



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA

APROVECHAMIENTO DE LA
CÁSCARA DE COCO EN LA
OBTENCIÓN DE PRODUCTOS
DE ALTO VALOR AGREGADO

TESIS
PARA OBTENER EL TÍTULO DE
INGENIERA QUÍMICA

PRESENTA
JESSICA VALERIA CRUZ AGUIRRE

CIUDAD UNIVERSITARIA, CDMX

AÑO 2017





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE : Profesor : Eduardo Bárzana García

VOCAL: Profesor : Óscar Hernández Meléndez

SECRETARIO: Profesor: José Agustín García Reynoso

1er. SUPLENTE: Profesora: Carmina Montiel Pacheco

2do. SUPLENTE: Profesor: Rubén Peláez Zapata

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA

LABORATORIO DE INGENIERÍA QUÍMICA

ASESOR DEL TEMA :

ÓSCAR HERNÁNDEZ MELÉNDEZ

SUSTENTANTE :

JESSICA VALERIA CRUZ AGUIRRE

Índice

Resumen	1
Antecedentes	2
El mercado de la palma de coco en México	3
El residuo del fruto del cocotero: una nueva oportunidad	6
Pretratamientos para biomasa lignocelulósica.....	10
Sacarificación enzimática	15
Objetivos	17
Objetivo general.....	18
Objetivos particulares	18
Hipótesis	19
Materiales y metodología	20
Caracterización del cóctel enzimático.....	20
Pretratamiento general de la cáscara de coco	26
Caracterización de la cáscara de coco.	26
Manejo de los materiales pretratados en el reactor	30
Caracterización de los productos crudos y pretratados	32
Hidrólisis enzimática	33
Resultados y análisis	34
Caracterización de la enzima	34
Pretratamiento y caracterización general del material.....	37
Pretratamiento general en un reactor termo-mecano-químico y posterior filtración con malla.	43
Hidrólisis enzimática del material sin tratamiento.....	46
Hidrólisis enzimática de los materiales pretratados, neutralizados y filtrados con malla.....	48
Análisis DRX de materia prima y las muestras tratadas.	54
Conclusiones	60
Recomendaciones	62
Anexo A	63
Anexo B	65
Bibliografía	67

Índice de figuras

Figura 1. Cadena de producción del coco en México (SAGARPA, 2008).....	4
Figura 2. Partes del coco (Abaunza Érika y cols., 2004).	7
Figura 3. Composición general de la biomasa lignocelulósica	8
(modificado de Gosselink y cols., 2012).....	8
Figura 4. Método de Bradford, ensayo de 5 mL (Bradford, 1976). 22	

Figura 5. Método de determinación de la actividad de las celulasas mediante papel Whatman No 1	23
Figura 7. Método de determinación de la actividad de xilanolítica (tomado de Bailey y cols., 1992)	25
Figura 8. Método Van Soest modificado (Adaptado de Pimentel, 2013).....	28
Figura 9. Método experimental de la hidrólisis enzimática.	33
coctel enzimático	35
Figura 10. Tipos de material después del tamizado. A. Polvo B. Fibra corta C. Material mixto.	38
Figura 11. Porcentaje del peso total obtenido para cada tipo de material	38
Figura 12. Composición proximal de la fracción polvo. (CS: compuestos solubles, HC: hemicelulosa, Cel.; celulosa, Min: minerales).....	40
Figura 13. Composición proximal de la fracción mixto. (CS: compuestos solubles, HC: hemicelulosa, cel; celulosa, Min: minerales).....	40
Figura 14. Composición proximal de la fracción Fibra. (CS: compuestos solubles, HC: hemicelulosa, cel; celulosa, Min: minerales).....	41
Figura 15. Densidad de los materiales después de la molienda	43
Figura 16. Porcentaje de minerales en función de la temperatura del pretratamiento al emplear una disolución de hidróxido de sodio 2.5% m/m.	44
Figura 17. Porcentaje de compuestos orgánicos solubles en función de la temperatura para el pretratamiento a concentración constante (NaOH 2.5% m/m).....	45
Figura 18. Porcentaje de compuestos orgánicos solubles en función de la concentración de hidróxido de sodio para el pretratamiento a temperatura constante (90°C).....	46
Figura 19. Porcentaje de azúcares generados en la sacarificación enzimática del material sin pretratamiento fisicoquímico.....	47
Figura 20. Porcentaje de conversión a azúcares reductores en función de la concentración del hidróxido de sodio en el pretratamiento a temperatura constante (90°C).....	49
Figura 21. Porcentaje de conversión a azúcares reductores en función de la temperatura del pretratamiento a concentración constante de NaOH (2.5% m/m).....	51
Figura 22. Porcentaje de conversión a glucosa en función de la temperatura del pretratamiento a concentración constante (NaOH 2.5% m/m).	52
Figura 23. Porcentaje de conversión a glucosa en función de la concentración de la base a temperatura constante (90°C).....	53
Figura 24. Difractograma de materias primas nativas.....	55

