



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE CIENCIAS QUÍMICAS

**“OPTIMIZACIÓN DE LA HIDRÓLISIS PARA EL TRATAMIENTO
DE RESIDUOS LIGNOCELULÓSICOS CON ENZIMAS DE
Aspergillus niger”**

TRABAJO DE TITULACIÓN

Tipo: Proyecto de Investigación

**Presentado para optar por el grado académico de:
INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA AMBIENTAL**

AUTORA: OLIVO URBINA MYLENA ALEXANDRA

TUTOR: ING. BYRON DÍAZ MONROY, PhD.

Riobamba – Ecuador

2018

©2018, Mylena Alexandra Olivo Urbina.

Se autoriza la reproducción total o parcial, con fines académicos, por cualquier medio o procedimiento, incluyendo la cita bibliográfica del documento, siempre y cuando se reconozca el Derecho de Autor.

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE CIENCIAS QUÍMICAS

El Tribunal de Trabajo de Titulación certifica que: El trabajo de investigación: Tipo **“Optimización de la hidrólisis para el tratamiento de residuos lignocelulósicos con enzimas de *Aspergillus niger*”**, de responsabilidad de la señorita **MYLENA ALEXANDRA OLIVO URBINA**, ha sido minuciosamente revisado por los Miembros del Tribunal del trabajo de titulación, quedando autorizada su presentación.

FIRMA

FECHA

Dr. C. Byron Díaz

**DIRECTOR DE TRABAJO
DE TITULACIÓN**

Dr. Iván Ramos

MIEMBRO DEL TRIBUNAL

Yo, MYLENA ALEXANDRA OLIVO URBINA soy responsable de las ideas, doctrinas y resultados expuestos en este Trabajo de Titulación y el patrimonio intelectual del Trabajo de Titulación pertenece a la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

Mylena Alexandra Olivo Urbina.

DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD

Yo, Mylena Alexandra Olivo Urbina, declaro que el presente trabajo de titulación es de mi autoría y que los resultados del mismo son auténticos y originales. Los textos constantes en el documento que provienen de otra fuente están debidamente citados y referenciados.

Como autora, asumo la responsabilidad legal y académica del actual trabajo de titulación.

Riobamba, 23 de Mayo del 2018

Mylena Alexandra Olivo Urbina

Cédula de Identidad: 220038492-9

DEDICATORIA

A mis padres Carlos y Mercedes, que han sido un claro ejemplo de lucha y perseverancia, un verdadero ejemplo para mi formación personal y profesional.

A Luis Meneses, por ser un apoyo personal y espiritual en mi vida.

A mis hermanos, que han estado presentes cuando se han presentado momentos de dificultad.

A mi gordita Solangie Olivo que ha sido mi motivación para superarme.

Mylena

AGRADECIMIENTO

A mis padres les agradezco por todo su amor y apoyo que me han brindado a lo largo de mi carrera.

Al Dr. Byron Díaz, Dr. Iván Ramos, Ing. Nelson Zúñiga y al Ing. Camilo Haro; por su ayuda y asesoramiento durante la ejecución del presente estudio.

Mylena

ÍNDICE DE CONTENIDO

RESUMEN.....	xiv
SUMMARY.....	xv
INTRODUCCIÓN.....	1
OBJETIVOS.....	3
CAPÍTULO I	4
1. MARCO TEÓRICO REFERENCIAL.....	4
1.1. Antecedentes de la investigación.....	4
1.2. Marco Conceptual.....	5
1.2.1. Residuo	5
1.2.2. Biomasa	5
1.2.2.1. Biomasa Lignocelulósica.....	6
1.2.3. Residuos Vegetales	6
1.2.3.1. Composición de los residuos vegetales.....	6
1.2.4. Residuos vegetales en la dieta de los rumiantes	7
1.2.5. Importancia de la fibra en la alimentación del ganado	8
1.2.6. Rastrojo de maíz	8
1.2.7. Enzimas	9
1.2.8. Cinética enzimática	10
1.2.9. Actividad enzimática	11
1.2.10. Enzimas exógenas	12
1.2.11. Hidrólisis Enzimática	13
1.2.11.1. Hidrólisis enzimática de la celulosa.....	14
1.2.12. <i>Aspergillus niger</i>	15
CAPÍTULO II	16
2. METODOLOGÍA	16
2.1. Lugar de la Investigación	16
2.2. Hipótesis y especificación de las variables	16
2.2.1. Hipótesis	16
2.2.2. Variables	16
2.3. Tipo y diseño de la Investigación	16
2.4. Unidad de análisis	16
2.4.1. Población de Estudio	19
2.4.2. Tamaño de Muestra	19
2.4.3. Selección de la muestra	19

2.5.	Técnicas de Recolección de Datos	19
2.5.1.	Técnicas y Métodos	19
2.5.1.1.	Recolección, secado y traslado previo a la caracterización del Rastrojo de Maíz	19
2.5.1.2.	Caracterización físico-química inicial del rastrojo de maíz	19
2.5.1.3.	Pre-tratamiento de los residuos lignocelulósicos	20
2.5.1.4.	Preparación soluciones buffer pH 4,0; 4,8 y 5,6.....	22
2.5.1.5.	Hidrólisis enzimática	24
2.5.1.6.	Análisis de azúcares reductores	24
CAPÍTULO 3		26
3.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	26
3.1.	Análisis de resultados	26
3.1.1.	Caracterización del rastrojo de maíz	26
3.1.2.	Pre-tratamiento del rastrojo de maíz	27
3.1.3.	Hidrólisis enzimática	27
3.2.	Análisis estadístico	31
3.2.1.	Pruebas de efectos entre variables	31
3.2.2.	Análisis de varianza	32
3.2.3.	Análisis gráfico medias marginales estimadas de la concentración de azúcares reductores	35
CONCLUSIONES		40
RECOMENDACIONES		41
BIBLIOGRAFÍA		
ANEXOS		

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.1	Composición nutricional del rastrojo de maíz	9
Tabla 1.2	Esquema del experimento para la fase de pre tratamiento de los residuales lignocelulósicos evaluados	17
Tabla 2.2	Esquema del experimento para la fase de hidrólisis de los residuales lignocelulósicos evaluados	18
Tabla 3.2	Métodos utilizados para la caracterización del rastrojo de maíz	20
Tabla 1.3	Caracterización del rastrojo de maíz.....	26
Tabla 2.3	Porcentaje de reducción del rastrojo pre-tratado.....	27
Tabla 3.3	Resultados de la hidrólisis enzimática.....	28
Tabla 4.3	Pruebas de efectos entre variables	31
Tabla 5.3	ANOVA de los pre-tratamientos	32
Tabla 6.3	Medias de las concentraciones de azúcares reductores en relación con los pre-tratamientos.....	32
Tabla 7.3.	ANOVA de los tiempos de incubación	33
Tabla 8.3	Medias de las concentraciones en relación con los diferentes tiempos	33
Tabla 9.3	ANOVA de las temperaturas de secado	33
Tabla 10.3	Medias de las concentraciones en relación con las diferentes temperaturas	34
Tabla 11.3	ANOVA de los pH de los diferentes tratamientos	34
Tabla 12.3	Medias de las concentraciones en relación con los diferentes pH	34
Tabla 13.3	Condiciones óptimas para las hidrólisis enzimática	35

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1. Hidrólisis enzimática de la celulosa.....	14
Figura 1.2. Procedimiento para el Pre-tratamiento alcalino de los residuos lignocelulósicos....	21
Figura 2.2. Procedimiento para el pre-tratamiento ácido alcalino de los residuos lignocelulósicos	22
Figura 3.2. Preparación de solución tampón Citrato Fosfato a pH = 4.....	23
Figura 4.2. Preparación de solución tampón Citrato Fosfato a pH = 4,8.....	23
Figura 5.2. Preparación de solución tampón Citrato Fosfato a pH = 5,6.....	24

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1.1. Curva de avance de la reacción.....	11
Gráfico 2.1. Cinética enzimática.....	11
Gráfico 1.3. Concentraciones de azúcares reductores a pH=4.....	29
Gráfico 2.3. Concentraciones de azúcares reductores a pH=4,8.....	29
Gráfico 3.3. Concentraciones de azúcares reductores a pH=5,6.....	29
Gráfico 4.3 Medias marginales estimadas de concentración en relación a (pre-tratamientos vs tiempos)	35
Gráfico 5.3 Medias marginales estimadas de concentración en relación a (pre-tratamientos vs temperatura)	36
Gráfico 6.3 Medias marginales estimadas de concentración en relación a (pre-tratamientos vs pH)	36
Gráfico 7.3 Medias marginales estimadas de concentración en relación a (tiempos vs temperaturas).....	37
Gráfico 8.3 Medias marginales estimadas de concentración en relación a (tiempos vs pH)	38
Gráfico 9.3 Medias marginales estimadas de concentración en relación a (temperaturas vs pH).....	39

LISTA DE ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

U: unidades.

INEC: Instituto Nacional de Estadística y Censos.

INEN: Instituto Ecuatoriano de Normalización.

pH: Potencial de hidrógeno.

DNS: Di nitro-salicílico.

91/156/CEE: Directiva Comunidad Económica Europea.

OH: Grupo hidroxilo.

FDN: Fibra Insoluble en Detergente Neutro.

CNF: Los carbohidratos no fibrosos.

FDNef: Fibra Detergente Neutra Efectiva.

V_{max}: velocidad máxima.

[S]: Concentración de sustrato.

SI: Sistema Internacional de unidades.

Kat: Katal, (unidad de actividad enzimática).

Å: Ångström

INIAP: Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias.

MS: Materia seca.

MO: Materia orgánica.

PC: Proteína cruda

EE: Extracto etéreo.

FDA: Fibra Detergente Ácida.

NaOH: Hidróxido de Sodio.

µm: Micrómetro.

Na₂HPO₄: Fosfato monoácido de sodio.

rpm: Revoluciones por minuto.

mL: mililitro.

nm: nanómetro.

g: gramo.

°C: Grado centígrado.

h: hora.

RESUMEN

Este estudio tuvo como objeto optimizar el proceso de hidrólisis enzimática para la degradación de la celulosa presente en el rastrojo de maíz, mediante la utilización de enzimas del *Aspergillus niger*. Durante la primera fase de la experimentación, se seleccionaron y caracterizaron 500 g de rastrojo, determinándose la cantidad de materia seca, materia orgánica, cenizas, proteína cruda, extracto etéreo y contenido de lignina. Posteriormente se realizó el pre-secado y molienda del rastrojo de maíz, previo a los procesos de pre-tratamiento álcali y ácido - álcali efectuados, los mismos que fueron secados a diferentes temperaturas. Una vez finalizada la fase previa se procedió a realizar la hidrólisis enzimática en presencia de una solución de enzimas celulasas del *Aspergillus niger* que contienen 39,125 U a diferentes pH (4,0; 4,8 y 5,6), por un período de 24, 48 y 72 horas a 37 °C. Durante el período de incubación, se realizó la cuantificación de las concentraciones de azúcares reductores liberados durante la reacción en cada uno de los tratamientos mediante el método DNS. Finalmente se determinó que el rastrojo de maíz sin pre-tratamiento, secado a una temperatura de 60°C y sometido a una hidrólisis enzimática durante 72 horas a pH 4,8 (P1T4), presentó una mayor concentración de azúcares liberados, pudiendo utilizarse los residuos lignocelulósicos como posible fuente de carbohidratos para la producción de biocombustibles mediante procesos biotecnológicos y como sustrato en la alimentación del ganado. Es importante realizar nuevas pruebas experimentales donde sean considerados residuos pre-tratados bajo diferentes condiciones alcalinas, a fin de preservar la celulosa disponible sin que se generen pérdidas significativas, lo cual favorecería la liberación de azúcares reductores durante la hidrólisis enzimática.

PALABRAS CLAVE: < CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES > < BIOTECNOLOGÍA >, < HIDRÓLISIS >, < RESIDUOS LIGNOCELULÓSICOS >, < ENZIMAS DE *ASPERGILLUS NIGER* >, < BIOMASA >, < AZÚCARES REDUCTORES >.

ABSTRACT

The purpose of this study was to optimize the enzymatic hydrolysis process for the degradation of the cellulose present in corn stubble, by using enzymes from *Aspergillus niger*. During the first phase of the experimentation, 500 g of stubble were selected and characterized, determining the amount of dry matter, organic matter, ashes, crude protein, ethereal extract and lignin content. Subsequently, the pre-drying and milling of the corn stubble was carried out, prior to the alkali and acid-alkali pre-treatment processes carried out, which were dried at different temperatures. Once the previous phase was completed, enzymatic hydrolysis was carried out in the presence of a solution of cellulase enzymes of *Aspergillus niger* containing 39,125 U at different pH (4,0, 4,8 and 5,6), for a period of 24 hours, 48 and 72 hours at 37 ° C. During the incubation period, the quantification of the concentrations of reducing sugars released during the reaction in each of the treatments was carried out using the DNS method. Finally, it was determined that corn stubble without pre-treatment, dried at a temperature of 60 ° C and subjected to an enzymatic hydrolysis for 72 hours at pH 4.8 (P1T4), presented a higher concentration of sugars released, being able to use lignocellulosic residues as a possible source of carbohydrates for the production of biofuels through biotechnological processes and as a substrate in cattle feed. It is important to perform new experimental tests where they are considered pre-treated waste under different alkaline conditions, in order to preserve the available cellulose without generating significant losses, which would favor the release of reducing sugars during enzymatic hydrolysis

KEY WORDS: <EXACT AND NATURAL SCIENCES> <BIOTECHNOLOGY>, <HYDROLYSIS>, <LIGNOCELLULOSIC RESIDUES>, <ASPERGILLUS NIGER ENZYMES>, <BIOMASS>, <REDUCING SUGARS>.

INTRODUCCIÓN

Identificación del problema

El aumento de la población en nuestro país, ha generado un notable incremento en el consumo de alimentos, lo que está directamente relacionado con la producción de residuos lignocelulósicos derivados de las actividades antrópicas, además de una alta deforestación, y por consiguiente la expansión de la frontera agropecuaria, afectando considerablemente la calidad ambiental.

Actualmente en nuestro país, la generación de residuos lignocelulósicos post-cosecha provenientes de los cultivos de maíz, no son aprovechados en ninguna actividad productiva, originando problemas de almacenamiento de los mismos en la industria agropecuaria; lo cual incrementa el riesgo de flagelos y de expansión de la frontera agropecuaria, lo cual representa una pérdida significativa de energía presente al interior de estos residuos.

Frente a esta realidad, es indispensable que en nuestro país exista un adecuado manejo de los residuos agroindustriales; siendo necesaria la aplicación de alternativas viables que permitan aprovechar las propiedades de los residuos para la elaboración de productos tales como: balanceados, abonos, entre otros.

La composición química de los residuos lignocelulósicos, principalmente ricos en fibra, los hace poco digerible por el ganado; por lo que la aplicación de métodos hidrolíticos en presencia de enzimas, permiten incrementar la degradación, la accesibilidad y la digestibilidad de los residuos tratados, pudiendo ser estos aprovechables posteriormente como alimento para el ganado (García, n.d: p.16).

Justificación del proyecto

Según datos del último censo poblacional y de vivienda realizado por el INEC en el 2010, el Ecuador tuvo una Tasa de Crecimiento Anual del 1,95%; convirtiéndolo en uno de los países de América Latina con mayor crecimiento de la región y uno de los de mayor densidad poblacional. El consumo de alimentos de origen animal por parte de la población, convierte a la industria ganadera en una de las principales fuentes de generación de gases de efecto invernadero, además de la responsable de la alta tasa de deforestación y de la pérdida de suelos por efectos de la erosión.

Es conocido que la producción de ganado en los últimos años se ha venido incrementando de forma sustancial, debido principalmente al cambio de hábitos de consumo por parte de la población mundial, lo que genera un incremento de las superficies dedicadas a la producción de

pastos y que finalmente serán utilizados para alimentar al ganado. Ante esto, los costos de producción de carnes, lácteos y derivado tienden a sufrir considerables aumentos, que sumados a los graves impactos ambientales que dicha industria genera, lo convierte en un sector con un enorme potencial para el desarrollo de nuevas tecnologías orientadas a la producción de alimentos, y que a su vez los hagan rentables y amigables con el ambiente.

En la búsqueda de alternativas de follajes para el ganado, el aprovechamiento de residuos lignocelulósicos tratados con enzimas fibrolíticas hacen que la absorción de los nutrientes presentes en los mismos, sean asimilados de una manera apropiada por parte de los rumiantes, convirtiéndose en la base de un nuevo modelo de engorde de los mismos. (Mendoza, et al, 2008: p.75).

El presente estudio tuvo como finalidad optimizar la hidrólisis de residuos lignocelulósicos previamente tratados en medio ácido – alcalino, mediante la utilización de enzimas de *Aspergillus niger*. Los residuos lignocelulósicos tratados mediante la hidrólisis enzimática se convierten en una alternativa para el aprovechamiento de los azúcares de los residuos del maíz, pudiendo ser estos utilizados como alimento del ganado vacuno, lo que reduciría la necesidad de producción de forrajes y el impacto ambiental generado por la industria ganadera, beneficiando tanto a productores como a consumidores.

OBJETIVOS

Objetivo general:

Optimizar el proceso de hidrólisis para el tratamiento de residuos lignocelulósicos con enzimas de *Aspergillus niger*.

Objetivos específicos:

- 1) Caracterizar los residuales lignocelulósicos (rastrajo de maíz), como sustrato elegible para alimentación animal.
- 2) Determinar el efecto de la hidrólisis con enzimas derivadas de *Aspergillus niger*, sobre rastrojo de maíz previamente tratado en medio ácido – alcalino.
- 3) Determinar el método de pre-tratamiento, la temperatura, pH y tiempo óptimos para la hidrólisis de los residuos lignocelulósicos estudiados.

CAPÍTULO I

1. MARCO TEÓRICO REFERENCIAL.

1.1. Antecedentes de la investigación.

Durante los últimos años, el incremento del consumo de alimentos de origen animal ha provocado un deterioro de la calidad del suelo y de cuencas hidrográficas, además del incremento en las tasas de deforestación en diferentes lugares a nivel mundial, lo cual ha generado un sinnúmero de estudios que pretenden optimizar los residuos lignocelulósicos, proveniente de la agricultura, mediante el tratamiento con enzimas fibrolíticas; convirtiéndose en una alternativa al uso de pastos y follajes para la producción de alimentos de origen animal.

De acuerdo a investigaciones realizadas por (Albernas, et al.,2015: p.128), las reacciones de hidrólisis enzimática de la celulosa son catalizadas por las enzimas celulasas, las cuales son altamente específicas y que generan azúcares reductores como productos de la reacción. Según (Férrandez, et al.,2011: p.7), el análisis de azúcares reductores se lo realiza por diferentes metodologías, entre estas el método DNS (Dinitrosalicílico), que consiste en la cuantificación de los azúcares mediante espectrofotometría, indispensable en la industria alimenticia..

En la Universidad Juárez se logró establecer que la utilización de enzimas fibrolíticas mejora la digestibilidad de los follajes utilizados para el ganado; por lo que, la utilización de dichas enzimas, podrían ser aplicadas en el tratamiento de residuos lignocelulósicos de diferentes tipos de cultivo, pudiéndose obtener productos asimilables para los rumiantes. (Castro, et al.,2014: p.4).

