



EL SABER DE MIS HIJOS  
HARÁ MI GRANDEZA

**UNIVERSIDAD DE SONORA**

---

---

**DIVISION DE INGENIERIA**

**DEPARTAMENTO DE INGENIERIA QUIMICA Y METALURGIA**

**ESTUDIO CINÉTICO DE LA HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DE TEJIDOS  
PRETRATADOS CON ÁCIDO SULFÚRICO DILUIDO DE *Cenchrus ciliaris***

**TESIS**

**Que para obtener el título de**

**INGENIERO QUIMICO**

**ESPECIALIDAD INGENIERIA DE PROCESOS**

**Presenta:**

**José Fernando Flores Yocupicio**

**Hermosillo, Sonora**

**Marzo del 2011**

# Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



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



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

**UNIVERSIDAD DE SONORA**  
**VOTOS APROBATORIOS**

Hermosillo, Sonora, a 23 de Marzo de 2011.

**M.C. JESÚS LEONEL SERVÍN RODRÍGUEZ**  
Jefe del Departamento  
Ingeniería Química y Metalurgia

Por medio de la presente, nos permitimos informarle que los miembros del Jurado designado para revisar la Tesis Profesional: "**Estudio Cinético de la Hidrólisis Enzimática de Tejidos Pretratados con Ácido Sulfúrico diluido de *Cenchrus ciliaris***", presentada por:

***JOSE FERNANDO FLORES YOCUPICIO***

La han revisado y cada uno de los integrantes da su **VOTO APROBATORIO** ya que cumple con los requisitos parciales para la obtención del Título de:

**Ingeniero Químico**

\_\_\_\_\_  
Fecha

\_\_\_\_\_  
**DR. ABRAHAM ROGELIO MARTÍN GARCÍA**

\_\_\_\_\_  
**M.C. ARTURO RUÍZ MANRÍQUEZ**

\_\_\_\_\_  
**DRA. MARÍA ESPERITA TRUJILLO CAMACHO**

\_\_\_\_\_  
**DR. FRANCISCO JAVIER ALMENDARIZ TAPIA**

## **Dedicatoria**

*A mi padre Fernando:*

*Por dar su vida por su familia, quiero que sepas que te llevare por siempre tu ejemplo de vida en mi memoria y aunque ya no estés entre nosotros, tus enseñanzas, valores, y demás cualidades, han hecho de mí el hombre de bien el cual esperarías que llegara ser.*

*A mi Madre Ma. Dolores:*

*Gracias por darme la oportunidad de continuar con los estudios y por todo el amor que me has dado, además depositar tu confianza en mí, por lo cual te dedico este trabajo.*

*A mi hermano Daniel:*

*Gracias por ser un amigo y hermano a la vez, en el cual puedo apoyarme en cualquier momento.*

*A toda mi familia y amigos:*

*Abuelos, tíos, tías ,primos y amigos: los cual tuvieron una aportación, en la cual me enriquecieron como ser humano.*

## **Agradecimientos**

*Agradezco al Dr. Abraham Rogelio Martín García, por compartir sus conocimientos, e inestimable ayuda durante la realización de esta investigación, así como su tiempo y estímulos.*

*A la Universidad de Sonora por darme la oportunidad de estudiar la licenciatura de Ingeniería Química donde, en donde obtuve grandes experiencias que me ayudaran para la realización como ser humano.*

*A todos los profesores que tuve durante toda la etapa universitaria, en la cual compartieron sus conocimientos, consejos y que me fueron formando.*

*A todos mis compañeros y amigos, que fueron un gran apoyo para la culminación de mis estudios, en donde me brindaron diferentes valores y compartí grandes experiencias.*

*A toda mi familia, especialmente a mi Tia Lidia por brindarme su casa y soportarme durante todo este tiempo.*

## Índice

Índice.....	i
Lista de Figuras.....	ii
Lista de Tablas.....	iii
1 Introducción.....	1
1.1 Etanol como combustible.....	2
1.2 Procesos de obtención de etanol.....	3
1.3 Hidrólisis enzimática en la producción de etanol.....	7
2 Objetivos.....	9
2.1 Objetivo general.....	9
2.1.1 Objetivos particulares.....	9
3 Revisión Bibliográfica.....	10
3.1 Enzima.....	10
3.2 Actividad catalítica de las enzimas.....	12
3.2.1 Factores que influyen en la velocidad de las reacciones enzimáticas	12
3.3 Celulasas.....	13
3.3.1 Fuentes de celulasa.....	14
3.4 Naturaleza de los tejidos pretratados de <i>Cenchrus ciliaris</i> .....	15
3.4.1 Composición de <i>Cenchrus ciliaris</i> .....	15
3.4.2 Composición de los tejidos pretratados de <i>Cenchrus ciliaris</i> .....	17
4 Marco Teórico.....	18
4.1 Cinética enzimática homogénea.....	18
4.1.1 Mecanismo de reacción.....	20
4.1.2 Determinación de los parámetros enzimáticos por la grafica de Lineweaver-Burk.....	23
4.2 Cinética enzimática heterogénea.....	24
4.2.1 Mecanismo de reacción.....	24
4.2.2 Determinación de los parámetros enzimáticos.....	25
5 Materiales y Métodos.....	27

5.1	Naturaleza de los tejidos pretratados de <i>Cenchrus ciliaris</i> .....	27
5.2	Enzima utilizada .....	27
5.3	Diseño experimental.....	27
5.4	Análisis de las muestras por HPLC .....	29
6	Resultados .....	31
6.1	Curva de calibración de glucosa .....	31
6.2	Resultados experimentales .....	32
6.3	Calculo de velocidades de reacción .....	36
6.4	Calculo de los parámetros enzimáticos .....	36
7	Conclusiones.....	40
8	Referencias .....	41

### Lista de Figuras

Figura 1-1:	Diagrama de flujo en la producción de etanol. ....	4
Figura 3-1:	Estructura molecular de la celulosa.....	16
Figura 4-1:	Cambio de concentración del producto en función de tiempo. ....	19
Figura 4-2:	Rapidez de la reacción en función de la concentración de la enzima. .....	20
Figura 4-3:	Rapidez inicial de la reacción en función de la concentración de substrato.....	21
Figura 4-4:	Grafica de Lineweaver-Burk.....	24
Figura 5-1:	Diagrama de flujo del diseño experimental. ....	30
Figura 6-1:	Grafica de curva de calibración .....	32
Figura 6-2:	Producción de glucosa a 40°C, pH 4.5, a 0.2 g/l.....	33
Figura 6-3:	Producción de glucosa a 40°C, pH 4.5, a 0.4 g/l.....	34
Figura 6-4:	Producción de glucosa a 40°C, pH 4.5, a 0.8 g/l.....	34
Figura 6-5:	Producción de glucosa a 40°C, pH 4.5, a 1.6 g/l.....	35
Figura 6-6:	Producción de glucosa a 40°C, pH 4.5, a 3.2 g/l.....	35
Figura 6-7:	Velocidad de reacción (v) en función de concentración de enzima (E). .....	36

Figura 6-8: Grafica de inversa de velocidad de reacción en función de inversa de concentración de enzima.....	37
Figura 6-9: Descripción de datos experimentales por $V_{max}=0.0307$ y $K_m=2.903$ .	38
Figura 6-10: Descripción de datos experimentales por $V_{max}=0.0185$ y $K_m=1.3975$ .....	39

### Lista de Tablas

Tabla 1-I: Diferentes materias primas para la obtención de bioetanol.....	3
Tabla 1-II: Producción mundial de alcohol etílico (2004). .....	6
Tabla 3-I: Composición química del <i>Cenchrus ciliaris</i> . .....	16
Tabla 3-II: Composición de los tejidos pretratados de <i>Cenchrus ciliaris</i> .....	17
Tabla 6-I: Concentración de glucosa. ....	31
Tabla 6-II: Concentración de enzima y velocidad de reacción. ....	36

# 1 Introducción

Actualmente estamos viviendo de manera acelerada, donde los patrones de consumo de combustibles fósiles se están reduciendo drásticamente los recursos naturales con los que se cuenta y emitiendo grandes cantidades de emisiones a la atmosfera, lo que conlleva a una problemática ambiental, por cual motivo fuentes alternativas de energía están siendo estudiadas. En el caso del sector de consumo de energía para transportación, el bioetanol está siendo utilizado para los automotores que habitualmente utilizan gasolina. La mayoría del bioetanol que actualmente se usa en los automotores, proviene de productos relacionados con la alimentación humana (maíz, caña de azúcar); lo cual hace polémico su uso. A manera de resolver esta problemática y a la vez utilizar las características ambientales favorables de este combustible alternativo; Bioetanol está siendo obtenido de biomasa, que el humano no utiliza como alimento. La biomasa lignocelulósica utilizada está compuesta de Hemicelulosa, Celulosa y Lignina. En la producción de bioetanol con material lignocelulósicos es necesario primeramente hidrolizar la hemicelulosa, generalmente por medio de hidrólisis acida, y después hidrolizar la celulosa, generalmente por hidrólisis enzimática, para posteriormente realizar la fermentación y destilación.

Bajo esta línea de investigación, se realizó un proyecto de tesis de licenciatura titulado “**Producción de etanol a partir de Buffel**” por Torrecano Alvarez (2009); en dicho trabajo se caracterizó la fermentación de los azucares obtenidos por el pretratamiento con ácido sulfúrico diluido de Buffel (*Cenchrus ciliaris*); posteriormente, se hizo un proyecto de maestría, obteniendo la tesis “**Estudio cinético de la formación de xilosa por hidrólisis con ácido sulfúrico diluido de *Cenchrus ciliaris***” por Encinas Soto (2010). Este último trabajo mostró que bajo las condiciones de temperatura de 135°C y tiempo de reacción de 1 hora, utilizando ácido sulfúrico 0.15 M, la hemicelulosa es hidrolizado en un 95%. Durante este proceso se obtiene como producto; glucosa, xilosa y arabinosa en solución y el tejido de *Cenchrus ciliaris* pretratado

con la celulosa susceptible a la acción enzimática. Esta investigación fue dirigida al estudio de la hidrólisis enzimática de la celulosa. Desde el punto de vista operacional esta etapa plantea dos interrogantes:

1. Relación de la cantidad de tejidos pretratados a la cantidad de celulasas agregadas.
2. Actividad de las celulasas en el efluente producto del pretratamiento.

Los puntos mencionados anteriormente fueron los objetivos a lograr como producto de esta investigación.

### **1.1 Etanol como combustible**

El etanol, ofrece grandes ventajas como combustible en términos de almacenaje, entrega, y compatibilidad infraestructural, lo cual podría ser una gran oportunidad para motores de combustión interna por su alto rendimiento. Sin embargo, como es una importante materia prima para la industria (química, farmacéutica) juega un papel muy importante en la preparación de carburantes para vehículos automotores. El etanol como combustible aumenta el índice de octano, necesario para reducir el consumo y las emisiones de monóxido de carbono e hidrocarburos de un 10 al 15% [1]. La mayor parte de etanol, que actualmente se produce para la utilización en los automotores proviene de productos relacionados con la alimentación humana (maíz, caña de azúcar). En la Tabla 1-I se muestran las diferentes materias primas para la obtención de etanol con su relación de emisiones emitidas.