Figura 25. Difractograma de fibra bajo las condiciones de pretratamiento con sosa 3.25% a una temperatura de 50°C (color rojo) y 90°C (color verde).	57
Figura 26. Difractograma de rayos X para el material mixto bajo la condiciones de pretratamiento con sosa 1.25% (color rojo) y 3.25% (color verde) a una temperatura de 50°C.	59
Figura 27. Difractograma de rayos X para el material "polvo" bajo las condiciones de pretratamiento con sosa 1.25% (color rojo) y 3.25% (color verde) a una temperatura de 50°C.	60
Figura 28. Curva de calibración de glucosa para tratamientos con DNS para prueba FPU (Filter Papee Unit) y pruebas para actividad enduglocanasa.	63
Figura 29. Curva de calibración de proteína para método de bradford	64
Figura 30. Curva de calibración de xilanasa para el método de medición de actividad de enzimas xilanólíticas	64

Índice de tablas

Tabla 1. Composición del coco (Abaunza Érika y cols., 2004).	7
Tabla 2. Concentraciones de las soluciones de enzima utilizadas.	21
Tabla 3. Condiciones de trabajo para el pretratamiento en el reactor termo-mecano-químico.	31
Tabla 4. Cantidad de azúcares reductores y proteína presentes en el coctel enzimático	35
Tabla 5. Actividad celulolítica para el coctel NS-22192.	36
Tabla 6. Actividad endoglucanolítica para el coctel NS-22192.	36
Tabla 7. Actividad de xilanasas en el coctel NS-22192.	37
Tabla 9. Resultados generales de caracterización	65
Tabla 10. Resultados generales de la hidrólisis enzimática	66

Resumen

El problema actual y creciente del uso parcial de nuestros recursos ha mermado nuestra economía y nos obliga como ciudadanos a buscar alternativas para obtener el mayor provecho de los mismos. Uno de los grandes cultivos en México es la palma de coco, ya que se siembra 0.25% de la producción mundial. Sin embargo, por la baja en el precio de la copra (mercado principal del coco) se han descuidado estos cultivos.

La literatura científica generada en México en los últimos años y el banco de tesis de la UNAM no cuentan con registros de usos modernos para la cáscara de coco en la industria alimentaria, y su venta directa no es un mercado llamativo para reanimar la inversión en la palma de coco.

Es importante el desarrollo de nuevas técnicas biotecnológicas sustentables para obtener productos con valor agregado a partir de la cáscara de coco. Un ejemplo puede ser la producción de etanol carburante, como reportaron Ferreira-Leitao y cols., 2010.

Así, la presente tesis muestra los resultados de la caracterización de la cáscara de coco y de la hidrólisis enzimática posterior a tres diferentes tratamientos

fisicoquímicos. Para ello, se determinó la cantidad de compuestos solubles, hemicelulosa, lignina, celulosa, minerales, humedad, cantidad de azúcares reductores y glucosa presente en cada muestra.

De los ensayos realizados modificando variables como temperatura, concentración de la base y/o compuestos solubles, se establecieron condiciones experimentales óptimas que permiten liberar una mayor concentración de azúcares reductores en comparación con las materias primas crudas.

Antecedentes

A partir de la palma de coco se pueden elaborar más de 100 productos, que van desde utensilios simples de uso local hasta productos de valor agregado, como el agua de coco, que tuvo un mercado de 400 millones de dólares en 2013 en los Estados Unidos Americanos (Sánchez Teyer, 2016).

