones y se le adicionó 1 ml del reactivo DNS a todos los tubos; se llevó los tubos a ebullición durante 5 min para luego enfriarlos en agua helada por unos minutos. Cuando se encontraron los tubos fríos se le agregó 10 ml de agua destilada y se le dejó reposar 15 min. Después se le llevó al agitador de tubos y se los lleva al espectrofotómetro a 540 nm. Con estos datos se construye la curva.

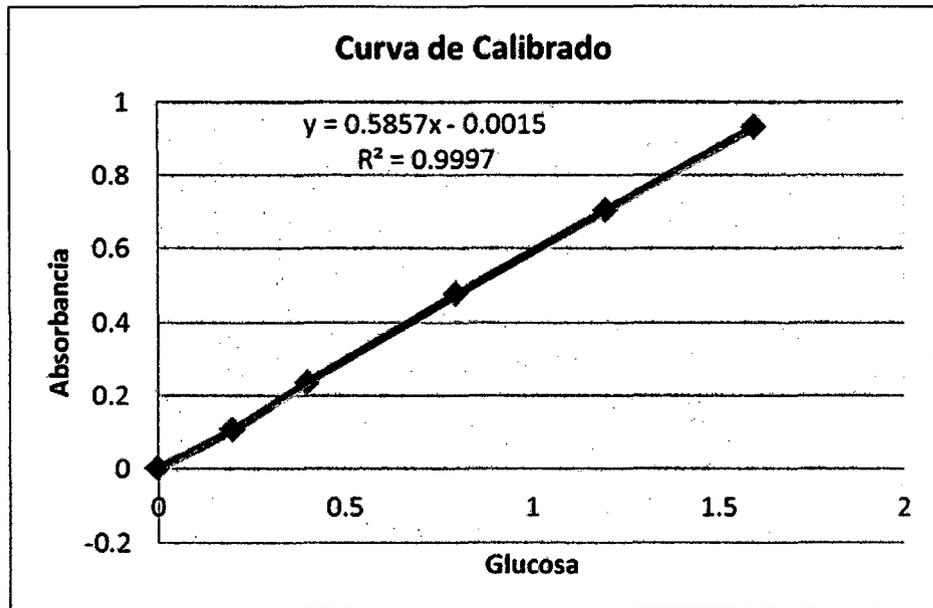


Figura A7: Curva de Calibrado para la determinación de azúcares reductores por el método DNS.

A	0,5857
B	0,0015
R²	0,9997

ANEXO 8

DETERMINACIÓN CUANTITATIVA DE GLUCOSA, MEDIANTE

EL KIT MONLABTEST

Se realizó una dilución (1:8) del hidrolizado de cascarilla de arroz. Luego se tomó 30 µl de la muestra diluida por duplicado. Se procedió a añadir 30ml del reactivo, se mezcló y se dejó incubar por un periodo de 10 minutos a 37°C. Finalizado este tiempo se llevó al espectrofotómetro a una longitud de onda de 505nm.

Tabla A8. Determinación cuantitativa de glucosa, mediante kit Monlabtest.

Muestra	ABS	Glucosa g/L	Promedio g/L
1	0.373	9.14208	9.05624
2	0.366	8.9704	

FICHA TÉCNICA



MonlabTest®

Glucosa Monlabtest®



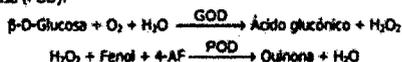
GOD-POD. Líquido.

Determinación cuantitativa de glucosa.

Para uso profesional de diagnóstico *in vitro*
Conservar a 2-8°C

PRINCIPIO DEL MÉTODO

La glucosa oxidasa (GOD) cataliza la oxidación de glucosa a ácido glucónico. El peróxido de hidrógeno (H₂O₂) producido se detecta mediante un aceptor cromogénico de oxígeno, fenol, 4-aminofenazona (4-AF), en presencia de la peroxidasa (POD):



La intensidad del color formado es proporcional a la concentración de glucosa presente en la muestra ensayada^{1,2}.

SIGNIFICADO CLÍNICO

La glucosa es la mayor fuente de energía para las células del organismo; la insulina facilita la entrada de glucosa en las células. La diabetes mellitus es una enfermedad que se manifiesta por una hiperglucemia, causada por un déficit de insulina^{1,2,3}. El diagnóstico clínico debe realizarse teniendo en cuenta todos los datos clínicos y de laboratorio.

REACTIVOS

R	TRIS pH 7,4	92 mmol/L
	Fenol	0,3 mmol/L
	Glucosa oxidasa (GOD)	15000 U/L
	Peroxidasa (POD)	1000 U/L
	4 - Aminofenazona (4-AF)	2,6 mmol/L
CAL GLUCOSA	Patrón primario acuoso de Glucosa 100 mg/dL	

PREPARACIÓN

El reactivo y el calibrador están listos para su uso.

CONSERVACIÓN Y ESTABILIDAD

Todos los componentes del kit son estables, hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta del vial, cuando se mantienen los vales bien cerrados a 2-8°C, protegidos de la luz y se evita la contaminación durante su uso. No usar reactivos fuera de la fecha indicada.

Indicadores de deterioro de los reactivos:

- Presencia de partículas y turbidez.
- Absorbancias (A) del Blanco a 505 nm $\geq 0,32$.

MATERIAL ADICIONAL

- Espectrofotómetro o analizador para lecturas a 505 nm.
- Cubetas de 1,0 cm de paso de luz.
- Equipamiento habitual de laboratorio.

MUESTRAS

Suero o plasma, libre de hemólisis¹.

El suero debe separarse lo antes posible del coágulo.

Estabilidad de la muestra: La glucosa en suero o plasma es estable 3 días a 2-8°C.

PROCEDIMIENTO

- Condiciones del ensayo:
Longitud de onda: 505 nm (490-550)
Cubeta: 1 cm paso de luz
Temperatura: 37°C / 15-25°C
- Ajustar el espectrofotómetro a cero frente a agua destilada.
- Pipetear en una cubeta:

	Blanco	Patrón	Muestra
R (mL)	1,0	1,0	1,0
Patrón (mmol/L) (µL)	-	10	-
Muestra (µL)	-	-	10
- Mezclar e incubar 10 minutos a 37°C ó 20 min a temperatura ambiente (15-25°C).
- Leer la absorbancia (A) del patrón y la muestra, frente al Blanco de reactivo. El color es estable como mínimo 30 minutos.

CÁLCULOS

$$\frac{(A)\text{Muestra}}{(A)\text{Patrón}} \times 100 (\text{Conc. Patrón}) = \text{mg/dL de glucosa en la muestra}$$

Factor de conversión: mg/dL x 0,0555 = mmol/L

CONTROL DE CALIDAD

Es conveniente analizar junto con las muestras sueros control valorados: CONTROL Normal y Patológico (Ref. MO-165107 y MO-165108)

Si los valores hallados se encuentran fuera del rango de tolerancia, se debe revisar los instrumentos, los reactivos y la calibración.

Cada laboratorio debe disponer su propio Control de Calidad y establecer correcciones en el caso de que los controles no cumplan con las tolerancias.

VALORES DE REFERENCIA¹

Suero o plasma:
60 - 110 mg/dL \approx 3,33 - 6,10 mmol/L

Estos valores son orientativos. Es recomendable que cada laboratorio establezca sus propios valores de referencia.

CARACTERÍSTICAS DEL MÉTODO

Rango de medida: Desde el límite de detección 0,033 mg/dL hasta el límite de linealidad 500 mg/dL.

Si la concentración de la muestra es superior al límite de linealidad, diluir 1/2 con CNa 9 g/L y multiplicar el resultado final por 2.

Precisión:

	Intraserie (n=20)		Interserie (n=20)	
Media (mg/dL)	86,7	235	92,5	250
SD	0,44	0,86	2,76	6,44
CV (%)	0,51	0,37	2,98	2,57

Sensibilidad analítica: 1 mg/dL = 0,0039 (A).

Exactitud: Los reactivos MONLABTEST (y) no muestran diferencias sistemáticas significativas cuando se comparan con otros reactivos comerciales (x).

Los resultados obtenidos con 50 muestras fueron los siguientes:

Coefficiente de regresión (r): 0,99492.

Ecuación de la recta de regresión: $y = 1,104x - 1,249$.

Las características del método pueden variar según el analizador utilizado.

INTERFERENCIAS

No se han observado interferencias con hemoglobina hasta 19 g/L y bilirrubina hasta 100 mg/L¹.

Se han descrito varias drogas y otras sustancias que interfieren en la determinación de la glucosa^{1,2}.

NOTAS

- CAL GLUCOSA: Debido a la naturaleza del producto, es aconsejable tratarlo con sumo cuidado ya que se puede contaminar con facilidad.
- La calibración con el Patrón acuoso puede dar lugar a errores sistemáticos en métodos automáticos. En este caso, se recomienda utilizar calibradores séricos. Usar puntas de pipeta desechables limpias para su dispensación.
- MONLAB dispone de Instrucciones detalladas para la aplicación de este reactivo en distintos analizadores.

BIBLIOGRAFÍA

- Kaplan L.A. Glucose. Kaplan A et al. Clin Chem The C.V. Mosby Co. St Louis, Toronto, Princeton 1984; 1032-1036.
- Tinder P. Ann Clin Biochem 1969; 6: 24-32.
- Young DS. Effects of drugs on Clinical Lab. Tests, 4th ed AACCC Press, 1995.
- Young DS. Effects of disease on Clinical Lab. Tests, 4th ed AACCC 2001.
- Burtis A et al. Tietz Textbook of Clinical Chemistry, 3rd ed AACCC 1999.
- Tietz N W et al. Clinical Guide to Laboratory Tests, 3rd ed AACCC 1995.

PRESENTACIÓN

Ref.: MO-165086
R: 2 x 125 mL
CAL: 1 x 5 mL

Ref.: MO-165087
R: 1 x 1000 mL
CAL: 1 x 5 mL

SÍMBOLOS UTILIZADOS PARA COMPONENTES Y REACTIVOS IVD

	Fabricante		Uso de diagnóstico <i>in vitro</i>
	No reutilizar		Consultar las instrucciones de uso
	Contiene suficiente para <n> test		Mantener seco
	Código		Limite de temperatura
	Número de lote		Fecha de caducidad

ANEXO 9

DETERMINACIÓN DE LOS AZUCARES FERMENTABLES EN EL HIDROLIZADO DE CASCARILLA DE ARROZ MEDIANTE HPLC.

a) CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS

- **Tipo de Columna:** Synchronis Amino 150x4.6mm
- **Fase móvil:** Acetonitrilo: Agua, 75:25%
- **Detector:** Índice de Refracción
- **Temperatura:** 30°C
- **Volumen de inyección:** 20µL

b) REPORTE CROMATOGRÁFICO DE:

