

UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA

“ANTONIO NARRO”

DIVISION DE CIENCIA ANIMAL



**HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DE PIÑAS DE SOTOL PARA INCREMENTAR LA
CONCENTRACIÓN DE AZÚCAR APLICANDO DIFERENTES TRATAMIENTOS**

POR:

LORENA LARA FERNÁNDEZ

Tesis:

Presentada como Requisito Parcial para Obtener el

Título de:

INGENIERO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

Buenavista, Saltillo, Coahuila, México

Diciembre del 2006

**UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA “ANTONIO NARRO”
DIVISION DE CIENCIA ANIMAL
DEPARTAMENTO DE NUTRICIÓN Y ALIMENTOS**

**HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DE PIÑAS DE SOTOL PARA INCREMENTAR LA
CONCENTRACIÓN DE AZÚCAR APLICANDO DIFERENTES TRATAMIENTOS**

Por:

LORENA LARA FERNANDEZ

TESIS

Que se somete a la consideración del H. Jurado Examinador, como requisito parcial

para obtener el título de:

INGENIERO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

Aprobado por:

Lic. Laura Olivia Fuentes Lara
Presidente del jurado

M.C. Heliodoro de la Garza Toledo
1er Vocal

Dr. Cristóbal Noé Aguilar González
2º Vocal

Dr. Baltazar Gutiérrez Rodríguez
Suplente

COORDINADOR DE LA DIVISIÓN DE CIENCIA ANIMAL

Dr. Ramón F. García Castillo

Buenavista, Saltillo, Coahuila, México.

Diciembre del 2006



UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA "ANTONIO NARRO"
DIVISION DE CIENCIA ANIMAL
DEPARTAMENTO DE NUTRICIÓN Y ALIMENTOS

La Universidad Autónoma Agraria "Antonio Narro" a través del comité de tesis hace constar que el presente trabajo titulado:

**HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DE PIÑAS DE SOTOL PARA INCREMENTAR LA
CONCENTRACIÓN DE AZÚCAR APLICANDO DIFERENTES TRATAMIENTOS**

Por:

LORENA LARA FERNÁNDEZ

Ha sido aceptada como requisito parcial para obtener el título de:

INGENIERO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

El proyecto fue dirigido por el siguiente comité:

Lic. Laura Olivia Fuentes Lara
Asesor UAAAN

M.C. Heliodoro de la Garza Toledo
Asesor UAAAN

Dr. Cristóbal Noé Aguilar González
Asesor UA de C

Dr. Baltazar Gutiérrez Rodríguez
Asesor UA de C

M.C. Antonio F. Aguilera Carbo
Asesor UAAAN

AGRADECIMIENTOS

Gracias a Dios y a mi Madre Divina ya que me dado la oportunidad de vivir, llegar hasta este ciclo de mi vida, realizarme como persona y como ser humano. Gracias por los momentos tan felices que he pasado en compañía de mis seres queridos que son lo mejor que tengo en esta vida.

A mi ALMA TERRA MATER por brindarme la oportunidad de alcanzar un sueño más, permitiendo mi desarrollo profesional y humano, por enseñarme el valor de la humildad y hermandad que existe en el corazón de esta institución.

A mis padres que me han brindado su apoyo y amor en todo momento, por ser mi guía para seguir cada día por el buen camino, gracias por todos sus consejos y sabiduría otorgada... Los amo con toda mi alma y que Dios los bendiga y los guarde siempre... Gracias por existir.

A mis hermanos Alejandro Lara y Adrián Lara, que han creído en mi en todo momento y me han dado su respaldo moral incondicionalmente.

Al Mc. Heliodoro de la Garza Toledo por ser mi profesor y gran amigo, por darme su apoyo y ser el arquitecto en la realización de esta investigación, gracias por toda su enseñanza pero sobre todo por su sincera amistad y paciencia a lo largo de todo este tiempo.

Gracias a todos los asesores: Lic. Laura O. Fuentes Lara, M.C. Heliodoro de la Garza Toledo, Dr. Cristóbal Noé Aguilar González, Dr. Baltazar Gutiérrez Rodríguez, M.C. Antonio F. Aguilera Carbo, ya que cada uno formo parte esencial en el desarrollo de este trabajo, además de brindarme las herramientas necesarias para poder transmitir su conocimiento.

Al Dr. Ramón García, por que me tendió su mano en todo momento, además de abrirme las puertas de su casa junto con su familia. Gracias por la convivencia dentro y fuera de la universidad.

Al T.L.Q. Carlos Alberto Arévalo Sanmiguel, gracias por la amistad, atención y apoyo brindado a lo largo de la realización de esta tesis y de toda la carrera.

Gracias a todos los profesores, de la carrera de ICTA que han contribuido en el desarrollo de mi formación como profesionista, y han hecho posible que concluya una más de mis metas... Que Dios los bendiga a todos.

Gracias a mis amigos Dodany Chacón, Fernando Jiménez, Mayra A. Álvarez, Cesar Vara por los momentos tan especiales que vivimos juntos en la universidad, a toda la banda de los botes, Ivonne, Iris, Roberto, Enoc, Cheke, Dania, Beto, Javier, Julio, Toulouse, Cristi, German, Cesarín, Paola Mariana, Peque, Pariente, a la popubanda de alimentos, por su agradable compañía durante todo este tiempo.

A la raza de Saltillo: Diana Prado, Argentina Prado, Elvia Ortiz (kena), Esmeralda, Parmeno, Lizeth, y su esposo Luis, a los coshinos: Javier y Efraín, a la Chiva, Mundo, Richard, Jazmín, Pamela, Erika, Paola Valdez, Arturo, Alain por todos los momentos de alegrías que pasamos, y por su sincera amistad...Gracias.

DEDICATORIAS

Dedico esta tesis principalmente a mi familia:

A mis padres: Santos Lara Domínguez

y

María Luisa Fernández Fernández

A mis hermanos: Adrián Lara y Alejandro Lara

A mi cuñada: Paola Cuevas de Lara

A mi sobrina: Melanie Lara Cuevas

También dedico este trabajo a una persona que se nos adelantó en el camino; M.C. Humberto Macías Hernández, ya que fue una gran persona, la cual gracias a su pasión y todas sus enseñanzas pudo contagiarme de ese amor para seguir por el camino del arte de la Enología. Que Dios lo guarde por siempre.

INDICE GENERAL

AGRADECIMIENTOS	I
DEDICATORIAS	III
INDICE GENERAL	IV
INDICE DE TABLAS	VI
INDICE DE GRAFICAS	VI
INDICE DE FIGURAS	VII

CAPITULO 1

1.1.- RESUMEN	1
1.2.- INTRODUCCIÓN	2

CAPITULO 2

2.- OBJETIVOS	4
2.1.- Objetivo General	4
2.2.- Objetivos específicos	4
2.3.- Justificación	5

CAPITULO 3

3.- REVISION DE LITERATURA	7
3.1.- Generalidades del sotol	7
3.2.- Importancia del sotol en Coahuila	8
3.3.- Trascendencia del sotol en la historia	10
3.4.- Celulosa	11
3.5.- Especificidad de las enzimas	12
3.6.- Especificidad por el sustrato	13
3.7.-Influencia del pH sobre las enzimas	13
3.8.-Influencia de la temperatura sobre las enzimas	14
3.9.- Hidrólisis de celulosa	15
3.10.- Microorganismos productores de celulasas	17
3.11.- Celulosa en la naturaleza	19
3.11.1.- Distribución y obtención	19
3.11.2.- utilización de la celulosa	19
3.12.- Fibra	20
3.13.- Lignina	20
3.14.- Métodos de extracción de complejos enzimáticos a gran escala	21
3.14.1.- Extracción por métodos químicos	22
3.14.1.1.- Álcalis	22
3.14.1.2.- Lisozima y EDTA	22

3.14.1.3.- Detergentes	23
3.14.1.4.- Shock por enfriamiento	23
3.14.1.5.- Shock osmótico	24
3.14.2.- Extracción por métodos físicos	24
3.14.2.1.- Sonificación	24
3.14.2.2.- Congelación y descongelación	25
3.14.2.3.- Cizalla sólida	25
3.14.2.4.- Cizalla líquida	25
3.15.- Métodos de aislamiento y purificación de complejos enzimáticos a gran escala	26
3.15.1.- Separación de ácidos nucleicos	26
3.15.2.- Concentración por precipitación	26
3.15.2.1.- Sulfato amónico	26
3.15.2.1.- Solventes orgánicos	26
3.15.3.- Concentración por ultra filtración	27
3.15.4.- Concentración por liofilización	27
3.15.5.- Cromatografía en gel	27
3.15.6.- Cromatografía de intercambio iónico	28
3.15.7.- Cromatografía de afinidad	29
3.15.8.- Cromatografía de interacción hidrofóbica	29
3.15.9.- Cromatografía líquida de alta eficacia	29
3.15.10.- Técnicas electroforéticas	30
3.15.11.- Cromato enfoque	30
3.15.12.- Separación en dos fases acuosas	31
3.16.- Enzimas aplicadas a los alimentos	31
4.- MATERIALES Y MÉTODOS	CAPITULO 4 33
5.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN	CAPITULO 5 35
6.- CONCLUSIONES	CAPITULO 6 43
7.- ANEXOS	CAPITULO 7 45
8.- BIBLIOGRAFÍA	CAPITULO 8 48

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Enzimas involucradas en la hidrólisis enzimática de la celulosa.	17
Tabla 2.- Análisis de varianza de producción de azúcar en diferentes sustratos de sotol variando temperatura y Ph.	36
Tabla 3.- Análisis de varianza de producción de azúcar en diferentes sustratos de sotol cambiando la concentración de la enzima y la concentración del sustrato.	38
Tabla 4.- Reducción porcentual de elementos lignocelulósicos.	42

INDICE DE GRAFICAS

Grafica 1.- Incremento de azúcares reductores en diferentes sustratos de sotol tratados con el complejo <i>celluviridina</i> variando la temperatura y el pH.	35
Grafica 2.- Rendimientos de incremento por la actividad celulolítica de azúcares reductores obtenidos para cada sustrato	

variando la relación de enzima-sustrato.	37
Grafica 3.- Porcentaje de azúcares liberados por la acción enzimática durante 7 horas de tratamiento.	39
Grafica 4.- Productividad en % de azúcar liberado por tiempo de acción.	40
Grafica 5.- Porcentaje de liberación de azúcares fermentables.	41

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura molecular de la celulosa.	11
Figura 2. Estructura de la celulosa.	12
Figura 3. Ciclo de reacción enzimática.	13
Figura 4. Efecto de la temperatura sobre las enzimas.	15
Figura 5. Esquema general de metodología.	34

RESUMEN

CAPÍTULO 1

En el presente trabajo se evaluaron los rendimientos de azúcares reductores obtenidos mediante hidrólisis enzimática, utilizando diferentes sustratos de sotol, con la aplicación del complejo celulolítico (*Trichoderma viride*), variando las temperaturas de 40 a 55 °C y el pH de 4 a 5.5 con un tiempo de reacción de 1 hora en agitación. De igual forma se evaluó el mayor rendimiento de azúcares reductores con la variación de la concentración de enzima (0.03, 0.05 y 0.07 g) y variación en la concentración del sustrato (3, 5 y 7 g en dilución 1:10 respectivamente). El máximo rendimiento de azúcares fermentables se obtuvo con la utilización de sustrato de sotol cocido a presión por 60 minutos, a un pH de 5, temperatura de 50 °C y una concentración de sustrato de 7.0 g con 0.03 g de enzima.

