

**ESTABLECIMIENTO DE UN PROCESO DE HIDRÓLISIS A
PARTIR DE CLADODIOS FRESCOS Y SECOS DE NOPAL
(*Opuntia spp.*) PARA LA OBTENCIÓN DE AZUCARES
FERMENTABLES**

TESIS
QUE PARA OBTENER EL GRADO

ACADEMICO DE
**MAESTRO EN CIENCIA Y
TECNOLOGIA
EN LA ESPECIALIDAD DE
PROCESOS AGROINDUSTRIALES**

PRESENTA

IB. JOSE VICENTE GONGORA CAUICH

MÉRIDA, YUC. NOVIEMBRBRE 2016

TÍTULO

**ESTABLECIMIENTO DE UN PROCESO DE HIDRÓLISIS A
PARTIR DE CLADODIOS FRESCOS Y SECOS DE NOPAL
(*Opuntia spp.*) PARA LA OBTENCIÓN DE AZÚCARES
FERMENTABLES**

Presenta: IB. José Vicente Gongora Cauich

Directora de tesis: Dra. María de los Ángeles Sánchez Contreras

Co-Directora de tesis: Dra. Ingrid Mayanín Rodríguez Buenfil

Asesora: Dra. Neith Aracely Pacheco López

Asesora: M. C. Tania González Flores

RESUMEN

RESUMEN

En el presente trabajo se evaluaron tres variedades de nopal (*Opuntia ficus indica*) en fresco y en harina para definir las condiciones de hidrólisis química y enzimática para la liberación de azúcares fermentables. El proceso secuencial de cladodios de nopal se realizó empleando la harina de variedad Atlixco de 12 meses, por presentar las mejores características.

En el proceso de hidrólisis química en los cladodios de nopal fresco, se evaluaron 4 factores los cuales fueron: agente hidrolizante, concentración, temperatura y tiempo, se seleccionó el pretratamiento químico con mayor producción de azúcares fermentables. El efecto de estos factores sobre la liberación de azúcares se determinó mediante un diseño factorial $2 \times 3 \times 3 \times 3$ utilizando dos niveles de agentes hidrolizantes: ácidos (ácido sulfúrico y ácido fosfórico) y alcalinos (hidróxido de sodio e hidróxido de potasio) se pudo observar que todos los factores tiene un efecto sobre la liberación de azúcares. Sin embargo, para el nopal fresco son los agentes alcalinos los que liberaron la mayor concentración de glucosa alcanzando valores cercanos a 2%, la mejor condición fue cuando se empleó hidróxido de sodio a 1 N, 30 °C por 45 min, para obtener hasta 1.5% de glucosa liberada, sin la formación de inhibidores como furfural e hidroximetilfurfural.

En el caso de harina de cladodios de nopal, al evaluar estos mismos factores se observó que todos los factores mostraron efecto significativo sobre la liberación de azúcares; sin embargo, a diferencia de la hidrólisis en nopal fresco, en este caso los agentes ácidos lograron una mejor capacidad hidrolítica, liberando hasta un 5% de glucosa, de igual manera a los hidrolizados se les realizó la determinación de furfural e hidroximetilfurfural, en este caso se notó la presencia de hidroximetilfurfural en concentraciones de 35-100 ppm y también se determinó la concentración de azúcares reductores totales a estas muestras, obteniéndose hasta un 25% de ART. El análisis de todos estos resultados en conjunto establecen que las mejores condiciones de hidrólisis química, es emplear harina de cladodios de nopal, usando ácido sulfúrico a una concentración 1 N, 95 °C y un tiempo de 70 min, para obtener una liberación de 4.2 ± 0.20 g de glucosa por 100g de harina de nopal en base seca, con la formación de hidroximetilfurfural en un concentración de 35 ppm.

RESUMEN

En la hidrólisis enzimática fueron evaluados 3 factores: tipo de enzima, relación enzima sustrato y tiempo. Mediante un diseño factorial 2x3x3 se evaluaron los factores durante la sacarificación de la biomasa previamente hidrolizada químicamente se emplearon 2 enzimas comerciales con diferentes actividades hidrolíticas en tres niveles de concentración y en tres tiempos, los resultados obtenidos fueron analizados estadísticamente y se obtuvo que el factor tipo de enzima es el único que tuvo un efecto significativo. Las mejores condiciones de sacarificación para la liberación de hasta un 6% de glucosa fueron cuando se empleó: enzima comercial Celluclast, a 25 UPF/g de harina y 48 h.

Finalmente en el proceso secuencial con las mejores condiciones de hidrólisis química y enzimática sobre la harina de cladodios de nopal y se determinó el perfil de azúcares liberados. En la etapa de hidrólisis química, se liberaron 4.23% de glucosa, 0.20% de xilosa, 4.32% de fructosa, 2.91% de manosa, 0.76% de sacarosa y 35 ppm de HMF, obteniéndose así un 20.95% de ART, durante la etapa de sacarificación se liberaron 9.17% de glucosa, 1.18% de xilosa siendo en total 11.53% de ART, mostrándose así una liberación de hasta el 32% de azúcares reductores totales.

Por último se realizó nuevamente un proceso secuencial con las mejores condiciones de hidrólisis en conjunto con la fermentación del licor hidrolizado, durante este procedimiento se manejó harina de cladodios de la variedad Atlixco de 6 meses y se empleó una cepa de levadura denominada HY1, durante las primeras 2 etapas se logró liberar hasta 9.25% de glucosa y un 16% de ART. Al fermentar este hidrolizado se obtuvo un rendimiento de fermentación del 65.16%, una producción de alcohol de 3.08 ± 0.021 g/L después de 24 h a 40 °C, con una productividad de etanol de 0.12 g/Ld.

INDICE DE CONTENIDO

INDICE DE CONTENIDO

TÍTULO.....	I
RESUMEN	II
INDICE DE CONTENIDO	IV
ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS	VIII
DEDICATORIAS.....	X
AGRADECIMIENTOS	XII
1. ANTECEDENTES.....	1
2. JUSTIFICACIÓN.....	3
3. HIPÓTESIS.....	4
4. OBJETIVOS.....	5
4.1. OBJETIVO GENERAL	5
4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	5
5. FUNDAMENTACIÓN.....	6
5.1 ORIGEN, DISTRIBUCIÓN Y TAXONOMÍA DE LOS NOPALES	6
5.2 CARACTERÍSTICAS GENERALES DEL NOPAL.....	7
5.3 COMPOSICIÓN FITOQUÍMICA Y FISCOQUÍMICA DEL NOPAL	7
5.4 PRODUCCIÓN DE NOPAL EN MÉXICO	8
5.5 PERSPECTIVAS DEL USO DE NOPAL PARA LA PRODUCCIÓN DE BIOETANOL	10
.....	10
5.6. ESTRUCTURA Y COMPOSICIÓN DE LOS PRINCIPALES POLISACÁRIDOS PRESENTES EN EL NOPAL 10	
5.6. PRETRATAMIENTOS DEL MATERIAL LIGNOCELULÓSICO	14
5.6.1 SACARIFICACIÓN.....	19

INDICE

5.6.2	SUBPRODUCTOS DE LA HIDRÓLISIS INVOLUCRADOS EN LA INHIBICIÓN DE LOS PROCESOS FERMENTATIVOS.	20
5.6.3	PRINCIPALES ENZIMAS COMERCIALES EMPLEADAS EN PROCESOS HIDROLÍTICOS.	22
6.	PROCEDIMIENTOS	25
6.1.	MATERIA PRIMA	25
6.2.	CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA Y FITOQUÍMICA	25
6.2.1.	Determinación de humedad	25
6.2.2.	Determinación de cenizas	25
6.2.3.	Determinación de color	26
6.2.4.	Determinación de minerales	26
6.2.5.	Determinación de pH.....	26
6.2.6	Determinación de proteína soluble	27
6.2.7	Cuantificación de polifenoles totales.....	27
6.2.8	Determinación de flavonoides totales.....	27
6.3	DETERMINACIÓN DE AZÚCARES	28
6.3.1	Determinación de azúcares reductores libres	28
6.3.2	Determinación de carbohidratos totales	28
6.3.3	Determinación de glucosa y sacarosa	28
6.3.4	Determinación cualitativa de azúcares mediante la prueba de Fenilhidrazina....	29
6.3.5.	Determinación del porcentaje de sacarificación	29
6.4.	DETERMINACIÓN DE FURFURAL E HIDROXIMETILFURFURAL	29
6.5.	PRETRATAMIENTO DE HIDRÓLISIS QUÍMICA EN FRESCO Y EN HARINA DE CLADODIOS DE NOPAL 30	
6.6.	HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA EN HARINA DE CLADODIOS DE NOPAL	32
6.7.	DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD CELULOLÍTICA	32
6.8.	DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD DE ENDO-B-1, 4- GLUCANASA POR CARBOXIMETIL CELULOSA	33
6.9	DETERMINACIÓN DE ALCOHOL.....	33
7.	RESULTADOS Y DISCUSIONES	34
7.1.	MATERIA PRIMA	34

INDICE

7.2.	CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA	35
7.3	HIDRÓLISIS QUÍMICA EN FRESCO.....	39
7.9.	DETERMINACIÓN DEL TIPO DE AZÚCAR.....	46
7.5.	HIDRÓLISIS QUÍMICA DE HARINA DE CLADODIOS DE NOPAL	47
7.6.	DETERMINACIÓN DE FURFURAL E HIDROXIMETILFURFURAL POR CROMATOLOGRAFÍA LÍQUIDA DE ULTRA ALTA PRESIÓN (UPLC)	51
7.7.	SACARIFICACIÓN DE HARINA	53
7.8.	PROCESO SECUENCIAL EN HARINA DE NOPAL.....	55
7.9.	FERMENTACIÓN DE HARINA DE NOPAL.....	57
8.	CONCLUSIONES	62
9.	RECOMENDACIONES	64
10.	BIBLIOGRAFÍA.....	65
11.	ANEXOS.....	72
11.1.	MÉTODO DE LOWRY	72
11.2.	CURVA DE CALIBRACIÓN PARA LA CUANTIFICACIÓN DE POLIFENOLES TOTALES.....	73
11.3.	CURVA DE CALIBRACIÓN PARA LA CUANTIFICACIÓN DE FLAVONOIDES TOTALES.....	73
11.4.	MÉTODO DE MILLER ET AL., 1959 (ÁCIDO DINITROSALICÍLICO, DNS)	74
11.5.	MÉTODO DE DUBOIS ET AL., 1956 (FENOL-SULFÚRICO)	74
11.6.	OSAZONAS DE ALGUNAS AZÚCARES.....	75
11.7.	CROMATOGRAMAS DE HIDROXIMETILFURFURAL Y FURFURAL POR UPLC	76
11.8.	DETERMINACIÓN DE UNIDADES DE PAPEL FILTRO	77
11.9.	DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD DE ENDO-B-1, 4- GLUCANASA POR CARBOXIMETIL CELULOSA	79
11.10.	MÉTODO DE BOHRIMNGER ET AL., 1964 (DICROMATO DE POTASIO).....	81
11.11	GRAFICAS DE VISCOSIDAD DE NOPAL	82
11.12.	PRESENTACIONES EN CONGRESOS	83
11.12.1.	Presentación en 3 ^{er} Congreso de la Facultad de Ingeniería Química, 2015.....	83
11.12.2.	Reconocimiento de 2 ^o lugar en presentaciones orales del CONFIQ-3, 2015.	84
11.12.3	Seminario Nacional de los Estudiantes del PICYT, 2015.....	85
11.12.4.	Simposio internacional del carbono en México, 2016.	86

INDICE

11.12.5. Food and Biotechnology International Congress, 2016.	87
11.12.6. Food and Biotechnology International Congress, 2016. Participación en el trabajo.	88
11.12.7. Food and Biotechnology International Congress, 2016. Participación en el trabajo.	89

INDICE DE TABLAS Y FIGURAS

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Índice de figuras

Figura 1. Nopal desechado	10
Figura 2. Desarrollo sostenible.....	10
Figura 3. Estructura de celulosa	11
Figura 4. Hemicelulosa con unidades β -1,4-d-xilofuranosil	12
Figura 5. Estructura de la lignina	12
Figura 6. Estructura de la pectina.....	13
Figura 7. Estructura del mucilago	13
Figura 8. Efecto del pretratamiento sobre el material lignocelulósico.....	14
Figura 9. Esquema general de los diferentes métodos de pretratamientos de material lignocelulósico (karthik and mohammad 2014).....	15
Figura 10. Componentes de la lignina. a) ácido p-coumarico; b) ácido ferulico; c) ácido sinapínico; d) ácido 4-metoxicinámico; e) 3,4- dimetoxicinámico; f) ácido 3,4,5-trimetoxicinámico; g) ácido propiónico; h) etil 4-hidroxi-3 metoxicinamato.....	21
Figura 11. Formación de furfural a partir de pentosas	21
Figura 12. Formación de hmf a partir de hexosas	21
Figura 13. Mecanismos de inhibición del furfural	22
Figura 14. A) Harina de cladodios de nopal de 12 meses de edad y B) Cladodios frescos de nopal de 6 meses. variedad Atlixco.....	34
Figura 15. Contenido de humedad, carbohidratos totales y polifenoles totales de 6 variedades de nopal a 2 diferentes edades	36
Figura 16. Corte y almacenamiento de los cladodios de nopal. variedad Atlixco 6 meses.	38
Figura 17. Hidrólisis química de cladodios frescos de nopal variedad Atlixco de 12 meses. liberación de glucosa durante los diferentes tratamientos	40
Figura 18. Gráfico de medias. a) Hidrolizante, b) Concentración, c) Temperatura y d) Tiempo.....	42
Figura 19. Graficas de interacciones para glucosa. a) Agente hidrolizante-Temperatura, b) Agente hidrolizante-Tiempo, c) Concentración-Temperatura y d) Temperatura-Tiempo...	43
Figura 20. Grafica de interacciones para hmf. a) Hidrolizante-Concentración, b) Hidrolizante- Temperatura, c) Hidrolizante- Tiempo y d) Temperatura-Tiempo.....	45

INDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Figura 21. Cristales de estándares de azúcares y muestras de las mejores condiciones (NaOH, 1 n, 30°c y 45 min), visto a través de un microscopio a una resolución 100x.....	46
Figura 22. Hidrólisis química de harina de cladodios de nopal variedad Atlixco de 12 meses. Liberación de glucosa durante los diferentes tratamientos.....	47
Figura 23. Graficas de interacciones para azúcares reductores. a) Agente hidrolizante-Concentración, b) Agente hidrolizante-Temperatura, c) Agente hidrolizante-Tiempo, d) Concentración-Temperatura y e) Temperatura-Tiempo.....	50
Figura 24. Liberación de azucares reductores durante los diferentes tratamientos con ácido sulfúrico.....	51
Figura 25. Formación de Hidroximetilfurfural (HMF), durante el proceso de hidrólisis con ácido sulfúrico.....	52
Figura 26. Hidrólisis enzimática de harina de nopal empleando la enzima comercial Celluclast para la determinación de glucosa liberada.....	53
Figura 27. Hidrólisis enzimática de harina de nopal empleando la enzima comercial Viscozyme para la determinación de glucosa liberada.....	54
Figura 28. Graficas de medias para el factor tipo de enzima.....	55
Figura 29. Proceso secuencial (hidrolisis química y enzimática) y perfil de azúcares.....	57
Figura 30. Fermentación del licor hidrolizado.....	58
Figura 31. Sacarificación: Liberación de glucosa y azúcares reductores.....	59
Figura 32. Cinética de producción de alcohol por la cepa HY1 y el consumo de azúcares reductores.....	60
Figura 33. Apariencia cristalina de las osazonas como se observan en el microscopio a baja potencia.....	75

INDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Índice de tablas

Tabla 1. Clasificación taxonómica del nopal.....	6
Tabla 2. composición química de cladodios sin espinas de <i>o. ficus indica</i>	8
Tabla 3. Composición química de nopal seco/100 g (<i>o. ficus indica</i>).....	8
Tabla 4. Principales productores de nopal a nivel nacional	9
Tabla 5. Principales variedades de nopal verdura distribuidos en México.....	9
Tabla 6. Polisacáridos estructurales de 5 especies de <i>opuntia</i>	11
Tabla 7. Principales enzimas comerciales usadas en la hidrólisis de lignocelulosa.....	23
Tabla 8. Condiciones de operación óptima de algunas enzimas comerciales	23
Tabla 9. Niveles establecidos para cada factor para el diseño factorial $2 \times 2 \times 3 \times 3 \times 3$	31
Tabla 10. Niveles establecidos para cada factor para el diseño factorial $2 \times 3 \times 3$	32
Tabla 11. Determinación fisicoquímica de harina de cladodios de nopal de 6 meses.....	37
Tabla 12. Determinación fisicoquímica de harina de cladodios de nopal de 12 meses.....	37
Tabla 13. Composición de cladodios de nopal, variedad atlixco	39
Tabla 14. Análisis de varianza multifactorial del diseño $2 \times 2 \times 3 \times 3 \times 3$ para glucosa.....	40
Tabla 15. Pruebas de múltiple rangos para glucosa por hidrolizante	41
Tabla 16. Pruebas de múltiple rangos para glucosa por concentración.....	41
Tabla 17. Pruebas de múltiple rangos para glucosa por temperatura	41
Tabla 18. Pruebas de múltiple rangos para glucosa por tiempo	42
tabla 19. Análisis de varianza multifactorial del diseño $2 \times 2 \times 3 \times 3 \times 3$ para hmf.....	44
Tabla 20. Análisis multifactorial del diseño experimental $2 \times 2 \times 3 \times 3 \times 3$ para glucosa	49
Tabla 21. Perfil de azúcares liberados durante la hidrólisis química y enzimática de harina de nopal	56

DEDICATORIAS

DEDICATORIAS

A mis padres Lilia y Antonio por todo el apoyo y cariño que me han brindado , a mi hermana Nelvin por ser una pieza importante en mi vida, por todo ese amor y comprensión que me ha dado. Gracias por todas las enseñanzas que me han dado, por estar conmigo en cada paso que he dado y por ser esa mano que me ha levantado de muchas caídas. Gracias por ser como son, han sido el motor que me permite seguir día a día, los amo con toda el alma.

A mis hermosos sobrinos, pero principalmente a Alan que aunque no está físicamente conmigo su amor sigue conmigo y no hay día que no piense en ti “eres ese pedacito de cielo que admiro cada mañana”.

A mis nuevos y viejos amigos que han estado conmigo que me han apoyado, escuchado y aconsejado para seguir adelante. Gracias por estar a mi lado en las buenas y malas.

AGRADECIMIENTOS

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por la beca otorgada con número de apoyo 339866, para la realización de este trabajo.

Al Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C. (CIATEJ) Unidad Sureste, por facilitar el uso de instalaciones y equipos para la realización de esta tesis.

Al Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C. (CIATEJ), por la beca complementaria otorgada para la conclusión de este trabajo.

A mi directora de tesis la Dra. María de los Ángeles Sánchez Contreras, directora de este trabajo, por los conocimientos compartidos, consejos, por su apoyo incondicional y sus constantes enseñanzas las cuales me ayudaron a crecer profesional y personalmente. Gracias por toda la confianza depositada en mí y por el cariño brindado.

A mi codirectora la Dra. Ingrid Mayanín Rodríguez Buenfil por los consejos y asesoría brindada; así como por sus valiosas observaciones.

A mis asesoras de tesis la Dra. Neith Aracely Pacheco López y M.C. Tania González Flores por sus valiosas observaciones y aportaciones a este trabajo, por los consejos y apoyo que siempre me han brindado, pero sobre todo por su amistad.

A mis amigos y compañeros de la Unidad Sureste, por su amistad, apoyo y enseñanzas, gracias por compartir conmigo esta etapa de mi vida.

ANTECEDENTES

1. ANTECEDENTES

En la actualidad la disminución progresiva de la reserva de petróleo es un problema latente; por ser un recurso no renovable que se agota rápidamente. Aunado a ello, la demanda y el consumo energético crece a pasos agigantados, por lo que se espera que para el año 2030, el consumo mundial de energía sea 35% mayor que el reportado al año 2010 (Juri Awad 2011). Por ello, es de suma importancia encontrar alternativas que permitan sustituir el uso de los combustibles fósiles, empleando aquellos que posean características renovables y menos contaminantes.

Actualmente se ha comprobado que la biomasa vegetal es una importante fuente renovable de energía alternativa. Esta biomasa se puede producir a partir de diferentes fuentes como residuos de cultivos agrícolas, forestales, agroindustriales; también se han considerado residuos sólidos urbanos, e incluso se propone el desarrollo de cultivos energéticos específicos, todo ello con el fin de obtener energía de manera diversificada sin afectar otras necesidades tan importantes como la alimentación (Gutiérrez, Hernández, and Barrágan 2014). En este contexto, en nuestro país se han ido desarrollando políticas energéticas las cuales se han basado en el fomento y propagación de diversas especies vegetales, cuya sustentabilidad ambiental y económica sea rentable para la generación de energía alternativa (Mendez et al. 2009).

Entre esas especies vegetales se encuentra el nopal (*Opuntia* spp.), la cual es un planta representativa de México, se calcula que en nuestro país existen alrededor de 2,500 productores de nopal cuyas plantaciones comerciales ocupan poco más de 210 mil hectáreas, 50 mil destinadas a producción de tuna; más de 10,000 a producción de nopalitos, 150 mil destinadas al forraje y aproximadamente 100 para producción de grana cochinilla. Entre los principales estados productores se encuentran la ciudad de México y Morelos, los cuales reportan un 55% de la producción cubriendo un 82% de la superficie que se destina al cultivo del nopal a nivel nacional. Este cultivo posee una alta eficiencia productiva de biomasa en condiciones restrictivas de suelo y agua, actualmente se tiene una gran producción de dicho cultivo. Adicionalmente su biomasa posee polisacáridos y carbohidratos que la hacen una fuente renovable de gran potencial, para la producción de biocombustibles (Bioagricultura 2011).

ANTECEDENTES

Sin embargo, se sabe que estos carbohidratos complejos (celulosa, hemicelulosa, pectina, lignina y mucilago) no pueden ser fermentados directamente, por lo que es necesario convertirlos en azúcares más sencillos para su conversión en alcohol, por ello en este trabajo se evalúa el proceso hidrolítico para lograr la sacarificación de Nopal (*Opuntia ficus indica*).

2. JUSTIFICACIÓN

En México el desarrollo de conocimientos y tecnología en materia de energía renovable va en aumento. A finales del año 2013, en México se aprobó la nueva Reforma energética, en la cual se plantean como objetivos principales, promover la producción de insumos bioenergéticos, a partir de las actividades agropecuarias que se desarrollan en el campo mexicano. Así como desarrollar, comercializar y utilizar eficientemente los recursos bioenergéticos, sin poner en riesgo la seguridad alimentaria del país (Federación 2014). Actualmente, el uso de la biomasa vegetal para la producción de bioenergéticos ha generado un gran interés en investigación, debido que sus costos comparativos son bajos y por su condición de ser tecnologías limpias para la generación de energía. México posee una gran variedad de frutas y vegetales, lamentablemente muchos de estos se pierden en la cosecha o no se aprovechan correctamente cuando se tiene sobreproducción. El nopal verdura y la tuna han sido muy apreciados en México, por sus cualidades alimenticias y medicinales, se cultiva en todo el país aunque la mayor producción se registra en 10 estados principales entre los cuales destacan: Zacatecas, Morelos y la ciudad de México. Siendo que a nivel mundial, México ocupa el primer lugar como productor de nopal pese a que en épocas de alta producción, gran parte de este cultivo no es comercializado, debido a la saturación del mercado y a su bajo precio, causando grandes pérdidas al sector agrícola. Por ello, para evitar desaprovechar el valor que este cultivo tiene como potencial insumo bioenergético, múltiples investigaciones analizan la factibilidad de generar productos de valor, en este caso mediante un proceso de obtención biotecnológica de etanol. Durante esta investigación, se propone establecer un proceso integral de pretratamiento e hidrólisis que permitan la obtención de azúcares fermentables a partir de Nopal (*Opuntia ficus indica*), evaluando los azúcares disponibles para emplearse en un proceso fermentativo, para la producción de alcohol.

HIPÓTESIS

3. HIPÓTESIS

La liberación de azúcares fermentables útiles en la producción de alcohol a partir de los cladodios de nopal (*Opuntia spp.*) pueden variar en función de la aplicación de un proceso de hidrólisis química o enzimática, se espera que el empleo de un modelo de diseño factorial permita evaluar los principales factores que impactan en la liberación de azúcares fermentables para el establecimiento de un proceso de hidrólisis secuencial.

OBJETIVOS

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general

Establecer un proceso secuencial de hidrólisis química y enzimática, para cladodios frescos y secos de nopal (*Opuntia spp.*) que permita la obtención de azúcares fermentables útiles en la producción de bioetanol.

4.2 Objetivos específicos

1. Estimar las propiedades fisicoquímicas de los cladodios frescos y de harina de *Opuntia spp.*, para elegir la biomasa cuyas características sean más adecuadas para realizar la hidrólisis.
2. Evaluar el efecto de los factores: concentración, tiempo y temperatura sobre la eficiencia de la hidrólisis ácida y básica de la biomasa de cladodios de *Opuntia spp.*
3. Evaluar el efecto de los factores: tipo de enzima, relación enzima-sustrato y tiempo sobre la eficiencia de la hidrólisis enzimática de la biomasa de cladodios de *Opuntia spp.*
4. Determinar el perfil de azúcares producidos durante las hidrólisis química y enzimática de cladodios de *Opuntia spp.*
5. Evaluar la eficiencia hidrolítica de un proceso integral empleando las mejores condiciones obtenidas de la hidrólisis química y enzimática.
6. Determinar el perfil de azúcares y otros subproductos producidos durante el proceso integral.

FUNDAMENTACIÓN

5. FUNDAMENTACIÓN

5.1 Origen, distribución y taxonomía de los nopales

Los nopales son originarios de América tropical y subtropical. Hoy en día se encuentran en forma silvestre o cultivada, distribuidos en todo el continente americano, cubriendo una gran variedad de condiciones agroclimáticas. Además, se han difundido a África, Asia, Europa y Oceanía, donde también se cultivan o se encuentran en forma silvestre. La taxonomía de los nopales se describe en la Tabla 1. Por múltiples razones, esta clasificación es sumamente compleja. Entre las más relevantes encontramos que sus fenotipos presentan gran variabilidad según las condiciones ambientales, encontrando frecuentemente casos de poliploidía, se reproducen en forma sexual o asexual y existen numerosos híbridos interespecíficos. Por ello distintos autores reportan variaciones en la colocación taxonómica de los nopales, pero todos dentro de la familia *Cactacea*. Actualmente, se ha consensuado la clasificación en donde se considera a los nopales bajo el género *Opuntia*. El nombre científico le fue asignado por Tournefort en 1700, por una semejanza con una planta espinosa que crecía en el poblado de *Opus* en Grecia (Sáenz et al. 2006).

TABLA 1. CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA DEL NOPAL

Reino	Vegetal
Subreino	<i>Embryophita</i>
División	<i>Angiospermae</i>
Clase	<i>Dicotyledonea</i>
Subclase	<i>Dialípetalas</i>
Orden	<i>Opuntiales</i>
Familia	<i>Cactácea</i>
Subfamilia	<i>Opuntioideae</i>
Tribu	<i>Opuntiae</i>
Géneros	<i>Opuntia</i> y <i>Nopalea</i>

Fuente (Chávez 2012).

5.2 Características generales del nopal

El nopal es una de las plantas con gran capacidad de adaptación al medio; esta adaptación la efectúa mediante modificaciones morfológicas, las cuales tienen relación con la conformación de varios de sus órganos. Específicamente el género *Opuntia* es una planta xeromorfa que ha desarrollado un mecanismo de resistencia a la sequía con base en el mantenimiento de un alto potencial hídrico. Los nopales son plantas arbustivas, rastreras o erectas que pueden alcanzar de 3.5 a 5 m de altura. Son densamente ramificadas, poseen tallos o cladodios suculentos y articulados, comúnmente llamados pencas, que presentan forma de raqueta ovoide o alargada de 60-70 cm de longitud, sobre estos se presentan las yemas, llamadas aréolas que presentan en su cavidad espinas (Ornelas 2011). Las flores son sésiles, hermafroditas y solitarias se desarrollan normalmente en el borde superior de las pencas, su color es variable las más frecuentes van de colores rojas, naranjas, amarillas y hasta blancas. En la mayor parte del mundo la planta florece una vez al año; Sin embargo, en Chile bajo ciertas condiciones ambientales y con suministro de agua en verano, se presenta una segunda floración en marzo, que da origen a la llamada fruta “inverniza” (Sáenz et al. 2006).

5.3 Composición fitoquímica y fisicoquímica del nopal

Entre los compuestos bioactivos que se encuentran en el nopal están los compuestos fenólicos particularmente flavonoides, aunque también se ha reportado la presencia de carotenos, ácido ascórbico, fitoesteroles y clorofila. Los nopales son considerados como una buena fuente de β -caroteno o provitamina A (11.3-53.5 $\mu\text{g}/100\text{g}$ de muestra fresca) y ácido ascórbico o vitamina C (7-22mg/ 100g de muestra fresca). En lo que respecta a la composición química de la porción comestible del nopal y los frutos de *Opuntia ficus-indica*, se pueden encontrar principalmente azúcares, proteínas y lípidos; algunos minerales incluyendo calcio, potasio y magnesio, fibra dietética además de otros importantes fitoquímicos (Tabla 2). La fibra del nopal está integrada por celulosa, hemicelulosa, pectina, lignina y gomas. Esta composición varía en función de su edad y zona de cultivo, siendo los cladodios quienes tienen la mayor demanda desde el punto de vista industrial, ya que cuando los brotes son jóvenes o tiernos (10-15 cm) se utilizan para la producción de nopal verdura o nopalitos para su comercialización en fresco, y cuando están parcialmente lignificados (cladodios de 2 a 3 años) son usados

FUNDAMENTACIÓN

principalmente para la producción de harinas y productos deshidratados (Tabla 3) (Sáenz et al. 2006).