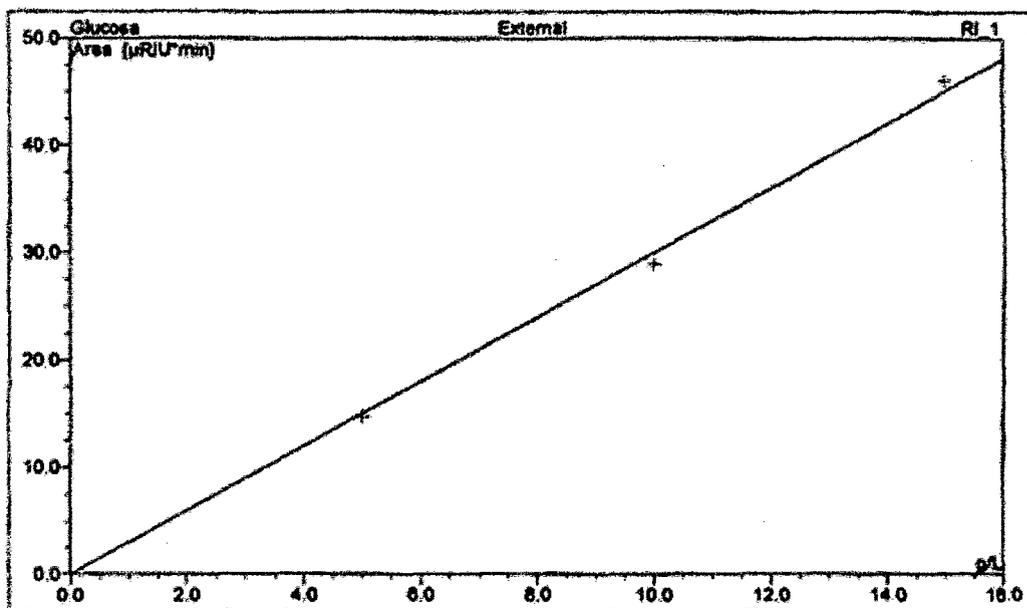
- Curva de Calibrado para Glucosa
- Curva de Calibrado para Xilosa
- Curva de Calibrado para Arabinosa
- Determinación de Glucosa en el hidrolizado
- Determinación de Xilosa en el hidrolizado
- Determinación de Arabinosa en el hidrolizado

CURVA DE CALIBRADO PARA GLUCOSA

Operator:LENOVO Timebase:LENOVO-THINK_1 Sequence:Glucosa

Page 1-1
9/9/2015 5:02 p.m.

1 Curva de calibrado para glucosa			
Sample Name:	Glucosa	Injection Volume:	20.0
Vial Number:	BA4	Channel:	RI_1
Sample Type:	Standard	Wavelength:	n.a.
Control Program:	Glucosa	Bandwidth:	n.a.
Quantif. Method:	Glucosa	Dilution Factor:	1.0000
Recording Time:	9/9/2015 14:40	Sample Weight:	1.0000
Run Time (min):	10.00	Sample Amount:	1.0000



No.	Ret.Time min	Peak Name	Cal.Type	Points	Coeff.Det. %	Offset	Slope	Curve
2	5.64	Glucosa	Lin	3	99.5582	0.0000	3.0078	0.0000
Average:					99.5582	0.0000	3.0078	0.0000

Sample	Sample Name	Ret.Time min	Area µRIU*min	Height µRIU	Amount g/L	Type	Plates(EP)
		Glucosa RI 1	Glucosa RI 1	Glucosa RI 1	Glucosa RI 1	Glucosa RI 1	Glucosa RI 1
2	glucosa 5gr/L	5.667	14.7223	40.57	4.8948	BMB	1412
3	glucosa 10 gr/L	5.617	26.9329	77.08	9.6194	BMB*	1294
4	glucosa 15gr/L	5.617	45.9849	119.37	15.2888	BMB*	1258
Average:		5.633	29.8800	79.01	9.9343		1321
Rel.Std.Dev:		0.612 %	52.386 %	49.917 %	62.386 %		6.097 %

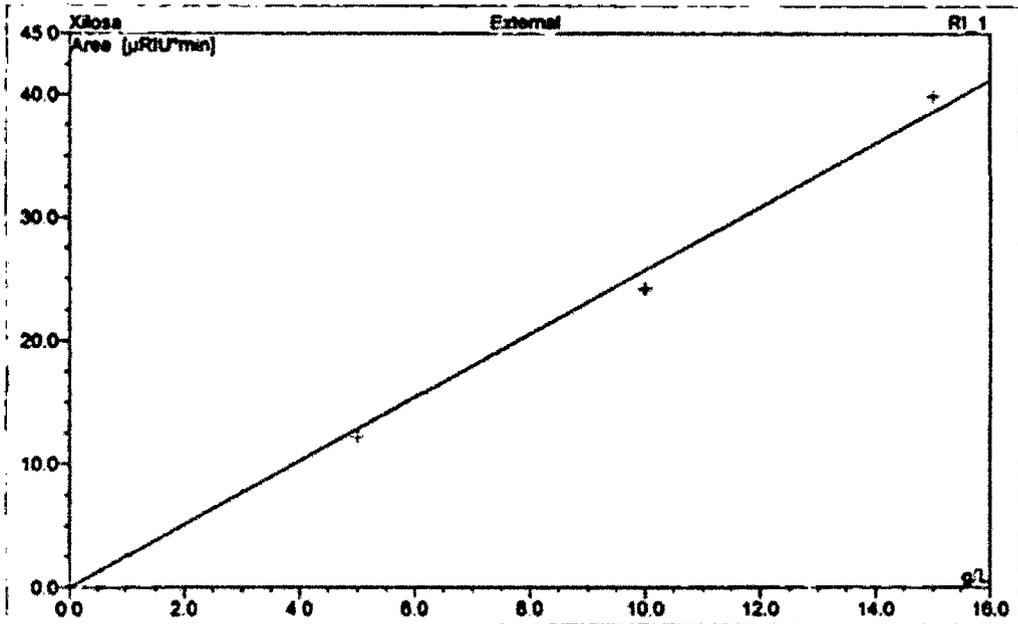
CURVA DE CALIBRADO PARA XILOSA

Operator LENOVO Timebase:LENOVO-THINK_1 Sequence.xilosa

Page 1-1
8/9/2015 5:11 p.m.

1 Curva de calibrado - xilosa

Sample Name:	Xilosa	Injection Volume:	20.0
Vial Number:	BB1	Channel:	RJ_1
Sample Type:	standard	Wavelength:	n.a.
Control Program:	xilosa	Bandwidth:	n.a.
Quantf Method:	xilosa	Dilution Factor:	1.0000
Recording Time:	8/9/2015 12:32	Sample Weight:	1.0000
Run Time (min):	10.00	Sample Amount:	1.0000



No.	Ret.Time min	Peak Name	Cal.Type	Points	Coeff.Det. %	Offset	Slope	Curve
1	4.17	Xilosa	Lin	3	98.8921	0.0000	2.5723	0.0000
Average:					98.8921	0.0000	2.5723	0.0000

Sample No.	Sample Name	Ret.Time	Area	Height	Amount	Type	Plates(EP)
		min	µRIU*min	µRIU	g/L		
		Xilosa	Xilosa	Xilosa	Xilosa	Xilosa	Xilosa
		RJ_1	RJ_1	RJ_1	RJ_1	RJ_1	RJ_1
1	Xilosa 5gr/L	4.167	12.2182	46.65	4.7503	BMB*	1528
2	Xilosa 10g/L	4.158	24.2003	91.57	9.4080	BMB*	1513
4	Xilosa 15gr/L	4.158	39.8138	152.40	15.4779	BMB*	1553
Average:		4.161	25.4111	98.87	9.8787		1532
Rel.Std.Dev:		0.116 %	54.453 %	54.767 %	54.453 %		1.314 %

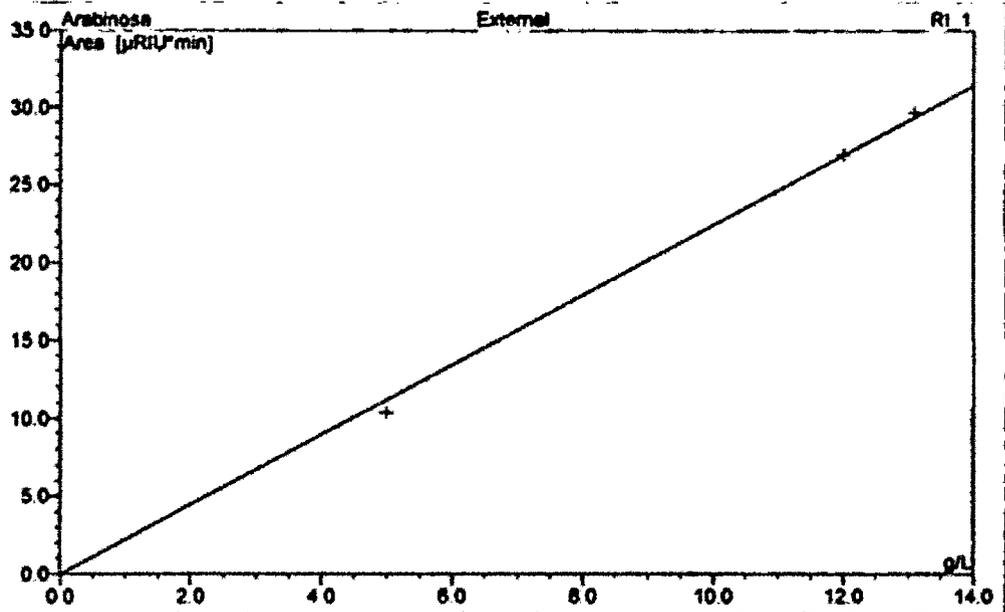
CURVA DE CALIBRADO PARA ARABINOSA

Operator:LENOVO Timebase:LENOVO-THINK_1 Sequence:Arabinosa

Page 1-2
9/9/2015 5:29 p.m

1 Curva de Calibrado - Arabinosa

Sample Name:	Arabinosa	Injection Volume:	20.0
Vial Number:	BC1	Channel:	R1_1
Sample Type:	standard	Wavelength:	n.a.
Control Program:	Arabinosa	Bandwidth:	n.a.
Quantif. Method:	Arabinosa	Dilution Factor:	1.0000
Recording Time:	9/9/2015 13:09	Sample Weight:	1.0000
Run Time (min):	15.00	Sample Amount:	1.0000



No.	Ret. Time min	Peak Name	Cal. Type	Points	Coeff. Det. %	Slope
1	4.62	Arabinosa	Lin	3	99.6534	2.2435
Average:					99.6534	2.2435