En base a las condiciones establecidas para cada sustrato, se realizó una cinética enzimática para medir el tiempo de reacción, además de evaluar la cantidad de lignina y celulosa contenida en el sustrato al final de la cinética, comparando con el sustrato sin tratamiento enzimático.

INTRODUCCIÓN

Las enzimas celulolíticas tienen diferentes usos y aplicaciones industriales por ejemplo para la producción de metanol y etanol como combustibles, también para la degradación de sólidos vegetales contaminantes generados por la industria de los alimentos. Este complejo enzimático formado por las enzimas endo-gluconasas, exo-gluconasas, glucosidasas y otras, las cuales llevan a cabo la hidrólisis de la celulosa para obtener como producto final glucósidos simples fermentables.

La presente investigación tiene como objetivo emplear este complejo enzimático para incrementar la concentración de azúcares fermentables en piñas de sotol, para la elaboración de la bebida alcohólica del mismo nombre, en el capítulo 2 se describe el objetivo y los objetivos específicos de la investigación, así como, la justificación de este trabajo, en el capítulo 3 se abordan temas relacionados con el proceso de elaboración de la bebida alcohólica, la importancia de la celulosa, las enzimas que la degradan y los microorganismos que las producen y los procesos de obtención de estas enzimas. El capítulo 4 describe la metodología empleada para durante el trabajo experimental. Los resultados y discusiones se encuentran en el capítulo 5, en donde se exponen de manera gráfica los mismos y se discuten estos resultados con los reportados en la literatura.

En el capítulo 6 se describen las conclusiones de acuerdo a los objetivos planteados al inicio del proyecto y finalmente en el capítulo 7 se enumera la bibliografía consultada durante la revisión de literatura.

La expectativa de la presente investigación es sentar las bases para la aplicación de enzimas en el proceso de elaboración del sotol para incrementar el rendimiento de esta planta y beneficiar tanto a los agricultores como a los productores de sotol.

2.1.- OBJETIVO GENERAL

Hidrolizar de manera enzimática los materiales celulolíticos de diferentes sustratos de sotol (Conchas crudas, conchas cocidas a presión, cocidas en hornos de piedra y bagazo)) para liberar los azúcares atrapados en su red, con el fin de aumentar la concentración de azúcares reductores que puedan ser utilizados en la fermentación alcohólica o en el aprovechamiento de los residuos sólidos (bagazo).

2.2.- OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Establecer el pH y temperatura de reacción de mayor rendimiento para cada sustrato analizado (sotol crudo, sotol cocido a presión, sotol cocido en horno de piedra y bagazo).
- Establecer la concentración de enzima y concentración de sustrato de mayor rendimiento para cada sustrato analizado.
- Establecer el tiempo de reacción de máximo rendimiento en el incremento de azúcares reductores para cada sustrato analizado.
- Cuantificar la reducción de elementos lignocelulósicos (fibra, lignina, celulosa), después de la hidrólisis enzimática para corroborar la efectividad de la enzima.

2.3.- JUSTIFICACIÓN

Las piñas de sotol están formadas de conchas duras de material celulítico y en su interior se encuentran polisacáridos tipo fructanos los cuales se hidrolizan parcialmente durante el cocimiento de las piñas, sin embargo estas siguen conteniendo ciertas cantidades de polisacáridos, los cuales pueden ser hidrolizados por medio de enzimas celulolíticas para incrementar la cantidad de azúcares fermentables. (García 2005).

La celulosa es el material orgánico más abundante y, a diferencia de otras potenciales fuentes de energía, es renovable. Anualmente se producen enormes cantidades de desechos de celulosa, por lo que el desarrollo de procesos sencillos, eficaces y rentables económicamente que convierta tales desechos en glucosa tiene gran interés. La glucosa así obtenida puede ser utilizada como edulcorante, como fuente de energía para la producción de proteínas unicelulares, o para transformarla como otros productos químicos valiosos, como el etanol (Wiseman, 1991).

Por lo tanto en esta investigación se propone incrementar los azúcares fermentables de las piñas del sotol para incrementar el rendimiento en los procesos de elaboración de la bebida alcohólica, así como el aprovechamiento de los residuos generados de este proceso para la obtención de sustratos fermentables para la producción de alcohol no potable para uso como combustible.

Desde el punto de vista tecnológico esta investigación aporta conocimiento que beneficia la forma directa a los productores artesanales, así como a las microempresas dedicadas a la producción de la bebida alcohólica sotol, también tiene impacto sobre el aprovechamiento sustentable de la planta de sotol ya que esta será empleada de forma adecuada, integral, lo cual redundará en la utilización adecuada de una planta que requiere de hasta 5 años para estar en condiciones adecuadas para ser aplicada para su procesamiento industrial.

3.1.- Generalidades del sotol

El sotol se elabora a partir de una agavácea que crece en las laderas altas de las sierras y lomeríos de zonas desérticas en el norte de la república. El licor se obtiene del conocimiento y la destilación de las piñas del agave denominado sotol (López 2005).

El nombre científico de esta agavácea es *Dasyllirion spp* y es nativa de los desiertos de Coahuila, Chihuahua, Durango, Zacatecas, Nuevo León.

La bebida alcohólica destilada obtenida de esta planta recibe el mismo nombre de Sotol o Sereque y generalmente se produce en forma artesanal, sin embargo, esta bebida empieza a tener demanda en los nuevos nichos de mercado, ya sea como el nuevo *tequila* o como el *sabor salvaje del desierto*, debido a que las condiciones de aridez y las temperaturas extremas en las que se desarrolla la planta le dan un sabor peculiar al *bouquet* derivado de la destilación del mosto de las piñas (Bogler, 1994).

El sotol es conocido de diferentes formas dependiendo del lugar en donde uno se encuentre: en Chihuahua se le llama sereque, un nombre indígena; en otros lugares se le llama zotol, nombre náhuatl que proviene del vocablo tzotollin (el dulce de la cabeza); en Coahuila se le conoce como sotol y a algunas variedades se les llama varacuate (López 2005).

Dasyllirion cedrosanum. Tallo corto, que va de 1.0 m a 1.5 mts de alto; hojas de 20.0 mm de ancho y de más de un metro de largo; espinas distantes entre sí de 10.0 mm a 15.0 mm y de 2.0 mm a 5.0 mm de largo, amarillas, rojizas hacia la punta. Inflorescencia de 5.0 m de altura. Frutos elípticos y angostos, de 4.0 mm a 5.0 mm por 7.0 mm a 9.0 mm. Esta planta cuenta con hojas largas y fibrosas, color verde, cuya parte aprovechable para la elaboración del licor es la piña o cabeza. Es propia de los desiertos o de los climas cercanos al tipo desértico. Su apariencia puede ser la de palmeras altas o de hierbas con grandes inflorescencias de sólidas y finas flores. Distribución: Zacatecas, en la región de Cedros; Coahuila, en Saltillo y la Angostura; a veinte kilómetros al sur de Ocampo, en el Aguaje del Pajarito, en el extremo occidental de la sierra de La Fragua; al norte del Puerto Colorado, en la Región de Monclava, en el Puerto de San Lázaro, en el rancho de La Luz, en la sierra de Paila y en el cañón de San Lorenzo (López 2005).

3.2.- Importancia del sotol en Coahuila

La participación de diferentes dependencias de gobierno y de instituciones educativas que han favorecido la interacción de sus miembros, esta tentativa representa un ejercicio inédito sobre el uso de especies maderables con potencial productivo, la cual incentiva el aprovechamiento sustentable de una planta de uso milenario con la que se obtiene una bebida espirituosa de un sello característico en la región desértica de Coahuila.

En los últimos treinta años las bebidas alcohólicas derivadas del agave han pasado del ámbito regional al reconocimiento de los mercados nacionales e internacionales. Esta creciente demanda y la globalización propia de la economía, esta obligando a las empresas de la cadena agave-bebidas alcohólicas (tequila, mezcal, pulque y sotol entre otros), a integrar nuevas tecnologías para obtener una mayor competitividad, mejores precios y una óptima calidad de sus productos.

Los estudios realizados conceden a Coahuila un alto potencial en la elaboración e industrialización del sotol como bebida destilada: de los siete millones de hectáreas que representa el hábitat de la planta, tres son reconocidas como buenas para su aprovechamiento.

Dado que se cree que hay suficiente materia prima para soportar una industria durante muchos años, tanto como la viabilidad de mejorar e incrementar las poblaciones de la planta bajo posibles resultados de investigación, Coahuila tendría entonces una ventaja por encima de Chihuahua y Durango, ambos estados incluidos en la declaratoria de denominación de origen del sotol, ya que las reservas de aquel estado están prácticamente intactas debido a que la producción del licor es limitada (López 2005).

3.3.- Trascendencia del sotol en la historia

El sotol ha tenido usos muy variados desde que llegaron los primeros pobladores al desierto hasta nuestros días. Evidencias arqueológicas demuestran que las culturas indígenas como los papagos, kikapoos y zunis empleaban sus piñas como alimento. Primero eran cocidas y luego se pasaban a pozas con piedras calientes a manera de *tatema*, del centro hacían una harina para preparar panes o tortillas.

En la época colonial se introduce el proceso de destilación en la región de la Nueva Vizcaya, proceso que introdujeron los españoles y, en particular, los franciscanos durante los siglos XVI al XVIII, cuando comenzaron a fabricarse y beberse alcoholes destilados, ya que con anterioridad el uso del sotol se reducía a fines alimenticios, religiosos, medicinales o para elaborar cestería.