TABLA 2. COMPOSICIÓN QUÍMICA DE CLADODIOS SIN ESPINAS DE *O. FICUS INDICA*

Constituyentes	Peso fresco (g/ 100 g)
Agua	88-95
Carbohidratos totales	3-7
Cenizas	1-2
Fibra cruda	1-2
Proteína	0.5-1
Lípidos	0.2

Fuente (Kuloyo et al. 2014).

TABLA 3. COMPOSICIÓN QUÍMICA DE NOPAL SECO/100 G (*O. FICUS INDICA*)

Constituyentes	Proporción
Humedad (%)	4.06
Proteínas (%)	14.22
Grasa (g)	3
Fibra soluble (g)	25.22
Fibra insoluble (g)	29.87
Cenizas (%)	18.41
Calcio (mg/g)	1.35
Fosforo (%)	0.38
Sodio (%)	0.21
Potasio (%)	5.52

Fuente (Rodríguez-García et al. 2007).

5.4 Producción de nopal en México

De acuerdo con el Instituto Nacional de Ecología, México cuenta con más de 100 especies del género *Opuntia*, y en las zonas semiáridas existe la variación más amplia, por lo que algunos botánicos lo consideran como el centro de origen de los nopales. En el país se reconocen tres sistemas de producción: nopaleras silvestres, nopaleras en huertos familiares y plantaciones comerciales, siendo esta última en la que se ocupa más de 210 mil hectáreas de cultivo, destinadas a la producción de tuna, nopalitos, forraje y grana de cochinilla (Financiera 2011). En el año 2013, la producción de nopal alcanzó 812,705.09 toneladas, siendo la ciudad de México una de las zonas de mayor producción, con las plantaciones en la delegación de Milpa Alta, impulsadas por programas de investigación y desarrollo para la mejora del cultivo (SIAP

FUNDAMENTACIÓN

2015). En la tabla 4, se muestran los principales estados productores de nopal verdura en el país, destacando Ciudad de México, Guadalajara, Monterrey, Puebla, San Luis Potosí, Morelos, Jalisco, Baja California. Su transformación, en la industria alimenticia produce nopales en salmuera, en escabeche, jugos, y harinas entre otros productos. En la industria cosmética se elaboran cremas, mascarillas y shampoos.

TABLA 4. PRINCIPALES PRODUCTORES DE NOPAL A NIVEL NACIONAL

Principales productores de nopal	Sup. Sembrada (Ha)	Producción (Ton)
Morelos	3, 566.00	326, 330.00
Distrito Federal	4, 331.00	270, 064.00
México	869.5	80, 697.35
Jalisco	736.5	23,006.23
Baja California	613.75	22, 816.73
Puebla	250.00	13, 714.15
Zacatecas	347.5	8, 764.46
Durango	81.18	2,600.00
San Luis Potosí	432.00	1,134.74
Querétaro	34.50	547.81

Fuente (SIAP 2015)

En la industria, farmacéutica se emplea el nopal deshidratado en capsulas, para emplearse como suplemento alimenticio (Financiera 2011). En México, la especie con importancia comercial más cultivada es *Opuntia ficus-indica*, esta especie también incluye variedades menos comerciales. Otras especies menos cultivadas como *Nopalea cochellinifera* y *O. robusta* también se presentan en la tabla 5.

TABLA 5. PRINCIPALES VARIEDADES DE NOPAL VERDURA DISTRIBUIDOS EN MÉXICO

Variedad	Entidad de producción	Especie
Milpa Alta	Ciudad de México, Morelos	<i>O. ficus-indica</i>
Atlixco	Puebla, Edo. de México	
COPENA V-1	Edo. de México, Baja California, San Luis Potosí, Hidalgo	
COPENA F-1	Edo. de México, Sonora, Baja California	
Moradilla	Edo. de México	
Blanco	Michoacán	
Negro	Michoacán, Guanajuato	
Polotitlan	Edo. de México	
Tamazunchale	San Luis Potosí, Hidalgo	
Tapon	S. L. P., Zacatecas, Guanajuato, Durango, Aguascalientes, Jalisco, Querétaro	<i>O. robusta</i>

*Nopal silvestre y plantado como cerco de huertos familiares y parcelas agrícolas, objeto de recolección.

Fuente (Flores Valdés, Luna Esquivel, and Ramírez Moreno 1995).

5.5 Perspectivas del uso de nopal para la producción de bioetanol

La producción de nopal en México se ha ido incrementando en los últimos años, estudios realizados han demostrado que se tiene la capacidad de alcanzar al año por hectárea de cultivo de nopal, hasta 100 toneladas de cladodios para su venta en fresco, teniendo una producción continua por más de cinco años (Mendez et al. 2009). Debido a la sobreproducción de dicho cultivo, en épocas de alta producción en muchos casos la problemática es que no se logran comercializar totalmente como producto fresco y esta sobre producción suele ser desechada (Figura 1). En el mejor de los casos, este excedente de producción, también se emplea para la alimentación de ganado. Sin embargo aun así, una gran cantidad se pierde debido a su rápida degradación, ya que el producto fresco que está expuesto al aire libre, con altas temperaturas y humedad, se degrada rápidamente, convirtiendo estos residuos con mala disposición, en un agente contaminante. Sin embargo, por su bajo costo y su naturaleza renovable, este excedente se ha considerado apropiado para ser aprovechado en la producción de bioetanol, cumpliendo adicionalmente con el esquema del desarrollo energético sostenible (Figura 2).



FIGURA 1. NOPAL DESECHADO

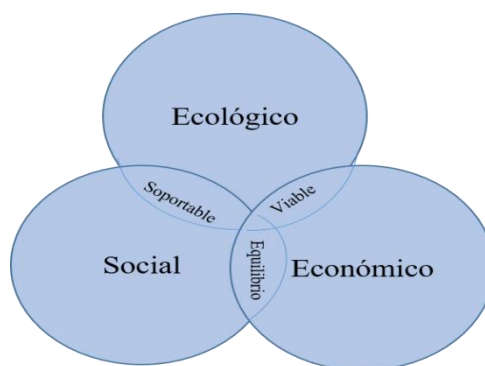


FIGURA 2. DESARROLLO SOSTENIBLE

5.6. Estructura y composición de los principales polisacáridos presentes en el nopal

En el nopal el principal material constituyente de la pared celular es la fibra insoluble, en este se pueden encontrar polisacáridos como la celulosa, hemicelulosa, lignina. Mientras que en la fracción de fibra soluble se tienen pectinas y mucílago. Las concentraciones de estos componentes suelen variar, sus propiedades fisicoquímicas así dependen de factores como la

FUNDAMENTACIÓN

especie y variedad del nopal, su edad y proceso de producción. Algunos reportes muestran la variabilidad de estos polisacáridos en el nopal (tabla 6).

TABLA 6. POLISACÁRIDOS ESTRUCTURALES DE 5 ESPECIES DE *OPUNTIA*

Polisacáridos (g/100 g peso seco)	Especies				
	<i>O. streptacantha</i>	<i>O. hyptiacantha</i>	<i>O. megacantha</i>	<i>O. albicarpa</i>	<i>O. ficus indica</i>
Mucílago	7.18 ^b	8.47 ^{ab}	7.40 ^b	6.89 ^b	11.72 ^a
Pectina	2.53 ^a	1.58 ^b	2.59 ^a	1.88 ^b	1.83 ^b
Hemicelulosa					
Débilmente unida	8.65 ^a	6.32 ^{bc}	7.89 ^{ab}	4.89 ^c	4.59 ^c
Fuertemente unida	3.70 ^a	2.38 ^b	3.18 ^{ab}	1.63 ^b	2.30 ^b
Celulosa	4.89 ^a	5.47 ^a	4.63 ^a	5.25 ^a	5.49 ^a

Diferentes letras muestran diferencia significativa (Tukey, P< 0.05).

Fuente(López-Palacios et al. 2012).

Celulosa

Sabemos que la celulosa es uno de los polisacáridos de gran importancia en la producción fermentativa de alcohol. Está conformada por subunidades de D-glucosa (Figura 3), unidas por enlaces 1,4-β-glucosídicos. La celulosa posee dos estructuras básicas, una organizada en forma cristalina y otra amorfa. Las capas de celulosa están organizadas en pequeños “empaquetados” denominados fibrillas de celulosa. Estas fibrillas se encuentran en su mayoría independientes y débilmente vinculadas a través de puentes de hidrógeno, confiriéndole a la celulosa, las características de insolubilidad, rigidez y resistencia al ataque de sustancias químicas y enzimáticas(Moheno 2013). De la hidrolisis de celulosa se obtienen dímeros característicos como celodextrinas y celobiosa, como final en una hidrolisis se tiene al principal monosacárido, la glucosa (López 2014).

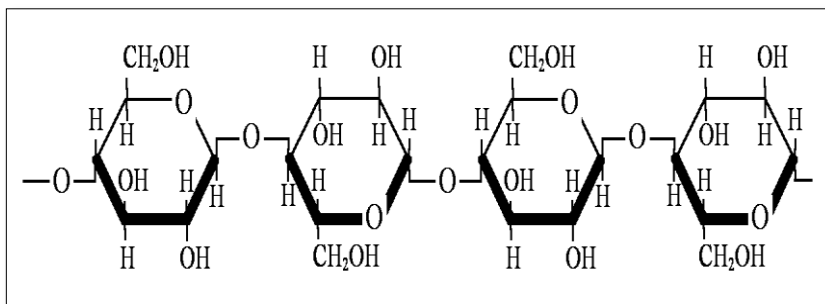


FIGURA 3. ESTRUCTURA DE CELULOSA

FUNDAMENTACIÓN

La **hemicelulosa** (Figura 4) es un carbohidrato complejo y heterogéneo, cuya estructura posee diferentes polímeros, conformados por pentosas (D-xilosa y L-arabinosa) y hexosas (D-manosa, D-glucosa y D-galactosa), entrelazados entre sí mediante enlaces glucosídicos. La hemicelulosa sirve de conexión entre la lignina y las fibras de celulosa y suele ser un polímero de menor masa molar que la celulosa y más fácilmente hidrolizable debido a su estructura predominantemente amorfa (Moheno 2013).

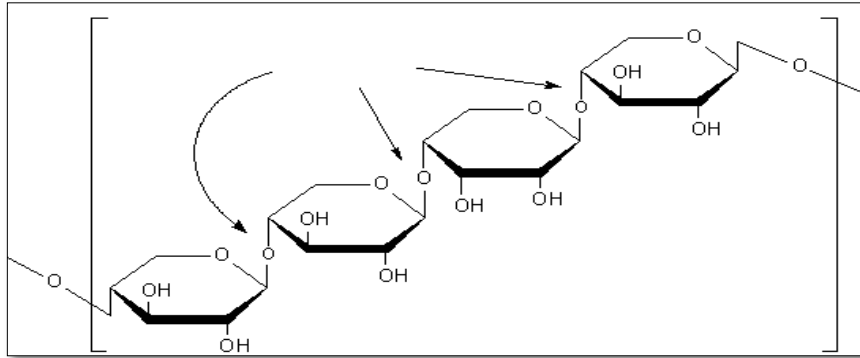


FIGURA 4. HEMICELULOSA CON UNIDADES B-1,4-D-XILOFURANOSIL

La **lignina** (Figura 5) es un heteropolímero amorfo que consta de tres diferentes unidades de fenilpropano (ρ -coumaril, coniferil y alcohol sinapílico) que se mantienen unidos por diferentes enlaces, la lignina no es soluble en agua y es ópticamente activa. Por su composición la degradación de la lignina es complicada. Su función estructural, es la de mantener unidos a la celulosa y hemicelulosa entre sí (Moheno 2013).

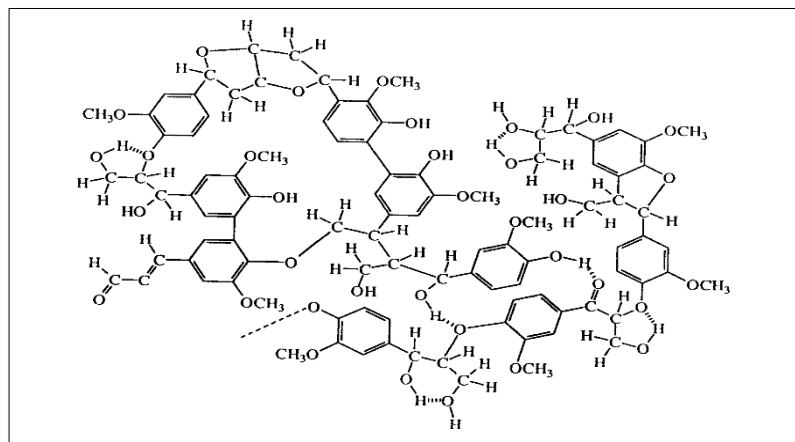


FIGURA 5. ESTRUCTURA DE LA LIGNINA

FUNDAMENTACIÓN

La **pectina** (Figura 6) consiste en un grupo de heteropolisacáridos cuya estructura básica está integrada por moléculas de ácido D-galacturónico, unidas por enlaces glucosídicos α -D-(1,4), también posee azúcares neutros como la ramnosa, galactosa y arabinosa. Estos heteropolisacáridos funcionan en los vegetales como agentes de hidratación y material de unión de la red celulósica (Lozada Carbajal 2007).

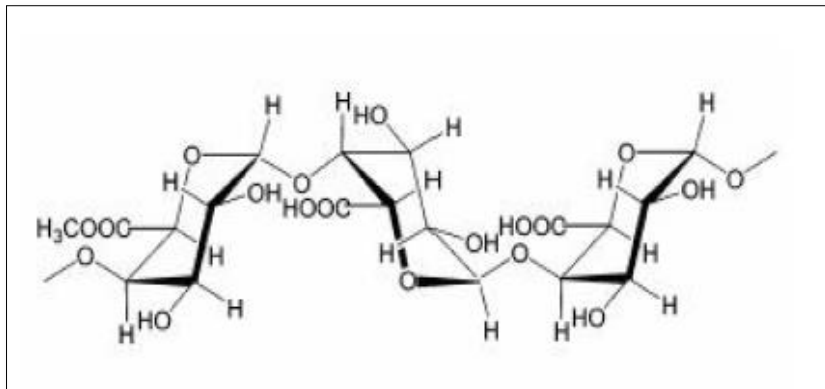


FIGURA 6. ESTRUCTURA DE LA PECTINA

El **mucílago** (Figura 7), químicamente se clasifica como un polímero lineal heterogéneo, compuesto principalmente de polisacáridos estos están estrechamente relacionados con las pectinas. Su composición química porcentual, oscila en 47% L-arabinosa, 23% D-xilosa, 18% D-galactosa y 5% de ácido D-galacturónico, esta composición puede variar, dependiendo de factores como las condiciones ambientales o la edad de la planta (León-Martínez, Méndez-Lagunas, and Rodríguez-Ramírez 2010). Con estos antecedentes se ha sustentado el hecho de que el nopal, es una materia prima adecuada para la producción de bioetanol, debido a su riqueza en polisacáridos que puede convertirse en carbohidratos fermentables.

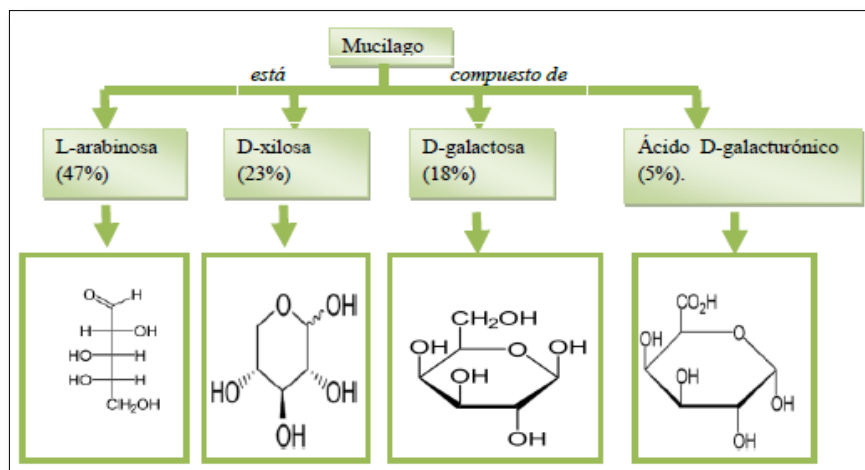


FIGURA 7. ESTRUCTURA DEL MUCILAGO

5.6. Pretratamientos del material lignocelulósico

A diferencia del bioetanol de primera generación, el cual es producido a partir de cultivos ricos en azúcares fermentables y disponibles, el bioetanol proveniente de los materiales lignocelulósicos o bioetanol de segunda generación, requiere que los azúcares contenidos en dichos materiales sean previamente liberados, debido a la complejidad de estos materiales esto implica más etapas en el proceso, conocidas como pretratamientos (Sandoval-Esparza 2010). Los pretratamientos permiten aumentar la tasa de producción de etanol, debido a que permiten la liberación de una mayor cantidad de azúcares durante la etapa de hidrólisis y sacarificación, incluso llegar a rendimientos superiores al 80% comparados con procesos sin pretratamiento cuyos rendimientos suelen ser del 20 al 40% de sacarificación. El efecto de los pretratamientos sobre el material lignocelulósico es variado (Figura 8), pero su principal función es la de aumentar el área de contacto entre las enzimas hidrolíticas y los polisacáridos, rompiendo en primera instancia las estructuras cristalinas para su despolimerización parcial, facilitando de este modo su solubilización, con la inherente liberación de los diferentes azúcares fermentables (Juri Awad 2011). Un resumen de los diferentes tratamientos se presenta en la figura 9.

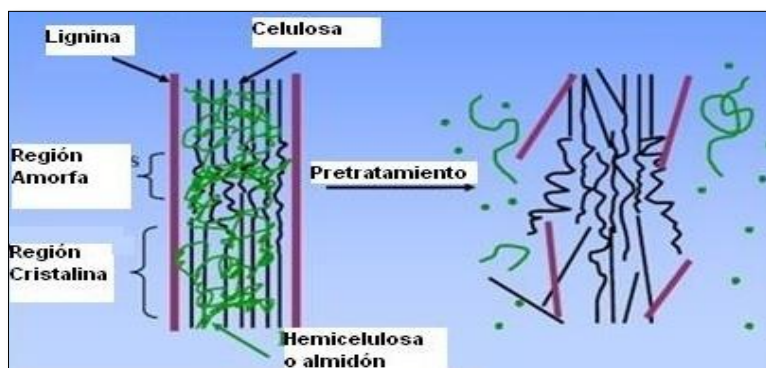


FIGURA 8. EFECTO DEL PRETRATAMIENTO SOBRE EL MATERIAL LIGNOCELULÓSICO

FUNDAMENTACIÓN

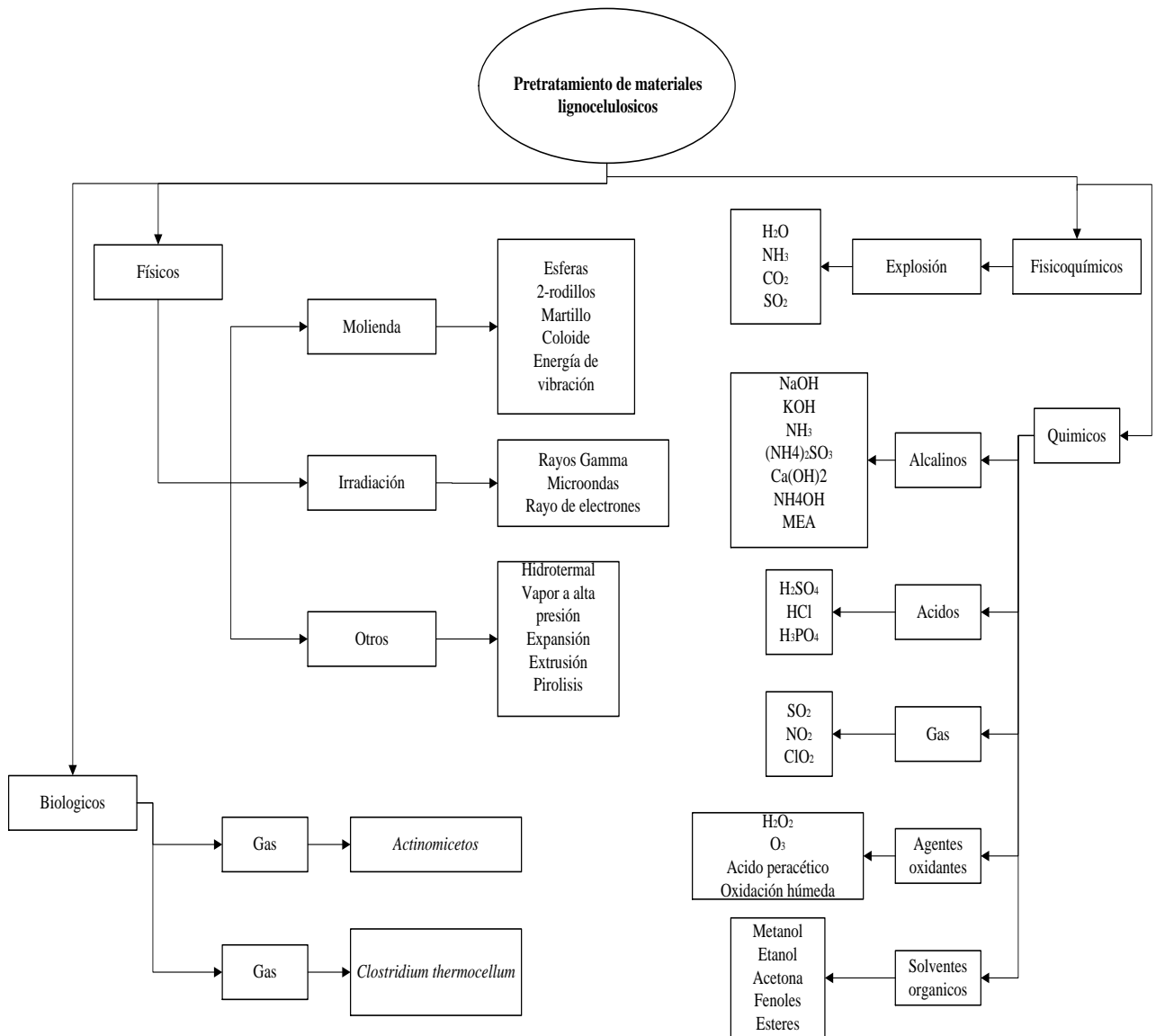


FIGURA 9. ESQUEMA GENERAL DE LOS DIFERENTES MÉTODOS DE PRETRATAMIENTOS DE MATERIAL LIGNOCELULÓSICO (KARTHIK AND MOHAMMAD 2014)

Entre los métodos de pretratamientos más utilizados encontramos:

1. Métodos físicos:

1.1. Fragmentación mecánica: el material lignocelulósico es fragmentado, triturado y molido (hasta alcanzar un tamaño de partícula entre 0.2 y 2 mm), esto logra aumentar el área de contacto, facilitando el acceso de las enzimas celulasas sobre las fibras de

celulosa, aumentando así su conversión en carbohidratos fermentables (Cuervo, Folch, and Quiroz 2009).

2.2. Pirólisis: con este pretratamiento, la lignocelulosa se descompone en diferentes productos gaseosos y carbón residual, aunque es un método eficiente para tratar el material lignocelulósico tiene un costo elevado en comparación con otros métodos ya que se requiere tratamientos con altas temperaturas de hasta 300°C, (Kuloyo et al. 2014).

2. Métodos físico-químicos:

2.1. Explosión por vapor (*Steam-explosion*): es uno de los pretratamientos más efectivos para las maderas duras y desechos agrícolas, en este método la biomasa es tratada con vapor saturado a una temperatura de 160-260°C (0.69-4.83 MPa) durante cierto tiempo, causando reacciones de auto hidrólisis, donde la hemicelulosa y lignina son total o parcialmente hidrolizadas (Cuervo, Folch, and Quiroz 2009).

2.2. Explosión de fibra de amoniaco (*AFEX*): es un proceso similar a la explosión por vapor en el que el material es impregnado con amoniaco líquido (1 a 2 kg amoniaco/kg biomasa seca) a una temperatura en torno a los 90°C, y un tiempo aproximado de 30 minutos, transcurrido este tiempo el material es sometido a una rápida descompresión. Este tipo de pretratamiento ha sido empleado con diferentes tipos de sustratos como alfalfa, paja de trigo, bagazo, residuos sólidos urbanos, papel residual y paja de cebada. La diferencia con la explosión de vapor y otros tipos de pretratamientos, es que en este proceso no se solubiliza la hemicelulosa, además que es utilizado para materiales con bajo contenido de lignina (Lozanoff, Heinichen, and Marchi 2007).

3. Métodos químicos:

3.1. Hidrólisis ácida: la hidrólisis ácida diluida ha sido ampliamente usada en la producción de biocombustibles. Los ácidos comúnmente usados son el ácido clorhídrico (HCl), fosfórico (H₃PO₄), nítrico (HNO₃) y sulfúrico (H₂SO₄), siendo este último el de más amplio uso. Las condiciones de concentración y temperatura varía, el rango de concentraciones utilizadas frecuentemente es de 0.7 a 3% y la temperatura varía en un rango de 120 a 220 °C. Con este proceso, se obtiene una fracción líquida, rica en azúcares libres (hexosas y pentosas) además de una fracción sólida compuesta

FUNDAMENTACIÓN

principalmente de celulosa y lignina residual. Este pretratamiento es eficiente en la solubilización de la hemicelulosa, en especial el xilano, puesto que el glucomanano es resistente al ácido. Sin embargo, este método, no resulta del todo efectivo para la eliminación de lignina (Hendriks and Zeeman 2009).

- 3.2. Hidrólisis alcalina:** el pretratamiento alcalino es capaz de separar tanto hemicelulosa como la lignina, sin tener grandes efectos sobre los demás componentes. Los reactivos más utilizados son la sosa cáustica (NaOH), amoníaco (NH₃), hidróxido de potasio (KOH) y cal (CaO, Ca(OH)₂). A diferencia de los pretratamientos ácidos, los alcalinos no necesitan temperaturas altas, aunque por lo general, se requieren tiempos más prolongados de reacción. Los pretratamientos con NaOH, logran que la biomasa se hinche, llevando a un aumento del área de superficie de contacto, logrando una disminución del grado de cristalinidad y una disrupción en la estructura de la lignina (Camesasca 2013).
- 3.3. Solventes orgánicos:** el pretratamiento con solventes orgánicos es efectivo en la eliminación de lignina, pero no para la eliminación de la hemicelulosa. Los solventes más utilizados son el metanol, etanol, etilenglicol, trietilenglicol y acetona (Camesasca 2013).
- 3.4. Ozonólisis:** el ozono ha sido utilizado para degradar la lignina y la hemicelulosa de numerosos materiales lignocelulósicos como paja de trigo, bagazo, pino, algodón y aserrín de álamo. La degradación por ozonólisis se limita fundamentalmente a la reducción de lignina ya que la hemicelulosa es atacada levemente, y la celulosa apenas si se ve afectada. Este tratamiento no origina productos tóxicos, y la reacción se realiza a temperatura ambiente y presión atmosférica, es principalmente empleada para productos maderables (Ye Sun and Cheng 2002).
- 3.5. Oxidación húmeda:** es un método efectivo para aumentar la digestibilidad enzimática de la celulosa y eliminar la lignina. Sin embargo, el método es bastante inespecífico, por lo que durante el pretratamiento se degradan muchos azúcares, sobre todo de la hemicelulosa. El método consiste en la adición de agentes oxidantes a la biomasa suspendida en agua, los agentes oxidantes más empleados son el peróxido de hidrogeno (H₂O₂) y el ácido peracético (CH₃CO₃H). Este pretratamiento no requiere

de altas temperaturas pero si de largos tiempos de reacción que oscilan entre las 18-24 horas (Camesasca 2013).

4. Métodos biotecnológicos

4.1. Microorganismos: la actividad celulolítica está ampliamente distribuida en el reino Fungí y en algunas bacterias. Los hongos son los más estudiados, se encuentran divididos en anaerobios de los géneros *Neocallimastix*, *Piromyces*, *Caecomyces*, *Orpinomyces* y *Anareomyces*, y aerobios de los géneros *Bulgaria*, *Chaetomium*, *Helotium*, *Neurospora*, *Cariolus*, *Phanerochaete*, *Pleurotus*, *Trametes*, *Poria*, *Aspergillus*, *Trichoderma*, entre otros. En este proceso se emplean dichos microorganismos con el objetivo principal de lograr la degradación de la lignina y la hemicelulosa, eliminando así las barreras que protegen a la celulosa, haciéndola más accesible para el posterior ataque enzimático (Gutiérrez, Hernández, and Barrágan 2014).

4.2. Hidrólisis enzimática: La hidrólisis enzimática es el corazón de la “plataforma bioquímica” o “plataforma del azúcar”, se basa en la conversión de la biomasa lignocelulósica en azúcares, para producir combustibles y productos químicos renovables (Stickel et al. 2014). Este tratamiento, es llevado a cabo por enzimas celulasas que poseen una alta especificidad. Los productos de la hidrólisis son en su mayoría pentosas y hexosas, incluida la glucosa, que pueden ser fermentadas por levaduras o bacterias para producir etanol. Las condiciones medioambientales para el uso de la hidrólisis enzimática, son suaves con pH desde 3.8 a 9.5 y temperaturas entre 45 y 50°C (Cortínez 2010).