La sustentabilidad que ofrece el etanol como combustible, radica en que puede ser utilizado en vehículos con motores de combustión interna no modificados (los cuales están garantizados para utilizarse con mezclas bajas de etanol), motores flexibles de combustión interna (capaces de usar etanol, metanol, y gasolina en cualquier proporción), motores encendidos por compresión, motores

de combustión interna especializados (optimizados para aprovechar las características particulares de los alcoholes), y celdas de combustible [2].

**Tabla 1-I:** Diferentes materias primas para la obtención de bioetanol.

<i>Materia prima</i>	<i>Relación de energía</i>	<i>Emisiones evitadas</i>
Caña de azúcar	9.3	89%
Maíz	0.6 - 2.0	- 30% a 38%
Trigo	0.97 - 1.11	19 a 47%
Remolacha	1.2 - 1.8	35 a 56%
Mandioca	1.6 – 1.8	63%
Residuos lignocelulósicos	8.3 – 8.4	66 a 73%

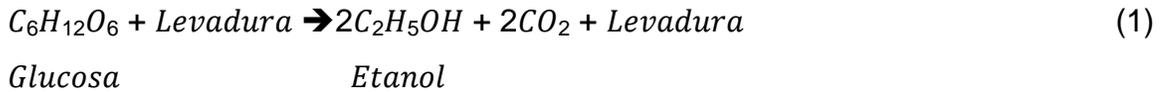
Fuente: [3]

Una aplicación importante del etanol, es el uso como aditivo para oxigenar la gasolina estándar, como reemplazo para el metil ter-butil éter (MTBE), el cual es un producto con el que se reformula la gasolina, permitiendo reducir las emisiones de CO<sub>2</sub>. Esta acción es muy importante ya que el MTBE, siendo un compuesto estable, de baja degradación y soluble en agua, se convirtió en un contaminante de aguas subterráneas, y a su vez, es clasificado como un potencial carcinógeno [1].

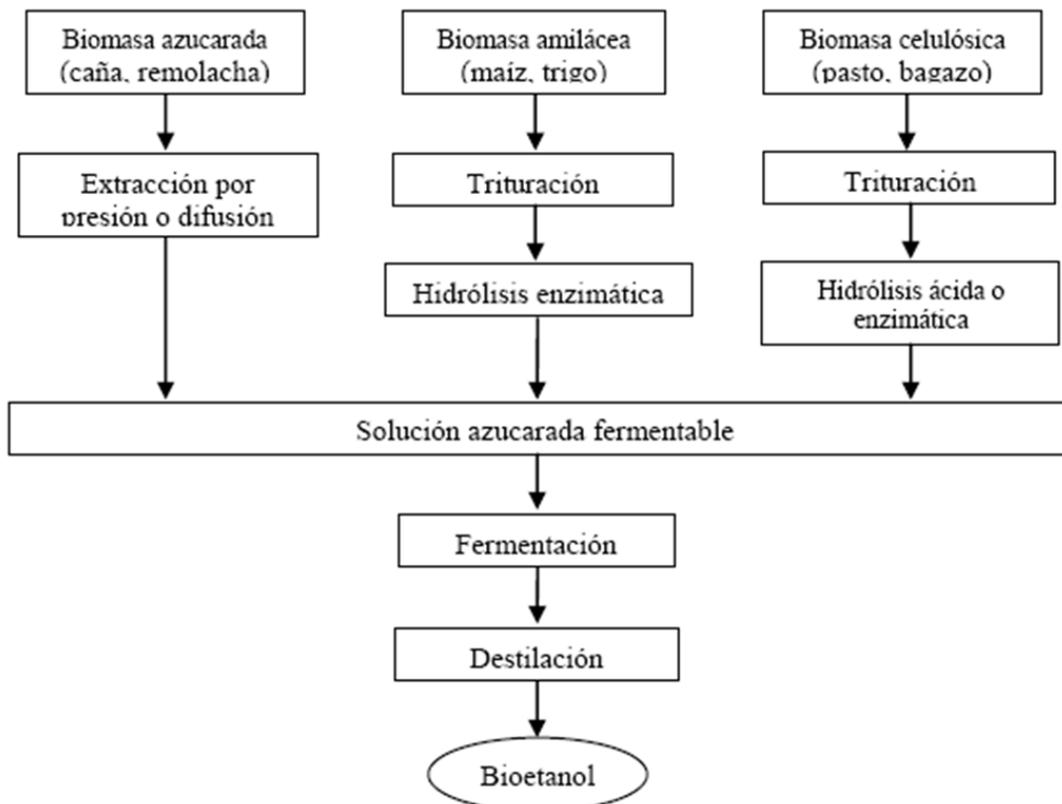
## 1.2 Procesos de obtención de etanol

El etanol se obtiene, principalmente, al tratar etileno con ácido sulfúrico concentrado y sometiéndolo a una posterior hidrólisis, pero de una manera natural, es obtenido a través de fermentación, por medio de levaduras a partir de materias primas que son ricas en carbohidratos. Las principales materias primas para la producción de etanol son aquellas que contengan un alto contenido de

sacarosa, almidón o celulosa. La fermentación alcohólica es un proceso bioquímico que permite convertir azúcares en alcohol y dióxido de carbono. La conversión se representa mediante la reacción:



Las principales responsables de esta transformación son las levaduras. La levadura fermenta el azúcar en alcohol y en dióxido de carbono, solo en la ausencia de aire, pero necesita oxígeno para crecer. Éstas levaduras produce alcohol etílico y dióxido de carbono de azúcares simples como la glucosa y la fructosa. *Saccharomyces cerevisiae*, es la especie de levadura usada con más frecuencia. En condiciones donde exista un exceso de oxígeno, el alcohol puede ser oxidado y convertido en ácido acético [4].



**Figura 1-1:** Diagrama de flujo en la producción de etanol.

El producto de la fermentación se somete a un proceso de purificación. Para poder utilizar el etanol como combustible mezclado con gasolina, es necesario eliminar el agua hasta alcanzar una pureza del 99.5 al 99.9% v/v. Tradicionalmente, la separación del sistema etanol-agua se hace con destilación azeotrópica, usando benceno, pentano o dietil éter como solvente, o mediante destilación extractiva empleando etilenglicol o gasolina [4].

Existe un gran interés en el empleo de enzimas para la degradación previa de la celulosa y su posterior uso en procesos de fermentación productores de etanol. Los problemas que en este momento limitan estas aplicaciones provienen de la disposición estructural de la celulosa, es su estado nativo [5]. La caña de azúcar constituye uno de las principales fuentes posibles para la producción de proteína unicelular derivada de la fermentación del azúcar y demás subproductos. El etanol es producido por la fermentación de mieles cuando se emplea levaduras en condiciones anaeróbicas, y cuando es factible producir proteína microbiana a partir de etanol.

La celulosa, sin duda, es el material orgánico más abundante en la tierra, renovable por naturaleza y de la cual se puede obtener muy diversos productos. Como compuesto primario de la naturaleza, y en muchos casos considerado desperdicio, su utilización presenta ventajas económicas y ecológicas. Los llamados desperdicios celulósicos comprenden:

- Desperdicios agrícolas (paja, bagazo, olotes, hojas, etc.)
- Desperdicios del procesamiento de alimentos (cascaras de frutas, pulpas, pedazos de vegetales, etc.)
- Desperdicios de madera (aserrín, cortezas, astillas, etc.) y desperdicios municipales (40% a 60% de los desperdicios en la basura son papel)

Todos los residuos celulósicos están formados por tres componentes principales: celulosa, hemicelulosa, y lignina asociada a pequeñas cantidades de

resinas, gomas, proteínas, grasa y minerales [6]. La producción mundial de etanol en 2004 fue de cerca de 41000 millones de litros. En promedio, el 73% del etanol producido mundialmente corresponde a alcohol carburante, el 17% a alcohol para bebidas y el 10% es alcohol industrial. Los datos para el alcohol carburante tomados de diversas fuentes indican que Brasil y EEUU contabilizan el 73% de la producción mundial (12600 y 10666 millones en 2003, respectivamente) aunque este porcentaje está cambiando constantemente debido a la dinámica del mercado mundial de este biocombustible [7].

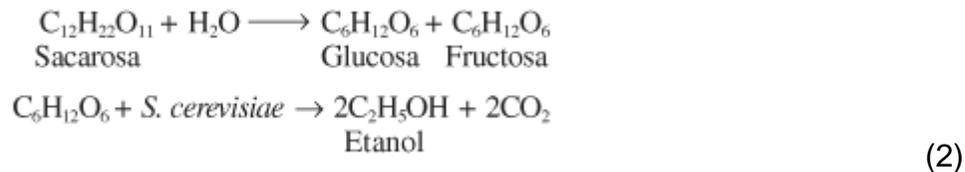
**Tabla 1-II:** Producción mundial de alcohol etílico (2004).

<i><b>País</b></i>	<i><b>Millones de litros</b></i>
Brasil	15098.37
EEUU	13379.98
China	3648.74
India	1748.67
Francia	828.91
Rusia	749
Sur África	416.35
Reino Unido	401.21
Arabia	299.01
Saudita	
España	299.01
<b>Total</b>	<b>40764.45</b>

Fuente: [7]

La principal materia prima para la producción de etanol es la caña de azúcar, ya sea en forma de jugo de caña o como melazas (subproducto de la industria

azucarera). Se pueden obtener cerca de 70 L de etanol por tonelada de caña y 9 L de etanol por tonelada de melazas, además de cerca de 100 kg de azúcar. Para efectos de costeo, se debe esperar un rendimiento de 58 galones de etanol a partir de 1 ton de melazas que contengan un 46% de azúcares. El microorganismo más utilizado es *Saccharomyces cerevisiae* por su capacidad de hidrolizar la sacarosa de la caña de azúcar para su conversión hasta glucosa y fructosa, dos hexosas fácilmente asimilables; además puede desarrollarse en condiciones anaeróbicas, pero se necesitan pequeñas cantidades de O<sub>2</sub> para la síntesis de sustancias como ácidos grasos y esteroides. La reacción general de la fermentación se puede representar como:



La fermentación alcohólica puede llevarse a cabo por lotes alimentados o en forma continua. El proceso típico de producción de alcohol por lotes a partir de melazas o jugo de caña (denominado proceso Melle-Boinot), comprende la esterilización de la materia prima seguida del ajuste del pH con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y de los °Brix a valores de 14-22. El mosto obtenido se somete a fermentación. El vino resultante se decanta y centrifuga para recuperar el etanol, mientras la levadura se recircula a los fermentadores. Para la obtención de alcohol anhidro se utiliza mayoritariamente la destilación azeotrópica con benceno. [7]

### 1.3 Hidrólisis enzimática en la producción de etanol

Se entiende por hidrólisis enzimática la hidrólisis que se produce mediante un grupo de enzimas llamadas hidrolasas. Estas enzimas ejercen un efecto catalítico hidrolizante, en todos aquellos enlaces que fueron formados por la liberación de una molécula de agua. Los constituyentes de la materia prima para producir etanol (biomasa) son principalmente celulosa, hemicelulosa y lignina.

