



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.  
Posgrado en Ciencias en Energía Renovable

Designificación de bagazo de sorgo dulce con un extracto enzimático de *Trametes hirsuta*  
Bm-2 para la producción de azúcares fermentables

Tesis que presenta  
I.B.Q. Carlos Eduardo Hernández Calderón

En opción al título de  
MAESTRO EN CIENCIAS EN ENERGÍA RENOVABLE

Mérida, Yucatán, México.  
Marzo 2018

## **Agradecimientos**

Al CONACYT, por la beca otorgada con el número 587417

A mi director de tesis el Dr. Luis Barahona por brindarme el apoyo, sus valiosos consejos y conocimientos aportados durante la maestría.

Al Dr. Raúl Tapia por sus apreciables conocimientos, recomendaciones y apoyo durante la maestría y escritura de la tesis.

A la Dra. Ruby Valdez, por sus observaciones y consejos, en el transcurso de la maestría.

A las Dras. Patricia Lappe y Sara Elena Solís por los consejos, conocimientos compartidos y su valioso apoyo en el proceso de la maestría y elaboración de la tesis.

A la Dra. Beatriz Escobar por facilitarme el uso del equipo de espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR).

Al M. C. Jorge Domínguez, técnico titular del Laboratorio de Biorreactores, por su ayuda en la caracterización de las muestras por Espectrometría Infrarroja por Transformada de Fourier (FT-IR).

A la Q. I. Tanit Toledano, técnica titular del Laboratorio de Biocombustibles, por su apoyo en el manejo de equipos en el laboratorio y en la caracterización de muestras por Microscopia Electrónica de Barrido (MEB)

A la M. C. Rubí Villacis y al M. C. Edgar Olguín por las enseñanzas técnicas en el manejo del hongo *Trametes hirsuta* Bm-2.

## Índice general

Agradecimientos .....	I
Índice general .....	II
Índice de Tablas .....	VI
Índice de Figuras .....	VII
Glosario .....	IX
Resumen .....	X
Abstract .....	XI
Introducción .....	1
Capítulo 1 .....	3
Antecedentes.....	3
1.1 Biocombustibles .....	3
1.2. Estructura lignocelulósica. Componentes principales .....	6
1.3. Pretratamiento de la materia lignocelulósica .....	9
1.4. Uso de macro y micromicetos como alternativa en el pretratamiento de material lignocelulósico.....	12
1.5. Basidiomiceto <i>Trametes hirsuta</i> Bm-2 .....	13
1.6. Enzimas lacasas .....	15
1.6.1 Reacción de catálisis por la enzima lacasa .....	15
1.7. Sacarificación.....	16
1.8 <i>Sorghum bicolor</i> (sorgo dulce) .....	18
1.9. Producción de sorgo dulce en México .....	20
Hipótesis.....	21
Objetivo general .....	21
Objetivos particulares.....	21
Capítulo 2 .....	22

Materiales y Métodos.....	22
2.1. Material biológico .....	23
2.2. Composición química y estructura física del bagazo de <i>S. bicolor</i> .....	23
2.3. Propagación en medio extracto de malta agar (EMA) de <i>T. hirsuta</i> Bm-2.....	23
2.4. Determinación de actividad lacasa en placa.....	24
2.5. Preparación del inóculo .....	24
2.6. Producción de lacasa en medio líquido .....	24
2.7. Medición de la actividad enzimática de la enzima lacasa .....	25
2.8. Pretratamientos del bagazo de <i>Sorghum bicolor</i> .....	25
2.9. Cuantificación de la concentración de fenoles totales de los pretratamientos.....	27
2.10. Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier (FT-IR) .....	27
2.11. Sacarificación de la biomasa pretratada con el extracto enzimático crudo de <i>T. hirsuta</i> Bm-2.....	28
2.12. Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC).....	28
2.13. Análisis estadístico .....	28
Capítulo 3 .....	29
Resultados y Discusión.....	29
3.1. Caracterización físico-química del bagazo de <i>Sorghum bicolor</i> .....	29
3.1.1. Composición química de <i>S. bicolor</i> .....	29
3.1.2. Microscopía electrónica de barrido de <i>S. bicolor</i> sin pretratamiento .....	30
3.1.3. FT-IR de <i>S. bicolor</i> sin pretratamiento.....	31
3.2. Actividad de la enzima lacasa .....	34
3.3. Calentamiento del bagazo de <i>S. bicolor</i> como control del pretratamiento enzimático a 45 °C.....	35
3.3.1. Concentración de fenoles totales después del calentamiento del bagazo de <i>S. bicolor</i> a 45 °C.....	35
3.3.2. Estructura microscópica del bagazo de <i>S. bicolor</i> calentado a 45 °C.....	37
3.3.3. Análisis de FT-IR del bagazo de <i>S. bicolor</i> calentado a 45 °C.....	38

3.3.4. Sacarificación del bagazo de <i>S. bicolor</i> calentado a 45 °C.....	39
3.4. Pretratamiento del bagazo de <i>S. bicolor</i> con el extracto enzimático crudo de <i>T. hirsuta</i> Bm-2 a 45 °C .....	40
3.4.1. Fenoles totales del bagazo de <i>S. bicolor</i> pretratado a 45 °C.....	40
3.4.2. Estructura microscópica del bagazo de <i>S. bicolor</i> pretratado a 45 °C .....	41
3.4.3. Análisis de FT-IR del bagazo de <i>S. bicolor</i> pretratado a 45 °C.....	44
3.4.4. Sacarificación del bagazo de <i>S. bicolor</i> pretratado a 45 °C.....	48
3.5. Calentamiento del bagazo de <i>S. bicolor</i> como control del pretratamiento enzimático a 50 °C.....	50
3.5.1. Concentración de fenoles totales después del calentamiento del bagazo de <i>S. bicolor</i> a 50 °C.....	50
3.5.2. Estructura microscópica del bagazo de <i>S. bicolor</i> calentado a 50 °C.....	51
3.5.3. Análisis de FT-IR del bagazo de <i>S. bicolor</i> calentado a 50 °C.....	52
3.5.4. Sacarificación del bagazo de <i>S. bicolor</i> calentado a 50 °C.....	53
3.6. Pretratamiento del bagazo de <i>S. bicolor</i> con el extracto enzimático crudo de <i>T. hirsuta</i> Bm-2 a 50 °C.....	53
3.6.1. Fenoles totales del bagazo de <i>S. bicolor</i> pretratado 50 °C.....	53
3.6.2. Estructura microscópica del bagazo de <i>S. bicolor</i> a 50 °C .....	55
3.6.3. Análisis FT-IR del bagazo de <i>S. bicolor</i> pretratado a 50 °C.....	59
3.6.4. Sacarificación del bagazo de <i>S. bicolor</i> pretratado a 50 °C.....	62
3.6.4.1. Cálculo del rendimiento de los procesos de pretratamiento-sacarificación a 45 y 50 °C.....	63
Conclusiones .....	66
Bibliografía.....	67
Anexo 1 .....	77
Medio de cultivo de restricción de crecimiento KIRK.....	77
Anexo 2 .....	78
Determinación de actividad enzimática .....	78

Anexo 3 .....	80
Determinación de fenoles totales .....	80
Anexo 4 .....	83
Determinación de concentración de glucosa por HPLC .....	83

## Índice de Tablas

Tabla 1. Tipos de pretratamiento de la biomasa lignocelulósica. ....	11
Tabla 2. Principales biopolímeros en el bagazo de <i>Sorghum bicolor</i> . ....	19
Tabla 3. Condiciones de los pretratamientos del bagazo de <i>S. bicolor</i> . ....	26
Tabla 4. Composición química (%) del bagazo de <i>S. bicolor</i> y otros tipos de biomasa ....	29
Tabla 5. Bandas de absorción de los materiales lignocelulósicos .....	33
Tabla 6. Bandas de absorción del bagazo de <i>S. bicolor</i> pretratado con el extracto enzimático crudo de <i>T. hirsuta</i> Bm-2 a 45 °C por 96 h comparado con otros pretratamientos.....	47
Tabla 7. Diluciones seriadas de ácido gálico para determinar la concentración de fenoles totales.....	81
Tabla 8. Promedio de las absorbancias de las diferentes concentraciones de ácido gálico de la curva de calibración para determinar la concentración de fenoles totales. ....	81
Tabla 9. Área bajo la curva del estándar de glucosa a diferentes concentraciones.....	83

## Índice de Figuras

Figura 1. Media mensual global de CO <sub>2</sub> en el volcán Mauna Loa. ....	3
Figura 2. Estructura de la celulosa. ....	6
Figura 3. Monómeros de carbohidratos constituyentes de la hemicelulosa]. ....	7
Figura 4. Representación de la lignina de madera aserrada. ....	8
Figura 5. Monómeros estructurales de la lignina. ....	8
Figura 6. Representación de la estructura tridimensional de la enzima lacasa de <i>Trametes hirsuta</i> . ....	16
Figura 7. Mecanismo de acción de las celulasas. ....	17
Figura 8. Estrategia experimental para el pretratamiento de biomasa lignocelulósica de bagazo de sorgo dulce para la producción de azúcares fermentables ....	22
Figura 9. Estructura microscópica del bagazo de <i>S. bicolor</i> sin pretratamiento. ....	30
Figura 10. Espectro de FT-IR del bagazo de <i>S. bicolor</i> sin pretratamiento. ....	31
Figura 11. Concentración de fenoles totales respecto al tiempo de calentamiento de la biomasa a 45 °C. ....	36
Figura 12. Estructura microscópica del bagazo de <i>S. bicolor</i> calentado por 96 h a 45 °C. ....	37
Figura 13. Espectros de FT-IR del bagazo de <i>S. bicolor</i> ; sin pretratamiento (negro); calentado a 45 °C por 96 h (rosado). ....	38
Figura 14. Concentración de fenoles del bagazo de <i>S. bicolor</i> respecto al tiempo de pretratamiento con el extracto enzimático crudo de <i>T. hirsuta</i> Bm-2 a 45 °C. ....	40
Figura 15. Coloración del bagazo de <i>S. bicolor</i> con pretratamiento a 45 °C. ....	42
Figura 16. Estructura microscópica del bagazo de <i>S. bicolor</i> pretratada a 45 °C ....	43
Figura 17. Espectros de FT-IR del bagazo de <i>S. bicolor</i> pretratada a 45 °C ....	45
Figura 18. Concentración de glucosa con respecto al tiempo de sacarificación del bagazo de <i>S. bicolor</i> pretratada a 45 °C. ....	48
Figura 19. Concentración de fenoles totales respecto al tiempo de calentamiento de la biomasa a 50 °C. ....	50
Figura 20. Estructura microscópica del bagazo de <i>S. bicolor</i> calentada por 96 h a 50 °C. ....	51
Figura 21. Espectros de FT-IR del bagazo de <i>S. bicolor</i> ; sin pretratamiento (negro); calentado a 50 °C por 96 h (rosado). ....	52
Figura 22. Concentración de fenoles del bagazo de <i>S. bicolor</i> respecto al tiempo de pretratamiento a 50 °C. ....	54



Figura 23. Comparación de las concentraciones de fenoles totales en los pretratamientos con el extracto enzimático crudo de <i>T. hirsuta</i> Bm-2 a 45 y 50 °C. ....	55
Figura 24. Coloración del bagazo de <i>S. bicolor</i> pretatada a 50 °C .....	56
Figura 25. Estructura microscópica del bagazo de <i>S. bicolor</i> pretatada a 50 °C. ....	57
Figura 26. Modificación de la estructura del bagazo de sorgo por diversos pretratamientos .....	58
Figura 27. Espectros de FT-IR del bagazo de <i>S. bicolor</i> pretatada a 50 °C .....	61
Figura 28. Concentración de glucosa con respecto al tiempo de sacarificación del bagazo de <i>S. bicolor</i> pretatada a 50 °C. ....	62
Figura 29. Rendimiento de la concentración de glucosa después del pretratamiento y sacarificación a 45 y 50 °C. ....	64
Figura 30. Curva de calibración de Fenoles Totales .....	82
Figura 31. Curva de calibración del estándar de glucosa en el HPLC. ....	83

## Glosario

$\mu$ L: microlitro

h: hora

$^{\circ}$ C: grados Celsius

min: minuto

kg: kilogramo

rpm : revoluciones por minuto

p/v: peso respecto al volumen

mm: milímetro

mM: milimolar

ppm: partes por millón

M: molar

mL: mililitro

L: litro

## Resumen

El bagazo de sorgo dulce, es un residuo generado anualmente en gran cantidad a nivel mundial. Los estudios estructurales y químicos realizados a esta biomasa indican su potencial como materia prima para la producción de bioetanol de segunda generación. Su alto contenido de lignina presenta una limitante para el aprovechamiento de los carbohidratos fermentables presentes en este sustrato; para romper su estructura el pretratamiento más utilizado es el químico, sin embargo, la tendencia es aplicar pretratamientos biológicos, los cuales son más amigables con el medio ambiente y utilizan condiciones de proceso menos demandantes de energía. El objetivo de este estudio fue determinar el efecto del extracto enzimático crudo obtenido a partir de la cepa Bm-2 de *Trametes hirsuta* en la deslignificación del bagazo de *Sorghum bicolor* L. Moench. Para ello, se evaluaron dos temperaturas (45 y 50 °C) y cuatro tiempos (24, 48, 72 y 96 h) de pretratamiento para después sacarificar la biomasa pretratada con un coctel enzimático comercial de celulasas. Los mejores resultados se obtuvieron con el pretratamiento realizado a 50 °C durante 72 h, observándose la degradación de las fibras del bagazo mediante microscopia electrónica de barrido. Los espectros FT-IR confirmaron las modificaciones de los grupos hidroxilo y carbonilo; y de los enlaces carbono-carbono presentes en la lignina. La máxima concentración de glucosa obtenida después de la sacarificación ( $2.3 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) resultó baja en comparación con los reportes de la literatura, por lo que se recomienda profundizar los estudios de deslignificación y sacarificación de este residuo.

## Abstract

Sweet sorghum bagasse is a waste generated annually in large quantities worldwide. The structural and chemical studies carried out on this biomass indicate its potential as a raw material for the production of second generation bioethanol. Its high content of lignin is a limitation for the use of the fermentable carbohydrates present in this substrate; the most used pretreatment to break down its structure is the chemical, however, the tendency is to apply biological pretreatments, which are environment friendly and use less demanding energy process conditions. The objective of this work was to determine the effect of the crude enzymatic extract obtained from the Bm-2 strain of *Trametes hirsuta* on the delignification of *Sorghum bicolor* L. Moench bagasse. Two pre-treatment temperatures were evaluated (45 and 50 ° C) at four different times (24, 48, 72 y 96 h). The saccharification of the pre-treated biomass was carried out with a commercial enzymatic cocktail of cellulases. The best results were obtained with the pre-treatment carried out at 50 ° C for 72 h, where the degradation of the bagasse fibers was observed by scanning electron microscopy analysis. The FT-IR spectra confirmed the modifications of the hydroxyl and carbonyl groups; and of the carbon-carbon bonds present in lignin. The maximum concentration of glucose obtained after saccharification was 2.3 mg · mL<sup>-1</sup>, which is low compared to reports in the literature, so it is recommended to carry out more studies of delignification and saccharification of this residue.

## Introducción

En la última década, la búsqueda de energías alternativas para combatir los efectos causados por el uso de combustibles fósiles, se ha visto impulsada por los gobiernos de varios países, y México no ha sido la excepción. Los biocombustibles pueden ser propulsores de las economías de los sectores rurales de esos países, sin embargo, al utilizar cultivos como el maíz en los Estados Unidos, la caña de azúcar en Brasil y la remolacha en la Unión Europea, se pone en peligro la seguridad alimentaria [1]. Es por ello que hoy en día se buscan nuevas fuentes de materias primas, que no compitan con el sector alimentario, para la producción de biocombustibles.

En este sentido, la biomasa lignocelulósica puede ser un buen candidato para ser utilizada en la producción de biocombustibles, debido a su abundancia. Sin embargo, una desventaja de dicha biomasa es la recalcitrancia, fenómeno atribuible a la lignina, un heteropolímero amorfo ramificado componente del material lignocelulósico y altamente resistente a la degradación química y biológica [2].

Actualmente los pretratamientos químicos son los más utilizados en el pretratamiento de la materia lignocelulósica, sin embargo, la desventaja que presentan es que incrementan los costos energéticos y de producción debido a la necesidad de remoción de los químicos utilizados. Una alternativa a estos procesos es la oxidación y rompimiento estructural de la lignina por acción enzimática que, aunque actualmente es costosa, debido principalmente a la producción, extracción y purificación de la enzima, es ventajosa por el reducido tiempo de pretratamiento, su especificidad y las condiciones suaves del proceso. En estos procesos enzimáticos, los organismos generalmente utilizados son los hongos de la podredumbre blanca, ya que además de biodegradar la lignina, no modifican el producto principal, no contaminan y pueden reducir considerablemente los costos de operación [3]. El inconveniente en el uso de los hongos es el tiempo del pretratamiento, el cual es prolongado (varias semanas) [4]. Es por esto que se prefiere el empleo de las enzimas que producen los hongos de la podredumbre blanca para la deslignificación de la biomasa.

En este trabajo se utilizó el extracto enzimático crudo de *Trametes hirsuta* (Bm-2) en el pretratamiento de deslignificación del bagazo de *Sorghum bicolor* L. Moench, y se evaluó si después de dicho pretratamiento la celulosa y hemicelulosa contenida en esta biomasa eran más susceptibles a la sacarificación y liberación de azúcares fermentables.

## Capítulo 1

### Antecedentes

#### 1.1 Biocombustibles

Uno de los mayores desafíos para la sociedad en el siglo XXI es satisfacer la creciente demanda de energía. La preocupación por la seguridad en el suministro de petróleo y el impacto negativo de los combustibles fósiles en el medio ambiente, en particular las emisiones de gases de efecto invernadero, han ejercido presión en la sociedad para la búsqueda de combustibles alternos como los biocombustibles [5].

De acuerdo con la Agencia Internacional de Energía, los gases de efecto invernadero son principalmente: bióxido de carbono, metano, y vapor de agua, entre otros. De acuerdo con la División de Monitoreo Global de la Administración Nacional Oceánica y Atmosférica (NOAA), el CO<sub>2</sub> proveniente de actividades antropogénicas ha alcanzado niveles alarmantes. En el año 2017, presenta una concentración de 407.07 ppm y la tendencia es de que estas concentraciones aumenten (Figura 1) [6].

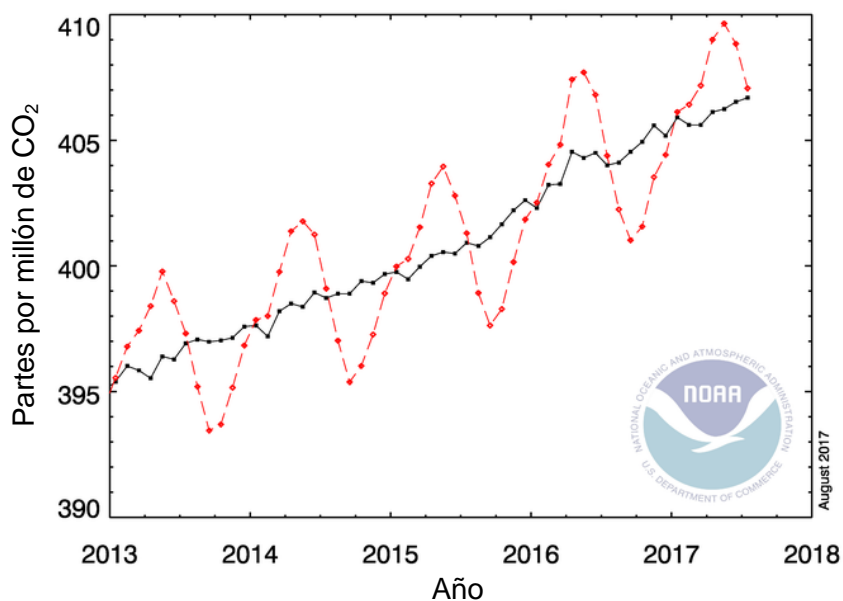


Figura 1. Media mensual global de CO<sub>2</sub> en el volcán Mauna Loa: la línea roja representa las medias de los valores mensuales y la línea en color negro muestra los mismos valores ajustado al ciclo de cada temporada [6].

Ante este panorama, las energías renovables son consideradas como una alternativa a las energías de origen fósil, con el objetivo de reducir los altos niveles de contaminación ambiental. Dentro de las principales energías renovables, por su importancia en la cantidad de energía generada y por sus muchas aplicaciones, se encuentra la bioenergía [7].

El potencial global de la bioenergía radica en que se obtiene de la biomasa. Esta es la materia que constituye a los seres vivos, sus excretas y sus restos no vivos. Su conversión a biocombustibles es una opción importante para la explotación de fuentes alternativas de energía y la reducción de gases contaminantes [7].

Los biocombustibles pueden ser clasificados de acuerdo al tipo de materia prima utilizada para su generación:

**Biocombustibles sólidos:** la leña, carbón vegetal, residuos agrícolas y pellets, para producir calor y/o electricidad, pueden ser quemados directamente (combustión), o por otros procesos como la gasificación y pirólisis.

**Biocombustibles líquidos:** bioetanol y biodiesel; obtenidos de cultivos energéticos como caña de azúcar, maíz, oleaginosos o aceite vegetal usado.

**Biocombustibles gaseosos:** biogás o biohidrógeno obtenidos de los residuos municipales e industriales, vía digestión anaerobia [7].

De acuerdo con las tecnologías empleadas para su obtención, los biocombustibles pueden clasificarse en:

**Biocombustibles de 1ª generación:** son aquellos cuya procedencia es agroalimentaria. Se obtienen a partir de diferentes partes de las plantas con altos contenidos de azúcares (tallos y frutos), de almidón (tubérculos, semillas), de aceites (semillas); aunque también pueden derivarse de desechos domésticos como aceites residuales o desechos orgánicos. Ejemplo de este tipo de biocombustible es el bioetanol que se produce en Estados Unidos de América a partir de maíz [8].



**Biocombustibles de 2ª generación:** son los que derivan de residuos agrícolas y forestales compuestos principalmente por lignina, celulosa y hemicelulosa. También dentro de esta categoría se consideran aquellos combustibles que se obtienen de cultivos no alimenticios dedicados especialmente a la producción de energía (cultivos energéticos) como el biodiesel obtenido de *Jatropha* [8]

**Biocombustibles de 3ª generación:** son aquellos que se producen por la actividad de los microorganismos [7]. Las microalgas pueden proveer la materia prima para la fabricación de diferentes biocombustibles como el biohidrógeno, biodiesel y metano [8]. Las bacterias también se han empleado en la obtención de bioetanol.

Los biocombustibles son actualmente una de las fuentes alternativas al consumo de combustibles fósiles líquidos para el transporte. El uso de los automóviles, motocicletas, trenes, aviones y barcos continúa requiriendo combustibles líquidos en la mayoría de los países. La biomasa es una de las materias primas más prometedoras para la producción de biocombustibles, ya que las emisiones netas de CO<sub>2</sub> son sustancialmente menores en comparación con los combustibles fósiles [9].

Actualmente, el etanol es el biocombustible que se produce a precios competitivos en el mercado de los combustibles. Se genera a partir de azúcar (Brasil) o almidón (EUA) [5]. Como el uso creciente de cultivos alimentarios para la obtención de etanol es un debate internacional sobre los posibles efectos negativos en la seguridad alimentaria, se han desarrollado otras estrategias que implican el uso de residuos agrícolas o forestales con altos contenido de celulosa y hemicelulosa como sustratos para la obtención de este biocombustible [5, 10].

El bioetanol derivado de la materia lignocelulósica es considerado como una de las alternativas más prometedoras en sustitución de los combustibles de origen fósil [3, 11]. Es, por lo tanto, un biocombustible de segunda generación que se obtiene de desechos agroindustriales y/o cultivos energéticos y es un sustituto satisfactorio para la gasolina, además, de ser amigable con el medio ambiente [12].

## 1.2. Estructura lignocelulósica. Componentes principales

Las fibras que conforman la biomasa lignocelulósica consisten de varias paredes celulares formadas de microfibras de celulosa semicristalina incrustadas en una matriz de hemicelulosa y lignina [13].

La celulosa ( $C_6H_{10}O_5$ )<sub>n</sub> [14] es el mayor componente de la biomasa lignocelulósica y es el polímero orgánico más abundante de la Tierra [15, 16]. Es un polisacárido compuesto de una cadena lineal de moléculas de glucosa (Figura 2) unidas por enlaces glucosídicos β-(1,4) existiendo además una gran cantidad de grupos hidroxilo a lo largo del esqueleto de la celulosa. Estos grupos forman redes de enlaces de hidrógeno, lo que resulta en una estructura cristalina compacta. También existen cadenas parciales de celulosa que están dispuestas de manera irregular, dando origen a la región amorfa de la celulosa [4, 17].

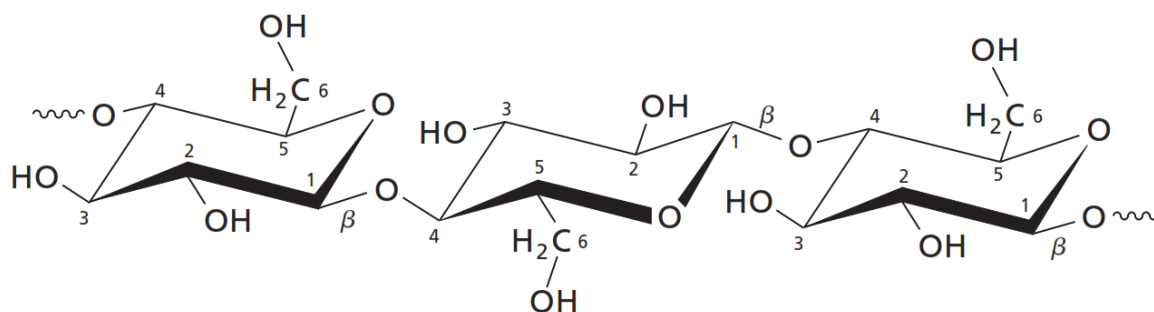


Figura 2. Estructura de la celulosa; enlaces glucosídicos β-(1,4) [18].