Frente a lo citado anteriormente, y considerando los avances en el campo de la biotecnología, el aprovechamiento de residuos mediante la utilización de microorganismos o de enzimas derivadas de los mismos, permitirían reducir el impacto ambiental de diferentes actividades antrópicas, como es el caso de la deforestación y la erosión de los suelos, además de recuperar nutrientes y energía mediante procesos de fermentación, beneficiando tanto al sector agropecuario como también a los ciudadanos y al ambiente en general.

1.2. Marco Conceptual

1.2.1. Residuo

De acuerdo a Orjuela Yepes, (2013: p.73), un residuo es todo material (sólido, semisólido, líquido o contenedor de gases) descartado, y que no es sometido a ningún proceso de reciclado o de aprovechamiento. (Castellano. & Moreno, 2002: p.203), establecen que los residuos pueden ser reutilizados, pudiéndose obtener subproductos con un valor agregado.

Otra de las definiciones válidas viene dado por el Instituto Ecuatoriano de Normalización (INEN), donde se define que un residuo se lo considera como “cualquier objeto, material, sustancia o elemento sólido o semisólido, resultante del consumo o uso de un bien tanto en actividades domésticas, industriales, comerciales, institucionales o de servicios, que no tiene valor para quien lo genera, pero que es susceptible de aprovechamiento y transformación en un nuevo bien con un valor económico agregado” (NTE INEN 2841, 2014: p.2). Los residuos se clasifican en:

Residuos orgánicos. Residuos biodegradables provenientes de seres vivos, y que de manera natural se transforman en humus mediante procesos de compostaje.

Residuos sólidos. Residuos que se presentan en estado sólido.

Residuos Reciclables. Residuos que pueden ser aprovechados, como materia prima o energía en diferentes procesos, obteniéndose productos con un valor agregado.

Residuos No Reciclables. Son desechos que no pueden ser aprovechados para producir nuevos productos, no poseen valor energético, ni comercial.

Residuo no peligroso. Son desechos que no poseen características peligrosas, sin embargo, pueden ser aprovechados en diferentes procesos, transformándose en un nuevo producto que contenga un valor económico agregado.

Residuos especiales. Son residuos que pueden generar un impacto significativo tanto en el ambiente, como en la salud, debido principalmente al volumen de generación o al grado de dificultad que presentan para conseguir su degradación.

Residuo peligroso. Son residuos que pueden generar un daño, lesión o impacto tanto sobre el ambiente como en la salud de los seres vivos, los mismos que posterior a un proceso de tratamientos, pueden ser transformados en residuos especiales.

1.2.2. Biomasa

Según (Mateos Moreno. (2006), citado por (Abril; & Navarro, 2012: p.7), la biomasa es la materia orgánica renovable que se obtiene de los diferentes procesos metabólicos generados por los seres vivos, la misma que puede ser viva o muerta. De acuerdo a su clasificación de acuerdo a su origen podemos citar la Biomasa Microbiana, Animal, Vegetal y Residual, donde la de mayor

generación a nivel de los procesos antrópicos es la Biomasa Vegetal, constituida principalmente por almidones, azúcares, grasas, proteínas, entre otros.

1.2.2.1. Biomasa Lignocelulósica

Es aquella biomasa producida por vegetales, y que estará constituida principalmente por celulosas, hemicelulosas y lignina, excluyéndose proteínas, almidones y azúcares, producidas por las plantas y que pueden encontrarse bajo forma de granos, cereales, entre otros. En términos globales, se la considera como la materia orgánica con mayor abundancia en el planeta, por lo que se convierte en una fuente importante de carbono orgánico presentes en los cultivos, restos de cosechas, bosques, restos de la industria de la madera y papel, entre otras. (Abril; & Navarro, 2012: p.7).

La utilización de la biomasa lignocelulósica en la actualidad, es prioritario para contrarrestar los potenciales efectos del calentamiento global, puesto que podría servir como alimento para animales o como fuente energética para la producción de biocombustibles mediante procesos fermentativos.

1.2.3. Residuos Vegetales.

De acuerdo a la directiva 91/156/CEE, citada en Suárez Estrella, (2002: p.12), los residuos vegetales son considerados desechos de tipo Biodegradables, es decir todo aquello que pueda degradarse sea en forma aerobia o anaerobia. Proviene principalmente de actividades agrícolas y forestales, pudiendo ser también de origen urbano, industrial y ganadero. De acuerdo a Ortíz, (1998), citado en Suárez Estrella, (2002: p.12) los residuos vegetales están compuestos por celulosa y lignina; por lo que su reutilización y eliminación se convierte en un problema ambiental, debido a la acumulación y a los volúmenes que se generan en las distintas actividades antrópicas. (Suárez Estrella, 2002: p.12).

1.2.3.1. Composición de los residuos vegetales.

Los residuos producidos por los vegetales presentan una serie de compuestos, los mismos que pueden clasificarse en fibras, azúcares, proteínas, entre otras. Cada componente presenta ciertas características estructurales que vienen descritas a continuación:

- a. Fibra. Según Martínez, (2006), citado por (Imba & Tallana, 2011: p.16), la fibra abarca los elementos estructurales de los tejidos vegetales, la misma que se encuentra constituida de celulosa, hemicelulosa y lignina, fundamentales en la estructura de las plantas. Son

polisacáridos no almidonosos y forman parte de las paredes celulares en los tejidos vegetales. Su función principal es ser el tejido de sostén en las plantas.

- b. Lignina. La lignina es un compuesto fenólico que se encuentra enlazado con la celulosa, la cual brinda rigidez estructural a los tejidos vegetales. Es un compuesto con baja digestibilidad, debido a la presencia de grupos fenólicos que se encuentra asociados a la celulosa, y conforme la planta madura, el contenido de lignina tiende a incrementarse, lo cual genera un endurecimiento de la estructura y una disminución de su degradabilidad; a todo esto se lo conoce como la lignificación.
- c. Hidratos de carbono. Soriano (2011: p.119) menciona que los hidratos de carbono son compuestos orgánicos polihidroxialdehídos o polihidroxicetonas que contienen en su estructura una función aldehído o cetona, además de grupos hidroxilados (OH) ligados a los carbonos presentes en las estructuras. Los hidratos de carbono son compuestos indispensables en la dieta de los organismos heterótrofos, debido que inciden en el normal desarrollo de los procesos metabólicos, siendo de fácil degradación y convirtiéndose en una fuente energética para los diferentes seres vivos.

1.2.4. Residuos vegetales en la dieta de los rumiantes.

De acuerdo a su composición, los residuos vegetales se convierten en una potencial fuente de energía y de nutrientes para los diferentes seres vivos, siendo una alternativa económica y ambiental frente al incremento de follajes destinados para la alimentación del ganado, donde tanto los hidratos de carbono, fibras, proteínas y minerales presentes en los residuos, pueden ser aprovechables en la industria ganadera.

Los hidratos de carbono son indispensables en la dieta de los rumiantes, debido que representa el componente más importante para su alimentación, particularmente en las vacas lecheras (Palladino, et al.,2006: p.82), pudiéndose clasificar en dos tipos:

- a. Hidratos de carbono fibrosos: Son carbohidratos ligados a estructuras complejas como por ejemplo la celulosa, hemicelulosa y lignina, las mismas que pueden ser digeridos únicamente en el rumen. Su cuantificación se lo realiza mediante la determinación de la Fibra Insoluble en Detergente Neutro (FDN), donde la concentración de Lignina, Celulosa y hemicelulosa determinan la calidad de FDN, debido que la lignina no es digerible en relación a la celulosa y la hemicelulosa que sí lo son, siendo la primera más degradable que en relación a la hemicelulosa.

- b. Hidratos de carbono no fibrosos: Son considerados como una fuente de energía muy significativa, pueden presentarse bajo forma de azúcares solubles o almidones, por lo que su degradabilidad ruminal y el sitio de digestión pueden variar. Los carbohidratos no fibrosos (CNF), aportan el 50 % del total de los carbohidratos totales y la diferencia corresponde a la FDN, siendo esta más digestible que la antes mencionada. Los CNF incluyen tanto carbohidratos que pueden ser digeridos directamente por los animales como aquellos que únicamente pueden ser degradados en el rumen. (Danelón, 2001: p.1).

1.2.5. Importancia de la fibra en la alimentación del ganado.

La fibra está compuesta principalmente por celulosa, hemicelulosa y lignina, lo cual contribuye con un óptimo funcionamiento del rumen, mejorando así el estado de salud del ganado; todo esto debido a que una pequeña cantidad de fibra estimula la salivación y la rumia en los bovinos.

En general, la alimentación del ganado debe garantizar la incorporación de ciertos nutrientes como es el caso de la FDN, la misma que estará compuesta por la Fibra Efectiva (FDNef), que no es más que aquella con capacidad suficiente para estimular la rumia y la salivación; donde por ejemplo, el heno picado contiene menor cantidad de FDNef a diferencia del heno sin picar, lo cual genera una diferenciación a la hora de suministrar en el ganado.

El aporte mínimo de fibra que garantiza una adecuada nutrición del ganado, estará basado en la cantidad de FDNef a suministrar, por lo que la composición química (contenido de celulosa, hemicelulosa, lignina y FDN), la forma y el tamaño de las partículas, inciden en la disponibilidad de esta, lo cual repercute en una mayor absorción de nutrientes durante la nutrición del ganado.

1.2.6. Rastrojo de maíz

El rastrojo o residuo de cosecha del maíz es el desecho generado posterior a la extracción del maíz (espigas, hojas, tallos, y brácteas de la mazorca), el mismo que presenta concentraciones de carbono orgánico representativas. (Reyes et al.,2013: p.1). La biomasa residual producida por las plantaciones de maíz bordean las 20 a 35 toneladas por hectárea de cultivo; del cual, únicamente la mazorca de maíz es utilizada como alimento para la población.

La estructura leñosa de la planta (caña, hojas y rastrojos) no es aprovechada por parte del ser humano, convirtiéndose así en un residuo lignocelulósico con alto poder energético. Los residuos del maíz presentan características físico-químicas que difieren de cada una de sus partes, debido a su fisiología y anatomía, donde la concentración de lignina como de proteínas se distribuirán

de forma heterogénea a lo largo de planta, pudiendo existir una mayor concentración de lignina y menor contenido de proteína bruta en los tallos que en relación a la mazorca. (Basaure, 2006: p.1).

Tabla 1.1. Composición nutricional del rastrojo de maíz.

Composición nutricional	Unidad	Cantidad
*MATERIA SECA	%	85,00
*ENERGÍA DIGESTIBLE	Mcal.kg ⁻¹	2,15
*ENERGÍA METABOLIZABLE	Mcal.kg ⁻¹	1,75
*PROTEÍNA (TCO)	%	5,40
*CALCIO (TCO)	%	0,47
*FÓSFORO TOTAL (TCO)	%	0,07
*GRASA (TCO)	%	1,10
*FIBRA (TCO)	%	29,50
*CENIZA (TCO)	%	6,10
**CENIZA	%	10,06
**LIGNINA	%	18,59
**CELULOSA	%	37,69

Fuente: * Gélvez, 2016. (Mundo Pecuario). ** Prinsen 2009. (Composición de algunos cultivos lignocelulósicos de interés industrial).

En un estudio realizado por Prinsen (2009), se establecen valores referenciales de la composición típica de los residuos del rastrojo de maíz, (véase tabla 1.1), en el que se establece una importante concentración de proteínas, materia orgánica y de celulosa, que se ve evidenciada por la cantidad de energía digerible y metabolizable, pudiéndose optimizar en diferentes procesos biotecnológicos tales como producción de biocombustibles y utilización como alimento. (Prinsen, 2009: p.3).

1.2.7. Enzimas

Son proteínas específicas (Castillo et al., 2005: p.298), de origen biológico, (Morales, 2008: p.2), cuya función es la de catalizar reacciones que se desarrollan al interior de un organismo, pudiéndose producir al interior de los mismos con la finalidad de acelerar el desarrollo de reacciones metabólicas. La ausencia o la disminución de una enzima reduciría la velocidad de reacción o las inhibiría, provocando alteraciones metabólicas en un determinado organismo. (Castillo et al., 2005: p.298).

Entre las principales funciones que realizan las enzimas en la célula tenemos:

- a. Participación en el reconocimiento y transmisión de señales provenientes del exterior, Síntesis de grasas y aminoácidos,
- b. Degradación de azúcares y macromoléculas

- c. Replicación de la información genética,
- d. Degradación de metabolitos tóxicos para la célula, entre otras. (Ramírez & Ayala, 2014: p.1).

En la actualidad, los adelantos efectuados a nivel de la ingeniería enzimática, ha permitido desarrollar e implementar nuevas aplicaciones en diferentes sectores tales como el farmacéutico, alimenticio, ambiental, entre otros. El uso de enzimas en la fabricación de alimentos, presenta una serie de ventajas de tipo productiva y económico, donde en pequeñas concentraciones durante los procesos de fermentación, contribuyen a la mejora de productos, como el vino, quesos, pan, entre otros. La producción de enzimas a gran escala tiene su principal aplicación en procesos fermentativos. (Morales, 2008: p.4).

1.2.8. Cinética enzimática

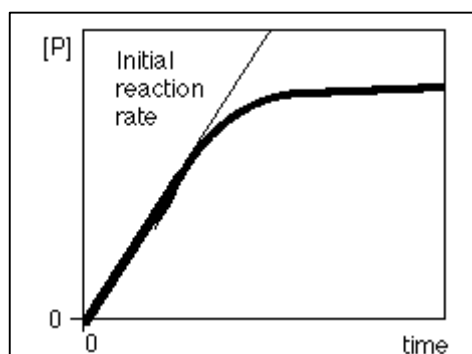
La cinética enzimática se encarga del estudio de la velocidad de reacción en la que participan enzimas como catalizadoras de las mismas, brindando además información sobre el mecanismo de la reacción y la especificidad de la enzima. Existen una serie de factores que inciden en el normal desarrollo de una reacción catalizada por una enzima, donde el pH, la temperatura, la presencia de cofactores, las concentraciones de sustrato, entre otros, inciden en la velocidad de la reacción.

Para el establecimiento de las condiciones óptimas de funcionamiento de una enzima se requiere analizar tanto la velocidad máxima de reacción (V_{max}) que esta presenta como a su vez las condiciones en las que se produce dicha respuesta. La aparición de o los productos deseados, como la disminución de las concentraciones de los sustratos utilizados, son analizados para calcular la velocidad máxima de la reacción, misma que permitiría alcanzar una mayor degradación de reactivos o la generación de un producto deseado. (González, n.d: p.1).

1.2.8.1 Curva de avance de la reacción o cinética de la reacción

La velocidad de acumulación de una reacción enzimática está condicionada por la ecuación de Michaelis-Menten, que se incrementa en función de la cantidad de sustrato disponible y disminuye conforme se vaya consumiendo el sustrato durante la reacción. Véase gráfico 1.1.

Gráfico 1.1. Curva de avance de la reacción

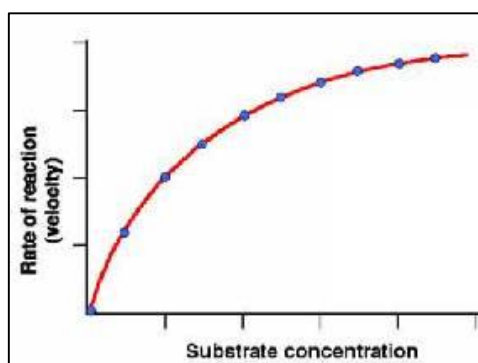


Fuente: González, n.d. (Biomoléculas).

Cuando una reacción enzimática se lleva a cabo, se determina la velocidad inicial que es igual a la pendiente de la curva de avance a tiempo cero, calculándose cuando el sustrato se haya consumido en un máximo del 10%, por lo que la concentración de sustrato puede considerarse como constante a lo largo de la experimentación.

En la cinética enzimática, la relación concentración de sustrato - velocidad de reacción, se da a una cantidad constante de enzima. Cuando la concentración inicial de sustrato es pequeña, la velocidad inicial es directamente proporcional a la $[S]$, y por tanto, la reacción será de primer orden. Si la concentración de sustrato es elevada, la enzima se encuentra en un medio saturado por el sustrato, por lo que la velocidad no dependerá de la $[S]$, lo que incide en que la reacción tenga un orden cero y la velocidad sea máxima (V_{max}). Véase gráfico 2.1.(González, n.d: p.1) .

Gráfico 2.1. Cinética enzimática



Fuente: González, n.d. (Biomoléculas).

1.2.9. Actividad enzimática

De acuerdo al Sistema Internacional de unidades (SI), la unidad de actividad enzimática se define como la cantidad de enzima que transforma 1 mol de sustrato por segundo. La unidad utilizada para dicha actividad es el katal (kat) que es equivalente a 60×10^6 Unidades de actividad

enzimática (U). Al ser una unidad demasiado grande, con frecuencia se utilizan submúltiplos de la misma. (González Mañas, n.d: p.1).

Las enzimas pueden actuar sobre los sustratos de dos maneras: la primera es fijándose al sustrato mediante enlaces fuertes (covalentes), debilitando sus enlaces y reduciendo la cantidad de energía para romperlos; y la segunda atrayendo a las sustancias reaccionantes hacia su superficie, incrementando la probabilidad de encuentro y por ende favoreciendo a que la reacción se lleva a cabo fácilmente.

Durante la reacción enzimática, las enzimas se unen a los sustratos catalizando la reacción. A medida que se desarrolla la misma, las enzimas se liberan con rapidez a fin de repetir el proceso con nuevas moléculas, lo cual permite que el sustrato se vaya consumiendo y generando el producto deseado. (Morales, 2008: p.3).

1.2.10. Enzimas exógenas

Son enzimas ajenas a un determinado organismo, que incide de forma favorable sobre la producción de un determinado producto a nivel industrial. Una de las principales aplicaciones de este tipo de enzima es la utilización como agregado en el alimento del ganado vacuno, lo cual incrementa la asimilación de nutrientes presentes en los follajes, logrando incrementar la productividad, disminuyendo además los costos en los sistemas de producción de rumiantes. (Rojo et al., 2007: p.173).

Las enzimas exógenas adicionadas al alimento del ganado, trae consigo una serie de beneficios tanto a nivel alimentario como a nivel del rumen, incrementando la asimilación del alimento por parte de los rumiantes debido a la liberación de los carbohidratos solubles en el medio, y eliminando barreras estructurales que limitan la digestión microbiana ruminal del alimento. Las enzimas exógenas dentro del rumen actúan sea de forma directa sobre los alimentos consumidos, como de forma indirecta con la estimulación de la actividad digestiva, generando procesos sinérgicos con los microorganismos del rumen.

Otra de las ventajas de la utilización de enzimas exógenas, es la permanencia que puedan tener al interior del intestino delgado, permaneciendo activas durante la digestión mejorando la digestibilidad y la asimilación de nutrientes, lo que permite reducir la viscosidad del quimo.