Actualmente no existe un procedimiento único que se pueda aplicar indistintamente para la sacarificación de diversos materiales lignocelulósicos, esto se debe a que cada biomasa tiene una composición específica, por ello la aplicación de los diversos métodos se evalúa en función del tipo de biomasa que se esté manejando. Cabe mencionar que la aplicación de algunas de estas técnicas, para facilitar la sacarificación presentan ciertas desventajas como son; la producción de agentes inhibidores de la fermentación como 5-hidroximetilfurfural y furfural, así como formación de emulsiones que generan problemas de separación que se

FUNDAMENTACIÓN

traducen en un incremento en los costos de operación. Por ello, con cada biomasa se tienen que realizar estudios que logren mejorar la eficiencia de hidrólisis, mediante el empleo de la acción combinada de los diferentes pretratamientos y en conjunto con la acción de enzimas, obtener una tecnología limpia capaz de generar el mayor rendimiento de azúcares fermentables.

5.6.1 Sacarificación

En esta etapa se produce la liberación de azúcares simples en su mayoría pentosas y hexosas, que provienen del material lignocelulósico degradado por enzimas específicas para este propósito. Las enzimas involucradas en este proceso son principalmente las endoglucanasas, exoglucanasas y β -glucosidasas, estas trabajan sinérgicamente para la liberación de glucosa (Juri Awad 2011).

Las endoglucanasas o 1,4- β -D-glucano-4-glucanohidrolasas (EC 3.2.1.4), actúan al azar en el interior del polímero, hidrolizando enlaces β -1,4 y generando nuevos finales de cadena no reductores. Puede actuar también sobre celodextrinas, y derivados sustituidos como carboximetilcelulosa (CMC), e hidroximetilcelulosa (HMC), así como sobre la celulosa amorfa.

Las exoglucanasas: a) 1,4- β -D-glucano celobiohidrolasas (EC 3.2.1.91.) o celobiohidrolasa (CBH) actúan sobre los extremos no reductores de la cadena generados por la endoglucanasa, liberando moléculas de celobiosa. Esta enzima tiene actividad sobre celulosa cristalina y amorfa, b) 1,4- β -D-glucanohidrolasas (EC 3.2.1.74.) o glucanohidrolasa (GGH) se encuentra en pequeña proporción y actúa sobre los extremos no reductores liberando unidades de glucosa. Tiene actividad sobre celulosa amorfa y CMC (Manavalan, Manavalan, and Heese 2015).

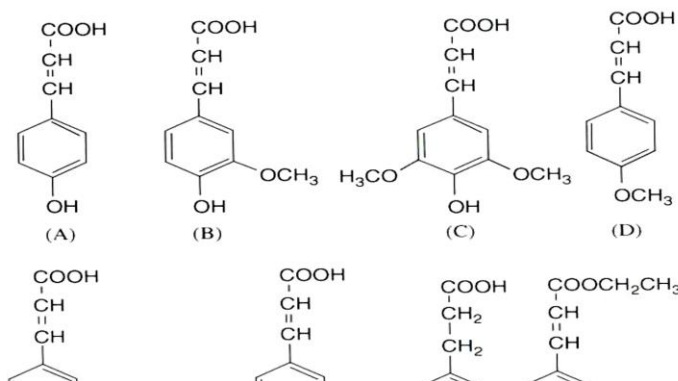
Las glucosidasas o β -glucósido glucohidrolasas (EC 3.2.1.21.) se encargan de hidrolizar celobiosa y oligosacáridos de pequeño tamaño, son absolutamente necesarias para evitar la fuerte inhibición que produciría la acumulación de celobiosa, sobre las endo y exo-glucanasas (Lozanoff, Heinichen, and Marchi 2007).

5.6.2 Subproductos de la hidrólisis involucrados en la inhibición de los procesos fermentativos.

Como ya se había mencionado anteriormente, con ciertos pretratamientos se pueden generar subproductos, los cuales suelen ser fuertes inhibidores para los procesos fermentativos e incluso como producto final, resultan inhibidores de la actividad enzimática hidrolítica. Por ello, estos inhibidores disminuyen la eficiencia de los procesos hidrolíticos durante la sacarificación, provocando a su vez, bajos rendimientos en la producción de bioetanol.

La lignina (Figura 9), es un heteropolímero que del cual se reconoce la inhibición de la hidrólisis de la celulosa, por una parte mediante la formación de una barrera física que restringe el acceso enzimático a la celulosa, y por otro por la formación de intermediarios tipo quinometano, que forman fácilmente interrelaciones en los sitios nucleofílicos de los carbohidratos y/o enzimas, y por lo tanto interfieren con la hidrólisis de la celulosa. Cabe señalar, que la presencia de grupos hidroxi-fenólicos, son necesarios para la formación del quinometano, ya que estos tienen la capacidad de interferir en la interacción entre la celulosa y las celulasas (Pan 2008).

Un ejemplo de esto, es cuando la cadena de celulosa entra en el túnel catalítico de la celobiohidrolasa, en el cual existen 10 sitios de unión (residuos de aminoácidos), donde se une la cadena de celulosa en un “modo de unión productiva” a través de los puentes de hidrogeno entre los grupo hidroxilo de la celulosa y los residuos de aminoácidos, de esta manera se ajusta y posiciona la cadena a través del túnel catalítico de una forma tal que el enlace glucosídico es escindido, resultando en la formación de celobiosa. Sin embargo, si los grupos hidroxi-fenólicos o ácidos fenólicos de la lignina interfieren en la hidrólisis enzimática y ocupan uno o más de estos sitios de unión en el túnel catalítico mediante la formación de puentes de hidrogeno u otras uniones, esto provocaría la disminución en el rendimiento hidrolítico (Pan 2008).



FUNDAMENTACIÓN

FIGURA 10. COMPONENTES DE LA LIGNINA. A) ÁCIDO P-COUMARICO; B) ÁCIDO FERULICO; C) ÁCIDO SINAPINICO; D) ÁCIDO 4-METOXICINAMICO; E) 3,4- DIMETOXICINAMICO; F) ÁCIDO 3,4,5-TRIMETOXICINAMICO; G) ÁCIDO PROPIONICO; H) ETIL 4-HIDROXI-3-METOXICINAMATO

Esto sucede de igual manera al momento de que la celulosa y hemicelulosa rompen sus enlaces para formar glucosa, xilosa, manosa, galactosa. Algunos de estos monosacáridos se pueden descomponer durante el proceso y formar compuestos como 5-Hidroximetilfurfural (HMF), y furfural, los cuales son compuestos inhibidores.

El **furfural** es un aldehído aromático con una estructura en anillo también conocido como furan-2-carboxaldehído, fural, furfuraldehído, aldehído piromúxico (Figura 11). Este compuesto se forma a través de la deshidratación de las pentosas, o bien, a partir de la descomposición del ácido ascórbico (Vejarano 2013).

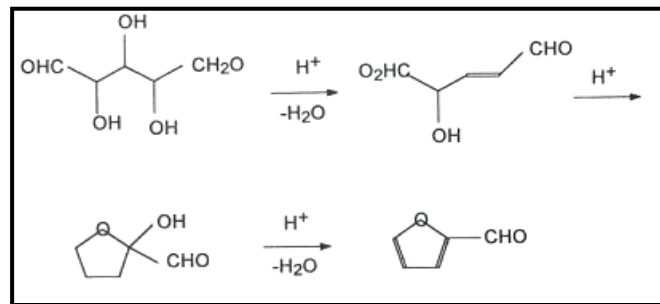
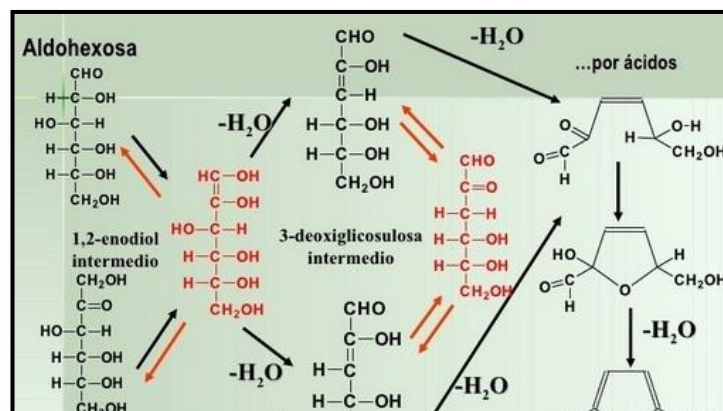


FIGURA 11. FORMACIÓN DE FURFURAL A PARTIR DE PENTOSAS

El **Hidroximetilfurfural** es un aldehído con anillo furano, formado durante la descomposición térmica de las hexosas, es también denominado HMF o 5-(Hidroximetil) furfural (Figura 12).



El mecanismo por el cual el furfural y el HMF afectan el metabolismo en los microorganismos fermentativos productores de etanol, no es completamente conocido, aunque se sugiere que estos aldehídos al ser químicamente reactivos, pueden formar compuestos con determinadas moléculas biológicas como lípidos, proteínas y ácidos nucleicos. Otros estudios indican que causan daños en la pared y membranas celulares, inhibiendo el crecimiento celular, causando daños en el ADN e inhiben la síntesis de proteínas y ARN (Oliva 2003).

Se sabe que el furfural ejerce una inhibición de tipo competitiva sobre las enzimas alcohol deshidrogenasa (ADH), encargada de la producción de etanol y ácido acético (aldehído deshidrogenasa, AIDH), ambos a partir del acetaldehído. El furfural es tóxico para las levaduras, estas lo convierten en compuestos menos perjudiciales, principalmente por reducción a alcohol furfurílico empleando NADH como cofactor, de manera que la enzima encargada de reducir el acetaldehído a etanol por vía glicolítica (Figura 13) es utilizada para este nuevo objetivo disminuyendo por consiguiente la síntesis de etanol (Vejarano 2013).

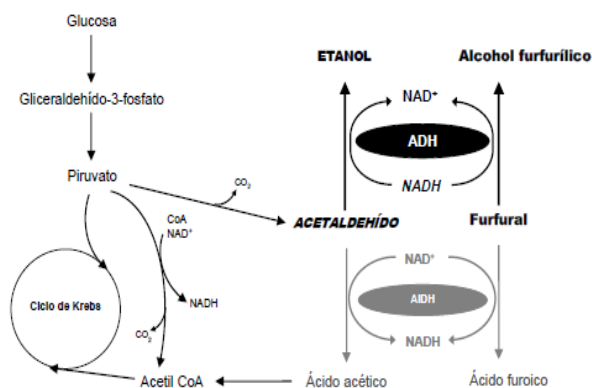


FIGURA 13. MECANISMOS DE INHIBICIÓN DEL FURFURAL

5.6.3 Principales enzimas comerciales empleadas en procesos hidrolíticos.

FUNDAMENTACIÓN

Actualmente en el mercado, hay una creciente demanda por las enzimas lignocelulósicas, para diversas aplicaciones, entre las que se destaca la bioconversión de material lignocelulósico para la producción de etanol (Singhania et al. 2010).

A nivel industrial existe una amplia gama de enzimas hidrolíticas; las cuales son selectivas y actúan en forma compleja (pectinasas, celulasas, oxidoreductasas y hemicelulasas), muchas de estas enzimas están disponibles en el mercado bajo diferentes nombres o marcas para diferentes aplicaciones, algunas de ellas se presentan en la tabla 7. La actividad de estas enzimas depende de factores medio ambientales como son la temperatura y pH, así como de la relación enzima-sustrato, con los cuales la sacarificación procede en condiciones óptimas, permitiendo obtener altos rendimientos en la producción de azúcares fermentables. En la tabla 8, se encuentran los parámetros de operación óptima de algunas de las enzimas comerciales más comúnmente empleadas en procesos hidrolíticos.

TABLA 7. PRINCIPALES ENZIMAS COMERCIALES USADAS EN LA HIDRÓLISIS DE LIGNOCELULOSA.

Nombre comercial	Tipo de enzima	Material lignocelulósico	Referencia
Celluclast 1.5 L	Complejo de celulasas	Pasto, madera, rastrojo de maíz, bagazo de caña	(Yoshida et al. 2008)
Novozyme 188	β - Glucosidasa	Rastrojo de maíz, paja de arroz, heno, bagazo de caña	(Y Sun and Cheng 2005)
Vizcozyme L	Endo- β -1, 4-Glucanasa	Soya, bagazo de caña, rastrojo de maíz	(Rosset and Del Pino Beléia 2014)
Cellic CTec2	β - Glucosidasa	Pasto, rastrojo de maíz, salvado	(Wang et al. 2012)
Cellubrix	Celulasa	Paja de arroz, caña de azúcar, melaza, y la yuca	(Boonmee 2012)
FibreZyme LBL	Complejo de celulasas/hemicelulasas	Papel, madera, bagazo de caña, pasto	(Prior and Day 2008)

TABLA 8. CONDICIONES DE OPERACIÓN OPTIMA DE ALGUNAS ENZIMAS COMERCIALES

Enzima comercial	Condiciones	Referencia
------------------	-------------	------------

FUNDAMENTACIÓN

Celluclast 1.5 L	pH: 4.8, Temperatura: 50-55°C , Carga: 20- 60 FPU/g	(Iberahim et al. 2013)
Novozyme 188	pH: 4.5- 5, Temperatura: 45-50°C, Carga: 40-60 FPU/mL	(Geddes et al. 2010)
Vizcozyme L	pH: 4.5-5, Temperatura: 50°C, Carga: 15-45 FBUG/g	(Rosset, Acquaro, and Beléia 2014)
Cellic CTec2	pH: 5- 5.5, Temperatura: 45-50°C, Carga: 11.3- 60 FPU/g	(Wang et al. 2012)

En todos los casos es evidente, que el empleo de estas enzimas sobre diversos sustratos con fines de producir azúcares fermentables, requiere de la optimización de los procesos ya sea en cuanto a las condiciones medio ambientales o en la relación enzima sustrato. Con el fin de conocer estas condiciones, en el presente trabajo se evalúan los principales factores que pueden influir sobre la eficiencia de producción de azúcares fermentables, a partir de nopal como sustrato y empleando enzimas comerciales usadas comúnmente en estos procesos.

PROCEDIMIENTOS

6. PROCEDIMIENTOS

6.1. Materia prima

El material vegetal utilizado en esta investigación fueron los cladodios frescos y secos de *Opuntia spp.*, los cuales se obtuvieron de una zona productora de nopal en Chapingo en el estado de México.

6.2. Caracterización fisicoquímica y fitoquímica

6.2.1. Determinación de humedad

La humedad se determinó empleando una termo balanza digital (Analizador de humedad Ohaus, MB45) de acuerdo al método establecido por la norma mexicana NMX-F-428-1982(NMX-F-428-1982 1978), cuyo fundamento se basa en que la humedad es tomada como la pérdida de peso durante el secado, el equipo emplea una balanza de torsión sensible para pesar la muestra durante el secado por una lámpara infrarroja.

6.2.2. Determinación de cenizas

La determinación de cenizas se realizó por el método de la AOAC 923.03, 1990 (International 1990), en el que se establece que la muestra seca se carboniza y posteriormente se incinera a 600°C, por último se pesa en la balanza analítica cuando alcanza temperatura ambiente, se calcula el % de cenizas utilizando la siguiente fórmula:

$$(1) \% \text{Cenizas} = \left(\frac{g \text{ de residuo fijo}}{g \text{ muestra}} \right) \times 100$$

6.2.3. Determinación de color

La determinación del color de los cladodios frescos y la harina de nopal, se realizó con ayuda de un colorímetro Mini-Scan, (marca Hunter Lab). EL valor del color se expresó usando los parámetros de L*(luminosidad), a* (+ rojo, - verde), b*(+ amarillo, -azul), croma o saturación (C*) de acuerdo a la fórmula 2 y hue (h°) de acuerdo a la fórmula 3.

$$(2) C^* = \sqrt{a^{*2} + b^{*2}}$$

$$(3) h^\circ = \tan^{-1} \frac{b^*}{a^*} \text{ (cuando } a^* > 0\text{); } h^\circ = 180 + \tan^{-1} \frac{b^*}{a^*} \text{ (cuando } a^* < 0\text{)}$$

6.2.4. Determinación de minerales

Dentro de los principales minerales que se encuentran en las plantas tenemos: el calcio, magnesio, sodio, potasio, hierro, cobre, manganeso, cobalto, zinc y molibdeno. Muchos de ellos actúan como cofactores de enzimas, para controlar la presión osmótica de fluidos celulares y el pH, o como parte constitutiva de algunas macromoléculas. Su determinación, se llevó a cabo considerando los minerales importantes en procesos fermentativos como son K, Mg, Ca y Na. Esta determinación fue realizada por absorción atómica.

6.2.5. Determinación de pH

El pH es una magnitud que expresa el grado de acidez o alcalinidad presentes en un sustrato. Este parámetro se midió de acuerdo a la norma oficial mexicana NMX-F-317-S-1978 (NMX-F-317-S-1978. 1978), este método se basa en la medición de los iones hidrógeno presentes en una muestra empleando un potenciómetro.

PROCEDIMIENTOS

6.2.6 Determinación de proteína soluble

Se determinó el contenido de proteínas de cada muestra, mediante el método Lowry (Lowry et al. 1951). Elaborando una curva de calibración y empleando un estándar de albúmina sérica bovina (BSA) en un rango de concentración de 0 a 0.5 mg/mL. La medición se realizó en un espectrofotómetro a 550 nm (Anexo 1).

6.2.7 Cuantificación de polifenoles totales

El contenido de polifenoles totales se determinó por espectrofotometría siguiendo la metodología propuesta por (Vasco, Ruales, and Kamal-eldin 2008) con algunas modificaciones. Se tomaron 20 μ L de muestra, se mezclaron con 250 μ L del reactivo Folin-Ciocalteu a temperatura ambiente durante 3 min, posteriormente 1250 μ L de una solución de carbonato de sodio (Na_2CO_3) al 7.5% es adicionado, luego se realizó la homogeneización de la mezcla para ser llevada a un volumen de 2 mL con agua destilada. Esta la muestra se dejó en reposo durante 30 min a temperatura ambiente en condiciones de oscuridad para su posterior análisis. La absorbancia se midió a 760 nm contra una curva de calibración de concentraciones conocidas de ácido gálico en un rango de concentración de 0.025-0.2 mg/ mL (Anexo 2). Lo anterior con el fin de expresar los resultados en términos de equivalentes de ácido gálico (EAG)/g de muestra.

6.2.8 Determinación de flavonoides totales

El contenido de flavonoides totales fue cuantificado siguiendo la metodología del tricloruro de aluminio propuesto por (Cruz Gallegos 2012) con algunas modificaciones. Se tomaron 500 μ L de la muestra, se mezclaron con 500 μ L de nitrito de sodio (NaNO_2) al 1.5% (p/v) y se agitaron durante 1 min en un vórtex y se dejaron reposar por 5 min, luego se agregó 500 μ L de AlCl_3 al 3% (p/v), se agitaron nuevamente y se dejaron reposar por 6 min, posteriormente se le añadió 500 μ L de hidróxido de sodio (NaOH 1 M), la mezcla se agitó y se dejó reposar durante 10 min, para finalmente medir la absorbancia a 490 nm, contra

PROCEDIMIENTOS

una curva de calibración de Quercetina en un rango de concentración de 20-80 mg/L (Anexo 3).

6.3 Determinación de azúcares

6.3.1 Determinación de azúcares reductores libres

Para la determinación de azúcares reductores se siguió el método de Miller, en el cual se emplea el ácido dinitrosalícílico (DNS) para formar un complejo colorido con los azúcares reductores presentes en la muestra (Miller 1959). La curva de calibración emplea un patrón de glucosa anhidra en un rango de concentración de 0.1-1 g/L. El ensayo se realizó con la siguiente modificación: en tubos de ensayo se agrega 0.5 mL de la muestra o del estándar de concentración conocida, se añade 1.5 mL de la solución DNS, los tubos se colocan en un baño de agua a una temperatura de 100 °C durante 15 min. Transcurrido el tiempo de reacción los tubos se enfrían en agua helada y por último la reacción se detiene agregándoles 8 mL de agua destilada, se homogenizan y se mide la absorbancia a 550 nm (Anexo 4).

6.3.2 Determinación de carbohidratos totales

La cuantificación de carbohidratos totales se realizó empleando el método de (Dubois, 1959). Para cuantificar la concentración de azúcares totales presentes en las muestras se preparara una curva de calibración de sacarosa a un rango de 0.01-0.1 g/L, las muestras y la curva de calibración se miden en un espectrofotómetro a 492 nm. Para estimar la concentración se calcula mediante regresión lineal en comparación con la concentración de la curva estándar de sacarosa (Anexo 5).

6.3.3 Determinación de glucosa y sacarosa

Los azúcares liberados de las muestras hidrolizadas, fueron analizadas mediante un analizador bioquímico (YSI modelo 2900D). Donde se emplean dos membranas selectivas con enzimas inmovilizadas, la primera membrana YSI 2703, contiene glucosa oxidasa, β -

PROCEDIMIENTOS

fructosidasa y mutarotasa, la segunda membrana YSI 2365, con glucosa oxidasa de *Aspergillus niger*, ambas membranas detectan glucosa, sin embargo la primera también detecta sacarosa y melobiosa, este último es un disacárido con enlaces β -glucosídicos entre galactosa y glucosa. La determinación se realizó empleando curvas estándar de concentración conocida de sacarosa y glucosa respectivamente en un rango de concentración.

6.3.4 Determinación cualitativa de azúcares mediante la prueba de Fenilhidrazina

Los derivados de Fenilhidrazina condensan con aldehídos y cetonas, formando hidrazonas que dan precipitados de color amarillo, estos compuestos forman cristales de osazona que tienen forma y puntos de fusión característicos, permitiendo la identificación de los azúcares. Esta reacción es empleada, como ensayo analítico para identificar aldehídos y cetonas en azúcares. La prueba consiste en agregar 1 mL de la muestra en uno tubo de ensayo con 250 μ L del reactivo de fenilhidrazina (1:1:4, Fenilhidrazina-Ácido acético glacial-agua destilada), los tubos se colocan en un baño de agua caliente a 100 °C, durante 10 min, posteriormente se enfrían y se dejan reposando durante 5 min. La formación de los cristales de osazonas se pueden observar con un microscopio óptico, para determinar la morfología. Algunas de las formas cristalinas de estos azúcares se presentan en el anexo 6.

6.3.5. Determinación del porcentaje de sacarificación

El porcentaje de sacarificación se determinó de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$(4) \% \text{ Sacarificación} = \frac{\text{Azúcares liberados}}{\text{Concentración de sustrato}} \times 100$$

6.4. Determinación de Furfural e Hidroximetilfurfural

Se realizó el análisis de los hidrolizados para la cuantificación de furfural e Hidroximetilfurfural, empleando un sistema ULPLC Acquity Hclass marca Waters. En este

PROCEDIMIENTOS

sistema se utilizó una columna Acquity UPLC HSSC₁₈ de 130Å, 1.8 µm, 2.1 x 50 mm. El método fue llevado a cabo usando un Fase A que contenía (agua: ácido acético: metanol) (80:2:18) y una fase B (agua: ácido acético: metanol) (8:2:90), siguiendo un sistema de gradiente el cual se presenta a continuación:

Tiempo min	%Fase A	%Fase B
Inicial	100	0
1.16	20	80
2.61	20	80
3.48	100	0
6.00	100	0

Se mantuvo un flujo de 0.2 mL/min y el volumen de inyección fue de 2 µl. El detector de PDA fue operado con una resolución de 4.8 nm, a una longitud de onda fijada a 280 nm. Las muestras fueron previamente neutralizadas y filtradas antes de la inyección empleando filtros PVDF MILLEX GV de 0.22 µm. Las concentraciones de furfural e hidroximetilfurfural en las muestras se determinaron contra una curva de calibración en un rango de 1 a 50 mg/L, con una mezcla de estándares de grado cromatográfico (Sigma-Aldrich) que incluían ambos compuestos, estos se diluyeron con una solución de H₂O:MeOH (1:1), los cromatogramas de estos compuestos se muestran en el anexo 7. Todas las muestras fueron analizadas por duplicado.

6.5. Pretratamiento de hidrólisis química en fresco y en harina de cladodios de nopal

Para la hidrólisis química en fresco se planteó un diseño factorial 2x3x3x3 tanto para el pretratamiento ácido como el alcalino, en el que en total se evaluarán 4 factores: tipo de compuesto hidrolizante con 2 niveles y la concentración, tiempo, temperatura con 3 niveles cada uno respectivamente, la variable de respuesta más importante a evaluar fue la concentración de azúcares obtenidos, así como también el contenido de subproductos (Furfural, HMF, etc.). El diseño experimental se presenta en la siguiente tabla, todos estos experimentos fueron realizados por duplicado:

PROCEDIMIENTOS

**TABLA 9. NIVELES ESTABLECIDOS PARA CADA FACTOR PARA EL DISEÑO FACTORIAL
2x2x3x3x3**

Pretratamiento	Tipo de compuesto hidrolizante	Concentración de reactante	Tiempo de pretratamiento (min)	Temperatura (°C)
Ácido	Ácido sulfúrico	0.5 N	45	30
		0.75 N	70	60
		1 N	120	95
	Ácido fosfórico	0.5 N	45	30
		0.75 N	70	60
		1 N	120	95
Alcalino	Hidróxido de sodio	0.5 N	45	30
		0.75 N	70	60
		1 N	120	95
	Hidróxido de potasio	0.5 N	45	30
		0.75 N	70	60
		1 N	120	95

Una vez establecido el diseño factorial, se realizaron las pruebas correspondientes en forma aleatoria por duplicado. Se trituraron 25 g de nopal fresco (Moulinex Spirali DG2) y se colocaron en frascos autoclavables, posteriormente se realizó la esterilización de las muestras a 121°C durante 15 min y por último se les agregó 25 mL de solución hidrolizante, manteniendo las concentraciones, tiempo y temperatura para cada tratamiento.

Este mismo diseño factorial se manejó para hidrólisis química de la harina de nopal, sin embargo en este caso se tomó 2.02 g de harina de nopal y se colocó en frascos autoclavables y para finalizar se les adiciono 30.6 mL de la solución hidrolizante, En todos los casos se mantuvo una relación soluto/solvente de 0.06 g en base seca/mL.

Posteriormente se realizó el análisis estadístico con ayuda del programa Statgraphics Centurion XVI.I mediante un análisis de Varianza (ANOVA), en el que se evaluaron las diferencias entre los tratamientos a un nivel de confianza de 0.05.

PROCEDIMIENTOS

6.6. Hidrólisis enzimática en harina de cladodios de nopal

En esta etapa se planteó un diseño factorial 2x3x3 en el cual se evaluarán los factores tipo de enzima con dos niveles, relación enzima-sustrato, medida en unidades de papel filtro y unidades de carboximetilcelulosa por gramo de sustrato empleado y el tiempo con tres niveles cada uno. Durante la sacarificación se utilizaron como biomasa, la harina de nopal previamente, tratadas con las mejores condiciones del pretratamiento químico, dichas biomásas fueron colocadas en frascos previamente esterilizados, donde se les adiciono 25 mL de buffer de citratos pH 4.8 y se les agrego 15, 25 y 30 UPF/g de harina de nopal para el tratamiento con la enzima Celluclast, y 15, 30 y 60 UCMC/g de harina de nopal para el tratamiento con la enzima Viscozyme, estos fueron incubados a 45 °C a 150 rpm, durante 24, 48 y 72 horas, todo esto se realizó por duplicado. Una vez terminadas las hidrólisis enzimáticas se realizó el análisis estadístico con ayuda del programa STATGRAPHICS Centurion XVI donde se evaluaron los factores tipo de enzima, actividad enzimática y tiempo.

TABLA 10. NIVELES ESTABLECIDOS PARA CADA FACTOR PARA EL DISEÑO FACTORIAL 2x3x3

Pretratamiento	Tipo de enzima	Relación enzima-sustrato	Tiempo de pretratamiento (h)
Enzimático	°Viscozyme L	15	24
		25	48
		30	72
	*Celluclast 1.5 L	15	24
		25	48
		30	72

°CMC/g y *UPF/g de cladodios de nopal

6.7. Determinación de actividad celulolítica

La actividad celulolítica de las enzimas comerciales, fue cuantificada y definida en Unidades de Papel Filtro (UPF) de acuerdo al método establecido por Adney & Baker (1996) que se encuentra dentro del reporte técnico de la National Renewable Energy Laboratory (NREL) (Anexo 8) (Adney and Nrel 2008).

6.8. Determinación de actividad de endo- β -1, 4- Glucanasa por Carboximetil Celulosa

La enzima comercial Viscozyme es del tipo endo- β -1, 4-Glucanasa, por ello la cuantificación de su actividad se realizara de acuerdo a la técnica establecida por Ghose en 1987, esta se basa en la capacidad hidrolítica de esta enzima para degradar la Carboximetil celulosa (CMC) a azúcares reductores (Anexo 9) (Ghose 1987).

6.9 Determinación de alcohol

Para la determinación de etanol se realizó con una solución de dicromato de potasio acidificada durante 10 min y se realizó la determinación por espectrofotometría a una longitud de onda de 585 nm. Para la curva de calibración se utilizó etanol puro como estándar, en concentración de 0.5 a 16 g/L (Anexo 10).