Siendo la celulosa y la hemicelulosa formadas por la reacción de un grupo OH con un grupo aldehído (R-CO-H) o un grupo cetona (R-CO-R), con la liberación de una molécula de agua. Siendo de esta manera, estas sustancias susceptibles de ser degradadas por enzimas hidrolíticas. La aplicación de enzimas hidrolíticas en la producción de etanol consiste en el uso de hemicelulasas y celulasas. Con la finalidad de degradar hemicelulosa, producir carbohidratos de 5 y 6 carbonos y liberar celulosa se utilizan las hemicelulasas. Las celulasas se emplean con la finalidad de degradar celulosa y producir glucosa [8]. Menon y colaboradores en 2010 [9] utilizaron xiloglucanasas para obtener carbohidratos de tejidos de tamarindo, obteniendo conversiones en el rango de 55 a 78% a 50°C y 50 horas. Wan y Li, en 2010 [10] demostraron que la lignina de los residuos de maíz puede ser hidrolizada por enzimas producidas de *Cerioposipsis subvermispota*, permitiendo en pasos posteriores obtener conversiones de glucosa de 57% a 66%. Duan, Prakash y colaboradores en 2010 [11] utilizaron xilanasas termoestables para hidrolizar la hemicelulasas de residuos agrícolas. Ellos encontraron que a 60 % al 50% de la hemicelulasas de trigo fue hidrolizado a 50°C. Person y colaboradores en 2009 [12], utilizaron celulasas para hidrolizar la paja de trigo y centeno obteniendo de 80% a 90% de conversión después de 72 horas. Karin y colaboradores en 2008 [13] reportaron el uso de celulasas de *Trichoderma reesei* en el rango de 45 a 50°C en el proceso de fermentación y sacarificación secundarias.

## 2 Objetivos

### 2.1 Objetivo general

Estudio cinético de la hidrólisis enzimática de tejidos pretratados con ácido sulfúrico diluido de *Cenchrus ciliaris*

#### 2.1.1 Objetivos particulares

1. Determinar la relación cantidad de sólidos agregados a cantidad de celulasas agregadas
2. Determinar la unidad de actividad de la enzima celulasa de *Aspergillus niger* en el efluente producto del pretratamiento.

### 3 Revisión Bibliográfica

#### 3.1 Enzima

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

- La sustancia sobre la que actúa la enzima se llama sustrato.
- El sustrato se une a una región concreta de la enzima, llamada centro activo. El centro activo comprende de (1) un sitio de unión formado por los aminoácidos que están en contacto directo con el sustrato y (2) un sitio catalítico, formado por los aminoácidos directamente implicados en el mecanismo de la reacción
- Una vez formados y liberados los productos la enzima puede comenzar un nuevo ciclo de reacción

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

- Alto poder catalítico; se logra un aumento de hasta  $10^9$  a  $10^{12}$  en la rapidez sobre la actividad no enzimática

- En tanto que las enzimas individuales tiene una alta especificidad por su sustrato, las enzimas, como un todo, tienen un intervalo amplio de actividad.
- Las reacciones se pueden realizar en condiciones moderadas de pH, temperatura y presión.
- Se puede crear un centro quiral dentro de un centro proquiral.

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

Ellas son:

➤ *Carbohidrasas*

- $\alpha$ -amilasa
- $\beta$ -amilasa
- Gluco-amilasa
- Invertasa

➤ *Proteasas*

- Proteasas en general (obtenidas de hongo/bacterias)
- Pancretina
- Renina
- Pepsina
- Papaína

➤ *Lipasas*

- Lipasas

➤ *Otras*

- Glucosasa isómera
- Glucosasa oxidasa
- Pectinasas

Las mayorías de las enzimas usadas industrialmente son hidrolasas (85 % del total); el 15% restante se divide entre oxidorreductasas e isomerasas. De las hidrolasas, 70% hidrolizan proteínas, 26% hidrolizan carbohidratos y 4% hidrolizan lípidos [14].

### 3.2 Actividad catalítica de las enzimas

La Comisión sobre Enzimas ha definido una unidad internacional de la actividad enzimática, el katal, el cual es la cantidad de enzima que transforma un mol de sustrato por segundo bajo condiciones experimentales estándar. Esta es una unidad de valor elevado: por ello se utiliza más corrientemente submúltiplos de ella; microkatal ( $\mu\text{kat}$ ) [15].

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

Otra característica importante que tiene las enzimas es su capacidad para funcionar como catalizadores en un intervalo moderado de temperaturas ( $\sim 300$  K), pH (2-10) y presión ( $\sim 1$  atm.). Otra propiedad importante de las enzimas es que, a diferencia de la catálisis química, su actividad a menudo se puede regularse mediante iones o moléculas pequeñas [15].

#### 3.2.1 Factores que influyen en la velocidad de las reacciones enzimáticas

*Temperatura:* Un aumento en la temperatura provoca un aumento de la velocidad de reacción hasta cierta temperatura óptima, ya que después de aproximadamente  $45^\circ\text{C}$  se comienza a producir la desnaturalización térmica. Las enzimas de muchos mamíferos tienen una temperatura óptima de  $37^\circ\text{C}$ , 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  $0^\circ\text{C}$ .

*Efecto Del pH Sobre La Actividad Enzimática:* El pH modifica la concentración de protones; estos además de alterar la estructura de la enzima y el sustrato, pueden participar también en la reacción como sustrato o producto. En esos casos, la concentración de protones afecta directamente la velocidad de la reacción. Cualquier cambio brusco de pH, sabiendo que las enzimas son proteínas, puede alterar el carácter iónico de los grupos amino y carboxilo en la superficie proteica, afectando así las propiedades catalíticas de una enzima. A pH alto o bajo se puede producir la desnaturalización de la enzima y en consecuencia su inactivación. [15].

### **3.3 Celulasas**

El término celulasas involucra un complejo de por lo menos tres actividades diferentes, las que a su vez existen en una multiplicidad de formas para llevar a cabo la hidrólisis total de la celulosa. De esta manera las endo- $\beta$ -1,4-glucanasas rompen al azar los enlaces internos de la molécula en las regiones amorfas, producen un rápido decremento en la longitud de la cadena y un lento incremento de los grupos reductores libres. Las exo- $\beta$ -1,4-glucanasas remueven unidades de glucosa o celobiosa a partir del extremo libre no reductor de la cadena de celulosa, dando como resultado un incremento rápido en los azúcares o grupos reductores y poco cambio en el tamaño del polímero. Finalmente la  $\beta$ -glucosidasa hidroliza la celobiosa producida por las actividades anteriores, dando como producto final la glucosa [16]. La degradación enzimática de la celulosa es un proceso complicado debido a la naturaleza del sustrato, ya que, en forma nativa la celulosa está compuesta por largas cadenas cristalinas unidas por puentes de hidrógeno. Estas fibras están cubiertas por una matriz de hemicelulosa y lignina lo que reduce su accesibilidad a los enzimas celulolíticos. Los microorganismos que degradan la celulosa poseen un sistema enzimático con una variedad de enzimas, diferentes en cuanto a especificidad y modo de acción, los cuales actúan de manera sinérgica en la hidrólisis de

celulosa. La celulasa es un complejo enzimático, mezcladas por lo menos dos enzimas,  $C_1$  y  $C_x$  cuya función no está perfectamente definida. Kim desarrollo un modelo cinético basado en los siguientes postulados:

- a)  $C_1$  es una enzima que reduce las uniones entre las cadenas de celulosa abriendo la estructura cristalina y convirtiendo la celulosa cristalina en amorfa y/o reactiva.  $C_x$  (endo y exo- $\beta$ -glucanasas) hidrolizan la celulosa más reactiva eliminando las unidades de glucosa a partir de los extremos no reductores (exo) y por rompimiento aleatorio de las cadenas largas (endo).
- b)  $C_x$  actúa en la celulosa cristalina generando extremos libres, que son más susceptibles al ataque enzimático;  $C_1$  es una enzima que hidroliza los extremos reactivos de la celulosa producidos por la acción de  $C_x$ .
- c) Se considera que la solución de la enzima como de un solo componente y las distintas actividades catalíticas aparecen cuando la celulosa es adsorbida en diferentes porciones de la matriz de la celulosa. Se postula que la enzima que rompe las uniones cristalinas tiene una forma compleja de  $C_1 + C_x$  o  $C_1$  y  $C_x$  actúan en el ciclo de hidrólisis para producir azúcares reductores.

### 3.3.1 Fuentes de celulasa

Los microorganismos producen una amplia gama de enzimas útiles a nivel industrial, muchas de las cuales son segregadas al exterior celular. Estos microorganismos son capaces de desarrollarse fácil y rápidamente en su medio de cultivo cuya tecnología se encuentra hoy bien establecida. La optimización de la producción de enzimas a partir de microorganismo depende de una serie de factores interrelacionados, lo que significa que una enzima solo puede sintetizarse durante parte del crecimiento. Algunos microorganismos de importancia industrial empleados para la obtención de metabolitos son los correspondientes al género de Deuteromicetos (Deuteromicotina), entre los cuales están *Aspergillus Niger*, *Penicillium notatum-chrysogenum* y *Trichoderma viride* [17]. Las celulasas son de las enzimas que tiene una gran importancia por sus grandes aplicaciones que tiene dentro de la industria, como lo es en la

industria textil, en la industria de producción de detergente, la producción de alimentos y en la formulación de medicamentos. Las celulasas son producidas por una gran variedad de microorganismos entre los que se encuentran hongos y bacterias como lo es *Aspergillus niger* [18]. La mayoría de los microorganismos celulolíticos son capaces de producir tanto celulasas como xilanasas; sin embargo, algunos otros sólo producen celulasas o xilanasas. A partir de los estudios realizados tanto en hongos como bacterias se ha propuesto un modelo general de regulación controlado por dos mecanismos. Por un lado, la inducción que se lleva a cabo por sus sustratos naturales celulosa y xilan para las celulasas y xilanasas, respectivamente, y por otro la represión por fuentes de carbono de bajo peso molecular como glucosa y celobiosa para el caso de las celulasas, y xilosa, arabinosa o xilobiosa para las xilanasas.

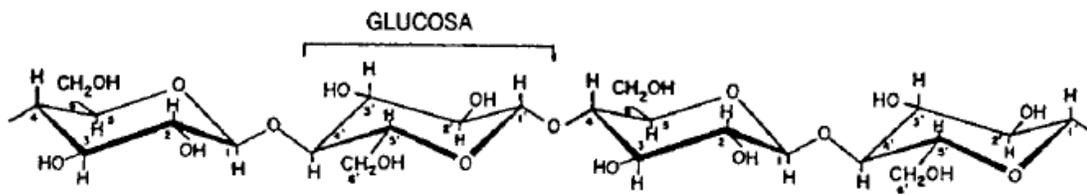
### **3.4 Naturaleza de los tejidos pretratados de *Cenchrus ciliaris***

Los tejidos de *Cenchrus ciliaris* fueron obtenidos en un trabajo de investigación previo sometiendo por un periodo de una hora, 10 gramos de *Cenchrus ciliaris*, de tamaño de partícula menor a 0.173 mm, en 1000 ml de ácido sulfúrico de concentración 0.15 M a 135 °C por un lapso de 60 minutos.