Es hasta el siglo XX cuando se comercializa en barriles. En 1908 se construye la primera vinata de sotol en Parras de la Fuente, Coahuila, estableciéndose un número creciente de éstas en las vastas regiones del estado, con el propósito de atender las demandas locales de vaqueros y mineros (López 2005).

3.4.- Celulosa

Se puede considerar como la molécula orgánica más abundante en la naturaleza. Es un polímero lineal de varios miles de glucosas unidas por enlaces ($1\beta\rightarrow4$). Tiene una estructura lineal o fibrosa, en la cual se establecen múltiples puentes de hidrógeno entre los grupos hidroxilo de distintas cadenas yuxtapuestas, haciéndolas impenetrables al agua, y originando fibras compactas que constituyen la pared celular de las células vegetales (Badui 1993).

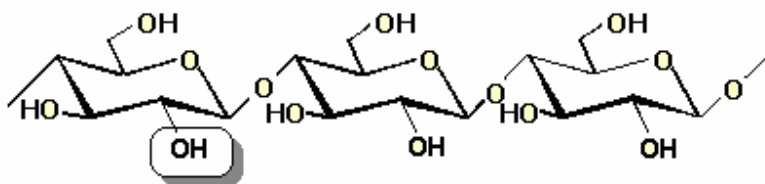


Figura 1. Estructura molecular de la celulosa (Web 1).

La celulosa es un polisacárido estructural en las plantas ya que forma parte de los tejidos de sostén. A pesar de que está formada por glucosas, los animales no pueden utilizar a la celulosa como fuente de energía, ya que no cuentan con la enzima necesaria para romper los enlaces β -1,4-glucosídicos, sin embargo, es importante incluirla en la dieta humana (fibra dietética) porque al mezclarse con las heces, facilita la digestión y defecación, así como prevenir los malos gases (Web 2).

Pero además, la configuración β le permite a la celulosa formar cadenas largas y lineales, las cuales no se presentan aisladas sino unidas entre sí mediante enlaces hidrógeno intramolecular, formando una estructura supramolecular cristalina y organizada, resistente a la hidrólisis (Eriksson 1985).

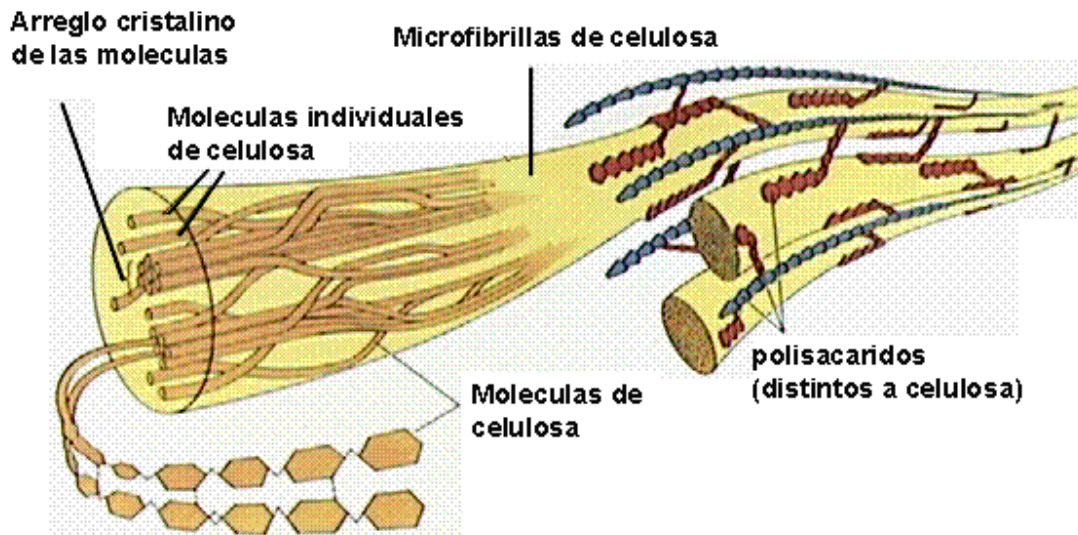


Figura 2. Estructura de la celulosa (Web 1).

3.5.- Especificidad de las enzimas

Además de la capacidad de las enzimas para aumentar la velocidad de reacción, se encuentra su especificidad, tanto desde el punto de vista del enlace químico que va a transformar (especificidad por el sustrato), como del tipo de reacción que cataliza (especificidad de reacción).

En la catálisis, solo una región relativamente pequeña de la enzima entra en contacto directo con el sustrato y se conoce como centro activo. El centro activo de cada enzima comprende las partes de la estructura proteica implicadas en la unión con el sustrato, en la que se compara la enzima con una cerradura y el sustrato con su llave correspondiente (Belitz, 1992).

3.6.- Especificidad por el sustrato

La especificidad por el sustrato no es igual de precisa para todas las enzimas. En el caso de una gran mayoría de hidrolasas es suficiente la existencia de un determinado grupo funcional en el sustrato. Muchas enzimas sólo actúan sobre un único sustrato, o sobre varios, pero con destacada preferencia por uno de ellos y reducida la actividad sobre los demás. Las enzimas con alta especificidad de un sustrato son de interés especial para el análisis de alimentos, puesto que con ellas se analiza cualitativa y cuantitativamente de forma selectiva un componente específico (Belitz, 1992).

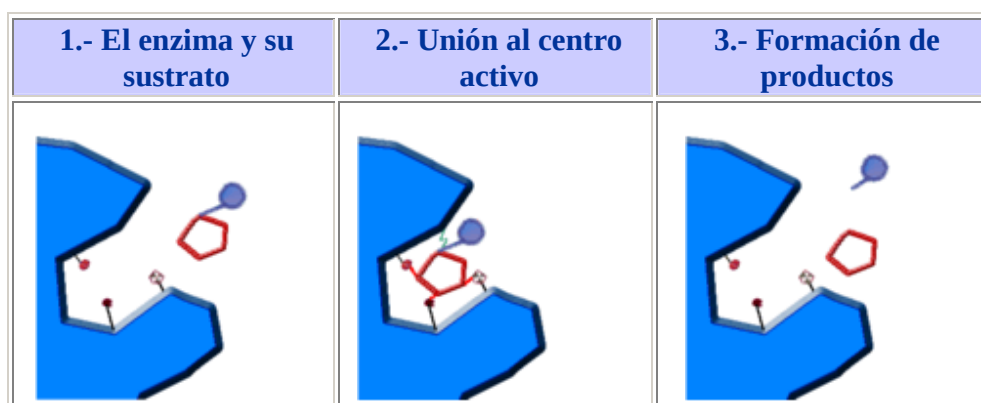


Figura 3. Ciclo de reacción enzimática (Web 6).

3.7.- Influencia de pH sobre las enzimas

Cada enzima sólo es catalíticamente activa en un intervalo restringido de pH debido a sus grupos químicos ionizables; según el pH del medio, estos grupos pueden tener carga eléctrica positiva, negativa o neutra.

Como la conformación de las proteínas depende, en parte, de sus cargas eléctricas, habrá un pH en el cual la conformación será la más adecuada para la actividad catalítica.

Este es el llamado pH óptimo. Cuando el sustrato es dissociable, la influencia del pH en su ionización es un factor importante en la velocidad de la reacción (Tonche 2005).

3.8.- Influencia de la temperatura sobre las enzimas

En general, los aumentos de temperatura aceleran las reacciones químicas: por cada 10°C de incremento, la velocidad de reacción se duplica. Las reacciones catalizadas por enzimas siguen esta ley general. Sin embargo, al ser proteínas, a partir de cierta temperatura, se empiezan a desnaturalizar por el calor. La temperatura a la cual la actividad catalítica es máxima se llama temperatura óptima. Por encima de esta temperatura, el aumento de velocidad de la reacción debido a la temperatura es contrarrestado por la pérdida de actividad catalítica debida a la desnaturalización térmica, y la actividad enzimática decrece rápidamente hasta anularse (Web 7).

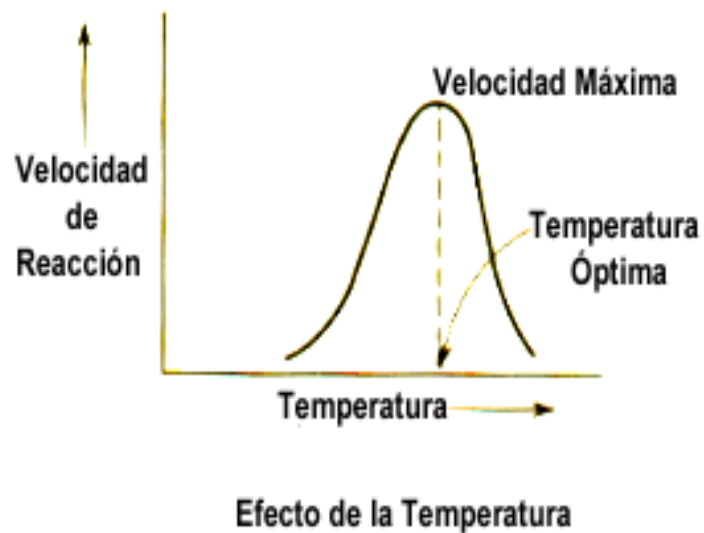


Figura 4. Efecto de la temperatura sobre las enzimas (Web 7).

3.9.- Hidrólisis de celulosa

La hidrólisis de la celulosa puede llevarse a cabo tanto por vía química, utilizando álcalis o ácidos, como por vía enzimática, siendo este tipo de proceso más atractivo, ya que no requiere condiciones tan extremas de pH y temperatura (Web 3).

La transformación de la celulosa por vía enzimática implica la acción de un sistema multienzimático; el complejo celulasas, constituido básicamente por tres enzimas; **Endoglucanasa**, que ataca al azar enlaces β -1,4-glicosídicos de la cadena de celulosa; **exoglucanasa**, que actúa sobre el extremo no reductor de la cadena dando lugar a unidades de celobiosa, y **β -glucosidasa**, que hidroliza específicamente celobiosa para dar lugar a glucosa (Web 3).

Una vez degradadas las zonas amorfas de la celulosa, tiene lugar la tercera etapa de la hidrólisis, en donde la región cristalina comienza a ser hidrolizada, como resultado de la acción sinérgica de la endoglucanasa y la exoglucanasa (Beldman 1988).

Finalmente, una etapa que limita la degradación de la celulosa es la hidrólisis de la celobiosa a glucosa mediante la acción de la β - 1, 4 glucosidasa; por que las glucanasas son inhibidas por la celobiosa (Lee 1997).