7. RESULTADOS Y DISCUSIONES

7.1. Materia prima

El material vegetal fue proporcionado por la Universidad Politécnica de Pachuca como parte de las actividades que integra el proyecto de investigación global. En la primera etapa, se trabajó con cladodios de nopal de 6 y 12 meses de edad, colectados en mayo de 2015, se evaluaron 6 variedades identificadas como: Copena VI, Larreyi, Goliat, Energy, Milpa Alta y Atlixco, El nopal fresco se deshidrató en estufa de convección de aire a 70°C por 24 hrs y se molió en molino de cuchillas (Pulvex), las harinas fueron tamizadas a una malla de 500 µm y reservadas para su caracterización.

De acuerdo a las características en cuanto a contenido de carbohidratos, se determinó que para este estudio específicamente se trabajaría con la variedad Atlixco de 6 y 12 meses de edad, tanto en fresco como en seco. Por lo que este trabajo se realizó empleando 2 kg de harina de cladodios de nopal de la variedad Atlixco, de 12 meses de edad (Figura 14A) y 35 kg de nopal fresco de la variedad Atlixco de 6 meses de edad (Figura 14B), los cladodios tenían un peso promedio de 399.15 g, con un ancho de 15.84 cm, largo de 32.94 cm y espesor de 13.53 mm, cabe mencionar que los cladodios frescos de nopal fueron cortados en un procesador de alimentos Hobart a un tamaño de malla de 7/32” y fueron almacenados en congelación para su posterior análisis.



FIGURA 14. A) HARINA DE CLADODIOS DE NOPAL DE 12 MESES DE EDAD Y B) CLADODIOS FRESCOS DE NOPAL DE 6 MESES. VARIEDAD ATLIXCO

7.2. Caracterización fisicoquímica

A los cladodios de las 6 variedades de nopal se les midió color, se determinó el contenido de minerales y carbohidratos, polifenoles y humedad. Estos resultados se presentan en la tabla 11 y 12. Como podemos observar en ambas tablas las variedades Energy y Milpa Alta de 6 meses así como Copena VI, Energy y Milpa Alta de 12 meses muestran los mayores valores de acidez (0.404, 0.382 0.444, 0.339 y 0.338 % respectivamente). Con relación al color, en la luminosidad o L* las variedades de harinas de cladodios de nopal no mostraron grandes diferencias, todas estas presentaron una alta luminosidad; con respecto al comportamiento del parámetro croma o C*, en la tabla 11 podemos ver que solo la variedad Copena VI de 6 meses muestra una menor intensidad, la cual es sobrepasada por las otras variedades estudiadas y en la tabla 12 todas la variedades muestran una similitud en su intensidad o saturación de color que va de 19.39-22.44, y de acuerdo al ángulo de tono o H*, en el presente estudio las muestras se situaron en el tono amarillo, donde se presentaron ángulos mayores de 70° pero menor de 180°. Como podemos ver en la gráfica (Figura 15) no se observa diferencia significativa entre las variedades evaluadas, en cuanto su contenido de humedad y poli fenoles totales y carbohidratos, por lo que para el resto de los ensayos se decidió que se realizaran empleando la variedad Atlixco, de la cual por estudios previos se sabe que se tiene una mejor producción y por lo tanto se tiene en mayor disposición.

En cuanto a los resultados de la caracterización del harina de la variedad Atlixco, se presentan en la tabla 12, como se puede observar el porcentaje de acidez titulable fue de 0.221%, el rango de valores reportado por otros autores para acidez titulable suelen estar entre 0.12-0.87% de ácido cítrico (Betancourt-Domínguez et al. 2006), por lo que tanto el valor de pH que fue de 4.87, como la acidez, se encuentran dentro de los rangos reportados. De acuerdo a la bibliografía el porcentaje de humedad en harina y liofilizados de cladodios de nopal se encuentra entre 4-7% dependiendo de la variedad y la edad, esto mismo sucede para las cenizas que van de 14-24% (Guevara-Figueroa et al. 2010; Rodríguez-García et al. 2007), en cuanto al contenido de minerales, este suele ser variable ya que depende del tipo de riego, suelo y proceso de fertilización que se le aplique a los cultivos de nopal, además de la variedad y la edad; aquí se presentan algunos porcentajes de

RESULTADOS Y DISCUSIONES

minerales presentes en cladodios de nopal, calcio 1.3-5.64%, fósforo 0.15-0.38, sodio 0.12-0.21%, potasio 2.35-6.84%, magnesio 0.19% (Feugang, Konarski, and Zou 2006; Guevara-Figueroa et al. 2010), el contenido de carbohidratos totales en harina de nopal que suele estar entre 25-60 % (Ramírez-Moreno et al. 2013). El contenido de carbohidratos totales determinado en la harina empleada en el presente trabajo fue del 30%, y el contenido de calcio fue uno de los más bajos de las variedades evaluadas. El contenido de calcio está directamente relacionado con la fuerza de formación de geles, por lo que un mayor contenido de calcio complicaría la viscosidad de las muestras.

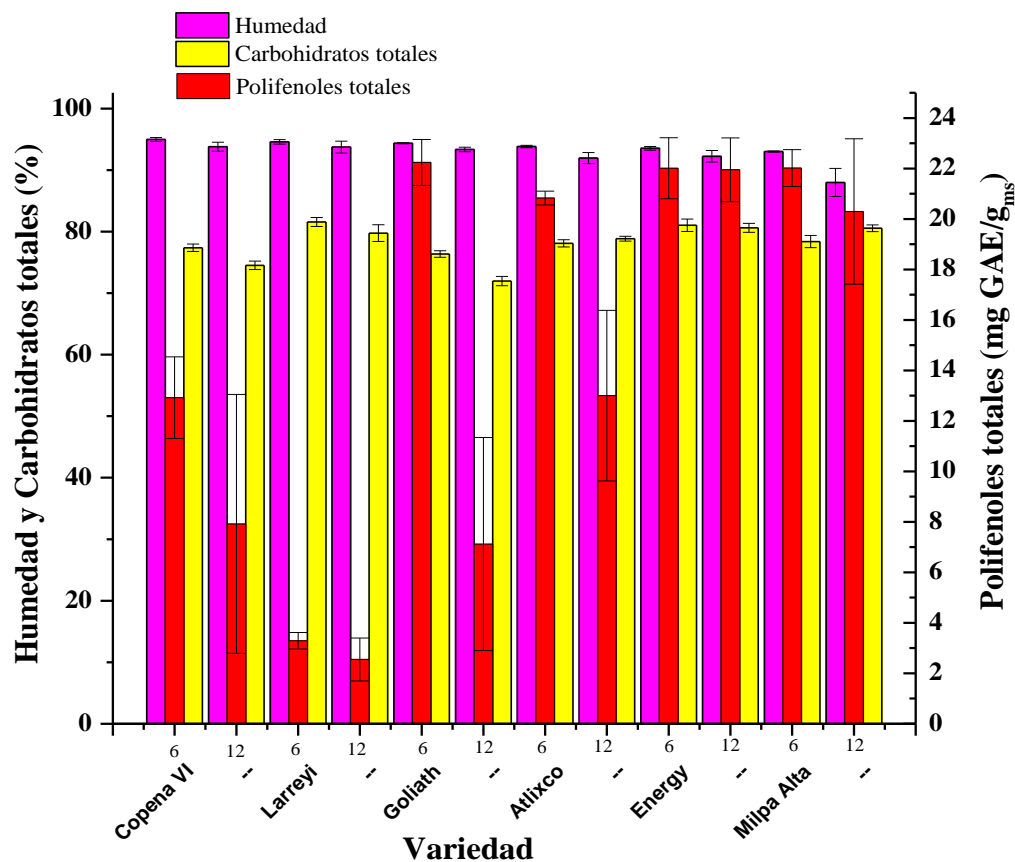


FIGURA 15. CONTENIDO DE HUMEDAD, CARBOHIDRATOS TOTALES Y POLIFENOLES TOTALES DE 6 VARIEDADES DE NOPAL A 2 DIFERENTES EDADES

RESULTADOS Y DISCUSIONES

TABLA 11. DETERMINACIÓN FISICOQUÍMICA DE HARINA DE CLADODIOS DE NOPAL DE 6 MESES

Determinación	Variedad				
	<i>Copena VI</i>	<i>Larreyi</i>	<i>Goliat</i>	<i>Energy</i>	<i>Milpa Alta</i>
Acidez titulable %	0.255	0.273	0.255	0.404	0.382
pH	5.3	5.21	5.1	5.02	4.94
Color					
L*	67.52	73.31	70.34	68.71	74.5
C*	17.77	21.15	19.79	22.21	20.03
h°	89.43	78.93	98.02	95.37	89.10
Minerales %					
Calcio	5.00	2.79	4.76	3.98	3.24
Magnesio	1.42	0.89	1.38	1.44	1.06
Potasio	5.68	4.32	3.54	3.67	3.48
Sodio	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02
Fosforo	0.74	0.26	0.22	0.25	0.09

TABLA 12. DETERMINACIÓN FISICOQUÍMICA DE HARINA DE CLADODIOS DE NOPAL DE 12 MESES.

Determinación	Variedad					
	<i>Copena VI</i>	<i>Larreyi</i>	<i>Goliat</i>	<i>Energy</i>	<i>Milpa Alta</i>	<i>Atlixco</i>
Acidez titulable %	0.444	0.254	0.275	0.339	0.338	0.221
pH	4.93	4.97	4.98	4.81	4.85	4.93
Color						
L*	74.03	74.91	73.76	77.134	79.69	77
C*	19.39	22.48	20.52	22.44	21.08	22.23
h°	96.83	85.79	97.36	92.51	89.32	91.95
Minerales %						
Calcio	5.67	2.85	4.44	4.62	4.93	3.79
Magnesio	1.32	0.73	1.57	1.03	1.00	0.87
Potasio	4.72	2.43	3.15	2.26	2.61	2.57
Sodio	0.02	0.02	0.01	0.01	0.01	0.01
Fosforo	0.74	0.36	0.26	0.27	0.11	0.13

En relación a la viscosidad esta fue determinada en un viscosímetro marca Brokfield, como puede verse en el Anexo 11 la concentración de harina de nopal en agua al 10 % tuvo un máximo de (Pa) comparado con la concentración de 20 % cuya viscosidad máxima fue de (Pa). Cabe mencionar que la capacidad de hinchamiento que se determino es de 80%, por lo que se decidió que la relación harina: solución hidrolizante, debería no ser mayor al 10%.

RESULTADOS Y DISCUSIONES

Los cladodios de nopal frescos y recién cortados fueron almacenados en bolsas de sellado hermético (ziploc) y congelados a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, para su posterior análisis (Figura 16).



FIGURA 16. CORTE Y ALMACENAMIENTO DE LOS CLADODIOS DE NOPAL.
VARIEDAD ATLIXCO 6 MESES

La composición química de los cladodios frescos de nopal se presenta en la tabla 13. El porcentaje de acidez titulable fue de 0.107 y el pH fue de 4.81, como podemos observar, con respecto a los valores obtenidos para la harina, existe una similitud. El contenido de humedad promedio obtenido fue de 93.39%, el cual es un valor semejante al reportado por otros autores con respecto a las variedades Milpa Alta y Atlixco (Bensadón et al. 2010; Ramírez-Moreno et al. 2013), este dato nos indica que el nopal posee un alto contenido de agua. La concentración de compuestos antioxidantes fue de 1.37 mg de polifenoles totales y 0.60 g flavonoides por g de cladodios de nopal fresco siendo mucho menor a la extraído en la harina esto puede ser debido al contenido de humedad que posee la materia fresca, ocasionando la pérdida de los polifenoles al momento de que los cladodios son secados y molidos.

RESULTADOS Y DISCUSIONES

TABLA 13. COMPOSICIÓN DE CLADODIOS DE NOPAL, VARIEDAD ATLIXCO

Determinación	Concentración (peso seco)	Concentración (peso fresco)
Acidez titulable (%)	0.221	0.101
pH	4.87	4.81
Humedad (%)	7.29	95
Cenizas (%)	22.08	
Calcio (%)	4.78	
Magnesio (%)	0.98	ND
Potasio (%)	3.36	
Sodio (%)	0.0061	
Fósforo (%)	0.064	
Fibra dietaría total (%)	25.255	44.89
Insoluble (%)	19.803	ND
Soluble (%)	5.452	
Proteína soluble (mg/100 g)	11.5	4.039
Polifenoles totales (mg EAG/g)	3.95	1.37
Flavonoides (mg/g)	1.40	0.60

ND. No determinado

7.3 Hidrólisis química en fresco

La hidrólisis se realizó siguiendo el diseño experimental descrito en la metodología (Tabla 9), en la figura 17 se muestran los resultados obtenidos para este diseño. Las concentraciones de azúcares obtenidas a partir del nopal fresco, como resultado de los diferentes pre tratamientos químicos, fueron mayores para los tratamientos con agentes alcalinos, en este caso son los que liberan la mayor cantidad de glucosa, a diferencia de los agentes ácidos. Sin embargo, de acuerdo al análisis estadístico ANOVA (tabla 14), podemos observar que existe un efecto significativo de los efectos principales y de algunas de sus interacciones (AC, AD, CD) sobre la cantidad de glucosa liberada, durante la hidrólisis química del nopal fresco ya que el valor- P es menor al nivel de significancia $\alpha=0.05$ establecido.

RESULTADOS Y DISCUSIONES

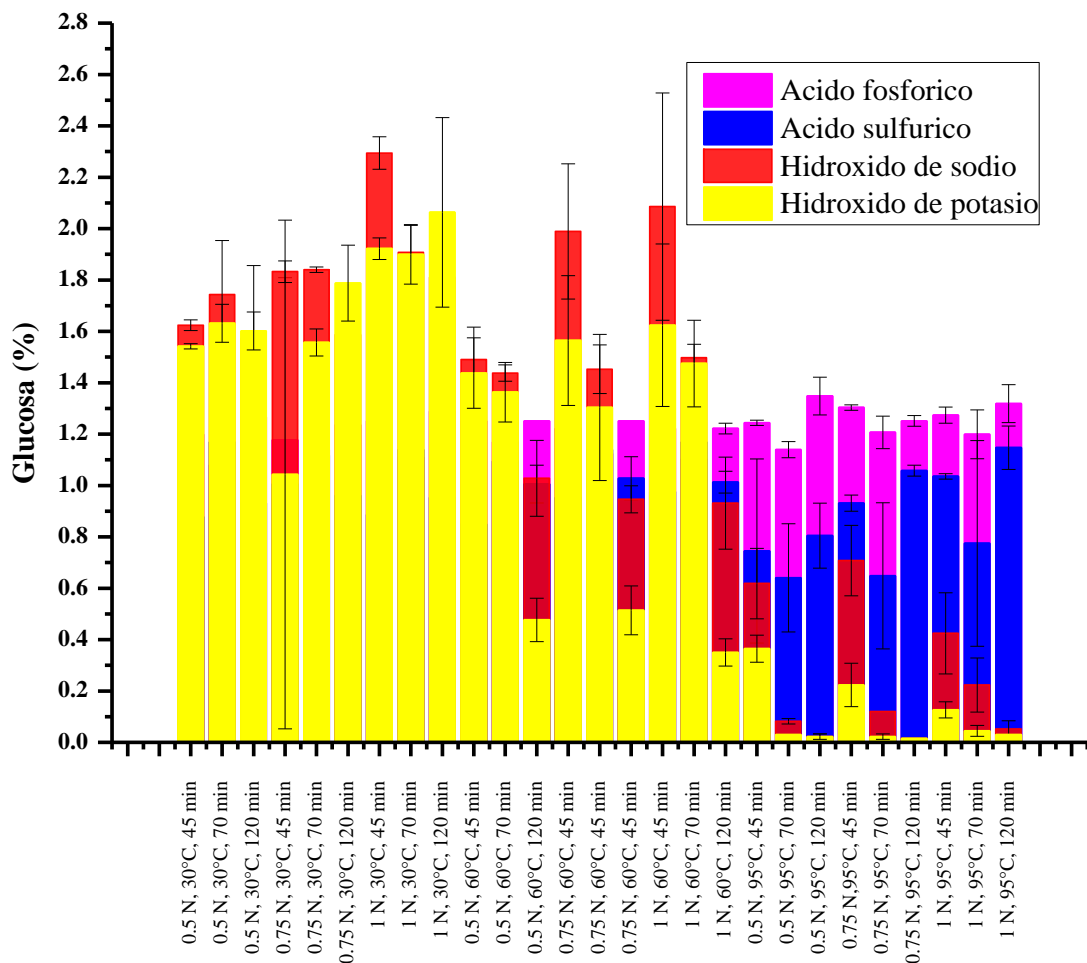


FIGURA 17. HIDRÓLISIS QUÍMICA DE CLADODIOS FRESCOS DE NOPAL VARIEDAD ATLIXCO DE 12 MESES. LIBERACIÓN DE GLUCOSA DURANTE LOS DIFERENTES TRATAMIENTOS

TABLA 14. ANÁLISIS DE VARIANZA MULTIFACTORIAL DEL DISEÑO 2X2X3X3X3 PARA GLUCOSA

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Hidrolizante	1.25805	3	0.419349	23.57	0.0000
B:Concentración	0.178958	2	0.0894792	5.03	0.0075
C:Temperatura	11.0853	2	5.54263	311.48	0.0000
D:Tiempo	0.641386	2	0.320693	18.02	0.0000
INTERACCIONES					
AB	0.122442	6	0.0204069	1.15	0.3372
AC	10.0209	6	1.67015	93.86	0.0000
AD	1.27508	6	0.212513	11.94	0.0000
BC	0.119222	4	0.0298056	1.67	0.1578
BD	0.0259556	4	0.00648889	0.36	0.8336
CD	1.00454	4	0.251136	14.11	0.0000
RESIDUOS	3.13182	176	0.0177944		
TOTAL (CORREGIDO)	28.8636	215			

RESULTADOS Y DISCUSIONES

Al realizar las pruebas de comparación de rangos múltiples (Tabla 15, 16, 17 y 18), poder ver las diferencias entre medias de cada factor: hidrolizante, concentración, temperatura y tiempo. Como podemos observar en la tabla 14 se forman 2 grupos homogéneos cuando el hidrolizante es: Hidróxido de potasio o Ácido sulfúrico e Hidróxido de sodio o Ácido fosfórico, en la tabla 15 de igual manera, podemos ver 2 grupos homogéneos que corresponden al efecto de la concentración donde la concentración de 0.5 o 0.75 N son un grupo homogéneo, mientras el segundo grupo es para la concentración 1 N. En la tabla 16 y 17 que corresponden a los factores temperatura y tiempo respectivamente, podemos notar que no se forman grupos homogéneos es decir cada nivel es diferente entre sí, siendo la temperatura de 30 °C y el tiempo de 45 minutos los de mejor respuesta, en cuanto a la concentración de glucosa.

TABLA 15. PRUEBAS DE MÚLTIPLE RANGOS PARA GLUCOSA POR HIDROLIZANTE

<i>Hidrolizante</i>	<i>Casos</i>	<i>Media LS</i>	<i>Sigma LS</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
Hidróxido de K	54	0.647222	0.0181529	X
Ácido sulfúrico	54	0.647778	0.0181529	X
Hidróxido de Na	54	0.778889	0.0181529	X
Ácido fosfórico	54	0.816667	0.0181529	X

TABLA 16. PRUEBAS DE MÚLTIPLE RANGOS PARA GLUCOSA POR CONCENTRACIÓN

<i>Concentración</i>	<i>Casos</i>	<i>Media LS</i>	<i>Sigma LS</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
0.5	72	0.692778	0.0157208	X
0.75	72	0.713611	0.0157208	X
1	72	0.761528	0.0157208	X

TABLA 17. PRUEBAS DE MÚLTIPLE RANGOS PARA GLUCOSA POR TEMPERATURA

<i>Temperatura</i>	<i>Casos</i>	<i>Media LS</i>	<i>Sigma LS</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
95	72	0.414167	0.0157208	X
60	72	0.801944	0.0157208	X
30	72	0.951806	0.0157208	X

RESULTADOS Y DISCUSIONES

TABLA 18. PRUEBAS DE MÚLTIPLE RANGOS PARA GLUCOSA POR TIEMPO

<i>Tiempo</i>	<i>Casos</i>	<i>Media LS</i>	<i>Sigma LS</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
120	72	0.655556	0.0157208	X
70	72	0.723333	0.0157208	X
45	72	0.789028	0.0157208	X

Este mismo resultado se puede corroborar mediante los gráficos de medias y diferencia mínima significativa, con una significancia de 0.05%. En la Figura 18 se muestran los resultados para cada uno de los factores establecidos, en función de la respuesta seleccionada; es decir, la concentración de glucosa liberada.

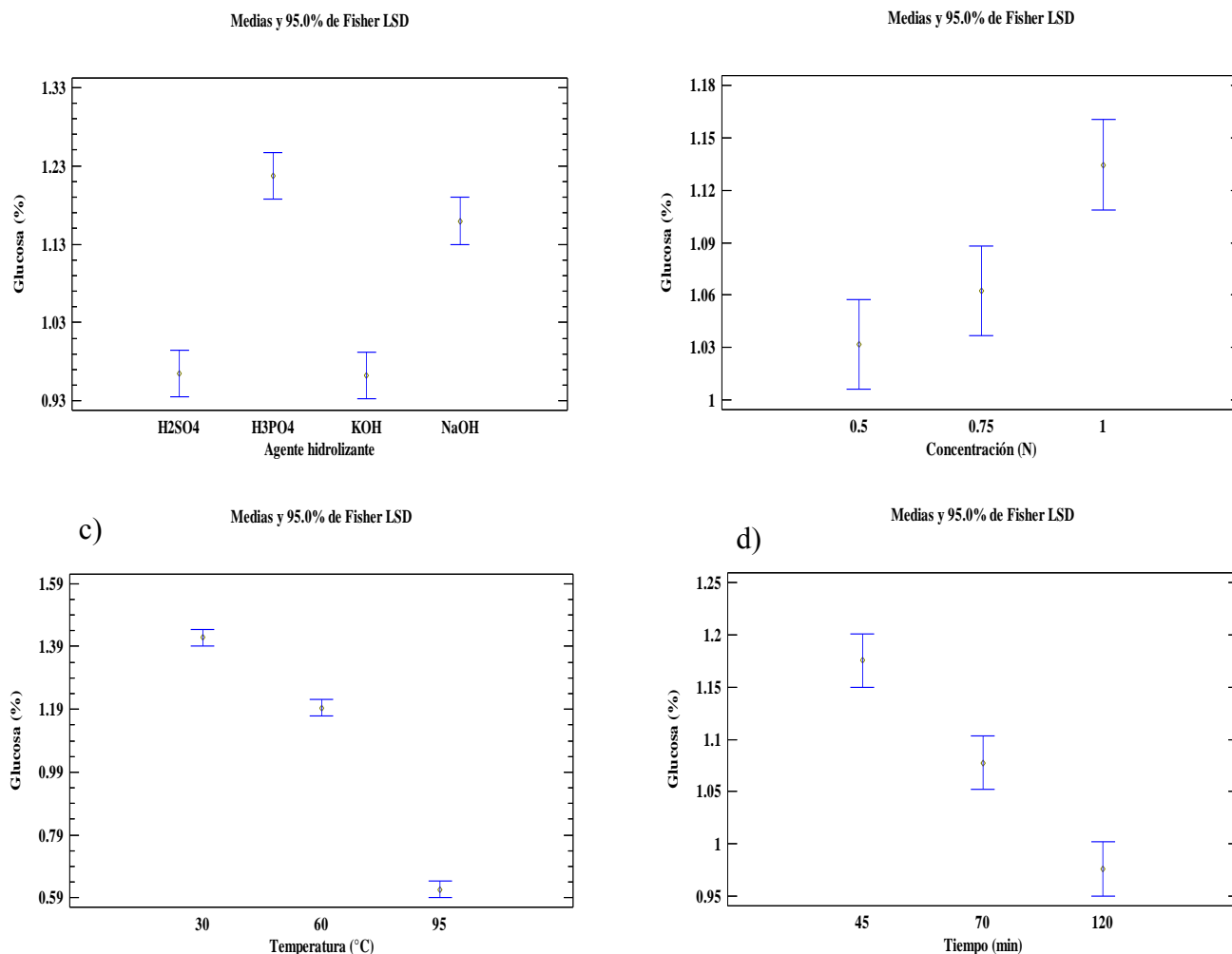


FIGURA 18. GRÁFICO DE MEDIAS. A) HIDROLIZANTE, B) CONCENTRACIÓN, C) TEMPERATURA Y D) TIEMPO

RESULTADOS Y DISCUSIONES

En la figura 19 se presentan las gráficas de interacciones, donde es posible observar que en la interacción agente hidrolizante-temperatura (Figura 19a), el hidróxido de sodio libera hasta 1.8% de glucosa a partir del nopal fresco a una temperatura de 30°C, en la interacción agente hidrolizante-tiempo (Figura 19b) podemos ver que el tiempo de 45 min tiene el mayor efecto junto con el hidróxido de sodio liberándose hasta 1.5% de glucosa, en la figura 18c que corresponde a la interacción concentración-temperatura, podemos notar que la concentración de 1 N tiene un efecto marcado sobre la liberación de glucosa el cual se ve aumentado con la temperatura de 30°C liberándose aproximadamente hasta 1.5% de glucosa a partir de nopal fresco y por último de acuerdo a la interacción temperatura-tiempo (Figura 19d) la mejor condición es manejar una temperatura de 30 °C sin importar el tiempo de hidrólisis.

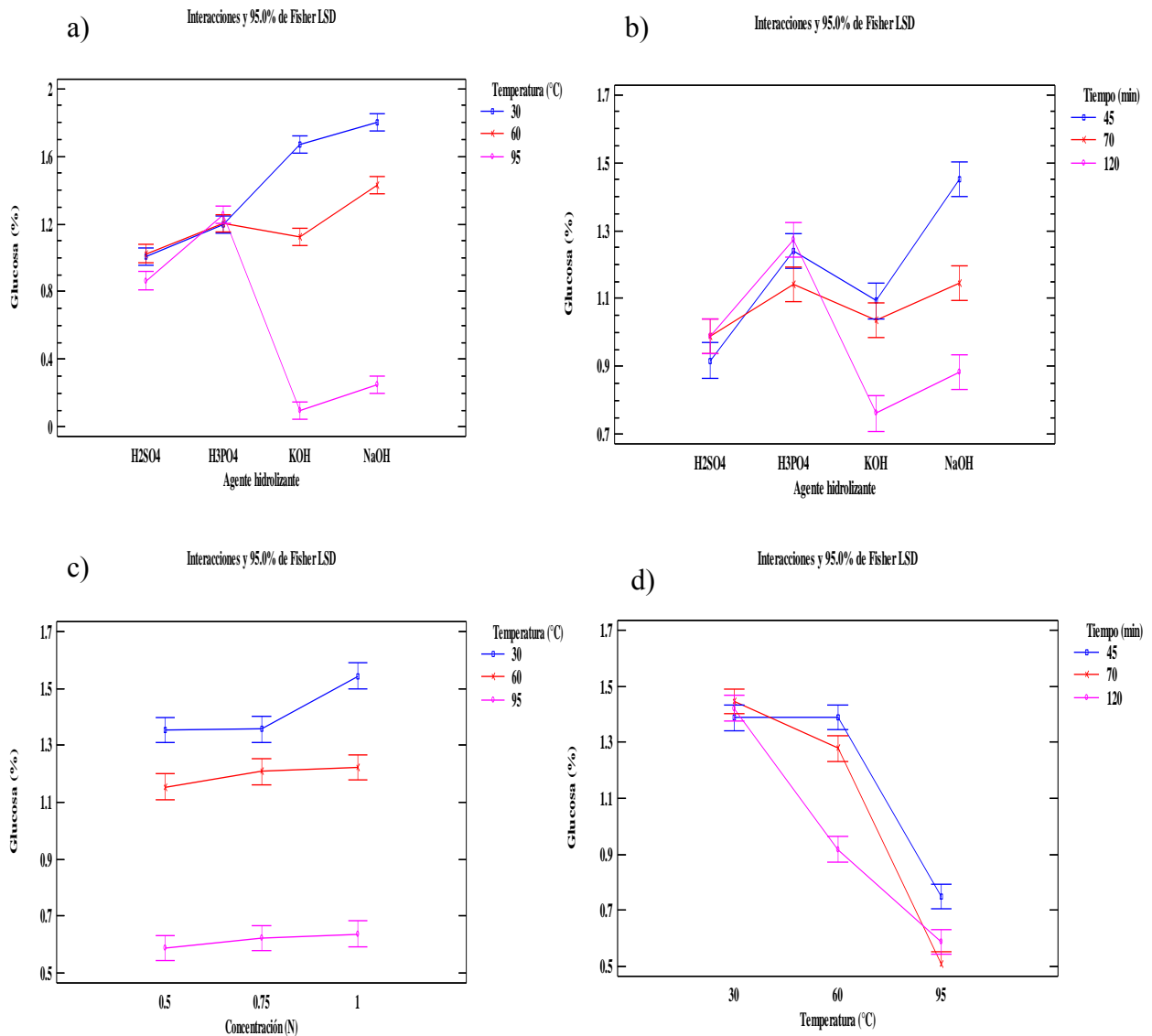


FIGURA 19. GRAFICAS DE INTERACCIONES PARA GLUCOSA. A) AGENTE HIDROLIZANTE-TEMPERATURA, B) AGENTE HIDROLIZANTE-TIEMPO, C) CONCENTRACIÓN-TEMPERATURA Y D) TEMPERATURA-TIEMPO

RESULTADOS Y DISCUSIONES

Adicionalmente, se realizó un análisis de varianza ANOVA (Tabla 19) para la variable de respuesta Hidroximetilfurfural (HMF), esto con la finalidad de poder determinar el efecto que tienen los factores sobre la producción de inhibidores de la fermentación. Y de este modo poder definir en conjunto con ambos resultados y establecer las mejores condiciones de trabajo en cuanto a la hidrólisis en fresco de cladodios de nopal.