Las enzimas exógenas son aplicadas en procesos de degradación in-vitro de la materia seca, fibra y residuos orgánicos en la industria ganadera, debido que incide en una mejora de la digestibilidad

de la fibra y logrando además mejorar la calidad e incrementar la producción de la leche de vaca (Avellaneda, 2003: p.13).

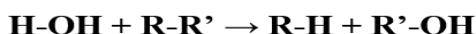
Las enzimas exógenas son una alternativa para disminuir los costos de alimentación del ganado; debido que con uso, se consigue disminuir la cantidad de granos destinados para la alimentación de las reses. Las enzimas inciden positivamente sobre los sustratos fibrosos, puesto que aportarían con una mayor cantidad de energía, debido a la mejora que experimentaría la fibra dietaria durante la degradabilidad ruminal y a la liberación de azúcares reductores. (Rojo et al., 2007: p.2).

Uno de los tipos de enzimas utilizadas como aditivos en el alimento de rumiantes son las enzimas fibrolíticas, las mismas que incrementa la colonización microbiana en las paredes de las células, también incrementa la hidrólisis, esto se debe a la actividad de las enzimas o a la simbiosis con las enzimas del rumen y aumenta la producción de la cantidad de bacterias ruminales. (Avellaneda, 2003: p.16).

Las enzimas celulasas favorecen la hidrólisis de la celulosa, estas son en parte responsables de la descomposición de la hojarasca, (Paz, 2006: p.43) las cuales desempeñan un rol importante en la degradación de paredes celulares en las plantas. (Jiménez & Merchant, 2003: p.566). Las enzimas hemicelulasas favorecen la hidrólisis de la hemicelulosa, que se encuentra unida a la pectina y a la lignina, estos son parte de la pared celular de los residuos vegetales. (Jáuregui & Chávez, 2006: p.113).

1.2.11. Hidrólisis Enzimática.

Según Wahlstrom, (2014) citado por Oyola, (2017: p22), la hidrólisis enzimática es un proceso en el cual se produce la ruptura de enlaces de un determinado compuesto orgánico por efecto de un grupo de enzimas llamadas hidrolasas y por el agua. La hidrólisis enzimática se produce de la siguiente forma:



Durante la hidrólisis enzimática, un grupo de enzimas denominadas péptido-hidrolasas, actúan sobre las moléculas generando una ruptura de los enlaces y desplazando al grupo deseado al agua.

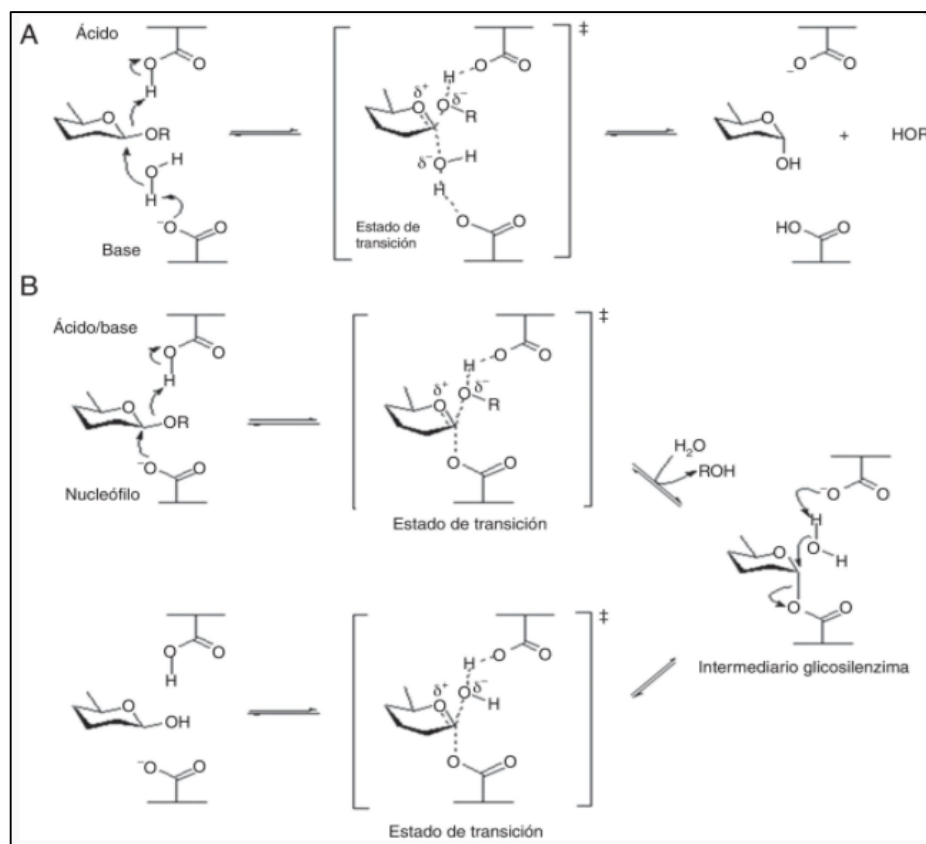
1.2.11.1. Hidrólisis enzimática de la celulosa

Las enzimas encargadas de la hidrólisis de la celulosa se denominan celulasas, pertenecientes a las glicosil-hidrolasas, encargada de la catálisis de los enlaces glucosídicos presentes entre 2 o más hidratos de carbono.

Este tipo de enzimas presenta dos módulos globulares independientes, el uno responsable de la hidrólisis; y el otro responsable de la unión con la celulosa. Entre las funciones principales tenemos la de mantener la enzima próxima al sustrato, lograr el reconocimiento con el sustrato, y por último, la disrupción de la estructura. Existen dos mecanismos para la hidrólisis con dichas enzimas, la de conservación y de inversión de la configuración del carbono anomérico.

La hidrólisis del enlace glucosídico es catalizada por dos aminoácidos presentes en el sitio catalítico, donde el primero actúa como un ácido general encargado de la donación de protones, mientras el segundo como un nucleófilo/base. Dependiendo de la posición espacial de estos aminoácidos, la hidrólisis se produce cuando se encuentran a una distancia entre 5.5Å y 10Å. Durante la hidrólisis por conservación, la degradación de la celulosa empieza por un proceso de glucosilación para posteriormente generar la deglucosilación, obteniéndose de esta forma el producto hidrolizado. Por otro lado, en el mecanismo de inversión, la hidrólisis se realiza en una sola etapa, donde se genera la incorporación de la molécula de agua entre la base y el azúcar. Véase figura 1.1. (Gutiérrez et al., 2015: p.2).

Figura 1.1. Hidrólisis enzimática de la celulosa



Fuente: Gutiérrez et al, 2015. (Mecanismos y regulación de la hidrólisis enzimática de celulosa en hongos filamentosos: Casos clásicos y nuevos modelos).

1.2.12. Aspergillus niger

El *Aspergillus niger* es un hongo filamentoso saprofita, perteneciente al filo Ascomycota. Se encuentra formado por hifas hialinas septadas y puede tener reproducción sexual y asexual. Estos hongos son productores de micotoxinas que se producen durante el proceso de degradación de la materia orgánica, que actúan como mecanismo de defensa frente a competidores.(INSH, 2012: p.5).

(Martínez & Ocampo, 1988: p.45), menciona que *Aspergillus niger* no se lo considera como un hongo común, puesto que coloniza productos que se encuentran en fase una avanzada fase de descomposición. La colonización se lleva a cabo cuando la humedad de los productos a colonizar, se encuentra comprendida entre el 90 y el 95 %. Es muy usado en la industria de fermentación puesto que es utilizado en la producción de amilasas, ácido cítrico y de enzimas, puesto que no producen toxinas.

CAPÍTULO II

2. METODOLOGÍA

2.1. Lugar de la Investigación.

La presente investigación se realizó en la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, en los laboratorios de Biotecnología Animal de la Facultad de Ciencias Pecuarias y de Investigaciones de la Facultad de Ciencias.

2.2. Hipótesis y especificación de las variables.

2.2.1. Hipótesis.

Los residuos lignocelulósicos provenientes del rastrojo de maíz, tratados mediante hidrólisis enzimática, presentan una mayor concentración de azúcares reductores.

2.2.2. Variables.

- **Variable independiente:** Tipo de pre-tratamiento (Sin pre-tratamiento, pre-tratamiento alcali y pre-tratamiento ácido-álcali), temperatura de secado, pH y tiempo de incubación.
- **Variable dependiente:** concentración de azúcares reductores.

2.3. Tipo y diseño de la Investigación

El presente estudio es de tipo Correlacional experimental, debido que se realizaron ensayos en laboratorio para optimizar la hidrólisis del rastrojo de maíz pre-tratado, con enzimas celulasas del *Aspergillus niger*. Para determinar los resultados de la hidrólisis, se cuantificó el contenido de azúcares reductores posterior al proceso de hidrólisis.

Durante la experimentación se realizó un diseño factorial (pH y tiempo), en el que el primer factor fue el pH del medio y el segundo factor el tiempo de hidrólisis, teniendo como variable respuesta la concentración de azúcares reductores. Con los resultados obtenidos se establecieron las condiciones en las que se puede optimizar el proceso hidrolítico del rastrojo de maíz.

2.4 Unidad de análisis

Las unidades de análisis fueron conformadas por rastrojo de maíz seco sin y con pre-tratamiento (Alcalino y ácido-alcalino) y soluciones buffer de diferente pH (4,0; 4,8; 5,6), a los cuales se adicionó una misma cantidad de enzima celulasa que degradaron la celulosa presente en los residuos.

Para la determinación del mejor tratamiento se cuantificaron las concentraciones de azúcares reductores en cada una de las unidades experimentales con sus respectivas réplicas, realizándose el muestreo respectivo a las 24, 48 y 72 horas de iniciado el tratamiento hidrolítico, tal como se muestra en las tablas 1.2 y 2.2.

Tabla 1.2. Esquema del experimento para la fase de pre tratamiento de los residuales lignocelulósicos evaluados.

PRETRATAMIENTO	TEMPERATURA (°C)	CÓDIGO	REPETICIONES
SIN PRETRATAMIENTO	45	P1T1	3
	50	P1T2	3
	55	P1T3	3
	60	P1T4	3
PRETRATAMIENTO ÁLCALI	45	P2T1	3
	50	P2T2	3
	55	P2T3	3
	60	P2T4	3
PRETRATAMIENTO ÁCIDO- ÁLCALI	45	P3T1	3
	50	P3T2	3
	55	P3T3	3
	60	P3T4	3
TOTAL			36

Realizado por: Mylena Olivo, 2018

Tabla 2.2 Esquema del experimento para la fase de hidrólisis de los residuales lignocelulósicos evaluados.

PRE-TRATAMIENTOS	REPETICIONES	pH	TIEMPOS DE INCUBACIÓN (h)		
			24	48	72
P1T1	3	4			
		4,8			
		5,6			
P1T2	3	4			
		4,8			
		5,6			
P1T3	3	4			
		4,8			
		5,6			
P1T4	3	4			
		4,8			
		5,6			
P2T1	3	4			
		4,8			
		5,6			
P2T2	3	4			
		4,8			
		5,6			
P2T3	3	4			
		4,8			
		5,6			
P2T4	3	4			
		4,8			
		5,6			
P3T1	3	4			
		4,8			
		5,6			
P3T2	3	4			
		4,8			
		5,6			
P3T3	3	4			
		4,8			
		5,6			
P3T4	3	4			
		4,8			
		5,6			

Realizado por: Mylena Olivo, 2018.

2.4.1. Población de Estudio

La población de estudio considerada fue el rastrojo de maíz, mismo que es utilizado como sustrato de las diferentes unidades experimentales que fueron sometidas a la hidrólisis enzimática. El rastrojo de maíz fue obtenido de diferentes productores del mercado “La Esperanza”, ubicado en la ciudad de Riobamba.

2.4.2. Tamaño de Muestra

La muestra considerada fue de 2500 g del rastrojo de maíz, los cuales fueron secados a temperatura ambiente y a la sombra previa a la caracterización y al pre-tratamiento e hidrólisis. Con la muestra pre-tratada y sin pre-tratar se conformaron las unidades experimentales a diferentes pH (4,0; 4,8; 5,6), las mismas que fueron incubadas por 24, 48 y 72 horas. La experimentación fue replicada por tres ocasiones.

2.4.3. Selección de la muestra

Las muestras fueron seleccionadas al azar a partir de la población (rastrojo de maíz) para los análisis de caracterización, luego, para la evaluación del efecto de los tratamientos, es decir, para medir la producción de azúcares reductores, las muestras fueron tomadas directamente de los procesos de hidrólisis, utilizándose un muestreo dirigido.

2.5. Técnicas de Recolección de Datos

2.5.1. Técnicas y Métodos

2.5.1.1. Recolección, secado y traslado previo a la caracterización del Rastrojo de Maíz.

La muestra utilizada para la presente investigación se la obtuvo de diferentes productores de la ciudad de Riobamba, habiéndose recolectado un total de 2,5 kilogramos. Los residuos fueron divididos en dos partes: la primera de 500 gramos que fue empaquetada y trasladada hacia el laboratorio de Servicio de Análisis e Investigación en Alimentos del Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias (INIAP), ubicado en la Estación Santa Catalina en la ciudad de Quito, para la caracterización físico-química inicial; mientras que la segunda parte fue utilizada en los ensayos posteriores. El rastrojo de maíz fue secado a temperatura ambiente y a la sombra, previo al envío y posterior utilización durante la segunda fase de la experimentación.

2.5.1.2. Caracterización físico-química inicial del rastrojo de maíz.

Al iniciar con la experimentación se realizó la caracterización inicial del rastrojo de maíz, a fin de conocer las características físicas y químicas que presenta dicho residuo previo al proceso de hidrólisis, analizándose el contenido de materia seca (MS), materia orgánica (MO), cenizas, proteína cruda (PC), extracto etéreo (EE) y contenido de lignina. La caracterización fue realizada

en el laboratorio de Servicio de Análisis e Investigación en Alimentos del INIAP, de acuerdo a los siguientes métodos:

Tabla 3.2 Métodos utilizados para la caracterización del rastrojo de maíz.

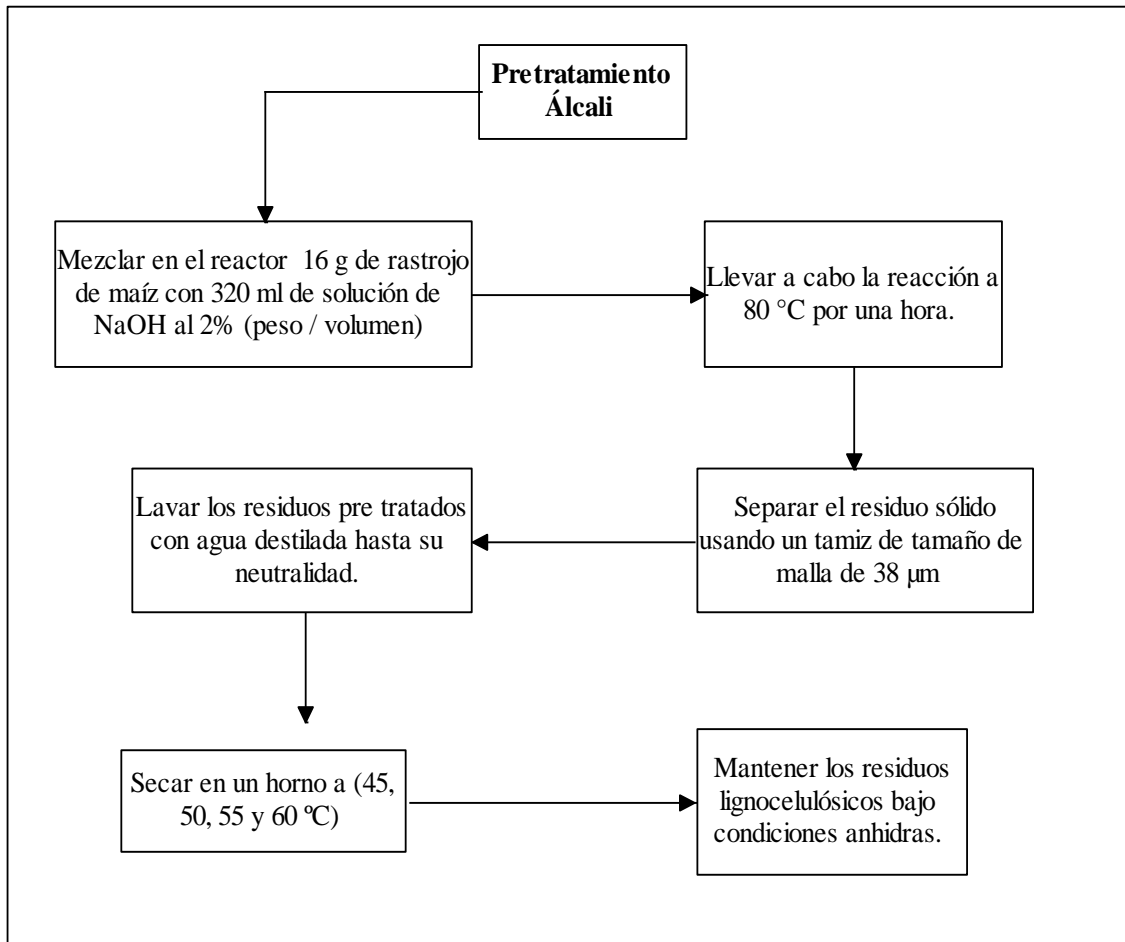
Parámetros	Método	Método de referencia
Materia seca	MO-LSAIA-01.01	U. FLORIDA 1970
Materia orgánica	MO-LSAIA-01.02	U. FLORIDA 1970
Cenizas	MO-LSAIA-01.02	U. FLORIDA 1970
Proteína cruda	MO-LSAIA-01.04	U. FLORIDA 1970
Extracto etéreo	MO-LSAIA-01.03	U. FLORIDA 1970
Humedad	MO-LSAIA-01.01	U. FLORIDA 1970
Lignina	MO-LSAIA-02.03	U. FLORIDA 1970
FDA	MO-LSAIA-02.02	U. FLORIDA 1970

Fuente: Laboratorio de servicio de análisis e investigación en alimentos. (INIAP).

2.5.1.3. Pre-tratamiento de los residuos lignocelulósicos

- a) **Pre-tratamiento alcalino.-** Para realizar el pre tratamiento álcali se procedió a mezclar en un reactor con capacidad de 1 Litro, 16 g (en peso seco) del rastrojo de maíz previamente triturado, luego del cual se adicionaron 320 ml de una solución de NaOH al 2% (peso/volumen) para someterle a un proceso de digestión alcalina a una temperatura de 80 °C durante una hora. Posteriormente el residuo se filtró usando un tamiz con malla de 38 µm, y se procedió a lavar con agua destilada hasta obtener un pH neutro de la solución de lavado. A continuación se secó el sustrato pre-tratado en una estufa a una temperatura de 45, 50, 55 y 60 °C respectivamente. Una vez secado, el sustrato se colocó dentro de un desecador para su conservación en condiciones anhidras. (Lee et al., 2015: pp.296-301).

Figura 1.2. Procedimiento para el Pre-tratamiento alcalino de los residuos lignocelulósicos.