#### **3.4.1 Composición de *Cenchrus ciliaris***

El *Cenchrus ciliaris* es una planta perenne, crece en el verano y puede llegar a crecer hasta 150 cm de alto. Este zacate soporta desde climas sub-tropicales hasta regiones cálidas con veranos lluviosos y largas temporadas de sequía. *Cenchrus ciliaris* tiene como sus principales componentes celulosa (33.5% w/w), hemicelulosa (31.8% w/w) y lignina (5.3% w/w)[19].

**Celulosa:** su fórmula química es  $(C_6H_{10}O_5)_n$  puede contener grandes cadenas de la misma. La celulosa es rígida, insoluble en agua y contiene desde varios cientos hasta varios miles de unidades de glucosa.



**Figura 3-1:** Estructura molecular de la celulosa.

**Hemicelulosa:** es también un componente de las paredes de las células de las plantas. Su función es la de una sustancia de soporte y armadura, es decir, es la de unir la celulosa y la lignina.

**Lignina:** el papel de la lignina es cementar los polisacáridos de la pared vegetal y actuar como barrera de la degradación microbiana del material lignocelulósico. Después de la celulosa es la segunda sustancia orgánica más abundante en el planeta [8].

A continuación se muestra en la Tabla 3-1 la composición de *Cenchrus ciliaris* utilizado en el proceso de pretratamiento para obtener los tejidos utilizados en la presente investigación.

**Tabla 3-I:** Composición química del *Cenchrus ciliaris*.

<b>Componente</b>	<b>% En peso de materia seca</b>
Materia Orgánica	84.4
• Proteína cruda	10
• Fibra detergente neutra	74.54
○ Celulosa	35.5
○ Hemicelulosa	31.8
○ Lignina detergente ácido	5.3
○ Cenizas insolubles en ácido	2.1

Fuente: [19]

### 3.4.2 Composición de los tejidos pretratados de *Cenchrus ciliaris*

En el trabajo de maestría realizado previamente, donde se produjeron los tejidos utilizados se concluyó que como efecto de las condiciones de proceso, la totalidad de la hemicelulosa fue removida; asumiendo que el proceso aplicado fue específico para la hemicelulosa; la composición de los tejidos utilizados en el presente estudio es mostrada en la Tabla 3-II.

**Tabla 3-II:** Composición de los tejidos pretratados de *Cenchrus ciliaris*.

<b>Componente</b>	<b>% En peso de materia seca</b>
Materia Orgánica	77.23
• Proteína cruda	14.61
• Fibra detergente neutral	62.62
○ Celulosa	51.82
○ Hemicelulosa	0
○ Lignina detergente ácido	7.74
○ Cenizas insolubles en ácido	3.06

## 4 Marco Teórico

La hidrólisis de la celulosa puede ser catalizada eficazmente tanto por ácidos como por enzimas celulolíticas. El ácido puede introducirse profundamente en la estructura morfológica de la celulosa, debido al pequeño tamaño de las moléculas y llevar a cabo una reacción secuencial de pseudo primer orden. Los principales inconvenientes de este proceso son; el rendimiento relativamente bajo, la alta formación de subproductos y elevado consumo de energía.

La hidrólisis enzimática puede dar un producto puro con un rendimiento cuantitativo, consumiendo menos energía. Pero la enzima es una macromolécula, por lo que su acceso a la celulosa, en el substrato celulósico heterogéneo e insoluble, puede estar restringido por muchos factores que no interviene en la catálisis acida [8].

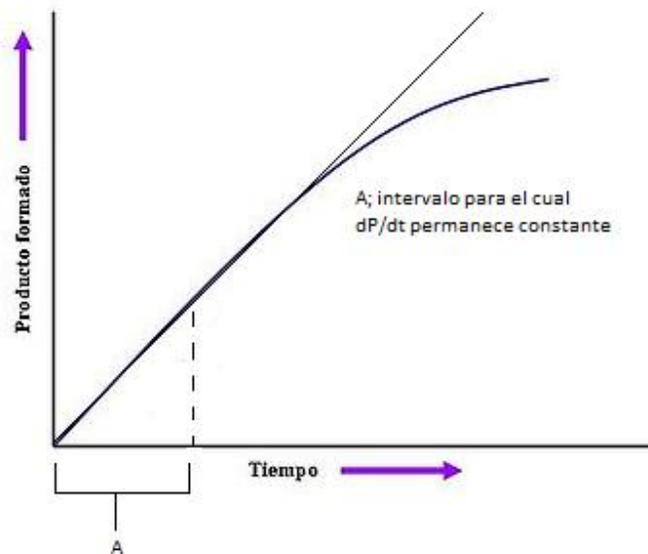
### 4.1 Cinética enzimática homogénea

El objetivo de la cinética enzimática es el estudio de las enzimas en su funcionamiento. Se propone, en particular, establecer las relaciones que existen entre la velocidad de la reacción enzimática y las concentraciones del substrato y de la enzima, así como la influencia de algunos factores: pH, temperatura, etc. [15].

La cinética enzimática simple se basa en tres principios experimentales:

- 1.- Que el substrato, S, forma un complejo intermediario enzima-substrato, ES, con la enzima, E.
- 2.- Que la rapidez de la reacción a tiempo,  $t$  (es decir, la rapidez de desaparición del substrato,  $-dS/dt$ , o bien, la rapidez de formación del producto,  $dP/dt$ ) se representa con la pendiente de la curva P o  $S=f(t)$ . Estas pendientes varían con el tiempo durante el curso de la reacción, debido a la desaparición del substrato (Figura 4-1). La mediciones

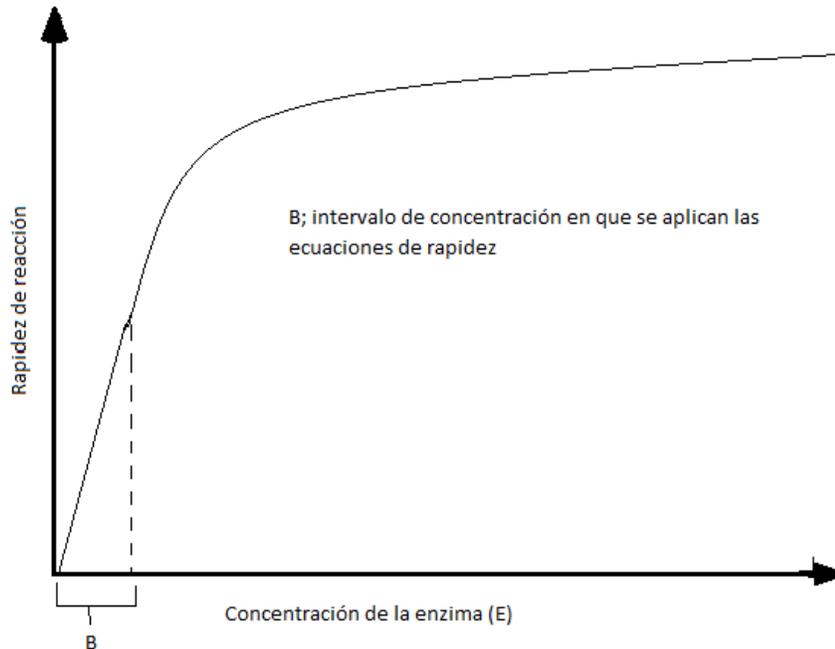
sintéticas de basan generalmente en la parte lineal de la curva, es decir, la velocidad inicial o la rapidez inicial de la reacción. En esta región es extremadamente pequeña la concentración del producto y, en consecuencia la descomposición del producto a substrato es insignificante (determinado por la constante de rapidez,  $K_2$ ) y se puede escribir:



**Figura 4-1:** Cambio de concentración del producto en función de tiempo.

3.-Para una concentración dada de substrato, la determinación de la variación en la rapidez de reacción como función de la concentración de la enzima no es lineal, sino hiperbólica (Figura 4-2). Esto se debe a que todo está formado por un complejo enzimático enzima substrato [ES] a altas concentraciones de la enzima. En consecuencia, la rapidez inicial de la reacción como función de la concentración de la enzima permanece

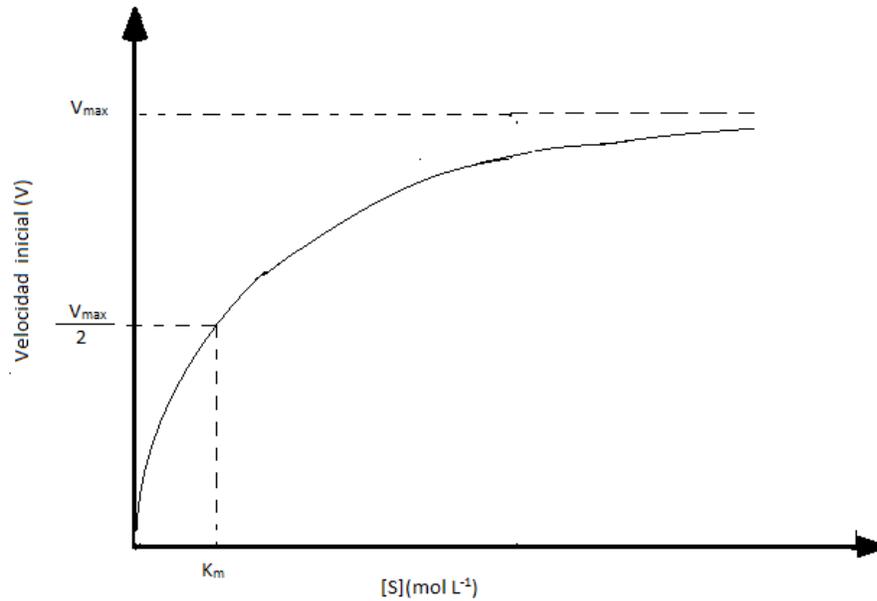
constante en estas condiciones. Para estudios cinéticos es necesario situarse en las condiciones que corresponden al principio de la curva, donde es lineal, es decir, a concentraciones bajas de enzimas. [15]



**Figura 4-2:** Rapidez de la reacción en función de la concentración de la enzima.

#### 4.1.1 Mecanismo de reacción

La cinética de Michaelis-Menten describe la velocidad de reacción de muchas reacciones enzimáticas. Su nombre es en honor a Leonor Michaelis y Maude Menten. Las reacciones catalizadas por enzimas exhiben cinética de saturación. A bajas concentraciones de sustrato, la velocidad de la reacción es proporcional a la concentración de sustrato y la reacción es de primer orden con respecto al sustrato. A medida que la concentración de sustrato aumenta, la rapidez de la reacción disminuye y ya no es proporcional a la concentración de sustrato; la reacción es de orden mixto. A concentraciones aún más altas la rapidez de reacción es constante e independiente de la concentración del sustrato, la reacción se vuelve de orden cero (Figura 4-3).