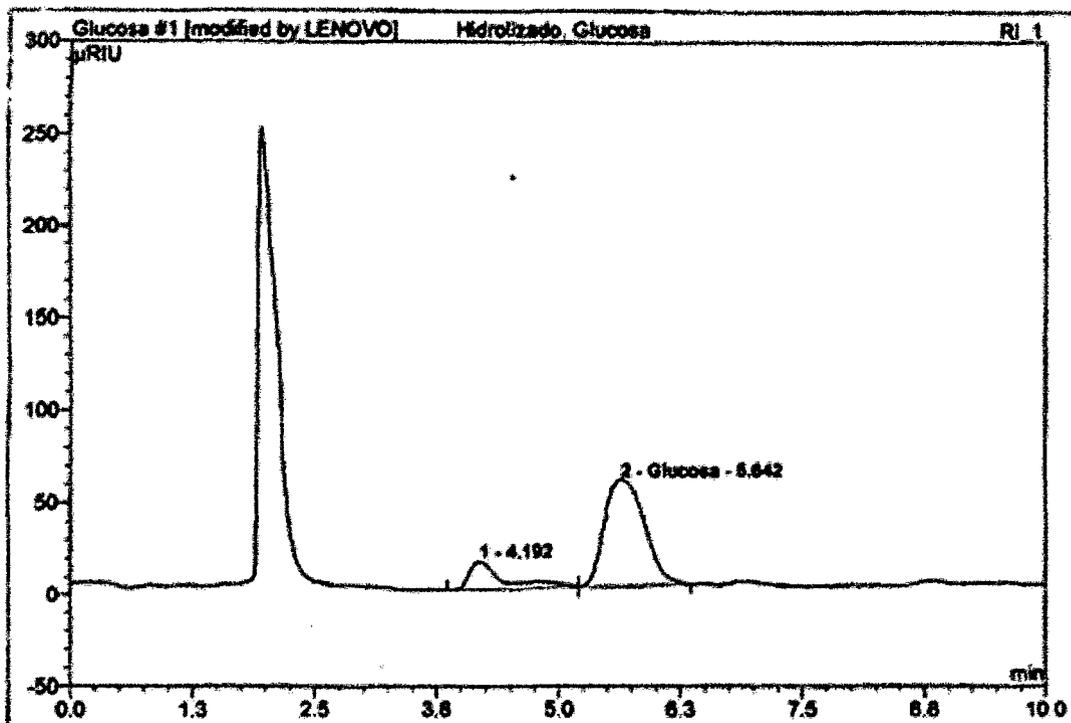
Sample No.	Sample Name	Ret. Time min	Area µRIU*min	Height µRIU	Amount g/L	Plates (EP)
		Arabinosa R1_1	Arabinosa R1_1	Arabinosa R1_1	Arabinosa R1_1	Arabinosa R1_1
1	Arabinosa 13gr/L	4.617	29.6802	93.64	13.2293	1501
2	Arabinosa 12gr/L	4.617	26.9484	64.14	12.0108	1351
3	Arabinosa 5gr/L	4.617	10.3992	29.95	4.6352	1445
Average:		4.617	22.3419	62.67	9.9585	1432
Rel. Std. Dev:		0.000 %	48.695 %	60.835 %	48.695 %	6.292 %

DETERMINACION DE GLUCOSA EN EL HIDROLIZADO

Operator:LENOVO Timebase:LENOVO-THINK_1 Sequence:Glucosa

Page 1-1
9/9/2015 4:12 p.m.

1 Hidrolizado. Determinación de Glucosa			
Sample Name:	Hidrolizado. Glucosa	Injection Volume:	20.0
Vial Number:	BA4	Channel:	RI_1
Sample Type:	unknown	Wavelength:	n.a.
Control Program:	Glucosa	Bandwidth:	n.a.
Quantf. Method:	Glucosa	Dilution Factor:	1.0000
Recording Time:	9/9/2015 14:40	Sample Weight:	1.0000
Run Time (min):	10.00	Sample Amount:	1.0000



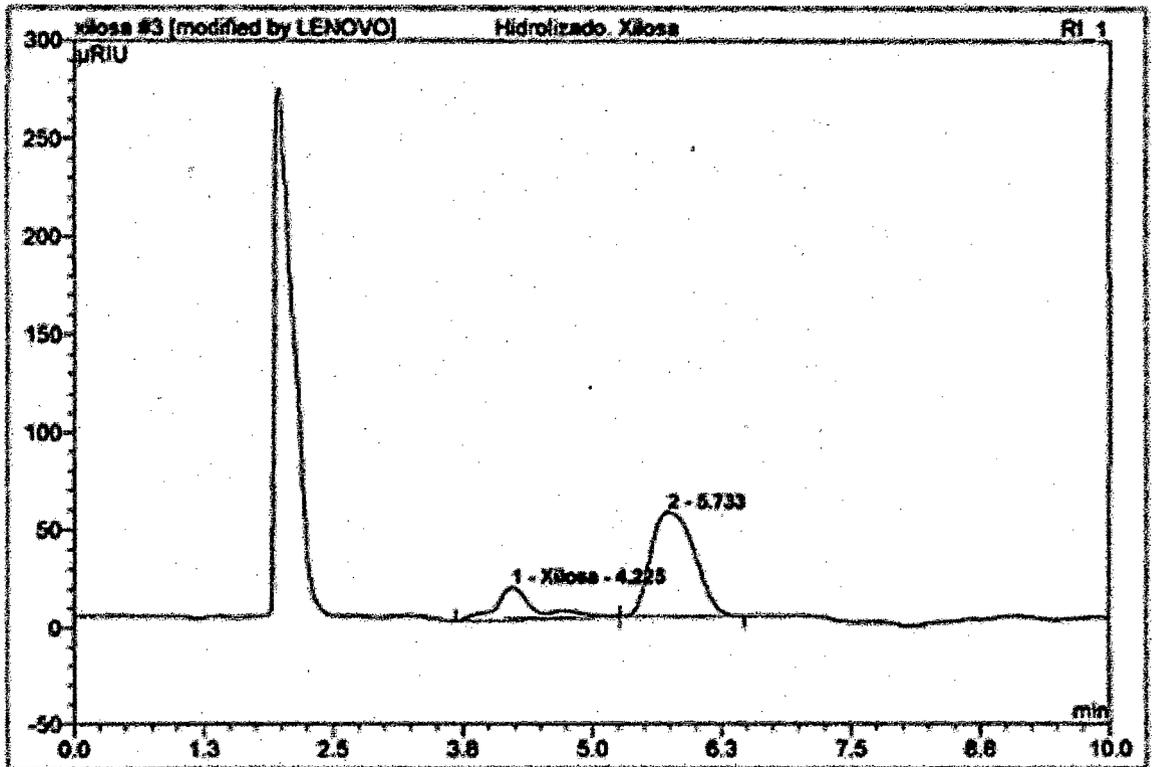
No.	Ret.Time min	Peak Name	Height μRIU	Area μRIU*min	Rel.Area %	Amount g/L	Type
1	4.19	n.a.	14.878	6.010	16.18	n.a.	BMB*
2	5.64	Glucosa	57.162	27.042	81.82	8.991	bMB*
Total:			72.039	33.052	100.00	8.991	

DETERMINACION DE XILOSA EN EL HIDROLIZADO

Operator:LENOVO Timebase:LENOVO-THINK_1 Sequence:xilosa

Page 1.
9/9/2015 5:07 p.m.

3 Hidrolizado. Determinación de Xilosa			
Sample Name:	Xilosa	Injection Volume:	20.0
Vial Number:	BA4	Channel:	RI_1
Sample Type:	unknown	Wavelength:	n.a.
Control Program:	xilosa	Bandwidth:	n.a.
Quantif. Method:	xilosa	Dilution Factor:	1.0000
Recording Time:	9/9/2015 16:53	Sample Weight:	1.0000
Run Time (min):	10.01	Sample Amount:	1.0000



No.	Ret.Time min	Peak Name	Height μRIU	Area μRIU*min	Rel.Area %	Amount g/L	Type
1	4.23	Xilosa	16.428	7.299	21.72	2.838	BMB*
2	5.73	n.a.	53.437	28.303	78.28	n.a.	bMB
Total:			69.865	33.603	100.00	2.838	

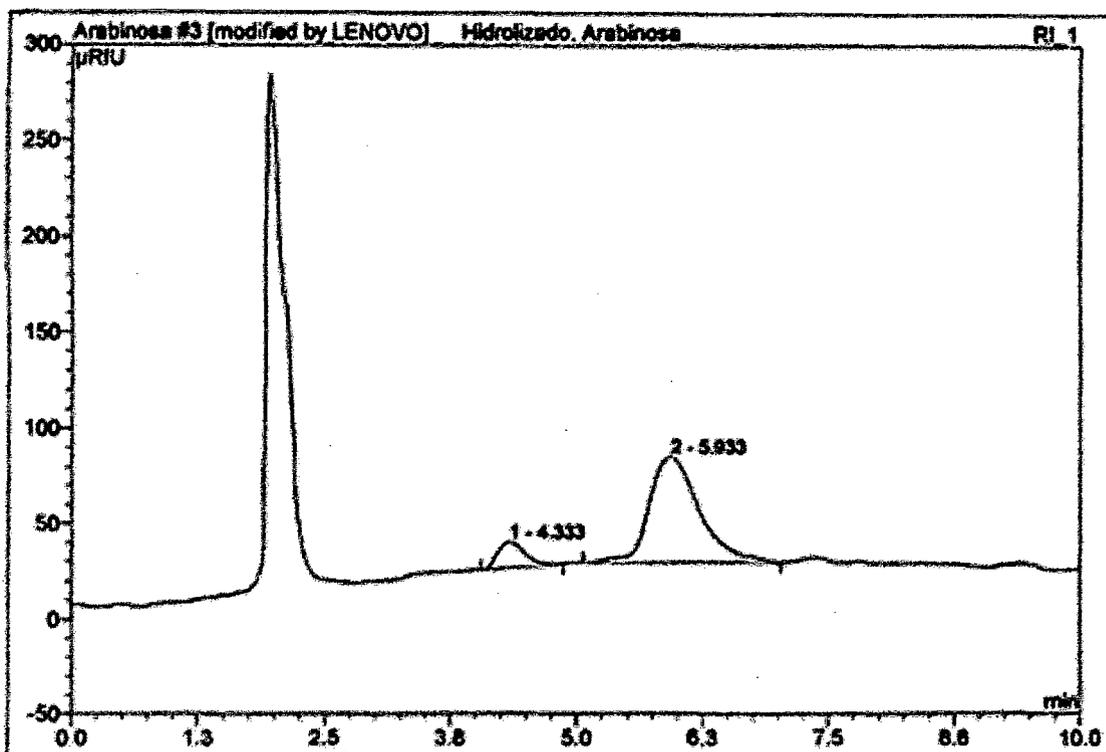
DETERMINACION DE ARABINOSA EN EL HIDROLIZADO

Operator:LENOVO Timebase:LENOVO-THINK_1 Sequence:Arabinosa

Page 1-
9/9/2015 5:38 p.m

3 Hidrolizado. Determinación de Arabinosa

Sample Name:	Arabinosa	Injection Volume:	20.0
Vial Number:	BA4	Channel:	RI_1
Sample Type:	Muestra	Wavelength:	n.a.
Control Program:	Arabinosa	Bandwidth:	n.a.
Quantif. Method:	Arabinosa	Dilution Factor:	1.0000
Recording Time:	9/9/2015 17:14	Sample Weight:	1.0000
Run Time (min):	10.00	Sample Amount:	1.0000



No.	Ret. Time min	Peak Name	Height µRIU	Area µRIU*min	Rel. Area %	Amount g/L	Type
1	4.33	n.a.	13.359	4.117	11.39	n.a.	BMB
2	5.93	n.a.	55.437	32.030	88.61	n.a.	BMB*
Total:			68.796	36.147	100.00	0.000	

FICHA TÉCNICA DEL PROVEEDOR – NOVOZYMES

ENZYMES FOR THE HYDROLYSIS OF LIGNOCELLULOSIC MATERIALS

You have received the Novozymes Cellulosic Ethanol Enzyme Kit. This document contains useful information designed to help you understand more about cellulosic ethanol production and how our innovative enzymes can optimize your plant processes and enable commercialization.

Following this brief overview of our work with cellulosic ethanol, you will find basic application information regarding the use of the enzymes contained in this sample kit. More specific details about the characteristics, activity, dosage, etc. of each enzyme are included in the Appendices beginning on page 6.

Overview

Novozymes leads the way in cellulosic ethanol through broad partnerships that employ many feedstocks and processes. We provide the industry's best enzyme solutions and process optimizations to enable commercialization with partners and in our own labs.

We take a holistic approach in developing next-generation bioinnovations to meet your company's ever-changing needs. Along with our unprecedented R&D efforts, we also work closely with our partners to bring different competencies together in an effort to fully understand the critical relationship between process mechanics and enzymes. Together we can create solutions that realize the promise of renewable energy.