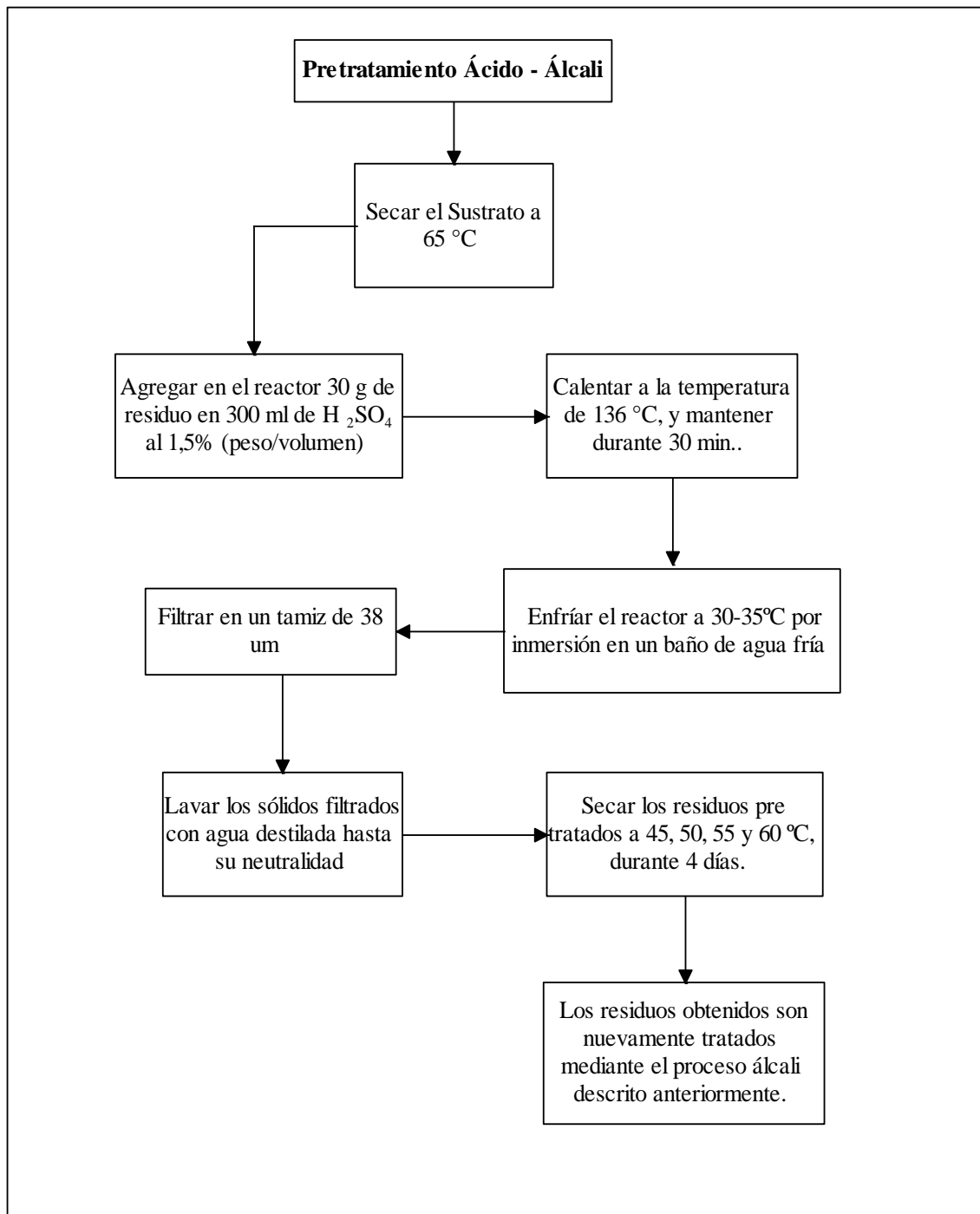


Fuente: Lee et al., 2015. (Sequential dilute acid and alkali pretreatment of corn stover: sugar recovery efficiency and structural characterization).

Realizado por: Mylena Olivo Urbina

- b) **Pre-tratamiento ácido alcalino de los residuos lignocelulósicos.**- Para realizar el pre-tratamiento ácido - álcali se procedió a colocar dentro de un reactor con capacidad de 1 Litro, 30 g de rastrojo de maíz previamente triturado y 300 mL de una solución de ácido sulfúrico al 1,5% (peso/volumen). La mezcla preparada se calentó a una temperatura de 136 °C durante 30 min. Transcurrido el tiempo de reacción, el reactor se lo enfrió a una temperatura de 30-35°C aproximadamente en un baño de agua fría (García, et al., 2014). La solución pre-tratada se cuela a través de un filtro grado GF/C de 0,45 µm donde los sólidos son retenidos y posteriormente lavados con agua destilada hasta alcanzar el pH neutro, Los sólidos filtrados se lavan con agua desionizada hasta que la solución de lavado alcance un pH neutro. Finalmente los sólidos obtenidos fueron secados a una temperatura de 50°C durante 4 días, una vez seco se procedió a efectuar el pre tratamiento alcalino descrito anteriormente. (García et al., 2014, pp.148-153).

Figura 2.2. Procedimiento para el pre-tratamiento ácido alcalino de los residuos lignocelulósicos.



Fuente: García et al., 2014, (Dilute sulphuric acid pretreatment and enzymatic hydrolysis of *Jatropha curcas* fruit shells for ethanol production).

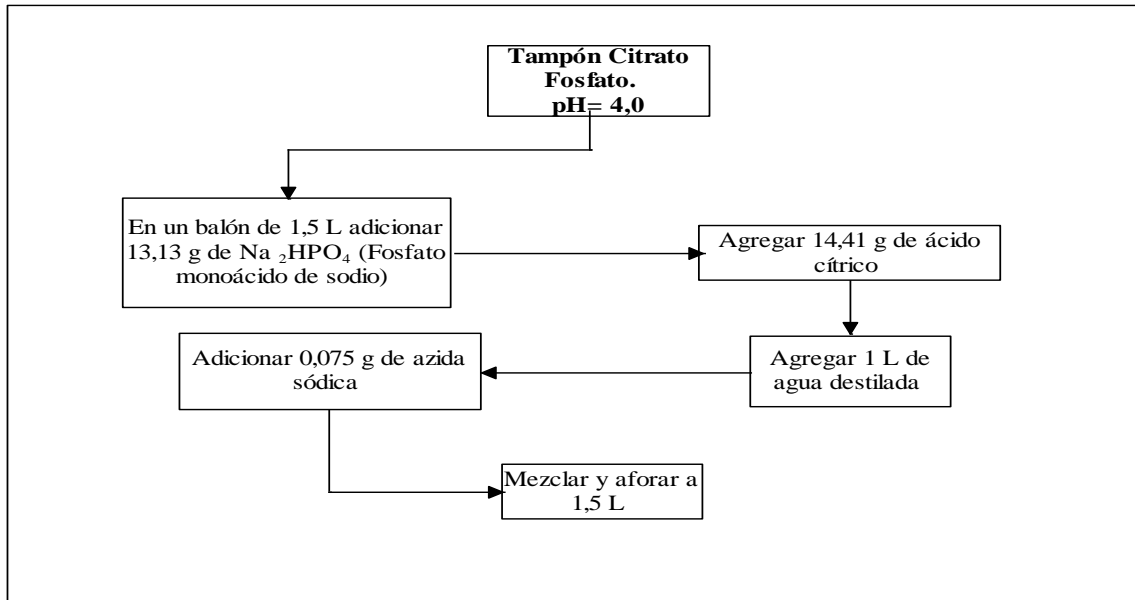
Realizado por: Mylena Olivo Urbina, 2018.

2.5.1.4. Preparación soluciones buffer pH 4,0; 4,8; y 5,6

Para la hidrólisis de los residuos pre-tratados fueron necesarios preparar soluciones buffer de Citrato-Fosfato de concentración de 50 mM, necesarios para la solubilización de las enzimas previo al proceso de degradación de la celulosa en la hidrólisis del rastrojo de maíz. Las soluciones

de diferentes pH (4,0; 4,8; y 5,6) se calcularon mediante el software Buffer Market. Una vez preparadas las mismas, se adicionó azida sódica a una concentración del 0,005% (p / v), con la finalidad de inhibir el crecimiento de microorganismos durante la hidrólisis (Resch et al, 2015: p.4), tal como se indican a continuación:

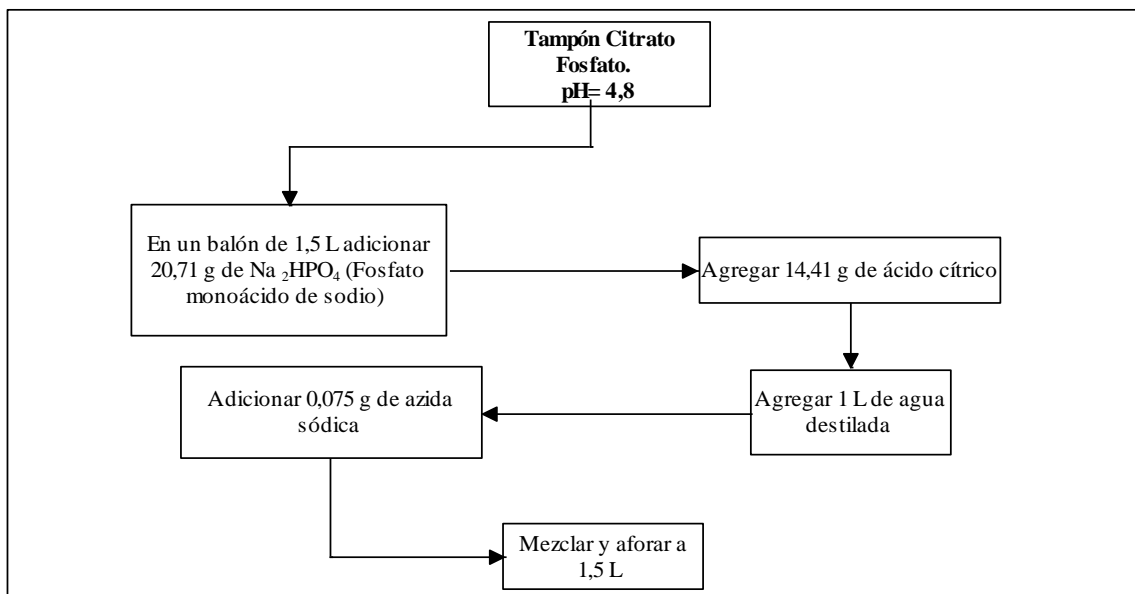
Figura 3.2. Preparación de solución tampón Citrato Fosfato a pH = 4,0



Fuente: Resch et al., 2015 (Low solids enzymatic saccharification of lignocellulosic biomass).

Realizado por: Mylena Olivo, 2018

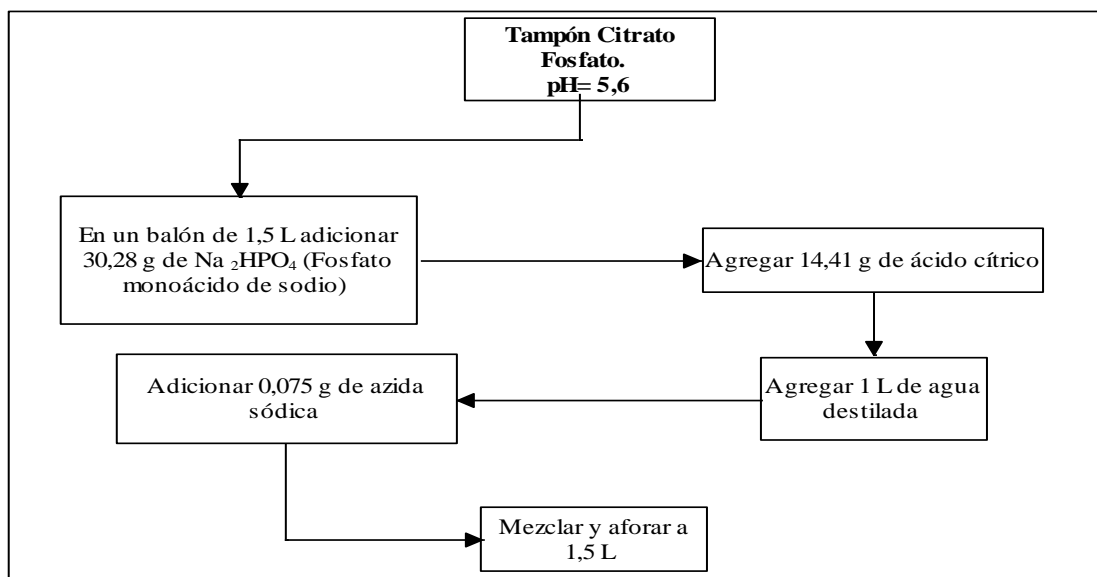
Figura 4.2. Preparación de solución tampón Citrato Fosfato a pH = 4,8



Fuente: Resch et al., 2015 (Low solids enzymatic saccharification of lignocellulosic biomass).

Realizado por: Mylena Olivo, 2018

Figura 5.2. Preparación de solución tampón Citrato Fosfato a pH = 5,6



Fuente: Resch et al., 2015 (Low solids enzymatic saccharification of lignocellulosic biomass).

Realizado por: Mylena Olivo, 2018

2.5.1.5. Hidrólisis enzimática

Para iniciar con el proceso de hidrólisis enzimática, se pesaron 1,25 g del residuo secado (sin pre-tratamiento o con pre-tratamiento) y se adicionan 62,5 mL de solución tampón preparado (pH 4,0; 4,8; o 5,6). A la solución se incorporaron 0,03125 g de Celulasas del *Aspergillus niger* y se homogeniza la mezcla (Celulasas del *Aspergillus Niger*, tipo C1184 SIGMA, véase anexo 1). Las celulasas adicionadas presentan una actividad enzimática de 0,3 U/mg sólido (1 U genera 1 micromol de glucosa a partir de la celulosa), lo que equivaldría a una actividad de 39,125 U para cada una de las muestras preparadas.

Finalmente los erlenmeyers con las soluciones a hidrolizar, son llevados a un Shaker marca ESCO OrbiCult para su incubación a 37 °C y 150 rpm durante 24, 48 y 72 h; tomándose muestras de las mezclas hidrolizadas al finalizar cada uno de los tiempos indicados. Los hidrolizados son centrifugados a 8000 rpm durante 10 min y se procede con el análisis de azúcares reductores de cada una de las muestras.

2.5.1.6. Análisis de azúcares reductores

Una vez centrifugadas las muestras hidrolizadas, se extrae el sobrenadante que fue utilizado para el análisis de los azúcares reductores mediante el método del ácido Di nitro-salicílico (DNS), propuesto por Coughlan y Moloney, donde se colocó en un tubo de ensayo 0,5 mL de la solución hidrolizada (muestra) y 0,5 mL del reactivo de DNS, el mismo que fue preparado con 0,8 g de

NaOH, 15 g de Tartrato de Sodio y Potasio Tetrahidratado y 0,5 g de ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS), aforándose con agua destilada a 50 mL.

Posteriormente se calientan los tubos con las muestras problemas a Baño María por 5 minutos, inmediatamente se detiene la reacción con baño de agua y hielo. Una vez que la muestra se haya enfriado, se adicionaron 5 mL de agua destilada, luego del cual se agitaron y se dejó reposar por un lapso de 15 minutos hasta completar la reacción. Finalmente se procedió a leer la absorbancia en el espectrofotómetro THERMO SCIENTIFIC GENESIS 10S UV-VIS a una longitud de 570 nm. Es importante el encerado del instrumento con un blanco preparado de la misma forma que las muestras problemas, preparada con agua destilada.

Para la determinación de las concentraciones de azúcares reductores se construyó una curva de calibración con soluciones patrones de 50, 100, 150, 200 y 400 ppm de glucosa, las mismas que fueron preparadas a partir de una solución madre de Glucosa de 1000 ppm, preparada adicionándose 0,1 g de glucosa anhidra y agua destilada hasta obtener un volumen de 100 mL. Las soluciones patrón fueron preparadas de la misma forma que las muestras problemas. A partir de las absorbancias obtenidas se determinó la curva de regresión lineal, determinándose la ecuación de regresión respectiva que relaciona las absorbancias con las concentraciones de azúcares reductores. Para establecer la confiabilidad de la curva se realizó la lectura en tres ocasiones, verificándose la correlación de los datos obtenidos de las lecturas realizadas (Ávila et al., 2012: pp.129-135).

CAPÍTULO 3

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Análisis de resultados

3.1.1. Caracterización del rastrojo de maíz

El rastrojo de maíz utilizado en la experimentación, fue caracterizado en el laboratorio de Servicio de Análisis e Investigación en Alimentos del Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias (INIAP), determinándose el contenido de humedad, cenizas, extracto etéreo, proteína, materia seca, celulosa, F.D.A, y lignina, obteniéndose los siguientes resultados:

Tabla 1.3. Caracterización del rastrojo de maíz.

Parámetro	Unidad	Valores
Humedad	%	34,29
Cenizas	%	10,85
Extracto Etéreo	%	0,67
Proteína	%	5,44
Materia seca	%	65,71
F.D.A	%	47,26
Celulosa	%	40,64
Lignina	%	6,62

Fuente: Laboratorio de servicio de análisis e investigación en alimentos del INIAP, 2017

Los resultados de la caracterización del rastrojo de maíz, mostraron que el contenido de ceniza, celulosa y lignina presentan valores entorno al 10,85; 40,64 y 6,62 % respectivamente, y que en comparación con los valores citados por (Prinsen, 2009, p.3), (Véase Tabla 1.1) donde el rastrojo presenta valores del 10,06 % de cenizas, 37,69 % de Celulosa y 18,59 % de lignina; se observa que el contenido de ceniza es similar; sin embargo, existe una diferencia significativa con respecto al porcentaje de lignina que podría deberse a las condiciones ambientales o al tipo de vegetación, donde las plantas herbáceas presentan valores cercanos al 20 %, muy por debajo de los encontrados en árboles o arbustos, en donde las concentraciones pueden llegar a ser mayores. (Megías, 2018: p.1).

En relación al contenido de Fibra Detergente Ácida (FDA) se pudo observar que la concentración en el rastrojo de maíz se encuentra en torno al 50%, lo que de acuerdo a Di Marco (2011, p.24) indicaría que la digestibilidad del rastrojo sería media-baja. Sabiendo que los forrajes de buena calidad presentan valores superiores al 70% de FDA, un pre-tratamiento o una hidrólisis

enzimática del residuo mejorarían la calidad del rastrojo del maíz previo a su utilización como forraje para el ganado, incrementando la digestibilidad de la misma. (Di Marco, 2011: p.24).

3.1.2. Pre-tratamiento del rastrojo de maíz

Durante el pre-tratamiento aplicado al rastrojo de maíz se pudo observar que de acuerdo al proceso álcali y ácido – álcali, la cantidad de sustrato utilizado se reduce debido a la deslignificación oxidativa que permite el rompimiento y la solubilización de la lignina, con la finalidad de incrementar la accesibilidad de la enzima a la celulosa durante la hidrólisis (López et al., 2013: p.319). Relacionando la masa del residuo previo y posterior al proceso de pre-tratamiento, se obtuvo la reducción de la misma en las siguientes proporciones:

Tabla 2.3. Porcentaje de reducción del rastrojo pre-tratado.