Las hemicelulosas ( $C_5H_8O_4$ )<sub>n</sub> [19] son cadenas heteropoliméricas ramificadas de alrededor de 200 unidades, constituidas por pentosas: β-D-xilosa (Xyl), β-D-arabinosa (Ara), β-D-apiosa (Api); hexosas: β-D-manosa (Man), β-D-glucosa (Glc), β-D-galactosa (Gal); ácidos urónicos: ácido α-D-galactourónico (GalA), ácido α-D-glucurónico (GlcA); y dioxiazúcares: α-L-Ramnosa (Rha) y α-L-Fucosa (Fuc) [15, 16, 20-22] (Figura 3). El contenido y la estructura química de las hemicelulosas pueden variar entre las diferentes plantas y partes de las mismas [23]. Están unidas por enlaces glucosídicos β-(1,4) y ocasionalmente β-(1,3) [17]. El Xilano es el segundo polímero más abundante en la naturaleza, contiene principalmente residuos β-D-xilopiranosilo unidos por enlaces glicosídicos (1,4). La columna vertebral del xilano generalmente tiene como grupos sustituyentes arabinosa, ácido glucurónico, grupos acetilo o xilosa [4].

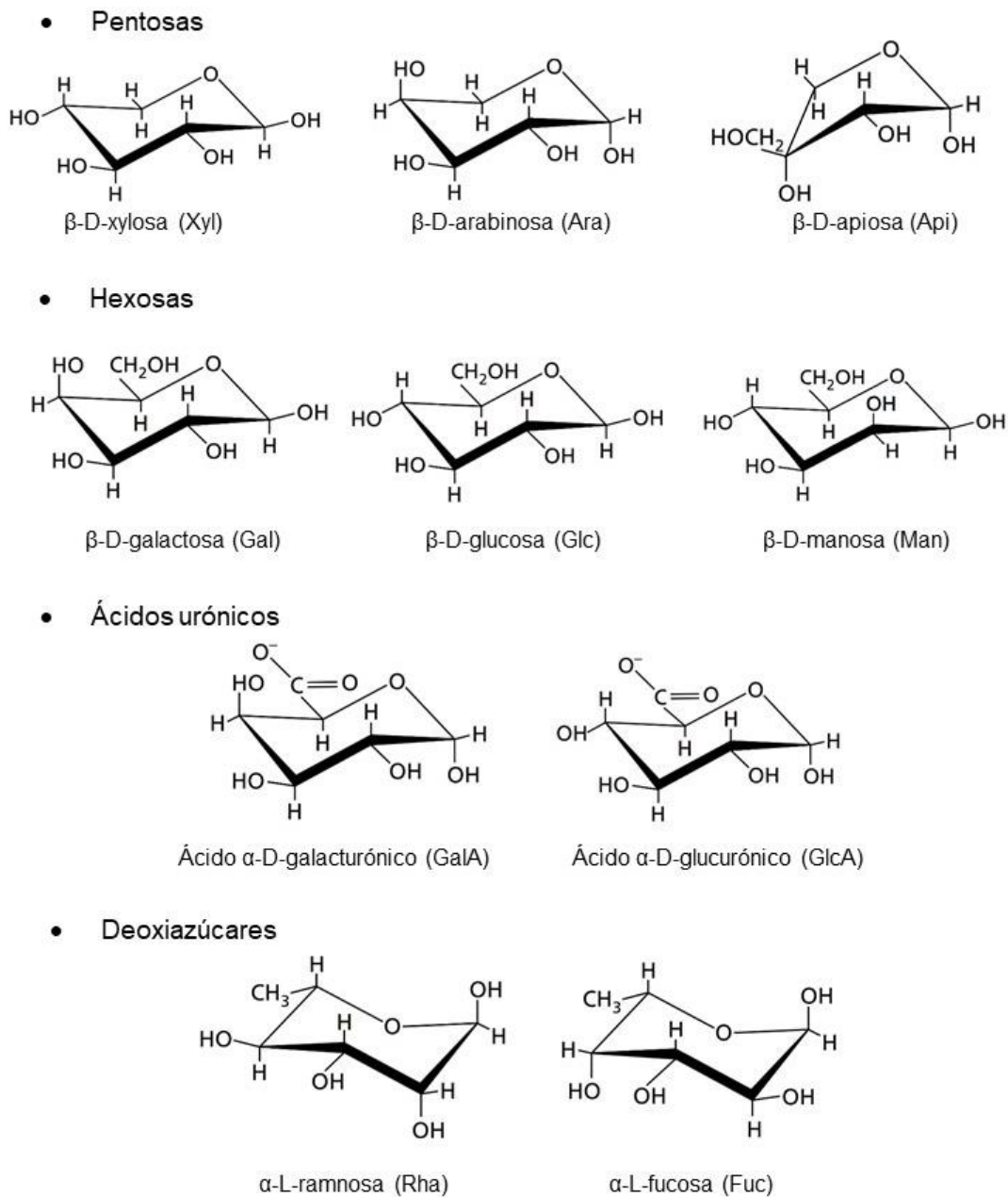


Figura 3. Monómeros de carbohidratos constituyentes de la hemicelulosa [24].

La lignina es una macromolécula de red tridimensional heterogénea (Figura 4) formada principalmente del acoplamiento oxidativo combinatorio de monolignoles: alcohol p-hidroxicinámico, y alcoholes coniferílico y sinapílico (Figura 5) [25].

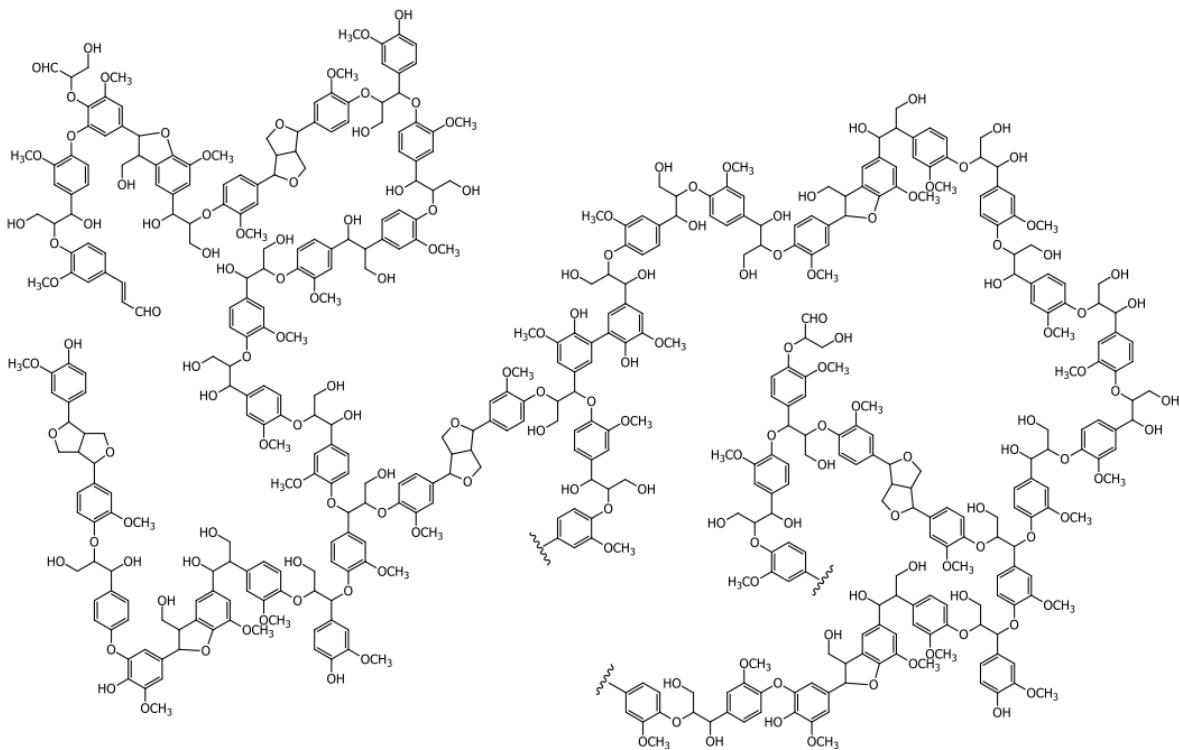


Figura 4. Representación de la lignina de madera aserrada [26].

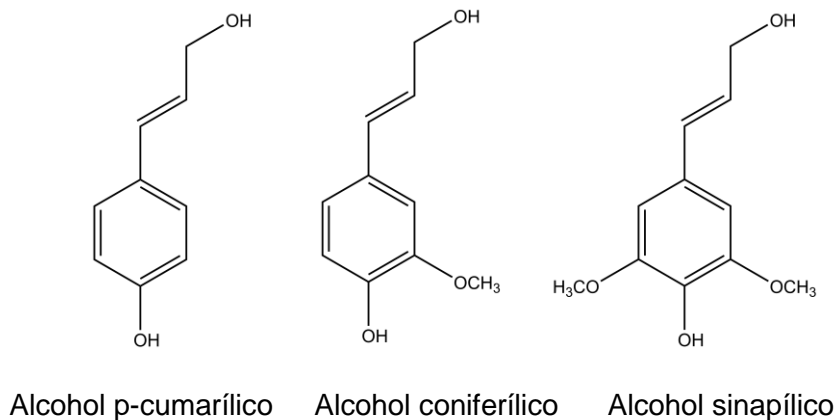


Figura 5. Monómeros estructurales de la lignina [16].

Excepto los tres principales monolignoles, también se presentan trazas de aldehídos de hidroxicinamilo, acetatos, p-cumaratos, p-hidroxibenzoatos, y ferulato de tiamina [27]. Estos monolignoles muestran diferentes abundancias según los tipos de plantas, tejidos vegetales y en las capas de la pared celular. Además, hay varios enlaces posibles entre estos monolignoles, tales como  $\beta$ -0-4',  $\beta$ -5',  $\beta$ -1',  $\beta$ - $\beta$ ', 5-5'-0-4 y 4-0-5' [28]. Debido a la

variedad de monolignoles y la "aleatoriedad" de los enlaces entre estos, la estructura real de la macromolécula de lignina es bastante compleja [25].

La celulosa cristalina y amorfa, la hemicelulosa y la lignina interactúan estrechamente entre sí y constituyen la pared celular de las plantas superiores. La formación de las paredes celulares vegetales lignocelulósicas no es simplemente la mezcla física de celulosa, hemicelulosas y lignina, sino que estos componentes están fuertemente entrelazados, unidos a través de enlaces covalentes y no covalentes [17]. La holocelulosa es el nombre que se le da a la suma de los carbohidratos estructurales de la biomasa, por lo que para saber la cantidad de celulosa y hemicelulosa total de la muestra primero se separa la holocelulosa en alfa celulosa, beta celulosa y gamma celulosa, donde las dos primeras corresponden a la celulosa total y la gamma celulosa a la hemicelulosa [29].

Teniendo en cuenta que a diario se producen millones de toneladas de desechos lignocelulósicos, la obtención de celulosa para la producción de bioetanol a partir de estos desechos es potencialmente posible, sin embargo, dada la estructura de la materia lignocelulósica, es necesario realizar pretratamientos para poder acceder a los carbohidratos de interés.

### **1.3. Pretratamiento de la materia lignocelulósica**

En la biomasa lignocelulósica, la celulosa está protegida por la hemicelulosa y la lignina [3] reduciendo el área superficial disponible para la sacarificación enzimática. Se requiere de un pretratamiento para modificar el tamaño macro y microscópico de la biomasa, así como su composición química, de modo que la hidrólisis de la fracción de carbohidratos complejos a azúcares monoméricos se pueda lograr más rápido y con mayores rendimientos. Un tratamiento previo apropiado puede aumentar la concentración de azúcares fermentables después de la sacarificación enzimática, incrementando así la eficiencia general del proceso. Un pretratamiento es aquel que: evita las necesidades de reducción del tamaño de la biomasa; hace que la biomasa lignocelulósica sea susceptible a una hidrólisis rápida con el aumento de los rendimientos de los carbohidratos

monoméricos; limita la formación de compuestos inhibidores; y minimiza las demandas de energía, de capital de inversión y de costo operativo (mantenimiento) [16].

El pretratamiento de la biomasa es el primer paso y el más difícil en el proceso para la obtención de bioetanol de segunda generación. Está considerado como el paso fundamental, tiene un gran impacto en la hidrólisis de la celulosa e influye de manera directa en los costos posteriores relacionados con retirar los subproductos del pretratamiento que afectan a la hidrólisis, además de: la carga de la enzima, las demandas de tratamiento de residuos y otras variables [30]. El pretratamiento constituye más del 40% del costo total del proceso de producción de etanol de 2ª generación.

Las modificaciones a la materia pretratada proporcionan mayor susceptibilidad a la acción de sacarificación [31-36], por ejemplo, la hidrólisis de la biomasa lignocelulósica sin ningún tratamiento previo puede producir menos del 20% de azúcares fermentables, mientras que después del pretratamiento se puede alcanzar hasta un 90% de los mismos [37].

Durante las últimas décadas, se han desarrollado varios procesos de pretratamiento se han desarrollado enfocados a disminuir la recalcitrancia de la biomasa. Diversos autores ofrecen una vista global sobre la clasificación de los pretratamientos, como se muestran en la Tabla 1. Estos se agrupan en físicos, químicos y biológicos, y su eficacia depende de la estructura física y de la composición química de la biomasa, así como de las condiciones del pretratamiento [3, 4, 15, 38, 39]. Sin embargo, los pretratamientos con un extracto enzimático crudo no son mencionados como una categoría. Además, siendo un coctel enzimático sin purificación, los pretratamientos con extractos enzimáticos crudos se colocan en la categoría de los pretratamientos biológicos.

Hoy en día, las tecnologías de pretratamiento de material lignocelulósico siguen siendo objeto de investigación, tanto a nivel laboratorio como a escala piloto. El objetivo es obtener mejores rendimientos de carbohidratos simples. El pretratamiento es probablemente la acción más importante en la conversión de biomasa lignocelulósica a combustibles o productos químicos.

Entre estos procesos de pretratamiento, los químicos y fisicoquímicos son los más eficaces y prometedores para aplicaciones industriales. Generalmente, los pretratamientos químicos, especialmente los alcalinos y ácidos, pueden eliminar eficazmente la hemicelulosa y la lignina de los materiales lignocelulósicos con un bajo costo, los pretratamientos físico-químicos pueden solubilizar hemicelulosas, afectar la estructura de la lignina y aumentar la superficie específica accesible para las enzimas [4].

Tabla 1. Tipos de pretratamiento de la biomasa lignocelulósica.

Métodos de pretratamiento	Extracción de lignina	Extracción de hemicelulosa	Área accesible	Descristalización de la celulosa	Porosidad	Generación de inhibidores
Físico	-	-	A	-	-	B
Químico	M	A	A	-	M	A
Biológico	A	M	A	-	A	B
Solventes orgánicos	A	B	A	-	M	B
Líquidos iónicos	M	B	A	A	A	B
Explosión de vapor	B	A	A	B	A	A
Hidrotérmico	M	A	M	-	M	A
Explosión fibra de amonio (AFEX)	M	B	A	A	A	B
Pretratamiento supercrítico CO <sub>2</sub> (SC-CO <sub>2</sub> )	B	B	A	-	A	B
Oxidativo	A	-	A	-	A	B

Efecto del pretratamiento en la biomasa. A: alto; M: medio; B: bajo, -; sin efecto. Fuente [4]

Aunque algunos pretratamientos, tales como los solventes orgánicos y líquidos iónicos, también pueden mejorar significativamente la ruptura de la lignina de los materiales lignocelulósicos, sus altos costos de operación limitan su aplicación comercial.

Hoy en día la producción de bioetanol requiere del desarrollo con características de ser un proceso viable tanto económica como ambientalmente, por lo que se ha apostado en la búsqueda de un pretratamiento biológico de la biomasa lignocelulósica que cumpla con estas particularidades [4].

#### 1.4. Uso de macro y micromicetos como alternativa en el pretratamiento de material lignocelulósico

Algunos macro y micromicetos se han utilizado para pretratar diversos materiales lignocelulósicos antes de la hidrólisis enzimática. Los basidiomicetos de la podredumbre blanca pueden desempeñar múltiples funciones como: deslignificación, sacarificación y fermentación de los carbohidratos [12, 40]. Los hongos de la pudrición marrón y blanca, se han utilizado para la degradación selectiva de la lignina y hemicelulosa [40], pero son los hongos causantes de la pudrición blanca los más utilizados [41, 42], debido a que producen enzimas ligninolíticas extracelulares como: lignina peroxidasa (LiP), manganeso peroxidasa (MnP) y lacasas, las cuales tienen una capacidad oxidante eficiente [43]. Entre las especies de hongos causantes de la pudrición blanca están los basidiomicetos *Phanerochaete chrysosporium*, *Ceriporia lacerata*, *Ceriporiopsis subvermispora*, *Pleurotus ostreatus* y *Trametes coccinea*, los cuales se han utilizado para pretratar diferentes materiales lignocelulósicos [44].

Las enzimas lacasas, lignina peroxidadas y manganeso peroxidadas, producidas por los hongos de la pudrición blanca, son capaces de degradar la lignina [45]. Por ejemplo; en el pretratamiento de paja de arroz con *P. ostreatus* se logró degradar el 41 % de lignina, el 17% de celulosa y el 48% de hemicelulosas en comparación con la paja de arroz sin tratar [46]. En el mismo trabajo se reportó la sacarificación de la paja de arroz pretratada con *P. ostreatus* y sin tratar, con una celulasa comercial durante 48 h. Como resultado, en el material pretratado se hidrolizó el 52 y 44% de holocelulosa y celulosa, respectivamente, en comparación con 33% de holocelulosa y 32% de celulosa en la paja de arroz sin tratar. En otro estudio, después del pretratamiento de paja de trigo con *P. ostreatus* durante cinco semanas, el 35% de la paja original se convirtió en azúcares reductores en la hidrólisis enzimática, en comparación con 12% de la muestra sin pretratamiento [44].

Otro basidiomiceto utilizado en el pretratamiento de la biomasa lignocelulósica con resultados exitosos es *Trametes hirsuta*. Los resultados del estudio realizado por Okamoto [12] señalan que *T. hirsuta* produce etanol a partir de diversos monosacáridos como glucosa, manosa, y disacáridos como maltosa y celobiosa, con rendimientos de



0.49, 0.48, 0.47 y 0.47 g de EtOH / g de azúcar utilizado, respectivamente. Además, este hongo mostró un consumo favorable de xilosa y la producción de etanol con un rendimiento de 0,44 g de EtOH / g de xilosa. En otro estudio, *T. hirsuta* se utilizó en el pretratamiento del rastrojo de maíz donde redujo la lignina en un 71.49 % durante 42 días de pretratamiento [4].

Esto indica que *T. hirsuta* puede ser un organismo prometedor para la producción de enzimas ligninolíticas que pueden ser utilizadas en el pretratamiento de la biomasa lignocelulósica, y además, de que puede producir bioetanol.

Los compuestos aromáticos, tales como los fenoles, están estructuralmente relacionados con la lignina y juegan un papel importante en el nivel de la producción de la enzima lacasa por los basidiomicetos [47]. Las lacasas se producen en presencia de varios inductores, y sus efectos sobre la actividad metabólica y el crecimiento celular dependen de las condiciones ambientales y los mecanismos de regulación específicos.

Aunque el pretratamiento biológico tiene muchas ventajas como: menos consumo de energía, ningún requerimiento de productos químicos y condiciones mínimas de pretratamiento, la desventaja es de que necesita de un tiempo prolongado (varias semanas) para lograr una tasa relativamente eficiente antes de la hidrólisis enzimática, lo que limita seriamente su aplicación industrial [4].

### **1.5. Basidiomiceto *Trametes hirsuta* Bm-2**

La cepa Bm-2 fue aislada a partir de la madera en descomposición en Mérida, Yucatán, México e identificada como *Trametes hirsuta* Bm-2 (GenBank GQ280372) y se caracteriza principalmente por producir enzimas ligninolíticas extracelulares, primordialmente lacasas [48].

Teniendo en cuenta la innovación de un pretratamiento enzimático, la atención en esta cepa se enfoca en su producción enzimática. En el estudio realizado por Zapata-Castillo [49] se reportó que la producción de la enzima lacasa incrementó al utilizar como sustrato salvado de trigo en una solución amortiguadora de fosfatos con un pH 6. La actividad

reportada fue de  $2,496 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$  a las 96 h de incubación, esto representa un incremento de 100 % respecto a lo reportado por Tapia-Tussel. La diferencia de actividad se debió al uso del salvado de trigo como sustrato [48, 49]. Díaz [50] reportó un incremento de la actividad enzimática con la adición de diferentes fuentes comerciales de salvado de trigo (Kellogg's, Nestlé y Quaker), alcanzando actividades de 3,500, 2000 y  $1100 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$  respectivamente. En un medio de cultivo que contenía: extracto de malta, peptona, extracto de levadura y glucosa, sin salvado de trigo, se produjeron  $1,800 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$  [50]. Solís [51] reportó de  $2,588 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$  utilizando salvado de trigo marca Bran Flakes de Kellogg's.

Se ha señalado que la producción de un extracto enzimático crudo puede ser fácil y económica [52], por lo que su utilización en el pretratamiento de la biomasa lignocelulósica representa una aportación fundamental a la búsqueda de un proceso de pretratamiento económicamente viable, eficiente, sustentable y de bajo impacto ambiental. Además, la aplicación de un pretratamiento enzimático acortaría el tiempo de pretratamiento aunado a bajos costos del proceso.

Como ejemplo de pretratamientos con extractos enzimáticos crudos utilizados hasta ahora está el de Hom-Díaz [53], quien empleó un extracto enzimático crudo (lacasas) del hongo *T. versicolor* en el pretratamiento de la biomasa microalgal para la producción de biogás. Los resultados obtenidos indicaron un incremento del 74 % en el rendimiento de la producción de metano con el pretratamiento, en comparación con un incremento del 20 % con un pretratamiento con una lacasa comercial. Asgher [54] pretrató el bagazo de caña con diferentes concentraciones de extracto crudo enzimático de *Trichoderma harzianum* por 48 h a  $35 \text{ }^\circ\text{C}$ . Los resultados demostraron que el porcentaje de deslignificación se incrementa conforme a la concentración del extracto crudo, y concluye que el pretratamiento con el extracto es recomendable si se compara con un pretratamiento químico (NaOH).

## 1.6. Enzimas lacasas

Las lacasas (bencenodiol: oxígeno oxidoreductasa, EC 1.10.3.2) son enzimas que catalizan la oxidación de una amplia variedad de sustratos orgánicos e inorgánicos incluyendo mono-, di- y polifenoles, aminofenoles, metoxifenoles, aminas aromáticas y ascorbato [55]. Estas enzimas contienen sitios de uniones a cobre y por esto se encuentran dentro del grupo de las proteínas azules de cobre u oxidasas azules de cobre.

La habilidad de las lacasas para oxidar compuestos fenólicos mediante la reducción del oxígeno molecular a agua, ha derivado en el estudio intensivo de estas enzimas [56].

Las lacasas están distribuidas ampliamente en plantas superiores y hongos así como en algunas bacterias y varios géneros de insectos [56]. La mayoría de las lacasas descritas han sido aisladas de ascomicetos y principalmente de los basidiomicetos de la podredumbre blanca como *T. versicolor*, *T. hirsuta*, *T. ochracea*, *T. villosa*, *T. gallica* (actualmente sinónimo de *Coriolopsis gallica*), *Cerrena máxima* (actualmente sinónimo de *Trametes maxima*), *Coriolopsis polizona* (actualmente sinónimo de *Trametes polyzona*), *Lentinus tigrinus*, *Pleurotus eryngii*, etc [57].

El trabajo de Tapia-Tussel (2011) con la cepa *T. hirsuta* Bm-2 se reporta que en presencia de fenoles aromáticos se expresan dos genes de lacasas de esta cepa, *lcc1* e *lcc2*, lo que incrementa la producción de la enzima lacasa aumenta, y por ende la actividad enzimática del extracto [58].

### 1.6.1 Reacción de catálisis por la enzima lacasa

Las enzimas reducen el oxígeno molecular a agua, generalmente por la oxidación de un sustrato fenólico [59]. Las lacasas (Figura 6a) se caracterizan por la presencia de un átomo de cobre (Cu1) junto con tres iones de cobre adicionales; un Cu2 y dos Cu3 dispuestos en un clúster trinuclear en su sitio activo. Los sustratos se oxidan en el cobre Cu1, los electrones extraídos se transfieren hacia los sitios Cu2 y Cu3, donde el oxígeno molecular es reducido a agua (Figura 6b) [60].

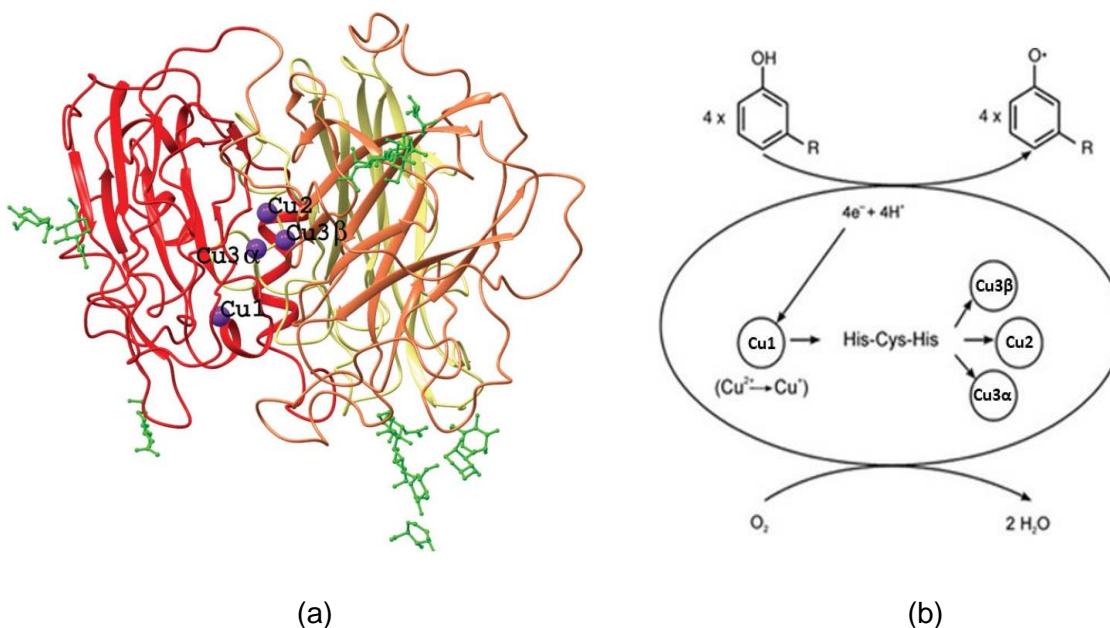


Figura 6. (a) Representación de la estructura tridimensional de la enzima lacasa de *Trametes hirsuta*, los dominios 1, 2 y 3 se muestran en amarillo, naranja y rojo, respectivamente. Los átomos de cobre (Cu) en color violeta y los enlaces con azúcares residuales se observan en verde [61], (b) mecanismo de acción de la enzima lacasa (aminoácidos: Histidina “His” y Cisteína “Cys”) [60].