La hidrólisis de la celulosa está catalizada por la celulasa (proveniente. Por ejemplo, de *Trichoderma viride*), que es una mezcla compleja de varias enzimas con diversas actividades hidrolíticas, preparada mediante fermentación en fase semisólida o sumergida, utilizando soforosa como inductor.

El sistema enzimático celulasa de *Trichoderma viride* se ve estimulado por la soforosa e inhibido por la glucosa, siendo la actividad celobiasa inestable para valores de pH inferiores a 4.0. Esta enzima es importante en la producción de glucosa a partir de la hidrólisis de celulosa, ya que suprime la inhibición por el producto debido a la celobiosa (Wiseman, 1991).

Tabla 1. Enzimas involucradas en la hidrólisis enzimática de la celulosa (Belitz, 1992).

NOMBRE	SINÓNIMOS	REACCIÓN
Celulasa	Factor Cx Endo-1,4 – β –glucanasa	Endohidrólisis de enlaces 1,4 – β - D glucosídicos.
Celulasa 1,4 – β -celobiohidrolasa	Factor C1 Exo - 1,4 – β –glucanasa	Exohidrólisis de enlaces 1,4 – β - D glucosídicos con formación de celobiosa a partir de celulosa o glucooligosacáridos 1,4 – β . El ataque se produce por el extremo no reductor.
1, 4 - β - glucosidasa	Celobiasa	Hidrólisis de restos terminales de β -D glucosa en β -glucanos.

3.10.- Microorganismos productores de celulasas

Las enzimas celulasas son producidas por una variedad de bacterias y hongos aeróbicos o anaeróbicos, mesófilos o termófilos. Sin embargo, sólo algunos de ellos producen la enzima celulasa extracelular, capaz de hidrolizar la celulosa (Eriksson 1985).

De entre los microorganismos capaces de producir celulasas, los rendimientos que se obtienen utilizando hongos son superiores a los conseguidos con bacterias, por lo que la mayor parte de las investigaciones se centran en la producción de este complejo enzimático a partir de hongos, principalmente de las especies *Trichoderma*, *Aspergillus*, y *Streptomyces* (Web 3).

A partir de hongos aeróbicos, tales como: *trichoderma viride*, *Trichoderma reesei*, *Penicillium pinophilum*, *Sporotrichum pulverulentum*, *Fusarium salani*, *Talaromyces emersonii* y *Trichoderma koningii*, se han obtenido los complejos celulolíticos debido a que presentan un sistema enzimático completo de celulasas capaces de degradar parcial o totalmente la celulosa en celobiosa y glucosa (Eriksson 1985).

Otros microorganismos productores de celulasas incluyen a los hongos aeróbicos termofílicos (*Sporotrichum thermophile*, *Thermoascus aurantiacus* y *Humicola insolens*), los hongos anaeróbicos mesofílicos (*Neocallimastix frontales*, *Piromonas communis*, *Sphaeromonas communis*), las bacterias aeróbicas mesofílicas y termofílicas (*Cellulomonas sp*, *Cellvibrio sp*, *Microbispora bispora* y *Thermomonospora sp*) y las bacterias anaeróbicas mesofílicas y termofílicas (*Acetivibrio cellulolyticus*, *Bacteroides succinogenes*, *Ruminococcus albus*, *Ruminococcus flavefaciens* y *Clostridium thermocellum*).

Entre estos microorganismos, los termofílicos son de interés por su capacidad para producir enzimas celulolíticas termoestables, las cuales son en general estables bajo condiciones severas, incluso en niveles de pH altamente ácidos o alcalinos así como temperaturas hasta de 90°C.

Las enzimas celulolíticas producidas por las bacterias del genero *Bacillus* presentan básicamente actividad endo β - 1-4 glucanasa y exo β - 1-4 glucanasa. En particular, las enzimas producidas por *Bacillus subtilis* son resistentes a la inhibición por la celobiosa (Eriksson 1985).

3.11.- Celulosa en la naturaleza

3.11.1.- Distribución y obtención

La celulosa es el componente principal de las paredes de las células vegetales, donde se encuentran asociadas a hemicelulosas, pectina y lignina. Este polisacárido no es atacado por las enzimas del aparato digestivo del organismo humano y constituye por ello, junto con el resto de los polisacáridos llamados inertes la parte no digestible de los alimentos de origen vegetal denominada fibra bruta, de gran importancia como inductora del peristaltismo intestinal (Belitz, 1992).

3.11.2.- Utilización de la celulosa

La celulosa microcristalina se utiliza, entre otros productos, en alimentos calóricos, salsas para ensaladas, postres y helados. La hidratabilidad y dispersabilidad de la celulosa mejora sensiblemente por la adición de pequeñas cantidades de carboximetilcelulosa (Belitz, 1992).

3.12.- Fibra

Con este nombre se designa a un grupo muy amplio de polisacáridos, de los considerados estructurales, que no son aprovechados metabólicamente por los organismos monogástricos, incluyendo al hombre, pero que cumplen una función muy importante en el bienestar del individuo.

La fibra esta constituida por los componentes estructurales de las paredes celulares de los vegetales, entre los que se destacan la celulosa, hemicelulosa y las pectinas; también se incluyen en estos a la lignina, aún cuando ésta no es un hidrato de carbono, sino más bien una cadena de compuestos fenólicos como la vanillina, el aldehído siríngico y los alcoholes coniferílico, sinapílico y cumarílico. Su composición es muy variada en los distintos alimentos

La fibra cruda es normalmente menor a la dietética y esta última representa el contenido total de los polímeros antes indicados (Badui 1993).

3.13.- Lignina

Se caracteriza por ser un complejo aromático (no carbohidrato) del que existen muchos polímeros estructurales (ligninas). Resulta conveniente utilizar el término lignina en un sentido colectivo para señalar la fracción lignina de la fibra. Después de los polisacáridos, la lignina es el polímero orgánico más abundante en el mundo vegetal. Es importante destacar que es la única fibra no polisacárido que se conoce.

Este componente de la madera realiza múltiples funciones que son esenciales para la vida de las plantas. Por ejemplo, posee un importante papel en el transporte interno de agua, nutrientes y metabolitos. Proporciona rigidez a la pared celular y actúa como puente de unión entre las células de la madera, creando un material que es notablemente resistente.

La lignina es el polímero natural más complejo en relación a su estructura y heterogenicidad. Por esta razón no es posible describir una estructura definida de la lignina (Web 5)

3.14.- Métodos de extracción de complejos enzimáticos a gran escala

En los últimos años se ha hecho aún más clara la necesidad de asociar las técnicas de purificación de proteínas con la fermentación a gran escala, en el rango de miles de litros de producto, para purificar ciertas proteínas a partir de cultivos microbianos (Wiseman, 1991).

Las proteínas bacterianas pueden clasificarse en proteínas extracelulares y proteínas intracelulares, pudiendo ser las segundas a su vez ligadas o libres. La purificación de las proteínas intracelulares requiere de un proceso de ruptura de la célula, pero una vez que este se ha realizado, no existen diferencias fundamentales en los procedimientos de purificación de estos dos grupos de proteína, excepto en el caso de las proteínas extracelulares los volúmenes implicados son mucho menores. El término extracción se utiliza para definir los métodos de ruptura de los microorganismos (Wiseman, 1991).

3.14.1.- Extracción por métodos químicos

3.14.1.1.- Álcalis

Sometiendo las bacterias a un pH alcalino, entre 11 y 12.5 durante 20 minutos. El éxito del tratamiento alcalino depende de la estabilidad de la enzima en cuestión a un pH elevado. También se ha indicado que este método inactiva las proteasas que pudieran existir, a la vez que reduce la posibilidad de contaminación por pirógenos de las preparaciones de enzimas para usos terapéuticos. Tales métodos tienen posibles aplicaciones para la inactivación y lisis rápida de los microorganismos modificados por ingeniería genética (Wiseman, 1991).

3.14.1.2.- Lisozima y EDTA

La lisozima es una enzima producida comercialmente a partir de la clara de huevo de gallina que cataliza específicamente la hidrólisis de los enlaces beta 1-4 glicosídico de los mucopéptidos de las paredes de las células bacterianas.

En las bacterias Gram-negativas la ruptura de la pared celular rara vez se logra solo con la lisozima, sino que hace falta añadir necesariamente el EDTA para producir la liberación de lipopolisacáridos de la envoltura de la pared. Esta técnica rara vez se utiliza para la extracción a gran escala de las enzimas bacterianas, dando un costo elevado de la lisozima (Wiseman, 1991).

3.14.1.3.- Detergentes

Los detergentes pueden ser compuestos iónicos, por ejemplo el lauril sulfato sódico, aniónico, y el bromuro de cetildietilamonio etc. Estas condiciones de fuerza iónica baja y pH apropiado, los detergentes se combinan con las lipoproteínas formando micelas. Por lo tanto los constituyentes lipoproteicos de las membranas biológicas pueden solubilizarse o las membranas hacerse permeables.

Los detergentes iónicos son más reactivos que los no iónicos y pueden dar lugar a la disociación de las lipoproteínas, lo que a su vez produce posteriormente a la desnaturalización, precipitación y, ocasionalmente, a la hidrólisis de los enlaces peptídicos de las proteínas. Por esta razón los detergentes no son ideales para la extracción de enzimas.

3.14.1.4.- Shock por enfriamiento

El efecto del shock por enfriamiento (una reducción rápida de temperatura desde la normal de crecimiento a 0°C), indica que las bacterias Gram negativas son más sensibles a este proceso que las Gram positivas. Sin embargo, para la ruptura celular a gran escala, el shock por enfriamiento es una técnica difícil de emplear. Las dos limitaciones más importantes impuestas por este método son en primer lugar, que el choque frío un efecto muy pequeño o nulo en las suspensiones celulares.

3.14.1.5.- Shock osmótico

El shock osmótico se ha utilizado en la extracción de enzimas hidrolíticas y proteínas ligadoras a partir de bacterias Gram negativas. El método incluye el lavado de las bacterias con una solución amortiguadora, para liberarla por medio de cultivo y posteriormente su introducción en una solución amortiguadora de sacarosa al 20%, en la que se deja que las células alcancen el equilibrio, perdiendo parte de su agua interna, que se elimina de la suspensión por centrifugación. La parte de células obtenida se dispersa rápidamente en agua a unos 4°C aproximadamente.

El súbito aumento de la presión osmótica del interior de las células hace que se produzca la liberación de algunos constituyentes celulares (Wiseman, 1991).