Cellulosic ethanol can be a major source of sustainable energy. Many feedstocks – including corn cobs, wheat straw, woody biomass, and municipal solid waste – are readily available, and it is estimated that cellulosic ethanol will reduce CO₂ emissions by 90% compared to petroleum-based fuels.

The complex structure of biomass make it more difficult to convert into ethanol than traditional starch substrates. This has presented unique technical and economic challenges in bringing cellulosic ethanol to market. Enzymes are vital in the conversion of biomass to ethanol, and the state-of-the-art Novozymes Cellic® solutions make the technology available at a commercially viable cost. Our groundbreaking innovation is a result of our commitment to creating sustainable solutions that improve the environment and enhance your business.

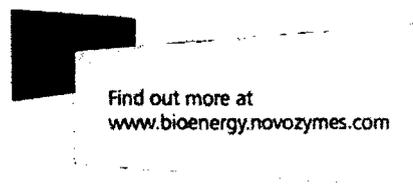
We are working every day to develop technologies that allow more types of biomass to be turned into commercially viable biofuel.

Our biomass test kit provides you with our leading enzymes for enabling the conversion of a variety of cellulosic feedstocks.

Application

In order to maximize the yield from enzyme hydrolysis, a combination of enzyme activities must be used. The optimal enzyme blend greatly depends on the composition of the various fractions (cellulose, hemicellulose, and lignin) in the biomass substrate. Experiments should be conducted to determine which enzymes and pretreatment method will work best on a specific feedstock.

The following tables contain information on the enzymes included in the test kit. The suggested enzyme dosage is based on weight percentage relative to the amount of biomass (total solids) on a dry basis. The required enzyme dosage may vary significantly based on the specific composition of the biomass feedstock and the particular physical and/or chemical pretreatment method used. Even though some of the enzymes have high temperature ranges, they will still work at lower temperatures, albeit at reduced activity. Operating at temperatures above the upper limit can result in irreversible enzyme denaturation. The general impact of temperature on enzyme activity and stability is shown in Appendix B.



Enzyme classification	Activity ¹	Density ² (g/ml)	pH	Temperature (°C)	Dosage ³ (% w/w (TS))
NS22086 Cellulase complex	1,000 BHU(2)/g	1.15	5.0-5.5	45-50	1-5%
NS22083 Xylanase	2,500 FXU-S/g	1.09	4.5-6.0	35-55	0.05-0.25%
NS22118 β-glucosidase	250 CBU/g	1.2	2.5-6.5	45-70	0.2-0.6%
NS22119 Enzyme complex	100 FBG/g (= 13,700 PGU/g)	1.19	4.5-6.0	25-55	0.05-0.4%
NS22002 Hemicellulase	45 FBG/g (= 470 FXU/g)	1.20	5.0-6.5	40-60	0.4-2%
NS22035 Glucosylase	750 AGU/g	1.15	4.5-5.5	60-70	0.01-0.06%

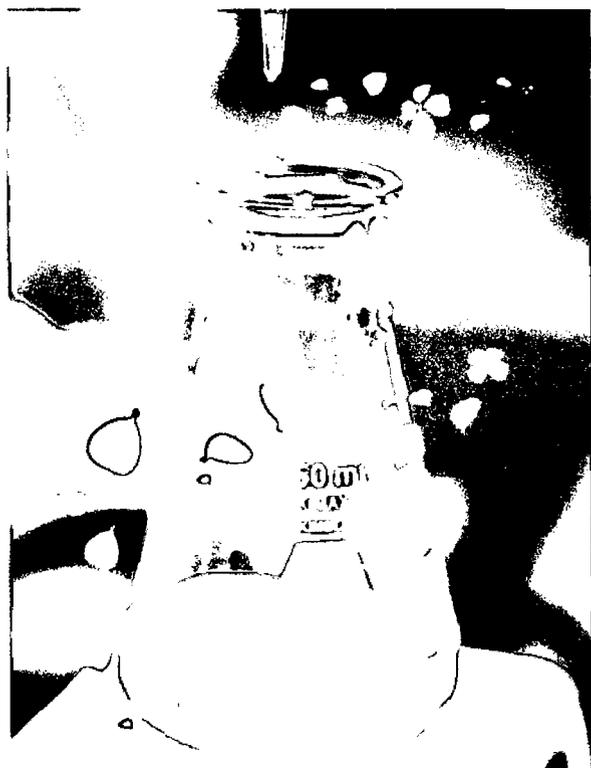
Table 2. Enzyme activity, density, pH, temperature, and recommended dosage.

1) EGU = Endo-Glucanase Unit, CBU = CelloBiase Unit, FBG = Fungal Beta-Glucanase Unit, PGU = PolyGalacturonase Unit, FXU-S = Fungal Xylanase Unit, and AGU = AmyloGlucosidase Unit. See Appendix A for further information on activity units.

2) Density values are approximate.

3) The required dosage is heavily dependent on feedstock type, pretreatment technology, and processing conditions. Enzyme dosage requirements may therefore vary significantly.

Pretreatment conditions must be optimized to achieve the maximum conversion of polysaccharides to fermentable sugars while minimizing the enzyme requirement. It is essential to evaluate the pretreated biomass for cellulose digestibility at an appropriate solids concentration.



If the solids concentration in a hydrolysis experiment is too high, nonenzymatic factors can be introduced that will interfere with the interpretation of the results. A range of 2-5% total solids (TS) loading is suggested for determining the efficacy of the pretreatment system. Results can be compared by evaluating the required enzyme dosage per mass of cellulose in the feedstock (cellulose content can be determined chemically) in order to give an indication of the enzymatic digestibility of the pretreated substrate (i.e., the efficiency of the pretreatment technology).

Note: Inhibition of enzymatic hydrolysis

The pretreatment method can create inhibiting products that can reduce the performance of the enzyme, resulting in lower cellulose conversion and/or increased enzyme dosage. Lignin and xylo-oligomer released during the pretreatment process can interfere with enzymatic performance by binding irreversibly to the enzymes or by blocking enzyme access to the substrate. An optimal degree of pretreatment does exist where the carbohydrate enzyme accessibility is maximized while the enzyme (and microorganism) inhibition is minimized.

From a cost perspective, it is normally advantageous to perform hydrolysis at the highest possible total solids in order to achieve maximum sugar concentrations.

NS number	Enzyme type	Description
NS22086	Cellulase complex	<ul style="list-style-type: none"> - Primary enzyme for use in the hydrolysis of lignocellulosic material - Catalyzes the breakdown of cellulosic material into glucose, cellobiose, and higher glucose polymers - Can be used to reduce the viscosity or increase the extraction yield of various products of plant origin - The main reaction products of cellulose hydrolysis using NS22086 are cellobiose and glucose - Testing for synergy with NS22118 and NS22083 is recommended to maximize performance
NS22083	Xylanase	<ul style="list-style-type: none"> - Purified endoxylanase with a high specificity toward soluble pentosans - Able to liberate pentose sugars from biomass hemicellulose fractions - Can be used to supplement NS22086 for pretreatment that leaves a significant portion of the hemicellulose intact (i.e., neutral-pH or alkaline pretreatment methods)
NS22118	β -glucosidase	<ul style="list-style-type: none"> - Also known as cellobiase; hydrolyzes cellobiose to glucose - Can be used to supplement NS22086 in order to increase the yield of fermentable sugars - Addition should be approximately 0–4% (v/v) of the amount of NS22086 for complete hydrolysis of the available cellulose
NS22119	Enzyme complex	<ul style="list-style-type: none"> - Contains a wide range of carbohydrases, including arabinase, β-glucanase, cellulase, hemicellulase, pectinase, and xylanase - Can break down cell walls for the extraction of useful components from plant tissue - Able to liberate bound materials and degrade a variety of nonstarch polysaccharides - Can be used to supplement NS22086 for substrates containing pectin
NS22002	β -glucanase Xylanase	<ul style="list-style-type: none"> - Contains a mixture of β-glucanase and xylanase enzyme activities - Possesses additional side activities, including cellulase, hemicellulase, and pentosanase - Can be used to supplement NS22086 for pretreatment that leaves a significant portion of the hemicellulose intact (i.e., neutral-pH or alkaline pretreatment methods)
NS22035	Glucoamylase	<ul style="list-style-type: none"> - Used on liquefied starch-containing substrates to produce sugars for fermentation - Works in dedicated saccharification stages as well as simultaneous saccharification and fermentation - Glucoamylases hydrolyze both 1,4- and 1,6-alpha linkages to liberate glucose for subsequent fermentation by the yeast

Table 1. Descriptions of enzymes contained in Novozymes' cellulosic ethanol enzyme kit.

ANEXO 11

DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DEL COMPLEJO ENZIMÁTICO: CELULASA COMPLEX + β - GLUCOSIDASA

Para realizar la determinación de actividad enzimática, tras el análisis experimental se realizó la hidrólisis con el resultado de mayor rendimiento en azúcares reductores totales: *Celulasa* 5% y *β -glucosidasa* 2%.

Pre-tratamiento:

Se tomó 5gr de muestra molida y fue sometido a una reacción alcalina (empleando una solución de NaOH 8% p/v, en una relación sólido: líquido de 1:10 g/ml, a 120°C durante 90 minutos). Luego fue lavado hasta llegar a pH neutro.

Condiciones de hidrólisis enzimática:

Se replicaron las condiciones de ensayos mostradas en el diseño experimental: 45°C, pH 5, 160 rpm; la hidrólisis se dio por espacio de una hora.

Procedimiento:

Se activó la enzima adicionándola en una solución tampón citrato a pH 5, de esta solución con la enzima (diluida a una proporción 1:10 enzima: citrato) se tomó la concentración obtenida en los resultados del análisis experimental. Se adicionó luego al volumen de reacción con la solución de tampón citrato (100ml). Luego adicionamos los 5 gramos de muestra molida pretratada al volumen de reacción, se puso al shaker a 45°C y se tomaron las muestras cada 10 minutos por una hora.

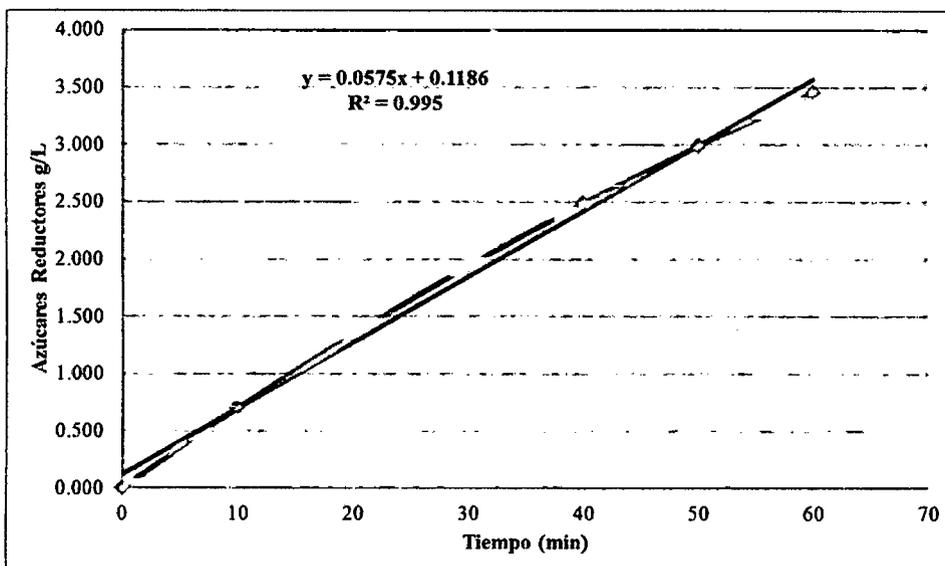


Figura A11: Representación gráfica de la cinética de reacción del compuesto celulolítico en la cascarilla de arroz pretratada.

$$Act. U / L = \left(\frac{Pendiente (g / L \times min)}{Glu\ cos\ a \left(\frac{g}{mol} \right)} \right) \times 1000000 \frac{\mu mol}{mol}$$

$$Actividad _ Enzimática (U / mg) = \frac{Act. U / L}{proteina (mg / L)}$$

Tabla A11. Actividad enzimática del complejo enzimática en cascarilla de arroz, para condiciones experimentales

Actividad Enzimática			
Pendiente	=	0.0575	g/L*min
Act. U/L	=	319.33	U/L
Actividad Enzimática	=	18.759	U/mg

ANEXO 12

DETERMINACIÓN DE LOS PARÁMETROS CINÉTICOS

Procedimiento

Se prepararon 5 matraces de 125ml, se adicionaron 25ml de tampón citrato a pH 5, para llevar a cabo la hidrólisis con las concentraciones de enzimas óptimas (*celulasa* 5% y *β -glucosidasa* 2%), a diferentes concentraciones de sustrato y todas con un tiempo de reacción de una hora.