**Figura 4-3:** Rapidez inicial de la reacción en función de la concentración de sustrato.

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

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



Por lo tanto

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

$$[E] = [ES] \frac{k_{-1}}{k_1[S]} \quad (5)$$

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

$$E_T = [E] + [ES] \quad (6)$$

Sustituyendo ecuación 7 en la ecuación 6, se obtiene:

$$E_T = [ES] \left[ 1 + \frac{k_{-1}}{k_1[S]} \right] \quad (7)$$

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

$$V = \frac{k_3 E_T}{1 + \frac{k_{-1}}{k_1[S]}} = \frac{k_3 E_T [S]}{[S] + \frac{k_{-1}}{k_1}} \quad (8)$$

Esta ecuación relaciona la rapidez de reacción con la concentración total de la enzima,  $E_T$ , y la concentración de sustrato, S. los términos de rapidez  $k_1$ ,  $k_{-1}$ ,  $k_3$ , son constante y, por lo tanto, la relación de  $k_{-1}/k_1$  también lo es y puede representarse por el término  $K_m$ , la constante de Michaelis. Además  $k_3 E_T$  es la rapidez máxima de reacción y entonces, la expresión se puede escribir de la forma: [20]:

$$V = \frac{V_{max}[S]}{K_m + [S]} \quad (9)$$

#### 4.1.2 Determinación de los parámetros enzimáticos por la grafica de Lineweaver-Burk

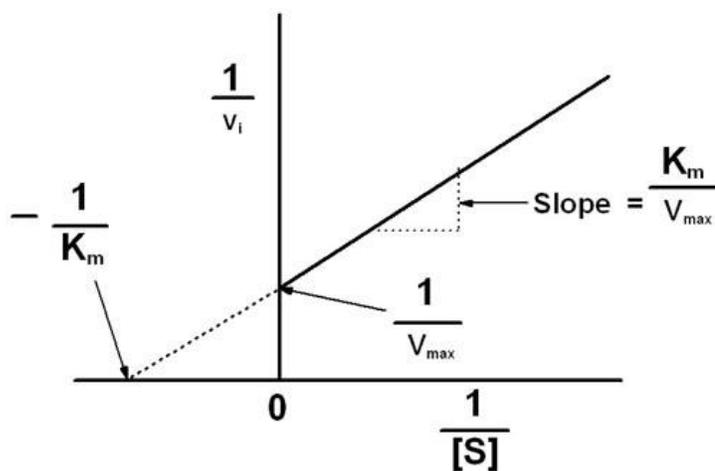
En una curva hiperbólica es difícil determinar con precisión  $V_{max}$  y, en consecuencia,  $K_m$ . Debido a esto se ha recurrido a muchas formas lineales de la ecuación de Michaelis- Menten, de las cuales la más popular es la gráfica de Lineweaver-Burk, la cual simplemente implica tomar los recíprocos de ambos lados de la expresión de la ecuación de Michaelis-Menten (9) de ambos lados de la expresión, como se muestra a continuación:

$$V = \frac{V_{max} [S]}{K_m + [S]} \quad (9)$$

Y los recíprocos de la ecuación de Michaelis- Menten

$$\frac{1}{V} = \frac{(K_m + [S])}{(V_{max} [S])} = \frac{K_m}{V_{max}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}} \quad (10)$$

Posteriormente se realiza la gráfica de  $1/V$  contra  $1/[S]$  produce una línea recta con una pendiente ,  $K_m/V_{max}$ , una ordenada al origen.  $1/ V_{max}$  y una ordenada sobre la abscisa de  $-1/ K_m$  (Figura 4-4). Por lo tanto, en dicha grafica  $K_m$  y  $V_{max}$  se pueden medir directamente [20].



**Figura 4-4:** Grafica de Lineweaver-Burk.

## 4.2 Cinética enzimática heterogénea

Como la catálisis es heterogénea, el catalizador se encuentra en una en una fase distinta a la fase de la mezcla de reacción. Para este tema de investigación el catalizador fue la celulasa; la cual es soluble en la solución donde se lleva a cabo la reacción y el sustrato se encuentra en estado sólido e insoluble en la solución. El punto de atención se concentró en la enzima (celulasas) que se encuentra en solución y el sustrato que se encuentra sólido, la celulosa de *Cenchrus ciliaris*. Las celulasas actúan sobre un medio porosos (*Cenchrus ciliaris*) en donde se puede llevar la ruptura de la glucosas polimerizada que forman la celulosa.

### 4.2.1 Mecanismo de reacción

Para desarrollar un modelo razonable para cinética heterogénea se opta por considerar lo siguiente: la enzima ahora absorbe en el sustrato. Dejando un sitio vacante en la superficie del sustrato (A), asumimos que el equilibrio es el siguiente [16]:



Si  $a_0$  es el número total de moles de los sitios de adsorción en la superficie del sustrato por unidad de volumen de la mezcla de la reacción, nos da:

$$a_0 = A + (EA) \quad (12)$$

Combinando esta ecuación con la relación de equilibrio para la adsorción de la enzima, obtenemos:

$$(EA) = \frac{a_0 E}{K_A + E} \quad (13)$$

Donde;

$$K_A = \frac{K_{des}}{K_{ads}} \quad (14)$$

#### 4.2.2 Determinación de los parámetros enzimáticos

De la ecuación 13 se deriva la siguiente ecuación al sustituir  $V_{max} = (E_0)(a_0)$  y  $K_m = K_A$ .

$$V = \frac{V_{max}(E)}{K_m + E} \quad (15)$$

Donde  $V$  es la velocidad de producción del producto,  $V_{max}$  es la máxima velocidad de producción del producto que se puede alcanzar en el sistema; la cual es alcanzada a valores determinados de temperatura y pH,  $E$  es la concentración de enzima y  $K_m$  es el valor de concentración de enzima en el cual se alcanza un medio de  $V_{max}$ .

Para calcular los parámetros cinéticos  $V_{max}$  y  $K_m$  la ecuación 17 es arreglada de la siguiente forma:

$$\frac{1}{V} = \left( \frac{K_m}{V_{max}} \right) \frac{1}{E} + \frac{1}{V_{max}} \quad (19)$$

Y se utiliza el siguiente procedimiento:

- 1) graficar el inverso de la velocidad de reacción contra el inverso concentración de enzima
- 2) Obtener intersección con eje y cuando  $x=0$
- 3) Sacar inverso de la cantidad obtenida en el paso 2 y obtener  $V_{max}$ .
- 4) Para calcular de  $K_m$  , multiplicar la pendiente por el valor de  $V_{max}$  obtenido en el paso 3.

## 5 Materiales y Métodos

Los tejidos de *Cenchrus ciliaris* utilizados en esta investigación fueron obtenidos por pretratamiento con  $H_2SO_4$  al 0.15 M, a 135°C, para eliminar la hemicelulosa. Con los tejidos obtenidos se realizaron ensayos de hidrólisis a temperatura de 40 °C y pH de 4.5, donde se evaluó la formación de glucosa utilizando celulasas de *Aspergillus niger*.

### 5.1 Naturaleza de los tejidos pretratados de *Cenchrus ciliaris*

Los tejidos de *Cenchrus ciliaris* fueron obtenidos en un trabajo de investigación previo donde tuvieron un pretratamiento con  $H_2SO_4$  al 0.15 M, a 135°C, por un periodo de una hora, para eliminar la hemicelulosa, de tamaño de partícula menor a 0.173 mm.

### 5.2 Enzima utilizada

En la presente investigación para lograr la hidrólisis de los tejidos pretratados de *Cenchrus ciliaris* fue utilizada celulasas producidas por *Aspergillus niger* obtenidas de USB Corporation (Cleveland, OH USA). La cual tiene como condiciones óptimas de pH 4.5 y Temperatura 40°C.

### 5.3 Diseño experimental

Para la realización de la experimentación del proyecto se utilizó el siguiente material:

Material

- Agitador magnético
- Reactor (Vaso con reflujo de agua para calentamiento de 1000 ml)
- Controlador de temperatura PolyScience modelo 210
- Potenciómetro y Termómetro digital OAKTON

- Placa agitadora magnética
- Vaso de precipitado de 100 ml
- Pipetas Volumétricas de 10 ml, 5 ml y 1 ml.
- Viales de 1 ml
- Matraz de 250 ml
- Balanza digital
- Agua desionizada
- Tejidos pretratados con ácido sulfúrico diluido de *Cenchrus ciliaris*
- Celulasas (USB Corporation (Cleveland, OH USA))
- Ácido sulfúrico diluido (0.15 M)
- Hidróxido de Sodio (8 M)
- Centrifuga
- Filtro Pall 0.45 $\mu$  nylon
- Jeringa de 1 ml

Para realización de los experimentos se siguió el siguiente procedimiento:

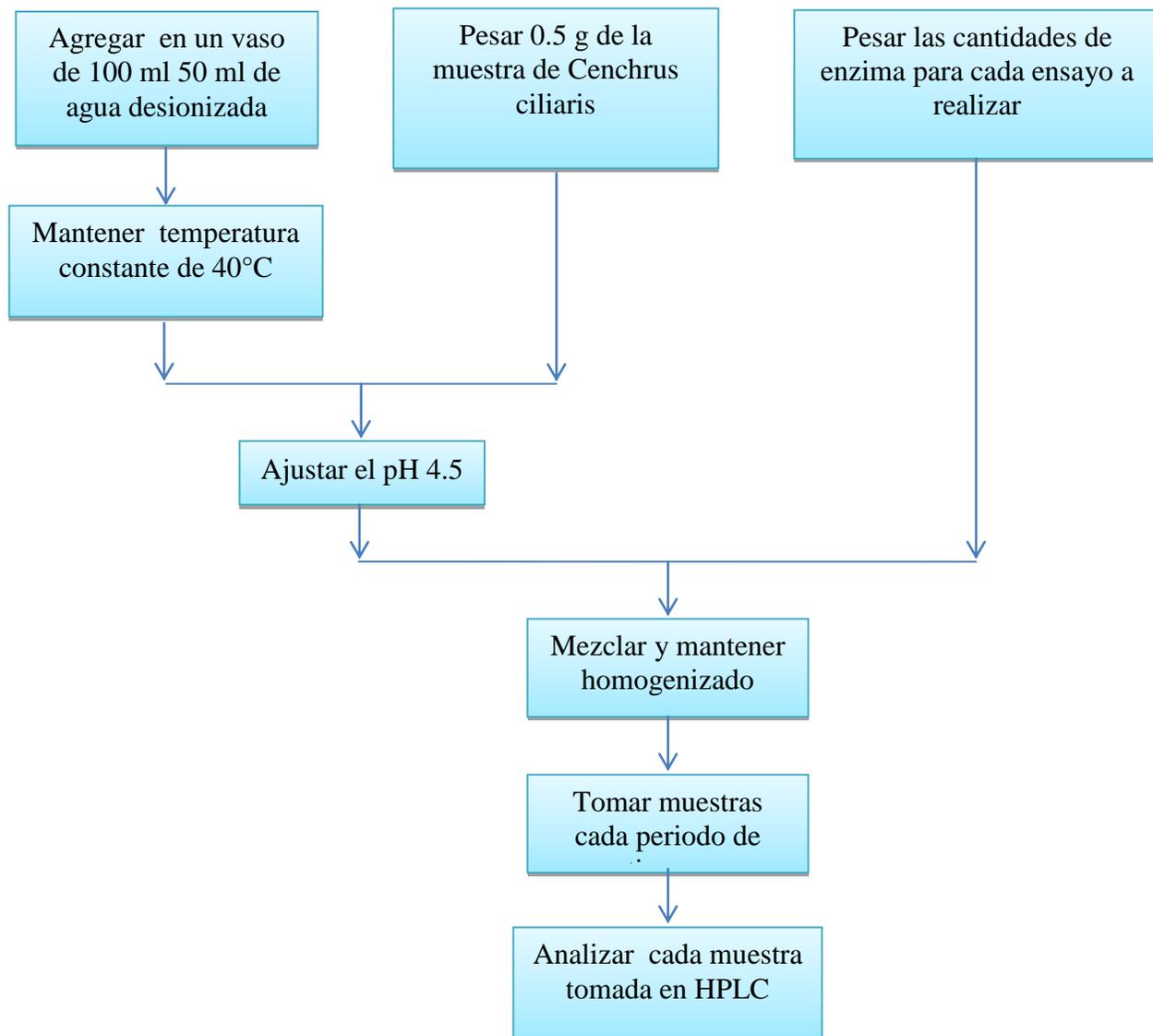
- En el vaso de precipitado de 100 ml se le adicionan 50 ml de agua desionizada.
- El vaso con 50 ml de agua desionizada se introdujo en el reactor (vaso con reflujo para calentamiento) hasta que llegue a una temperatura de 40°C.
- Medio gramo de *Cenchrus ciliaris* se colocó en el vaso de precipitado en cual ya se la había adiciona a los 50 ml de agua desionizada que se encontraba en el reactor a la temperatura adecuada.
- Cuando se encuentre la solución homogenizada se ajusta el pH con ácido sulfúrico diluido (0.15 M) e hidróxido de sodio al 8 M que se encontraba preparada previamente.