3.14.2.- Extracción por métodos físicos

3.14.2.1.- Sonificación

El término ultrasonido se utiliza para designar a los sonidos con frecuencias situadas por encima del nivel del oído humano. Se ha observado que algunas bacterias son muy resistentes a la disrupción ultrasónica. La eficacia de tratamiento con ultrasonidos depende de varios parámetros medioambientales, como el pH, la temperatura, la fuerza iónica del medio de suspensión y el tiempo de exposición.

La aplicación para la disrupción de cantidades elevadas de bacterias se ve limitada por la dificultad de transmitir suficiente potencia a grandes volúmenes de suspensión.

3.14.2.2.- Congelación y descongelación

Los efectos de la congelación y descongelación de microorganismos son similares a los obtenidos con los shock por enfriamiento y osmótico. Además del enfriamiento rápido y de la concentración del soluto intra y extracelular, la formación de cristales de hielo intra y extracelular produce daño a las células. La eficacia de este método en la liberación de proteínas en general es limitada, ya que solo se libera del 10% de las proteínas solubles totales en la operación, e incluso en la de bacterias Gram- negativas; además puede dar lugar a pérdida de actividad enzimática.

3.14.2.3.- Cizalla sólida

La ruptura de las células se debe a las fuerzas de cizalla ejercidas al pasar la pasta a través del pequeño orificio, aunque también colaboran los cristales de hielo formados en la pasta congelada. La disrupción celular mediante cizalla sólida es un excelente método para obtener enzimas y preparaciones de paredes bacterianas.

3.14.2.4.- Cizalla líquida

En el sistema de cizalla líquida para la disrupción de cloroplastos, la suspensión se hace pasar a través de una válvula de aguja a presiones de hasta 137 MPa, con un flujo de hasta 10 ml/minuto. La temperatura de salida se mantiene en torno a 15 °C con CO₂ y el aparato tiene una capacidad de procesamiento de bacterias equivalente a 300 mg de proteína (Wiseman, 1991).

3.15.- Métodos de aislamiento y purificación de complejos enzimáticos a gran escala

3.15.1.- Separación de los ácidos nucleicos

La eliminación de ácidos nucleicos se basa en la precipitación, formando complejos entre los residuos fosfato con carga negativa de las moléculas de ácido nucleico y los grupos cargados positivamente del agente precipitante. El complejo resultante puede eliminarse mediante centrifugación.

3.15.2.- Concentración por precipitación

3.15.2.1.- Sulfato amónico. El método de salado de las proteínas tiene como objeto lograr el doble propósito de purificar y concentrar algunas proteínas específicas. La sal utilizada con más frecuencia es el sulfato amónico, por su gran solubilidad, ausencia de efectos perjudiciales para la mayoría de las enzimas, no es cara y en algunos casos, por su efecto estabilizante en ciertas enzimas.

3.15.2.2.- Solventes orgánicos. En presencia de solventes orgánicos, las temperaturas superiores a 4°C pueden dar lugar a la desnaturalización de las proteínas, por lo que es deseable trabajar a una temperatura inferior a 0°C, lo que es factible por la depresión del punto de congelación producida por los solventes orgánicos. Para precipitar las proteínas pueden utilizarse varios solventes orgánicos, como el metanol, etanol y 2-propanol, que son los más utilizados, aunque también se emplean la acetona o incluso el éter etílico. Estos últimos tienen la desventaja de ser inflamables (Wiseman, 1991).

3.15.3.- Concentración por ultra filtración

La ultra filtración puede considerarse como una de las técnicas de filtración, que incluyen la ósmosis inversa (peso molecular límite 250), ultra filtración (peso molecular entre 500 y 300.000), filtración de micro partículas y filtración de partículas.

El ultra filtro de difusión es en esencia una membrana de gel hidrófilo homogéneo a través de la cual los solventes y solutos son transportados por difusión molecular bajo la acción de un gradiente de concentración o de actividad. El transporte de una molécula requiere una cantidad de cinética considerable y es un proceso activado térmicamente.

3.15.4.- Concentración por liofilización

La liofilización se puede utilizar para la concentración de proteínas, su empleo es limitado, ya que a menos que la concentración de sal en la solución sea muy baja se pueden formar mezclas eutécticas, lo que daría lugar a un secado incompleto o a la formación de gran cantidad de espuma y desnaturalización de las proteínas. Estos problemas pueden evitarse controlando cuidadosamente la temperatura de la masa congelada para mantener una temperatura por debajo del más bajo de los puntos eutécticos. También puede ser necesario reducir la concentración de sal antes de la liofilización (Wiseman, 1991).

3.15.5.- Cromatografía en gel

El proceso de cromatografía en gel consiste en el reparto de las moléculas de soluto entre la fase móvil de solvente y la fase estacionaria, constituida por los espacios existentes entre las partículas porosas del gel. El mecanismo de esta técnica es más fácil de entender si se considera que el gel tiene una estructura porosa similar a la del pan.

La fase móvil es el líquido que circula por el exterior de las partículas del gel, y se conoce como volumen vacío, mientras que la fase estacionaria es el líquido que ocupa el interior de las partículas del gel. El soluto se distribuye por difusión entre la fase estacionaria y la móvil.

3.15.6.- Cromatografía de intercambio iónico

La cromatografía de intercambio iónico puede diferenciar entre los componentes de una mezcla poli electrolítica en base a la carga transportada por cada electrolito individual. Sin embargo, la carga neta, densidad de carga y tamaño molecular de la proteína así como el pH y la fuerza iónica de la solución son parámetros que influyen en el proceso.

Existen tres tipos de intercambiadores de iones, las resinas, las celulosas y los geles de agarosa y dextrano cambiadores de iones (Wiseman, 1991).

3.15.7.- Cromatografía de afinidad

La cromatografía de afinidad se basa en la interacción más o menos específica entre una proteína y un ligando inmovilizado, que está incluido en uno de estos dos grupos principales:

- a) Aquellos que sean específicos para la proteína deseada, en cuyo caso el ligando es generalmente un anticuerpo, un substrato o un inhibidor.
- b) Aquellos que interaccionan con varias proteínas, y que pueden ser específicos para las diferentes clases de enzimas, o que interaccionan con un amplio rango de proteínas tales como las cadenas hidrocarbonadas o algunos colorantes.

3.15.8.- Cromatografía de interacción hidrofóbica

Las interacciones hidrofóbicas son mayor cuanto mayor sea la fuerza iónica, por lo que la adsorción a la matriz hidrofóbica puede llevarse a cabo de una forma adecuada después de haber precipitado con sales o de haber realizado una cromatografía de intercambio iónico (Wiseman, 1991).

3.15.9.- Cromatografía líquida de alta eficacia

La alta eficacia de las columnas de HPLC se deriva del pequeño tamaño de sus partículas, cuyos diámetros oscilan entre 5 a 50 micrómetros, una décima parte de diámetro de las de los geles blandos clásicos. Este pequeño tamaño necesita presiones altas para obtener velocidades de flujo adecuadas, por lo que las partículas

deben de ser muy rígidas. Inicialmente se utilizaba sílice pero la superficie de sus partículas no interaccionan adecuadamente con las proteínas. El HPLC tiene un considerable potencial de aumento de escala, puesto que además de usar columnas más largas, la técnica de automatizarse fácilmente repitiendo la inyección de la muestra en la misma columna.

3.15.10.- Técnicas electroforéticas

La electroforesis se basa en la aceleración de las partículas cargadas en un campo eléctrico, a las que se opone la fricción debida al paso de las partículas a través del medio que las rodea, de modo que se mueven a una velocidad constante proporcional a su carga. El pH tiene un efecto dramático en la movilidad de las enzimas en un campo eléctrico.

La técnica de electro decantación con multimembranas consiste en la colocación de una proteína en una célula que tiene un cierto número de membranas semipermeables, ajustándose el pH de la solución hasta el punto isoelectrico de la proteína a purificar, y haciendo pasar la corriente a través de la solución mediante dos electrodos (Wiseman, 1991).

3.15.11.- Cromato enfoque

El cromatoenfoco es una forma de enfoque isoelectrico realizado en un lecho de resinas cambiadoras de iones especiales, llevando acabo la elusión con soluciones anfóteras. El cromatoenfoco combina el poder de resolución del enfoque isoelectrico

en combinación con la cromatografía, por lo que es muy adecuado para trabajar a gran escala.

3.15.12.- Separación en dos fases acuosas

Los sistemas en dos fases acuosas pueden formarse mezclando soluciones de polietilenglicol y dextrano o polietilenglicol y ciertas sales, especialmente sulfato amónico o fosfato potásico.

Las proteínas y los restos celulares se reparten entre las dos fases, de tal manera que su localización exacta de una proteína en particular depende de parámetros tales como su peso molecular, el pH y la fuerza iónica de la mezcla y la presencia de iones polivalentes.

Los sistemas en dos fases pueden aplicarse para eliminar eficazmente los restos de células de homogeneizados consiguiendo al mismo tiempo un cierto grado de purificación.

En algunos casos las dos fases pueden separarse en un tanque de sedimentación, aunque se puede conseguir una separación más rápida y eficaz mediante centrifugación (Wiseman, 1991).

3.16.- Enzimas aplicadas a los alimentos

La aplicación de enzimas en alimentación supone imitar procesos metabólicos limpios y naturales que permiten obtener alimentos sanos y de calidad.

Como ya se ha mencionado anteriormente las enzimas son proteínas con actividad biológica que catalizan reacciones bioquímicas en diferentes organismos.

A ellas debemos multitud de acciones metabólicas, desde la obtención de energía a la duplicación de las células. Estas proteínas se mantienen además inalterables durante mucho tiempo, lo que las hace especialmente interesantes para la tecnología y la seguridad de los alimentos. Al tiempo que las enzimas resultan esenciales para el metabolismo de todo ser vivo, pueden también utilizarse de forma independiente para activar reacciones químicas fuera de los organismos vivos.

Por este motivo, su uso se remonta miles de años atrás, tal y como muestra la función de los microorganismos en la producción de alimentos fermentados y de alimentos alcohólicos (Web 4).

Materiales y métodos

CAPÍTULO 4

El estudio se realizó utilizando diferentes tipos de sustratos de sotol: Sotol crudo, sotol cocido a presión durante 60 minutos, sotol cocido en horno de piedra (de forma artesanal por 3 días) y bagazo; con la aplicación de un complejo celulolítico comercial liofilizado llamado *celluviridina* obtenido del microorganismo *Trichoderma viride*, midiendo su actividad a diferentes temperaturas (40, 45, 50 y 55 °C), variando su pH (4.0, 4.5, 5.0 y 5.5), con 5 g de sustrato y 0.05 g de enzima a un tiempo de reacción de 1 hora en agitación.