TABLA 19. ANÁLISIS DE VARIANZA MULTIFACTORIAL DEL DISEÑO 2X2X3X3X3 PARA HMF

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Hidrolizante	40.5716	3	13.5239	13.74	0.0000
B:Concentración	7.14501	2	3.5725	3.63	0.0285
C:Temperatura	28.3962	2	14.1981	14.43	0.0000
D:Tiempo	10.3024	2	5.15121	5.23	0.0062
INTERACCIONES					
AB	18.0612	6	3.0102	3.06	0.0072
AC	38.7716	6	6.46194	6.57	0.0000
AD	20.6564	6	3.44274	3.50	0.0027
BC	7.32905	4	1.83226	1.86	0.1192
BD	4.76974	4	1.19243	1.21	0.3075
CD	23.2273	4	5.80683	5.90	0.0002
RESIDUOS	173.191	176	0.984041		
TOTAL (CORREGIDO)	372.422	215			

En este caso se puede observar que también existe un efecto significativo de los efectos principales y de algunas de sus interacciones (AB, AC, AD y CD) sobre la cantidad de HMF producido durante la hidrólisis en fresco (valor-*P* es menor al nivel de significancia $\alpha=0.05$). En la Figura 20, podemos observar que en todas las interacciones, la hidrólisis básica no presenta la formación de Hidroximetilfurfural a diferencia de lo que sucede con la hidrólisis ácida, en la cual se puede producir hasta 35 ppm.

De igual manera la hidrólisis alcalina, presento una mayor liberación de azúcares esto pudo deberse a que la biomasa de nopal sufrió una oxidación parcial o completa de la lignina, que permitió que la celulosa pudiera ser hidrolizada más fácilmente, algunos estudios proponen una hidrólisis alcalina, ya que esta permite un incremento en el área de superficie interna reduciendo el grado de polimerización y cristalinidad de la celulosa, causando la separación de las uniones estructurales entre la lignina y los carbohidratos (Cuervo, Folch, and Quiroz 2009). En el estudio realizado por (Pérez-Martínez et al. 2013) donde evaluaron diferentes pretratamientos para la extracción de pectina de nopal el cual es un componente importante de la pared celular del mismo que puede ser una barrera al momento de

RESULTADOS Y DISCUSIONES

hidrolizar dicha biomasa, ellos observaron que los cladodios de *Opuntia ficus indica* tratados con agentes alcalinos y soluciones quelantes logran desesterificar completamente la pectina, lo que les permitió obtener un alto contenido de Ácido galacturónico y glucanos (Pérez-Martínez et al. 2013). De igual manera un estudio realizado por (Ferreira et al. 2016) en el cual ellos realizaron una sacarificación y fermentación simultánea de biomasa de nopal donde evaluaron diferentes pretratamientos, ellos notaron que con las hidrólisis alcalinas obtuvieron mayores porcentajes de recuperación de celulosa (66-93%).

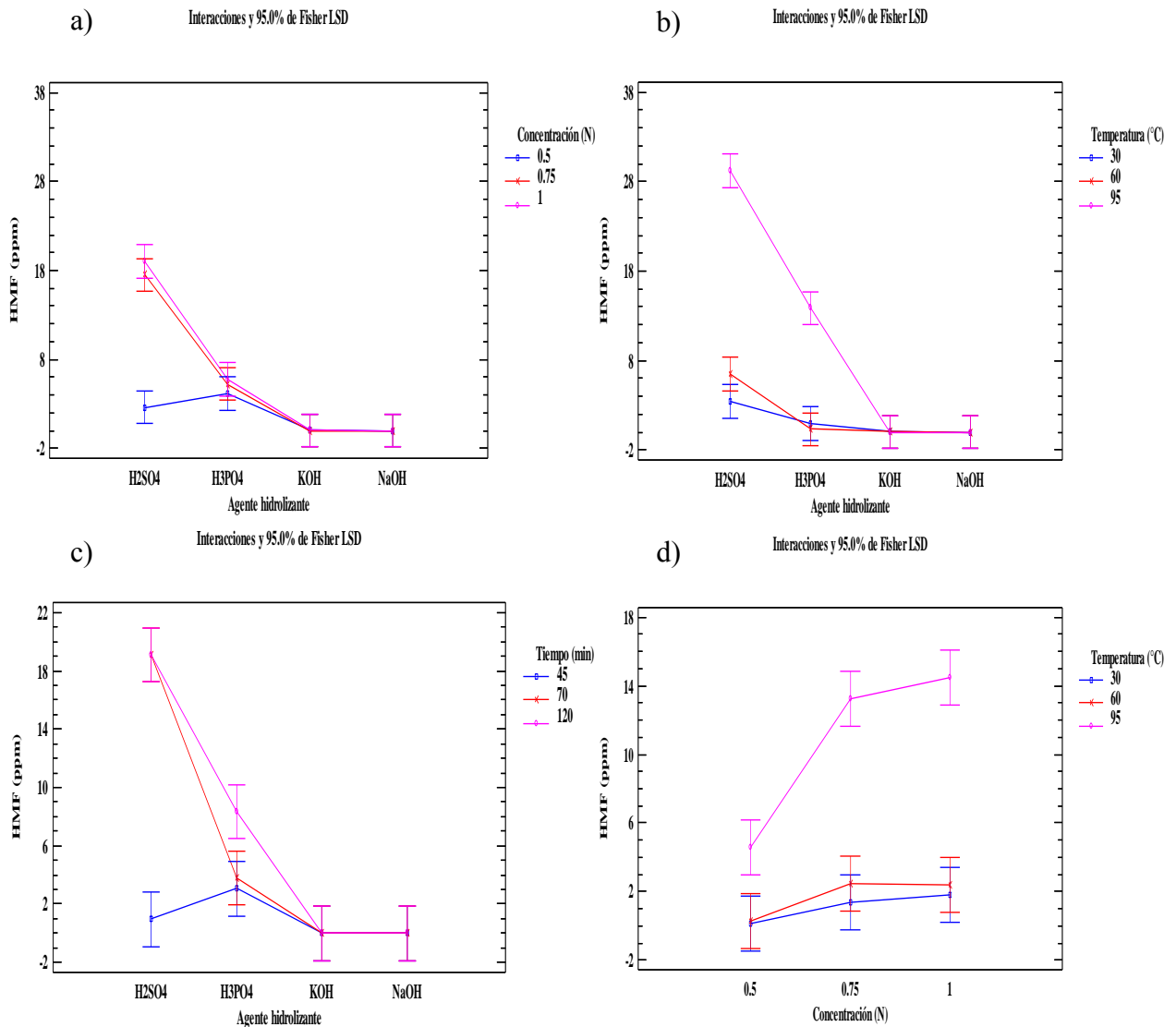


FIGURA 20. GRAFICA DE INTERACCIONES PARA HMF. A) HIDROLIZANTE-CONCENTRACIÓN, B) HIDROLIZANTE-TEMPERATURA, C) HIDROLIZANTE- TIEMPO Y D) TEMPERATURA-TIEMPO

RESULTADOS Y DISCUSIONES

Con todo ello podemos establecer que las mejores condiciones de hidrólisis en cladodios frescos de nopal, son: hidróxido de sodio como agente hidrolizante, a una concentración 1 N, con una temperatura de 30 °C y un tiempo de 45 min, para obtener hasta 1.5 % de glucosa liberada a partir de nopal fresco, sin la formación de inhibidores como HMF y F.

7.9. Determinación del tipo de azúcar

Para poder estimar que otras azúcares se formaron durante el proceso de hidrólisis, se realizó la técnica de cualificación por la formación de osazonas empleando fenilhidrazina y estándares de diferentes azúcares y mezclas de estos, para formar los aductos de osazona y poder comparar los cristales formados con los de nuestras muestras de hidrolizados. En la figura 21, en la primera columna se muestran las micrografías de dicha prueba, tanto para el estándar de manosa, y sus mezclas con estándares de Glucosa, Fructosa y Xilosa. En la segunda columna, de la misma figura, podemos observar la Muestra 1, correspondiente a las mejores condiciones de hidrólisis de nopal fresco y su réplica (Muestra 2), de acuerdo a lo que se corrobora mediante el análisis de varianza ANOVA. Como podemos, observar la formación de cristales de osazona, que mayoritariamente se forman en las muestras, son similares a la de los estándares combinados de fructosa-manosa y glucosa-manosa. Por lo que se asume que los azúcares que principalmente se liberan por esta hidrólisis son, glucosa, fructosa y manosa.

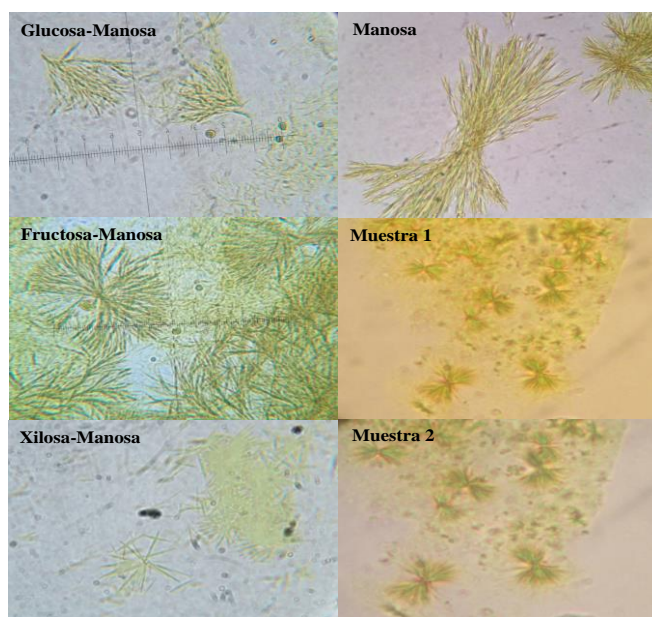


FIGURA 21. CRISTALES DE ESTÁNDARES DE AZÚCARES Y MUESTRAS DE LAS MEJORES CONDICIONES (NAOH, 1 N, 30°C Y 45 MIN), VISTO A TRAVÉS DE UN MICROSCOPIO A UNA RESOLUCIÓN 100X.

RESULTADOS Y DISCUSIONES

7.5. Hidrólisis química de harina de cladodios de nopal

Los diferentes tratamientos que se realizaron para la hidrólisis de harina de cladodios de nopal, se presentan en la figura 22. Podemos ver que la cantidad de glucosa liberada por el agente hidrolizante: ácido sulfúrico libera la mayor concentración de glucosa, al determinar la cantidad de azúcares reductores totales liberados, en dichos tratamientos, también se ve el mismo efecto (Figura 22).

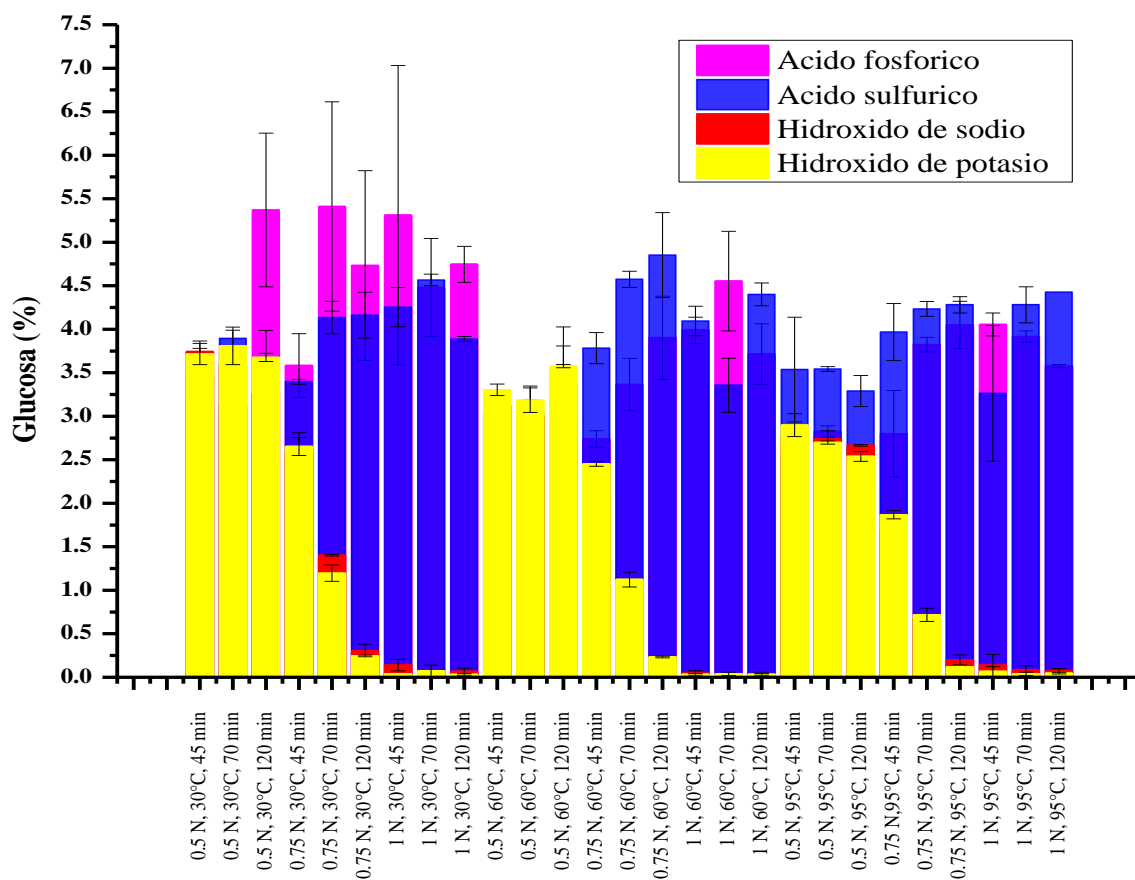


FIGURA 22. HIDRÓLISIS QUÍMICA DE HARINA DE CLADODIOS DE NOPAL VARIEDAD ATLIXCO DE 12 MESES. LIBERACIÓN DE GLUCOSA DURANTE LOS DIFERENTES TRATAMIENTOS

RESULTADOS Y DISCUSIONES

Para la hidrólisis de harina de nopal, en general se observa que los agentes hidrolizantes ácidos, liberan la mayor cantidad de glucosa siendo de hasta un 5 % a diferencia de los agentes alcalinos que solo liberan hasta un 3.5%, este resultado es similar a lo reportado por (Ferreira et al. 2016), donde usan 3 diferentes pretratamientos: Alcalino con peróxido de hidrogeno, alcalino usando hidróxido de sodio y ácido usando ácido sulfúrico sobre 2 especies de nopal (*Opuntia ficus indica* y *Nopalea cochenillifera*), ellos con el procedimiento alcalino liberan 30% de azúcares reductores totales, siendo una cantidad mucho menor a la esperada, sin embargo al combinar este método con el tratamiento ácido logran duplicar la liberación de azúcares reductores hasta alcanzar una liberación de 60%, esto es debido a que en la hidrólisis con ácido diluido incrementa la velocidad de solubilización de la hemicelulosa mientras que el pretratamiento alcalino, permite romper los puentes entre la lignina y carbohidratos, modificando la estructura de la lignina facilitando su liberación (Conde-Mejía, Jiménez-Gutiérrez, and El-Halwagi 2012). Es por ello que los pretratamientos químicos, actualmente se han considerado de gran importancia para desarrollar métodos para producción de bioetanol a partir de residuos lignocelulósicos.

Para este estudio el análisis de varianza (ANOVA) que se muestra en la tabla 20, de la hidrólisis química de la harina de cladodios de nopal, mostró que existen interacciones (AB, AC, AD, BC, CD, ABC Y ACD) que tienen un efecto estadísticamente significativo sobre la cantidad de glucosa producida durante la hidrólisis en harina de nopal ($p < 0.05$); de igual manera cabe mencionar que los factores principales: agente hidrolizante (A), concentración (B) y temperatura (C) tienen efecto sobre la variable de respuesta, ya que el valor- P es menor al nivel de significancia $\alpha = 0.05$ establecido.

En el figura 23 se presentan las diversas interacciones, donde es posible observar que en la interacción agente hidrolizante-concentración (AB) (Figura 23a), el ácido fosfórico libera una concentración aproximada de 4.3% de glucosa a partir de harina de nopal a una concentración de 0.5 N, en la interacción agente hidrolizante-temperatura (AC) (Figura 23b) podemos ver que el ácido sulfúrico y la temperatura de 95 °C tienen el mayor efecto con respecto a las otras soluciones hidrolizantes liberándose hasta 4.2g de glucosa/100 g de harina de nopal en base seca, en la Figura 23c que corresponde a la interacción agente

RESULTADOS Y DISCUSIONES

hidrolizante-tiempo (AD), podemos notar que el ácido sulfúrico tiene un efecto marcado sobre la liberación de glucosa el cual no se ve afectado por el tiempo de hidrólisis donde se libera aproximadamente hasta 4.0 g de glucosa/100 de harina de nopal en base seca, la interacción temperatura-tiempo (BC) (Figura 23d) la mejor condición es manejar una temperatura de 30 °C con una concentración de 0.5 N, por último la interacción temperatura-tiempo (CD) (Figura 10e) para liberar hasta 3.2% de glucosa es adecuado manejar una temperatura de 30°C y un tiempo de 45 min.

Con todo ello podemos establecer que de las condiciones de hidrólisis química probadas sobre la harina de cladodios de nopal, en la que se obtiene más glucosa son las siguientes: ácido sulfúrico a 1 N y temperatura de 95 °C por un tiempo de 70 min, obteniendo una concentración de 4.2 ± 0.20 g de glucosa por 100g de harina de nopal en base seca.

Al determinar el contenido de azúcares reductores totales, se verificó que la mayoría de los tratamientos con ácido sulfúrico mostraron una buena liberación de azúcares reductores (liberando 12-25%), como se presenta en la figura 24, podemos observar además que la mejor producción de azucares reductores totales se logra a 1N, 95°C y 70 min.

TABLA 20. ANÁLISIS MULTIFACTORIAL DEL DISEÑO EXPERIMENTAL 2X2X3X3X3 PARA GLUCOSA

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Agente hidrolizante	29320.3	3	9773.42	370.86	0.0000
B:Concentración	1067.97	2	533.987	20.26	0.0000
C:Temperatura	4228.2	2	2114.1	80.22	0.0000
D:Tiempo	94.4578	2	47.2289	1.79	0.1696
INTERACCIONES					
AB	810.828	6	135.138	5.13	0.0001
AC	15637.8	6	2606.29	98.90	0.0000
AD	1322.09	6	220.348	8.36	0.0000
BC	183.578	4	45.8946	1.74	0.1429
BD	15.9331	4	3.98329	0.15	0.9623
CD	266.13	4	66.5324	2.52	0.0426
RESIDUOS	4638.23	176	26.3536		
TOTAL (CORREGIDO)	57585.4	215			

RESULTADOS Y DISCUSIONES

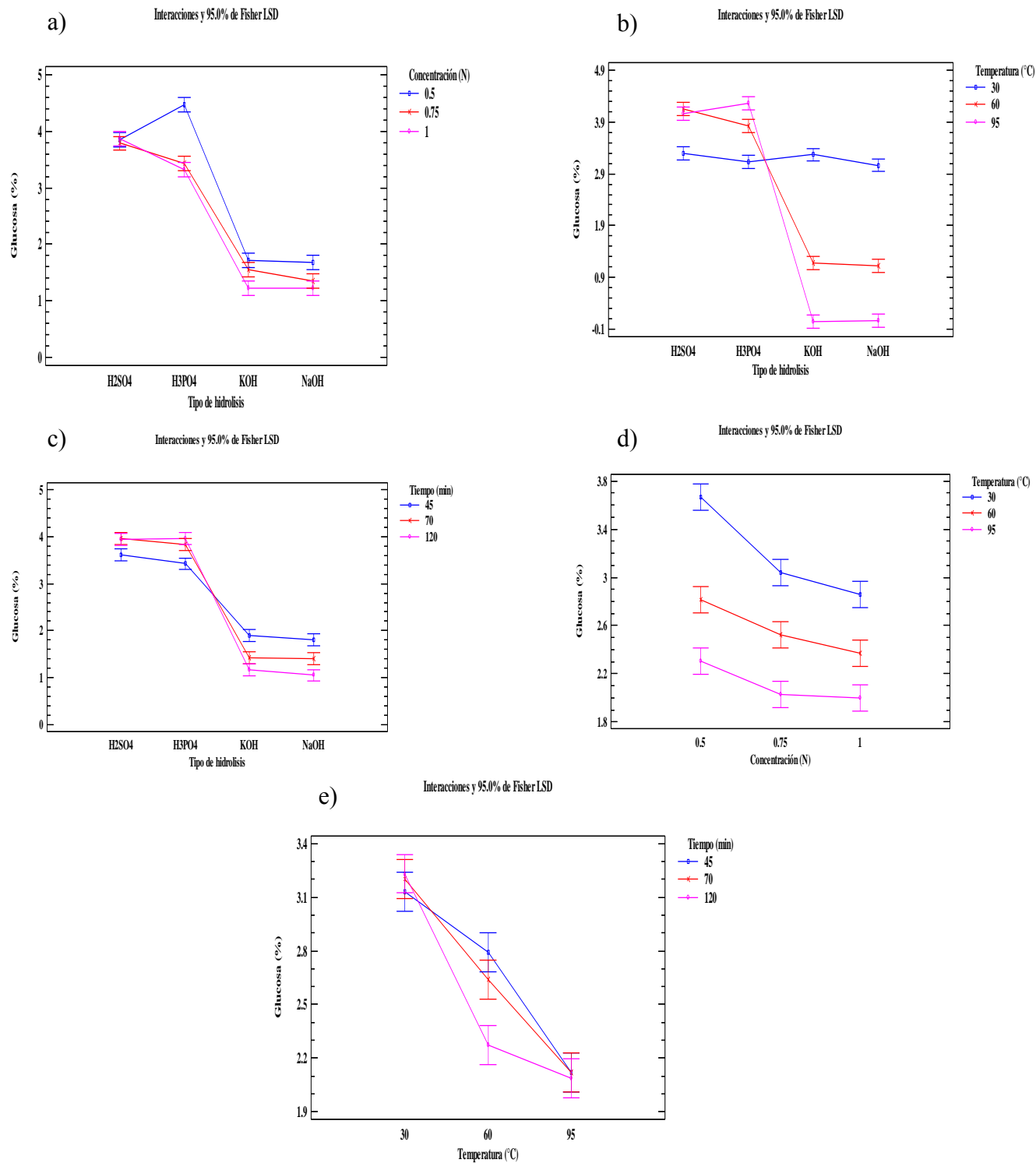


FIGURA 23. GRAFICAS DE INTERACCIONES PARA AZÚCARES REDUCTORES. A) AGENTE HIDROLIZANTE-CONCENTRACIÓN, B) AGENTE HIDROLIZANTE-TEMPERATURA, C) AGENTE HIDROLIZANTE-TIEMPO, D) CONCENTRACIÓN-TEMPERATURA Y E) TEMPERATURA-TIEMPO.

RESULTADOS Y DISCUSIONES

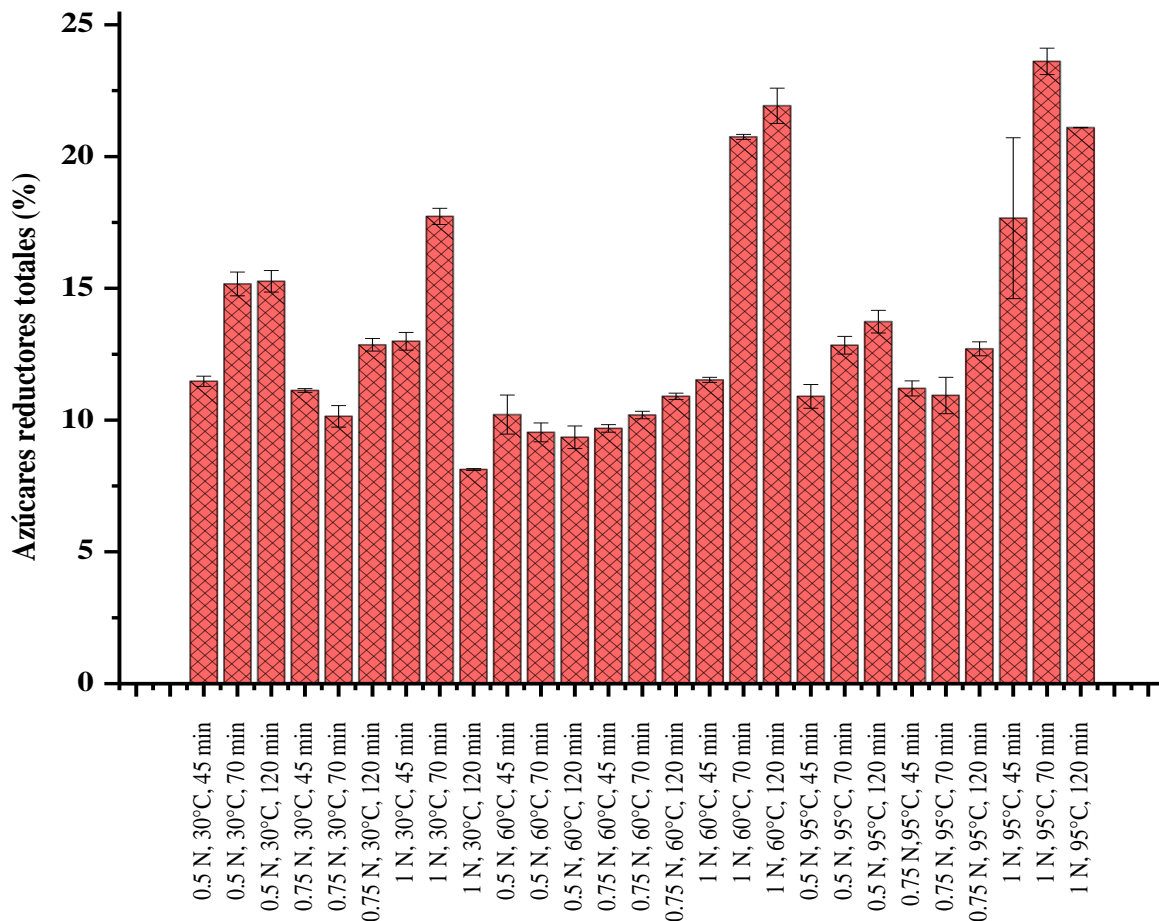


FIGURA 24. LIBERACIÓN DE AZÚCARES REDUCTORES DURANTE LOS DIFERENTES TRATAMIENTOS CON ÁCIDO SULFÚRICO

7.6. Determinación de Furfural e Hidroximetilfurfural por Cromatografía líquida de ultra alta presión (UPLC)

El análisis por UPLC por sus siglas en inglés (Ultrahigh Pressure Liquid Chromatography) se realizó para las muestras de hidrólisis con la mayor producción de azúcares reductores totales, con el fin de evaluar si aquellos tratamientos formaron inhibidores de la fermentación como HMF y Furfural. A diferencia de los tratamientos en donde se utilizaron agentes alcalinos; las muestras hidrolizadas con ácido fosfórico mostraron una formación de hidroximetilfurfural menor a 1 ppm, y no hubo presencia de furfural, Algunas de las muestras que fueron pretratadas con ácido sulfúrico, presentaron una mayor concentración de hidroximetilfurfural y de igual manera tampoco hubo formación de furfural. Sin embargo algunos tratamientos con ácido sulfúrico si presentaron la formación de

RESULTADOS Y DISCUSIONES

hidroximetilfurfural estos se pueden observar en la figura 25. Las condiciones en las que se obtuvo mayor cantidad de azúcares reductores totales (1N, 95°C y 70 min), logra la liberación de hasta 4.28 g de glucosa y 23.61 g de azúcares fermentables por cada 100 g de harina de cladodios de nopal, liberando tan solo 30 ppm de HMF.