Los ensayos se realizaron por duplicado, como se detalla en la siguiente Tabla A12.1. Diseño experimental para la determinación de parámetros cinéticos.

Nº	Concentración g/l	Volumen	Cascarilla g
1	10	25	0.25
2	15	25	0.375
3	25	25	0.625
4	35	25	0.875
5	45	25	1.125

Los resultados obtenidos para cada uno de los sustratos fueron graficados para obtener la pendiente, es decir, la velocidad de reacción inicial correspondiente a cada uno de los sustratos analizados en la experiencia. La tabla 16 muestra los valores de producto en g/L para cada reacción, por duplicado.

Tabla A12.2 Producto a una hora de hidrólisis para diferentes concentraciones de sustratos de cascarilla de arroz pretratada.

Sustrato (g/L)	Tiempo	ABS	Diluido	Producto g/L	Producto (Promedio)
10	0	0	0	0	0
	60	0.3	0.784	1.568	1.582
	60	0.305	0.798	1.596	
15	0	0	0	0	0
	60	0.385	1.024	2.049	2.063
	60	0.39	1.038	2.077	
25	0	0	0	0	0
	60	0.472	1.270	2.541	2.552
	60	0.476	1.282	2.564	
35	0	0	0	0	0
	60	0.569	1.545	3.090	3.104
	60	0.574	1.559	3.118	
45	0	0	0	0	0
	60	0.64	1.746	3.491	3.511
	60	0.647	1.765	3.531	

Una vez obtenidas las pendientes, velocidades iniciales de reacción, se procedió a graficar las inversas de S y V, como se describe en la metodología. La representación gráfica de Lineweaver-Burke permite identificar el K_m y $V_{m\acute{a}x}$; el punto de corte con el eje de ordenadas es el equivalente a la inversa de $V_{m\acute{a}x}$, y el de abscisas es el valor de $-1/K_m$.

Tabla A12.3. Inversas de S y V, para determinación de parámetros cinéticos.

S	V	1/S	1/V
10	0.0266	0.100	37.594
15	0.0346	0.067	28.902
25	0.0425	0.040	23.529
35	0.0517	0.029	19.342
45	0.0585	0.022	17.094

Los valores de la tabla A12.3 fueron graficados para obtener los parámetros cinéticos del complejo enzimático a las condiciones antes descritas para la cascarilla de arroz pretratada.

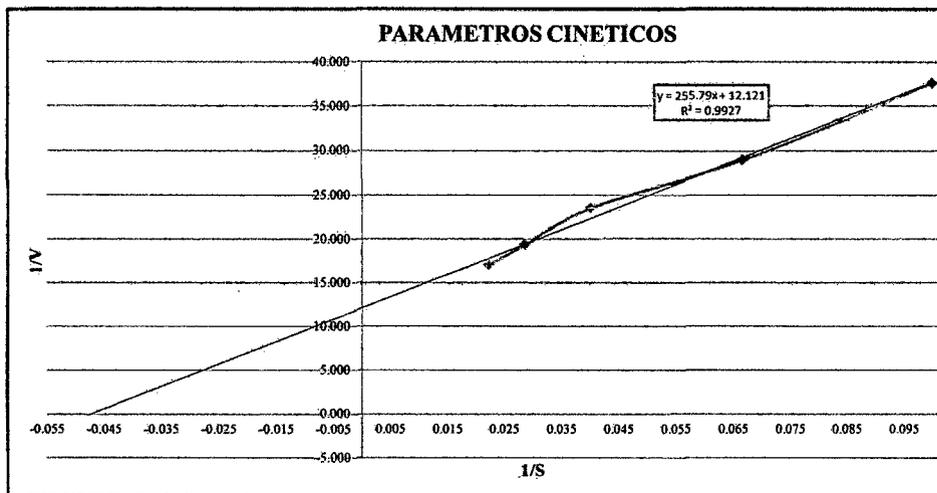


Figura A12. Representación gráfica de las inversas S y V.

1/V _{máx}	12.121	V _{máx}	0.0825
K _m /V _{máx}	255.79	K _m	21.1030

ANEXO 13

REFERENCIAS DE COMPOSICIÓN DE MEDIOS DE MANTENCIÓN, ACTIVACIÓN Y CULTIVO PARA *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 4126.

Medio	Nutriente	Concentración (g/l)
Sólido de mantención (YM sólido)	Extracto de levadura	3
	Peptona	5
	Extracto de malta	3
	Agar	20
	Glucosa	10
Activación	Glucosa	15
	Extracto de levadura	3
	Extracto de malta	5
	Solución de sales	5 ml/L
Fermentación	Hidrolizado de cascarilla de arroz pretratada	1,8
	Extracto de levadura	
	(NH ₄) ₂ SO ₄	
	KH ₂ PO ₄	10 ml/L
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	
	Solución de sales	100 ml/L
	Tampón citrato pH 4,2	

Composición elemental m.o.: C 45%; N 9%; Mg 0,4%; K 0,5% y P 2,0%

$U_{\text{máx}} = 0,37 \text{ h}^{-1}$ en glucosa a 35°C (Lane, M. y Morrissey, J. 2010)

Composición de la solución de sales 100 veces concentrado, utilizadas en los medios de cultivo en g/L: 1,12 CaCl₂·2H₂O; 0,11 ZnSO₄·7H₂O; 0,06 FeSO₄·7H₂O; 0,05 CuSO₄·5H₂O; 0,01 CoCl₂·6H₂O; 0,0005 MoO₃; 0,027 MnCl₂·6H₂O y 0,28 NaCl

Condiciones de cultivo: Temperatura 35° y velocidad de agitación de 200 rpm en el agitador orbital (Shaker).

ANEXO 14

DETERMINACIÓN DE ETANOL EN EL CROMATOGRÁFO DE GASES

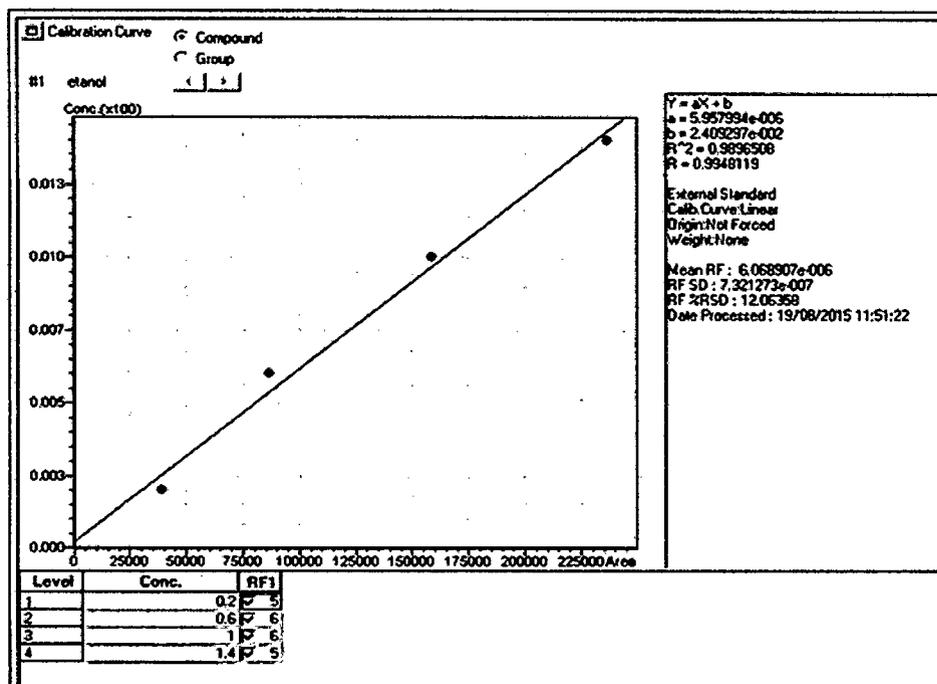
a) CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS.

- Tipo de Columna: Stabilwax®-DA 30meter, 0.25mmID, 0.5umdf
 - Total Program Time: 11.5min.
 - INJ TYPE: Split
 - DET TYPE: FID
 - LINEAR VELOCITY: 32.9 cm/sec (He)
- INJ TEMP: 250°C
DET TEMP: 200.0 °C
Split Ratio: 300.0

b) CURVA DE CALIBRADO ETANOL

Análisis de 0.2 % 0.6% - 1% y 1.4% de alcoholes puros o patrones

Figura A14. Curva de calibrado para la determinación de etanol por cromatografía de gases.



Ecuación: $y = ax + b$

$a = 5.957994e-006$

$b = 2.409297e-002$

$R^2 = 0.9896508$

c) Resultado del Análisis Cromatográfico en el fermentado del hidrolizado de cascarilla de arroz.

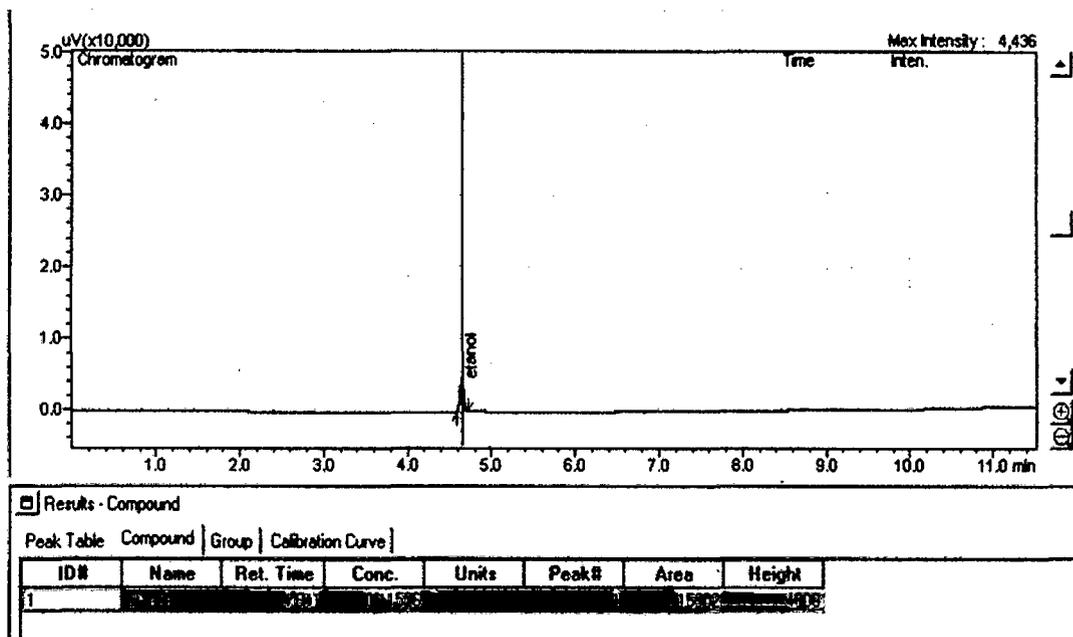


Figura A14.1 Determinación de etanol en el *minuto 30* del fermentado de hidrolizado de cascarilla de arroz por cromatografía de gases.