### 1.7. Sacarificación

La producción de bioetanol de segunda generación a partir de la biomasa lignocelulósica se compone de tres procesos principales: el pretratamiento, la sacarificación y la fermentación. El pretratamiento es llevado a cabo para la eliminación de la lignina. El siguiente paso es la sacarificación, donde la hidrólisis enzimática permite la obtención de los carbohidratos que en el último paso serán fermentados para la producción de etanol [62].

La hidrólisis es un proceso químico donde una molécula orgánica sufre un desdoblamiento por acción del agua y calor (hidrólisis térmica). Los polisacáridos tienen la propiedad de resistir la hidrólisis térmica, pero sus enlaces glucosídicos pueden hidrolizarse con facilidad por acción de ácidos. La hidrólisis ácida es el método más empleado en la descomposición de la biomasa, pero su uso puede producir compuestos

inhibitorios para los pasos subsecuentes; la remoción y tratamiento de estos compuestos genera un incremento en los costos de operación. La hidrólisis enzimática es una opción a la hidrólisis ácida ya que, debido a su especificidad, puede producir los compuestos de interés sin modificarlos. Las enzimas encargadas de esta acción son las hidrolasas [21].

Las celulasas son enzimas que hidrolizan la celulosa; entre ellas están las exo- $\beta$ -glucanasas o celobiohidrolasas (CBHs; EC 3.2.1.91), endo- $\beta$ -glucanasas (EGs; EC 3.2.1.4) y  $\beta$ -glucosidasa ( $\beta$ G; EC 3.2.1.21) [63]. CBHs, EGs y  $\beta$ G actúan sinérgicamente en la degradación de la celulosa cristalina y amorfa. Durante la sacarificación, las EGs actúa de manera aleatoria rompiendo los enlaces glucosídicos internos y de los extremos de la cadena de celulosa. La celulosa parcialmente degradada y expuesta es atacada por las CBHs generando celobiosa, que a su vez, es hidrolizada por la  $\beta$ G a glucosa [19] (Figura 7).

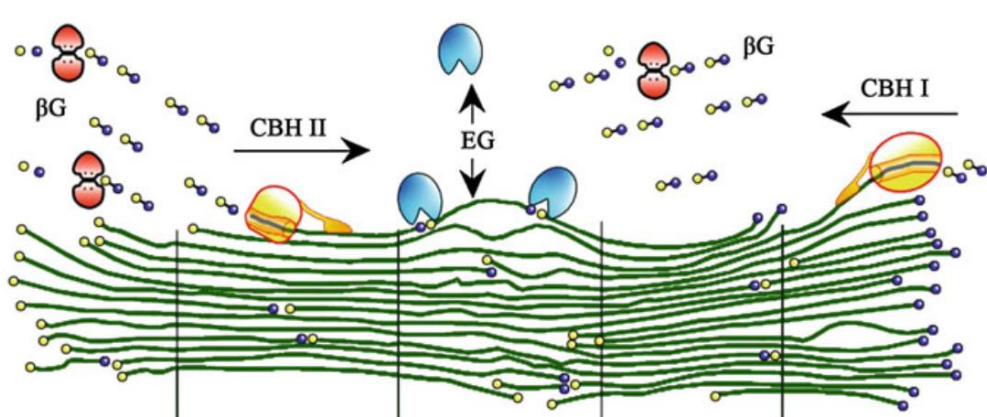


Figura 7. Mecanismo de acción de las celulasas: las celobiohidrolasas se muestran en color amarillo, las glucanasas en azul y las  $\beta$ -glucosidasas en rojo [64].

Hoy en día, empresas como Novozymes, Sigma-Aldrich, Dupont, entre otras, son pioneras en la venta de cocteles enzimáticos de celulasas para ser utilizados en la producción de bioetanol de segunda generación.

## **1.8 *Sorghum bicolor* (sorgo dulce)**

El sorgo dulce es un cultivo que ha sido ampliamente reconocido como una fuente potencial de materia prima para la producción de biocombustibles y en específico de bioetanol [65]. Es considerado un cultivo análogo a la caña de azúcar, debido a la acumulación en su jugo de 11.8 % de azúcares como sacarosa, glucosa y fructosa, en comparación con un 9.8% en el jugo de la caña de azúcar [66]. Además el sorgo cuenta con una mayor estabilidad agronómica a las fluctuaciones de temperatura, menor requerimiento de agua (la caña de azúcar requiere 36,000 m<sup>3</sup> de agua por cosecha por hectárea, mientras que el sorgo dulce requiere 8,000 m<sup>3</sup> de agua para 2 cosechas por hectárea), y una mejor tolerancia a la salinidad y alcalinidad del suelo [67]. Es capaz de crecer en zonas con temperaturas de hasta 38 °C, y se adapta bien a terrenos pobres, lo que en general lo hace ideal para desarrollarse en tierras que no son atractivas para el cultivo de caña de azúcar y otros cultivos alimenticios [68].

Muchas de las plantas que crecen en los trópicos, con condiciones de alta intensidad luminosa y temperaturas elevadas, han desarrollado un mecanismo para evitar la fotorrespiración: son las plantas con metabolismo C4. En la fotosíntesis de las plantas C4 intervienen dos tipos de células; las mesófilas y las túncico-vasculares. En las primeras el CO<sub>2</sub> es fijado por acción de la fosfoenolpiruvato carboxilasa, luego el producto formado es transportado a las células túncico-vasculares donde la ribulosa-1,5-bifosfato carboxilasa/oxigenasa toma el CO<sub>2</sub> y lo incorpora al ciclo de Calvin [21].

El sorgo dulce cuenta con un metabolismo fotosintético C4, lo cual le da una característica de alta eficiencia fotosintética, es decir, es más eficiente en la captura de carbono (CO<sub>2</sub>) [68]. El bagazo está constituido primordialmente por tres clases de biopolímeros: la celulosa, la hemicelulosa y la lignina en las proporciones que se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. Principales biopolímeros en el bagazo de *Sorghum bicolor*.

Compuestos	Porcentajes total (%)*
Extraíbles totales	23.45
Lignina	14.7
Celulosa	39.93
Hemicelulosa	21.55
Total	99.63

\*Los porcentajes expresados son las medias de las muestras analizadas. Los valores están representados en base al material seco. Fuente: [29]

La lignina del bagazo de sorgo está compuesta por unidades estructurales de p-hidroxifenilo, guaiacilo y siringilo, que forman el polímero por enlaces éter y C-C, predominantemente  $\beta$ -0-4'-aril-éter, junto con cantidades menores de enlaces  $\beta$ - $\beta'$ ,  $\beta$ -5',  $\beta$ -1' y  $\alpha,\beta$ -diaril-éter [69].

Equihua-Sánchez [29] utilizó bagazo de sorgo dulce para realizar un pretratamiento básico-oxidativo con NaOH al 6 % y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 10 %. Reportó que el pretratamiento removió efectivamente la lignina y la hemicelulosa, además, de que aumentó la superficie de contacto entre la biomasa y las enzimas celulolíticas, lo que dio como resultado un rendimiento de etanol de 32 g·L<sup>-1</sup> en la sacarificación y fermentación por etapas, y de 26.65 g·L<sup>-1</sup> en la sacarificación y fermentación simultánea. Concluyó que el bagazo de sorgo dulce puede ser considerado como una materia prima para la producción de bioetanol de segunda generación.

Mishra *et al.*, [32] también utilizaron bagazo de sorgo dulce al cual le realizaron un pretratamiento biológico con diferentes hongos de la podredumbre blanca: *Coriolus versicolor* (MTCC 138) (actualmente sinónimo de *Trametes versicolor*), *Daedalea flavida* (MTCC 145) (actualmente sinónimo de *Trametes flavita*), *Ganoderma lucidum* (MTCC 1039), *Phlebia radiata* (MTCC 2791), *Pleurotus eryngii* (MTCC 1798), *Pleurotus ostreatus* (MTCC 1801), *Stereum hirsutum*. Reportaron que *C. versicolor* deslignificó el bagazo de sorgo y con ello incrementó el rendimiento de la sacarificación. Sin embargo, el tiempo sigue siendo una limitante para los pretratamientos biológicos, pues fue realizado por 30 días.

## **1.9. Producción de sorgo dulce en México**

En México, a través de la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA) y del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Forestales (INIFAP), se está desarrollando un proyecto de producción de sorgo dulce en distintas regiones de los estados de Colima, Coahuila, Chiapas, Jalisco, Tabasco, Tamaulipas y Yucatán [70]. El sorgo dulce hoy en día se cultiva como alimento para ganado vacuno, por lo cual, al no ser un producto de consumo humano, el uso potencial del bagazo para la producción de biocombustibles es posible.

En 2015, con el respaldo de la SAGARPA y del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), se inauguró en el Instituto Tecnológico de Veracruz (ITVER) una planta piloto para la producción de bioetanol a partir del jugo de los tallos y semillas del sorgo dulce. Su inversión fue de 2.1 millones de pesos y tendría una capacidad de producción de etanol de 100 a 300 litros por día [71]. Actualmente la producción de la planta no ha sido continua, y básicamente se ha realizado para trabajos de investigación y tesis de diversos niveles, como lo indicó la Dra. María Guadalupe Aguilar Uscanda, profesor investigador del ITVER a dos años de la construcción de la planta piloto [72].

Los esfuerzos por parte del gobierno para implementar el cultivo del sorgo (jugo y semillas) se han propuesto e implementado a escala piloto [73], sin embargo, falta explotar el uso de los residuos que genera la producción de este cultivo, con el objetivo de producir etanol de segunda generación. De concretarse esto, los granos de sorgo seguirán siendo destinados al consumo de animales de granja y el bagazo residual a la producción de bioetanol.

La principal limitante en el uso de las materias lignocelulósicas es el pretratamiento, ya que repercute en los costos totales de la producción de etanol. Hoy en día los hongos de la podredumbre blanca han adquirido interés biotecnológico, las enzimas extracelulares que producen pueden ser aplicadas en el pretratamiento, con ello reducir los costos y mejorar los rendimientos de obtención de los azúcares fermentables.



## Hipótesis

El hongo *Trametes hirsuta* Bm-2 produce enzimas extracelulares capaces de degradar la lignina de la biomasa lignocelulósica. Por lo tanto, la aplicación del extracto enzimático crudo en el pretratamiento de residuos de sorgo dulce degradará la lignina y con ello, se optimizará la sacarificación con celulasas comerciales, produciendo una mayor cantidad de azúcares fermentables.

### Objetivo general

Determinar el efecto del extracto enzimático crudo del basidiomiceto *Trametes hirsuta* Bm-2 en el pretratamiento de la biomasa del bagazo seco de *S. bicolor* para la obtención de azúcares fermentables.

### Objetivos particulares

- Obtener un extracto enzimático crudo de *T. hirsuta* de Bm-2
- Determinar el efecto de la temperatura y tiempo de deslignificación en el pretratamiento del material lignocelulósico del bagazo de sorgo dulce con el extracto enzimático crudo de *T. hirsuta* Bm-2
- Caracterización de la biomasa pretratada, por las técnicas de MEB, FT-IR y fenoles totales
- Determinar el efecto del pretratamiento en la sacarificación con el coctel enzimático comercial de celulasas Acellerase 1500<sup>®</sup> en el material pretratado

## Capítulo 2

### Materiales y Métodos

Para llevar a cabo los objetivos planteados se realizó la siguiente estrategia experimental.

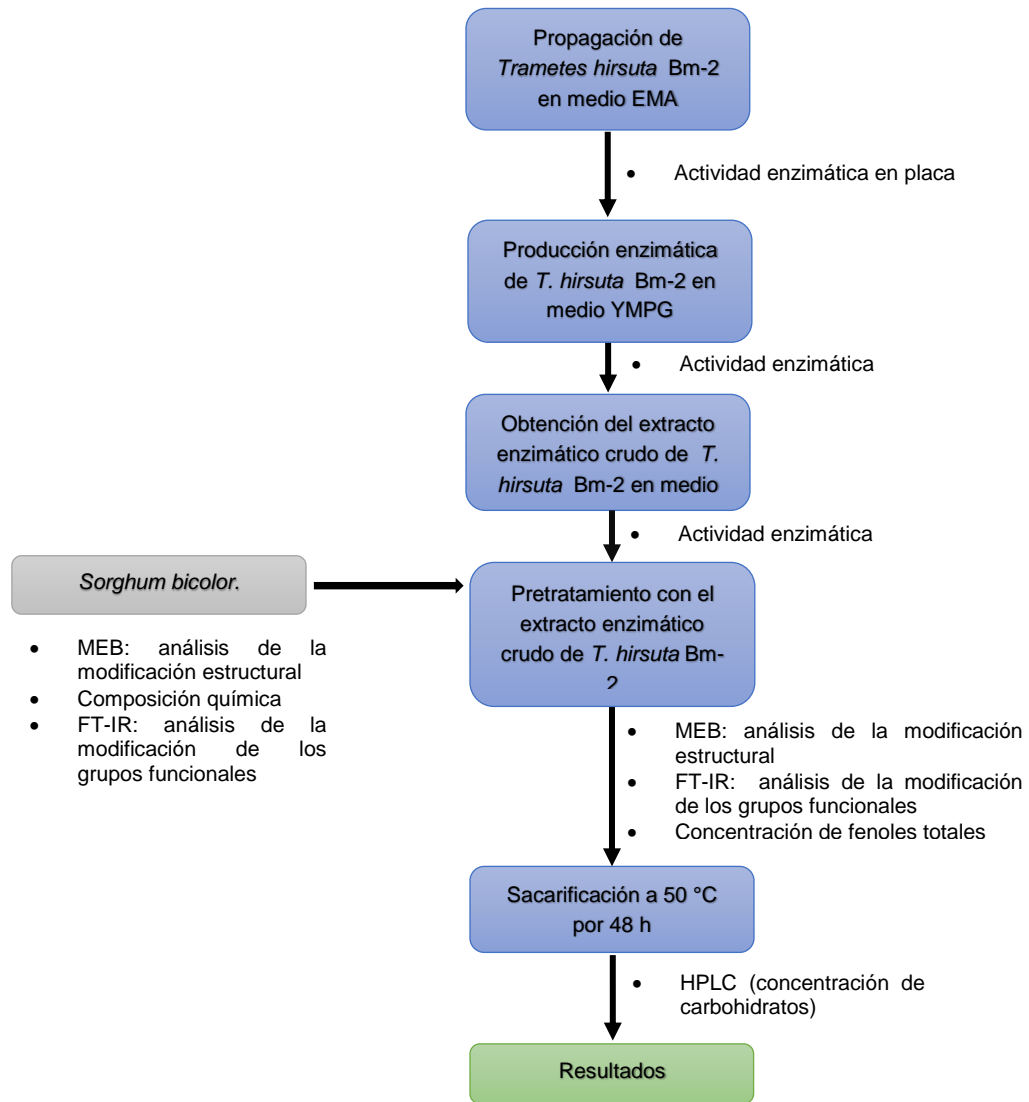


Figura 8. Estrategia experimental para el pretratamiento de biomasa lignocelulósica de bagazo de sorgo dulce para la producción de azúcares fermentables. Microscopía electrónica de barrido (MEB), Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), Espectroscopia Infrarroja de Transformada de Fourier (FT-IR).

## **2.1. Material biológico**

La cepa Bm-2 de *Trametes hirsuta* fue proporcionada por el Instituto Tecnológico de Mérida (ITM). El número de acceso de la cepa, en el GenBank es GQ280372.

El bagazo de sorgo dulce fue proporcionado por la empresa EnerAll, ubicada en la localidad de Tizimín, Yucatán, México. El material se secó a 80°C en una estufa por 24 h y posteriormente se molió a un tamaño de partícula de 1 mm en un molino Pagani 2030.

## **2.2. Composición química y estructura física del bagazo de *S. bicolor***

La composición química del bagazo de sorgo dulce fue determinada en el Departamento de Madera, Celulosa y Papel de la Universidad de Guadalajara. Esto se realizó empleando técnicas estándar TAPPI para determinar humedad, lignina insoluble en ácidos, holocelulosa, así como alfa, beta y gamma celulosa.

La visualización de la estructura física del bagazo de sorgo dulce se realizó por microscopía electrónica de barrido (JOEL; 6360LV, Tokio, Japón). Las muestras fueron deshidratadas con diferentes gradientes de concentración de etanol, con incrementos del 10%, iniciando con 30 hasta el 100 %. Posteriormente, se realizó el secado crítico (etanol al 99%, 800 psi y CO<sub>2</sub>) y se cubrieron con oro.

## **2.3. Propagación en medio extracto de malta agar (EMA) de *T. hirsuta* Bm-2**

*T. hirsuta* Bm-2 se reactivó a partir de 10 µl de una solución homogénea de Bm-2 medio rico en nutrientes para su crecimiento YMPG (dextrosa 1% J.T. Baker, Edo. De México, México; extracto de malta 1% Dibico; peptona bacteriológica 0.2% MCD-Lab, Tlalnepantla, México, extracto de Levadura 0.2%, MCD-Lab: fosfato de potasio monobásico (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) 0.2% Sigma-Aldrich, MO, EUA; sulfato de magnesio heptahidratado (MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O) 0.1% Sigma-Aldrich, Tokio, Japón; tiamina 0.01% Supelco, Bellefonte, EUA y salvado de trigo 2 % conservado a 4 °C) [74], la cual se sembró en 3 cajas de Petri con extracto de malta agar (EMA) (extracto de malta 2% Dibico Edo. de

México, México y agar bacteriológico 2% BD Bioxon Edo. de México, México). Las placas inoculadas se incubaron a  $30 \pm 1$  °C durante 96 h en oscuridad. Posteriormente, un disco de 1 cm de diámetro se transfirió a una nueva placa de EMA y se incubó a 35°C en oscuridad durante 5 días (cultivo inicial). Esto se realizó por triplicado.

#### **2.4. Determinación de actividad lacasa en placa**

La producción de la enzima lacasa, se detectó mediante la oxidación del sustrato ABTS (2,2'-ácido azino bis-3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico, Sigma-Aldrich, Mannheim, Alemania) [48, 75]. Para ello, en una placa de EMA que contenía 5 mM de ABTS, se sembró un disco de 1 cm de diámetro proveniente del cultivo inicial y se incubó en oscuridad a 35 °C durante cuatro días.

#### **2.5. Preparación del inóculo**

Se tomaron 7 discos de 1 cm de diámetro del cultivo inicial de *T. hirsuta* Bm-2 y se transfirieron, bajo condiciones asépticas, en 100 mL de medio estéril de YMPG, y se incubó durante 4 días a 35 °C y 150 rpm. Al término del periodo de incubación, la biomasa producida por *T. hirsuta* Bm-2 se homogenizó (HG-300D, Hsiangtai Machinery, Taipei, Taiwan) bajo condiciones asépticas y se conservó a 4 °C.

#### **2.6. Producción de lacasa en medio líquido**

Se empleó medio de cultivo YMPG [74] adicionado con salvado de trigo a granel y en otro ensayo se reemplazó con salvado de trigo comercial (All Bran, Kellogg's). La producción de la enzima se realizó en el medio de cultivo de restricción de crecimiento modificado: KIRK [76] (Anexo 1). Los experimentos se realizaron con salvado de trigo 2% p/v en 100 mL de medio YMPG y 2 mL del homogenizado de *T. hirsuta* Bm-2. Posteriormente se incubó a 35°C y 150 rpm, durante 96 hrs. Durante este tiempo de incubación, se tomaron

cada 24 h, 2 mL de la fase líquida del medio, para determinar la actividad enzimática. Al término del periodo de incubación, se recuperó la fase líquida, se filtró con gasas estériles para remover el micelio y centrifugó (7500 rpm/ 25 min) para separar los sólidos del medio de cultivo (salvado de trigo) del sobrenadante (extracto crudo enzimático), el cual se recuperó y conservó a 4 °C hasta su utilización.

## **2.7. Medición de la actividad enzimática de la enzima lacasa**

La actividad de la enzima lacasa se midió por oxidación del ABTS (2,2'-ácido azino bis-3etilbenzotiazolina-6-sulfónico). La reacción se llevó a cabo mezclando 100 µL de buffer de acetato (pH 5, 1M), 100 µL de ABTS (5 mM), 700 µL agua desionizada y 100 µL de muestra. El medio de reacción se incubó a 40° C durante 20 min en baño María. La muestra adquirió una coloración con tonalidades verde-azul correspondiente a la oxidación del ABTS, la cual se midió a 420 nm en un espectrofotómetro (Basic, 6135000905 Eppendorf, Hambur, Alemania). Considerando que la unidad de actividad enzimática (U) es la cantidad de enzima que cataliza la conversión de 1 µmol de sustrato en un minuto [77], la actividad enzimática se obtuvo multiplicando la absorbancia por 1388.89 U·mL<sup>-1</sup> (Anexo 2).

## **2.8. Pretratamientos del bagazo de *Sorghum bicolor***

Los pretratamientos se llevaron a cabo en matraces de 250 mL, en los que se adicionaron 50 mL de solución amortiguadora de citratos a pH 5, una carga de extracto enzimático crudo de 5 mL (con una actividad enzimática de 8,000 U·mL<sup>-1</sup>) y 5 % p/v de sustrato. La agitación fue de 150 rpm. Se evaluaron dos valores de temperatura: 45 y 50 °C. Esto debido a que de acuerdo a Zapata-Castillo *et al.* [49] la actividad del extracto crudo enzimático producido por *T. hirsuta* Bm-2 se mantiene estable en un rango de temperatura de 40 a 50 °C. La conservación de la estructura cuaternaria de la enzima en este rango de temperatura mantiene su actividad para la oxidación del sustrato. La literatura no reporta un tiempo definido para el pretratamiento enzimático de biomasa

lignocelulósica de sorgo dulce. En el caso de bagazo de caña de azúcar (un biomaterial similar al sorgo dulce), el pretratamiento biológico se llevó a cabo por 48 h [54], por lo que se decidió realizar el pretratamiento del bagazo con el extracto enzimático crudo de *T. hirsuta* Bm-2 por 24, 48, 72 y 96 h, para lo cual se desarrolló el diseño experimental que se muestra en la Tabla 3.

Tabla 3. Condiciones de los pretratamientos del bagazo de *S. bicolor*.

Pretratamiento	Temperatura (° C)	Tiempo (h)
1	45	48
2	45	72
3	45	96
4	50	48
5	50	72
6	50	96

Finalizado el tiempo de incubación se inactivó el extracto crudo enzimático, en baño María. La fracción sólida se separó de la líquida por filtrado al vacío. Posteriormente, se analizó la estructura microscópica de la fase sólida por microscopía electrónica de barrido. También se realizó un análisis de espectroscopía infrarroja de transformada de Fourier para la identificación de los grupos funcionales por el método modificado de Goncalves [31], y por último se determinó la concentración de los fenoles totales por el protocolo de Waterhouse [78]. A los controles de cada pretratamiento no se les adicionó el extracto enzimático crudo y fueron muestreados cada 24 h para la determinación de la concentración de fenoles totales y a las 96 h para los análisis de microscopía electrónica de barrido y FT-IR.

## **2.9. Cuantificación de la concentración de fenoles totales de los pretratamientos**

El reactivo principal del ensayo es el Folin-Ciocalteu (FC) que consiste en una mezcla de ácidos fosfomolibdico y fosfotúngstico de color amarillo. Es a partir de la mezcla de ambos ácidos que se producen iones de Molibdato y Tungsteno. La reacción de tipo óxido/reducción se lleva a cabo en condiciones básicas (pH 10), las cuales permiten la formación de un complejo de Molibdato que presenta una coloración azul con absorbancia a 765 nm [79].

La concentración total de fenoles fue determinada utilizando el reactivo Folin-Ciocalteu (Sigma-Aldrich, St. Lois, MO, EUA), y ácido gálico (Sigma-Aldrich, Shanghai, China) como estándar. Primero se realizó una curva de calibración con el ácido gálico con un intervalo de concentración de 100-800 mg·L<sup>-1</sup> con incrementos de 100 mg·L<sup>-1</sup>. La reacción se llevó a cabo mezclando 0.02 mL de la muestra, 1.58 mL de agua destilada y 0.1 mL del reactivo Folin-Ciocalteu. Luego se agregaron 0.3 mL de carbonato de sodio al 20 % p/v. La reacción se llevó a cabo por 30 min a 40 °C en oscuridad. La absorbancia fue leída a 765 nm (Eppendorf Basic, 6135000905). El total de fenoles fue calculado como equivalentes de ácido gálico (Anexo 3) [78].

## **2.10. Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier (FT-IR)**

Los espectros de FT-IR de los materiales sólidos procedentes de los pretratamientos y las referencias, fueron obtenidos en un espectrofotómetro Tensor II (Bruker, MA. EUA) con una fuente de radiación proporcionada por un diodo láser de luz infrarroja MIR (longitud de onda de 3-8 μm). Todas las muestras sólidas se analizaron con una resolución de 4 cm<sup>-1</sup>, y 32 búsquedas en un intervalo de longitud de onda de 500 a 4000 cm<sup>-1</sup> en modo de reflectancia total atenuada usando un accesorio ATR con punta de diamante.

### **2.11. Sacarificación de la biomasa pretratada con el extracto enzimático crudo de *T. hirsuta* Bm-2**

La sacarificación en el material pretratado se realizó utilizando la enzima Acellerase 1500® (DUPONT, IA, EUA; mezcla de celulasas: endoglucanasa 2200-2800 CMC U·g<sup>-1</sup> y β-glucosidasa 450-775 pNPg U·g<sup>-1</sup>) con una carga de 0.5 mL·g<sup>-1</sup>. Las condiciones para la sacarificación fueron 48 h, 50°C y 150 rpm. La biomasa se sacarificó en una solución amortiguadora de citratos a pH 5. Cada 24 h se tomaron muestras para la cuantificación de azúcares fermentables por HPLC (Anexo 2).

### **2.12. Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC)**

Para la cuantificación de azúcares se utilizó un cromatógrafo HPLC (INFINITY 1260, Agilent Technologies, GA, EUA) equipado con un detector de índice de refracción (RID). La separación se llevó a cabo con una columna ZORBAX Carbohydrate 4.6 x 150 mm x 5μ (Agilent Technologies, GA, EUA). Las condiciones para el análisis fueron: la fase móvil consistió en una mezcla de solventes con 80 % de acetonitrilo y 20 % de agua; flujo de 0.8 mL·min<sup>-1</sup>, a una temperatura de 40 °C en los calefactores y 35 °C en el detector. Se inyectaron 20 μL de muestra.