Se tomó 1 ml de muestra y se hicieron diluciones 1:4 para el caso del sustrato crudo y bagazo y dilución 1:5 para sustratos cocido a presión y en hornos de piedra. Todos los experimentos se realizaron por duplicado. Los datos obtenidos se analizaron mediante el software de la facultad de agronomía de la UANL, utilizando un diseño tri factorial completamente al azar para la comparación de los resultados del incremento de azúcares reductores en función del cambio de temperatura, y de los cambios de pH, se realizó el análisis de variancia para conocer el grado de significancia de los resultados obtenidos.

Una vez establecidas las condiciones de pH y temperatura para cada sustrato se midió la actividad enzimática variando las concentraciones de enzima y de sustrato los cuales fueron analizados estadísticamente de igual manera.

Los resultados de la hidrólisis enzimática se determinaron en base a los contenidos de azúcares reductores obtenido mediante el método conocido como del ácido dinitrosalicílico (método DNS) y comparando siempre contra un blanco. (Miller 1959)



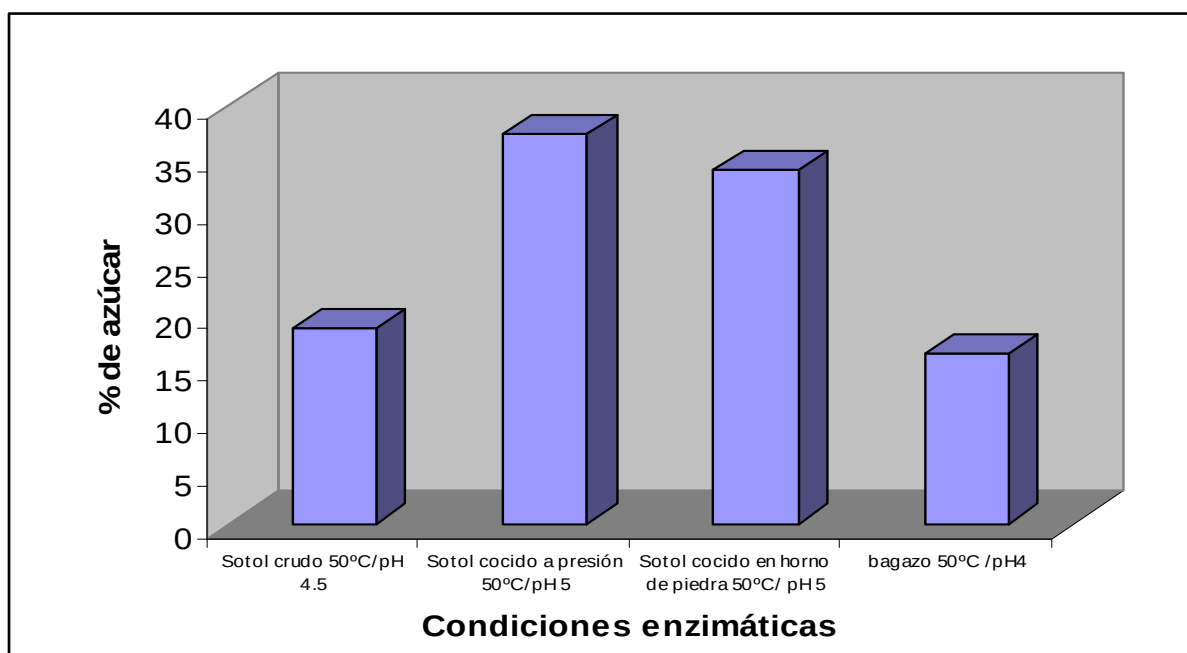
Figura 5. Esquema general de metodología

Resultados y discusión

CAPÍTULO 5

En el presente capítulo se muestran los resultados obtenidos después de realizar la estrategia experimental planteada en el capítulo de materiales y métodos para cumplir con los objetivos de la presente investigación.

En la gráfica 1 se muestra el efecto de la enzima celulolítica en el incremento de los azúcares reductores en sustratos de: sotol crudo, sotol cocido a presión, sotol cocido en hornos de piedra, y en bagazo a la temperatura y pH de mayor liberación durante la primera hora de hidrólisis, que fue el tiempo al cual se obtuvieron estos resultados.



Gráfica 1.- Incremento de azúcares reductores en diferentes sustratos de sotol tratados con el complejo *celluvidina* variando la temperatura y el pH.

De la utilización de diferentes sustratos de sotol se encontró de acuerdo al análisis de varianza (tabla 1) que existe diferencia significativa entre los rendimientos de los azúcares reductores obtenidos en sotoles cocidos a presión o en horno de piedra y de los rendimientos de sotol crudo o bagazo.

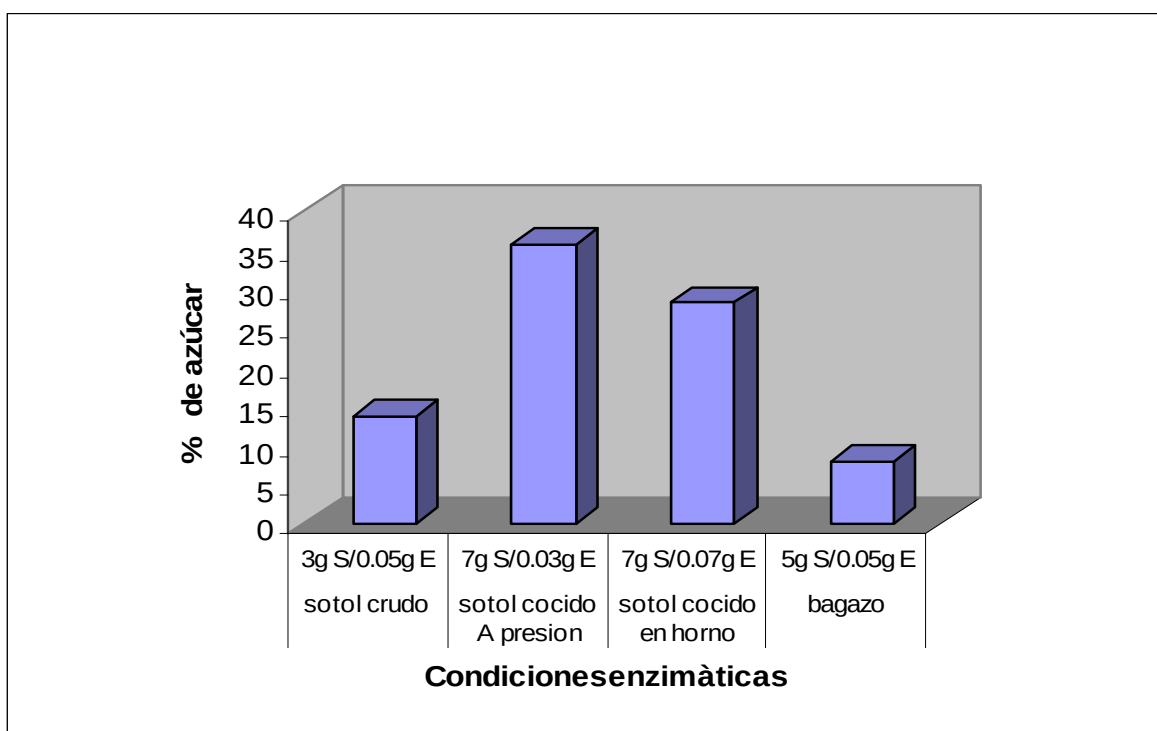
Tabla 2.- Análisis de varianza de producción de azúcar en diferentes sustratos de sotol variando temperatura y pH.

Análisis de varianza

FV	GL	SC	CM	F	P>F
TEMPERATURA	3	1752.707031	584.235657	3.8038	0.012
SUSTRATO	3	6726.984375	2242.328125	14.599	0.000
pH	3	425.363281	141.787766	0.9231	0.566
T x S	9	2251.503906	250.167099	1.6288	0.113
T x P	9	686.839844	76.315536	0.4969	0.875
S x P	9	562.578125	62.508682	0.407	0.929
T x S x P	27	1820.082031	67.410446	0.4389	0.992
ERROR	128	19660.066406	153.594269		
TOTAL	191	33886.125000			

Los resultados obtenidos, estadísticamente muestran en el análisis de varianza que los cambios de pH dentro de los rangos de 4.0 - 5.5 no afecta el tratamiento, sin embargo, la temperatura y el sustrato si afectan de manera significativa el comportamiento de la enzima utilizada.

En la gráfica 2 se muestra el efecto de la enzima celulolítica en el incremento de los azúcares reductores en sustratos de: sotol crudo, sotol cocido a presión, sotol cocido en hornos de piedra, y en bagazo a concentraciones de enzima y concentraciones de sustrato (sotoles) de mayor rendimiento de azúcares reductores, durante la primera hora de acción.



Gráfica 2.- Rendimientos de incremento por la actividad celulolítica de azúcares reductores obtenidos para cada sustrato variando la relación de enzima-sustrato.

Tabla 3.- Análisis de varianza de producción de azúcar en diferentes sustratos de sotol cambiando la concentración de la enzima y la concentración del sustrato.