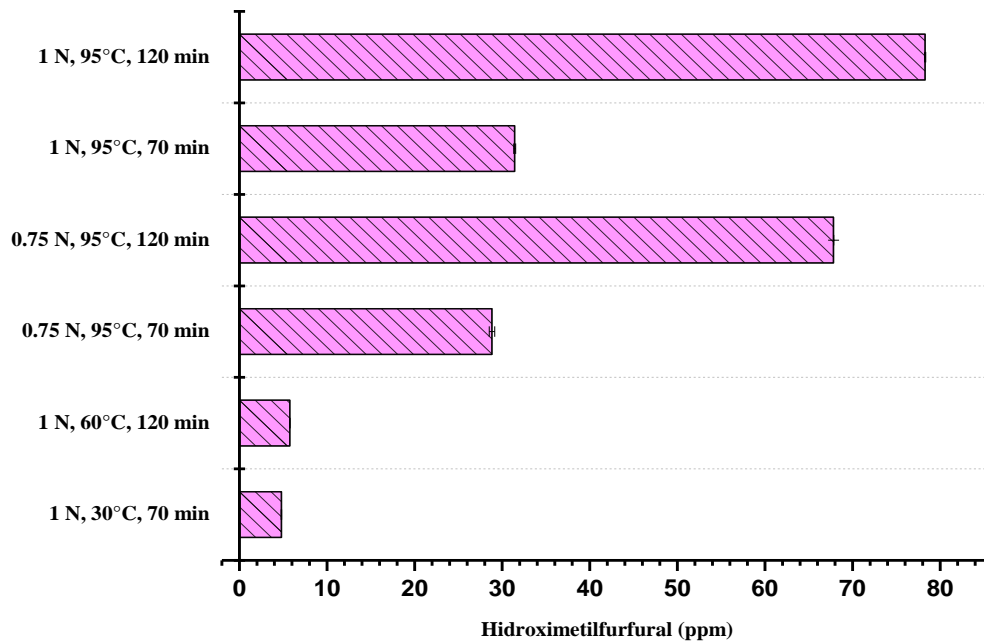


FIGURA 25. FORMACIÓN DE HIDROXIMETILFURFURAL (HMF), DURANTE EL PROCESO DE HIDRÓLISIS CON ÁCIDO SULFÚRICO

Para el tratamiento con H_2SO_4 de 0.75 a 1 N realizados a 95 °C y 120 min se liberan de 70 a 80 ppm de HMF como máximo, esta concentración de HMF resulta ser mucho menor a la concentración inhibitoria reportada por otros autores, los cuales utilizan a la cepa *Saccharomyces cerevisiae* y establecen que el HMF afecta la producción de etanol a partir de 500 ppm ocurriendo una inhibición completa a 4000 ppm (Tello and Vinicio 2013), así mismo (Gracida and Pérez 2014) reportan inhibición de la fermentación hasta 2000 ppm de HMF provocando un 70% de inhibición de *Saccharomyces*.

7.7. Sacarificación de harina

En la figura 26 y 27 se muestran los resultados de la sacarificación de harina de nopal por las 2 enzimas comerciales (Celluclast y Viscozyme). Las concentraciones de glucosa se determinaron empleando un analizador bioquímico YSI. Como podemos observar en la figura 26 durante los diferentes tratamientos con Celluclast se libera una cantidad de glucosa semejante (8.4 %), sin importar el tiempo y concentración de enzima utilizada.

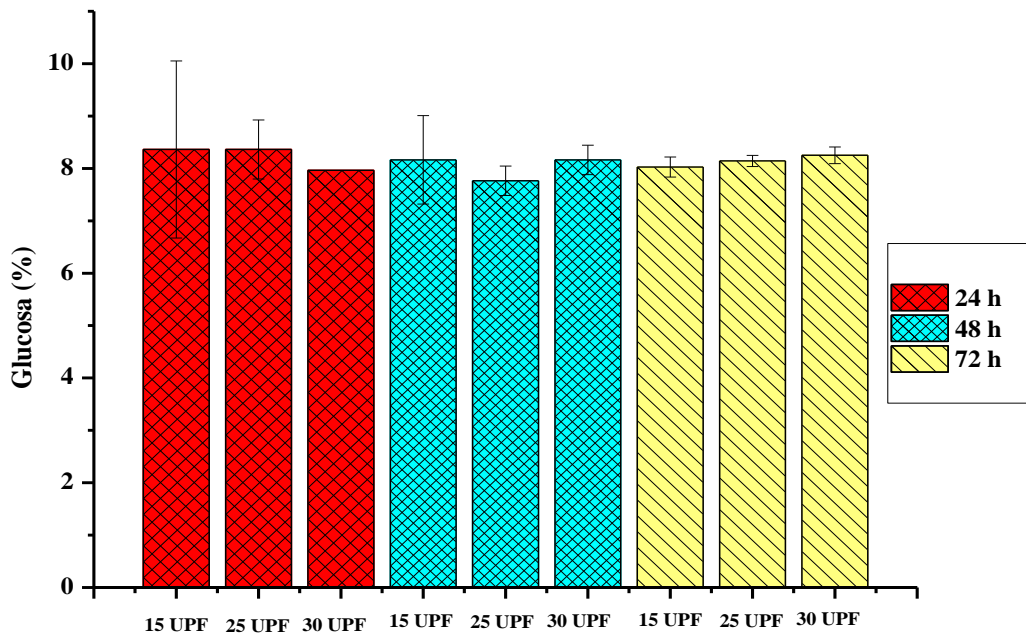


FIGURA 26. HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DE HARINA DE NOPAL EMPLEANDO LA ENZIMA COMERCIAL CELLUCLAST PARA LA DETERMINACIÓN DE GLUCOSA LIBERADA.

En la figura 27 podemos ver que al usar la enzima Viscozyme, se alcanza una liberación máxima de 1.1% de glucosa a las 48 h con una carga enzimática de 30 UCMC/g de harina de cladodios de nopal con la enzima Viscozyme. Sin embargo, esta concentración es mucho menor a lo obtenido con la enzima Celluclast, esto se atribuye a que cada enzima posee diferente modo de acción, en este caso se considera que la endoglucanasa presente en celluclast favorece la liberación de azúcares.

RESULTADOS Y DISCUSIONES

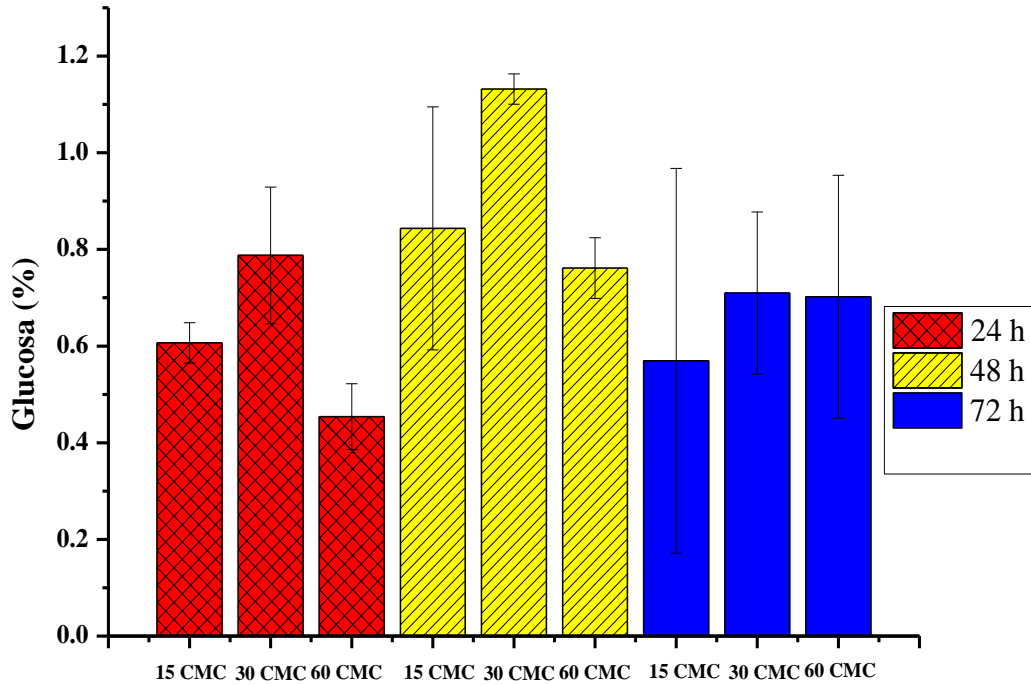


FIGURA 27. HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DE HARINA DE NOPAL EMPLEANDO LA ENZIMA COMERCIAL VISCOZYME PARA LA DETERMINACIÓN DE GLUCOSA LIBERADA

Por último, con la finalidad de expresar de una manera correcta la relación existente entre la concentración de glucosa liberada y la cantidad de enzima empleada, se determinó la producción de glucosa con relación a la actividad enzimática específica de cada enzima.

Adicionalmente se realizó el análisis estadístico de estos resultados, y de acuerdo a ello se observó que el factor tipo de enzima fue el único que tuvo un efecto significativo sobre la variable Glucosa (Figura 28), donde podemos ver que la enzima Celluclast libera aproximadamente hasta un 6% de glucosa a partir de la harina de cladodios de nopal pretratada químicamente.

RESULTADOS Y DISCUSIONES

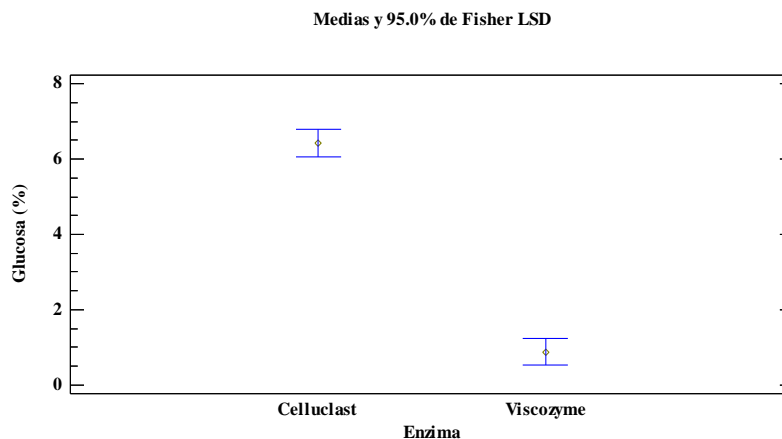


FIGURA 28. GRAFICAS DE MEDIAS PARA EL FACTOR TIPO DE ENZIMA

Los demás factores no tuvieron un efecto, por lo que las mejores condiciones para la liberación de hasta 6% de glucosa fueron: Enzima comercial Celluclast, a 25 UPF/g de harina por 48 h.

7.8. Proceso secuencial en harina de nopal

El proceso secuencial se realizó por duplicado, para ello se tomaron 2.02 g de harina de nopal de la variedad Atlixco y se trataron con ácido sulfúrico 1 N a 95°C durante 70 min, luego se realizó el lavado y neutralización de las biomásas hidrolizadas, estas posteriormente fueron hidrolizadas enzimáticamente empelando enzima comercial Celluclast a 25 UPF/g durante 48 horas en buffer de citratos incubados a 45 °C con agitación a 150 rpm, por último las muestras fueron analizadas por HPLC para determinar el perfil de azúcares liberados presente en la tabla 21.

RESULTADOS Y DISCUSIONES

TABLA 21. PERFIL DE AZÚCARES LIBERADOS DURANTE LA HIDROLISIS QUÍMICA Y ENZIMÁTICA DE HARINA DE NOPAL

Etapa	Azúcares (%) y compuestos inhibidores						
	Glucosa	Xilosa	Fructosa	Manosa	Sacarosa	HMF*	ART
Inicial	2.93±0.01	n/d	7.17±0.45	n/d	1.79±0.02	n/d	12.40±0.41
Hidrolisis química	4.23±0.07	0.20±0.01	4.31±0.08	2.91±0.04	0.76±0.02	3.58±0.01	20.95±0.28
Lavados							
Agua destilada	0.56±0.05	n/d	n/d	n/d	0.29±0.01	n/d	3.15±0.01
Buffer	0.10±0.01	n/d	n/d	n/d	0.03±0.01	n/d	1.13±0.01
Sacarificación	9.17±0.19	1.18±0.33	n/d	n/d	n/d	n/d	11.53±0.13

Nota: n/d: no detectado; * mg/100 g de harina de nopal.

Como podemos observar se obtuvo una liberación de hasta 32.48 % de azúcares fermentables siendo similar a lo obtenido por (Kuloyo et al. 2014) siendo hasta un 32.9% de azúcares fermentables, donde la glucosa represento el 18.2% siendo el azúcar mayoritaria, similar a lo obtenido durante nuestro proceso liberándose hasta 13.4% de glucosa, la diferencia en la liberación de dicha azúcar se debe a las condiciones que se manejan al realizar el proceso secuencial Kuloyo y colaboradores emplearon ácido sulfúrico en una concentración de 1.5% (P/P) con un tratamiento térmico a 120 °C durante 50 min. Así mismo en la hidrolisis enzimática emplearon una mezcla multienzimática de Celluclast 15 UPF/mL, Novozyme 15 UI y Pectinex Ultra SP-L 100 U por gramo de biomasa seca (Kuloyo et al. 2014).

El diagrama de flujo del proceso secuencial planteado en este trabajo de tesis se describe en la figura 29, como podemos observar, en comparación con los reportes para este mismo sustrato, hemos logrado un buen rendimiento empleando tan solo un tipo de enzima. Este proceso se replicó en escala de 2 L, para poder verificar el proceso incluyendo la fermentación del producto de hidrolisis, los resultados se muestran en la siguiente sección.

RESULTADOS Y DISCUSIONES

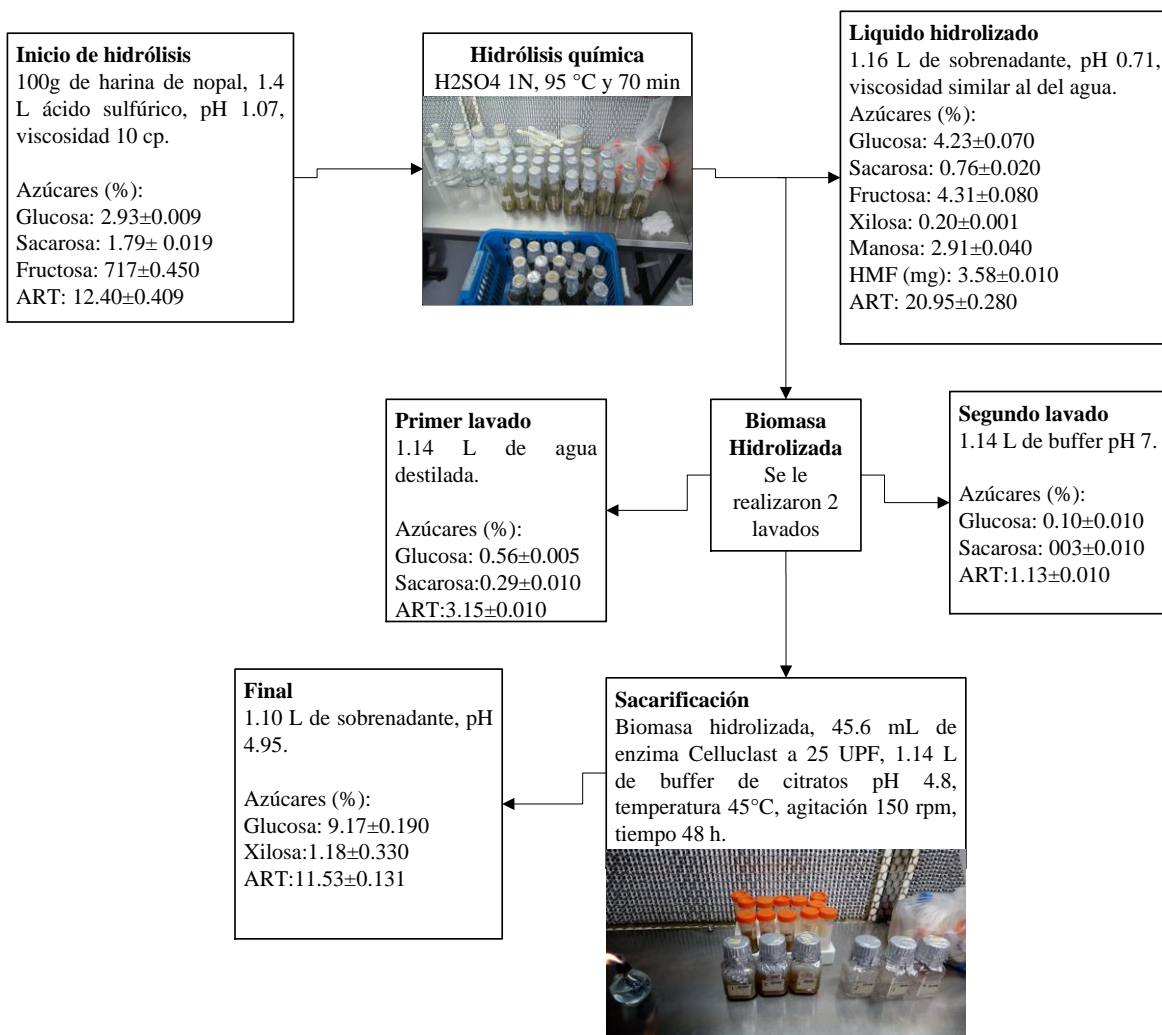


FIGURA 29. PROCESO SECUENCIAL (HIDROLISIS QUÍMICA Y ENZIMÁTICA) Y PERFIL DE AZÚCARES

7.9. Fermentación de harina de nopal

Durante esta etapa se repitió el proceso secuencial incluyendo la fermentación del licor hidrolizado (Figura 30), para ello se utilizaron 100 g de harina de cladodios de nopal de la variedad Atlixco de 6 meses, la harina fue previamente esterilizada en seco, posteriormente se le agregó 1.4 L de ácido sulfúrico 1 N manteniendo una temperatura de 95 °C durante 70 min, después de este retratamiento se ajustó el pH a 4.8 con hidróxido de sodio 10 N y se completó a un volumen de 2 L con buffer de citratos pH 4.8, posteriormente se adiciona la enzima Celluclast a 25 UPF/g manteniendo una temperatura de 45 °C agitando a 150 rpm. Durante 48 min. Al final de este tiempo se agregó el inoculo de cepa de levadura

RESULTADOS Y DISCUSIONES

denominada HY1, cuyos parámetros medioambientales de crecimiento y producción fueron determinados previamente en otro trabajo (Comunicación personal, González Tania). Cada etapa de los procesos se monitorea mediante la toma de muestras, a las cuales se les determinó la cantidad de glucosa, sacarosa, azúcares reductores totales liberados y alcohol.



FIGURA 30. FERMENTACIÓN DEL LICOR HIDROLIZADO

Durante la etapa de hidrólisis química se logró liberar hasta 4.81 ± 0.01 g de glucosa por cada 100 g de harina de cladodios de nopal, similar a lo obtenido en los experimentos anteriores, en cuanto a la liberación de azúcares reductores se obtuvo 16.39 ± 0.21 g, se puede notar una menor liberación de azúcares reductores esto puede ser debido a que la materia prima es diferente en el contenido de compuestos lignocelulósicos con respecto a la harina de nopal evaluada (Atlixco de 12 meses), sin embargo si hablamos de la liberación de glucosa, esta es similar a lo reportado por (Gonzalez et al. 2015) donde ellos obtienen entre 2-4.7 g de glucosa por cada 100 g de nopal con un pretratamiento con ácido sulfúrico al 4% a $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 1 h.

En la etapa de sacarificación se logra duplicar la cantidad de glucosa liberada siendo de hasta 9.25 ± 0.05 g y se alcanza una liberación de 14 ± 0.06 g de ART (figura 31). La cantidad de glucosa liberada es ligeramente menor a la obtenida por Kuloyo y col., (2014)

RESULTADOS Y DISCUSIONES

(Kuloyo et al. 2014) alcanzando hasta 12.80 g/ 100 g de harina de nopal. Sin embargo, como mencionamos antes, esta variación puede deberse a que ellos manejan una mezcla multienzimática (15 UPF/mL de Celluclast, 15 UI de Novozyme y 100 U de Pectinex Ultra SP-L) por gramo de biomasa seca, previamente tratada. Cabe mencionar que el uso de enzimas comerciales en estos procesos es muy común, pero dichas enzimas son costosas, por ello uno de los principales objetivos de este trabajo era reducir los costos de producción de bioetanol, con la finalidad de desarrollar posteriormente una evaluación de la factibilidad técnico-financiera. Como otros autores reportan entre los que encontramos podemos mencionar a Ferreira y col., (2016) en donde logran obtener una concentración de 54.42 y 62.14 g de azúcares reductores por 100 g de harina de Opuntia y Nopalea respectivamente, usando un pretratamiento ácido-alcalino combinado con ácido sulfúrico al 0.5% y peróxido de hidrogeno al 7.5%, para una carga de sólidos igual a la evaluada aquí (10%) (Ferreira et al. 2016). En este caso con un proceso de hidrólisis similar la cantidad de glucosa y azúcares reductores liberados durante esta etapa de sacarificación se muestran en la figura 31.

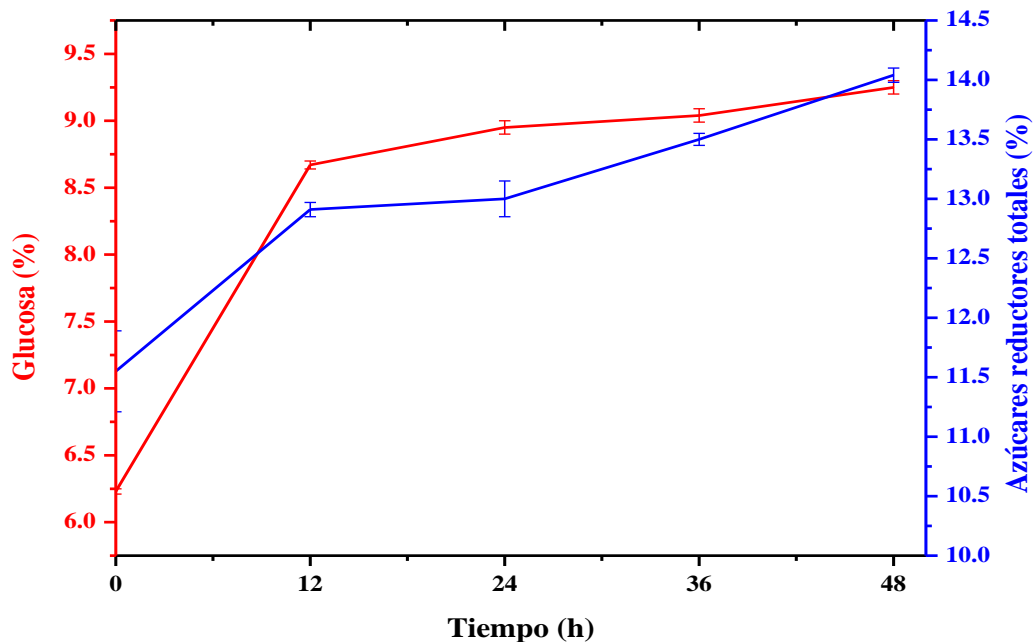


FIGURA 31. SACARIFICACIÓN: LIBERACIÓN DE GLUCOSA Y AZÚCARES REDUCTORES

RESULTADOS Y DISCUSIONES

Para la etapa de fermentación se utilizó un bioreactor de 3 L (Applikon Biotechnology) con la finalidad de obtener la mayor producción de alcohol se preparó un preinóculo de la cepa HY1, el cual fue cultivado en un tubo con 10 mL de YPD con pH 5.5 y se creció por duplicado durante 24 h a las condiciones de 35 °C y 200 rpm. Se realizó un segundo pase agregando 1 mL de YPD con las células crecidas a un matraz de 250 mL con 50 mL de YPD durante 24 h a las condiciones de 35 °C y 200 rpm.

Una vez crecido el microorganismo, se realizó una cuenta al microscopio para ajustar la población a 28×10^6 cel/mL para la cepa HY1 que se inoculo al inicio de la fermentación. Se realizó la toma de muestras por duplicado, para la determinación de etanol se realizó una reacción con solución de dicromato de potasio acidificada durante 10 min y se realizó la determinación espectrofotométrica.

En la figura 32, se presenta las curvas de consumo de azúcares reductores y producción de alcohol a partir de harina de cladodios de nopal.

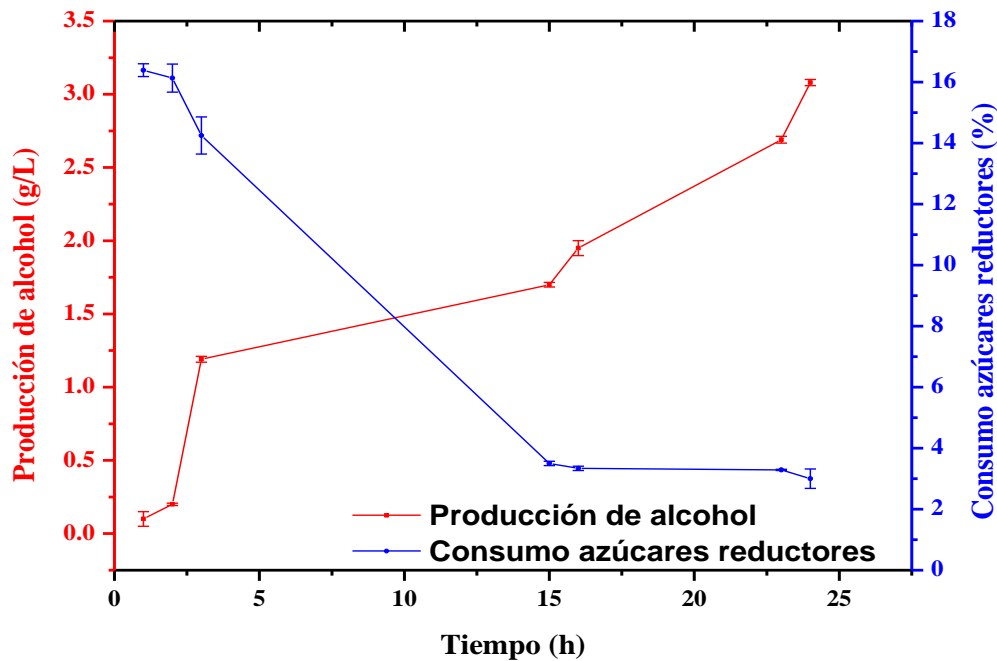


FIGURA 32. CINÉTICA DE PRODUCCIÓN DE ALCOHOL POR LA CEPA HY1 Y EL CONSUMO DE AZÚCARES REDUCTORES

RESULTADOS Y DISCUSIONES

Con base a los datos obtenidos se calcularon los parámetros cinéticos de producción de alcohol a partir de la fermentación de los hidrolizados de harina de cladodios de nopal, en dicha fermentación, la máxima producción de etanol fue de 3.08 ± 0.021 g/L después de 24 h a 40 °C, se obtuvo un rendimiento de fermentación con base en la glucosa liberada del 65.16% y la productividad de etanol de 0.12 g/L, como podemos observar los rendimientos y la producción de alcohol fue mucho menor a lo que reporta Kuloyo y col., (2014), estos autores realizaron una hidrólisis y fermentación simultánea donde evaluaron dos cepas, con la *S. cerevisiae* obtuvieron una concentración de etanol de 20.6 g/L, con la cepa *K. marxianus* produjeron hasta 19.3 g/L de etanol, con un rendimiento del 70 y 64% respectivamente. De la misma manera que (Ferreira et al. 2016) llevaron a cabo una hidrólisis y fermentación simultánea con *S. cerevisiae*, evaluando 2 variedades de nopal, el rendimiento de producción de etanol para *N. cochenillifera* fue de 70%, mientras que para *O. ficus indica* obtuvo un valor máximo de 35.58%.

8. CONCLUSIONES

El Nopal (*Opuntia ficus indica*) variedad Atlixco que se evaluó en este trabajo para llevar a cabo los procesos de hidrólisis química y enzimática, posee hasta 25.56% de contenido de fibra total, la fracción insoluble compuesta por celulosa y hemicelulosa es de 19.8%, mientras que la fracción de fibra soluble compuesta por mucilago y pectina comprende el 5.45%, por lo que concluimos que si logra una adecuada liberación de azúcares fermentables, este tipo de biomasa puede emplearse para la producción de Bioetanol.

De acuerdo al análisis estadístico multifactorial realizado para evaluar la hidrólisis química de los cladodios tanto en frescos como en harina, sabemos que todos los factores tienen efecto significativo sobre la liberación de azúcares. Sin embargo, la producción de furfural e hidroximetilfurfural solo se da durante la hidrólisis ácida.

La hidrólisis alcalina produce mayores efectos sobre el material fresco, mientras que la hidrólisis ácida lo hace para la harina, liberando una mayor cantidad de azúcares. Este efecto puede atribuirse principalmente a la fracción de fibra soluble compuesta por mucilago, ya sabemos que este hidrocoloide cambia su conformación en función del pH y la temperatura, por otro lado el efecto de secado para la elaboración de la harina también afecta a este hidrocoloide, permitiendo que los agentes ácidos interactúen más fácilmente con los polisacáridos para liberar una mayor cantidad de azúcares fermentables.

Al realizar el análisis factorial de la sacarificación de la harina previamente hidrolizada en medio ácido, el único factor que tuvo efecto sobre la liberación de azúcares fue el tipo de enzima, donde se concluyó que la enzima comercial Celluclast tiene una mayor actividad hidrolítica, esto debido a que es un complejo multienzimático de enzimas celulolíticas.

Las mejores condiciones de la hidrólisis química y la sacarificación, determinadas para la harina de cladodios de nopal de la variedad Atlixco de 12 meses, permitieron obtener un máximo de 32 g de azúcares fermentables por cada 100 g de harina. Siendo los principales azúcares obtenidos glucosa, manosa, fructosa y xilosa. Pero al realizar el proceso secuencial a un volumen de 2 L para realizar la fermentación solo se liberó un máximo de 16 g de azúcares reductores totales, y con todo ello se logró obtener una producción de etanol de 3 g/L.

CONCLUSIONES

La baja cantidad de alcohol producido se atribuye a que la concentración de azúcares fermentables que se liberaron solo fueron 50% de las que se habían logrado en el proceso de pequeña escala, por lo que es necesario seguir evaluando las condiciones de pretratamiento y sacarificación, a nivel de 2 L, a fin de verificar las condiciones para lograr una mayor liberación de azúcares para su posterior fermentación y lograr así una alta productividad de alcohol.

RECOMENDACIONES

9. RECOMENDACIONES

Seguir evaluando otras condiciones de pretratamiento básico sobre la biomasa fresca, para lograr una mejor liberación de azúcares fermentables, esto con la finalidad de reducir los costos por la aplicación de operaciones unitarias para la producción de harina como la reducción de tamaño, secado, etc.