### **2.13. Análisis estadístico**

Todos los experimentos se realizaron por triplicado. Para los análisis estadísticos se utilizó el programa OriginLab9 (OriginLab, Northampton, MA, EUA) con un valor *P* del 95% (en todos los casos, se determinó que hay diferencia significativa si el valor *p* ≤ 0.05).



## Capítulo 3

### Resultados y Discusión

#### 3.1. Caracterización físico-química del bagazo de *Sorghum bicolor*

##### 3.1.1. Composición química de *S. bicolor*

La composición química fue determinada por el Departamento de Madera, Celulosa y Papel de la Universidad de Guadalajara. Los valores que se muestran en la Tabla 4 son el promedio de tres muestras.

Tabla 4. Composición química (%) del bagazo de *S. bicolor* y otros tipos de biomasa

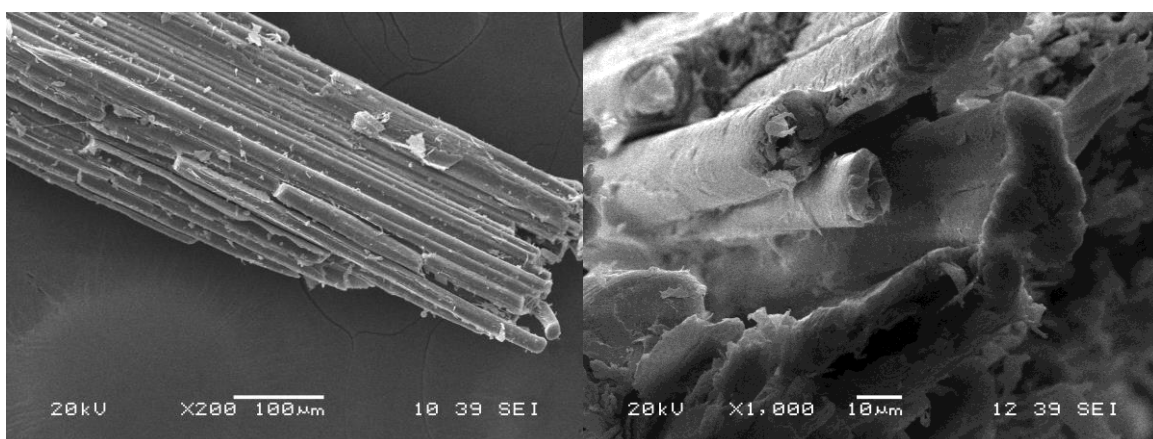
Muestra	Este trabajo	Otros reportes	Biomasa [Referencia]
Lignina	18.3	16.5	Sorgo dulce [29]
		12.1	Paja de arroz [80]
		24.22	Bagazo de caña [34]
		13.65	Bagazo de maíz [81]
		24.1	Bagazo de caña [82]
Hemicelulosa	2.67	0.1	Sorgo dulce [29]
Alfa celulosa	55.43	60.5	Sorgo dulce [29]
		42.77	Bagazo de caña [34]
		46.31	Bagazo de maíz [81]
		40.0	Bagazo de caña [82]
		41.4	Paja de arroz [80]
Extraíbles en:			
Etanol/Benceno	6.3		
Etanol	6.9		
Agua Caliente	10.4		

Los valores de alfa celulosa y lignina se encuentran dentro del rango reportado de diferentes materiales lignocelulósicos. Los resultados del contenido de lignina del bagazo

de sorgo dulce en este estudio son similares a los reportados en diversos sustratos como: paja de arroz, el bagazo de caña de azúcar y de maíz, de acuerdo a lo presentado en la Tabla 4. El 18.3 % de lignina indica que la biomasa requiere de un pretratamiento, de tal manera que los carbohidratos de interés sean más accesibles a las celulasas, para lograr obtener un mayor rendimiento en la sacarificación.

### 3.1.2. Microscopía electrónica de barrido de *S. bicolor* sin pretratamiento

Conocer la estructura microscópica de la biomasa utilizada sin pretratamiento es importante para confirmar el efecto del pretratamiento en ella. En las Figuras 9a y 9b se puede observar las fibras del bagazo de *S. bicolor* (biomasa seca y molida) sin pretratamiento.



(a)

(b)

Figura 9. Estructura microscópica del bagazo de *S. bicolor* sin pretratamiento (a) vista longitudinal de una fibra (b) sección transversal.

Las fotomicrografías 9a y 9b muestran que las fibras de los tallos de *S. bicolor* están íntimamente unidas, que presentan un aspecto liso; y que tienen una pared celular de grosor considerable, lo cual es característico de las células de esclerenquima, que se caracterizan por sus paredes celulares gruesas y lignificadas. Esta observación está de acuerdo con el contenido relativamente alto de lignina reportado en los análisis químicos

de *S. bicolor*. Este tipo de estructuras también ha sido reportado por Cao *et al.*, y Mishra *et al.*, en bagazo de sorgo dulce recolectado en China [83] e India [32], respectivamente.

### 3.1.3. FT-IR de *S. bicolor* sin pretratamiento

En la Figura 10 se presenta el espectro de FT-IR del bagazo sin pretratamiento. Se pueden observar las bandas de absorción características de la biomasa lignocelulósica, como se explica a continuación.

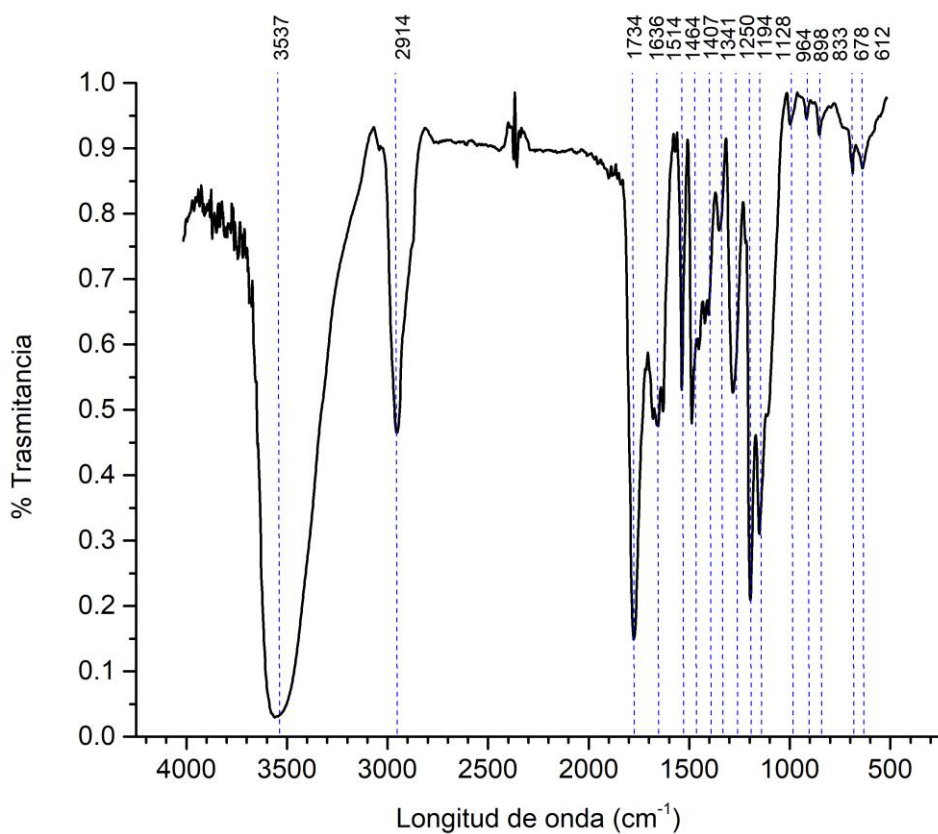


Figura 10. Espectro de FT-IR del bagazo de *S. bicolor* sin pretratamiento.

En el espectro se puede observar una banda de absorción intensa en la región 3300-3500  $\text{cm}^{-1}$  que se atribuye a los grupos funcionales (OH) de la lignina, y en la región 2800-3000  $\text{cm}^{-1}$  la banda que se relaciona con los enlaces (C-H) pertenecientes a los grupos metoxilo de los anillos base de la lignina, y a los enlaces (C-H) de la celulosa. Otra banda característica se observa a 1700  $\text{cm}^{-1}$  la cual es atribuida al grupo carbonilo (C=O) del éster que se forma por la unión de la hemicelulosa y la lignina [32]. Las bandas en las regiones de 1400 a 1600  $\text{cm}^{-1}$  son otra característica de los materiales lignocelulósicos debido a que corresponden a la vibración de los enlaces (C=C) del anillo aromático. Las bandas en la región a 1300  $\text{cm}^{-1}$  también son de importancia debido a que se relacionan con el grado de exposición de las fibras de celulosa y hemicelulosa. Así mismo, las bandas observadas en la región de 1000 a 1200  $\text{cm}^{-1}$  corresponden a los enlaces (C-O) que son característicos de los enlaces entre las moléculas que forman la lignina. La señal a 898  $\text{cm}^{-1}$  se relaciona con la exposición de los enlaces glucósidicos  $\beta$ -(1,4) de los carbohidratos. Las bandas que aparecen entre 250 y 650  $\text{cm}^{-1}$  se relacionan con las flexiones fuera del plano del enlace de un átomo de carbono con su grupo hidroxilo (C-OH), para los alcoholes. En la Tabla 5 se comparan las bandas de absorbancias obtenidas en este trabajo y las reportadas en la literatura para los diferentes grupos funcionales presentes en la biomasa del sorgo dulce.

La composición química, el análisis de la estructura morfológica (MEB) y el espectro FT-IR del bagazo mostraron su complejidad y su nivel de lignificación, lo que indica la pertinencia del pretratamiento de la biomasa para obtener los azúcares fermentables.

Tabla 5. Bandas de absorción de los materiales lignocelulósicos

Longitud de onda ( $\text{cm}^{-1}$ )			
Este trabajo	Referencia	Grupo funcional	Polímero
3557	3300-3500 [84, 85]	O-H	Celulosa y hemicelulosa
2914	2800-3000 [84, 85]	C-H y $\text{CH}_2$	Celulosa y hemicelulosa
1734	1700 [86, 87]	C=O	Hemicelulosa
1634,1514,1464	1600 -1400 [88]	C=C	Anillo aromático
1341	1370, [31]	$\text{CH}_3$	Estructura simétrica y deformación asimétrica de la celulosa y hemicelulosa
1250	1200, [89, 90]	C-O	Hemicelulosa, lignina
1194	1150, [91, 92]	C-O-C	Celulosa, hemicelulosa
964	1000, [85, 93]	C-O-C	Hemicelulosa
898	890, [86, 94]	C-O-C	Celulosa, hemicelulosa
833	833, [95]	C-H	Lignina
612,678	250-650	C-OH	Alcoholes

### 3.2. Actividad de la enzima lacasa

Posterior a la reactivación de la cepa del hongo Bm-2 en medio EMA, se verificó la producción de enzimas lacasas utilizando el mismo medio, adicionado con ABTS. El resultado obtenido fue la formación de un halo verde-azul oscuro alrededor del crecimiento micelial a las 96 h, producto de la oxidación del sustrato ABTS. Este resultado coincide con lo reportado por Niku-Paavola *et al.*, Tapia-Tussell *et al.*, y Chablé-Villacis [48, 74, 75]. Este resultado confirmó que la cepa produjo enzimas lacasas, con lo cual se procedió con la producción del extracto enzimático crudo.

Primero se realizaron dos experimentos en los que se utilizó el medio de cultivo YMPG adicionando salvado de trigo a granel (EXP1) y comercial (All Bran, Kellogg's) (EXP2). Esto con dos objetivos: primero, proveer los nutrientes necesarios para el crecimiento del hongo *T. hirsuta* Bm-2 y segundo, inducir la producción de enzimas lacasas debido a los compuestos fenólicos presentes en el salvado de trigo. La concentración enzimática obtenida en EXP1 fue de  $38 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$  a las 96 h de incubación. En EXP2 se observó un incremento importante en la actividad enzimática con  $1,118 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$ . El valor obtenido en EXP1 fue aproximadamente el doble de lo reportado por Tapia-Tussell *et al.* [48] los cuales usaron medio KIRK para la producción de la enzima y sin fuente de fenoles. EXP2 mostró una actividad de lacasa 30 veces mayor al valor obtenido en EXP1. Es posible que esto se deba a los suplementos (proteína 4g, grasa saturada 0.2 g, grasa monoinsaturada 0.2 g, grasa poliinsaturada 0.6 g, hidratos de carbono 26 g, azúcares 0.6 g, y sodio, 150 mg, reportados en 40 g de producto) que contiene el salvado de trigo comercial.

De acuerdo con los resultados obtenidos se decidió continuar con los experimentos sólo con el salvado de marca comercial, para inducir una mayor producción de la enzima utilizando el medio de cultivo KIRK (EXP3), la actividad obtenida a las 96 h de incubación fue de  $1,631 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$ . Este valor es similar a lo reportado por Zapata-Castillo *et al.* [49].

La actividad de la lacasa incrementó al adicionar salvado de trigo al medio de cultivo. Islas-Solís [51] también reportó un aumento de actividad enzimática de  $2,588 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$ , al agregar salvado de trigo comercial (All Bran, Kellogg's) al medio de cultivo.

Por último, se recuperaron 270 mL del extracto enzimático crudo, que se utilizó en los pretratamientos de la biomasa del *S. bicolor*.

### **3.3. Calentamiento del bagazo de *S. bicolor* como control del pretratamiento enzimático a 45 °C**

Vermerris y Nicholson [96] mencionaron que los grupos OH presentes en los compuestos fenólicos favorecen la solubilidad en agua y por ende su extracción. La lignina, la cual está compuesta de moléculas aromáticas, contiene gran cantidad de grupos OH, por lo que la temperatura juega un papel importante en la solubilidad y extracción de los compuestos fenólicos [97, 98]. Debido a este fenómeno, es necesario que los pretratamientos con el extracto crudo enzimático se comparen con controles en los que la biomasa lignocelulósica sea tratada solamente con agua y a la misma temperatura que el pretratamiento.

#### **3.3.1. Concentración de fenoles totales después del calentamiento del bagazo de *S. bicolor* a 45 °C**

La concentración de fenoles totales se midió cada 24 h durante 96 h de calentamiento de la biomasa sin adición del extracto enzimático crudo de *T. hirsuta* Bm-2. En la Figura 11 se muestra la concentración de los fenoles totales a los diferentes tiempos de calentamiento de la biomasa.

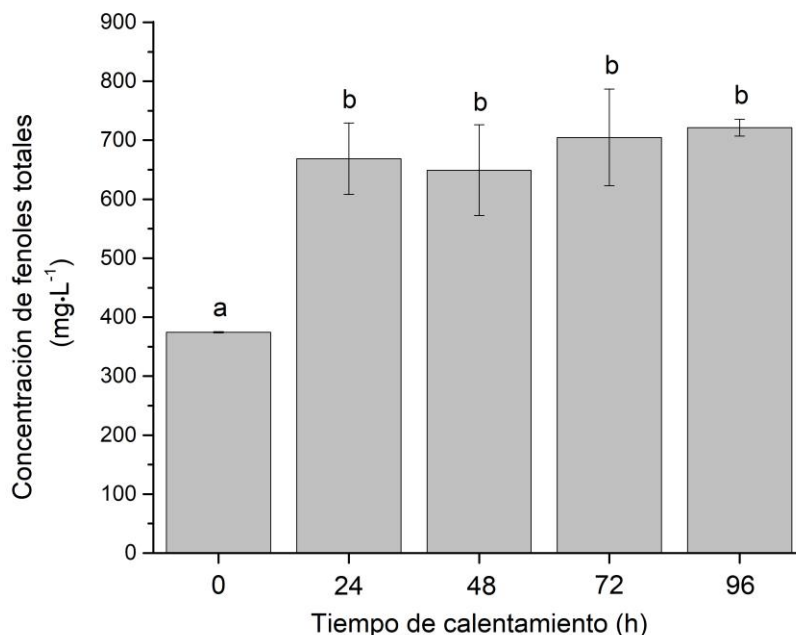


Figura 11. Concentración de fenoles totales respecto al tiempo de calentamiento de la biomasa a 45 °C.

La concentración inicial de fenoles fue de 374 mg·L<sup>-1</sup>, valor que se relaciona con el proceso de molienda de la biomasa, ya que debido al rompimiento mecánico de las fibras del bagazo ocurre una exposición parcial de los grupos OH de los biopolímeros que conforman la biomasa y que reaccionan con el reactivo Folin-Ciocalteu. A las 24 horas de calentamiento a 45 °C la concentración de fenoles fue de 668 mg·L<sup>-1</sup>, incremento que fue estadísticamente significativo. A las 48, 72 y 96 h de calentamiento, las concentraciones de fenoles totales fueron 649, 704 y 721 mg·L<sup>-1</sup>, respectivamente. Esto indica que la concentración de fenoles totales se mantuvo constante a partir de las 24 h. Tapia-Torres *et al.*, reportaron una concentración de fenoles totales de 414.3 mg de equivalentes de ácido gálico/g de madera fresca de *Litsea glaucescens* utilizando agua a 92 °C [99].

En este estudio, el análisis de la composición química del bagazo de sorgo indicó que 10.4 % de la biomasa es extraíble en agua caliente, lo que corrobora los resultados obtenidos en la concentración de fenoles totales cuando se calentó con agua solamente.



La temperatura contribuyó a la exposición de los grupos OH de la lignina y éstos pudieron ser oxidados por el reactivo.

### 3.3.2. Estructura microscópica del bagazo de *S. bicolor* calentado a 45 °C

Varios autores han reportado que la superficie de la biomasa de diferentes residuos lignocelulósicos siguen teniendo un aspecto liso después de los tratamientos químicos [31, 100, 101], físicos [36] y físico-químicos [34]. El aspecto mencionado se relaciona con la recalcitrancia de la lignina, la cual le permite resistir pretratamientos como los que se mencionaron con anterioridad. La Figura 12 muestra las fotomicrográficas del bagazo calentado por 96 h a 45 °C.

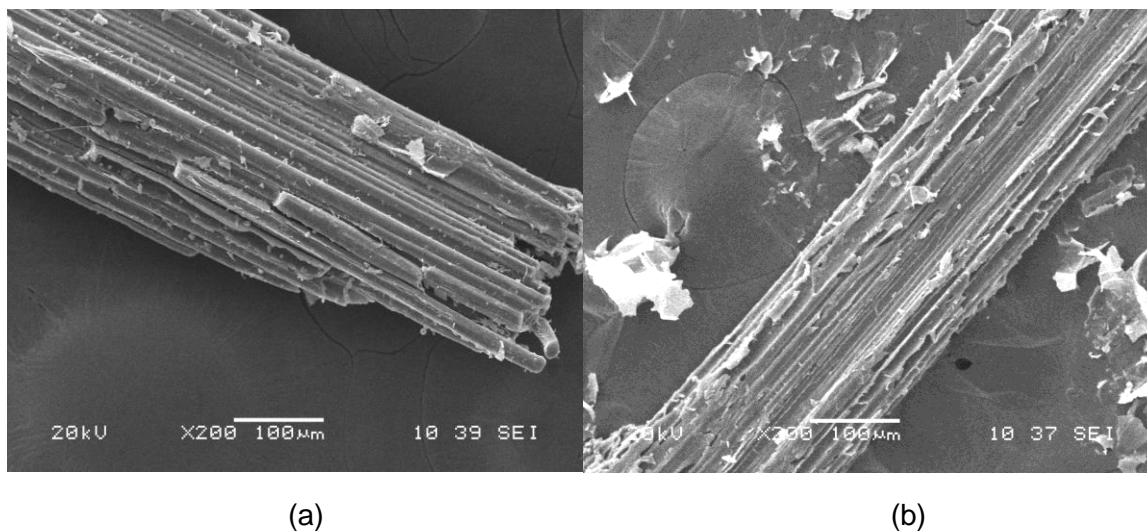


Figura 12. Estructura microscópica del bagazo de *S. bicolor*; (a) sin pretratamiento, y (b) calentada por 96 h a 45 °C.

Se observa que después de 96 h de calentamiento a 45 °C, hay un ligero daño en la superficie de la biomasa y la mayoría de las fibras se mantienen unidas, lo que explica la resistencia de la biomasa a los tratamientos térmicos. Vermerris y Nicholson [96] mencionaron que los grupos OH presentes en los compuestos fenólicos favorecen la solubilidad en agua y por ende su extracción, con base en la concentración de fenoles

obtenida con anterioridad se esperaba observar en las fotomicrografías un rompimiento estructural en la biomasa. Sin embargo, la temperatura solo mejora la disponibilidad de los grupos OH para medir la concentración de fenoles, pero no es suficiente para romper la lignina.

### 3.3.3. Análisis de FT-IR del bagazo de *S. bicolor* calentado a 45 °C

El análisis de FT-IR se realizó a la muestra con 96 h de calentamiento. La Figura 13 muestra el espectro FT-IR de la biomasa antes (negro) y después del calentamiento (rosado).

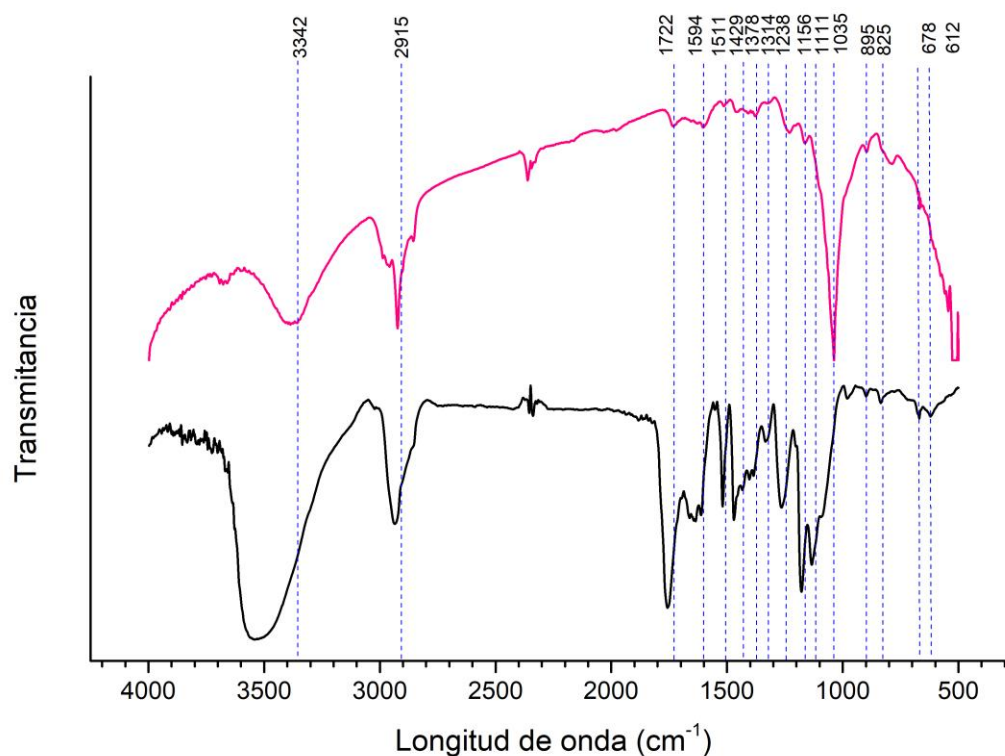


Figura 13. Espectros de FT-IR del bagazo de *S. bicolor*; sin pretratamiento (negro); calentado a 45 °C por 96 h (rosado).

El análisis de FT-IR de la biomasa calentada a 45 °C (línea rosada) mostró una reducción de la banda correspondiente a los grupos OH ( $3300-3500\text{ cm}^{-1}$ ), lo que puede deberse a que los extraíbles contienen estos grupos funcionales y al ser eliminados después del calentamiento, no son detectados en este análisis. En la región  $2800-3000\text{ cm}^{-1}$ , la banda que se relaciona con los enlaces (C-H) pertenecientes a los grupos metoxilo de los anillos base de la lignina, y a los enlaces (C-H) de la celulosa, disminuye, pero no significativamente, respecto a la biomasa inicial. Las bandas a  $1700$ ,  $1600$  y  $1400\text{ cm}^{-1}$  que corresponden a grupos éster de carbonilo, disminuyen. Estas señales están relacionadas con la unión de la hemicelulosa y la lignina [34], por lo que es posible que durante el calentamiento se produzca un reacomodo de la matriz lignocelulósica. Es necesario realizar más estudios para corroborar este efecto. El incremento de la banda en la región  $1000$  a  $1200\text{ cm}^{-1}$  que corresponde a los enlaces (C-O) característicos de los enlaces entre las moléculas que forman la lignina, indica que la conformación de la macromolécula cambió, y sus grupos carbonilo quedan más expuestos.

#### **3.3.4. Sacarificación del bagazo de *S. bicolor* calentado a 45 °C**

En el control (biomasa calentada a 45 °C) no se observó la producción de glucosa, por lo que se concluyó que no hubo sacarificación. Madadi *et al.*, resumen los factores que afectan la sacarificación: los relacionados con el sustrato y la enzima [62]. En este estudio, la sacarificación pudo haber sido afectada por la limitada superficie de acceso a la celulosa por el coctel de celulasas. Lo anterior revela que, solamente con un calentamiento a 45 °C, una cierta cantidad de grupos OH quedan expuestos, pero no se logra romper la estructura de la lignina. Lo cual corrobora con los análisis de FT-IR y microscopía electrónica de barrido presentados anteriormente.

### 3.4. Pretratamiento del bagazo de *S. bicolor* con el extracto enzimático crudo de *T. hirsuta* Bm-2 a 45 °C

Habiendo determinado el efecto debido al calentamiento de la biomasa a 45°C, se procedió a realizar el pretratamiento con el extracto enzimático crudo de *T. hirsuta* Bm-2.

#### 3.4.1. Fenoles totales del bagazo de *S. bicolor* pretratado a 45 °C

La Figura 14 muestra un aumento en la concentración de fenoles totales con respecto al tiempo de pretratamiento con el extracto enzimático crudo de *T. hirsuta* Bm-2 a 45 °C.