- Cuando la solución se encuentre a las condiciones adecuadas para la realización de la experimentación se pesa la celulosa deseada y se adiciona al reactor.
- Después de adicionar la celulosa se toma muestras de 1 ml a intervalos de tiempo razonables para determinar velocidad inicial de reacción.

#### **5.4 Análisis de las muestras por HPLC**

Una vez que se tomaron muestras de la experimentación se realiza el análisis por medio de HPLC y el procedimiento utilizado fue el siguiente:

- Las muestras en viales de 1.5 ml fueron centrifugadas por alrededor de 5 minutos para la eliminación de sólidos que se encuentran en la solución
- Después de centrifugar la solución es filtrada por un filtro Pall 0.45µ Nylon
- De la solución filtrada se toma aproximadamente 0.5 ml en la jeringa de 1 ml para ser inyectado al HPLC.
- Las condiciones y equipos de HPLC son
  - Bomba Prostar 220 operando a un flujo de 0.6 ml/min
  - Detector de índice de refracción Varian Star 9040 utilizando un factor de atenuación de  $256 \times 10^{-6}$  RIU/F.S a 35°C
  - La separación de los carbohidratos fue realizado por medio de una Columna BioRad Aminex 84P a temperatura de 85°C.
  - Tiempo de retención en el equipo HPLC fue de aproximadamente de 12 min.



**Figura 5-1:** Diagrama de flujo del diseño experimental.

## 6 Resultados

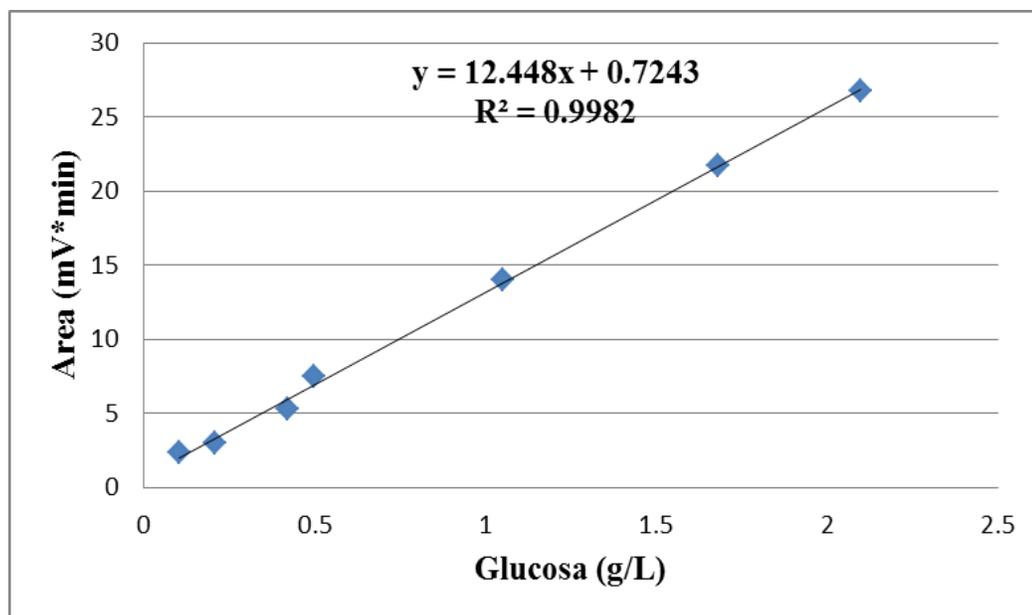
### 6.1 Curva de calibración de glucosa

Para determinar la curva de calibración se analizaron soluciones a concentraciones conocidas de estándares de glucosa; la cual presento la señal correspondiente a los 12 minutos. A continuación se muestra una tabla (Tabla 6-1) con las diferentes concentraciones utilizadas y con las diferentes áreas dada para cada uno de ellas.

**Tabla 6-I:** Concentración de glucosa.

<i>GLUCOSA (g/L)</i>	<i>Área (mV*min)</i>
2.1	26.7167678
1.68	21.695773
1.05	14.0386878
0.5	7.47508747
0.42	5.33294648
0.21	2.96475037
0.105	2.34391365

Los valores anteriores son graficados; lo cual nos da una curva de calibración como se muestra en la Figura 6-1.



**Figura 6-1:** Grafica de curva de calibración

En la gráfica se muestra la ecuación de la curva de calibración la cual es  $y=12.448x+0.7243$  y el coeficiente de correlación de 0.9982. De la cual es posible estimar la concentración de una muestra conociendo el área correspondiente a la muestra, el factor de dilución y mediante el uso de la siguiente formula:

$$Concentracion = FD \left( \frac{Area - 0.7243}{12448} \right) \quad (20)$$

Dónde:

FD; es el factor de dilución

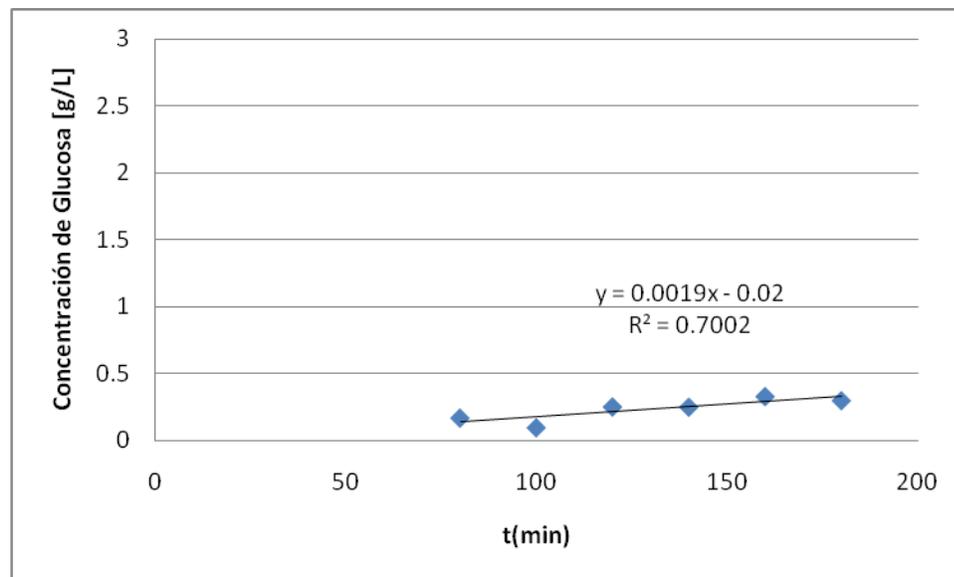
Área; es el área dada por la integración de la curva de análisis

## 6.2 Resultados experimentales

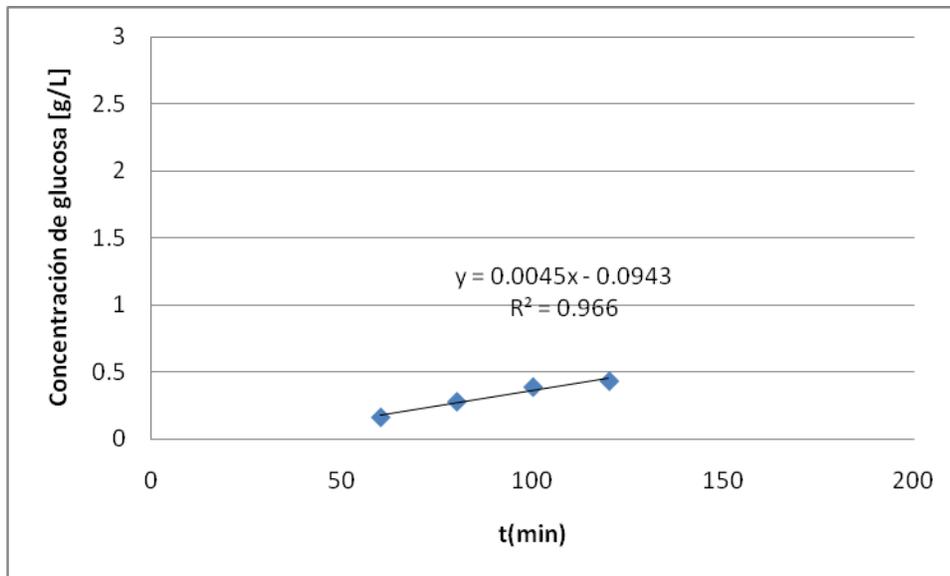
Se realizado la hidrólisis enzimática utilizando como substrato a *Cenchrus ciliaris* con un pretatamiento de ácido sulfúrico con una concentración de 0.15 M a 135°C y la misma cantidad para cada ensayo que es de 0.5 gramos en un

volumen, con celulasas de *Aspergillus niger* a diferentes concentraciones con agitación constante, controlando las variables de temperatura (40°C) y pH (4.5), en un tiempo de 2 horas y tomando muestras de 20 minutos o mayores.

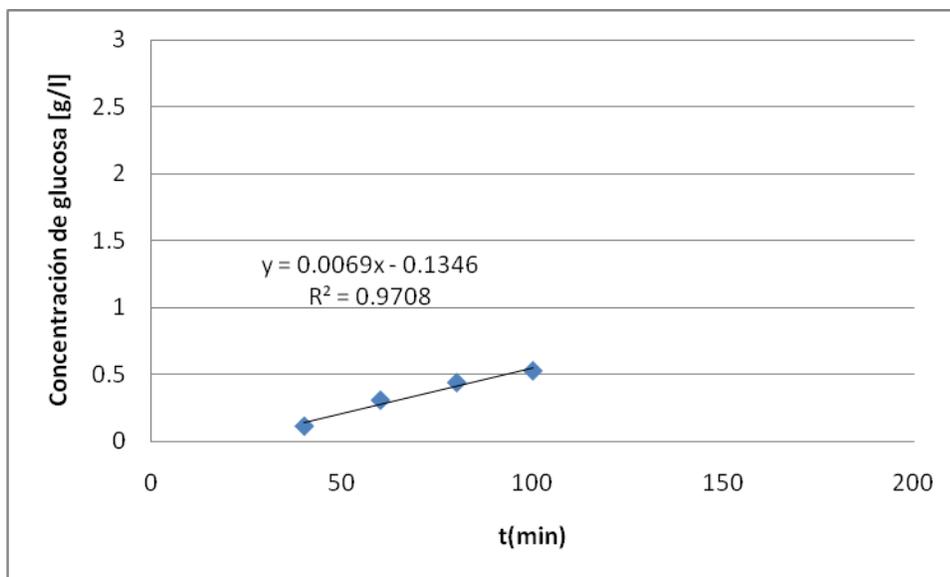
En la Figura 6-2 a 6-6 se muestra la producción de glucosas al poner en contacto de 0.5 gramos de tejidos de *Cenchrus ciliaris* en un volumen de 50 ml de solución a 40°C y pH 4.5 a diferentes relaciones de enzima-substrato que van desde 0.02 hasta 3.2 g/L.