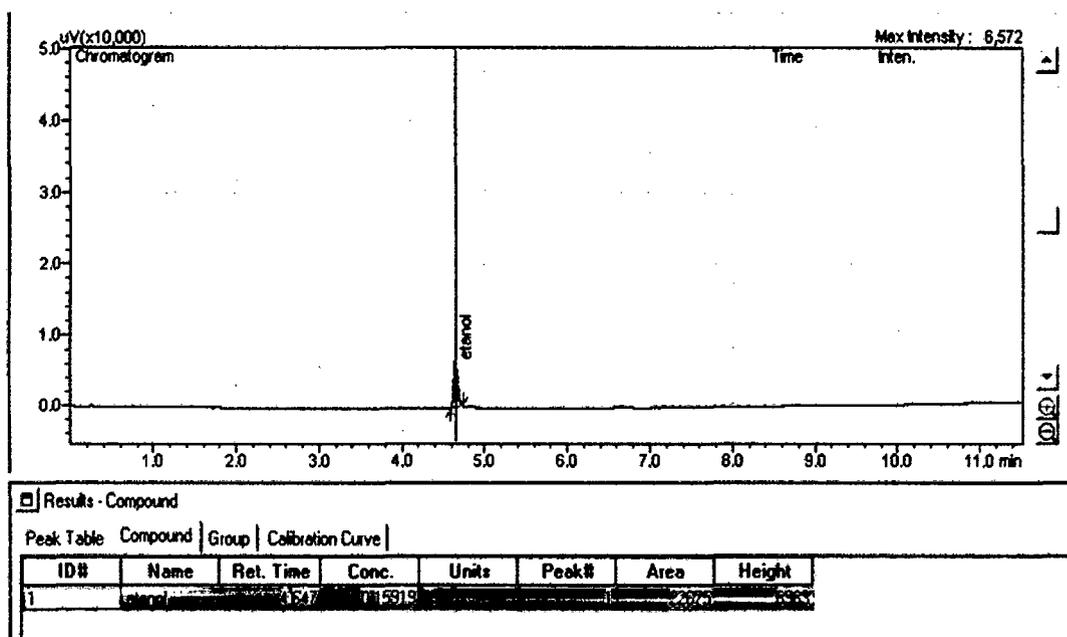


Figura A14.2 Determinación de etanol en el *minuto 60* de la fermentación de hidrolizado de cascarilla de arroz por cromatografía de gases.

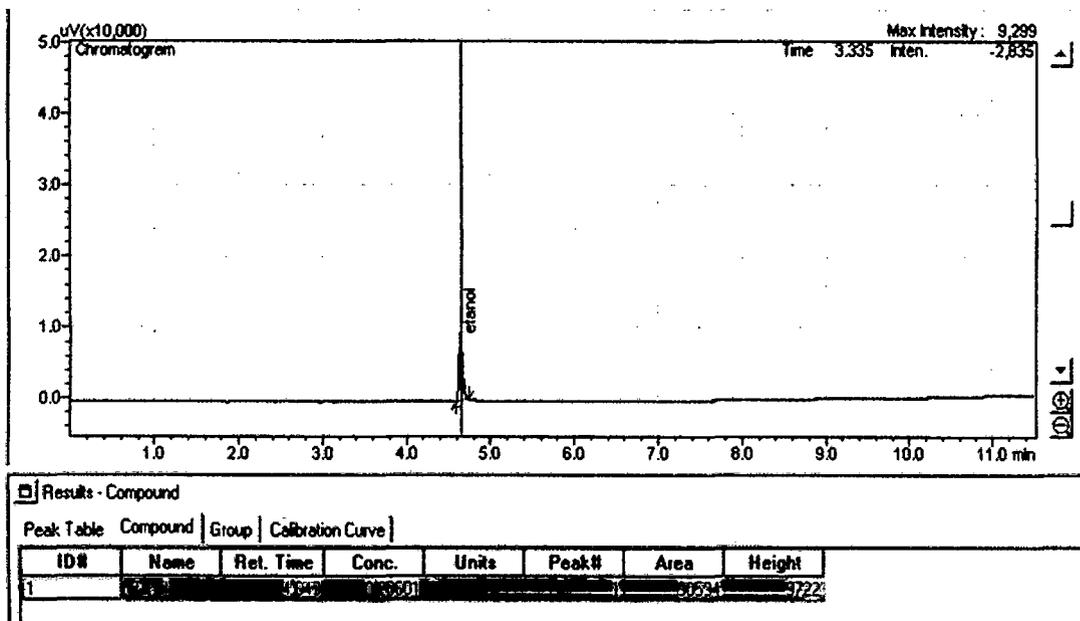


Figura A14.3 Determinación de etanol en el *minuto 120* de la fermentación de hidrolizado de cascarilla de arroz por cromatografía de gases.

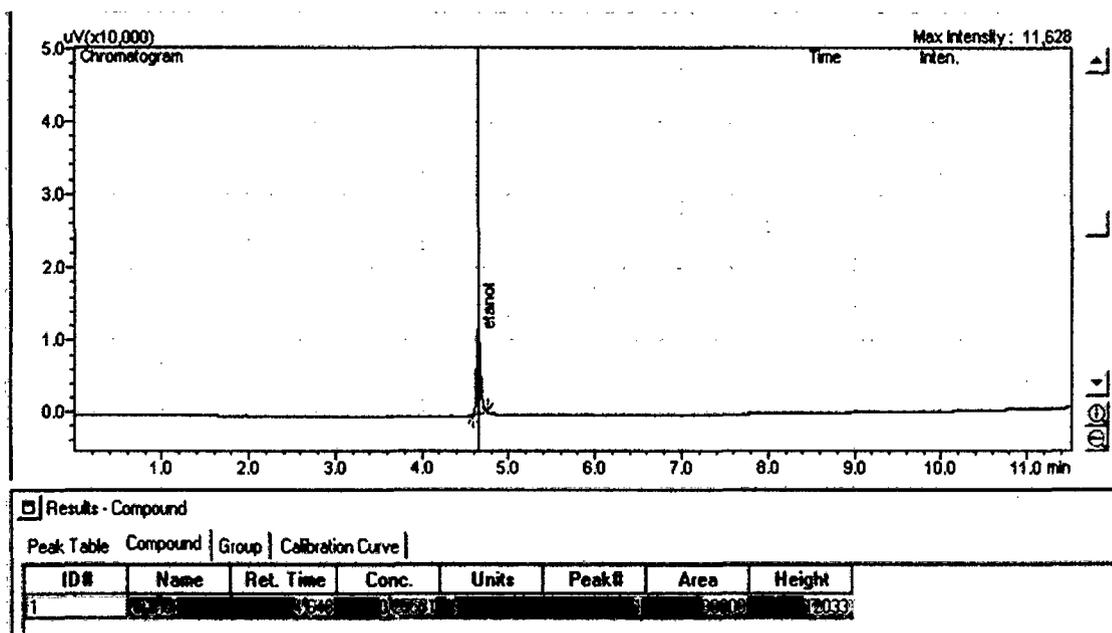


Figura A14.4 Determinación de etanol en el *minuto 180* de la fermentación de hidrolizado de cascarilla de arroz por cromatografía de gases.

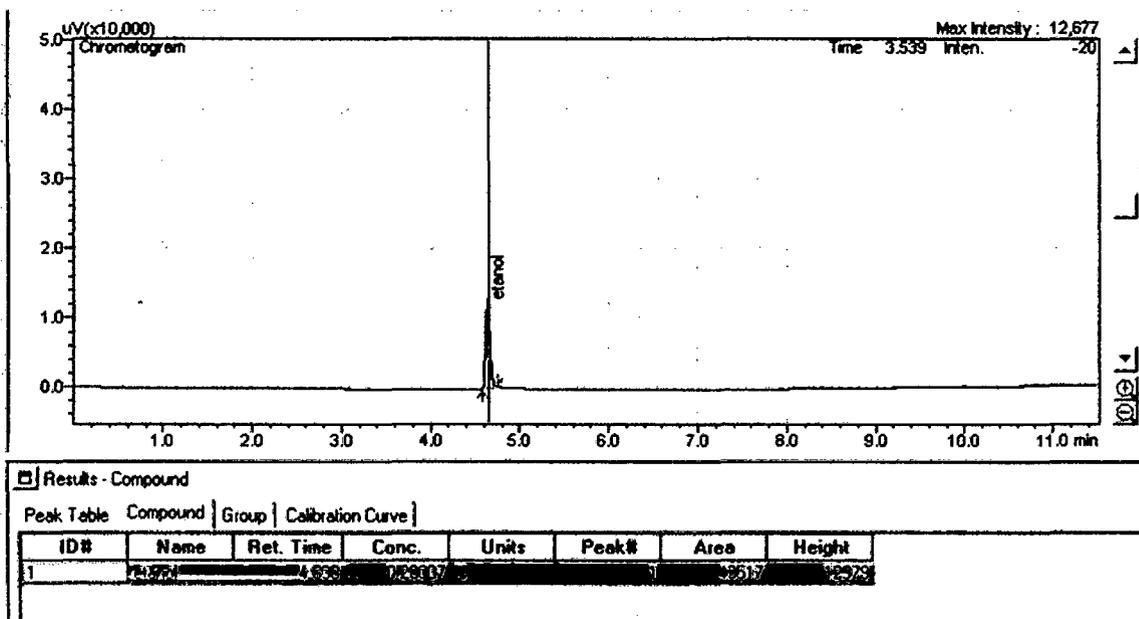


Figura A14.5 Determinación de etanol en el *minuto 300* de la fermentación de hidrolizado de cascarilla de arroz por cromatografía de gases.