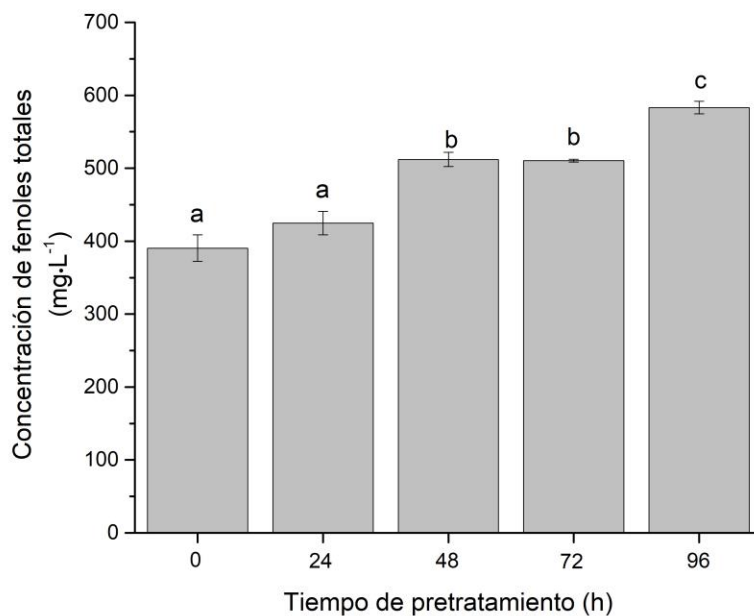


Figura 14. Concentración de fenoles del bagazo de *S. bicolor* respecto al tiempo de pretratamiento con el extracto enzimático crudo de *T. hirsuta* Bm-2 a 45 °C.

En la gráfica se puede observar que la concentración inicial es de 389 mg.L<sup>-1</sup>, a las 24 h de pretratamiento no hay un aumento significativo en la concentración de fenoles totales con respecto al inicio. A las 48 h se detectó un incremento de aproximadamente 25%, el cual se mantuvo hasta las 72 h de pretratamiento. A las 96 h se registró otro aumento,

para llegar a una concentración de fenoles totales de  $583 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  es decir, 33.1% más de lo que había al inicio del pretratamiento.

Contrariamente a lo esperado, las concentraciones de fenoles totales en el pretratamiento con el extracto enzimático crudo fueron menores que los valores obtenidos en el control. Esto puede explicarse si se considera el mecanismo de catálisis de la enzima lacasa. En el pretratamiento, la temperatura contribuye con la disponibilidad de los grupos OH de la lignina, pero la enzima los oxida y reduce el oxígeno a agua, por lo tanto, cuando se utiliza el reactivo Folin-Ciocalteu, la disponibilidad de los grupos OH se ha reducido, con lo cual la concentración de los fenoles totales es menor.

Soares *et al.*, [102] en su estudio reportó una concentración de ácido 4-hidroxibenzoico superior a los  $500 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  después de un pretratamiento químico. Esta es una molécula aromática de la que está compuesto principalmente el mesocarpio del coco. Esta biomasa tiene un porcentaje de lignificación superior al sorgo, lo cual indica que los resultados obtenidos del pretratamiento del bagazo de sorgo dulce con el extracto enzimático crudo de *T. hirsuta* Bm-2, es eficiente.

La confirmación de la acción enzimática del extracto crudo de *T. hirsuta* Bm-2 en la biomasa de *S. bicolor* durante el pretratamiento se complementó con los análisis por microscopía electrónica de barrido y espectroscopía de transformada de Fourier.

#### **3.4.2. Estructura microscópica del bagazo de *S. bicolor* pretratado a 45 °C**

Antes de realizar la microscopía, se efectuó un análisis visual debido a que Sun *et al.* [81], mencionaron que en su estudio, el cambio de color está relacionado con la acción de deslignificación en el pretratamiento biológico de bagazo de maíz por *T. hirsuta*. El color original del bagazo de sorgo sin pretratamiento es marrón claro, y se observó que después del pretratamiento enzimático dicha tonalidad cambió, tornándose el color más claro, como se muestra en la Figura 15.

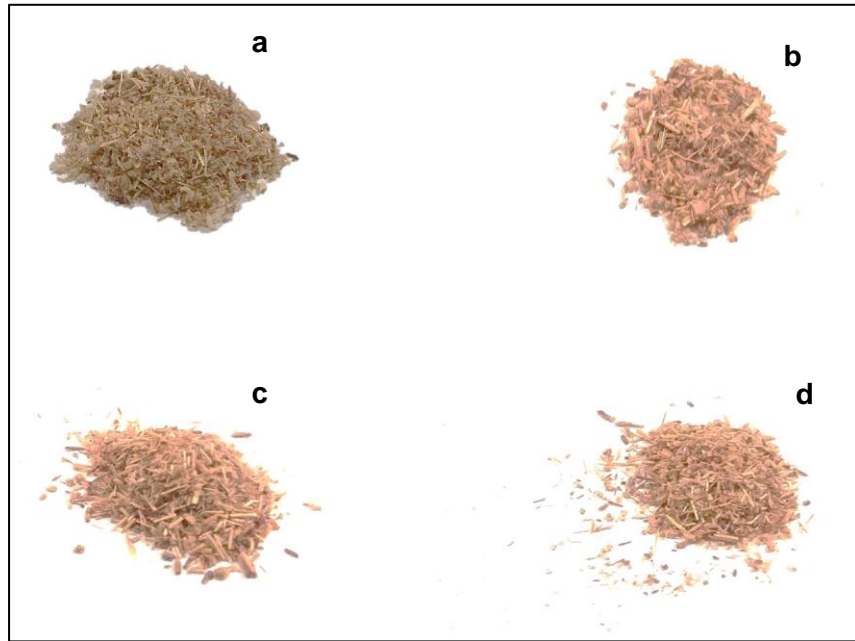


Figura 15. Coloración del bagazo de *S. bicolor*. a) control; b, c y d) con pretratamiento a 45 °C, por 48, 72, y 96 h, respectivamente.

Estas observaciones se complementaron con los análisis de microscopía electrónica de barrido (MEB) de la biomasa de *S. bicolor* con diferentes tiempos del pretratamiento con el extracto enzimático a 45 °C (Figura 16).

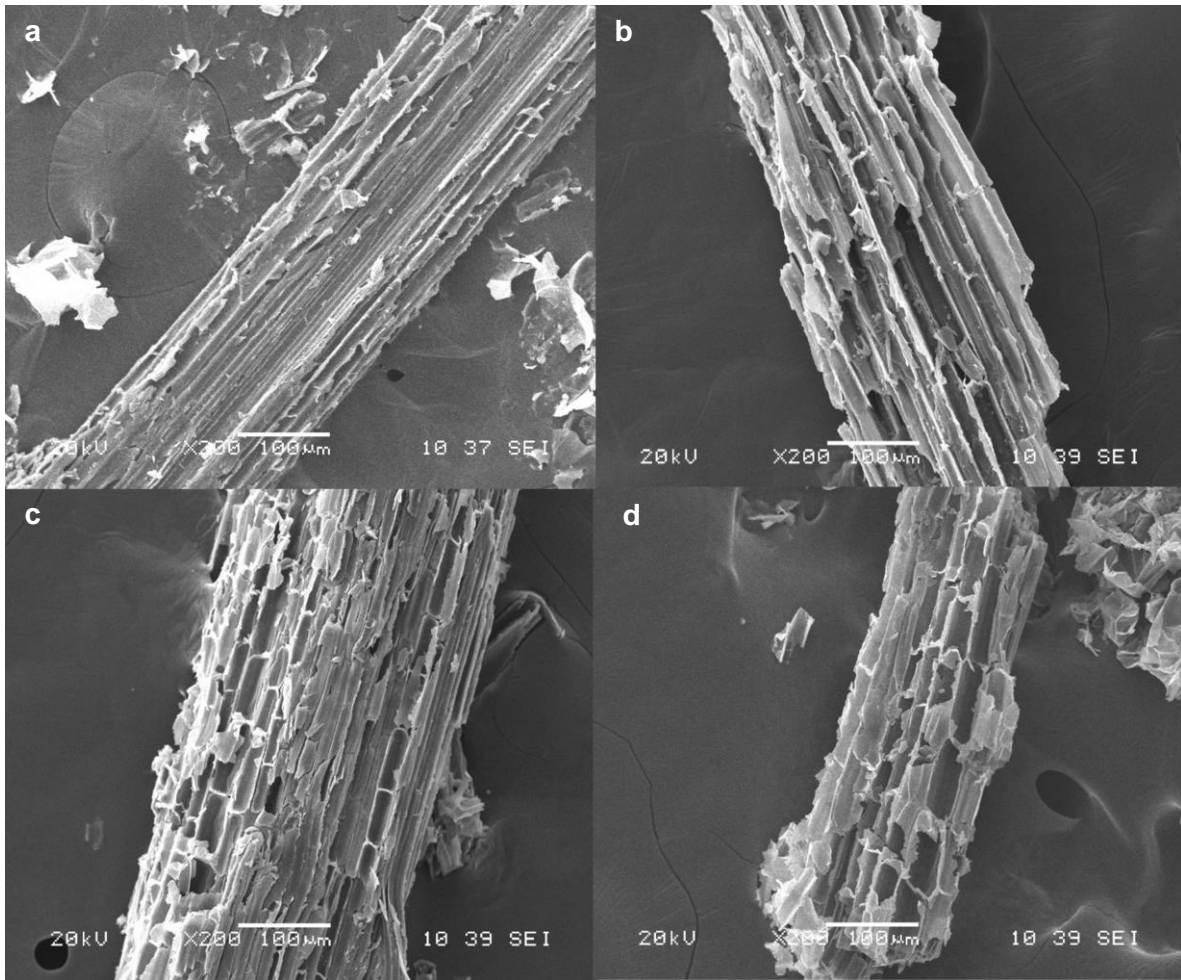


Figura 16. Estructura microscópica del bagazo de *S. bicolor*. a) control. Pretratamiento con el extracto enzimático crudo de *T. hirsuta* Bm-2 a 45 °C: b) 48 h, c) 72 h y d) 96 h.

Las imágenes muestran que los cambios estructurales causados por el pretratamiento con el extracto enzimático crudo a 45 °C fueron similares en los diferentes tiempos de exposición de la biomasa. Se observó el desordenamiento de las fibras en comparación con el control. Esta modificación puede deberse al rompimiento de los enlaces C-C de los anillos aromáticos y la oxidación de los grupos OH de la lignina por acción del extracto enzimático crudo. Cao *et al.* [83] utilizaron un pretratamiento físico-químico en el bagazo de sorgo dulce, con lo cual la superficie de la biomasa era blanda, después del pretratamiento. Los cambios estructurales obtenidos por el pretratamiento enzimático en este trabajo son similares a los obtenidos por Sun *et al.*, [81] y Mishra *et al.*, [32] en el pretratamiento biológico del bagazo de maíz y sorgo dulce, respectivamente. La diferencia

radica en el tiempo. Ellos reportan un cambio estructural diferente a su control hasta los 21 días de pretratamiento mientras que, en este estudio, en las primeras 48 h la modificación de la biomasa se hace evidente. Mishra *et al.*, [32] utilizaron en su estudio bagazo de sorgo dulce pretratado con *Coriolus versicolor*. La diferencia igualmente, es el tiempo de pretratamiento, el cual fue de 30 días.

Varios autores han reportado que la superficie de la biomasa de diferentes residuos lignocelulósicos sigue teniendo un aspecto liso después de los tratamientos químicos [31, 100, 101], físicos [36] y físico-químicos [34]. El aspecto mencionado se relaciona con la recalcitrancia de la lignina, la cual le permite resistir pretratamientos como los que se mencionaron con anterioridad. El aspecto liso que mencionan los diferentes autores en el control después de 96 h de pretratamiento se conserva, pero se pierde con la adición del extracto enzimático crudo.

Como el daño estructural observado en el bagazo de sorgo dulce pretratado con el extracto enzimático crudo de *T. hirsuta* Bm-2, fue similar en los diferentes tiempos de pretratamiento, se realizó un análisis de FT-IR para confirmar si existía en el tiempo de pretratamiento un efecto de deslignificación de la biomasa.

### **3.4.3. Análisis de FT-IR del bagazo de *S. bicolor* pretratado a 45 °C**

El análisis de FT-IR se realizó a los tiempos de pretratamiento de 48, 72 y 96 h. La Figura 17 muestra los espectros de FT-IR correspondientes. Es necesario señalar que no se presentan los resultados de la muestra del pretratamiento a 45°C por 24 h, debido a que presentó la misma concentración de fenoles que el tiempo de pretratamiento a 48 h.

El análisis de FT-IR del control (línea rosada) confirmó que la temperatura influye en la exposición de los grupos OH de la biomasa del sorgo dulce, al mostrar una reducción importante de la banda correspondiente, con respecto a la biomasa sin pretratar. Además, la disminución de las bandas en las regiones de 2800–3000, 1700, 1400–1600, 1500, 1000 y 890  $\text{cm}^{-1}$  (línea azul), corroboran la modificación de la biomasa por efecto



solamente de la temperatura. Después de 48 h de pretratamiento con el extracto crudo de *T. hirsuta* Bm-2, solamente se observa el efecto de la temperatura, al ser el espectro de esta muestra similar al del control.

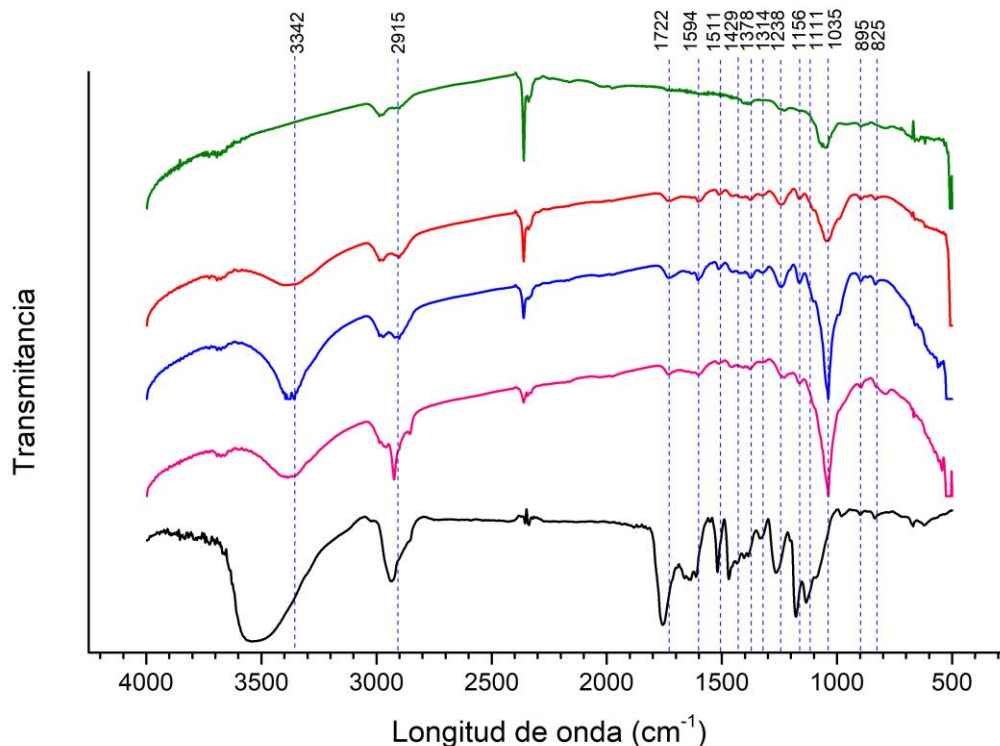


Figura 17. Espectros de FT-IR del bagazo de *S. bicolor* pretratado con el extracto enzimático crudo de *T. hirsuta* Bm-2 a 45 °C. Biomasa sin pretratamiento (negro), control sin extracto crudo (rosado), muestras pretratadas por 48 (azul), 72 (roja) y 96 h (verde)

El espectro de infrarrojo del pretratamiento por 72 h, muestra una disminución importante de las bandas en las regiones de 3300–3500, 1200 y 1000  $\text{cm}^{-1}$  indicando una mayor acción enzimática a este tiempo. Estos resultados son interesantes, debido a que en el análisis de fenoles totales no se encontró diferencia estadística significativa entre los tiempos de pretratamiento a 48 y 72 h. El espectro del pretratamiento por 96 h, muestra una disminución drástica en todas las bandas, sobresaliendo la región de 3300-3500  $\text{cm}^{-1}$ , donde la banda de absorción desaparece por completo. El mismo efecto se pudo observar a 1400, 1500, 1600 y 1700  $\text{cm}^{-1}$ . La disminución de estas bandas indica un proceso de deslignificación de la biomasa.

Lopes-Silva [34] utilizó un pretratamiento de explosión de vapor con NaOH en el bagazo de caña de azúcar. El resultado obtenido en su análisis por FT-IR fue el incremento de la intensidad de las bandas en las regiones de 3300, 2900, 1735, 1600, 1500-830  $\text{cm}^{-1}$ , lo que indica que los grupos hidroxilo permanecieron intactos y más expuestos después del pretratamiento. En los resultados obtenidos con el pretratamiento del bagazo de sorgo dulce con el extracto enzimático crudo de *T. hirsuta* Bm-2 a 45 °C, las bandas disminuyen, lo que se explica por la catálisis enzimática de las lacasas presentes en el extracto. La disminución de la intensidad de las bandas coincide con lo reportado por Mishra *et al.* [32], quienes utilizaron el bagazo de sorgo dulce como sustrato esterilizado (121 °C/15 min) y un pretratamiento biológico con *Coriolus versicolor* por 30 días.

La Tabla 6 muestra la comparación de las bandas presentes en los espectros de las muestras pretratadas a 45 °C con el extracto enzimático crudo y las citadas en la literatura. Independientemente del pretratamiento, en el caso del bagazo de sorgo dulce, las bandas de absorción aparecen a longitudes de onda que se relacionan con la lignina, hemicelulosa y celulosa. La diferencia radica en la intensidad de las bandas, indicando diferentes grados de deslignificación.

Tabla 6. Bandas de absorción del bagazo de *S. bicolor* pretratado con el extracto enzimático crudo de *T. hirsuta* Bm-2 a 45 °C por 96 h comparado con otros pretratamientos

Pretratamiento					
control	enzimático	biológico [32]	químico [69]	Grupo funcional	Polímero
Longitud de onda (cm <sup>-1</sup> )					
3557	3342	3418	3451	O-H	Celulosa y hemicelulosa
2914	2915	2930	2938 2838	C-H y CH <sub>2</sub>	Celulosa y hemicelulosa
1734	1722			C=O	hemicelulosa
1634	1594	1638	1652	C=C	Anillo aromático
1514	1511		1598 1507		
1464	1429	1435	1420		
1341	1378		1329	CH <sub>3</sub>	Estructura simétrica y deformación asimétrica de la celulosa y hemicelulosa
1250	1238		1221	C-O	Hemicelulosa, lignina
1194	1156 1111 1035	1130	1163	C-O-C	Celulosa, hemicelulosa
964			981	C-O-C	Hemicelulosa
898	895			C-O-C	Celulosa, hemicelulosa
833	825		831	C-H	lignina
612 , 678				C-OH	Alcoholes

#### 3.4.4. Sacarificación del bagazo de *S. bicolor* pretratado a 45 °C

Como los resultados de los análisis de fenoles totales y de FT-IR indicaron que los tiempos de pretratamiento por 72 y 96 h tienen mayor efecto de deslignificación, la sacarificación de la biomasa pretratada sólo se realizó a estos tiempos.

La Figura 18 muestra las concentraciones de glucosa obtenidas mediante el análisis de cromatografía líquida de alta resolución a las 24 y 48 h de sacarificación de los pretratamientos por 72 y 96 h con el extracto enzimático crudo de *T. hirsuta* Bm-2 a 45 °C.

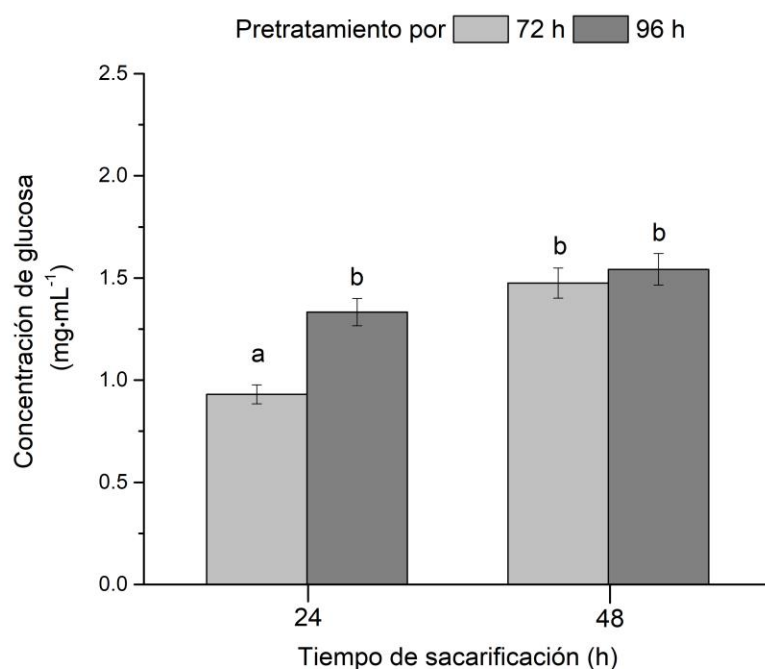


Figura 18. Concentración de glucosa con respecto al tiempo de sacarificación del bagazo de *S. bicolor* pretratada con el extracto enzimático crudo de *T. hirsuta* Bm-2 por 72 y 96 h a 45°C.

Con la biomasa pretratada por 72 h se obtuvo una concentración de glucosa de 0.9 mg·mL<sup>-1</sup> a las 24 h, incrementando a 1.4 mg·mL<sup>-1</sup> a las 48 h de sacarificación. La biomasa pretratada por 96 h presentó una concentración de 1.3 mg·mL<sup>-1</sup> a las 24 h y de 1.5 mg·mL<sup>-1</sup> a las 48 h de sacarificación. El análisis estadístico de la concentración de glucosa, señaló que hay diferencia en las primeras 24 h de sacarificación entre los

pretratamientos de 72 y 96 h (letras distintas) y que no existe diferencia entre ambos pretratamientos a las 48 h de sacarificación (letras iguales).

Los resultados indicaron que el bagazo de sorgo dulce pretratado por 96 h a 45 °C con el complejo enzimático Acellerase 1500<sup>®</sup> produjo más glucosa conforme se incrementó el tiempo de sacarificación, obteniendo a las 48 h la máxima concentración de glucosa. Sin embargo, la concentración de glucosa es baja en comparación con lo reportado por Equihua-Sánchez [29] donde se alcanzó una concentración de 100 mg·mL<sup>-1</sup> de glucosa con el bagazo de sorgo dulce con un pretratamiento químico. Goshadrou *et al.*, [103] en su estudio reporta una concentración de 0.9 g de glucosa/gramo de biomasa de sorgo dulce expuesta a un pretratamiento físico-químico. Mishra *et al.*, reportaron una concentración de 312 mg·g<sup>-1</sup> de bagazo de sorgo dulce pretratado biológicamente con *C. versicolor* [32].

El coctel de celulasas Acellerase 1500<sup>®</sup>, contiene dos principales celulasas: endoglucanasas y glucosidasas que, aunque actuaron sinérgicamente en la sacarificación de la biomasa pretratada, la falta de celobiohidrolasas afectó el rendimiento de la sacarificación.

### 3.5. Calentamiento del bagazo de *S. bicolor* como control del pretratamiento enzimático a 50 °C

Con el pretratamiento a 45 °C se demostró que el extracto enzimático crudo de Bm-2 modifica la estructura de la biomasa de sorgo dulce. Basado en los resultados reportados por Vermerris y Nicholson; Al-Farsi *et al.*, y Wang *et al.*, [96-98], los cuales indican que la temperatura influye en la exposición de los grupos hidroxilos en la biomasa lignocelulósica, es de esperar que a 50 °C la designificación sea mayor. Como control se calentó la biomasa de sorgo dulce a 50 °C sin el extracto enzimático.

#### 3.5.1. Concentración de fenoles totales después del calentamiento del bagazo de *S. bicolor* a 50 °C

La concentración de fenoles totales se midió cada 24 h durante 96 h de calentamiento. En la Figura 19 se presenta la concentración de los fenoles totales en el control, con respecto al tiempo.

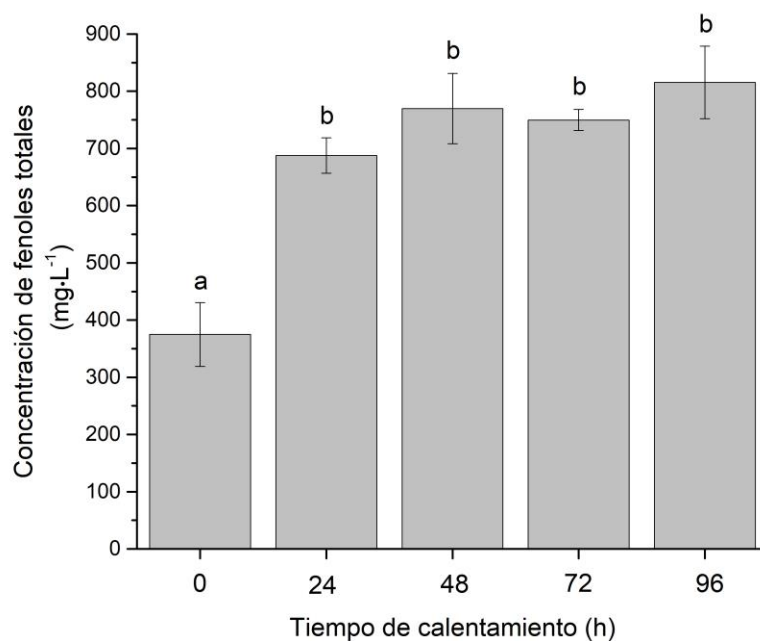


Figura 19. Concentración de fenoles totales respecto al tiempo de calentamiento de la biomasa a 50 °C.

Las concentraciones de fenoles totales al final de los experimentos fueron: 374, 687, 769, 749 y 815 mg·L<sup>-1</sup> para los tiempos 0, 24, 48, 72 y 96 h de calentamiento, respectivamente. Como se mencionó en el experimento a 45 °C, la detección de fenoles totales en el tiempo 0 se atribuye a la molienda del bagazo de sorgo dulce, que logra causar daño a los biopolímeros que la conforman. Se encontró una diferencia de 19, 120, 100, 45 y 94 mg·L<sup>-1</sup> en los valores de fenoles totales con respecto al control en el calentamiento a 45 °C. Estas diferencias son estadísticamente iguales (a 45 y 50 °C) para los tiempos de 0, 24 y 72 h, y son estadísticamente diferentes para los tiempos de calentamiento de 48 y 96 h, por lo que no se puede inferir si hay un efecto de la temperatura en la exposición de los grupos hidroxilo presentes en la biomasa lignocelulósica.