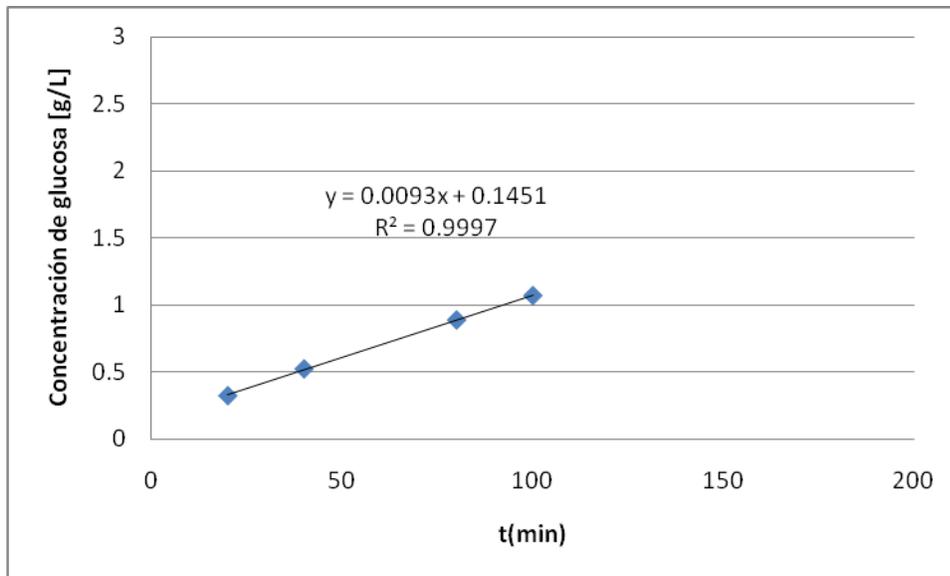
**Figura 6-2:** Producción de glucosa a 40°C, pH 4.5, a 0.2 g/l.



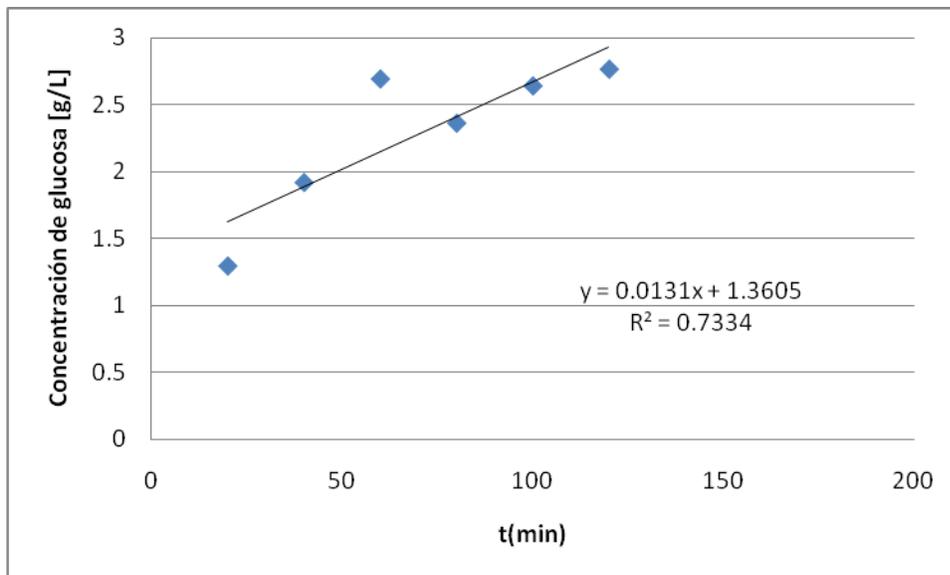
**Figura 6-3:** Producción de glucosa a 40°C, pH 4.5, a 0.4 g/l.



**Figura 6-4:** Producción de glucosa a 40°C, pH 4.5, a 0.8 g/l.



**Figura 6-5:** Producción de glucosa a 40°C, pH 4.5, a 1.6 g/l.



**Figura 6-6:** Producción de glucosa a 40°C, pH 4.5, a 3.2 g/l.

Considerando la cantidad de tejidos pre tratados agregados al reactor y su composición; la máxima concentración de glucosa esperada era de 5.2 g/L; la Figura 6-6 muestra una concentración máxima de 2.8 g/L a los 120 minutos; lo que equivale a una conversión aproximada de 53.84%.

### 6.3 Cálculo de velocidades de reacción

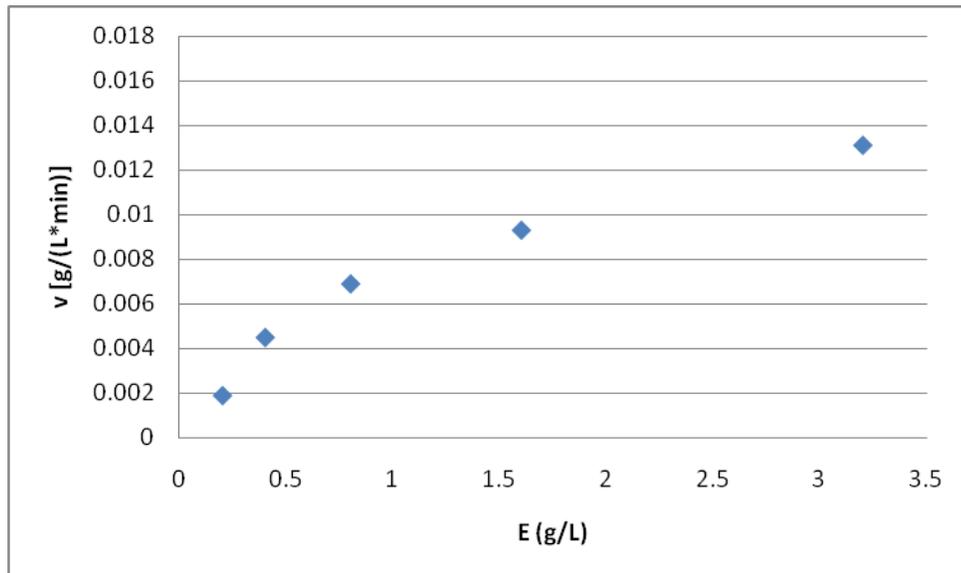
La velocidad de reacción se calculó con las pendientes de los datos mostrados en las Figuras 6-2 a 6-6.

**Tabla 6-II:** Concentración de enzima y velocidad de reacción.

ENZIMA (g/L)	$r$ (g/(L*min))
0.2	0.0019
0.4	0.0045
0.8	0.0069
1.6	0.0093
3.2	0.0131

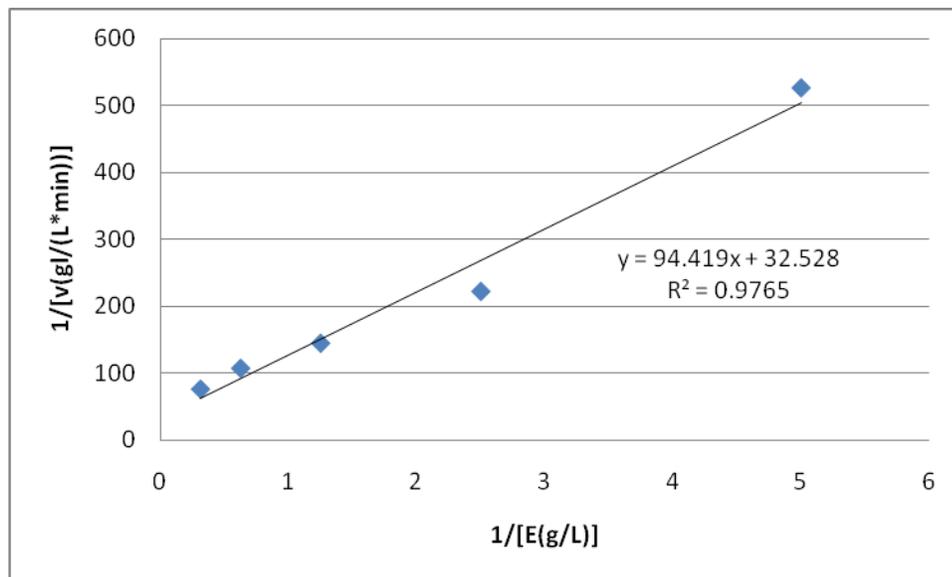
### 6.4 Cálculo de los parámetros enzimáticos

El cálculo de los valores de  $K_m$  y  $V_{max}$  fue realizado utilizando las ecuaciones 17 y 18. Un primer paso consiste en graficar la velocidad de reacción contra la concentración de enzima; lo cual es mostrado en la Figura 6-7.



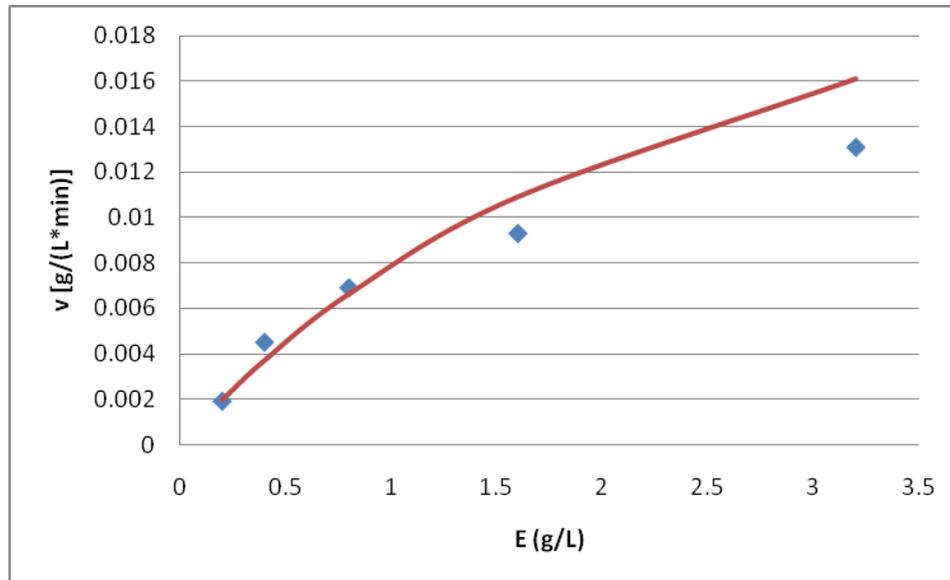
**Figura 6-7:** Velocidad de reacción ( $v$ ) en función de concentración de enzima ( $E$ ).