Pre-tratamiento	Masa inicial (g)	Masa final (g)	% de reducción
Álcali	16	6,025	62,34
Ácido – álcali	30	10,992	63,4

Realizado por: Mylena Olivo, 2018

De acuerdo a los resultados obtenidos, los residuos tratados mediante el proceso ácido – álcali presentan un mayor porcentaje de reducción debido principalmente a las reacciones generadas tanto en el medio ácido como en el medio alcalino, lo cual incide en una mayor solubilización de la lignina y mayor degradación de la celulosa y hemicelulosa. (Chandler et al., 2012: p.247).

3.1.3. Hidrólisis enzimática.

Una vez realizados los pre-tratamientos al rastrojo de maíz, se procedió con la hidrólisis enzimática, determinándose las concentraciones de azúcares reductores en las diferentes muestras tomadas a 24, 48 y 72 horas, obteniéndose los siguientes resultados: Véase tabla 3.3

Tabla 3.3. Resultados de la hidrólisis enzimática.

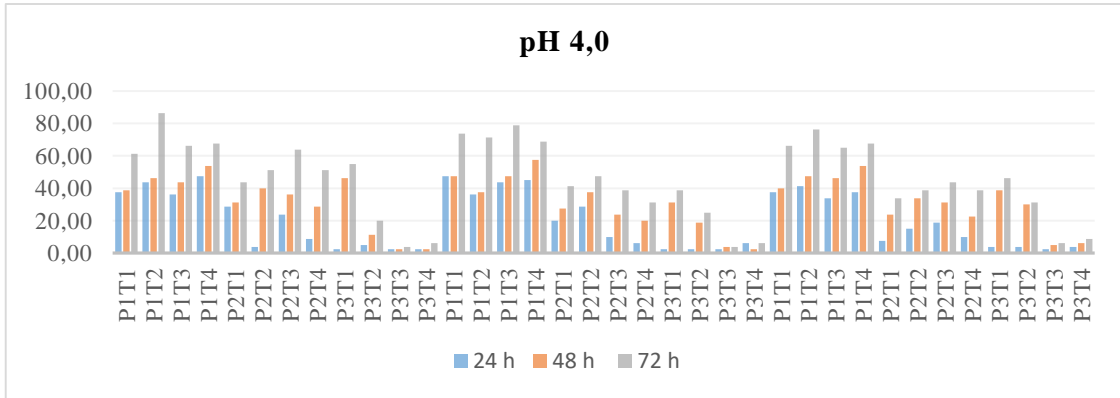
	CÓDIGO	Réplica 1			Réplica 2			Réplica 3		
		24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h
Hidrólisis enzimática pH 4	P1T1	37,50	38,75	61,25	47,50	47,50	73,75	37,50	40,00	66,25
	P1T2	43,75	46,25	86,25	36,25	37,50	71,25	41,25	47,50	76,25
	P1T3	36,25	43,75	66,25	43,75	47,50	78,75	33,75	46,25	65,00
	P1T4	47,50	53,75	67,50	45,00	57,50	68,75	37,50	53,75	67,50
	P2T1	28,75	31,25	43,75	20,00	27,50	41,25	7,50	23,75	33,75
	P2T2	3,75	40,00	51,25	28,75	37,50	47,50	15,00	33,75	38,75
	P2T3	23,75	36,25	63,75	10,00	23,75	38,75	18,75	31,25	43,75
	P2T4	8,75	28,75	51,25	6,25	20,00	31,25	10,00	22,50	38,75
	P3T1	2,50	46,25	55,00	2,50	31,25	38,75	3,75	38,75	46,25
	P3T2	5,00	11,25	20,00	2,50	18,75	25,00	3,75	30,00	31,25
	P3T3	2,50	2,50	3,75	2,50	3,75	3,75	2,50	5,00	6,25
	P3T4	2,50	2,50	6,25	6,25	2,50	6,25	3,75	6,25	8,75
Hidrólisis enzimática pH 4.8	P1T1	155,00	168,75	231,25	155,00	175,00	235,00	173,75	185,00	250,00
	P1T2	163,75	271,25	331,25	176,25	278,75	321,25	182,50	282,50	347,50
	P1T3	207,50	260,00	336,25	201,25	247,50	347,50	180,00	235,00	367,50
	P1T4	212,50	333,75	477,50	198,75	266,25	453,75	182,50	248,75	420,00
	P2T1	205,00	291,25	405,00	215,00	287,50	418,75	230,00	318,75	442,50
	P2T2	157,50	170,00	261,25	160,00	176,25	272,50	171,25	191,25	292,50
	P2T3	153,75	186,25	242,50	170,00	181,25	256,25	162,50	201,25	266,25
	P2T4	198,75	303,75	352,50	206,25	295,00	332,50	190,00	281,25	318,75
	P3T1	3,75	7,50	3,75	3,75	6,25	3,75	2,50	6,25	6,25
	P3T2	2,50	11,25	5,00	3,75	5,00	3,75	3,75	3,75	3,75
	P3T3	5,00	7,50	6,25	6,25	7,50	5,00	8,75	5,00	5,00
	P3T4	2,50	5,00	6,25	5,00	11,25	8,75	2,50	10,00	7,50
Hidrólisis enzimática pH 5.6	P1T1	92,50	118,75	122,50	102,50	120,00	118,75	108,75	128,75	127,50
	P1T2	90,00	120,00	120,00	96,25	113,75	113,75	102,50	120,00	121,25
	P1T3	90,00	111,25	108,75	103,75	110,00	106,25	101,25	111,25	107,50
	P1T4	96,25	113,75	120,00	100,00	116,25	117,50	93,75	122,50	118,75
	P2T1	17,50	17,50	17,50	18,75	13,75	18,75	3,75	18,75	25,00
	P2T2	3,75	36,25	40,00	8,75	47,50	60,00	11,25	56,25	73,75
	P2T3	13,75	33,75	90,00	18,75	21,25	96,25	15,00	15,00	91,25
	P2T4	15,00	15,00	18,75	8,75	16,25	21,25	13,75	17,50	23,75
	P3T1	5,00	8,75	27,50	3,75	12,50	28,75	5,00	10,00	35,00
	P3T2	7,50	2,50	3,75	3,75	5,00	5,00	6,25	2,50	7,50
	P3T3	6,25	12,50	21,25	7,50	18,75	28,75	6,25	13,75	31,25
	P3T4	7,50	3,75	2,50	8,75	6,25	5,00	8,75	7,50	5,00

Realizado por: Mylena Olivo, 2018

Como se puede observar en la tabla anterior, la mayor concentración de azúcares reductores se lo registró a las 72 horas de incubación en los diferentes tratamientos aplicados a un pH de 4,8, esto

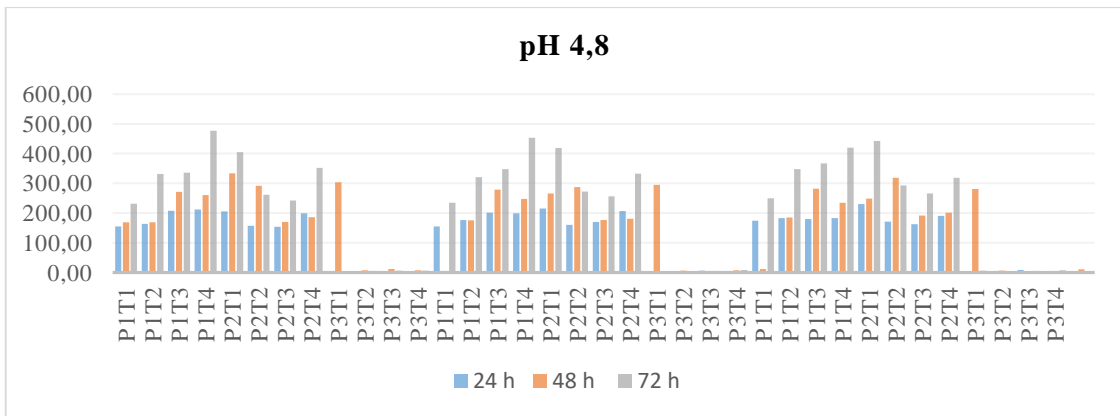
se debió principalmente a que las celulasas del *Aspergillus niger* trabajan en óptimas condiciones a un pH de 5 (véase anexo 1). Al tratarse de un proceso de optimización, la hidrólisis se la realizó a diferentes condiciones, con el fin de establecer una nueva condición de pH en la que se puedan tener resultados favorables.

Gráfico 1.3. Concentraciones de azúcares reductores a pH=4,0



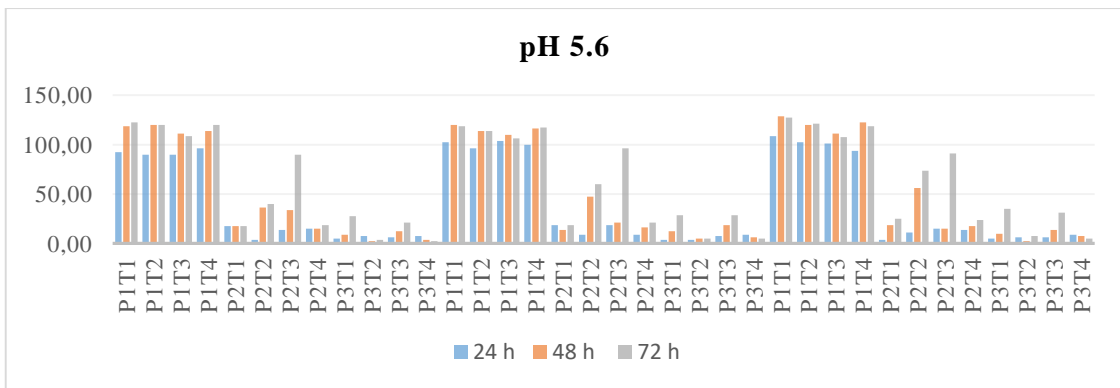
Realizado por: Mylena Olivo, 2018

Gráfico 2.3. Concentraciones de azúcares reductores a pH=4,8



Realizado por: Mylena Olivo, 2018

Gráfico 3.3. Concentraciones de azúcares reductores a pH=5.6



Realizado por: Mylena Olivo, 2018

De acuerdo a los resultados obtenidos, la mayor generación de azúcares reductores se produjo a un pH de 4,8, pudiéndose observar que en los tratamientos donde se presentaron concentraciones elevadas de azúcares, se utilizaron residuos que no fueron pre-tratados (Por ejemplo: P1T4-453 mg/L Azúcares Reductores-Glucosa); sin embargo, los tratamientos con residuos sometidos a un pre-tratamiento alcalino (Por ejemplo P2T1-442 mg/L Azúcares Reductores-Glucosa) presentaron también valores significativos. La actividad enzimática de las celulasas durante el proceso hidrolítico provocó la degradación de la celulosa, incrementando la concentración de los azúcares reductores sobre todo cuando la hidrólisis enzimática se lleva a cabo a un pH cercano a 5.

Una de las principales razones por la que los residuos que no fueron sometidos a ningún tipo de pre-tratamiento presentaron concentraciones elevadas fue la acción directa de las enzimas sobre el rastrojo, lo que evitó la pérdida de azúcares durante la fase de pre-tratamiento (Lavado). Los análisis realizados a los residuos hidrolizados presentaron concentraciones que varían desde los 250 a los 480 ppm posterior a 72 horas de incubación. Las altas concentraciones de azúcares detectadas en los residuos sin pre-tratamiento, estarían relacionadas con la composición química del rastrojo, donde el sustrato caracterizado presenta una baja concentración de lignina y la disponibilidad de celulosa y hemicelulosa sería mayor, por consiguiente la actividad de las celulasas se incrementaría y habría una mayor generación de azúcares. (Daniela, 2007: p.44).

Es preciso destacar además que la concentración de azúcares posterior a la hidrólisis enzimática del rastrojo pre-tratado mediante proceso álcali generó valores cercanos a los máximos alcanzados, lo cual se debió al efecto que produce el hidróxido de Sodio (NaOH) sobre la lignina, que contribuye con su solubilización, favoreciendo el incremento de la actividad enzimática sobre la celulosa y hemicelulosa presentes en mayor proporción en el medio. (López et al., 2013: p.322). Es importante mencionar que una baja concentración de NaOH genera buenos rendimientos durante la hidrólisis alcalina de residuos que contengan lignina entre un 10 a un 18%. (Elizondo, 1998: p.24), por lo que la solución utilizada durante la experimentación favoreció la solubilización de la lignina

Con respecto a los residuos pre-tratados mediante el proceso ácido-alcali, la hidrólisis no muestra resultados aceptables, debido principalmente a que durante la fase ácida se estarían liberando monómeros procedentes de la degradación de la celulosa y de la hemicelulosa, y de acuerdo a Chandler (2012: p.247), es en esta fase donde se degradarían entre un 80 a 95% de dichos

compuestos, por lo que los azúcares liberados se estarían eliminando durante el lavado del residuo previo a la fase alcalina. (Chandler et al., 2012: p.247). En cambio en esta segunda fase, la lignina presente en el rastrojo pre-tratado tiende a solubilizarse, lo cual genera la liberación de celulosa residual, misma que sería degradada por las celulasas durante el tratamiento hidrolítico, reflejándose en una disminución de los azúcares reductores en relación a los cuantificados en el tratamiento con residuos pre-tratados con NaOH.

Otro de los factores utilizados durante el pre-tratamiento de los residuos fue la temperatura de secado, observándose que no existe mayor incidencia sobre la conversión de los residuos lignocelulósicos en azúcares reductores durante la hidrólisis enzimática, por lo que la temperatura apenas generó pequeñas variaciones en los niveles de azúcares generados.

3.2. Análisis estadístico

3.2.1. Pruebas de efectos entre variables

Con los resultados obtenidos durante la hidrólisis enzimática se realizó el análisis estadístico para establecer la significancia entre las medias de los diferentes tratamientos, pudiéndose determinar el mejor tratamiento a partir de la correlación entre la concentración de azúcar determinado y las diferentes variables (pre-tratamientos, pH, Tiempo de Incubación y temperatura de secado), además de la prueba de Tukey, tal como se observa a continuación: Véase tabla 4.3

Tabla 4.3 Pruebas de efectos entre variables.

Variable dependiente: concentración

Origen	gl	Sig.	Nivel de Sig
Modelo	108	,000	***
Pre-tratamientos	2	,000	***
Tiempos	2	,000	***
Temperatura	3	,000	***
pH	2	,000	***
Tratamiento * tiempos	4	,000	***
Tratamiento * temperatura	6	,000	***
Tratamiento * pH	4	,000	***
Tiempos * temperatura	6	,013	NS
Tiempos * pH	4	,000	***
Temperatura * pH	6	,000	***
Tratamiento * tiempos * temperatura	12	,000	***
Tratamiento * tiempos * pH	8	,000	***
Tratamiento * temperatura * pH	12	,000	***
Tiempos * temperatura * pH	12	,000	***
Tratamiento * tiempos * temperatura * pH	24	,000	***
Error	216		
Total	324		

NS No significativo.

*** Significativo.

Realizado por: Mylena Olivo, 2018

Durante la experimentación realizada se evidenció que la correlación entre las variables (pre-tratamientos, tiempos, temperaturas y pH), muestran diferencias muy significativas en la mayoría de las interacciones, lo cual indica que las concentraciones de azúcares reductores de los tratamientos difieren entre sí; sin embargo, la interacción entre los tiempos de incubación y las temperaturas del secado del sustrato genera poca significancia, es decir, que las concentraciones de azúcares entre estos son similares.

3.2.2 Análisis de varianza

Para determinar las condiciones en las que se produciría una mayor liberación de azúcares reductores se realizó el análisis de varianzas ANOVA de cada uno de los tratamientos aplicados, realizándose la interpretación tanto del pre-tratamiento aplicado, del pH de la hidrólisis, la temperatura de secado de los residuos como también del tiempo de incubación, observándose el siguiente comportamiento:

Tabla 5.3 ANOVA de los pre-tratamientos

Variable Dependiente: Concentración

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.	Nivel de Sig
Entre grupos	970542,448	2	485271,224	62,732	,000	***
Dentro de grupos	2483139,974	321	7735,639			
Total	3453682,422	323				

Realizado por: Mylena Olivo, 2018

Tabla 6.3 Medias de las concentraciones de azúcares reductores en relación con los pre-tratamientos

Tukey B^{a,b}

Pre-tratamientos	N	Subconjunto		
		1	2	3
pre-tratamiento ácido - álcali	108	9,9306		
pre-tratamiento álcali	108		102,4653	
sin pre-tratamiento	108			140,2083

Realizado por: Mylena Olivo, 2018

De acuerdo al ANOVA de los pre-tratamiento se evidenció un nivel de significancia inferior a 0.001, lo que indica que la diferencia entre las medias de las concentraciones de azúcares

reductores obtenida en los diferentes grupos aplicados son significativas, siendo el rastrojo de maíz sin pre-tratamiento el que mejor respuesta presenta en relación a los residuos pre-tratados; sin embargo, la media de las concentraciones del pre-tratamiento alcalino es representativo.

Tabla 7.3 ANOVA de los tiempos de incubación

Variable Dependiente: Concentración

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.	Nivel de Sig
Entre grupos	129483,681	2	64741,84	6,252	0,002	**
Dentro de grupos	3324198,74	321	10355,759			
Total	3453682,42	323				

Realizado por: Mylena Olivo, 2018

Tabla 8.3 Medias de las concentraciones en relación con los diferentes tiempos.

Tukey B^{a,b}

tiempos	N	Subconjunto para alfa = 0,05	
		1	2
24	108	60,8912	
48	108	82,0023	82,0023
72	108		109,7106

Realizado por: Mylena Olivo, 2018

Con respecto al ANOVA de los tiempos de incubación se evidenció que el nivel de significancia es menor a 0,01, lo que indica que la diferencia entre las medias de las concentraciones de azúcares reductores obtenida para los grupos en los subconjuntos homogéneos son significativas, existiendo cierta similitud entre las medias obtenidas a las 24 y 48 horas como también entre las 48 y 72 horas de incubación, evidenciándose una mayor presencia de azúcares al finalizar la experimentación, es decir, el tiempo óptimo de incubación sería a las 72 horas.

Tabla 9.3 ANOVA de las temperaturas de secado

Variable Dependiente: Concentración

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.	Nivel de Sig
Entre grupos	4668,726	3	1556,242	0,144	0,933	NS
Dentro de grupos	3449013,7	320	10778,168			
Total	3453682,42	323				

Realizado por: Mylena Olivo, 2018

Tabla 10.3 Medias de las concentraciones en relación con las diferentes temperaturas.

Tukey B^{a,b}

Temperatura	N	Subconjunto para alfa = 0,05
		1
55	81	80,6636
50	81	81,0494
45	81	85,0154
60	81	90,0772

Realizado por: Mylena Olivo, 2018

En relación al ANOVA de las temperaturas de secado del rastrojo con o sin pre-tratamiento se observa que el nivel de significancia es superior a 0,05, lo que indica que la diferencia entre las medias de las concentraciones de azúcares reductores obtenida para los grupos en los subconjuntos homogéneos no son significativas, por lo que el secado del residuo a diferentes temperaturas (45, 50, 55 y 60 °C) no incidiría sobre el incremento de las concentraciones de azúcares en los diferentes tratamientos.