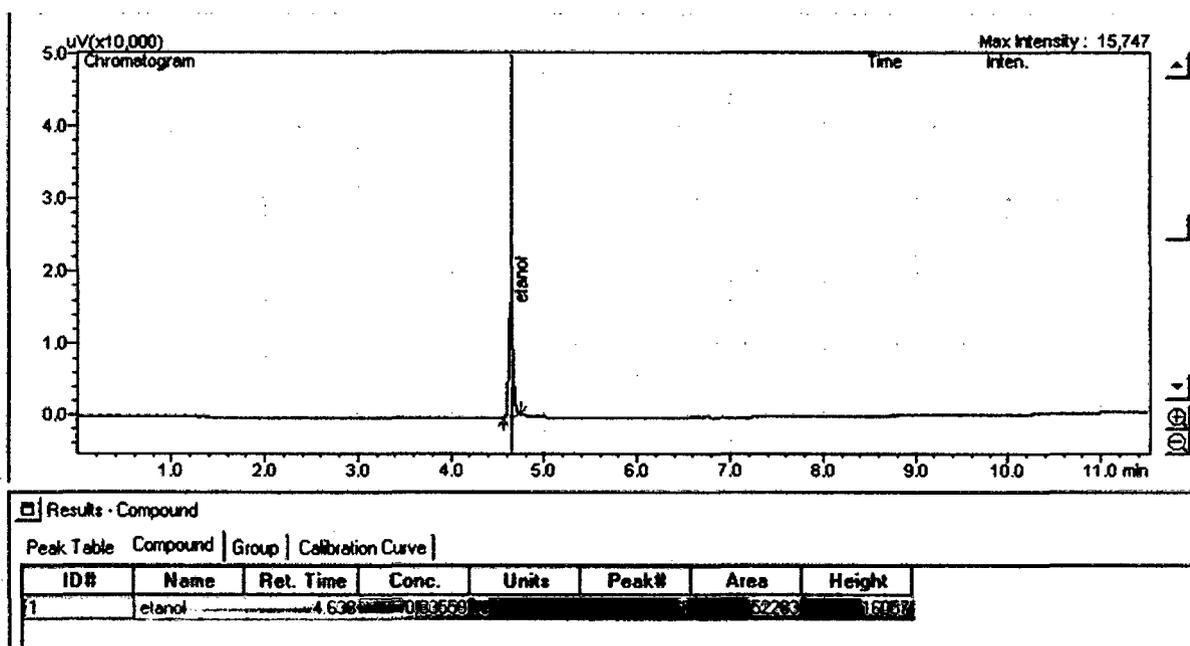


Figura A14.6 Determinación de etanol en el *minuto 480* de la fermentación de hidrolizado de cascarilla de arroz por cromatografía de gases.



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SANTA FACULTAD DE INGENIERÍA



ESCUELA ACADEMICO PROFESIONAL DE INGENIERIA AGROINDUSTRIAL

OFICINA CENTRAL DE INVESTIGACIÓN

CATÁLOGO DE TRABAJOS DE INVESTIGACIÓN Y TESIS

I. DATOS GENERALES (PRE GRADO):

1.1. UNIVERSIDAD:

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SANTA

1.2. ESCUELA O CARRERA PROFESIONAL:

INGENIERIA AGROINDUSTRIAL

1.3. TITULO DE TRABAJO:

“DETERMINACION DE LAS CONCENTRACIONES DE ENZIMAS
Celulasa Y *β-Glucosidasa* PARA LA OBTENCIÓN DE AZÚCARES
FERMENTABLES A PARTIR DE CASCARILLA DE ARROZ”

1.4. AREA DE INVESTIGACION:

EXPERIMENTAL Y APLICADO

1.5. AUTORES:

DNI: 47485716, CHICO LEON HENRY GERMAN

DNI: 46347950, SANDOVAL ROJAS DANIEL ALBERTO

1.6. TITULO PROFESIONAL AL QUE CONDUCE:

INGENIERO AGROINDUSTRIAL

1.7. AÑO DE APROBACION DE LA SUSTENTACION:

2015



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SANTA

FACULTAD DE INGENIERÍA

ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL



II. CONTENIDO DEL RESUMEN:

2.1. PLANTEAMIENTO DEL ESTUDIO:

2.1.1. Objetivo de la Investigación:

- **Social:**

El mundo encara el agotamiento progresivo de sus recursos energéticos basados mayoritariamente en combustibles no renovables y, al mismo tiempo, el consumo de energía aumenta a ritmos cada vez mayores. El consumo global de combustibles genera enormes cantidades de gases contaminantes que son liberados a la atmósfera, causando cambios significativos en el clima del planeta, por lo que se ha convertido en una de las problemáticas que más preocupan a los gobiernos, las comunidades y la opinión pública en general.

La única forma de encarar esta problemática es mediante recursos energéticos renovables. Para ello, la biotecnología ofrece múltiples alternativas tecnológicas.

Una solución renovable es el uso de energía solar en forma de biomasa, la cual está representada en los materiales lignocelulósicos y los cultivos de plantas ricas en energía. La utilización de biomasa lleva consigo una disminución de la contaminación atmosférica: Las emisiones de CO₂ generadas por la producción y uso de biocombustibles son compensadas por la absorción de CO₂ durante el



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SANTA

FACULTAD DE INGENIERÍA



ESCUELA ACADEMICO PROFESIONAL DE INGENIERIA AGROINDUSTRIAL

crecimiento de las plantas y de otros materiales vegetales, a partir de los cuales dichos combustibles se producen.

- **Económico:**

Para un país como los EEUU, la producción masiva de biocombustibles representaría el "regreso" de dinero y puestos de trabajo a la economía, sin mencionar que el desarrollo de cultivos energéticos implicaría un impulso al sector rural. Este argumento es aún más válido para la mayoría de los países latinoamericanos, considerando la perspectiva de una reducción de las reservas comprobadas de petróleo en un plazo de 5-10 años. Una parte importante del PIB de cada país tendría que destinarse a la compra de petróleo cuya perspectiva de precios es muy incierta, a lo que hay que agregar la feroz competencia que encaran los productos agrícolas de los países latinoamericanos frente a los enormes subsidios destinados al sector primario por los países desarrollados. Por ello es de importancia estratégica la diversificación de la agricultura a través de cultivos ricos en energía (caña de azúcar, palma africana, sorgo, maíz y yuca, entre otros).

Además de que en el mundo, la tendencia del uso de energías limpias ha permitido el crecimiento de la demanda de bioetanol (o simplemente etanol, EtOH), el cual se espera se incremente drásticamente en los siguientes años.



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SANTA

FACULTAD DE INGENIERÍA

ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL



- **Científico:**

Entre las materias primas agrícolas que comúnmente se han utilizado a nivel mundial para la obtención de bioetanol se encuentran: la caña de azúcar, melazas de remolacha azucarera y el maíz. Sin embargo, es preciso mencionar que además de estas materias primas, existen todavía una gran variedad, dentro de las cuales se encuentran los residuos agroindustriales: por su alto contenido en azúcares. Una hectárea de cultivos ricos en energía usada para la producción de biocombustibles líquidos (bioetanol, biodiesel) puede evitar la emisión de 0.2-2.0 t de carbono a la atmósfera en comparación con el empleo de combustibles fósiles. Por ello, el desarrollo de esta investigación desarrollará un aporte en la etapa de hidrólisis del material lignocelulósico, en el que se determinará las concentraciones óptimas de las enzimas *celulasa* y *β -glucosidasa* para la obtención de azúcares fermentables a partir de cascarilla de arroz, proveniente del valle de Santa. Los residuos agroindustriales generados por la cosecha de este cereal es muy relevante en Perú, y es una fuente abundante para obtener azúcares fermentables, las cuales, luego de someterse a procesos de hidrólisis son susceptibles de llevarlas a una fermentación alcohólica para la obtención de etanol.



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SANTA

FACULTAD DE INGENIERÍA

ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE INGENIERIA AGROINDUSTRIAL



2.1.2. Formulación del Problema:

¿Cuáles serán las concentraciones de enzimas *Celulasa* y β -*glucosidasa* para la obtención de azúcares fermentables a partir de cascarilla de arroz?

2.2. OBJETIVOS:

2.2.1. Objetivo General:

- Determinar las concentraciones de enzimas *Celulasa* y β -*glucosidasa* para la obtención de azúcares fermentables a partir de cascarilla de arroz.

2.2.2. Objetivos Específicos:

- Determinar la composición química proximal de la cascarilla de arroz.
- Realizar un pretratamiento alcalino para deslignificación de la cascarilla de arroz.
- Determinar las concentraciones de enzimas *Celulasa* y β -*glucosidasa* en relación a la hidrólisis Enzimática.
- Realizar la caracterización del hidrolizado de cascarilla de arroz.
- Realizar una fermentación del hidrolizado de cascarilla de arroz pretratado.



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SANTA

FACULTAD DE INGENIERÍA

ESCUELA ACADEMICO PROFESIONAL DE INGENIERIA AGROINDUSTRIAL



2.3. HIPOTESIS:

Los parámetros para la obtención enzimática de azúcares fermentables a partir de cascarilla de arroz son: [Enzima *Celulasa*]: (1 - 5) %; [Enzima β - *Glucosidasa*]: (0,2 – 0,6) %; para la obtención de una [Azúcares Totales]: (10 – 20 g/L)

2.4. MARCO TEORICO:

2.4.1. Celulosa:

La celulosa es el compuesto orgánico más abundante en la naturaleza, se presenta en las plantas superiores, algas, hongos y en los quistes de los protozoarios. Es un polímero lineal de la celobiosa, la cual corresponde a un disacárido formado por la unión de dos moléculas de glucopiranos. El número de unidades de celobiosa que forman la celulosa varía con las especies vegetales. Es una molécula formada por unidades de glucosa unidas mediante enlaces β -1,4. Este tipo de enlace es la diferencia más clara con respecto al almidón, en que las moléculas de glucosa están unidas mediante enlace α -1,4. La diferencia de tipos de enlace y longitud de las cadenas determina que almidones y celulosas tengan propiedades tecnológicas y nutricionales muy distintas (Cubero, 2002).



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SANTA

FACULTAD DE INGENIERÍA

ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL



2.4.2. Lignina:

La lignina es un polímero tridimensional de fenilpropano con unidades que mantiene unidades por enlace éter y carbón-carbón. Tiene un alto peso molecular, es amorfa en la naturaleza y está concentrada en capas exteriores de fibras y proporciona rigidez estructural por endurecimiento y por mantener juntas las fibras de polisacáridos (Cowling y Kirk; 1976) es por ello que la encontramos en todas las fuentes de celulosa orgánica y por ser un polímero de esta magnitud es que hace una tarea difícil llevar a cabo la hidrólisis enzimática.

2.4.3. Conceptos de pretratamiento:

El propósito del pretratamiento consiste en realizar el acondicionamiento de la materia prima, mediante operaciones mecánicas, físicas y química, para aumentar el rendimiento en la conversión de hidrólisis de cascarilla de arroz. El principio del pretratamiento es quitar la lignina, separándola de la hemicelulosa, reducir la región cristalina de la celulosa y aumentar la porosidad de los materiales.



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SANTA

FACULTAD DE INGENIERÍA

ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL



2.4.4. Tipos de pretratamiento

- **Pretratamiento físico**

Los pretratamientos físicos, cuyo principal efecto es la reducción del tamaño de las partículas, producen un aumento en la tasa de hidrólisis, debido fundamentalmente a la disponibilidad de superficie para la adsorción de las enzimas hidrolíticas (Hills y Nakano, 1990).

- **Pretratamiento químico**

En el caso del pretratamiento alcalino, comparado con otras tecnologías para pretratamiento, se realiza a bajas temperaturas y presiones. Es posible llevar a cabo el proceso a condiciones ambientales pero puede tardar horas o días (Hendricks y Zeeman, 2009).

Comparado con el pretratamiento ácido el proceso alcalino causa menos degradación de azúcares y la sal caustica se puede recuperar o regenerar (Kumar et al, 2009). Además, la estructura de la celulosa después del pretratamiento es más densa y termodinámicamente más estable que la celulosa natural (Hendricks y Zeeman, 2009).