La grafica anterior muestra los datos experimentales obtenidos de la cual es posible obtener los parámetros cinéticos utilizando regresión no lineal; pero la metodología más utilizada para lograr este propósito es la descrita en la Sección 4.2.2. La Figura 6-8 muestra la aplicación de procedimiento de la sección 4.2.2.



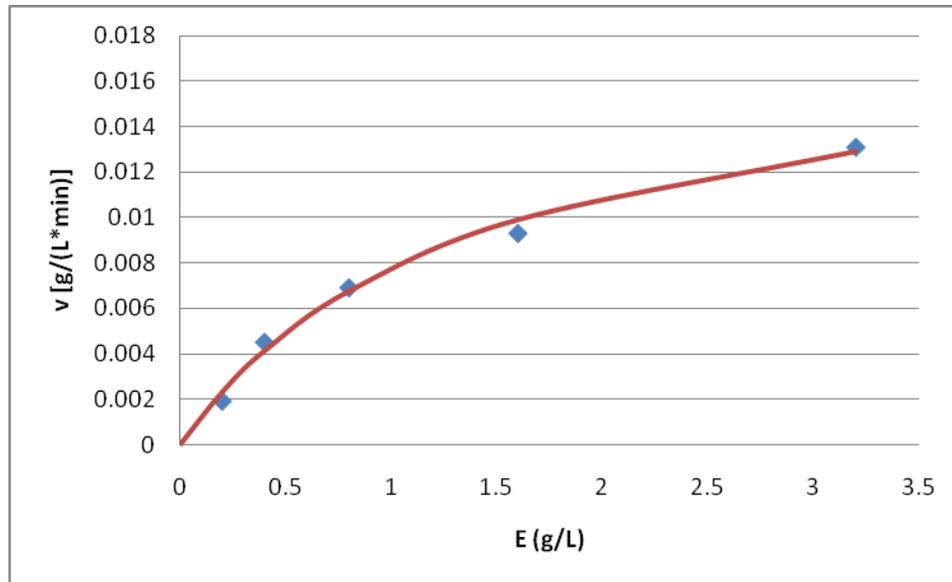
**Figura 6-8:** Grafica de inversa de velocidad de reacción en función de inversa de concentración de enzima.

De la grafica anterior se deduce que el valor de  $V_{\max}$  es  $1/32.528=0.03074274$ ; obteniéndose así  $V_{\max} = 0.0307 \text{ g/(L*min)}$ . Utilizando este valor y multiplicando por la pendiente de la recta de la Figura 4-7 se obtiene el valor de  $K_m$  de 2.902269921. De esta manera  $K_m$  es igual a 2.902 g/L. La forma en que los valores obtenidos de los parámetros cinéticos describen los resultados experimentales es mostrada en la Figura 6-9.



**Figura 6-9:** Descripción de datos experimentales por  $V_{\max}=0.0307$  y  $K_m=2.903$ .

Los valores de  $K_m$  y  $V_{\max}$  que fueron obtenidos utilizando una forma lineal del modelo. En dicho procedimiento, de acuerdo a los datos experimentales se obtienen valores inversos los cuales son de magnitud variante, esto conlleva a que los resultados arrojados, no describan de forma adecuada los datos. Una descripción más adecuada se obtiene al realizar una regresión no lineal y mínimos cuadrados; el procedimiento consiste en variar los valores de  $K_m$  y  $V_{\max}$  hasta que se obtenga un mínimo valor de la suma de las diferencias cuadradas de los datos experimentales y los datos dados por el modelo. Al aplicar este método se obtiene que  $K_m=1.39759930351448$  y  $V_{\max}=0.01853344$ . La forma en que estos valores describen los resultados experimentales es mostrada en la Figura 6-10.



**Figura 6-10:** Descripción de datos experimentales por  $V_{max}=0.0185$  y  $K_m=1.3975$ .

Por lo tanto es evidente que al usar el método de los inversos no se obtienen valores apropiados que describen los resultados experimentales; por lo tanto los valores que describen la cinética de la hidrólisis de la celulosa contenida en los tejidos pre tratados de *Cenchrus ciliaris* son  $K_m=1.397$  g/L y  $V_{max}=0.0185$  g/(L\*min).

## 7 Conclusiones

1.- La hidrólisis enzimática de los tejidos pretratados con ácido sulfúrica diluido de *Cenchrus ciliaris* obedece la cinética dada por el siguiente modelo:

$$V = \frac{V_{max}(E)}{K_m + E}$$

Con los valores de  $K_m = 1.397 \text{ g/L}$  y  $V_{max} = 0.0185 \text{ g/(L*min)}$  al realizar la hidrólisis a  $40^\circ\text{C}$  y pH de 4.5 utilizando celulasas de *Aspergillus niger*.

2.- La descripción de los resultados experimentales fue mejor al utilizar los valores de los parámetros obtenidos al aplicar regresión no lineal, que al utilizar los valores obtenidos linealizando la ecuación  $V = \frac{V_{max}(E)}{K_m + E}$

3.- La relación de solidos agregados a cantidad de celulasas que permite velocidades de producción de  $0.009 \text{ g/(L*min)}$ , lo cual equivale al 50% de la velocidad máxima, es de  $(0.5\text{g}/50\text{mL})/(1.397\text{g/L}) = 7.158$  gramos de solidos por gramos de enzima.

4.- Utilizando celulasas de *Aspergillus niger* fue posible obtener un 53.84% de hidrólisis de celulosa de los tejidos obtenidos como producto del pretratamiento ácido después de 120 minutos utilizando una concentración de tejidos pretratados de *Cenchrus ciliaris* de  $10 \text{ g/L}$ , una concentración de enzima de  $3.2 \text{ g/L}$  a  $40^\circ\text{C}$  y pH 4.5. Comparando los resultados obtenidos en esta investigación con los de Zhang y colaboradores (2010) se observa que estos investigadores obtuvieron el 67.6% de conversión después de 24 horas a  $50^\circ\text{C}$ , mientras que en esta investigación se obtuvo el 53.83% de conversión después de 2 horas a  $40^\circ\text{C}$ .

## 8 Referencias

- [1] Vázquez H.J., Dacosta O. Fermentación alcohólica: Una opción para la producción de energía renovable a partir de desechos agrícolas. *Ingeniería Investigación y Tecnología* (2007), 8(4), 249-259.
- [2].- Lynd L. Overview and evaluation of fuel ethanol from cellulosic biomass: technology, economics, the environment, and policy. *Annu. Rev. Energy Environ.* 1996. 21:403–65.
- [3] .- Horta L. Bioetanol de caña de azúcar. Una energía para el desarrollo sostenible. Resumen ejecutivo. BNDES, CGEE, FAO y CEPAL (2008), 5.
- [4].- Vásquez C., Ruiz C., Arango D. Production of anhydrous ethanol by extractive distillation with salt effect. *Dyna rev. fac. nac. minas* (2007), 74(151), 53-59.
- [5].- Gacesa P., Hubble J., *Tecnología de las enzimas*, Editorial Acribia, 1990, 110
- [6].- Quintero R., *Ingeniería Bioquímica: Teoría y Aplicación*, Editorial Alhambra Mexicana, c1981. 175-185
- [7] Sánchez O., Cardona C., Producción biotecnológica de alcohol carburante I: obtención a partir de diferentes materias primas. *INCI*, nov. 2005, vol.30, no.11, p.671-678.
- [8] Macarron R., Tesis Doctoral Producción y caracterización de Endoglucanasa III de *Trichoderma reesei*. Universidad de Complutense de Madrid. Facultad de ciencias Biológicas. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular 1. Junio 1992.

[9] Menon, Vishnu; Prakash, Gyan; Rao, Mala. Enzymatic hydrolysis and ethanol production using xyloglucanase and *Debaromyces hansenii* from tamarind kernel powder: Galactoxyloglucan predominant hemicellulose. Division of Biochemical Sciences, National Chemical Laboratory, Maharashtra, India. *Journal of Biotechnology* (2010), 148(4), 233-239.

[10] Wan, Caixia; Li, Yebo. Microbial pretreatment of corn stover with *Ceriporiopsis subvermispora* for enzymatic hydrolysis and ethanol production. Department of Food, Agricultural, and Biological Engineering, The Ohio State University/Ohio Agricultural Research and Development Center, Wooster, OH, USA. *Bioresource Technology* (2010), 101(16), 6398-6403.

[11] Modified technology of switchgrass pretreatment for ethanol production. Duan, Yangkai; Tian, Shen; Yu, Yong; Zhou, Guixiong; Yang, Xiushan. College of Life Science, Capital Normal University, Beijing, Peop. Rep. China. *Taiyangneng Xuebao* (2009), 30(12), 1709-1712.

[12] Persson, Tobias; Ren, Jun Li; Joelsson, Elisabeth; Joensson, Ann-Sofi. Fractionation of wheat and barley straw to access high-molecular-mass hemicelluloses prior to ethanol production. Department of Chemical Engineering, Lund University, Lund, Swed. *Bioresource Technology* (2009), 100(17), 3906-3913.

[13] Karim, M. Nazmul; Ryu, Seunghyun. One-step cellulosic ethanol production. Department of Chemical Engineering, Texas Tech University, Lubbock, TX, USA. *Abstracts of Papers, 235th ACS National Meeting, New Orleans, LA, United States, April 6-10, 2008* (2008), FUEL-175.

[14] Scragg A. *Biotecnología para ingenieros: sistemas biológicos en procesos tecnológicos*. México : Editorial Limusa, c1996.

[15] Scriban R. Biotecnología. Rene. Mexico: Editorial El Manual Moderno, c1985. 225.

[16] Ratledge C., Kristiansen B., Basic biotechnology 2a ed. Cambridge, U.K. : New York, NY : Editorial Cambridge University Press, c2001

[17] Dustet,J.. Carmenate, M.. Haramboure, T.. Hernande O. Obtención de celulasas de *Aspergillus niger*. Técnica de cultivo y método de separación. Grupo de Biotecnología Aplica. Centro de Estudios de Ingeniería de Procesos. Cuba. 1999

[18] Villena G. Gutierres M.. Biopelículas de *Aspergillus niger* para la producción de celulasas: algunos aspectos estructurales y fisiológicos. 2003, Rev. Peru. Biol 10(1):78-87

[19] Ramírez R., Enríquez A., Lozano F. Valor nutricional y degradabilidad ruminal del zacate buffel y nueve zacates nativos del NE de México. Ciencia UANL (2001), 4(003), 314-htm.

[20] Shuler, L. Bioprocess engineering : basic concepts 2a ed. Upper Saddle River, NJ : Editorial Prentice Hall, c2002.

[21] Zhang, Qiang; Yin, Yongguang, Thygesen ,Anders; Thomsen, Anne Belinda. Ethanol production from wet oxidezed corn straw by simultaneous saccharification and fermentation. College of Biological and Agricultural engineering, Jilin University, Changchun, Peop. Rep. China. Nongye Gongcheng Xuebao (2010),26(9), 292-295