Tabla 11.3 ANOVA de los pH de los diferentes tratamientos

Variable Dependiente: Concentración

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.	Nivel de Sig
Entre grupos	1227219,56	2	613609,78	88,467	,000	***
Dentro de grupos	2226462,86	321	6936,021			
Total	3453682,42	323				

Realizado por: Mylena Olivo, 2018

Tabla 12.3 Medias de las concentraciones en relación con los diferentes pH

Tukey B^{a,b}.

pH	N	Subconjunto		
		1	2	3
4,0	108	31,9792		
5,6	108		50,0116	
4,8	108			170,6134

Realizado por: Mylena Olivo, 2018

Del ANOVA realizado sobre los pH utilizados durante la hidrólisis enzimática, se estableció que el nivel de significancia es menor a 0,001, lo que indica que la diferencia entre las medias de las concentraciones de azúcares reductores obtenida para los grupos en los subconjuntos son

significativas, es decir, los valores obtenidos de las medias de las concentración de azúcares a diferentes pH (4,0; 4,8 y 5,6), difieren entre sí, como se muestra en la tabla 12.3, sin embargo, de acuerdo a los resultados mostrados, el pH óptimo en el que se obtiene una mayor concentración de azúcares reductores es a 4,8.

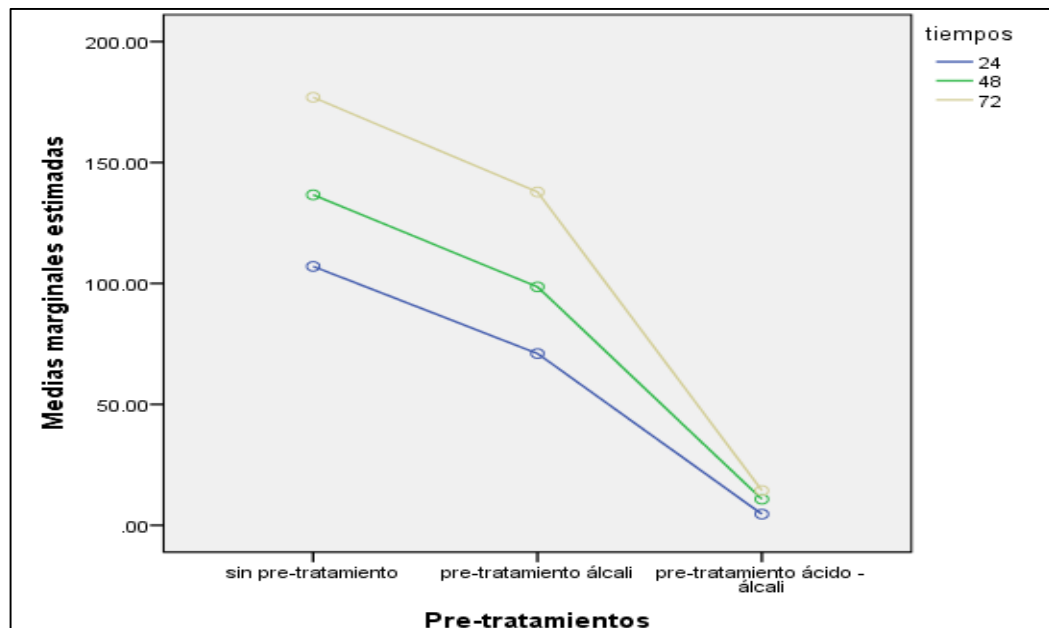
Tabla 13.3 Condiciones óptimas para las hidrólisis enzimática

Pre-tratamiento	Temperatura de secado (pre-tratamiento)	Tiempo de hidrólisis	pH de hidrólisis
Sin pre-tratamiento	60 °C	72 horas	4,8

Realizado por: Mylena Olivo, 2018

3.2.3. Análisis gráfico medias marginales estimadas de la concentración de azúcares reductores.

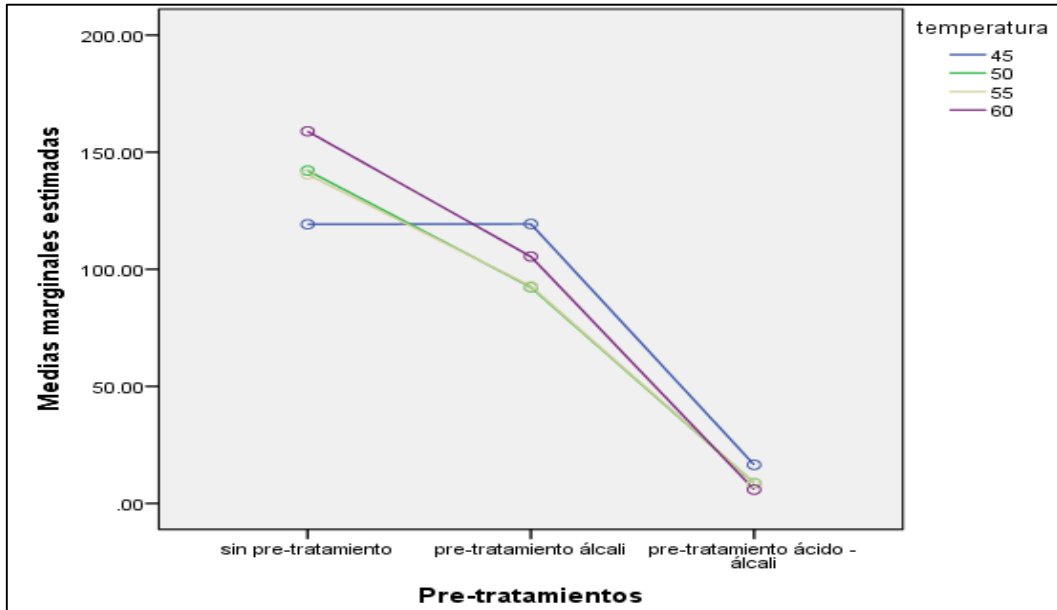
Gráfico 4.3 Medias marginales estimadas de concentración en relación a (pre-tratamientos vs tiempos)



Realizado por: Mylena Olivo, 2018

Del análisis efectuado entre las medias marginales de las concentraciones y la relación pre-tratamiento versus tiempo, se observa que la utilización del rastrojo de maíz sin pre-tratamiento generó una mayor producción de azúcares a las 72 horas de incubación en contraste con los residuos pre-tratados en un medio alcalino y alcalino-ácido; sin embargo la producción de azúcares reductores a partir de los residuos pre-tratados mediante el proceso alcalino, alcanzó una importante concentración de azúcares que sería ligeramente inferior a los obtenidos con el residuo sin pre-tratamiento. Véase gráfico 4.3.

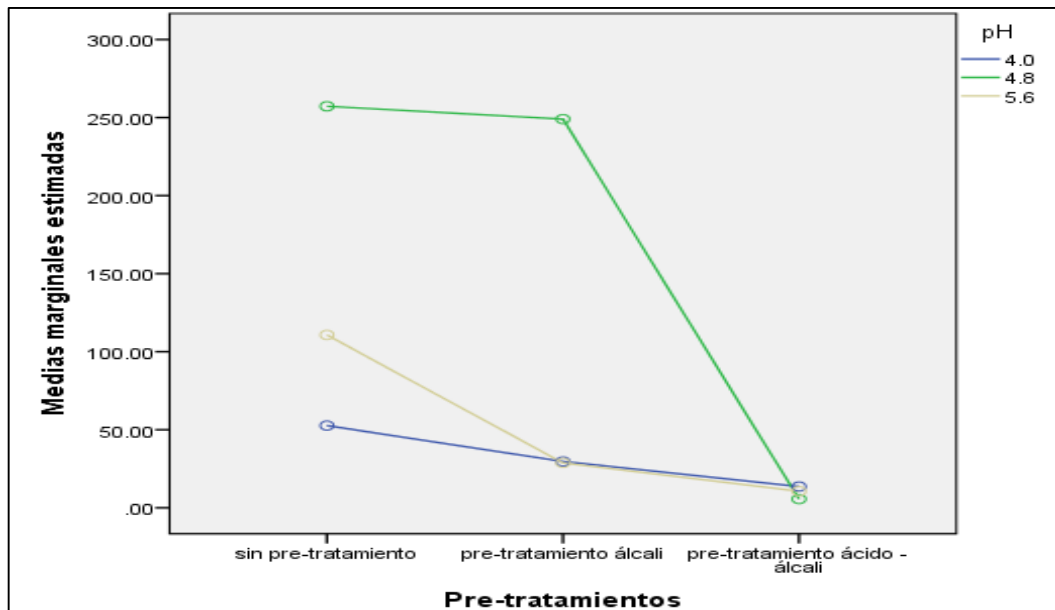
Gráfico 5.3 Medias marginales estimadas de concentración en relación a (pre-tratamientos vs temperatura)



Realizado por: Mylena Olivo, 2018

En relación al gráfico 5.3, las concentraciones de azúcares versus los pre-tratamientos y las temperaturas de secado del residuo, indica que las diferencias no son significativas entre las temperaturas de secado, por lo que la hidrólisis de los residuos únicamente depende del tipo de pre-tratamiento aplicado durante la experimentación.

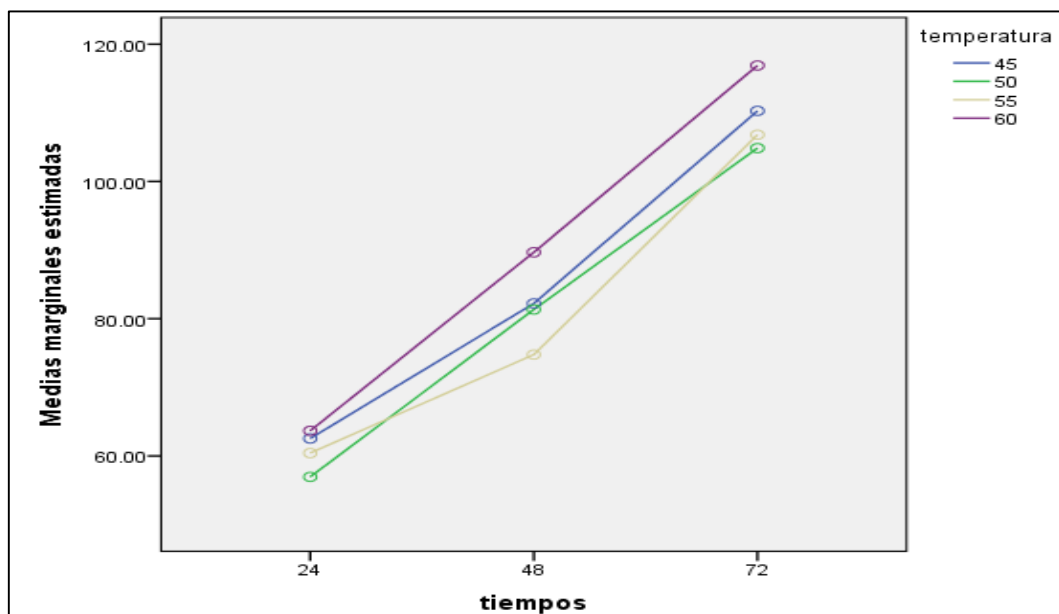
Gráfico 6.3 Medias marginales estimadas de concentración en relación a (pre-tratamientos vs pH)



Realizado por: Mylena Olivo, 2018

Con respecto a la relación entre las concentraciones de azúcares versus los pre-tratamientos y pH utilizados durante la hidrólisis, se observa que un pH en torno a 4,8 produce una mejor actividad enzimática lo cual estaría relacionado con la concentración de azúcares obtenidos, por lo que un pH 4 y 5,6 no incidirían mayormente sobre el proceso de degradación del rastrojo de maíz, por lo que las concentraciones serían bajas siempre que el pH sea distinto a 4,8; todo esto se debe a la proximidad al rango de eficiencia que presentan las enzimas y que vienen detallado en el anexo 1.

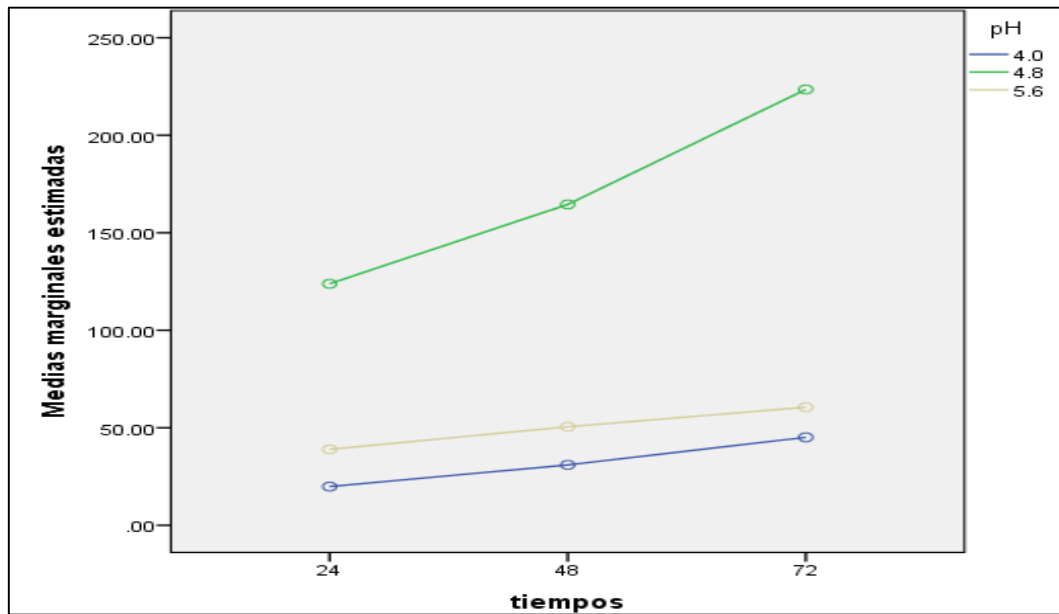
Gráfico 7.3 Medias marginales estimadas de concentración en relación a (tiempos vs temperaturas)



Realizado por: Mylena Olivo, 2018

Como se observa en la gráfica 7.3 la relación entre las concentraciones de azúcares versus los tiempos de incubación y temperaturas de secado del rastrojo pre-tratado, no presenta diferencias significativas a nivel de las temperaturas de secado utilizadas, mientras que el tiempo de incubación genera una mayor concentración de azúcares reductores al finalizar el tercer día de hidrólisis, por lo que las 72 horas sería el tiempo óptimo para que se generen concentraciones representativas de azúcares reductores durante la hidrólisis enzimática.

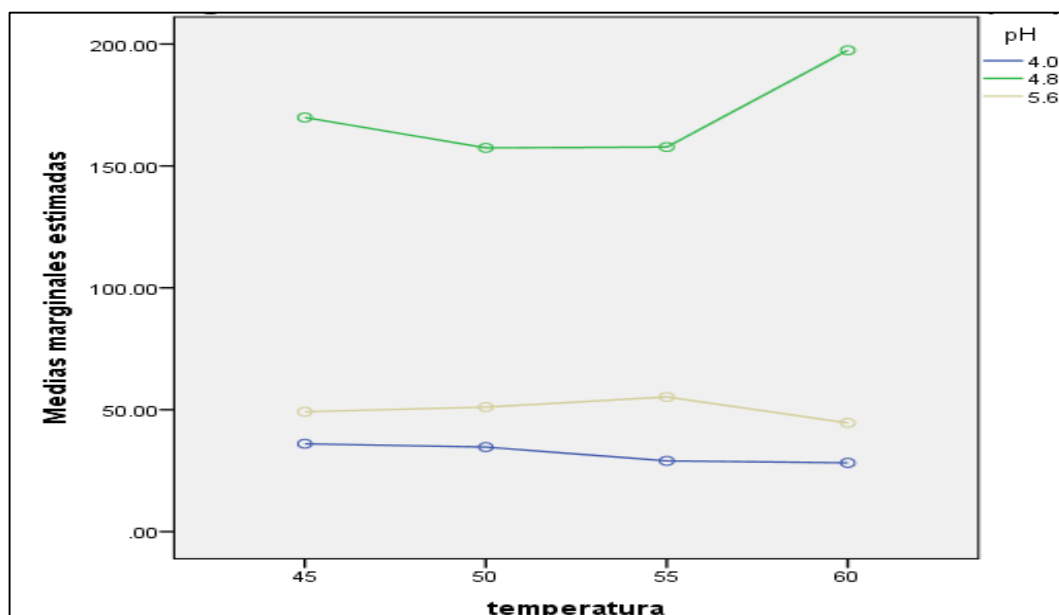
Gráfico 8.3 Medias marginales estimadas de concentración en relación a (tiempos vs pH)



Realizado por: Mylena Olivo, 2018

En función del análisis de las medias marginales de las concentraciones de azúcares y de la relación entre el pH y los tiempos de incubación durante la hidrólisis, se observa que a un pH de 4.8 se produce una mayor degradación del rastrojo adicionado y que conforme avanza el tiempo de incubación, la concentración de azúcares reductores tiende a incrementarse. Además se pudo constatar que a un pH 4 y 5,6, y a tiempos inferiores a las 72 horas, las medias marginales de las concentraciones no serían representativas, todo esto debido a la proximidad que tendría el pH 4,8 al óptimo requerido para la actividad de las enzimas. Véase gráfico 8.3.

Gráfico 9.3 Medias marginales estimadas de concentración en relación a (temperaturas vs pH)



Realizado por: Mylena Olivo, 2018

Como se indica en la Gráfica 9.3, la relación entre las medias marginales de las concentraciones de azúcares con respecto al pH y las temperaturas de secado del rastrojo de maíz confirman lo indicado anteriormente, donde el pH óptimo de la hidrólisis es de 4,8 mientras que la temperatura de secado no generó variaciones significativas; sin embargo a un pH de 4,8, los residuos secados a 60 °C provocaron un ligero incremento en las concentraciones de azúcares, lo cual no difiere en mucho con los valores alcanzados por los demás tratamientos, donde el rastrojo utilizado fue secado a 45, 50 y 55°C.

Frente a los resultados y a las gráficas analizadas anteriormente se pudo corroborar que las mejores condiciones en las que se produjo la hidrólisis enzimática del rastrojo de maíz, se dieron a un pH de 4,8 y un tiempo de incubación de 72 horas; sin embargo, en relación al pre-tratamiento aplicado, se evidenció que la mayor concentración de azúcares reductores obtenidos se obtuvo de los residuos que no fueron sometidos a un pre-tratamiento, y que fueron secados a una temperatura de 60°C.

CONCLUSIONES

Durante el presente estudio se optimizó el proceso de hidrólisis enzimática para el tratamiento de residuos lignocelulósicos a partir de la utilización del rastrojo de maíz sin pre-tratamiento, secado a 60°C e hidrolizado a un pH de 4,8, observándose la presencia de elevadas concentraciones de azúcares reductores en relación a los demás tratamientos aplicados finalizado las 72 horas de incubación.