Análisis de varianza

FV	GL	SC	CM	F	P>F
CONC. ENZ. (A)	2	4.780273	2.390137	0.4725	0.633
SUSTRATO (B)	3	2048.824219	682.941406	135.0047	0.000
CON. SUST. (C)	2	110.038086	55.019043	10.8762	0.000
A x B	6	595.162109	99.193687	19.6087	0.000
A x C	4	230.033203	57.508301	11.3683	0.000
B x C	6	1316.124023	219.354004	43.3622	0.000
A x B x C	12	425.706055	35.475506	7.0128	0.000
ERROR	36	182.111328	5.058648		
TOTAL	71	4912.779297			

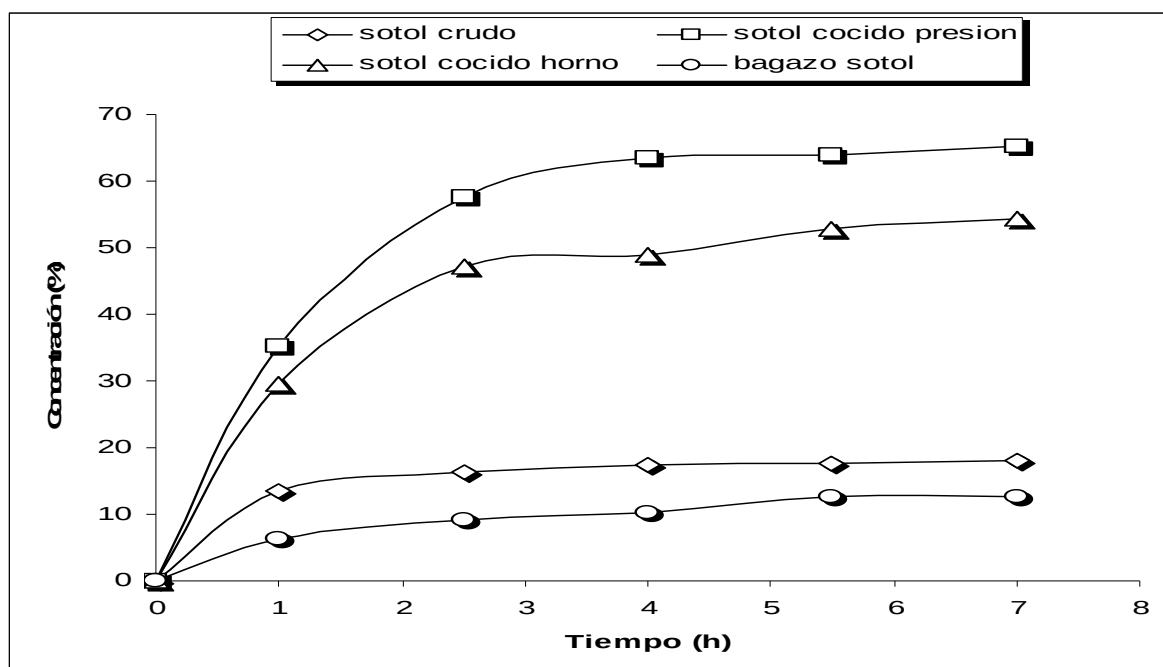
Los resultados obtenidos, de acuerdo al análisis de varianza como se muestra en la tabla 2, indican que la concentración de enzima (0.03, 0.05 Y .07 g) no afecta la producción de azúcar, pero el tipo de sustrato, concentración de sustrato y la combinación de los factores si influyen en los rendimientos obtenidos.

Los resultados obtenidos han sido comparados con los reportados por David R. Walt et. Al (2003), donde estableció un pH óptimo de 4.8 a 50°C, una dilución de 1:10 midiendo azúcares reductores por el mismo método utilizado en este trabajo (DNS), David R. Walt, utilizó de igual manera enzimas celulolíticas, pero como sustrato, diferentes tipos de papel, obteniendo un 3.6% de azúcares liberados enzimáticamente.

En 2005 García, A. M del P. evaluó la actividad enzimática en paja de cebada, estableciendo las condicione de la enzima en: pH de 4.6 a 5, tratado a 50°C, con una concentración de la enzima de 5 a 15 UPF/g, estos parámetros son muy similares a los establecidos en este trabajo por lo que se consideran resultados favorables.

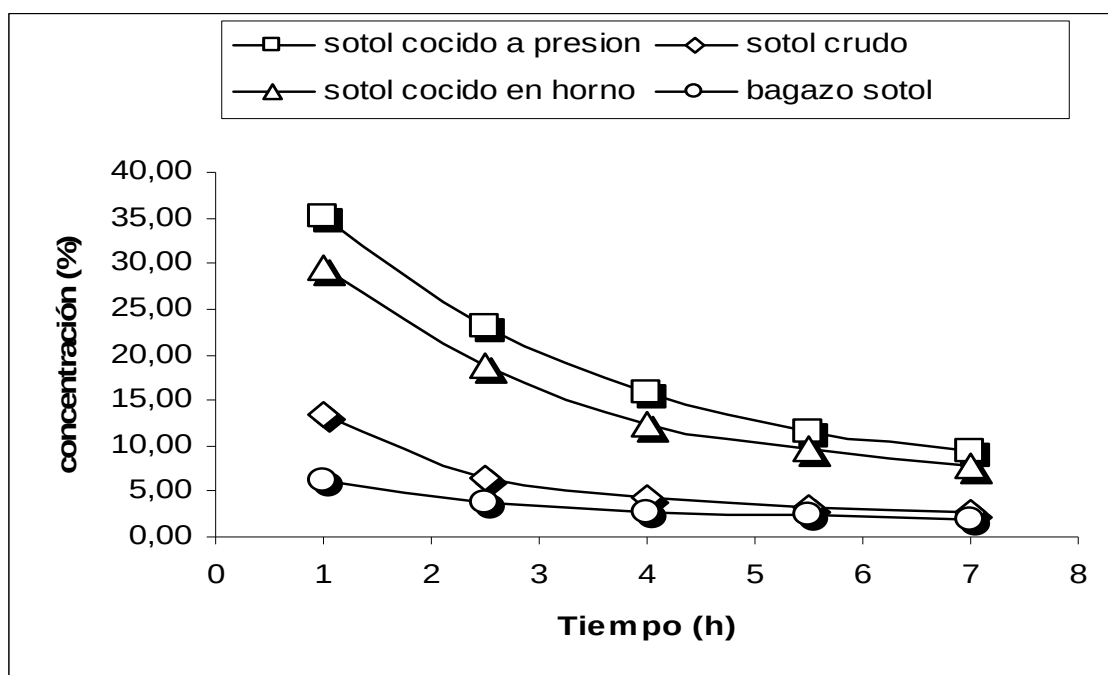
En la gráfica 3 se muestra el porcentaje de azúcares liberados por la acción enzimática durante un periodo de 7 horas de acción, en el cual se observa el mismo comportamiento a los experimentos anteriores; se presenta un mayor rendimiento de azúcares fermentables en sotol cocido a presión, seguido de sotol cocido en horno de piedra, manteniéndose en niveles inferiores el sotol crudo y bagazo.

En el análisis de esta gráfica se puede mencionar que el incremento de azúcares fermentables se reduce conforme transcurre el tiempo, dando un mayor rendimiento en tiempo y azúcar liberado a las 2.5 horas de acción. Este fenómeno asintótico en las curvas después de las cuatro horas posiblemente se debe a procesos de inhibición de la enzima.



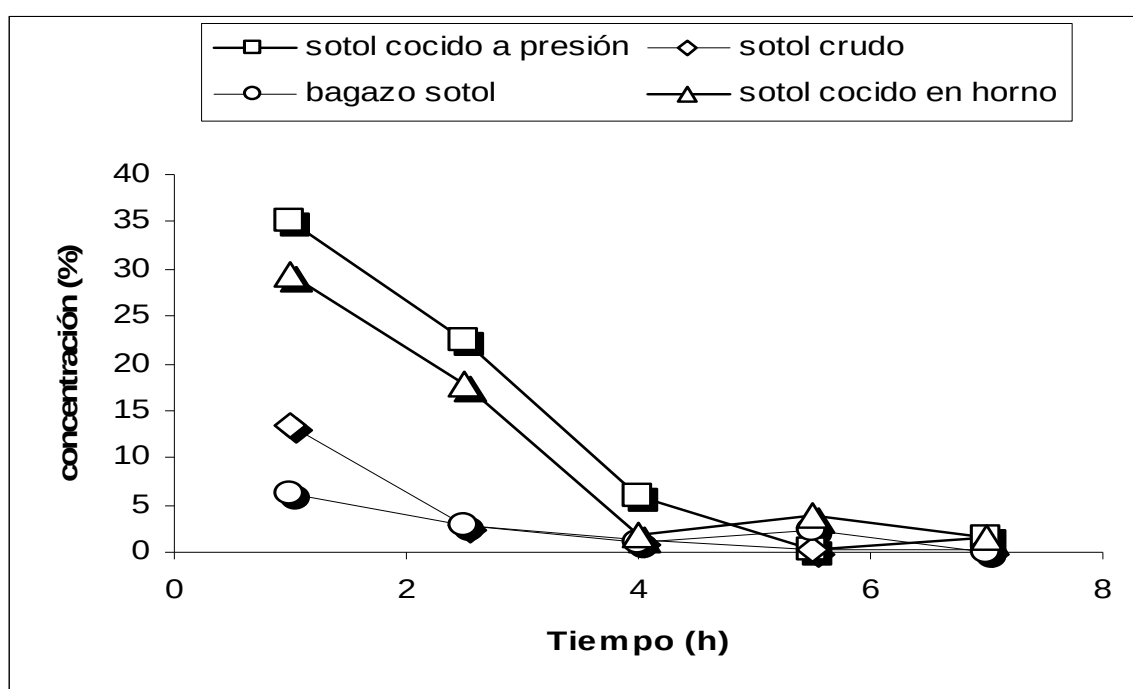
Gráfica 3.- Porcentaje de azúcares liberados por la acción enzimática durante 7 horas de tratamiento.

En la gráfica 4 se muestra la productividad en % de azúcar liberado por el tiempo de acción de la enzima; se observa un decremento de la productividad de la hidrólisis enzimática conforme transcurre el tiempo ya que la obtención de azúcares fermentables es cada vez menor después de 2.5 horas de acción.



Gráfica 4.- Productividad en % de azúcar liberado por tiempo de acción.

En la gráfica 5 se muestra el porcentaje de liberación de azúcares fermentables por la acción de la enzima celulolítica; donde muestra un decremento en la obtención de azúcar conforme pasa el tiempo, corroborando así el comportamiento de la enzima sobre el sustrato al igual que los resultados mostrados en las gráficas anteriores.



Gráfica 5.- Porcentaje de liberación de azúcares fermentables.

Tabla 4.- Reducción porcentual de elementos lignocelulósicos.

	REDUCCION % DE FIBRA	REDUCCION % DE LIGNINA	REDUCCION % DE CELULOSA
SOTOL CRUDO	0,8	25,9	3,5
SOTOL COCIDO A PRESION	14,7	56,9	10,4
SOTOL COCIDO EN HORNO DE PIEDRA	11,1	57,6	9,2
BAGAZO	5,5	3,7	8,5

En la tabla 4 se observa la reducción porcentual de fibra, lignina y celulosa después de haber sido sometidos todos los sustratos de sotol a tratamiento enzimático. Los resultados son bastante congruentes, ya que el comportamiento de la liberación de azúcares fermentables se muestra armoniosamente a lo largo de todos los experimentos realizados en este trabajo.