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SANTA

FACULTAD DE INGENIERÍA

ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE INGENIERIA AGROINDUSTRIAL



2.4.5. Cinética enzimática:

La cinética enzimática estudia la velocidad de las reacciones químicas que son catalizadas por las enzimas. El estudio de la cinética de una enzima nos mostrará los detalles del mecanismo catalítico de esa enzima, su papel en el metabolismo, cómo es controlada su actividad en la célula y cómo puede ser inhibida su actividad por drogas o venenos o potenciada por otro tipo de moléculas (Valero, 1998).

Las dos propiedades cinéticas más importantes de una enzima son: el tiempo que tarda en saturarse con un sustrato en particular y su punto máximo de saturación. El conocimiento de estas propiedades nos permitirá hacer una hipótesis acerca del comportamiento de una enzima en el ambiente celular y cómo responderá frente a un cambio de esas condiciones (Cunningham, 1994).

2.4.6. Hidrólisis enzimática:

Este proceso se lleva a cabo mediante el uso de enzimas llamadas celulasas las cuales son altamente específicas. Los productos son azúcares reductores incluyendo glucosa. Los costos de utilidad de este proceso de hidrólisis son bajos comparados con la hidrólisis ácida porque se realiza bajo condiciones medias (pH de 4,8 y



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SANTA

FACULTAD DE INGENIERÍA



ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL

temperatura de 40-50 °C) y no produce problemas de corrosión (Blume, 1991).

Zhu (2005) menciona que en comparación con la hidrólisis con ácido diluido, la hidrólisis enzimática tiene la ventaja de que puede lograr altos rendimientos y eliminar la formación de subproductos inhibidores.

Las celulasas son una mezcla de varias enzimas, los grupos principales son: endoglucanasa, exoglucanasa o celobiohidrolasa y β -glucosidasa. Específicamente, los tres tipos de enzimas que incluye una celulasa son: la endo- β -1,4-glucanasa o 1,4- β -D-glucan glucanhidrolasa; la exo- β -1,4-glucanasa o 1,4- β -D-glucan celobiohidrolasa y la β -1,4-glucosidasa o β -Dglucósido glucohidrolasa (Zhang, 2006).

2.4.7. Azúcar Fermentable:

Se denomina técnicamente azúcares a los diferentes monosacáridos, disacáridos, y polisacáridos, que generalmente tienen sabor dulce, aunque por extensión se refiere a todos los hidratos de carbono; estos están compuestos solamente por carbono, oxígeno e hidrógeno (Barrow, 2000)



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SANTA

FACULTAD DE INGENIERÍA

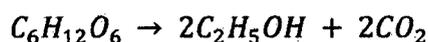
ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL



Los Azúcares reductores son aquellos azúcares que poseen su grupo carbonilo (grupo funcional) intacto, y que a través del mismo pueden reaccionar con otras especies.

2.4.8. Fermentación:

La fermentación alcohólica es una bioreacción que permite degradar azúcares en alcohol y dióxido de carbono. La conversión se representa mediante la ecuación:



Las principales responsables de esta transformación son las levaduras. La *Saccharomyces cerevisiae*, es la especie de levadura usada con más frecuencia. Por supuesto que existen estudios para producir alcohol con otros hongos y bacterias, como la *Zymomonas Mobilis*, pero la explotación a nivel industrial es mínimo. (Vázquez. H y Dacosta. O, 2007).

El rendimiento teórico estequiométrico para la transformación de glucosa en etanol es de 0.511 g de etanol y 0.489 g de CO₂ por 1g de glucosa. Este valor fue cuantificado por Gay Lussac. En la realidad es difícil lograr este rendimiento, porque como se señaló



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SANTA

FACULTAD DE INGENIERÍA

ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE INGENIERIA AGROINDUSTRIAL



anteriormente, la levadura utiliza la glucosa para la producción de otros metabolitos. El rendimiento experimental varía entre 90% y 95% del teórico, es decir, de 0.469 a 0.485 g/g. Los rendimientos en la industria varían entre 87 y 93% del rendimiento teórico (Boudarel, 1984). Otro parámetro importante es la productividad (g/h/l), la cual se define como la cantidad de etanol producido por unidad de tiempo y de volumen. (Vázquez. H y Dacosta. O, 2007).

2.5. CONCLUSIONES:

- De la caracterización fisicoquímica de la cascarilla de arroz, se determinó que la celulosa es el componente más abundante, seguido de la hemicelulosa.
- Del pretratamiento térmico – alcalino de la cascarilla de arroz, se logró reducir la concentración de lignina en un 66.55%, mejorando sus condiciones para su posterior hidrólisis enzimática.
- Se determinó que las concentraciones de enzimas óptimas para la hidrólisis enzimática de la cascarilla de arroz pretratada, están en una relación de 25:1 de *celulasa* respecto a *β -glucosidasa*.
- Los valores de los parámetros cinéticos para las condiciones óptimas del proceso indican alta afinidad del sustrato por la enzima y baja reactividad.



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SANTA

FACULTAD DE INGENIERÍA

ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE INGENIERIA AGROINDUSTRIAL



- La hidrólisis de la cascarilla de arroz pretratada, a las concentraciones óptimas de enzimas, dieron un rendimiento del 68.0% en azúcares reductores.
- Se determinó que el hidrolizado de cascarilla de arroz pretratada contiene un 52.43% de glucosa, y 16.55% de xilosa respecto a la concentración de azúcares reductores.
- Se comprobó que el hidrolizado enzimático obtenido fue fermentado a etanol.

2.6. RECOMENDACIONES:

- Realizar un proceso de deslignificación biológica usando *Pleurotus ostreatus*, proceso que sería ambientalmente amigable, con la que se pueden generar productos adicionales, como hongos comestibles y complejos enzimáticos con actividades ligninasas.
- Realizar la experiencia de la hidrólisis enzimática en un bioreactor automatizado.



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SANTA

FACULTAD DE INGENIERÍA



ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL

2.7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

- Agustín Valverde, Bienvenido Sarria y José Monteagudo, 2007. Análisis comparativo de las características fisicoquímicas de la cascarilla de arroz. Colombia.
- Colina, G., J. Ferrer, G. Páez, Z. Mármol, G. Urbaneja, L. Arenas Y L. Sandoval. (1998). Tratamiento de los desechos generados en la producción del grano de café (pulpa de café) para la obtención de carbohidratos por hidrólisis ácida. Rev. Téc. Ing. Univ. Zulia. 21 (3): 179- 187.
- Van Zyl et al., (1991): Desechos del sector agricultura: Fundamentos para el Aprovechamiento de un Recurso Promisorio pag.51-58. Editorial Carrasco, Lima Perú, 6ta Edición.
- Singh, A., K. Das, Y D. Sharma. (1984). Production of xylose, furfural fermentable sugars and ethanol from agricultural residues. J. Chem. Biotechnol. Vol.34: 51-56.
- Taiz, I. and Zeiger, E. (2002) Fisiología vegetal tercera edición. Editada en por Sinauer Associates INC. 300.
- Cunningham R. LÓPEZ G.(1994) Etanol de lignocelulósicos tecnología y perspectivas, Santiago de Compostela, universidad, servicio de publicación e intercambio científico, Programa CYTED 1994
- Valero, F. (1998) Módulo de Enzimas, Ingeniería Bioquímica. Departamento de Ingeniería Química.



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SANTA
FACULTAD DE INGENIERÍA
ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL



- Zhang, Y., Himmel, M. y Mielenz, J. (2006) Outlook of cellulase improvement: screening and selection strategies. *Biotechnology Advances*. Vol. 24, 452-48.
- Blume J.E. and Herberl Ennis (1991). A *Dictyostelium discoideum* Cellulase Is a Member of a Spore Germination-specific Gene Family. *The Journal Of Biological chemistry*. Issue of August 15. 15432-15437.1991
- Barrow G. (2000), *Química general*, editorial reverté.
- Cacesa, P., Hubble, J. (1990); *Tecnología de las Enzimas*; editorial acriba S.A. Zaragoza – España.
- Cubero, N., Monferrer, A. y Villalta, J. (2002) *Aditivos Alimentarios*. Editorial Mundi-Prensa. Madrid. 21-23, 48-49.
- Van Buren. (1999). *Biotechnology & Chemical Engineering Anoverviewof Fermentation Process*.
- WHO/FAO (1998) *Carbohydrates in human nutrition*. FAO food and nutrition paper no. 66. FAO, Rome.
- Kumar, P., Barret, D. M., Delwiche, M. J., & Stroeve, P. (2009). Methods for Pretreatment of Lignocellulosic Biomass for Efficient Hydrolysis and Biofuel Production. *Ind. Eng. Chem. Res.*, 48, 3713-3729.
- Hendricks, A., & Zeeman, G. (2009). Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*, 100, 10-18.



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SANTA
FACULTAD DE INGENIERÍA
ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE INGENIERIA AGROINDUSTRIAL



- McMillan, J. D. (1994). Pretreatment of lignocellulosic biomass. In: M. E. Himmel, J. O. Baker, R. P. Overend (eds.). Conversion of hemicellulose hydrolyzates to ethanol (pp.292–324). Washington: American Chemical Society Symposium.
- Linde M., Galbe, M., Zacchi, G. (2007). Simultaneous saccharification and Fermentation of steam-pretreated barley straw at low enzyme loadings and low yeast. *Enzyme Microb Technol.* 40, 1100-1107.

PROYECTOS DE TESIS:

- Proyecto de Trabajo de Investigación: “DETERMINACIÓN DEL EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE LA BASE NaOH, DE LA CELULASA Y CELOBIASA EN LA HIDRÓLISIS PARA LA PRODUCCIÓN DE ETANOL A PARTIR DEL RASTROJO DE LA PIÑA. Ciudad Universitaria Rodrigo Facio San José, Costa Rica – 2011
- Proyecto de Trabajo de Investigación: “OPTIMIZACIÓN DEL PROCESO DE OBTENCIÓN ENZIMÁTICA DE AZÚCARES FERMENTABLES A PARTIR DE ASERRÍN DE PINO”. Instituto Tecnológico de Durango, Felipe Pescador 1830 Ote., Col. Nueva Vizcaya, Durango, Dgo., México.
- Torres, J.F.(2009). “Evaluación del rendimiento de la hidrólisis enzimática de la celulosa a glucosa, con pretratamiento alcalino”. Proyecto de graduación para optar por el grado de Licenciatura en Ingeniería Química,



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SANTA FACULTAD DE INGENIERÍA



ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL

Escuela de Ingeniería Química, Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica.

- Amador, J.L. (2009). “Evaluación del efecto del tamaño de partícula, tiempo de pretratamiento y concentración de hidróxido de sodio en la hidrólisis enzimática del bagazo de caña de azúcar”. Proyecto de graduación para optar por el grado de Licenciatura en Ingeniería Química, Escuela de Ingeniería Química, Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica.
- Virginia Melo Ruiz y Oscar Cuamatzi Tapia. Bioquímica de los Procesos Metabólicos. México 2006. Editorial Reverté S.A. – Barcelona.

PÁGINAS WEB

- <http://www.sciencedirect.com/science>
- http://193.43.36.125/XML_Output/1992/US/US92008.xml
- https://books.google.com.pe/books?id=A4FlhoNWTn8C&pg=PA141&lng=PA141&dq=valores+de+Vm+para+celulasa+km&source=bl&ots=fHrWopIuTu&sig=Lqz4GiuzJ3ILfL_4p4i27GvRDFk&hl=es-419&sa=X&ved=0CDcQ6AEwA2oVChMItSD37bJxwIVSXE-Ch2G7wPb#v=onepage&q=valores%20de%20Vm%20para%20celulasa%20km&f=false