También es necesario seguir trabajando en la etapa de hidrólisis enzimática para aumentar el contenido de azúcares fermentables, esto mediante el manejo de una mezcla de enzimas, para que degraden la mayor cantidad de biomasa.

Se recomienda evaluar otros tipos de pretratamientos que sean más amigables con el medio ambiente, como los pretratamientos biológicos.

Evaluar las ventajas y desventajas de realizar una sacarificación y fermentación simultánea sobre la harina de cladodios de nopal.

Para monitorear de una mejor manera la producción de azúcar y producción de alcohol, se sugiere utilizar técnicas como la cromatografía líquida de ultra eficiencia (UPLC) y la cromatografía de gases (CG) en todas las etapas del proceso.

BIBLIOGRAFÍA

10. BIBLIOGRAFÍA

- Adney, B, and J Baker Nrel. 2008. "Measurement of Cellulase Activities Laboratory Analytical Procedure (LAP) Issue Date : 08 / 12 / 1996 Measurement of Cellulase Activities Laboratory Analytical Procedure (LAP)." *Renewable Energy*, no. January: 8.
- Bensadón, Sara, Deisy Hervert-Hernández, Sonia G. Sáyago-Ayerdi, and Isabel Goñi. 2010. "By-Products of *Opuntia Ficus-Indica* as a Source of Antioxidant Dietary Fiber." *Plant Foods for Human Nutrition* 65 (3): 210–16. doi:10.1007/s11130-010-0176-2.
- Betancourt-Domínguez, M. a., T. Hernández-Pérez, P. García-Saucedo, a. Cruz-Hernández, and O. Paredes-López. 2006. "Physico-Chemical Changes In Cladodes (*Nopalitos*) From Cultivated And Wild Cacti (*Opuntia Spp.*)." *Plant Foods for Human Nutrition* 61 (3): 115–19. doi:10.1007/s11130-006-0008-6.
- Bioagricultura. 2011. "Cultivos de Nopal En México." <https://bioagricultura.wordpress.com/2011/06/07/cultivos-de-nopal-en-mexico/>.
- Boonmee, Atcha. 2012. "Hydrolysis of Various Thai Agricultural Biomasses Using the Crude Enzyme from *Aspergillus Aculeatus* Iizuka FR60 Isolated from Soil." *Brazilian Journal of Microbiology* 43: 456–66. doi:10.1590/S1517-83822012000200005.
- Camesasca, Laura. 2013. "Producción de Bioetanol Combustible a Partir de Pasto Elefante : Estudio de La Hidrólisis Enzimática Y Fermentación." Universidad de la República.
- Chávez, Eva María. 2012. "Estudio Exploratorio Del Efecto de La Adición de Nopal (*Opuntia Ficus--Indica*) a La Leche Curda Sobre Las Cuentas Bacterianas Mesófilas Aerobias Y Coliformes." *Vetzoo.Umich.Mx*. http://www.vetzoo.umich.mx/phocadownload/Tesis/2008/Febrero/prevencion_y_tratamiento_del_distemper_canino.pdf.
- Conde-Mejía, Carolina, Arturo Jiménez-Gutiérrez, and Mahmoud El-Halwagi. 2012. "A Comparison of Pretreatment Methods for Bioethanol Production from Lignocellulosic Materials." *Process Safety and Environmental Protection* 90 (3). Institution of Chemical Engineers: 189–202. doi:10.1016/j.psep.2011.08.004.

BIBLIOGRAFÍA

- Cortínez, Victoria. 2010. “Comparación De Pretratamientos En Residuos Forestales Para La Producción De Bioetanol De Segunda Generación: Hidrólisis Ácida Y Líquidos Iónicos.” Universidad de Chile.
- Cruz Gallegos, José. 2012. “Relación Flavonoides Totales-Actividad Antidiabética (in Vitro Por Difusión De Glucosa) En Extractos De Colubrina Elíptica.”
- Cuervo, Laura, JI Folch, and Re Quiroz. 2009. “Lignocelulosa Como Fuente de Azúcares Para La Producción de Etanol.” *Bio Tecnología* 13 (3): 11–25. http://www.smbb.com.mx/revista/Revista_2009_3/Lignocelulosa.pdf.
- Federación, Diario Oficial de la. 2014. “Programa Especial Para El Aprovechamiento de Energías Renovables.” <http://www.gob.mx/sener/documentos/programa-especial-para-el-aprovechamiento-de-energias-renovables>.
- Ferreira, Pedro, De Souza Filho, Vitor Troccoli Ribeiro, and Everaldo Silvino. 2016. “Simultaneous Saccharification and Fermentation of Cactus Pear Biomass — Evaluation of Using Different Pretreatments.” *Industrial Crops & Products* 89. Elsevier B.V.: 425–33. doi:10.1016/j.indcrop.2016.05.028.
- Feugang, Jm, P Konarski, and D Zou. 2006. “Nutritional and Medicinal Use of Cactus Pear (Opuntia Spp.) Cladodes and Fruits Jean.” *Frontiers in Bioscience* 11: 2574–89. <http://www.bioscience.org/2006/v11/af/1992/2.htm>.
- Financiera, Rural. 2011. “Monografía Del Nopal Y La Tuna,” 8. [http://www.financierarural.gob.mx/informacionsectorrural/Documents/Monografias/MonografiaNopal-Tuna\(jul11\).pdf](http://www.financierarural.gob.mx/informacionsectorrural/Documents/Monografias/MonografiaNopal-Tuna(jul11).pdf).
- Flores Valdés, Claudio a., Juan M. Luna Esquivel, and Pedro P. Ramírez Moreno. 1995. “Mercado Mundial Del Nopalito.” *ASERCA–UACH–CIESTAAM*, 176.
- Geddes, C.C., J.J. Peterson, C. Roslander, G. Zacchi, M.T. Mullinnix, K.T. Shanmugam, and L.O. Ingram. 2010. “Optimizing the Saccharification of Sugar Cane Bagasse Using Dilute Phosphoric Acid Followed by Fungal Cellulases.” *Bioresource Technology* 101 (6). Elsevier Ltd: 1851–57. doi:10.1016/j.biortech.2009.09.070.
- Ghose, T. 1987. “Measurement of Cellulase Activities.” *Pure and Applied Chemistry* 59 (5): 257–68.

BIBLIOGRAFÍA

- Goncalvez, Fabiano Avelino, Héctor Ruiz, Everaldo dos Santos, José Teixeira, and Gorete de Macedo. 2015. "Bioethanol Production from Coconuts and Cactus Pretreated by Autohydrolysis." *Industrial Crops & Products* 77: 1–12. doi:10.1016/j.indcrop.2015.06.041.
- Gracida, Jorge, and Baruc Pérez. 2014. "Factores Previos Involucrados En La Produccion de Bioetanol, Aspectos a Considerar." *Int. Contam. Ambie.* 30 (2): 213–27.
- Guevara-Figueroa, Teresita, Hugo Jiménez-Islas, María L. Reyes-Escogido, Anne G. Mortensen, Bente B. Laursen, Li-Wei Lin, Antonio De León-Rodríguez, Inge S. Fomsgaard, and Ana P. Barba de la Rosa. 2010. "Proximate Composition, Phenolic Acids, and Flavonoids Characterization of Commercial and Wild Nopal (*Opuntia* Spp.)." *Journal of Food Composition and Analysis* 23 (6): 525–32. doi:10.1016/j.jfca.2009.12.003.
- Gutiérrez, Cinthya, M. Lourdes Hernández, and Blanca Barrágan. 2014. "Aprovechamiento de Residuos Agroindustriales En La Producción de Nanomateriales." *Revistas Sistemas Ambientales* 7: 25–36.
- Hendriks, a.T.W.M., and G. Zeeman. 2009. "Pretreatments to Enhance the Digestibility of Lignocellulosic Biomass." *Bioresource Technology* 100 (1): 10–18. doi:10.1016/j.biortech.2008.05.027.
- Iberahim, Nur Izzati, Jamaliah Md Jahim, Shuhaida Harun, Mohd Tusirin Mohd Nor, and Osman Hassan. 2013. "Sodium Hydroxide Pretreatment and Enzymatic Hydrolysis of Oil Palm Mesocarp Fiber." *International Journal of Chemical Engineering and Applications* 4 (3): 101–5. doi:10.7763/IJCEA.2013.V4.272.
- International, Aoac. 1990. *AOAC: Official Methods of Analysis (Volume 1)*. Edited by Kenneth Helrich. Fifteenth. Vol. 1. Association of Official Analytical Chemists, Inc.
- Juri Awad, Sebatián a. 2011. "Sacarificación Y Fermentación Simultánea Para La Producción De Bioetanol De Segunda Generación."
- Karthik, Rajendran, and J. Mohammad. 2014. "Pretreatment of Lignocellulosic Materials." In *Renewable Resources To Commodity Bioprocessing of Renewable Resources To Commodity*, edited by S Virendra and Kondo Akihiro, First edit, 43–50. John Wiley &

BIBLIOGRAFÍA

Sons.

- Kuloyo, Olukayode O., James C. du Preez, Maria Del Prado García-Aparicio, Stephanus G. Kilian, Laurinda Steyn, and Johann Görgens. 2014. "Opuntia Ficus-Indica Cladodes as Feedstock for Ethanol Production by *Kluyveromyces Marxianus* and *Saccharomyces Cerevisiae*." *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 30 (12): 3173–83. doi:10.1007/s11274-014-1745-6.
- León-Martínez, F.M., L.L. Méndez-Lagunas, and J. Rodríguez-Ramírez. 2010. "Spray Drying of Nopal Mucilage (*Opuntia Ficus-Indica*): Effects on Powder Properties and Characterization." *Carbohydrate Polymers* 81 (4): 864–70. doi:10.1016/j.carbpol.2010.03.061.
- López-Palacios, Cristian, Cecilia Beatriz Peña-Valdivia, J. Antonio Reyes-Agüero, and Adriana Inés Rodríguez-Hernández. 2012. "Effects of Domestication on Structural Polysaccharides and Dietary Fiber in Nopalitos (*Opuntia* Spp.)." *Genetic Resources and Crop Evolution* 59 (6): 1015–26. doi:10.1007/s10722-011-9740-3.
- López, Cindy. 2014. "Evaluación de La Sacarificación de Residuos Cítricos Empleando Microorganismos Productores de Celulosomas."
- Lowry, Oliver H, Nira J Rosebrough, Lewis Farr, and Rose Randall. 1951. "Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent." *J. Biol. Chem.* 193 (1): 265–75. doi:10.1016/0304-3894(92)87011-4.
- Lozada Carbajal, Marco a. 2007. "Extracción Y Caracterización Reológica de Polisacáridos Tipo Pectina de La Cáscara de Tuna (*Opuntia* Spp .)," 109.
- Lozanoff, a G Jorge, a G Susana Heinichen, and a G Gabriel Marchi. 2007. "Bioenergía Revision de Tecnologías Emergentes."
- Manavalan, Tamilvendan, Arulmani Manavalan, and Klaus Heese. 2015. "Characterization of Lignocellulolytic Enzymes from White-Rot Fungi." *Current Microbiology* 70 (4): 485–98. doi:10.1007/s00284-014-0743-0.
- Mendez, S De Jesus, Dietmar Rossel, Alejandro Amante, Javier E Gardo, and Adrian Gomez. 2009. "El NOPAI EN LA PRODUCCION DE BIOCOMBUSTIBLES." *RESPYN Revista Salud Pública Y Nutrición* 5: 70–84.

BIBLIOGRAFÍA

- Miller, Gail. 1959. "Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar." *Analytical Chemistry* 31 (III): 426–28. doi:10.1021/ac60147a030.
- Moheno, Marina G. 2013. "Uso de Un Hidrolizado de Cáscaras de Naranja -Toronja Y Dos Cepas de Levadura Para La Obtención de Bioetanol."
- NMX-F-317-S-1978. 1978. "NMX-F-317-S-1978. DETERMINACIÓN DE pH EN ALIMENTOS. DETERMINATION OF pH IN FOODS. NORMAS MEXICANAS. DIRECCIÓN GENERAL DE NORMAS." *Colpos.Mx*, 3–6. <http://www.colpos.mx/bancodenormas/nmexicanas/NMX-FF-038-2002.PDF>.
- NMX-F-428-1982. 1978. "NMX-F-428-1982. ALIMENTOS. DETERMINACIÓN DE HUMEDAD (MÉTODO RÁPIDO DE LA TERMOBALANZA)." *Colpos.Mx*. <http://www.colpos.mx/bancodenormas/nmexicanas/NMX-FF-038-2002.PDF>.
- Oliva, Jose. 2003. "Efectos de Los Productos de Degradacion Originados En La Explosión Por Vapor de Biomasa de Chopo Sobre Kluyveromyces Marxianus." doi:10.1016/S0141-0229(03)00220-5.L.
- Ornelas, Jorge Luis. 2011. "Mejoramiento Del Método de Extracción Del Mucílago de Nopal Opuntia Ficus Indica Y Evaluación de Sus Propiedades de Viscosidad."
- Pan, Xuejun. 2008. "Role of Functional Groups in Lignin Inhibition of Enzymatic Hydrolysis of Cellulose to Glucose." *Journal of Biobased Materials and Bioenergy* 2: 25–32.
- Pérez-Martínez, Jaime David, Mayra Sánchez-Becerril, José de Jesús Ornelas-Paz, Marco M. González-Chávez, Vrani Ibarra-Junquera, and Pilar Escalante-Minakata. 2013. "The Effect of Extraction Conditions on the Chemical Characteristics of Pectin from Opuntia Ficus Indica Cladode Flour." *Journal of Polymers and the Environment* 21 (4): 1040–51. doi:10.1007/s10924-013-0602-2.
- Prior, Bernard A, and Donal F Day. 2008. "Hydrolysis of Ammonia-Pretreated Sugar Cane Bagasse with Cellulase , β -Glucosidase , and Hemicellulase Preparations." *Applied Biochemistry and Biotechnology* 146: 151–64. doi:10.1007/s12010-007-8084-0.
- Ramírez-Moreno, Esther, Damián Córdoba-Díaz, María de Cortes Sánchez-Mata, Carmen Díez-Marqués, and Isabel Goñi. 2013. "Effect of Boiling on Nutritional, Antioxidant

BIBLIOGRAFÍA

- and Physicochemical Characteristics in Cladodes (*Opuntia Ficus Indica*).” *LWT - Food Science and Technology* 51 (1). Elsevier Ltd: 296–302. doi:10.1016/j.lwt.2012.10.005.
- Rodríguez-García, M. E., C. de Lira, E. Hernández-Becerra, M. a. Cornejo-Villegas, a. J. Palacios-Fonseca, I. Rojas-Molina, R. Reynoso, et al. 2007. “Physicochemical Characterization of Nopal Pads (*Opuntia Ficus Indica*) and Dry Vacuum Nopal Powders as a Function of the Maturation.” *Plant Foods for Human Nutrition* 62 (3): 107–12. doi:10.1007/s11130-007-0049-5.
- Rosset, Michele, Vinicius Ricardo Acquaro, and Adelaide Del Pino Beléia. 2014. “Protein Extraction from Defatted Soybean Flour with Viscozyme L Pretreatment.” *Journal of Food Processing and Preservation* 38 (3): 784–90. doi:10.1111/jfpp.12030.
- Rosset, Michele, and Adelaide Del Pino Beléia. 2014. “Pre-Treatment of Soy Slurry with Viscozyme L and the Concentration of Sugars and Isoflavones and the Microstructure of Silken Tofu.” *Journal of Food and Nutrition Research* 2 (3): 130–35. doi:10.12691/jfnr-2-3-7.
- Sáenz, Carme, Horst Berger, Joel Corrales, Ljubica Galletti, Inocencio Higuera, Candelario Mondragón, and Elena Sepúlveda. 2006. “Utilización Agroindustrial Del Nopal.” *Boletín de Servicios Agrícolas de La FAO*, 1–50.
- Sandoval-Esparza, Sandra. 2010. “Distribución Geográfica Del Género *Opuntia* (Cactaceae) En México,” 91.
- SIAP. 2015. “Anuario Estadístico de La Producción Agrícola.” http://infosiap.siap.gob.mx/aagricola_siap_gb/ientidad/index.jsp.
- Singhania, Reeta Rani, Rajeev K. Sukumaran, Anil Kumar Patel, Christian Larroche, and Ashok Pandey. 2010. “Advancement and Comparative Profiles in the Production Technologies Using Solid-State and Submerged Fermentation for Microbial Cellulases.” *Enzyme and Microbial Technology* 46 (7). Elsevier Inc.: 541–49. doi:10.1016/j.enzmictec.2010.03.010.
- Stickel, Jonathan J, Richard T Elander, James D McMillan, and Roman Brunecky. 2014. “Enzymatic Hydrolysis of Lignocellulosic Biomass.” *Bioprocessing of Renewable Resources to Commodity Bioproducts*, 77–103. doi:10.1002/9781118845394.ch4.

BIBLIOGRAFÍA

- Sun, Y, and J Cheng. 2005. "Dilute Acid Pretreatment of Rye Straw and Bermudagrass for Ethanol Production." *Bioresource Technology* 96 (14): 1599–1606. doi:10.1016/j.biortech.2004.12.022.
- Sun, Ye, and Jiayang Cheng. 2002. "Hydrolysis of Lignocellulosic Materials for Ethanol Production: A Review." *Bioresource Technology* 83 (1): 1–11. doi:10.1016/S0960-8524(01)00212-7.
- Tello, Mazariegos, and Carlos Vinicio. 2013. "Efecto de La Temperatura Y La Concentración de H₂SO₄ En La Producción de Azúcares Y 5-Hidroximetilfurfural En El Pretratamiento de Bagazo de Caña de Azúcar." Escuela Agrícola Panamericana.
- Vasco, Catalina, Jenny Ruales, and Afaf Kamal-eldin. 2008. "Total Phenolic Compounds and Antioxidant Capacities of Major Fruits from Ecuador PACIFIC OCEAN." *Food Chemistry* 111: 816–23. doi:10.1016/j.foodchem.2008.04.054.
- Vejarano, Ricardo. 2013. "Utilización de Bloqueadores Metabólicos Y Optimización de Las Condiciones de Aplicación Para La Reducción Del Grado Alcohólico En Vinos Elaborados a Partir de Uva Procedente de Zonas Cálidas." Universidad politécnica de madrid.
- Wang, Ziyu, Ruyi Li, Jiele Xu, Jane M. Marita, Ronald D. Hatfield, Rongda Qu, and Jay J. Cheng. 2012. "Sodium Hydroxide Pretreatment of Genetically Modified Switchgrass for Improved Enzymatic Release of Sugars." *Bioresource Technology* 110. Elsevier Ltd: 364–70. doi:10.1016/j.biortech.2012.01.097.
- Yoshida, Makoto, Yuan Liu, Satoshi Uchida, Kensuke Kawarada, Yusuke Ukagami, Hitomi Ichinose, Satoshi Kaneko, and Kiyoharu Fukuda. 2008. "Effects of Cellulose Crystallinity, Hemicellulose, and Lignin on the Enzymatic Hydrolysis of *Miscanthus Sinensis* to Monosaccharides." *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 72 (3): 805–10. doi:10.1271/bbb.70689.

11. ANEXOS

11.1. Método de Lowry

Preparar una curva de calibración en un rango de concentración 0.02 a 0.1 mg/mL utilizando una solución patrón de albúmina sérica bovina (BSA).

Para lo anterior, disolver calentando 1.25 g de BSA en agua destilada y posteriormente llevar a un aforo en un matraz de 50 mL. Tomar una alícuota de 160 μ L y disolver en 2 mL de agua destilada en un tubo eppendorf para tener así una solución de trabajo de 2 mg/mL de la cual se partirá para la preparación de los puntos de la curva de calibración.

Pesar los siguientes reactivos:

- 4 g de hidróxido de sodio (NaOH)
- 2.5 g de sulfato de cobre ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)
- 5 g de tartrato de sodio y potasio ($\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)
- 10 g de carbonato de sodio (Na_2CO_3)

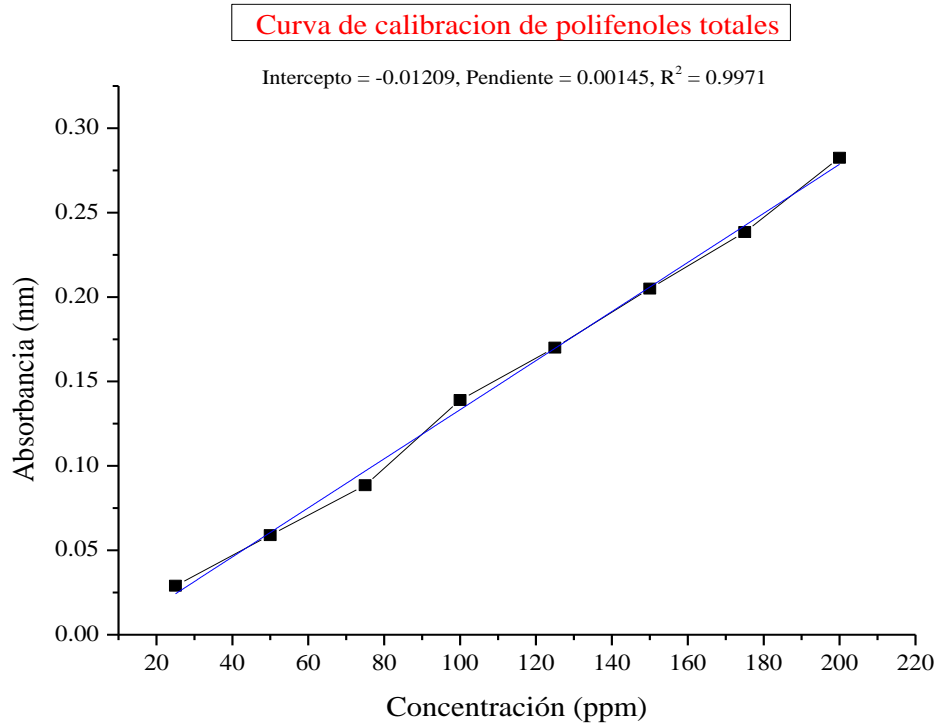
Disolver los 4 g de hidróxido de sodio en agua destilada y llevar a un aforo en un matraz de 1 L. Disolver el sulfato de cobre en agua destilada y llevar a un aforo en un matraz de 250 mL para tener una solución al 1%, nombrarla como (B).

Disolver el tartrato de sodio y potasio en agua destilada y llevar a un aforo en un matraz de 250 mL para tener una solución al 2%, nombrarla como (C).

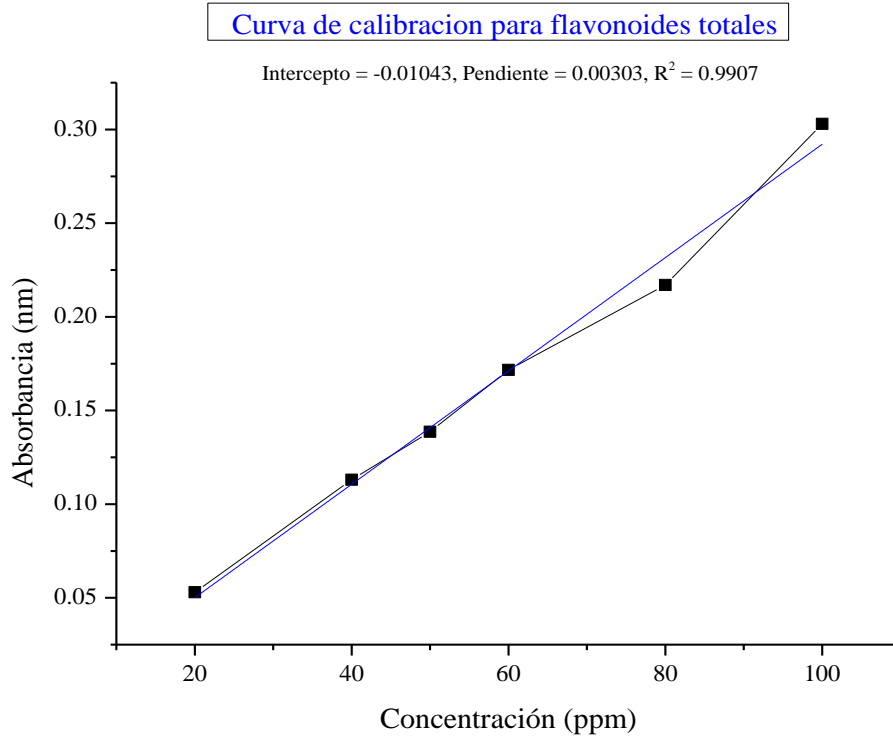
Disolver el carbonato de sodio en hidróxido de sodio 0.1 N y llevar a un aforo en un matraz de 500 mL para tener una solución al 2%, nombrarla como (A).

Tomar los volúmenes de la solución estándar de trabajo correspondientes a cada uno de los puntos de la curva de calibración y adicionar en tubos de ensayo, posteriormente agregar a cada tubo 1 mL de la mezcla de reactivos A-B-C en una proporción 100:1:1, agitar y dejar reaccionar por 10 minutos en oscuridad. Transcurrido el tiempo, adicionar 100 μ L de reactivo de Folín-Ciocalteu 1N, agitar y dejar reaccionar durante 30 minutos en oscuridad para posteriormente leer la absorbancia a 540 nm. Realizar lo mismo para cada una de las muestras así como para los blancos.

11.2. Curva de calibración para la cuantificación de polifenoles totales



11.3. Curva de calibración para la cuantificación de flavonoides totales



11.4. Método de Miller *et al.*, 1959 (Ácido dinitrosalicílico, DNS)

Preparar una curva de calibración en un rango de concentración de 0.1 a 1 g/L utilizando una solución patrón de glucosa.

Luego disolver 0.25 g de glucosa en agua destilada y llevar a un aforo en un matraz de 250 mL.

Pesar los siguientes reactivos:

- 10 g de hidróxido de sodio (NaOH)
- 10 g de ácido 3,5 dinitrosalicílico ($C_7H_4N_2O_7$)
- 200 g de tartrato de sodio y potasio ($KNaC_4H_4O_6 \cdot 4H_2O$)
- 2 g de fenol (C_6H_5OH)
- 0.5 g de metabisulfito de sodio ($Na_2S_2O_5$)

Disolver los reactivos en 500 mL de agua destilada poco a poco hasta lograr una completa disolución. Llevar a un aforo en un matraz de un litro y almacenar en un frasco ámbar.

Adicionar en tubos de ensayo 0.5 mL de las soluciones estándar correspondientes a cada uno de los puntos de la curva de calibración, añadir 1.5 mL de la solución de DNS, agitar y colocar los tubos en baño María en ebullición durante 15 minutos. Transcurrido éste tiempo, enfriar en un baño con hielo, posteriormente agregar 8 mL de agua destilada, agitar y leer la absorbancia a 550 nm. Realizar lo mismo para cada una de las muestras así como para los blancos, si es necesario realizar diluciones.

11.5. Método de Dubois *et al.*, 1956 (Fenol-sulfúrico)

Preparar una curva de calibración en un rango de concentración de 0.01 a 0.1 g/L utilizando una solución patrón de sacarosa. Preparar una solución de fenol al 5% pipeteando 5.1 mL de fenol líquido, disolver en agua destilada, llevar a un aforo en un matraz de 100 mL y almacenar en un frasco ámbar.

Adicionar en tubos de ensayo 1 mL de las soluciones estándar correspondientes a cada uno de los puntos de la curva de calibración, añadir 1 mL de la solución de fenol al 5,

posteriormente añadir 5 mL de ácido sulfúrico concentrado, agitar y dejar reaccionar por 5 minutos. Transcurrido el tiempo colocar los tubos en un baño de agua fría durante 10 minutos. Finalmente, retirar del agua y leer la absorbancia a 492 nm. Realizar lo mismo para cada una de las muestras así como para los blancos, si es necesario realizar diluciones.