### 3.5.2. Estructura microscópica del bagazo de *S. bicolor* calentado a 50 °C

Se esperaba que el aumento de 5 °C respecto al calentamiento de 45 °C contribuyera en la modificación estructural de la biomasa de sorgo dulce. La Figura 20 muestra las fotomicrografías del bagazo de *S. bicolor* calentado por 96 h.

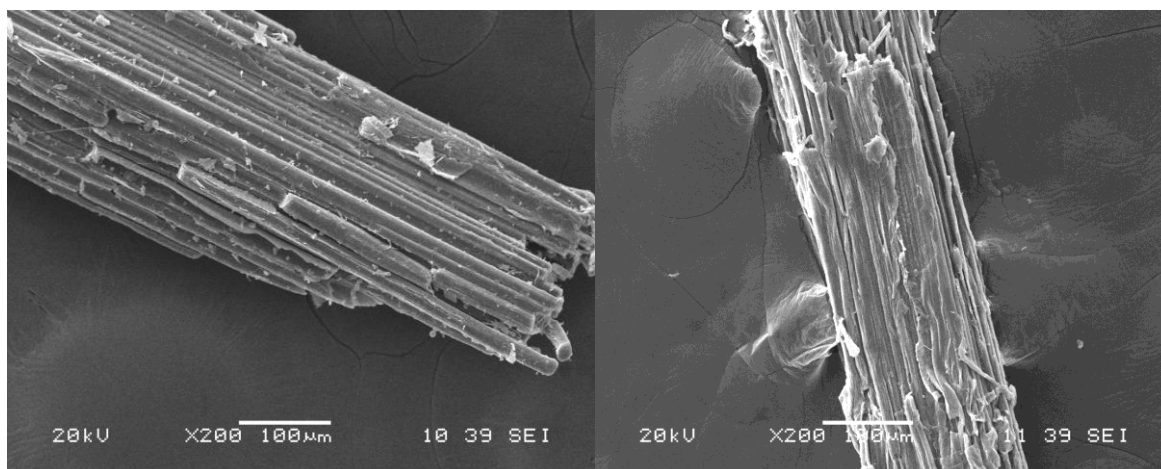


Figura 20. Estructura microscópica del bagazo de *S. bicolor*; (a) sin pretratamiento, y (b) calentada por 96 h a 50 °C.

Las fotomicrografías muestran que la superficie de la biomasa sigue conservando un aspecto liso después de 96 h de calentamiento a 50 °C, similar a la biomasa sin pretratamiento, el contenido de lignina de las paredes celulares de *S. bicolor* le confieren resistencia a distintos tratamientos como; los químicos, físicos y fisicoquímicos, lo que coincide con Goncalves *et al.*, 2014, Lopes-Silva *et al.*, 2017, De la Torre *et al.*, 2017, Brígida *et al.*, 2010 y Nlewen *et al.*, 2010. La fotomicrografía 20b corrobora que la eficiencia del pretratamiento depende de la estructura física de la biomasa, la composición química y de las condiciones de pretratamiento como lo mencionan Agbor *et al.*, 2011, Shindu *et al.*, 2016, Sun *et al.*, 2016, Shirkavand *et al.*, 2016 y Sharma *et al.*, 2017.

### 3.5.3. Análisis de FT-IR del bagazo de *S. bicolor* calentado a 50 °C

La Figura 21 muestra el espectro FT-IR del bagazo de *S. bicolor* calentado por 96 h a 50 °C.

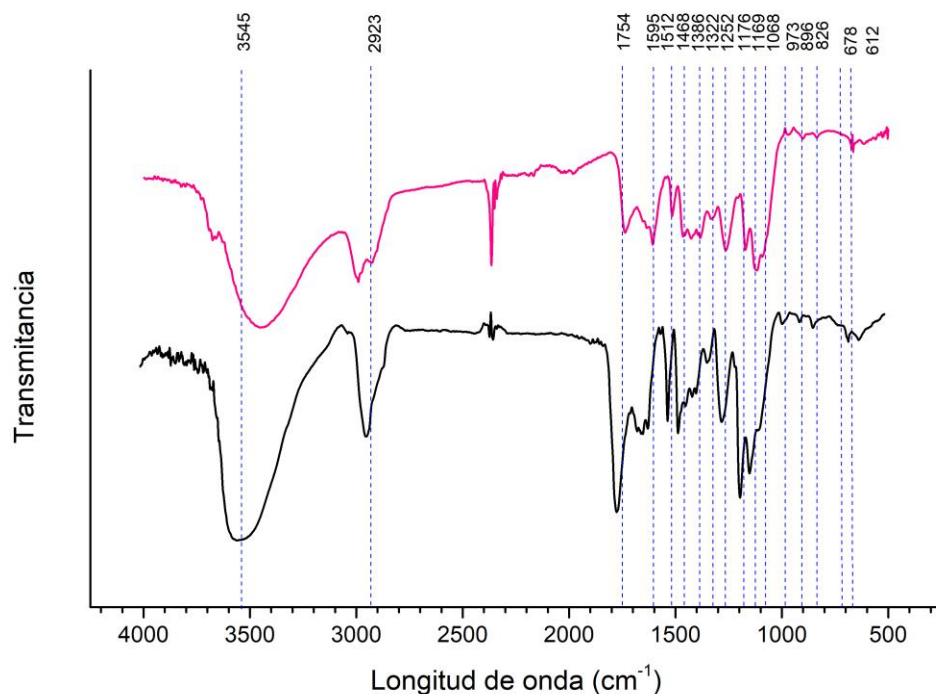


Figura 21. Espectros de FT-IR del bagazo de *S. bicolor*; sin pretratamiento (negro); calentado a 50 °C por 96 h (rosado).



Al comparar los espectros de FT-IR de la biomasa inicial y la calentada a 50 °C se pudo observar una disminución de las principales bandas que corresponden a los grupos funcionales presentes en la biomasa estudiada. Disminuyeron las bandas en las regiones 3300-3500  $\text{cm}^{-1}$  que se atribuye a los grupos funcionales (OH) de la lignina; 2800-3000  $\text{cm}^{-1}$  que se relaciona con los enlaces (C-H) pertenecientes a los grupos metoxilo de los anillos base de la lignina, y a los enlaces (C-H) de la celulosa; 1700, 1400 a 1600, 1300, 1000 a 1200, 800 a 900 y de 600 a 700  $\text{cm}^{-1}$ , correspondientes a los grupos carbonilo característicos de la unión de la hemicelulosa y la lignina, mostraron una disminución, pero no significativa, lo que indica que la biomasa sigue conservando su estructura molecular [34].

#### **3.5.4. Sacarificación del bagazo de *S. bicolor* calentado a 50 °C**

Al igual que en el control a 45 °C, en el análisis por HPLC de las muestras sacarificadas del control a 50 °C, no se detectó la presencia de glucosa, concluyendo que el proceso de sacarificación no se llevó a cabo.

#### **3.6. Pretratamiento del bagazo de *S. bicolor* con el extracto enzimático crudo de *T. hirsuta* Bm-2 a 50 °C**

##### **3.6.1. Fenoles totales del bagazo de *S. bicolor* pretratado 50 °C**

La Figura 22 muestra la concentración de los fenoles totales del pretratamiento de la biomasa de sorgo dulce con el extracto enzimático crudo de *T. hirsuta* Bm-2 a 50 °C.

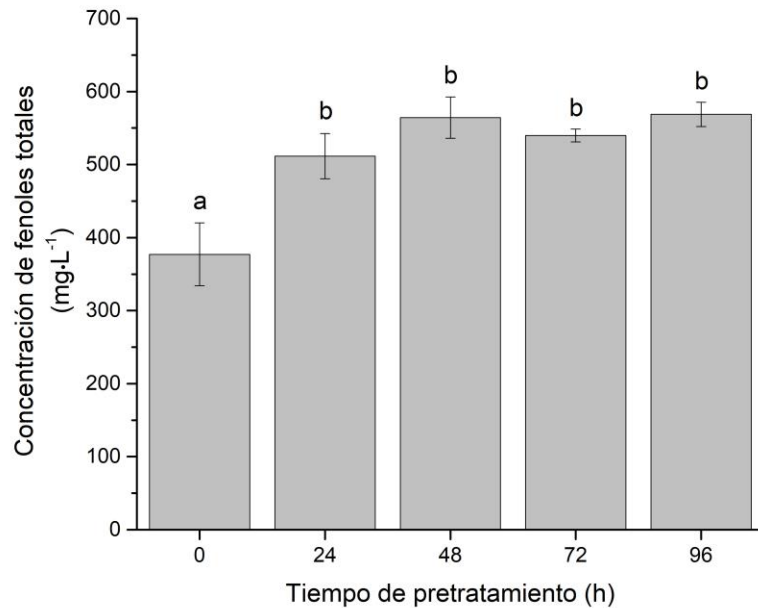


Figura 22. Concentración de fenoles del bagazo de *S. bicolor* respecto al tiempo de pretratamiento a 50 °C.

A las 24 h se registró un incremento en la concentración de los fenoles totales de 134.4 mg·L<sup>-1</sup> con respecto al inicio y se mantuvo igual (estadísticamente) hasta las 96 h de pretratamiento. Estos resultados son similares al pretratamiento a 45 °C. Esto es probablemente debido a que la temperatura contribuye a la disponibilidad de los grupos hidroxilos, luego las enzimas los oxidan y reducen el oxígeno molecular, por ello, la concentración de fenoles después del pretratamiento es menor que en el control.

La comparación de las concentraciones de fenoles totales de ambos pretratamientos, se muestra en la Figura 23.

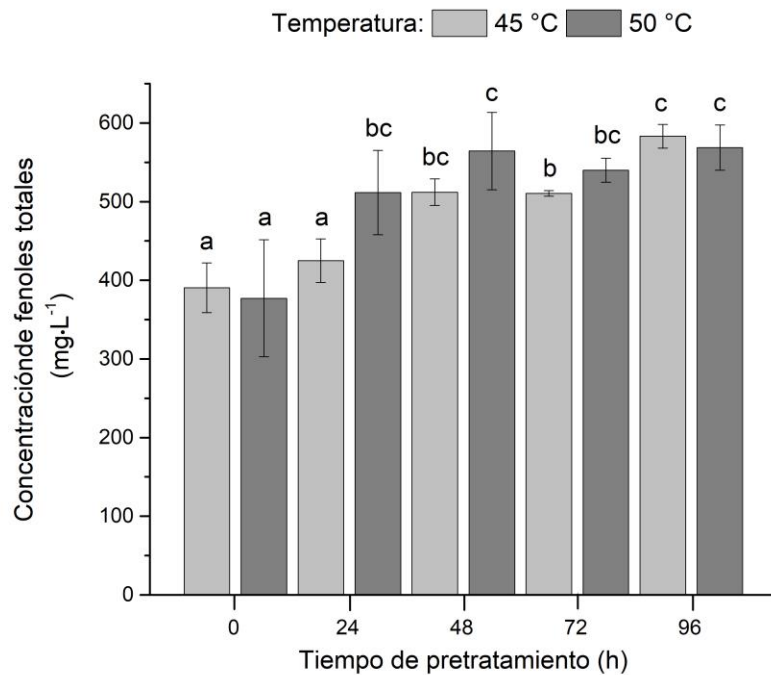


Figura 23. Comparación de las concentraciones de fenoles totales en los pretratamientos con el extracto enzimático crudo de *T. hirsuta* Bm-2 a 45 y 50 °C.

No existe diferencia estadística significativa para el tiempo 0, la concentración se relaciona con el proceso de molienda del bagazo de sorgo dulce. Para el tiempo 24, existe una diferencia entre los pretratamientos a 45 y 50 °C la cual es estadísticamente significativa. Para los tiempos 48, 72 y 96 h de pretratamiento, nuevamente no se encontró una diferencia estadísticamente significativa.

### 3.6.2. Estructura microscópica del bagazo de *S. bicolor* a 50 °C

El cambio de la tonalidad marrón del bagazo de sorgo dulce molido, también se presentó durante el pretratamiento de la biomasa con el extracto enzimático crudo a 50 °C. En la Figura 24 se muestran las diferentes tonalidades de la biomasa pretratada.

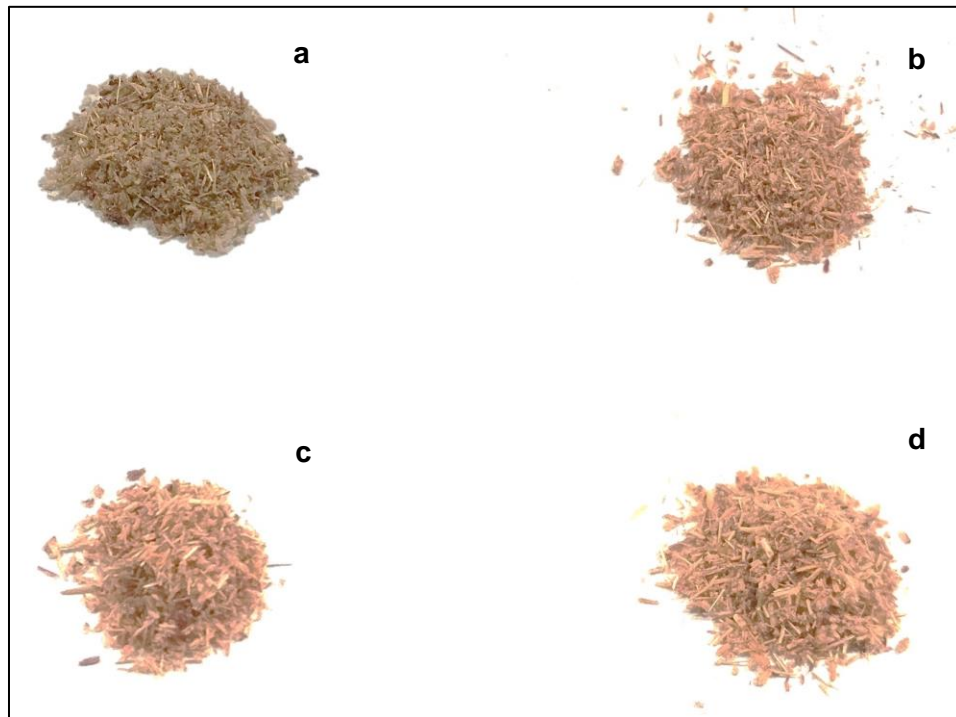


Figura 24. Coloración del bagazo de *S. bicolor*. a) calentamiento por 96 h; b, c y d) con pretratamiento enzimático a 50°C, por 48, 72, y 96 h, respectivamente.

Se puede observar el cambio de tonalidad en los diferentes tiempos del pretratamiento enzimático. La disminución del color fue significativa a las 48 h de pretratamiento, y éste siguió aclarándose en el transcurso del pretratamiento.

En la Figura 25 se muestran las fotomicrográficas del bagazo de sorgo dulce pretratado enzimáticamente a 50 °C durante 48, 72 y 96 h.

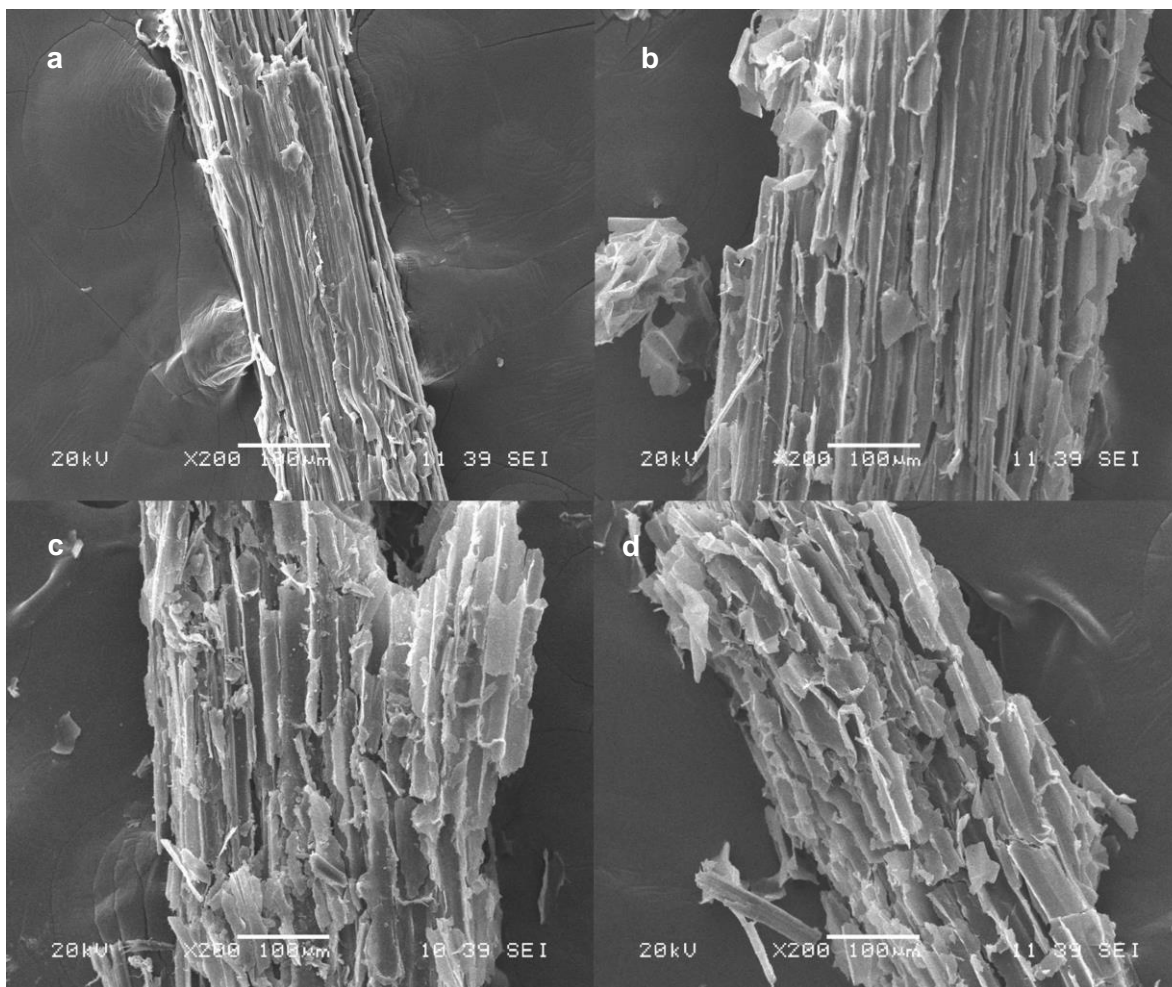


Figura 25. Estructura microscópica del bagazo de *S. bicolor*. Sin pretratamiento: a) control. Pretratamiento a 50 °C: b) 48 h, c) 72 h y d) 96 h.

Los resultados de la microscopía electrónica de barrido mostraron una diferencia estructural evidente entre el control y las muestras con el extracto enzimático crudo a 50 °C. También se puede observar como a medida que pasa el tiempo, las fibras se ven más deterioradas. En el control se observa una superficie de aspecto liso que limitó la acción de hidrólisis. A este respecto, Madadi *et al.*, [62] y Choudhary *et al.*, [104] reportaron que cuando las fibras de sorgo son pretratadas con microondas, se rompe la estructura de la pared celular, permitiendo un mayor acceso de las enzimas para la sacarificación.

A modo de comparación, la Figura 26 muestra las estructuras de diferentes muestras de bagazo de sorgo obtenidas en este estudio: sin pretratamiento, los controles a 45 y 50 °C por 96 h y la biomasa pretratada con el extracto enzimático crudo por 96 h a 45 y 50 °C.

También se presentan muestras de biomasa a las que se le realizó pretratamiento enzimático, biológico, químico y físico, reportados en la literatura.

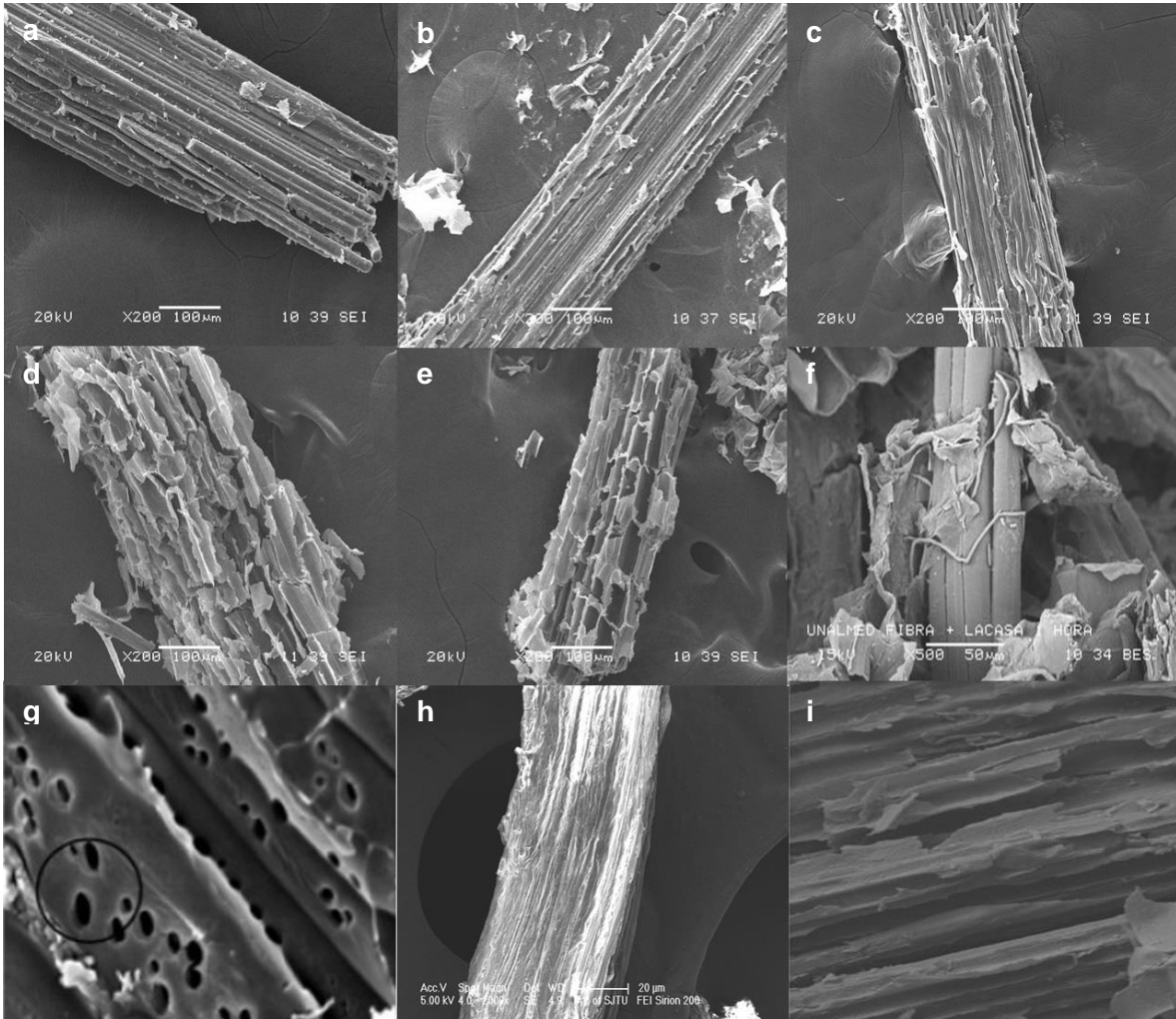


Figura 26. Modificación de la estructura del bagazo de sorgo por diversos pretratamientos: a) sin pretratamiento, b) control pretratado por 96 h a 45 °C, c) control pretratado por 96 h a 50 °C, d) pretratado con el extracto enzimático crudo de Bm-2 por 96 h a 45 °C, e) pretratado con el extracto enzimático crudo de Bm-2 por 96 h a 50 °C, f) fibras de plátano pretratadas por 1 h con una enzima comercial lacasa de *Aspergillus oryzae* [105], g) bagazo de sorgo dulce pretratado con *Coriolus versicolor* (actualmente sinónimo de *Trametes versicolor*) por 30 días [32], h) bagazo de sorgo dulce pretratado con 20 % de NaOH por 60 min a 121 °C [83], i) bagazo de sorgo dulce pretratado con microondas [104].

Se puede observar que la estructura de la biomasa lignocelulósica puede presentar diferencias dependiendo del tipo del pretratamiento al que haya sido sometida. Como se mencionó, la modificación de la superficie del bagazo de sorgo dulce (Figuras 26d y 26e) es evidente con el extracto enzimático crudo de *T. hirsuta* Bm-2 respecto a la biomasa sin pretratamiento (Figura 26a) y los controles (Figuras 26b y 26c). Las fibras del plátano (Figura 26f) mantuvieron su aspecto liso después de que fueron pretratadas con una lacasa comercial. Es posible que el tiempo del pretratamiento (1 h) no haya sido suficiente para provocar una modificación estructural de la biomasa. La Figura 26g muestra los orificios en la biomasa que fueron provocados por la acción enzimática del hongo *Coriolus versicolor*. Este daño a la biomasa puede llegar hasta la holocelulosa, provocando una disminución de los azúcares disponibles. Esto, aunado a la desventaja de tener un tiempo de pretratamiento prolongado [32] hace que este tipo de pretratamiento necesite de más estudios como la optimización del tiempo de pretratamiento y la obtención de carbohidratos de interés [130]. El pretratamiento químico mostrado en la Figura 26h resultó en una biomasa más susceptible a la sacarificación. Las fibras están expuestas pero completas. Su desventaja: la remoción del químico utilizado en el pretratamiento. En la Figura 26i del bagazo de sorgo pretratado con microondas, se observa una destrucción de la superficie de la biomasa similar a los pretratamientos con el extracto enzimático crudo de *T. hirsuta* Bm-2 de este trabajo.

### 3.6.3. Análisis FT-IR del bagazo de *S. bicolor* pretratado a 50 °C

Martinez-Yepe [106] mencionó que el licor de lignina utilizado en la obtención de la vainillina se caracteriza por la intensidad y el ancho de las bandas de absorción, destacando las regiones 3500, 2115 y 549  $\text{cm}^{-1}$ . Su banda más característica se encuentra en la región de 1650  $\text{cm}^{-1}$ , que representa el estiramiento de los enlaces C=O de los grupos cetónicos que se encuentran en la lignina. Finalmente, la banda a 1400  $\text{cm}^{-1}$  la relaciona con el esqueleto del anillo aromático de la lignina. Estas son las bandas de las que se espera un cambio con el pretratamiento.