Conclusiones

CAPÍTULO 6

- Se aumentó la concentración de azúcares reductores en todos los sustratos de sotol, obteniendo mayor concentración de azúcar liberado en sotol cocido a presión (35.67 %), seguido de sotol cocido en horno de piedra (28.21%) y los menores rendimientos fueron para el sotol crudo (13.78 %) y para el bagazo (7.99 %).
- Se estableció el pH dentro de los rangos de 4.0 - 5.5 en el cual no se ve afectado el tratamiento. La temperatura recomendada para obtener un mejor rendimiento de azúcares reductores es de 50 °C, en los diferentes sustratos de sotol.
- Se concluyó que la concentración de enzima y de sustrato dentro de los rangos utilizados, no afecta en la hidrólisis enzimática.
- Se determinó que la mayor liberación de azúcares reductores en el uso de este complejo celulolítico aplicado a los diferentes sustratos de sotol es óptimo durante las primeras 2.5 horas de acción.
- Se cuantificó la reducción de elementos lignocelulósicos (fibra, lignina, celulosa) contenida al final del tratamiento enzimático, por lo que se concluye que el complejo enzimático no es puro, ya que actúa en otros compuestos diferentes a la celulosa.

- Por lo tanto, el grado de hidrólisis y la efectividad del proceso esta influida por las condiciones de reacción (pH, temperatura, concentración de la enzima, concentración del sustrato y el tiempo de reacción), por lo tanto, la optimización de las condiciones del proceso son necesarias; ya efectividad de la enzima dependerá de la naturaleza química del sustrato analizado.

Técnicas utilizadas**Azúcares reductores****Reactivos**

Reactivo DNS (3.5 dinitrosalicy Acid)

NaOH 2N 20ml aforado a 100

DNS (1 gramo X 100ml)

Tartrato de sodio y potasio 30 gramos

50ml de agua + 20 ml de NaOH + D.N.S y agitar hasta dilución. Ya que este disuelto poner 30gr de tartrato de sodio y potasio, ya disuelto se afora y se guarda en un frasco ámbar.

NaOH 2N – 4 gramos en 50ml de agua en un matraz de aforación de 50ml o pudiera ser 2 gr en 25ml.

Nota: se pone sulfito de sodio al 0.05% y fenol cuando se almacena por mucho tiempo y usar frasco ambar.

Procedimiento

Se coloca 0.5ml de la muestra, se adiciona 0.5 del reactivo D.N.S.

Poner el baño en ebullición por 5 minutos.

Sacar y poner el baño de hielo y agua por 2 minutos.

Pasado el tiempo poner 5ml de agua destilada a cada tubo, agitar en Bortex.

Leer a 540 nm

Curva. Con algún azúcar reductor (Dextrosa o Fructuosa)

Curva.

Rango de la curva de .2 a 1 g/L

Preparación de la solución madre:

0.1g de azúcar Fructuosa, disolver en 10ml para preparar:

Tubos	0	1	2	3	4	5
Solución madre	0	.1	.2	.3	.4	.5
Agua destilada	.5	.4	.3	.2	.1	0
DNS (3.5 dinitrosalicy Acid)	.5	.5	.5	.5	.5	.5

Millar, G.L (1959)

Determinación de lignina y celulosa

Reactivos

- a) KMnO_4 saturado. Disolver 50g de KMnO_4 /litro de agua. Colocar en frasco ámbar para proteger de la luz.
- b) Solución buffer de lignina, disolver 6g de $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ y 0.15g de AgNO_3 en 100ml de agua destilada. Combine esta mezcla con 500ml de ácido acético glacial y 5g de acetato de Potasio. Agregar 400ml de alcohol butílico terciario y mezclar la solución.
- c) Solución de KMnO_4 combinada. Antes de ser usada, combine, y a la vez mezcle la solución de KMnO_4 saturada con la solución buffer de lignina en la relación 2:1 por volumen. La porción no utilizada de esta mezcla puede mantenerse por una semana en refrigeración en ausencia de luz. Esta solución puede utilizarse si mantiene el color morado y está libre de precipitado.
- d) Solución desmineralizadora. Para cada litro de solución, disolver 50g de ácido oxálico deshidratado en 700 ml de alcohol etílico de 95%. Agregar 50 ml de HCl concentrado (12N) con 250ml de agua destilada y mezclar.
- e) Alcohol etílico al 80% - 845 ml de alcohol etílico al 95% y 155 ml de agua destilada.
- f) HBr grado reactivo.

Procedimiento

- a) El residuo de la determinación de ácido detergente (fibra) se utiliza (aplicando el peso original de la muestra).
 - b) Colocar los crisoles que contienen la fibra ácido – detergente en una bandeja de vidrio de poca profundidad que tenga una capa de 1cm de espesor de agua fría. La fibra dentro de los crisoles no se debe mojar.
 - c) Agregar a los crisoles aproximadamente 25ml de solución combinada de permanganato de potasio sin llenarlo demasiado. Con una varilla de vidrio en cada crisol remover la muestra deshaciendo los grumos y bañar todas las partículas que se adhieren a las paredes internas del crisol con la solución de KMnO_4 .
 - d) Dejar las crisoles 90 +/- 10 minutos a temperatura de 20 – 25°C agregando si fuera necesario, una cantidad adicional de la solución combinada de permanganato de potasio.
 - e) Colocar los crisoles en los matraces de filtración, filtrando toda la porción líquida. Colocar los crisoles en bandejas limpias de vidrio o porcelana y llenarlas hasta la mitad con la solución desmineralizadora, después de 5 minutos filtrar y se vuelve a llenar con solución anterior. Repita la adición de la solución anterior. Repita la adición de la solución desmineralizadora por tercera vez si se nota que el filtrado del segundo tratamiento esta café oscuro. Lavar además las paredes internas de los crisoles, el color de la fibra debe ser blanco. (tiempo 20 – 30 minutos).
 - f) Llene y lave el contenido de los crisoles con alcohol etílico al 80%; filtre y repita este lavado 2 veces. Lave y filtre las muestras 2 veces también con acetona.
-
1. Para obtener el contenido de lignina. Seque los crisoles durante la noche a 105°C de temperatura; luego déjese enfriar en un desecador y péselos. El contenido de lignina se calcula en base a la pérdida de peso original de la fibra obtenida por el método ácido – detergente.
 2. Para obtener el contenido de celulosa. Incinerar la muestra procedente de la determinación de lignina a 500°C durante 3 horas, enfriar en desecador y pesar. La pérdida de peso equivale al contenido de celulosa.

CALCULOS:

% DE LIGNINA= (peso de la fibra ácido detergente – peso de la fibra x KMnO_4) / peso de la muestra original seca. X 100

% DE CELULOSA= (Crisol + residuo de fibra x KMnO_4 (estufa) – crisol + ceniza (mufla) / peso de la muestra original seca X 100

Van Soest, P.J (1968)

Bibliografía

CAPÍTULO 8

BADUI Delgar Salvador (1993). Química de los alimentos, tercera edición, editorial Universid, México D.F. 117, 118 pp.

BELDMAN G, Voragen AGJ. Rombouts FM, Pinik W (1988). Synergism in cellulose hydrolysis by endoglucanases and exoglucanases purified from *Trichoderma viride*. Biotechnology and Bioengineering. Journal 31: 173-178.

BELITZ H.-D; Grosch. W (1992). Química de los Alimentos. Zaragoza España, 2ª edición editorial Acribia S.A. páginas consultadas: 351 – 352, 358.

BOGLER, D. J. (1994), Taxonomy and Phylogeny of Dasylirion (Nolinaceae), Dissertation, Unites Estates, Faculty of the Graduate School of the University of Texas. 583 p

DAVID R. Walt. (2003), applied biochemistry and biotechnology. “Automated filter paper assay for determination of cellulose activity. By humana press inc.

ERIKSON KE; Wood TM (1985). Biodegradation of cellulose: biosynthesis and biodegradation of wood components. Higuchi T (ed). Academic Press, New York. 469 – 503pp

GARCÍA, A. M del P. (2005). Sacarificación enzimática de paja de cebada. Departamento de Energía, División de Energías Renovables, Unidad de Biomasa. España.

LEE J. (1997). Biological conversion of lignocellulosic biomasa to etanol. Journal of Biotechnology. 56: 1-24

LÓPEZ, B. L. A. (2005). El sotol en Coahuila, potencialidades y limitaciones, En "bebidas y regiones, historia e impacto de la cultura etílica en México. Camilo Contreras Delgado, Isabel Ortega Ridaura, primera edición México DF, Editorial PyV, paginas consultadas: 63-83.

MILLER, G. L. (1959). Analysis chemist "use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducinf sugar". Paginas consultadas: 31, 426-428.

TONCHE, L. L. A (2005). Determinación del pH óptimo para la proteasa obtenida del cardo (*Cynara cardunculus* L), aplicable a la tecnología quesera. Tesis para obtener el titulo de ingeniero en ciencia y tecnología de alimentos, Buenavista Saltillo, Coahuila México. 12 pp.

VAN SOEST, P.J, and R.H. Wine. (1968). Determination of lignin and cellulose in acid- detergent fibre with permanganate J. Assoc. Official Anal. Chem 51:780.

WISEMAN, (1991). Manual de biotecnología de las enzimas. Ed. Acribia Zaragoza, España. Paginas consultadas: 7 – 39, 334 y 335.

Consultas Web

1. **(Web 1)**. Disponible en:

<http://www.ehu.es/biomoleculas/HC/SUGAR34.htm#c> 29/11/2006. 7:25 pm.

2. **(Web 2)**. Disponible en:

<http://es.wikipedia.org/wiki/Celulosa>. 29/11/06. 7:21pm

3. **(Web 3)**. Disponible en:

<http://www.uclm.es/profesorado/jvillasenor/esplingbioq/hidr%C3%B3lisis%20enzimatica.pdf>. 29/11/06. 8:11pm

4. **(Web 4)**. Disponible en:

<http://www.consumaseguridad.com/web/es/investigacion/2006/10/25/25461.php>

5. **(Web 5)**. Disponible en:

<http://es.wikipedia.org/wiki/Lignina> 29/11/2006 8:13pm

6. **(Web 6)**. Disponible en:

<http://www.ehu.es/biomoleculas/ENZ/ENZ1.htm> 2/12/2006 2:33pm

7. (Web 7). Disponible en:

<http://www.ehu.es/biomoleculas/ENZ/ENZ1.htm#t>

2/12/2006 2:44

8. (Web 8). Disponible en

<http://www.bioquimicaqui11601.ucv.cl/unidades/hdec/HdeC4.html>.