11.6. Osazonas de algunos azúcares

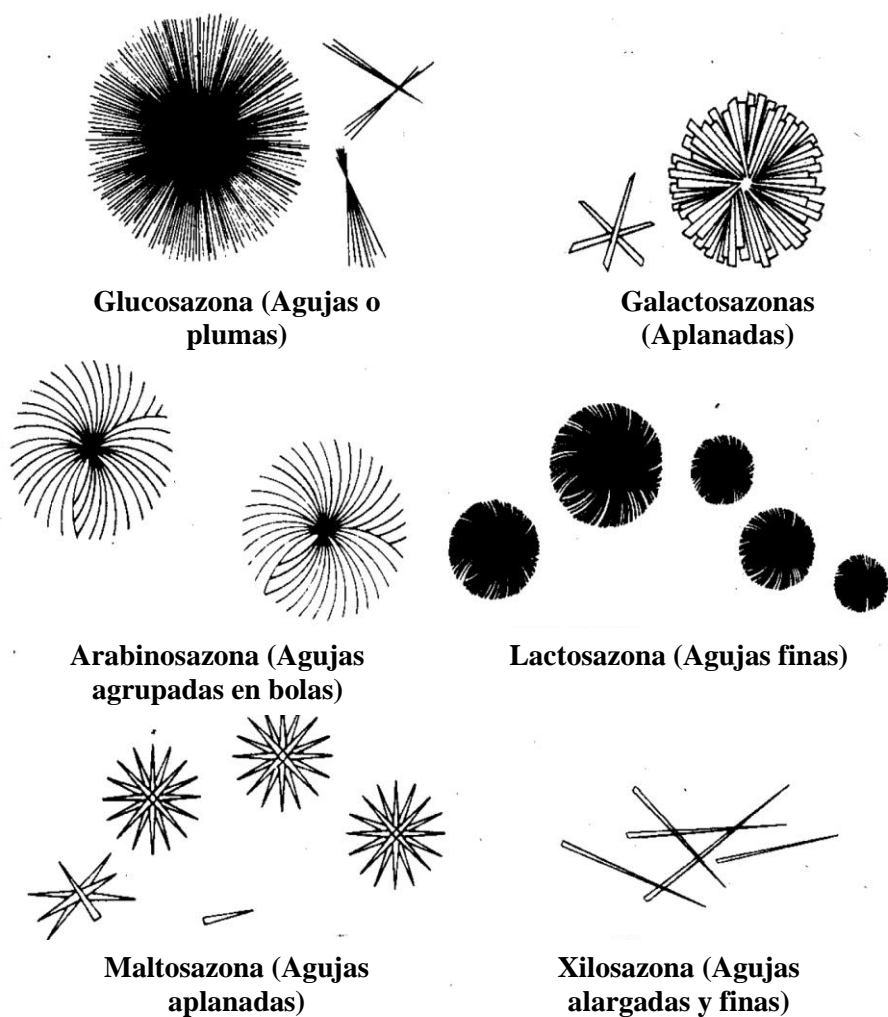
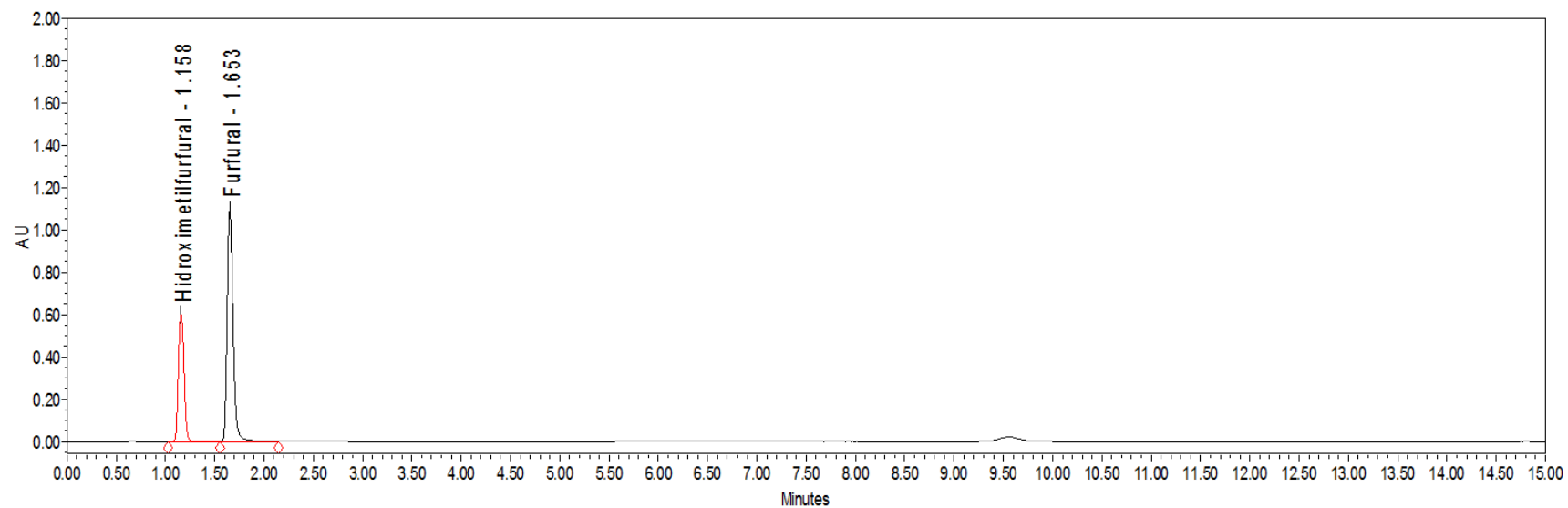


Figura 33. Apariencia cristalina de las osazonas como se observan en el microscopio a baja potencia.

11.7. Cromatogramas de Hidroximetilfurfural y furfural por UPLC



Cromatogramas de los compuestos Hidroximetilfurfural el cual presenta un tiempo de retención de 1.158 y el furfural con un tiempo de retención de 1.65

11.8. Determinación de unidades de papel filtro

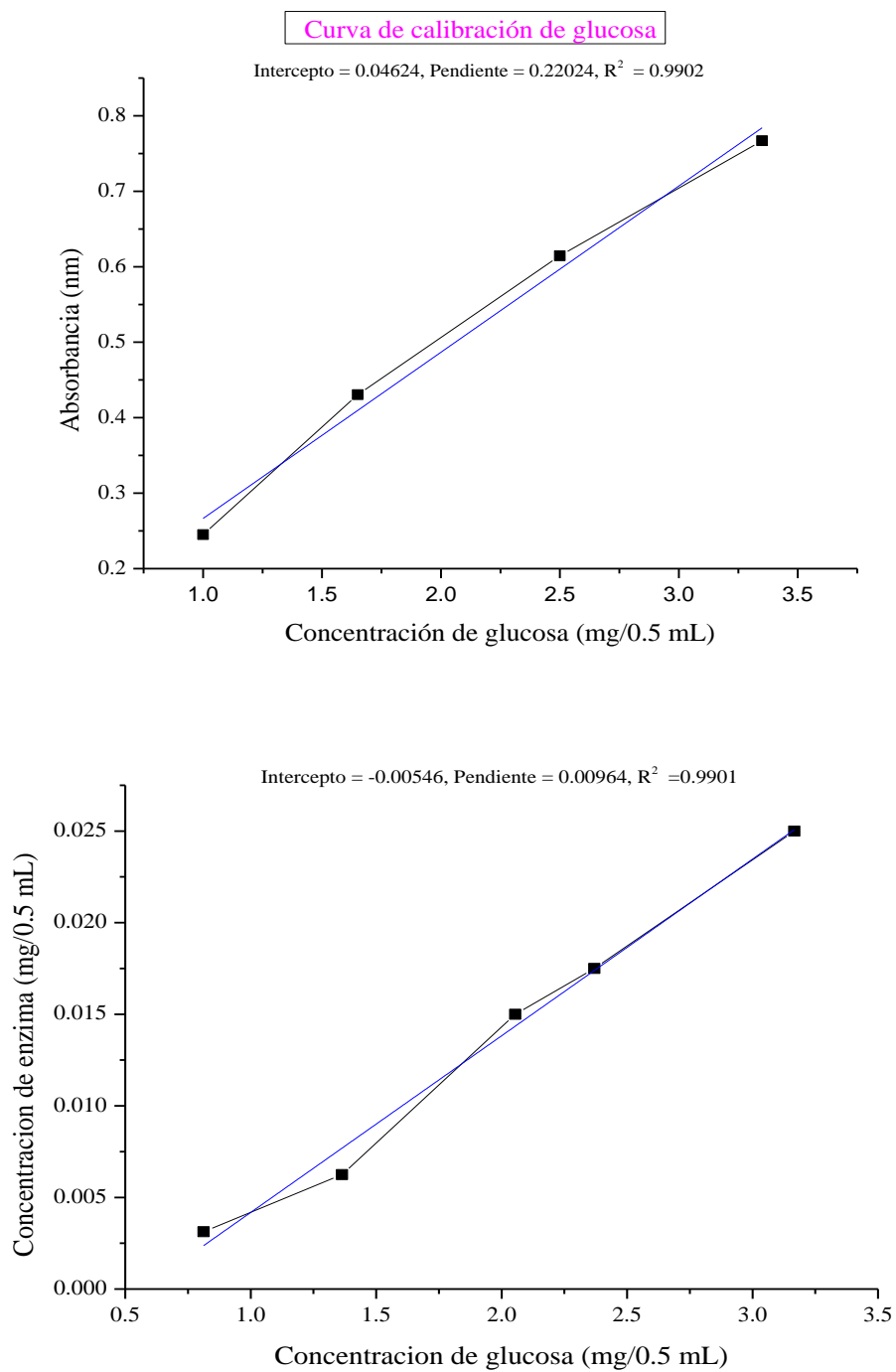
Para la cuantificación de las UPF, primero se cortan tiras de papel filtro Whatmam N° 1 con un peso aproximado de 50 mg, posteriormente se prepara una solución stock enzimática de 3 mg/mL, de la cual se realizan varias diluciones que permitan la liberación de ± 2 mg de glucosa, al mismo tiempo se construye una curva de calibración de glucosa a un rango de 1-3.35 mg/0.5 mL, todas las soluciones son preparadas con buffer citratos pH 4.8 en tubos de ensayo, el procedimiento es el siguiente:

	Muestra problema (mL)	Patrones de glucosa (mL)	Blanco de enzima (mL)	Cero (mL)
Buffer citrato pH 4.8	1	1	1	1.5
Sol. enzimática	0.5	-	0.5	-
Glucosa	-	0.5	-	-
Tiras de papel filtro	1	-	-	-

Una vez preparadas las muestras, estas se incuban durante 60 min a 50 °C en estufa, una vez transcurrido el tiempo de reacción, se añaden 3 mL del reactivo DNS a todos los tubos, incluyendo muestras problemas. Después de agitar se introducen durante 5 min en un baño con agua hirviendo (100 °C) y se transfieren a un baño de agua fría, luego se agregan 20 mL de agua destilada a cada tubo, se agitan y se leen a 540 nm. Por último el cálculo de las UPF se realiza ajustando los valores de absorbancia obtenidos para los distintos patrones de glucosa a una recta, posteriormente se calcula sobre la ecuación de esa recta los valores de glucosa que corresponderían a las absorbancias obtenidas para las muestras problema y de último se representa gráficamente los valores de glucosa obtenidos frente a las concentraciones de solución de enzima correspondiente, y se estima el valor de la concentración que liberaría exactamente 2 mg de azúcares reductores.

ANEXO 8

Gráficos para cálculo de UPF:



Calculo de las UPF del grafico concentración de enzima vs concentración de glucosa.

$$0.37 / 0.9846 = 0.38 \text{ UPF/mL}$$

11.9. Determinación de actividad de endo- β -1, 4- Glucanasa por Carboximetil Celulosa

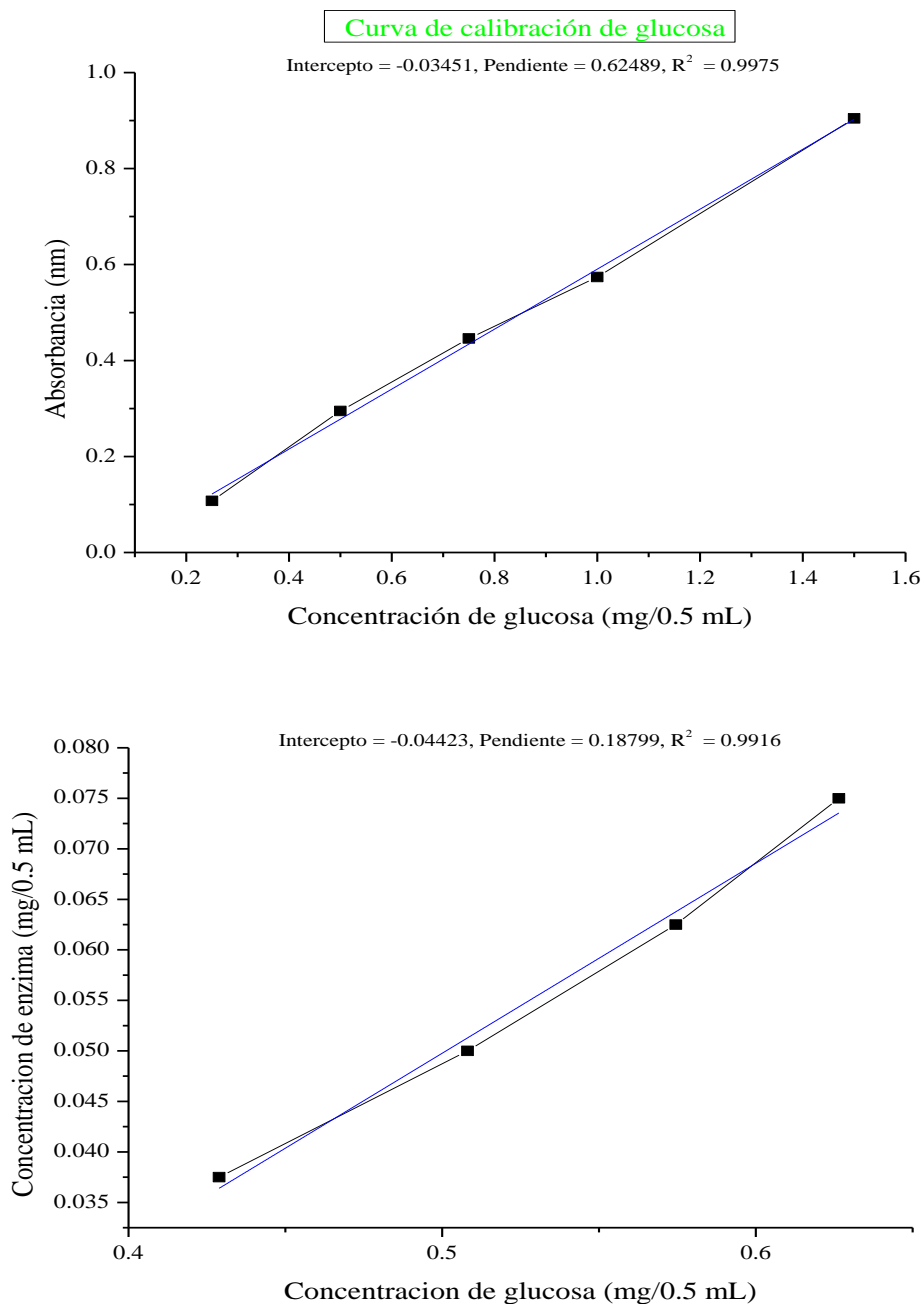
Para la medición de las unidades de CMC, primero se prepara una solución de CMC al 2%, la cual es previamente disuelta en buffer de citratos pH 4.8 a 50 mM, el procedimiento es semejante a la determinación de las unidades de papel filtro, ya que se realizan diluciones de una solución stock enzimática de concentración conocida, con las cuales se deben liberar \pm 0.5 mg de azúcares reductores, luego se prepara una curva estándar de glucosa que va de 0.5 a 1 mg/0.5 mL, posteriormente las soluciones se mezclan en tubos de ensayo. En la siguiente tabla, se detallan los volúmenes de reactivos que deben incorporarse en las distintas muestras.

	Muestra problema (mL)	Patrones de glucosa (mL)	Blanco de enzima (mL)	Cero (mL)
Buffer citrato pH 4.8	-	0.5	0.5	1
Sol. enzimática	0.5	-	0.5	-
Glucosa	-	0.5	-	-
CMC (2%)	0.5	-	-	-

Las muestras problema se incuban a 50 °C durante 30 min en una estufa. Transcurrido este tiempo se añaden 3 mL de DNS a todos los tubos, se agitan y se introducen en un baño de agua hirviendo durante 5 minutos, la reacción es detenida agregando los tubos a un baño de agua helada y se les añade 20 mL de agua destilada a cada tubo, se agitan nuevamente y se lee la absorbancia de las muestras a 540 nm. Por último el cálculo de las unidades de CMC se realiza ajustando los valores de absorbancia obtenidos para los distintos patrones de glucosa a una recta, posteriormente se calcula sobre la ecuación de esa recta los valores de glucosa que corresponderían a las absorbancias obtenidas para las muestras problema y de último se representa gráficamente los valores de glucosa obtenidos frente a las concentraciones de solución de enzima correspondiente, y se estima el valor de la concentración que liberaría exactamente 0.5 mg de azúcares reductores.

ANEXO 9

Gráficos para cálculo de Unidades de CMC:



Cálculo de las Unidades de CMC del gráfico concentración de enzima vs concentración de glucosa.

$$\frac{0.185}{0.0498} = 3.71 \text{ CMC/m}$$

11.10. Método de Bohrimnger *et al.*, 1964 (Dicromato de potasio)

a) Reactivos utilizados:

- 33.768 g Dicromato de potasio ($K_2Cr_2O_7$).
- 323 mL de ácido sulfúrico concentrado.
- 1000 mL de agua destilada.

b) Preparación del reactivo:

Se diluyo el ácido sulfúrico en aproximadamente 400 mL de agua destilada, se dejó enfriar y se agregó el dicromato de potasio diluido en aproximadamente 200 mL de agua destilada; finalmente, se aforo con agua destilada a 1000 mL.

c) Procedimiento:

A 1 mL de muestra se agregaron 2 mL de solución de dicromato, se agitaron y se dejaron reposar durante 10 min, después de ese tiempo, se adicionaron 5 mL de agua destilada, se agitaron nuevamente y por último se determinó la absorbancia a 585 nm.

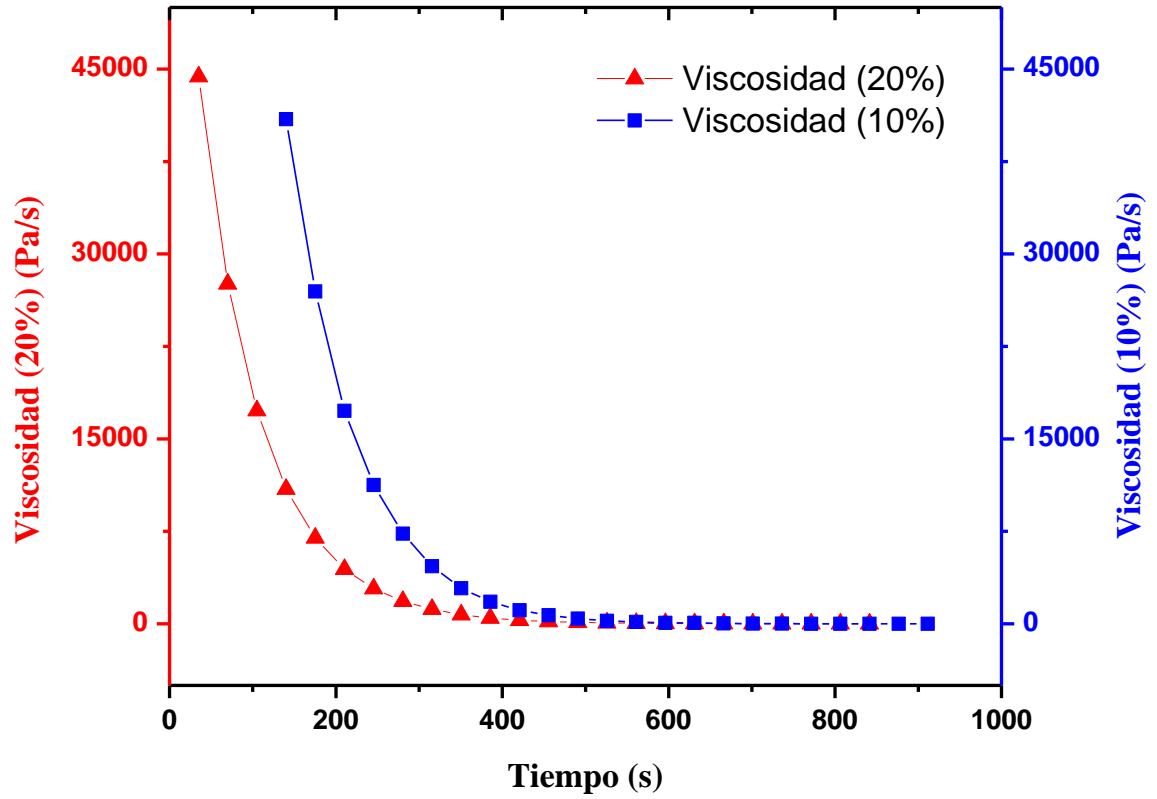
d) Curva de calibración para la determinación de alcohol.

De acuerdo con la densidad y el porcentaje de pureza del etanol, se calcularon los mililitros necesarios a adicionar a 1 L de agua destilada para obtener la solución patrón de 20 g/L. Para realizar la curva de calibración, el rango de análisis de regresión lineal fue de 0.5-16 g/L de etanol, se obtuvo entonces, una ecuación, y con ella se cuantifico la cantidad de alcohol presente en las muestras, a partir de la absorbancia dada.

e) Preparación de la muestra

A 2 mL de muestra, se le agregaron 10 mL de agua destilada, esto se destilo en un microdestilador de vidrio, cuidando la temperatura. Los destilados fueron colocados en tubos de 15 mL forrados con aluminio y fueron congelados a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su posterior análisis.

11.11 Graficas de viscosidad de nopal




11.12. Presentaciones en congresos

11.12.1. Presentación en 3^{er} Congreso de la Facultad de Ingeniería Química, 2015.



11.12.2. Reconocimiento de 2° lugar en presentaciones orales del CONFIQ-3, 2015.



**La Facultad de Ingeniería Química
de la Universidad Autónoma de Yucatán**

otorga el presente

RECONOCIMIENTO

a

José Vicente Góngora Cauich

Por haber obtenido el 2do lugar de las presentaciones orales con el trabajo: "Establecimiento de un proceso de hidrólisis a partir de cladodios frescos de nopal (*Opuntia spp.*) Para la obtención de azúcares fermentables" en el marco de las actividades del Tercer Congreso de la Facultad de Ingeniería Química (CONFIQ-3).

Mérida, Yucatán, a 14 de mayo de 2015.

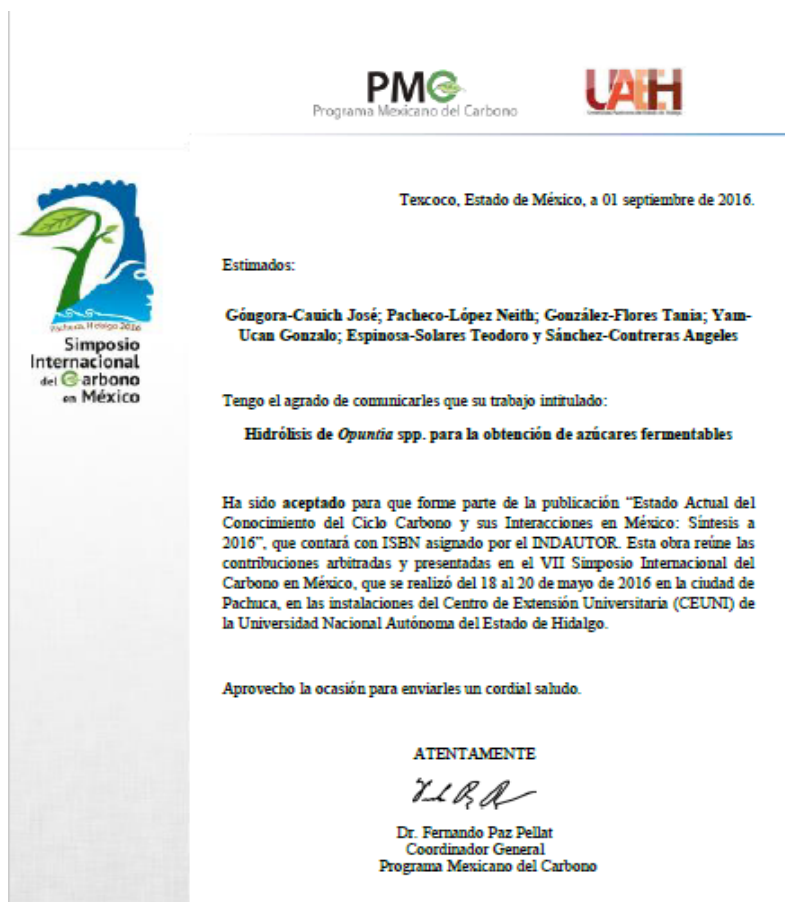
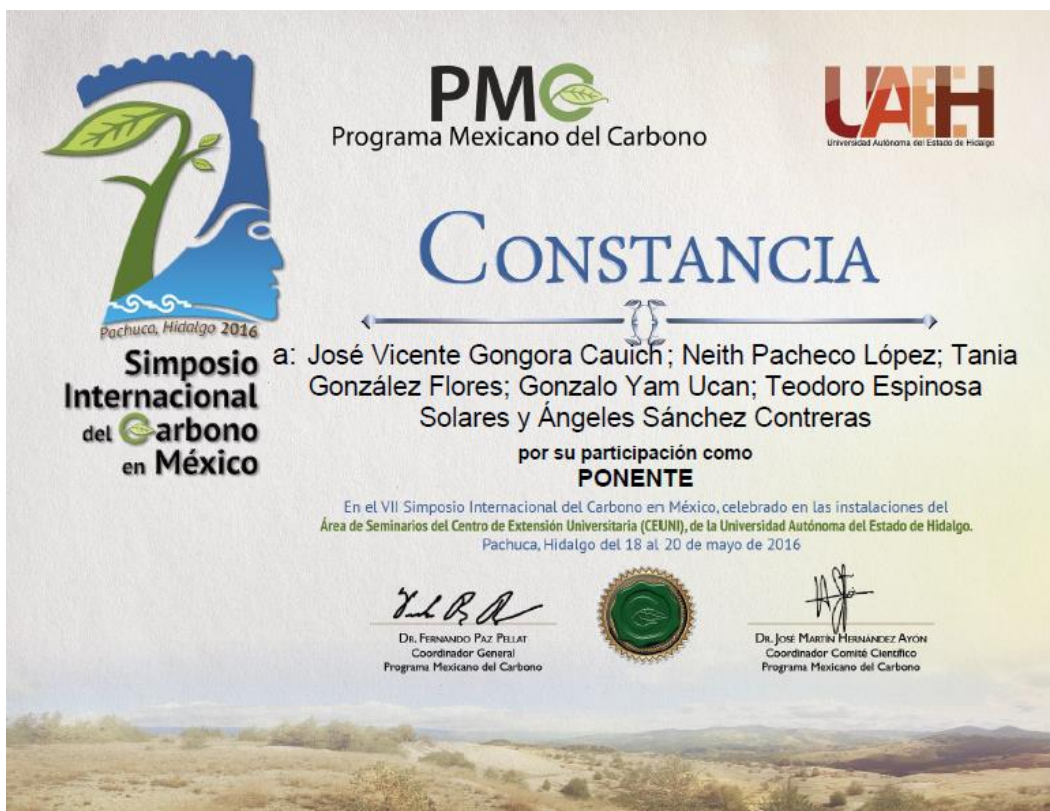
PO Dra. Marcela Zamudio Maya
Dra. Marcela Zamudio Maya
Directora
Facultad de Ingeniería Química

Dr. Cristian Carrera Figueiras
Dr. Cristian Carrera Figueiras
Jefe de la Unidad de Posgrado e Investigación
Facultad de Ingeniería Química

11.12.3 Seminario Nacional de los Estudiantes del PICYT, 2015.



11.12.4. Simposio internacional del carbono en México, 2016.



11.12.5. Food and Biotechnology International Congress, 2016.



**El Comité Organizador del Food
& Biotechnology International
Congress 2016**



Otorga la Presente Constancia a:

Gongora-Cauich J., Pacheco-López N., González-Flores T., Ortiz-Salazar F., Espinosa-Solares T., Sánchez-Contreras A.

Por su participación con el trabajo:

“Producción de Bioetanol a Partir de Cladodios de Nopal (Opuntia spp.)”

Del 19 al 21 de Octubre de 2016, en la Ciudad de Pachuca, Hidalgo, México.

Dr. Alejandro Téllez Jurado
Universidad Politécnica de Pachuca
Comité Organizador - F&BIC2016

MC. Luis Díaz Batalla
Universidad Politécnica de Francisco I Madero
Comité Organizador - F&BIC2016

Dr. Carlos Alberto Gómez Aldapa
Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo
Comité Organizador - F&BIC2016

11.12.6. Food and Biotechnology International Congress, 2016. Participación en el trabajo.



El Comité Organizador del Food
& Biotechnology International
Congress 2016



Otorga la Presente Constancia a:

**GONZÁLEZ-FLORES T., GÓNGORA-CAUICH J. V., PACHECO-LÓPEZ N. A.,
AYORA-TALAVERA T. R., SÁNCHEZ-CONTRERAS M. A.**

Por su participación con el trabajo:

**“La Manzana del Marañón (*Anacardium occidentale* L.) Como
Materia Prima para la Obtención de Bioetanol.”**

Del 19 al 21 de Octubre de 2016, en la Ciudad de Pachuca, Hidalgo, México.

Dr. Alejandro Téllez Jurado
Universidad Politécnica de Pachuca
Comité Organizador - F&BIC2016

MC. Luis Díaz Batalla
Universidad Politécnica de Francisco I Madero
Comité Organizador - F&BIC2016

Dr. Carlos Alberto Gómez Aldapa
Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo
Comité Organizador - F&BIC2016

11.12.7. Food and Biotechnology International Congress, 2016. Participación en el trabajo.



**El Comité Organizador del Food
& Biotechnology International
Congress 2016**



Otorga la Presente Constancia a:

**ORTIZ-SALAZAR F., GÓNGORA-CAUICH J., PACHECO-LÓPEZ N.,
GONZÁLEZ-FLORES T., ESPINOSA-SOLARES T., SÁNCHEZ-CONTRERAS**

Por su participación con el trabajo:

**“Aprovechamiento de las Propiedades Biotecnológicas, Antioxidantes y
Nutraceúticas del Nopal (*Opuntia ficus-indica*).”**

Del 19 al 21 de Octubre de 2016, en la Ciudad de Pachuca, Hidalgo, México.

Dr. Alejandro Téllez Jurado
Universidad Politécnica de Pachuca
Comité Organizador - F&BIC2016

MC. Luis Díaz Batalla
Universidad Politécnica de Francisco I. Madero
Comité Organizador - F&BIC2016

Dr. Carlos Alberto Gómez Aldapa
Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo
Comité Organizador - F&BIC2016