En la Figura 27a se muestran los espectros de FT-IR del pretratamiento del bagazo de sorgo con el extracto enzimático crudo de Bm-2 a 50 °C.

Se observa una disminución en la intensidad de la banda a 3300–3500  $\text{cm}^{-1}$  (oxidación de los grupos OH de la lignina) entre la biomasa sin tratar y el control calentado a 50 °C. En el caso del pretratamiento con el extracto del hongo, no se observan cambios significativos de esta banda, lo cual indica que no hay deslignificación. Los cambios durante el pretratamiento se produjeron en la región 800–1800  $\text{cm}^{-1}$ , como se puede observar en el aumento realizado a esta región mostrado en la Figura 27b.

Se puede observar que en los pretratamientos a 48, 72 y 96 h, una disminución leve de la intensidad de la banda a 1500  $\text{cm}^{-1}$  atribuible a los enlaces C-O de la lignina, así como de las bandas de las regiones 1600, 1000–1400, 830 y 890  $\text{cm}^{-1}$  que se atribuyen al rompimiento del enlace éster entre la hemicelulosa y la lignina.

Aunque leve, la disminución en la intensidad de las bandas de absorción de los espectros de los pretratamientos, indica que hay cambios estructurales de la biomasa (deslignificación) en el tiempo debido a la acción del extracto enzimático.

En el caso de pretratamientos químicos de biomasa lignocelulósica, se puede encontrar en la literatura trabajos que indican un aumento de todas las bandas de absorción [31], contrario a lo que sucedió con el pretratamiento a 45 °C, donde las bandas de absorción en las regiones 3500, 1700-100, 900-800  $\text{cm}^{-1}$ , disminuyeron con el tiempo de pretratamiento con el extracto enzimático crudo de *T. hirsuta* Bm-2. Se ha reportado que las bandas de absorción pueden disminuir, como es el caso de un pretratamiento biológico de sorgo dulce [33].



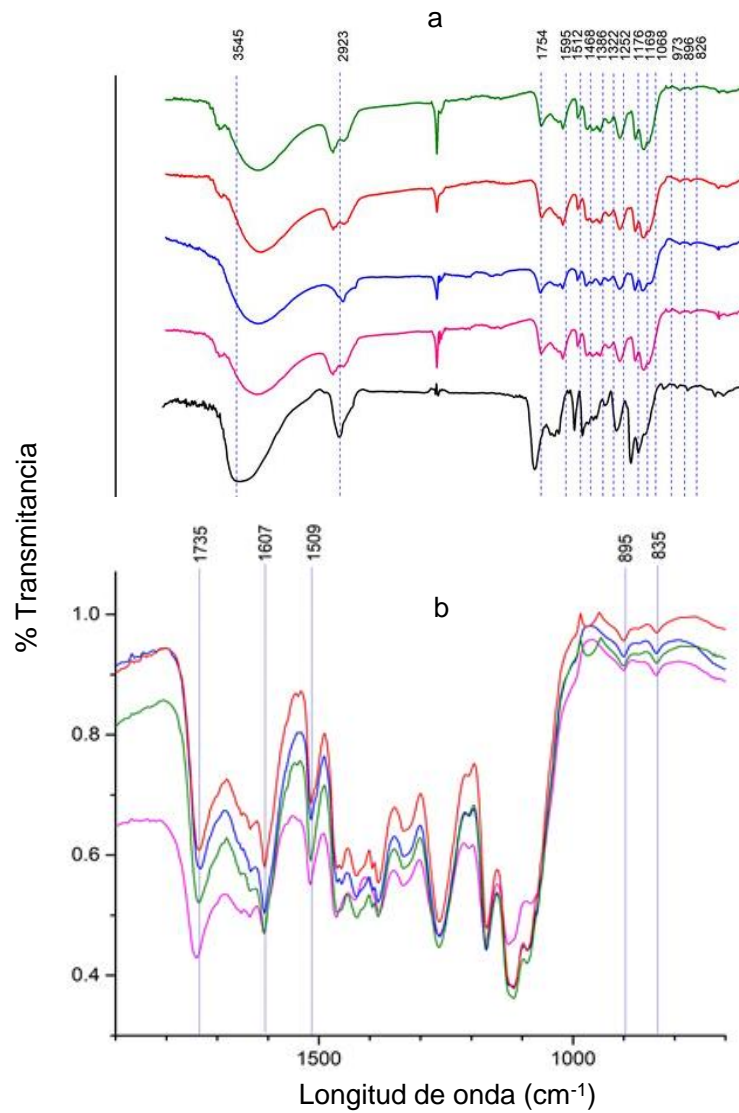


Figura 27. a) Espectros de FT-IR del bagazo de *S. bicolor* pretratado con el extracto enzimático crudo de *T. hirsuta* Bm-2 a 50 °C. Biomasa sin pretratamiento (negro), control sin extracto crudo (rosado), muestras pretratadas por 48 (azul), 72 (roja) y 96 h (verde); b) Aumento de la región 800–1800 cm<sup>-1</sup>.

### 3.6.4. Sacarificación del bagazo de *S. bicolor* pretratado a 50 °C

Como no hay diferencia significativa de la concentración de fenoles totales en los tiempos de pretratamiento a 24, 48, 72 y 96 h, se tomaron los tiempos de 48, 72 y 96 h para los análisis por MEB, los cuales revelaron que hay modificación estructural de la biomasa y el estudio por FT-IR indicó que los tiempos de pretratamiento por 72 y 96 h tienen mayor efecto de deslignificación, se decidió realizar la sacarificación de la biomasa pretratada sólo a estos tiempos.

La Figura 28 muestra la concentración de glucosa, analizada por cromatografía líquida de alta resolución, obtenida después del proceso de sacarificación por 48 h del bagazo de *S. bicolor* pretratado con el extracto enzimático crudo de *T. hirsuta* Bm-2 por 72 y 96 h.

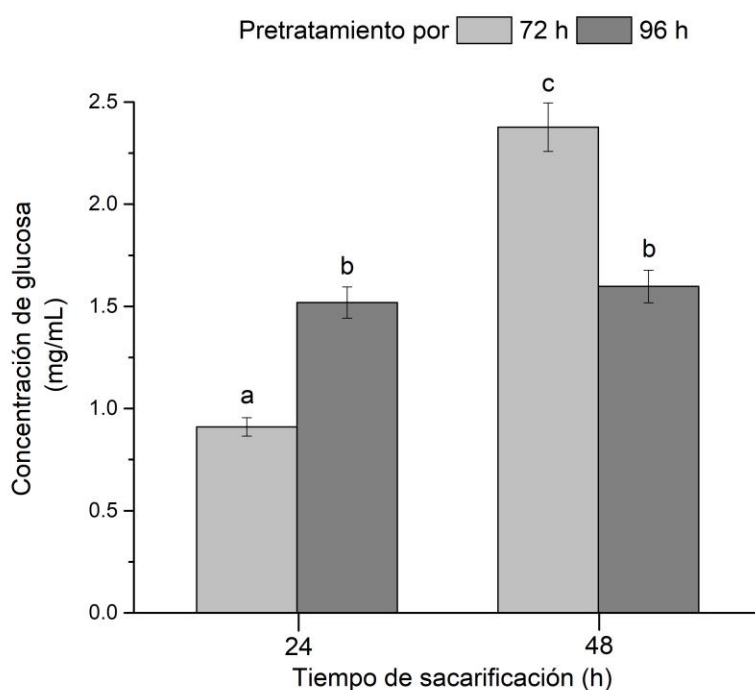


Figura 28. Concentración de glucosa con respecto al tiempo de sacarificación del bagazo de *S. bicolor* pretratada con el extracto enzimático crudo de *T. hirsuta* Bm-2 por 72 y 96 h a 50 °C.

Se observa que para el pretratamiento por 72 h, la concentración de glucosa a las 24 h de sacarificación fue de 0.91 mg·mL<sup>-1</sup> y aumentó a 2.37 mg·mL<sup>-1</sup> a las 48 h. Para el

pretratamiento por 96 h, la concentración de glucosa fue de  $1.52 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  a las 24 h y permaneció igual (no hubo diferencia estadística) hasta las 48 h de sacarificación.

Los resultados mostraron que la mayor cantidad de glucosa se obtuvo con la biomasa pretratada enzimáticamente por 72 h y con una sacarificación de 48 h a  $50 \text{ }^{\circ}\text{C}$ . Este valor es más elevado que los obtenidos en el pretratamiento a  $45 \text{ }^{\circ}\text{C}$ , pero más bajo comparado con las concentraciones que reportaron Equihua-Sánchez [29], Goshadrou *et al.*, [103] y Mishra *et al.* [32].

La sacarificación es un proceso que también tiene que ser estudiado, ya que las condiciones de trabajo como temperatura, pretratamiento, carga enzimática, tipo de enzima, pueden influir en la eficiencia del mismo. Por ejemplo, el coctel enzimático de celulasas Acellerase 1500<sup>®</sup> ha sido utilizado en la hidrólisis de otros materiales lignocelulosicos como el reportado por Saritha *et al.*, [80] quienes utilizaron paja de arroz y obtuvieron la máxima concentración de glucosa a las 24 h de sacarificación de la biomasa pretratada por 21 días con el hongo *T. hirsuta*.

#### **3.6.4.1. Cálculo del rendimiento de los procesos de pretratamiento-sacarificación a $45$ y $50 \text{ }^{\circ}\text{C}$**

Para el cálculo de los rendimientos de los procesos realizados en este trabajo, se tomaron en cuenta los siguientes datos. Los pretratamientos se realizaron en un volumen de 50 mL de solución amortiguadora conteniendo 2.5 g de sustrato (bagazo de sorgo dulce molido). De acuerdo a los resultados de la composición química del bagazo de sorgo dulce, el 55.43 % que corresponde a la celulosa en la biomasa, puede ser aprovechado para la obtención de glucosa. En este estudio el 55.43 % de 2.5 g serían 1.38 g, que en 50 mL daría una concentración de glucosa de  $27.6 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ . Este valor se puede tomar como el 100% del teórico para este estudio. La Figura 29 muestra los rendimientos de la producción de glucosa después del pretratamiento y sacarificación a  $45$  y  $50 \text{ }^{\circ}\text{C}$ .

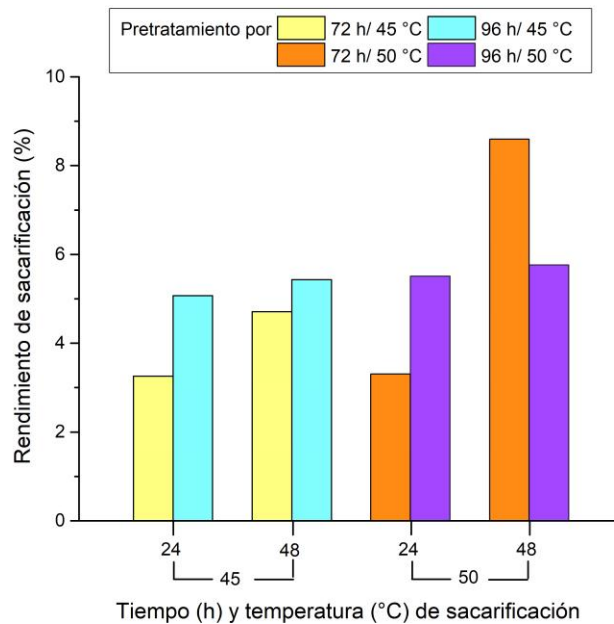


Figura 29. Rendimiento de la concentración de glucosa después del pretratamiento y sacarificación.

El cálculo del rendimiento de los experimentos realizados en este trabajo partió del valor teórico de  $27.6 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ . Los rendimientos se calcularon por simple regla de tres, donde una concentración de glucosa de  $27.6 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  es el 100% de rendimiento. Los resultados del rendimiento de sacarificación del bagazo de *S. bicolor* pretratado con el extracto enzimático crudo de Bm-2 por 72 h a  $45 \text{ }^\circ\text{C}$  fue de 3.26% a las 24 h y de 4.71 % a las 48h. En el pretratamiento por 96 h con la misma temperatura, los rendimientos fueron de 5.07 y 5.43% a las 24 y 48 h de sacarificación, respectivamente.

La sacarificación del bagazo de *S. bicolor* pretratado con el extracto enzimático crudo por 72 h a  $50 \text{ }^\circ\text{C}$  dio un rendimiento de 3.3% a las 24 h y de 8.59% a las 48 h de sacarificación. La sacarificación con la biomasa pretratada por 96 h a  $50 \text{ }^\circ\text{C}$  dio un rendimiento de 5.51 % a las 24 h y de 5.76% a las 48 h.

Mishra *et al.* [32], en el pretratamiento biológico del bagazo de sorgo dulce con el hongo *C. versicolor* adicionado con ácido síringico, obtuvieron un rendimiento de sacarificación del 31.2 %. Choudhary *et al.* [104] realizaron un pretratamiento físico por microondas al bagazo de sorgo dulce y los rendimientos de la sacarificación después del pretratamiento fueron de 32.2 g por cada 100 gramos del bagazo de sorgo dulce, lo que indica un 52.6 %

de rendimiento en la obtención de azúcares fermentables. Cao *et al.* [83] obtuvieron un rendimiento del 74.29 % en la hidrolisis enzimática del bagazo de sorgo dulce, previamente pretratada químicamente.

Es posible que los bajos rendimientos obtenidos en la sacarificación se deban a que el pretratamiento no logró exponer completamente la celulosa a la acción del coctel enzimático. Es necesario realizar más estudios para conocer mejor el proceso y poder mejorar los rendimientos.

## Conclusiones

De las técnicas de análisis empleadas, la determinación de la concentración de fenoles totales no pudo ser empleada como un indicativo de la deslignificación de la biomasa de sorgo dulce, por lo que fue necesario apoyarse en otras técnicas.

Las fotomicrografías de la biomasa pretratada corroboraron los cambios en la estructura del material lignocelulósico.

El análisis por FT-IR permitió observar el avance de la deslignificación de la biomasa durante los pretratamientos, indicando que los mejores fueron los realizados a 50 °C por 72 y 96 h con el extracto enzimático crudo de *T. hirsuta* Bm-2.

La mayor concentración de glucosa, después de la sacarificación, se obtuvo con la biomasa pretratada enzimáticamente a 50 °C por 72 h.

La sacarificación se logró realizar en la misma solución amortiguadora donde se llevó a cabo el pretratamiento. Esto indicó que los productos del pretratamiento no inhibieron la actividad del coctel de celulasas, aunque son necesarios más estudios de las condiciones de la sacarificación (pH, temperatura, carga enzimática, agitación, etc) para mejorar su rendimiento.

El análisis de HPLC mostró que el único azúcar fermentable producido de la biomasa de sorgo dulce pretratada con el extracto enzimático crudo de *T. hirsuta* Bm-2 fue la glucosa.

Este es el primer estudio en el que se utiliza el extracto crudo de *T. hirsuta* Bm-2 para la deslignificación de biomasa lignocelulósica.

## Bibliografía

1. De Bhowmick, G.; Sarmah, A. K.; Sen, R., Lignocellulosic biorefinery as a model for sustainable development of biofuels and value added products, *Bioresource Technol.* 247, 1144-1154, 2018.
2. Feldman, D., Lignin nanocomposites, *J. Macromol. Sci. A.* 53, 382-387, 2016.
3. Sindhu, R.; Binod, P.; Pandey, A., Biological pretreatment of lignocellulosic biomass – An overview, *Bioresource Technol.* 199, 76-82, 2016.
4. Sun, S.; Sun, S.; Cao, X.; Sun, R., The role of pretreatment in improving the enzymatic hydrolysis of lignocellulosic materials, *Bioresource Technol.* 199, 49-58, 2016.
5. Hahn-Hägerdal, B.; Galbe, M.; Gorwa-Grauslund, M. F.; Lidén, G.; Zacchi, G., Bio-ethanol – the fuel of tomorrow from the residues of today, *Trends Biotechnol.* 24, 549-556, 2006.
6. National Oceanic & Atmospheric Administration, E. S. R. L., Global Monitoring Division Trends in Atmospheric Carbon Dioxide, 2016.
7. Cerutti, O. M., Coralli, F., Bustamante, C. G., Riegelhauot, E., Arías, T. C., Vega., J. G., Díaz; R. J., Gerrero. G. P., Cecotti, L., *La Bioenergía en México situación actual y perspectivas*, in *Cuadernos temáticos sobre bioenergía*. 2011. p. 7-9.
8. Alam, F.; Mobin, S.; Chowdhury, H., Third Generation Biofuel from Algae, *Procedia Engineer.* 105, 763-768, 2015.
9. Ruiz, H. A.; Martínez, A.; Vermerris, W., Bioenergy Potential, Energy Crops, and Biofuel Production in Mexico, *Bioenerg. Res.* 9, 981-984, 2016.
10. Zaldivar, J.; Nielsen, J.; Olsson, L., Fuel ethanol production from lignocellulose: a challenge for metabolic engineering and process integration, *Appl Microbiol. Biot.* 56, 17-34,
11. Kim, H.; Choi, B., The effect of biodiesel and bioethanol blended diesel fuel on nanoparticles and exhaust emissions from CRDI diesel engine, *Renew. Energ.* 35, 157-163, 2010.
12. Okamoto, K.; Nitta, Y.; Maekawa, N.; Yanase, H., Direct ethanol production from starch, wheat bran and rice straw by the white rot fungus *Trametes hirsuta*, *Enzyme Microb. Tech.* 48, 273-277, 2011.

13. Kalia, S.; Kaith, B. S.; Kaur, I.; Kaur, I., *Cellulose fibers: bio- and nano-polymer composites : green chemistry and technology*, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, 2011.
14. Chen, H., *Biotechnology of Lignocellulose: Theory and Practice*, Springer Netherlands, 2014.
15. Shirkavand, E.; Baroutian, S.; Gapes, D. J.; Young, B. R., Combination of fungal and physicochemical processes for lignocellulosic biomass pretreatment – A review, *Renew. Sust. Energ. Rev.* **54**, 217-234, 2016.
16. Gupta, V. K.; Tuohy, M. G., *Biofuel Technologies: Recent Developments*, Springer-Verlag, Dordrecht, 2013.
17. Pérez, J.; Muñoz-Dorado, J.; de la Rubia, T.; Martínez, J., Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview, *Int. Microbiol.* **5**, 53-63, 2002.
18. Horton, H. R., *Principios de bioquímica 4ED*, Pearson Educación, 2008. p. 1200.
19. Fang, X.; Qin, Y.; Li, X.; Wang, L.; Wang, T.; Zhu, M.; Qu, Y., Progress on cellulase and enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass, *Sheng wu gong cheng xue bao = Chinese Journal of Biotechnology.* **26**, 864-869, 2010.
20. Berg, J. M.; Stryer, L.; Tymoczko, J. L.; Macarulla, J. M., *Bioquímica*, Reverté, 2007. p. 1026.
21. Lehninger, A. L.; Cox, M. M., *Principios de bioquímica*, Omega, 2006. p. 1232.
22. Pičmanová, M.; Møller, B. L., Apiose: one of nature's witty games, *Glycobiology.* **26**, 430-442, 2016.
23. Saha, B. C., Hemicellulose bioconversion, *J. Ind. Microbiol. Biot.* **30**, 279-291, 2003.
24. Taiz, L.; Taiz, N.; Murphy, A., *Plant Physiology and Development*, Sinauer Associates Incorporated, 2014, p. 832.
25. Ralph, J.; Lundquist, K.; Brunow, G.; Lu, F.; Kim, H.; Schatz, P. F.; Marita, J. M.; Hatfield, R. D.; Ralph, S. A.; Christensen, J. H.; Boerjan, W., Lignins: Natural polymers from oxidative coupling of 4-hydroxyphenyl- propanoids, *Phytochem. Rev.* **3**, 29-60, 2004.
26. Rúa-Orozco, D.; Carlos Escobar Palacio, J.; Lora, E.; José Venturini, O.; Barros, R., *Procesos biológicos de conversión*, 2015.



27. Boerjan, W.; Ralph, J.; Baucher, M., Lignin biosynthesis, *Annu. Rev. Plant Biol.* **54**, 519-546, 2003.
28. Sette, M.; Wechselberger, R.; Crestini, C., Elucidation of lignin structure by quantitative 2D NMR, *Chem-Eur. J.* **17**, 9529-9535, 2011.
29. Equihua-Sánchez, M., Obtención de etanol por sacarificación y fermentación simultáneas a partir de la biomasa lignocelulósica de tallos de sorgo dulce, Tesis de Maestría, Centro de Investigación Científica de Yucatán, México, 2013.
30. Zhang, Y. H. P., Reviving the carbohydrate economy via multi-product lignocellulose biorefineries, *J. Ind. Microbiol. Biot.* **35**, 367-375, 2008.
31. Gonçalves, F. A.; Ruiz, H. A.; Nogueira, C. d. C.; Santos, E. S. d.; Teixeira, J. A.; Macedo, G. R. d., Comparison of delignified coconuts waste and cactus for fuel-ethanol production by the simultaneous and semi-simultaneous saccharification and fermentation strategies, *Fuel.* **131**, 66-76, 2014.
32. Mishra, V.; Jana, A. K.; Jana, M. M.; Gupta, A., Fungal pretreatment of sweet sorghum bagasse with supplements: improvement in lignin degradation, selectivity and enzymatic saccharification, *3 Biotech.* **7**, 110, 2017.
33. Cybulska, I.; Lei, H.; Julson, J., Hydrothermal Pretreatment and Enzymatic Hydrolysis of Prairie Cord Grass, *Energ. Fuels.* **24**, 718-727, 2010.
34. Lopes-Silva, T.; Dário Zamora Zamora, H.; Henrique Ribeiro Varão, L.; Soares Prado, N.; Alves Baffi, M.; Pasquini, D., Effect of Steam Explosion Pretreatment Catalysed by Organic Acid and Alkali on Chemical and Structural Properties and Enzymatic Hydrolysis of Sugarcane Bagasse, *Waste Biomass Valori.* 1-11, 2017
35. Barrera, I.; Amezcua-Allieri, M. A.; Estupiñan, L.; Martínez, T.; Aburto, J., Technical and economical evaluation of bioethanol production from lignocellulosic residues in Mexico: Case of sugarcane and blue agave bagasses, *Chem. Eng. Res. Des.* **107**, 91-101, 2016.
36. De La Torre, M.; Martín-Sampedro, R.; Fillat, Ú.; Eugenio, M. E.; Blánquez, A.; Hernández, M.; Arias, M. E.; Ibarra, D., Comparison of the efficiency of bacterial and fungal laccases in delignification and detoxification of steam-pretreated lignocellulosic biomass for bioethanol production, *J. Ind. Microbiol. Biot.* **44**, 1561-1573, 2017.
37. Alizadeh, H.; Teymouri, F.; Gilbert, T. I.; Dale, B. E., *Pretreatment of Switchgrass by Ammonia Fiber Explosion (AFEX)*, in *Twenty-Sixth Symposium on*

- Biotechnology for Fuels and Chemicals*, B. H. Davison; B. R. Evans; M. Finkelstein; J. D. McMillan, Editors. 2005., Humana Press: Totowa, NJ. p. 1133-1141.
38. Agbor, V. B.; Cicek, N.; Sparling, R.; Berlin, A.; Levin, D. B., Biomass pretreatment: fundamentals toward application, *Biotechnol. Adv.* 29, 675-685, 2011.
  39. Sharma, H. K.; Xu, C.; Qin, W., Biological Pretreatment of Lignocellulosic Biomass for Biofuels and Bioproducts: An Overview, *Waste Biomass Valori.* 2017.
  40. Sánchez, C., Lignocellulosic residues: Biodegradation and bioconversion by fungi, *Biotechnol. Adv.* 27, 185-194, 2009.
  41. Alvira, P.; Tomás-Pejó, E.; Ballesteros, M.; Negro, M. J., Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review, *Bioresource Technol.* 101, 4851-4861, 2010.
  42. Taherzadeh, M.; Karimi, K., Pretreatment of Lignocellulosic Wastes to Improve Ethanol and Biogas Production: A Review, *Int. J. Mol. Sci.* 9, 1621, 2008.
  43. Hammel, K. E., Extracellular free radical biochemistry of ligninolytic fungi, *New J. Chem.* 20, 195-198, 1996.
  44. Hatakka, A. I., Pretreatment of wheat straw by white-rot fungi for enzymic saccharification of cellulose, *Eur. J. Appl. Microbiol.* 18, 350-357, 1983.
  45. Kumar, R.; Wyman, C. E., Effects of Cellulase and Xylanase Enzymes on the Deconstruction of Solids from Pretreatment of Poplar by Leading Technologies, *Biotechnol. Progr.* 25, 302-314, 2009.
  46. Taniguchi, M.; Suzuki, H.; Watanabe, D.; Sakai, K.; Hoshino, K.; Tanaka, T., Evaluation of pretreatment with *Pleurotus ostreatus* for enzymatic hydrolysis of rice straw, *J. Biosci. Bioeng.* 100, 637-643, 2005.
  47. Terrón, M. C.; González, T.; Carbajo, J. M.; Yagüe, S.; Arana-Cuenca, A.; Téllez, A.; Dobson, A. D. W.; González, A. E., Structural close-related aromatic compounds have different effects on laccase activity and on lcc gene expression in the ligninolytic fungus *Trametes* sp. I-62, *Fungal Genet. Biol.* 41, 954-962, 2004.
  48. Tapia-Tussell, R.; Pérez-Brito, D.; Rojas-Herrera, R.; Cortes-Velazquez, A.; Rivera-Muñoz, G.; Solis-Pereira, S., New laccase-producing fungi isolates with biotechnological potential in dye decolorization, *Afr. J. Biotechnol.* 10, 10134-10142, 2011.