Se realizó la caracterización físico-química del rastrojo de maíz, evidenciándose un contenido representativo de celulosa (40,64%), lignina (6,62%) y Fibra Detergente Ácida (47,26), sin descartar la concentración de proteína y de cenizas que se encuentran en el rango del 5,44 y 10,85% respectivamente, lo cual confirma la potencialidad que presenta el rastrojo para ser utilizado como alimento del ganado previo a un pre-tratamiento, que incrementaría su degradabilidad y digestibilidad.

Durante la hidrólisis enzimática de los residuos pre-tratados y sin pre-tratar, se determinó un incremento de la concentración de azúcares reductores en las muestras sin pre-tratamiento; sin embargo, el contenido de azúcares liberados de los residuos que fueron pre-tratados en un medio alcalino fue significativo en comparación a los residuos sometidos a un pre-tratamiento acido-alcalino, donde las concentraciones de azúcares fueron bajas.

La hidrólisis del rastrojo de maíz presentó una media de las concentraciones de azúcares reductores en relación a los pH, igual a 31,98; 170,61 y 50,01 mg/L a pH de 4,0; 4,8 y 5,6 respectivamente; mientras que la media de las concentraciones versus los pre-tratamientos fueron de 9,93; 102,46 y 140,21 mg/L, para el pre-tratamiento ácido – álcali, álcalino y sin pre-tratamiento respectivamente, por lo que la hidrólisis del rastrojo sin pre-tratamiento a un pH de 4,8 presentó una mejor respuesta en relación a los demás tratamientos.

La hidrólisis enzimática del rastrojo de maíz presentó una media de las concentraciones de azúcares reductores en relación a los tiempos, igual a 60,89; 82,00 y 109,71 mg/L correspondientes a las 24, 48 y 72 horas de incubación respectivamente; mientras que la media de las concentraciones versus las temperaturas de secado durante el pre-tratamiento fueron de 85,01; 81,05; 80,66 y 90,08 mg/L, para una temperatura de 45, 50, 55 y 60 °C respectivamente, lo cual indica que la temperatura de secado del sustrato previo a la hidrólisis enzimática (sin pre-tratamiento, pre-tratamiento alcalino y acido - álcali) fue de 60 °C, y el tiempo óptimo de incubación para una mayor liberación de azúcares reductores fue de 72 horas.

Durante la hidrólisis enzimática se determinó que las condiciones en las que se obtendría una mayor liberación de azúcares reductores sería a un pH de 4,8 y un tiempo de incubación de 72 horas, siendo los residuos secados a 60°C y sin pre-tratamiento previo, los que mayor reducción de celulosa y hemicelulosa presentaron, debido a la acción degradadora de las celulasas y a la ausencia de pérdidas que podrían darse durante el pre-tratamiento del rastrojo.

RECOMENDACIONES

- 1) Antes de realizar la hidrólisis enzimática se recomienda lavar los sustratos en una solución buffer de citrato de sodio de pH 5, con la finalidad de inhibir el crecimiento microbiano y por ende la reducción de interferencias durante el proceso de hidrólisis.
- 2) Al trabajar con los residuos pre-tratados, es importante evitar el contacto con el medio externo para evitar posibles contaminaciones durante el proceso hidrolítico.
- 3) Se recomienda realizar la hidrólisis enzimática a diferentes temperaturas, con la finalidad de establecer las condiciones a las cuales se presentaría una mejor degradación de la celulosa, evitando en su defecto realizar el secado de los residuos pre-tratados a diferentes temperaturas.
- 4) Es importante realizar nuevas pruebas experimentales donde sean considerados residuos pre-tratados bajo diferentes condiciones alcalinas, a fin de preservar la celulosa disponible sin que se generen pérdidas significativas, lo cual favorecería la liberación de azúcares reductores durante la hidrólisis enzimática.

BIBLIOGRAFÍA

ABRIL, A. y NAVARRO, E.A. *Obtención de etanol a partir de biomasa lignocelulósica*. [En línea]. Valencia-España: Aleta Ediciones, 2012. [Consulta: 01 Diciembre 2017]. Disponible en: https://www.researchgate.net/profile/Enrique_Navarro/publication/241216642_Etanol_a_partir_de_biomasa_lignocelulosica/links/0c96051c8409028b93000000.pdf.

ALBERNAS-CARVAJAL, Y., CORSANO, G., GARRIGA, L.M. y HERRERO, R.S. “Estudio de la cinética de la hidrólisis enzimática del bagazo pretratado”. *Afinidad Revista de química teórica y aplicada* [en línea], 2015, (España) 72(570), pp. 128. [Consulta: 03 Diciembre 2017]. ISSN 0001-9704. Disponible en: <https://www.google.com.ec/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&cad=rja&uact=8&ved=0ahUKEwjBu8mQhs3VAhWGQSYKHRrICi4QFggIAMA&url=http%3A%2F%2Fwww.raco.cat%2Findex.php%2Fafinidad%2Farticle%2Fdownload%2F297237%2F386225&usq=AFQjCNGiJbm1uUJDLEyEvsewXsVdYEj6>.

AVELLANEDA CEVALLOS, J.H. Efecto de enzimas fibrolíticas exógenas en características nutritivas de gramíneas tropicales. [En línea]. (Trabajo de titulación), (Doctoral). Instituto de recursos genéticos y productividad, Programa en ganadería, (Montecillo-México). 2003. pp. 13. [Consulta: 03-12-2017]. Disponible en: <http://repositorio.educacionsuperior.gob.ec/handle/28000/434>.

ÁVILA, R., RIVAS, B., HERNÁNDEZ, R. y CHIRINOS, M. “Contenido de azúcares totales, reductores y no reductores en *Agave cocui* Trelease”. *Multiciencias* [en línea], 2012, (Venezuela) 12(2), pp. 129-135. [Consulta: 07 Diciembre 2017]. ISSN 1317-2255. Disponible en: www.redalyc.org.

BASAURE, P. “Maíz: Composición del rastrojo”. *Manual de lombricultura* [en línea], 2006, (Santiago-Chile), pp. 1-2. [Consulta: 22 Octubre 2017]. Disponible en: <http://www.manualdelombricultura.com/foro/mensajes/15476.html>. 2002.

CASTELLANO., P.R. y MORENO, M. del C.M. *Avances en calidad ambiental* [en línea]. Salamanca-España: Europa artes gráficas, S.A. [Consulta: 26 Octubre 2017]. Disponible en: https://books.google.com.ec/books?id=WAgSRdxAGtQC&hl=es&source=gbs_navlinks_s.

CASTELLS, X.E. *Reciclaje de residuos industriales: Residuos sólidos urbanos y fangos de depuradora*. [En línea]. 2ª. Edición. Ediciones Díaz de Santos, S.A. 2012. [Consulta: 22 Octubre 2017]. Disponible en: https://books.google.com.ec/books?id=8yWSZEbQsXgC&vq=En+general,+todas+las+legislaciones+suelen+definir+el+residuo+de+una+manera+similar.&dq=residuos&hl=es&source=gbs_navlinks_s.

CASTILLO, F., ROLDÁN, M., BLASCO, R., HUERTAS, M., CABALLERO, F., CONRADO, V. y ROMERO, M.L. *Biotecnología ambiental*. [En línea]. Madrid-España: Tébar, S.L. 2005. [Consulta: 23 Octubre 2017]. Disponible en: <https://books.google.com.ec/books?id=19ffPAm3E3kC&pg=PA298&lpg=PA298&dq=Las+enzimas+son+proteínas+que+actúan+como+verdaderos+catalizadores,+acelerando+la+velocidad+de+las+reacciones+específicas+para+cada+una+de+ellas.+Estas+reacciones+no+te>.

CASTRO, H., VÁZQUEZ, M., SÁNCHEZ, F. y MURILLO, M. “Investigan uso de enzimas para alimento de ganado”. *El Siglo de Torreón*. [En línea] 2014, (México) p.4. [Consulta: 29 Octubre 2017]. Disponible en: <https://www.elsiglodetorreon.com.mx/noticia/67334.investigan-uso-de-enzimas-para-alimento-de-ganado.html>.

CHANDLER, C., VILLALOBOS, N., GONZALES, E., ARENAS, E., MÁRMOL, Z. y RÍOS, J. Hidrólisis ácida diluida en dos etapas de bagazo de caña de azúcar para la producción de azúcares fermentables. *Revista Multiciencias*. [En línea], 2012, (Venezuela) vol. 12, no. 3, pp. 245-253. [Consulta: 03 Marzo 2018]. ISSN 1317-2255. Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=90426810002>.

DANELÓN, J. *Comprendiendo a los carbohidratos*. [En línea]. Argentina. 2001. Sitio argentino de producción animal. [Consulta: 13 Enero 2018]. Disponible en: http://www.produccion-animal.com.ar/informacion_tecnica/manejo_del_alimento/56comprendiendo_a_los_carbohidratos.pdf.

DANIELA, N. Estudio de la producción de azúcares fermentables a partir de la celulosa contenida en desechos agrícolas o industriales, por medio de una hidrólisis enzimática. [En línea] (Trabajo de titulación) (Pregrado) Universidad Central de Venezuela. Facultad de Ingeniería. (Caracas-Venezuela). 2007. P.44. [Consulta: 02 Mayo 2018]. Disponible en: http://saber.ucv.ve/bitstream/123456789/1310/1/TESIS_2.pdf.

DEL CASTILLO, J.M.S. *Nutrición básica humana*. [En línea]. Valencia - España: Borrás y Talens Asesores SL. 2006. [Consulta: 31 Diciembre 2017]. Disponible en: https://books.google.com.ec/books?id=z6iMx642m_wC&dq=hidratos+de+carbono&hl=es&source=gbs_navlinks_s.

DI MARCO, O. *Estimación de la calidad de los forrajes*. [En línea], Argentina. 2011. vol. 20, no. 240, pp. 24-30. Sitio argentino de producción animal. [Consulta: 05 Febrero 2018]. Disponible en: http://www.produccion-animal.com.ar/tablas_composicion_alimentos/45-calidad.pdf.

ELIZONDO ESPINOZA, I. Evaluación de tratamientos alcalinos sobre la calidad nutricional de subproductos lignocelulósicos. [En línea]. (Trabajo de titulación) (Doctoral). Universidad de Colima, Facultad de medicina veterinaria y zootecnia. (Colima-México). 1998. p.24. [Consulta: 03 Marzo 2018]. Disponible en: http://digeset.ucol.mx/tesis_posgrado/Pdf/Irma_Elizondo_Espinoza.pdf.

FÉRNANDEZ, I., FUENTES, A. y GARCÍA, E. Cálculo del contenido en azúcares totales en alimentos por el método de Bertrand. [En línea], (Trabajo de titulación) (Pregrado). Universidad Politécnica de Valencia, Departamento de tecnología y alimentos. (Valencia-España). 2011. p.7. [Consulta: 29 Octubre 2017]. Disponible en: [https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/29788/Cálculo del contenido en azúcares totales.pdf?sequence=3](https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/29788/Cálculo_del_contenido_en_azúcares_totales.pdf?sequence=3).

GARCÍA ROLLAN, M. Mejora de la paja como alimento del ganado. *Ministerio de Agricultura y pesca. Alimentación y medio ambiente*. [En línea]. Sin fecha. (España), Neografis, S.L., p.16. [Consulta: 25 Octubre 2017]. ISBN 84-341-0346-X. Disponible en: http://www.mapama.gob.es/ministerio/pags/biblioteca/hojas/hd_1983_20.pdf.

GARCÍA, A., CARA, C., MOYA, M., RAPADO, J., PULS, J., CASTRO, E. y MARTÍN, C. Dilute sulphuric acid pretreatment and enzymatic hydrolysis of *Jatropha curcas* fruit shells for ethanol production. *Industrial crops and products*. [En línea], 2014, (Cuba), p.3. [Consulta: 2 Abril 2018]. Disponible en: https://www.academia.edu/5821951/Dilute_sulphuric_acid_pretreatment_and_enzymatic_hydrolysis_of_Jatropha_curcas_fruit_shells_for_ethanol_production.

GÉLVEZ, L.D. *Composición nutricional del rastrojo de maíz*. Mundo pecuario. [En línea]. Venezuela: 2016. [Consulta: 23 Octubre 2017]. Disponible en: http://mundo-pecuario.com/tema61/nutrientes_para_rumiantes/maiz_rastrojo-333.html.

GONZÁLES MAÑAS, J.M. *Actividad enzimática*. Universidad del País Vasco. [En línea]. España. Sin fecha. [Consulta: 27 Enero 2018]. Disponible en: <http://www.ehu.es/biomoleculas/enzimas/enz3.htm#ae>.

GONZÁLEZ MAÑAS, J.M. *Cinética enzimática*. Universidad del País Vasco. [En línea]. España. Sin fecha. [Consulta: 10 Diciembre 2017]. Disponible en: <http://www.ehu.es/biomoleculas/enzimas/enz3.htm#e>

GUTIÉRREZ-ROJAS, I., MORENO-SARMIENTO, N. y MONTOYA, D. Mecanismos y regulación de la hidrólisis enzimática de celulosa en hongos filamentosos: Casos clásicos y nuevos modelos. *Revista Iberoamericana de Micología*. [En línea], 2015, Colombia. vol.32, no.1, p.1. [Consulta: 12 Octubre 2017]. ISSN 21739188. DOI 10.1016/j.riam.2013.10.009. Disponible en: <http://www.elsevier.es/es-revista-revista-iberoamericana-micologia-290-articulo-mecanismos-regulacion-hidrolisis-enzimatica-celulosa-S1130140614000138>.

IMBA-CHONTASI, E.G. y TALLANA-CHIMBARRO, L.M. Aceptabilidad del bagazo de caña, rastrojo de maíz y tamo de cebada en bloques nutricionales como reemplazo del maíz en cobayos de engorde (*cavia porcellus*) en la granja La Pradera-Chaltura. (Trabajo de titulación) (Pregrado). [En línea]. Universidad Técnica Del Norte, Facultad de Ingeniería en Ciencias Agropecuarias y Ambientales. (Ibarra-Ecuador). 2011. p.16. [Consulta: 22 Octubre 2017]. Disponible en: [http://repositorio.utn.edu.ec/bitstream/123456789/778/3/03 AGP 130 TESIS.pdf](http://repositorio.utn.edu.ec/bitstream/123456789/778/3/03%20AGP%20130%20TESIS.pdf).

INSH, I.N.D.S.E.H. *Fichas de agentes biológicos: Aspergillus spp. Databio*. [En línea], España: 2012. p.5. [Consulta: 28 Enero 2018]. Disponible en: [http://www.insht.es/RiesgosBiologicos/Contenidos/Fichas de agentes biologicos/Fichas/Hongos/Ficha Aspergillus spp.pdf](http://www.insht.es/RiesgosBiologicos/Contenidos/Fichas%20de%20agentes%20biologicos/Fichas/Hongos/Ficha%20Aspergillus%20spp.pdf).

JÁUREGUI RINCÓN, J. y CHÁVEZ VELA, N.A. *Glosario de biotecnología*. [En línea]. Aguascalientes- México: 2006. ISBN 970-728-049-3. [Consulta: 25 Octubre 2017]. Disponible en: <https://books.google.com.ec/books?id=iFCVkjTiRqWC&pg=PA113&dq=enzima+hemicelulasa&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwjX-77I85zSAhVKNSYKHcRbD7QQ6AEIGDAA#v=onepage&q=enzima+hemicelulasa&f=false>.

JIMÉNEZ GARCÍA, L.F. y MERCHANT LARIOS, H. *Biología celular y molecular*. [En línea]. México: Pearson Education de México, S.A. ISBN 970-26-0387-0. 2003. [Consulta: 25 Octubre 2017]. Disponible en: [https://books.google.com.ec/books?id=sDQYRWEhVroC&pg=PA566&dq=funcion+de+enzimas+celulasas&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwi9-47vufnRAhVDPCYKHS4vAoEQ6AEIGDAA#v=onepage&q=funcion de enzimas celulasas&f=false](https://books.google.com.ec/books?id=sDQYRWEhVroC&pg=PA566&dq=funcion+de+enzimas+celulasas&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwi9-47vufnRAhVDPCYKHS4vAoEQ6AEIGDAA#v=onepage&q=funcion%20de%20enzimas%20celulasas&f=false).

PRINSEN, P. Fundamentos de biotecnología. *The Fungal Population* (Trabajo de titulación) (maestría). [En línea], Universidad de Sevilla. (Sevilla-España). 2009. vol. 49, no. 1, pp. 1-3. ISSN 0555-1099. DOI 10.7868/S0555109913030112. [Consulta: 13 Febrero 2018]. Disponible en: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-84881277747&partnerID=tZOtx3y1%0Ahttp://www.irmase.csic.es/users/delrio/repository/theses/2010-Prinsen-MsC.pdf%0Ahttp://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9781483227443500109>.

LEE, J., KIM, J., JANG, H., LEE, M. y PARK, J. “Sequential dilute acid and alkali pretreatment of corn stover: sugar recovery efficiency and structural characterization. *Bioresource technology*”. *Bioresource technology*. [En línea], 2015, (Holanda), pp.296-301.

[Consulta: 02 Abril 2018]. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852415001364>.

PACHECO, MANUEL MEGÍAS. *Tejidos y órganos vegetales, Lignina*. [En línea]. España: 2018. [Consulta: 13 Febrero 2018]. Disponible en: <https://mmegias.webs.uvigo.es/2-organos-v/ampliaciones/lignina.php>.

MARTÍNEZ, E.M. y OCAMPO, C.B. *Manual para la identificación de hongos en granos y sus derivados*. [En línea]. México: 1998. ISBN 968-36-0718-7. [Consulta: 15 Octubre 2017]. Disponible en: https://books.google.com.ec/books?id=5UTjL_a9Y8C&pg=PA45&dq=que+es+el+hongo+aspergillus+niger&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwiW_oCtqu7WAhXHSyYKHRymC_QQ6AEIKTAB#v=onepage&q=que+es+el+hongo+aspergillus+niger&f=false.

MELÉNDEZ, P. “Las bases para entender un análisis nutricional de alimentos y su nomenclatura”. *El Mercurio*. [En línea], 2015, (Chile), p.1. [Consulta: 23 Octubre 2017]. Disponible en: <http://www.elmercurio.com/Campo/Noticias/Analisis/2015/10/21/Las-bases-para-entender-un-analisis-nutricional-de-alimentos-y-su-nomenclatura.aspx>.

MENDOZA, G., PLATA, F., ESPINOSA, R. y LARA, A. “Manejo nutricional para mejorar la eficiencia de utilización de la energía en bovinos”. *Universidad y Ciencia*. [En línea], 2008, (México) vol. 24, no. 1, p.75. ISSN 0186-2979. [Consulta: 27 Octubre 2017]. Disponible en: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0186-29792008000400009&lng=es&nrm=iso&tlng=es.

MERK, *Celulasa de Aspergillus niger*. [En línea]. USA: 2018. [Consulta: 15 Octubre 2017]. Disponible en: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/c1184?lang=en®ion=EC>.

MORALES, N. *Las enzimas y su tecnología* [blog]. Colombia: 2008. [Consulta: 23 Octubre 2017]. Disponible en: <https://www.blogger.com/profile/01301245476856675448>.

LÓPEZ, NIÑO L., CÁRDENAS, A.A. y ZAMBRANO, R.G. “Evaluación de pretratamientos químicos para la hidrólisis enzimática de residuos lignocelulósicos de yuca (Manihot esculenta Crantz)”. *Redalyc* [en línea], 2013, (Colombia) no. 69, p.317. ISSN 01206230. [Consulta: 13 Febrero 2018]. Disponible en: <http://www.redalyc.org/pdf/430/43029812024.pdf>.

NTE INEN 2841. *Gestión ambiental. Estandarización de colores para recipientes de depósito y almacenamiento temporal de residuos sólidos*. [En línea]. Ecuador: 2014. [Consulta: 22 Octubre 2017]. Disponible en: <http://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:http://www.normalizacion.gob.ec/wp-content/uploads/downloads/2014/03/2841.pdf>.

ORJUELA YEPES, D. “Comparative study of the international significant standards for the definition, exclusion, declassification and identification of hazardous wastes”. *SciELO*. [En línea], 2013 (Colombia) vol. 11, no. 19, pp. 73-92. ISSN 1794-2470. [Consulta: 26 Diciembre 2017]. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/nova/v11n19/v11n19a07.pdf>.

OYOLA GILER, P.D. Identificación de compuestos inhibidores que se forman en el hidrolizado enzimático de celulosa y hemicelulosa presentes en cáscara de arroz. (Trabajo de titulación) (Pregrado). [En línea], Universidad Técnica de Machala, Unidad Académica de Ciencias Químicas y de la Salud. (Machala-Ecuador). 2017. pp. 20-29. [Consulta: 27 Enero 2018]. Disponible en: http://repositorio.utmachala.edu.ec/bitstream/48000/10074/1/OYOLA_GILER_PATRICIA_DOLORES.pdf.

PALLADINO, A., WAWRZKIEWICZ, M. y BARGO, F. *La fibra*. [En línea], Argentina: 2006. pp. 82-84. [Consulta: 23 Octubre 2017]. Disponible en: www.produccion-animal.com.ar.

PAZ FERREIRO, J. *Propiedades bioquímicas de suelos de prado de Galicia*. [En línea]. Santiago de Compostela-España: 2006. [Consulta: 25 Octubre 2017]. Disponible en: <https://books.google.com.ec/books?id=nul5vDjLjloC&pg=PA43&dq=enzima+celulasa&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwiSgILU8ZzSAhWLxYMKHbOjAZcQ6AEIJTAC#v=onepage&q=enzima+celulasa&f=false>.

PÉREZ CÓRDOBA, M. y MOLINA CÓRDOBA, M. “Determinación del efecto de la concentración de la celulasa, celobiasa y de naoh en la hidrólisis para la producción de etanol a partir del rastrojo de la piña”. *Portal de revistas académicas de la Universidad de Costa Rica*. [En línea], 2014. (Costa Rica) p. 1. [Consulta: 03 Marzo 2018]. Disponible en: <https://revistas.ucr.ac.cr/index.php/ingenieria/article/view/11767/15615>.

RAMÍREZ, J.R. y AYALA, M.A. “Enzimas: ¿qué son y cómo funcionan?” *Revista Digital Universitaria. revista.unam.mx*. [En línea], 2014, (México) p. 1. [Consulta: 23 Octubre 2017]. Disponible en: <http://www.revista.unam.mx/vol.15/num12/art91/#>.

RESCH, M.G., BAKER, J.O. y NREL, S.R.D. “Low solids enzymatic saccharification of lignocellulosic biomass”. *National Renewable Energy Laboratory*. [En línea], 2015, (USA) p. 4. [Consulta: 23 Octubre 2017]. [Consulta: 18 Noviembre 2017]. Disponible en: <https://www.nrel.gov/docs/fy15osti/63351.pdf>.

REYES-MURO, L., CAMACHO-VILLA, T.C. y GUEVARA-HERNÁNDEZ, F. *Rastrojos: manejo, uso y mercado en el centro y sur de México*. [En línea]. México: 2013. ISBN 978-607-37-01709. [Consulta: 13 Enero 2018]. Disponible en: https://www.zef.de/uploads/tx_zefportal/Publications/tbeuchelt_download_Rastrojos_manejo_uso_y_mercados_en_el_centro_y_sur_de_México.pdf.

ROJO, R., MENDOZA, G., MONTAÑEZ, O., REBOLLAR, S., CARDOSO, D., HERNÁNDEZ, J. y GONZÁLEZ, F. “Exogenous amylolytic enzymes in the feeding of ruminant feeders”. *Redalyc*. [En línea], 2007, (México) vol. 23, no. 2, pp. 173-182. [Consulta: 23 Octubre 2017]. Disponible en: <http://www.redalyc.org/html/154/15423208/>.

SÁEZ VEGA, A., FLÓREZ VALDÉS, L. y CADAVID RENDÓN, A. “Caracterización de una cepa nativa de *Aspergillus niger* y evaluación de la producción de ácido cítrico”. *Revista universidad EAFIT*. [En línea], 2002, (Colombia) no. 128, pp. 33-42. ISSN 0120-341X. [Consulta: 13 Octubre 2017]. Disponible en: <http://publicaciones.eafit.edu.co/index.php/revista-universidad-eafit/article/download/845/753/>.

SUÁREZ ESTRELLA, F. Persistencia y capacidad infectiva del hongo fitopatógeno fusarium oxysporum, f. Sp. Melonis en residuos vegetales de melón. (Trabajo de titulación). (Doctoral). [En línea]. Universidad de Almería, Departamento de Biología Aplicada, Área de Microbiología. (Almería-España), 2002. p. 12. [Consulta: 10 Enero 2018]. Disponible en: https://books.google.com.ec/books?id=_aZMAQAAQBAJ&pg=PA18&dq=que+son+los+residuos+vegetales&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwit-vJv7nYAhUKRyYKHSwjAJsQ6AEINjAE#v=onepage&q=que+son+los+residuos+vegetales&f=false.

USAT. *Los residuos*. [En línea]. Chiclayo-Perú: 2015. [Consulta: 26 Diciembre 2017]. Disponible en: https://issuu.com/xthyna/docs/los_residuos_2014.

ANEXOS

ANEXO A. Ficha técnica Celulasas *Aspergillus Niger* C1184 SIGMA

Código: C1184 SIGMA

Presentación: Forma de polvo.

Polvo, ≥ 0.3 unidades / mg de sólidos

Sinónimo: 1,4- (1,3: 1,4) - β -D-Glucan 4-glucanohidrolasa

Temperatura de almacenamiento: 2-8 ° C (Merk, 2018: p.1)

Acciones Biochemphysiol

La celulasa de *Aspergillus niger* cataliza la hidrólisis de los enlaces endo-1,4- β -D-glicosídicos en celulosa, lichenina, glucano de cebada y celotriosis de celuloaligosacáridos a celohexaosa. No escinde celobiosa o p-nitrofenil- β -D-glucósido. Esta enzima también escindirá el Glicosaminoglicano intacto de un péptido central hidrolizando el enlace xirosil-serina.

Definición de la unidad

Una unidad liberará 1.0 μ moles de glucosa de celulosa en una hora a pH 5.0 a 37 ° C (2 horas de tiempo de incubación).

Aplicación



La celulasa de Sigma se ha utilizado para estudiar la capacidad de varios de sus posibles Sustratos, celulosa, Avicel PH-101 y papel de filtro, para proteger la actividad enzimática durante el digestión monogástrico en los tractos digestivos de animales y aves. La enzima también ha sido aprobada como un aditivo alimentario secundario directo como una ayuda en el procesamiento de almejas y camarones.

Descripción general

La FDA reconoce la celulasa de *A. niger* como GRAS (generalmente considerada como segura) si las cepas no patógenas y no toxigénicas, así como las buenas prácticas de fabricación actuales, se usan en la producción. (Merk, 2018b: p.1.)

ANEXO B. Informe de resultados de la caracterización de los residuales lignocelulósicos (rastrajo de maíz).

MC-LSAIA-2201-04

	<p>INSTITUTO NACIONAL AUTONOMO DE INVESTIGACIONES AGROPECUARIAS ESTACION EXPERIMENTAL SANTA CATALINA DEPARTAMENTO DE NUTRICION Y CALIDAD LABORATORIO DE SERVICIO DE ANALISIS E INVESTIGACION EN ALIMENTOS Panamericana Sur Km. 1. CutuglaguaTlfs. 2690691-3007134. Fax 3007134 Casilla postal 17-01-340</p>	
---	--	---

<p>NOMBRE PETICIONARIO: Srta. Milena Olivo DIRECCION: Riobamba FECHA DE EMISION: 23 de octubre de 2017 FECHA DE ANALISIS: Del 7 al 23 de octubre de 2017</p>	<p>INFOME DE RESULTADOS No. 17-212</p>	<p>INSTITUCION: Particular ATENCION: Srta. Milena Olivo FECHA DE RECEPCION.: 06/10/2017 HORA DE RECEPCION: 08h33 ANALISIS SOLICITADO: Materia seca, cenizas, proteína, grasa, FDA, lignina</p>
---	---	---

ANÁLISIS	HUMEDAD	CENIZAS ^Ω	E.E. ^Ω	PROTEINA ^Ω	MATERIA SECA	IDENTIFICACIÓN
MÉTODO	MO-LSAIA-01.01	MO-LSAIA-01.02	MO-LSAIA-01.03	MO-LSAIA-01.04	MO-LSAIA-01.01	
METODO REF.	U. FLORIDA 1970	U. FLORIDA 1970	U. FLORIDA 1970	U. FLORIDA 1970	U. FLORIDA 1970	
UNIDAD	%	%	%	%	%	
17-1377	34,29	10,85	0,67	5,44	65,71	Rastrojo de maíz
ANÁLISIS	F.D.A. ^Ω		LIGNINA ^Ω			IDENTIFICACIÓN
MÉTODO	MO-LSAIA-02.02		MO-LSAIA-02.03			
METODO REF.	U. FLORIDA 1970		U. FLORIDA 1970			
UNIDAD	%		%			
17-1377	47,26		6,62			Rastrojo de maíz

Los ensayos marcados con Ω se reportan en base seca.
 OBSERVACIONES: Muestra entregada por el cliente

RESPONSABLES DEL INFORME


 Dr. Juan Samaniego, MSc.
 RESPONSABLE TÉCNICO .N.C.



Este documento no puede ser reproducido ni total ni parcialmente sin la aprobación escrita del laboratorio.
 Los resultados arriba indicados solo están relacionados con el objeto de ensayo

NOTA DE DESCARGO: La información contenida en este informe de ensayo es de carácter confidencial, está dirigido únicamente al destinatario de la misma y solo podrá ser usada por este. Si el lector de este correo electrónico o fax no es el destinatario del mismo, se le notifica que cualquier copia o distribución de este se encuentra totalmente prohibido. Si usted ha recibido este informe de ensayo por error, por favor notifique inmediatamente al remitente por este mismo medio y elimine la información.

ANEXO C. Realización del pre-tratamiento.

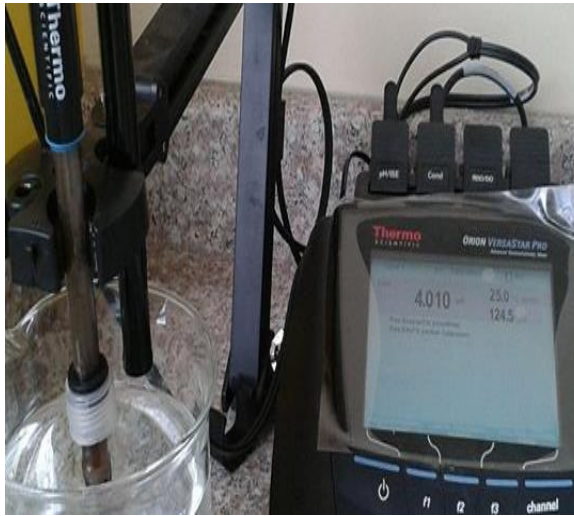


a) Proceso de digestión ácida – alcalina



b) Secado del sustrato en estufa a 45 °C, 50 °C, 55 °C y 60 °C

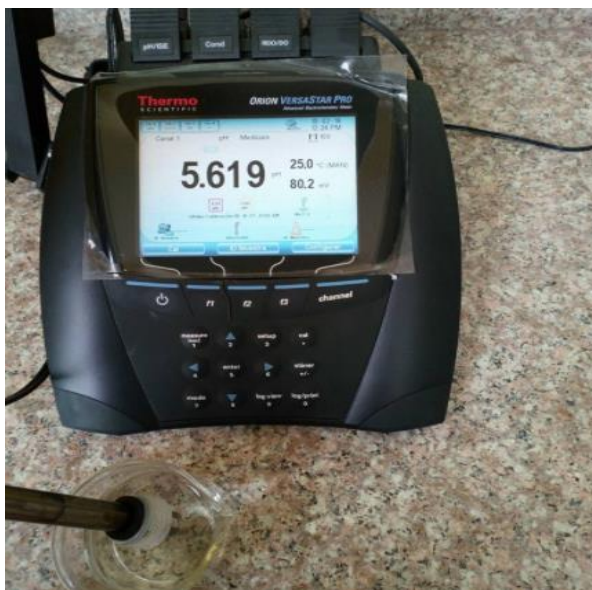
ANEXO D. Preparación de buffer pH = 4,0; 4,8; y 5,6



a) Preparación de buffer pH = 4,0

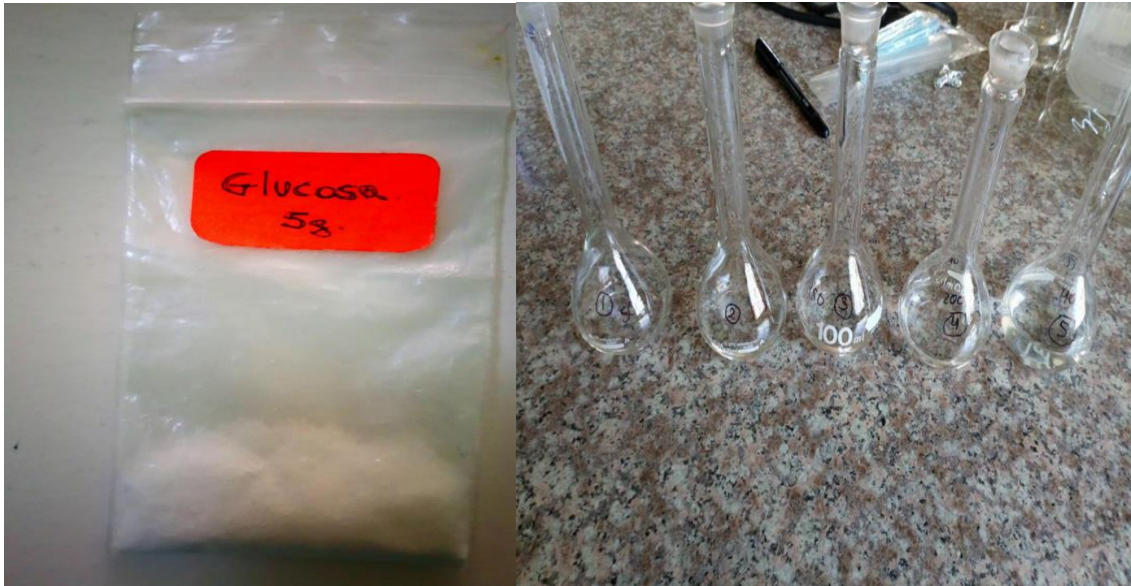


b) Preparación de buffer pH = 4,8



c) Preparación de buffer pH = 5,6

ANEXO E. Preparación de la curva de calibración.



a) Preparación de las soluciones patrones de 50, 100, 150, 200 y 400 ppm de glucosa



b) Colocación de 0,5 mL de solución patrón en tubo de ensayo.



c) Colocación de 0,5 mL de solución DNS en tubo de ensayo.



d) Tubos de ensayo sometidos a Baño María por 5 minutos.



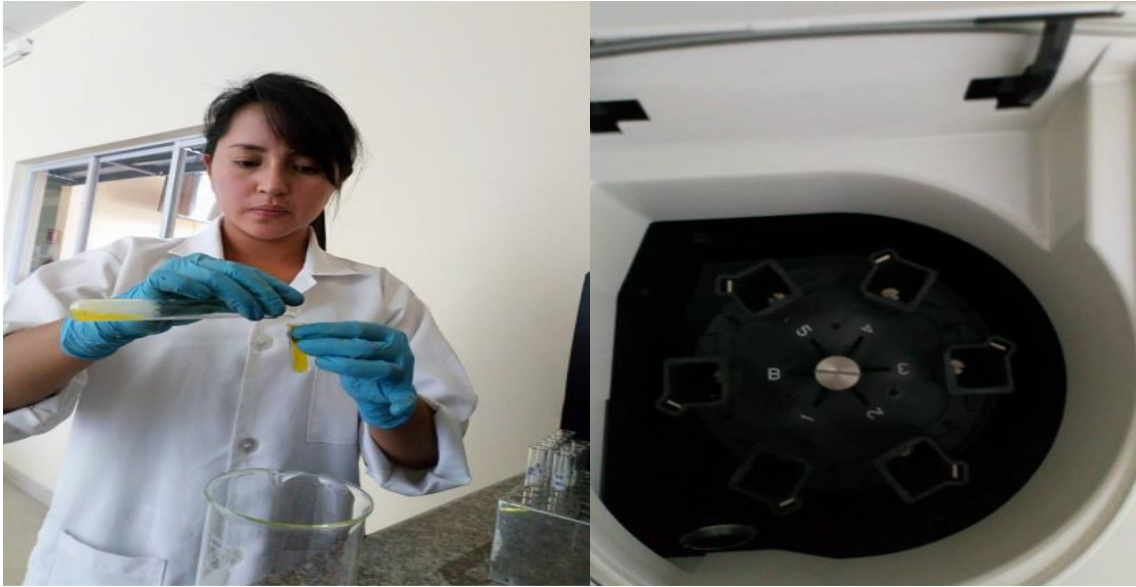
e) Tubos de ensayo enfriados en Baño de agua con hielo.



f) Aforamiento de los tubos de ensayo con 5 mL de agua destilada.



g) Reposo de los tubos de ensayo por 15 minutos.



h) Lectura de las absorbancias de las soluciones en el espectrofotómetro.

ANEXO F. Realización de la hidrólisis enzimática.



a) Sustratos no tratados y pre – tratados sometidos a los diferentes buffer junto con la enzima celulasa.



b) Colocación de los erlenmeyers con las soluciones a hidrolizar en el Shaker para su incubación a 37 °C y 150 rpm durante 24, 48 y 72 h

ANEXO G. Lectura de absorbancias de los hidrolizados en el espectrofotómetro.



a) Toma de 10 mL de la muestra hidrolizada.



b) Muestras hidrolizadas y centrifugadas
DNS.

c) Colocación de 0,5 mL de solución centrifugada y 0,5 de solución



d) Tubos de ensayo sometidos a Baño María por 5 minutos.



e) Tubos de ensayo enfriados en Baño de agua con hielo.



f) Aforamiento de los tubos de ensayo con 5 mL de agua destilada.



g) Reposo de los tubos de ensayo por 15 minutos.



h) Lectura de las absorbancias de las soluciones en el espectrofotómetro.