49. Zapata-Castillo, P.; Villalonga-Santana, M.; Tamayo-Cortés, J.; Rivera-Muñoz, G.; Solís-Pereira, S., Purification and characterization of laccase from *Trametes hirsuta* Bm-2 and its contribution to dye and effluent decolorization, *Afr. J. Biotechnol.* *11*, 3603-3611, 2012.
50. Tamayo-Díaz, M. L., Biotratamiento microbiano y enzimático de tintes y efluentes contaminantes, Tesis de Licenciatura, Instituto Tecnológico de Mérida, Yucatán, 2013.
51. Islas-Solís, T. R., Expresión del gen lacasa en *Trametes hirsuta* Bm-2 durante su cultivo en residuos lignocelulósicos, Tesis de Maestría, Instituto Tecnológico de Mérida Yucatán, 2016.
52. Zapata-Castillo, P.; Villalonga-Santana, L.; Islas-Flores, I.; Rivera-Muñoz, G.; Ancona-Escalante, W.; Solís-Pereira, S., Synergistic action of laccases from *Trametes hirsuta* Bm2 improves decolourization of indigo carmine, *Lett. Appl. Microbiol.* *61*, 252-258, 2015.
53. Hom-Díaz, A.; Passos, F.; Ferrer, I.; Vicent, T.; Blánquez, P., Enzymatic pretreatment of microalgae using fungal broth from *Trametes versicolor* and commercial laccase for improved biogas production, *Algal Res.* *19*, 184-188, 2016.
54. Asgher, M.; Ahmad, Z.; Iqbal, H. M. N., Alkali and enzymatic delignification of sugarcane bagasse to expose cellulose polymers for saccharification and bio-ethanol production, *Ind. Crop. Prod.* *44*, 488-495, 2013.
55. Galhaup, C.; Wagner, H.; Hinterstoisser, B.; Haltrich, D., Increased production of laccase by the wood-degrading basidiomycete *Trametes pubescens*, *Enzyme Microb. Tech.* *30*, 529-536, 2002.
56. Madhavi, V.; Lele, S., Laccase: properties and applications, *Bioresources.* *4*, 1694-1717, 2009.
57. Morozova, O. V.; Shumakovich, G. P.; Gorbacheva, M. A.; Shleev, S. V.; Yaropolov, A. I., "Blue" laccases, *Biochemistry-Moscow+*. *72*, 1136-1150, 2007.
58. Tapia-Tussell, R.; Perez-Brito, D.; Torres-Calzada, C.; Cortes-Velazquez, A.; Alzate-Gaviria, L.; Chable-Villacis, R.; Solís-Pereira, S., Laccase Gene Expression and Vinasse Biodegradation by *Trametes hirsuta* Strain Bm-2, *Molecules.* *20*, 15147-15157, 2015.
59. Thurston, C. F., The structure and function of fungal laccases, *Microbiology.* *140*, 19-26, 1994.

60. Baldrian, P., Fungal laccases – occurrence and properties, *FEMS Microbiol. Rev.* 30, 215-242, 2006.
61. Polyakov, K. M.; Fedorova, T. V.; Stepanova, E. V.; Cherkashin, E. A.; Kurzeev, S. A.; Strokopytov, B. V.; Lamzin, V. S.; Koroleva, O. V., Structure of native laccase from *Trametes hirsuta* at 1.8 Å resolution, *Acta Crystallogr. D.* 65, 611-617, 2009.
62. Madadi M, T. Y., Abbas A, Recent status on enzymatic saccharification of lignocellulosic biomass for bioethanol production, *Electronic J. Biol.* 13,2017.
63. Lynd, L. R.; Weimer, P. J.; van Zyl, W. H.; Pretorius, I. S., Microbial Cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology, *Microbiol. Mol. Biol. R.* 66, 506-577, 2002.
64. Tsao, G. T.; Liu, C.-G.; Huang, H.; Bai, F.-W., *Biotechnology in China III: Biofuels and Bioenergy*, Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 2012.,
65. Delserone, L. M., Sorghum, *J. Agri. Food Inform.* 8, 9-14, 2007.
66. Kim, M.; Day, D. F., Composition of sugar cane, energy cane, and sweet sorghum suitable for ethanol production at Louisiana sugar mills, *J. Ind. Microbiol. Biot.* 38, 803-807, 2010.
67. Reddy, B. V.; Ramesh, S.; Reddy, P. S.; Ramaiah, B.; Salimath, M.; Kachapur, R., Sweet sorghum-a potential alternate raw material for bio-ethanol and bio-energy, *Icrisat.* 46, 79-86, 2005.
68. Saballos, A., *Development and Utilization of Sorghum as a Bioenergy Crop*, Springer New York, New York, NY, 2008.,
69. Sun, S.-L.; Wen, J.-L.; Ma, M.-G.; Li, M.-F.; Sun, R.-C., Revealing the Structural Inhomogeneity of Lignins from Sweet Sorghum Stem by Successive Alkali Extractions, *J. Agr. Food Chem.* 61, 4226-4235, 2013.
70. SAGARPA, *Impulsan variedades de sorgo dulce para producir etanol*. Fecha de acceso 23 de noviembre de 2017, del sitio web de la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación:  
<http://www.sagarpa.gob.mx/saladeprensa/2012/Paginas/2015B571.aspx>.
71. SAGARPA, *Inguran planta piloto para la producción de bioetanol a base de sorgo dulce en Veracruz*. Fecha de acceso 22 de septiembre de 2017, de sitio web del sitio web de la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación:

- <https://www.gob.mx/sagarpa/prensa/impulsan-variedades-de-sorgo-dulce-para-producir-etanol>.
72. Lugo, J., *Cumple dos años la planta piloto de etanol hecha en el ITVER*. Fecha de acceso 17 de noviembre de 2017, del sitio web *Agencia imagen del golfo*: <https://www.imagendelgolfo.mx/noticiasveracruz/medio-ambiente/41196184/cumple-dos-a%C3%B1os-la-planta-piloto-de-etanol-hecha-en-el-itver.html>.
  73. Innovador, E., *Inauguran planta piloto para producción de bioetanol a base de sorgo dulce en Veracruz*. Fecha de acceso 10 de octubre de 2017, del sitio web el Innovador: <http://www.elinnovador.mx/noticia.php?w=2504>.
  74. Chable-Villacis, R. R., Evaluación de cepas de hongos ligninolíticos nativos de Yucatán en la decoloración y remoción de fenoles en vinazas y efluente de su digestión anaeróbica, Tesis de Maestría, Centro de Investigación Científica de Yucatán, 2015.
  75. Niku-Paavola, M. L.; Raaska, L.; Itävaara, M., Detection of white-rot fungi by a non-toxic stain, *Mycol. Res.* 94, 27-31, 1990.
  76. Kirk, T. K.; Croan, S.; Tien, M.; Murtagh, K. E.; Farrell, R. L., Production of multiple ligninases by *Phanerochaete chrysosporium*: effect of selected growth conditions and use of a mutant strain, *Enzyme Microb. Tech.* 8, 27-32, 1986.
  77. Macarulla, J. M.; Marino, A.; Macarulla, A., *Cuestiones sobre metabolismo*, Reverté, 1992,
  78. Waterhouse, A. L., *Determination of Total Phenolics*, in *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*. 2001, John Wiley & Sons, Inc.
  79. Muñoz-Bernal, Ó. A.; Torres-Aguirre, G. A.; Núñez-Gastélum, J. A.; de la Rosa, L. A.; Rodrigo-García, J.; Ayala-Zavala, J. F.; Álvarez-Parrilla, E., Nuevo acercamiento a la interacción del reactivo de Folin-Ciocalteu con azúcares durante la cuantificación de polifenoles totales, *TIP.* 20, 23-28, 2017.
  80. Saritha, M.; Arora, A.; Nain, L., Pretreatment of paddy straw with *Trametes hirsuta* for improved enzymatic saccharification, *Bioresource Technol.* 104, 459-465, 2012.
  81. Sun, F.-h.; Li, J.; Yuan, Y.-x.; Yan, Z.-y.; Liu, X.-f., Effect of biological pretreatment with *Trametes hirsuta* yj9 on enzymatic hydrolysis of corn stover, *Int. Biodeter. Biodegr.* 65, 931-938, 2011.

82. Antunes, F. A. F.; Chandel, A. K.; Brumano, L. P.; Terán Hilaes, R.; Peres, G. F. D.; Ayabe, L. E. S.; Sorato, V. S.; Santos, J. R.; Santos, J. C.; Da Silva, S. S., A novel process intensification strategy for second-generation ethanol production from sugarcane bagasse in fluidized bed reactor, *Renew. Energ.* 2017.
83. Cao, W.; Sun, C.; Liu, R.; Yin, R.; Wu, X., Comparison of the effects of five pretreatment methods on enhancing the enzymatic digestibility and ethanol production from sweet sorghum bagasse, *Bioresource Technol.* 111, 215-221, 2012.
84. Yang, H.; Wang, K.; Song, X.; Xu, F.; Sun, R.-C., Enhanced enzymatic hydrolysis of triploid poplar following stepwise acidic pretreatment and alkaline fractionation, *Process Biochem.* 47, 619-625, 2012.
85. Ju, Y.-H.; Huynh, L.-H.; Kasim, N. S.; Guo, T.-J.; Wang, J.-H.; Fazary, A. E., Analysis of soluble and insoluble fractions of alkali and subcritical water treated sugarcane bagasse, *Carbohydr. Polym.* 83, 591-599, 2011.
86. Xiao, X.; Bian, J.; Li, M.-F.; Xu, H.; Xiao, B.; Sun, R.-C., Enhanced enzymatic hydrolysis of bamboo (*Dendrocalamus giganteus* Munro) culm by hydrothermal pretreatment, *Bioresource Technol.* 159, 41-47, 2014.
87. Chen, L.; Li, J.; Lu, M.; Guo, X.; Zhang, H.; Han, L., Integrated chemical and multi-scale structural analyses for the processes of acid pretreatment and enzymatic hydrolysis of corn stover, *Carbohydr. Polym.* 141, 1-9, 2016.
88. García, A.; Alriols, M. G.; Spigno, G.; Labidi, J., Lignin as natural radical scavenger. Effect of the obtaining and purification processes on the antioxidant behaviour of lignin, *Biochem. Eng. J.* 67, 173-185, 2012.
89. Li, F.-h.; Hu, H.-j.; Yao, R.-s.; Wang, H.; Li, M.-m., Structure and saccharification of rice straw pretreated with microwave-assisted dilute lye, *Ind. Eng. Chem. Res.* 51, 6270-6274, 2012.
90. Ernesto, V. A. R. T.; Ribeiro, C. A.; Hojo, O.; Fertoni, F. L.; Crespi, M. S., Thermal characterization of lignocellulosic residue from different sugarcane, *J. Therm. Anal. Calorim.* 97, 653, 2009.
91. Ouyang, X.; Wang, W.; Yuan, Q.; Li, S.; Zhang, Q.; Zhao, P., Improvement of lignin yield and purity from corncob in the presence of steam explosion and liquid hot pressured alcohol, *Rsc Adv.* 5, 61650-61656, 2015.

92. Nakasone, K.; Ikematsu, S.; Kobayashi, T., Biocompatibility evaluation of cellulose hydrogel film regenerated from sugar cane bagasse waste and its in vivo behavior in mice, *Ind. Eng. Chem. Res.* **55**, 30-37, 2016.
93. Haripriya, R.; Selvaraj, C.; Naveenraj, D.; Kirubakaran, S.; Muthukumar, R.; Thirumalaivasan, P., Pretreatment of cellulosic waste materials, *Eur. J. Biotechnol. Biosci.* **2**, 4-13, 2014.
94. Zhang, M.; Su, R.; Qi, W.; He, Z., Enhanced enzymatic hydrolysis of lignocellulose by optimizing enzyme complexes, *Appl. Biochem. Biotech.* **160**, 1407-1414, 2010.
95. Hoareau, W.; Trindade, W. G.; Siegmund, B.; Castellan, A.; Frollini, E., Sugar cane bagasse and curaua lignins oxidized by chlorine dioxide and reacted with furfuryl alcohol: characterization and stability, *Polym. Degrad. Stabil.* **86**, 567-576, 2004.
96. Vermerris, W.; Nicholson, R., Phenolic compound biochemistry, *Dordrecht: Springer. ISBN 13, 978-1*, 2006.
97. Al-Farsi, M. A.; Lee, C. Y., Optimization of phenolics and dietary fibre extraction from date seeds, *Food Chem.* **108**, 977-985, 2008.
98. Wang, J.; Sun, B.; Cao, Y.; Tian, Y.; Li, X., Optimisation of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from wheat bran, *Food Chem.* **106**, 804-810, 2008.
99. Tapia-Torres, N. A.; de la Paz-Pérez-Olvera, C.; Román-Guerrero, A.; Quintanar-Isaías, A.; García-Márquez, E.; Cruz-Sosa, F., Histoquímica, contenido de fenoles totales y actividad antioxidante de hoja y de madera de *Litsea glaucescens* Kunth (Lauraceae), *Madera y bosques.* **20**, 125-137, 2014.
100. Brígida, A.; Calado, V.; Gonçalves, L.; Coelho, M., Effect of chemical treatments on properties of green coconut fiber, *Carbohydr. Polym.* **79**, 832-838, 2010.
101. Nlewem, K. C.; Thrash, M. E., Comparison of different pretreatment methods based on residual lignin effect on the enzymatic hydrolysis of switchgrass, *Bioresource Technol.* **101**, 5426-5430, 2010.
102. Soares, J.; Demeke, M. M.; Foulquié-Moreno, M. R.; Van de Velde, M.; Verplaetse, A.; Fernandes, A. A. R.; Thevelein, J. M.; Fernandes, P. M. B., Green coconut mesocarp pretreated by an alkaline process as raw material for bioethanol production, *Bioresource Technol.* **216**, 744-753, 2016.

103. Goshadrou, A.; Karimi, K.; Taherzadeh, M. J., Bioethanol production from sweet sorghum bagasse by *Mucor hiemalis*, *Ind. Crop. Prod.* **34**, 1219-1225, 2011.
104. Choudhary, R.; Umagiliyage, A. L.; Liang, Y.; Siddaramu, T.; Haddock, J.; Markevicius, G., Microwave pretreatment for enzymatic saccharification of sweet sorghum bagasse, *Biomass. Bioenerg.* **39**, 218-226, 2012.
105. Álvarez, C.; Rojano, B.; Almaza, O.; Rojas, O. J.; Gañán, P., Self-Bonding Boards From Plantain Fiber Bundles After Enzymatic Treatment: Adhesion Improvement of Lignocellulosic Products by Enzymatic Pre-Treatment, *J. Polym. Environ.* **19**, 182-188, 2011.
106. Martínez-Yepes, P., Rodríguez-Espinosa, J., Díaz-Toro, P. , Obtención de Vainillina a partir de la lignina de la Guada, *Scientia Et Technica.* **48**, 305-309, 2011.
107. Singleton, V. L.; Orthofer, R.; Lamuela-Raventós, R. M., [14] Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent, *Method. Enzymol.* **299**, 152-178, 1999.



## Anexo 1

### Medio de cultivo de restricción de crecimiento KIRK

Reactivos por cada 1000 mL

Glucosa	10 g
Fosfato de potasio monobásico	2 g
Sulfato de magnesio heptahidratado	50 mg
Cloruro de calcio dihidratado	10 mg
Hidrocloruro de tiamina	10 mg
Sulfato de amonio	1.32 g
Elementos traza	10 mL

Los reactivos se diluyeron en una solución amortiguadora de fosfato de potasio con un pH de 6 ajustado con HCl 1M

Concentración de elementos traza por cada 1000 mL

Sulfato de magnesio heptahidrato	3 g
Cloruro de sodio	1 g
Sulfato férrico heptahidratado	0.1 g
Cloruro de cobalto hexahidratado	0.185 g
Cloruro de calcio	0.08 g
Sulfato de zinc heptahidratado	0.18 g
Ácido bórico	0.01 g
Sulfato de cobre pentahidratado	0.01 g
Molibdato sódico dihidratado	0.012 g

Los elementos traza se diluyeron en agua destilada y se filtraron a un tamaño de poro de 0.2  $\mu\text{m}$ .

## Anexo 2

### Determinación de actividad enzimática

Determinación de la actividad enzimática

La acción de las enzimas se mide determinando la cantidad de sustrato consumido, de producto transformado o el número de las acciones elementales realizadas por unidad de tiempo, así, se define como unidad internacional de actividad enzimática, U, a la cantidad de enzima necesaria para transformar 1  $\mu\text{mol}$  de sustrato por 1 minuto, a 25 °C, en condiciones estandarizadas [77].

Matemáticamente se representa con la siguiente ecuación:

$$U = \Delta C / t \quad \text{ec. 1}$$

$\Delta C$ : variación de la concentración ( $\mu\text{mol}$ )

t: tiempo (min)

Bioquímicamente la actividad enzimática se expresa por unidad de volumen (mL) quedando de la siguiente manera:

$$U \cdot \text{mL}^{-1} = \Delta C / t$$

Despejando  $\Delta C$  se obtiene:

$$\Delta C = (U \cdot \text{mL}^{-1}) \cdot t \quad \text{ec. 2}$$

La ley de Lambert-Beer es fundamental en todas las determinaciones espectrofotométricas. Esta ley establece que el cambio de absorbancia es directamente proporcional tanto a la absortividad molar así como al cambio de concentración del compuesto de análisis, y al trayecto óptico del haz. Matemáticamente se representa de la siguiente manera:

$$\Delta A = \varepsilon \cdot \Delta C \cdot b \quad \text{ec. 3}$$

$\varepsilon$ : coeficiente de extinción molar ( $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ )

$\Delta C$ : variación de concentración ( $\mu\text{mol}$ )

b: espesor de la cubeta (cm)

Sustituyendo la ec. 2 en la ec. 3 y despejando  $U \cdot mL^{-1}$

$$\Delta A = \varepsilon \cdot (U \cdot mL^{-1}) \cdot t \cdot b$$

$$U \cdot mL^{-1} = \Delta A / \varepsilon \cdot t \cdot b \quad \text{ec. 4}$$

Sustituyendo en la ec. 4 los valores de reacción de actividad enzimática:

$\varepsilon$  = reactivo ABTS a 420 nm es de  $36000 M^{-1} cm^{-1}$

La cantidad de muestra utilizada fue de 0.1 mL

$$U \cdot mL^{-1} = \Delta A / 0.036 \mu mol^{-1} cm^{-1} \cdot 1 cm \cdot 20 min \cdot 0.1 mL$$

$$U \cdot mL^{-1} = \Delta A / 0.072 min \cdot mL / \mu mol$$

Utilizando el inverso de 0.072:

$$U \cdot mL^{-1} = \Delta A \cdot 13.89 \mu mol \cdot min^{-1} \cdot mL^{-1}$$

$$U \cdot mL^{-1} = \Delta A \cdot 13.89 U \cdot mL^{-1} \quad \text{ec. 5}$$

Con el factor de dilución final en la ec. 5, en este caso se realizaron dos diluciones. La primera fue de 100  $\mu L$  en 900  $\mu L$  de agua destilada (1/10), de dicha dilución se tomaron 100  $\mu L$  y diluyeron en 900  $\mu L$  de agua destilada quedando en 1/100.

$$U \cdot mL^{-1} = \Delta A \cdot 13.89 U \cdot mL^{-1} \cdot 100$$

$$U \cdot mL^{-1} = \Delta A \cdot 1388.89 \quad \text{ec. 6}$$

Nota: el valor de la multiplicación cambiará respecto al valor de dilución.

## **Anexo 3**

### **Determinación de fenoles totales**

Históricamente los resultados sobre vinos y bebidas espirituosas se consideraron valores de "tanino" porque se utilizó ácido tánico como patrón. Sin embargo, el ácido tánico de diferentes preparaciones puede variar, y otros taninos cubren una amplia gama de rendimiento de color por unidad de peso. El ácido gálico es la unidad fenólica significativa en el ácido tánico comercial. El ácido gálico se evalúa en base al peso del ácido tánico, con ello, los valores en miligramos de ácido tánico o equivalentes de ácido gálico por litro en la misma muestra de vino o de alcohol son muy similares y los valores relativos en un conjunto de muestras son directamente comparables, por esta razón histórica, el ácido gálico es ampliamente utilizado como el estándar de comparación [107].

#### **Preparación del estándar y determinación de fenoles totales**

Etanol 96%

Ácido gálico

Agua destilada

Se utilizó una concentración de  $5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  para lo cual se disolvió 0.5 g de ácido gálico en 10 mL de etanol, luego se aforó a 100 mL con agua destilada. Posteriormente, se realizaron las siguientes diluciones (Tabla 7):

Tabla 7. Diluciones seriadas de ácido gálico para determinar la concentración de fenoles totales.

Dilución	mL de solución del estándar	mL de agua destilada	Vol. Total (mL)	[g·L <sup>-1</sup> ]	[mg·mL <sup>-1</sup> ]
1	0	1	1	Blanco	Blanco
2	2	98	100	0.1	100
3	4	96	100	0.2	200
4	6	94	100	0.3	300
5	8	92	100	0.4	400
6	10	90	100	0.5	500
7	12	88	100	0.6	600
8	14	86	100	0.7	700
9	16	84	100	0.8	800

Tabla 8. Promedio de las absorbancias de las diferentes concentraciones de ácido gálico de la curva de calibración para determinar la concentración de fenoles totales.

Concentración (mg·mL <sup>-1</sup> )	Absorbancia			Promedio
	Réplica			
	1	2	3	
100	0.005	0.000	0.003	0.003
200	0.022	0.015	0.031	0.023
300	0.113	0.023	0.053	0.063
400	0.121	0.032	0.105	0.096
500	0.245	0.143	0.180	0.189
600	0.253	0.221	0.269	0.248
700	0.312	0.313	0.305	0.310
800	0.484	0.384	0.401	0.423

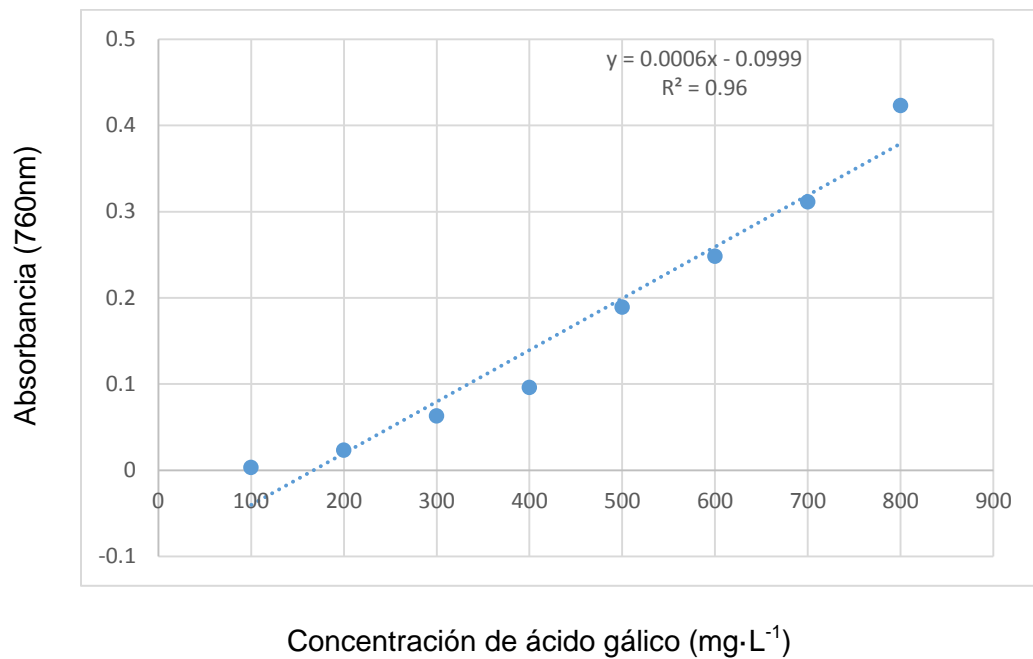


Figura 30. Curva de calibración de Fenoles Totales

## Anexo 4

### Determinación de concentración de glucosa por HPLC

Se utilizó como estándar la glucosa. Se pesaron 10 mg y se diluyeron en una mezcla de acetonitrilo y agua HPLC (50:50), luego se filtró (filtro de nylon 0.2  $\mu\text{m}$ ), y se diluyó a 5, 2.5 y 1.25  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ , por último se inyectaron 20  $\mu\text{L}$  de cada dilución en el de HPLC por duplicado.

Tabla 9. Área bajo la curva del estándar de glucosa a diferentes concentraciones

Concentración ( $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ )	Área bajo la curva Inyección		Promedio
	1	2	
10	170398595	158020809	164209702
5	91946212	85373107	88659659.5
2.5	39720924	36302788	38011856
1.25	41249039	49746711	45497875

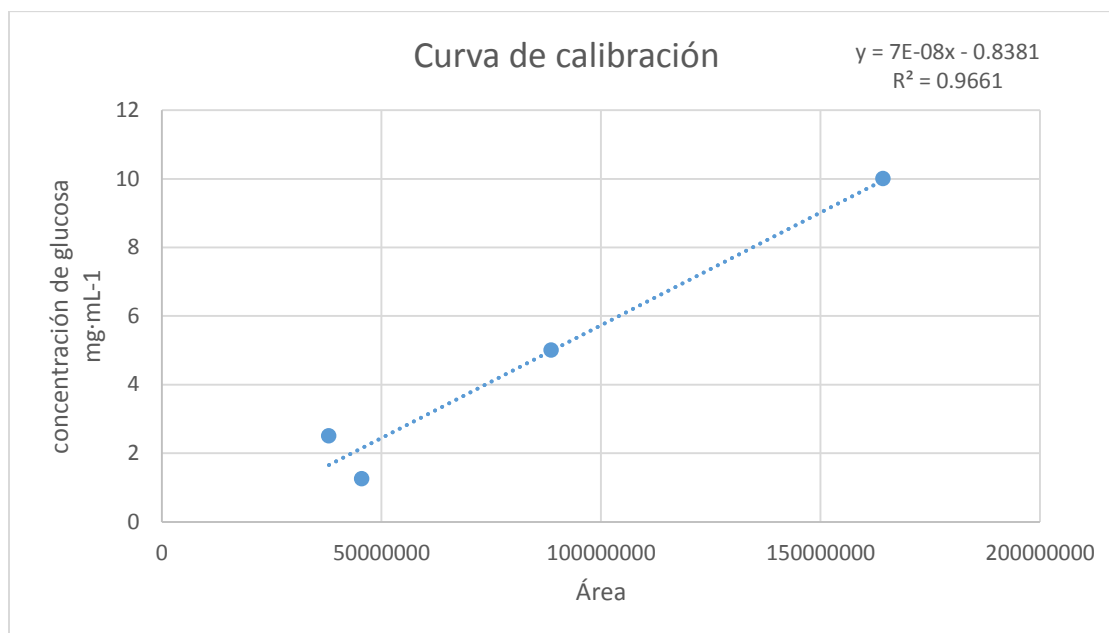


Figura 31. Curva de calibración del estándar de glucosa en el HPLC.