De acuerdo con la información que SAGARPA proporciona en 2012, México se colocó como el séptimo productor en el mundo de este cultivo, ya que se produjeron poco más de 165 mil toneladas, equivalentes al 0.25% de la producción mundial.

Sin embargo, la situación actual de las plantaciones de coco no es muy favorable; su rentabilidad ha disminuido debido a la baja inversión para enfrentar la enfermedad de la palma de

coco conocida como el amarillamiento letal, el envejecimiento de las plantaciones y, por otro lado, los bajos precios de la copra en el mercado nacional.

Derivado de ello, se requiere la aplicación de la ciencia y la tecnología para estudiar los diversos eslabones de la cadena productiva e incrementar la competitividad de las empresas existentes. Esto puede lograrse a través de la apertura de nuevas líneas de producción con la materia prima ya disponible.

El mercado de la palma de coco en México

De acuerdo con la información que SAGARPA en 2008 proporcionó, los estados de Jalisco, Nayarit, Michoacán, Oaxaca, Sinaloa y Yucatán son las entidades responsables de más del 90% de la producción nacional del fruto de coco.

En nuestro país la diversidad genética disponible comprende tres ecotipos, que corresponden a los principales acervos genéticos a nivel mundial: 1, 2 y 3. Un eco tipo enano con dos linajes: francés (Costa de Marfil) e inglés (Jamaíquino).

Los eco tipos altos presentan diferente comportamiento ante una de las problemáticas más grandes para la palma de coco: el amarillamiento letal. El ecotipo 2 muestra mayor tolerancia, y corresponde al que se muestra en la Figura 1, y por ello será

el tipo de cocotero que se estudiará en la presente tesis (Plan Rector Sistema Producto Nacional Palma de coco, 2012).

En México, el empleo principal de la palma de coco es su fruto. Los productos obtenidos de éste se dividen como lo muestra la Figura 1.

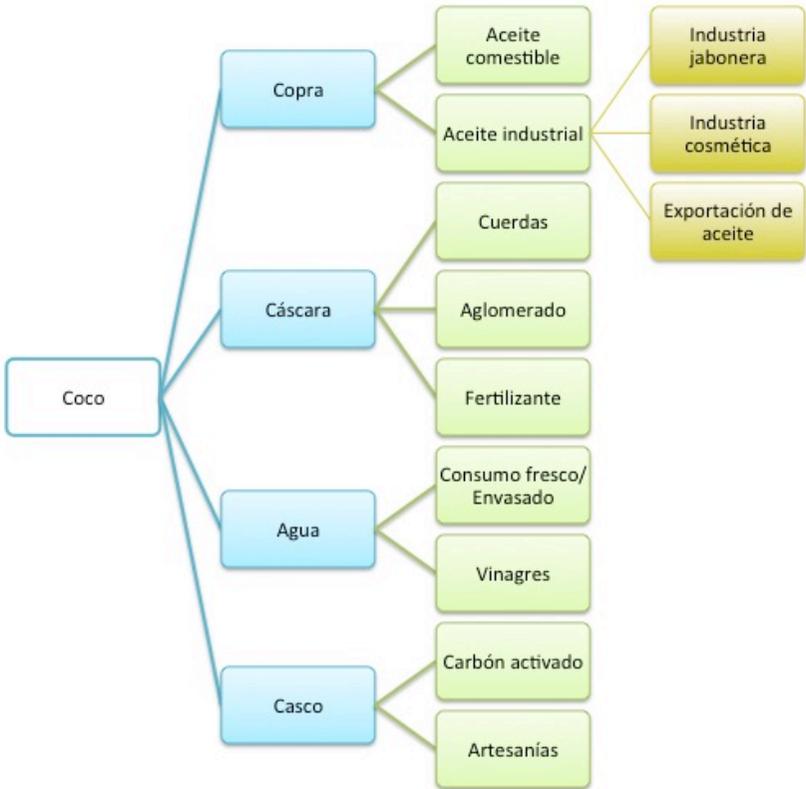


Figura 1. Cadena de producción del coco en México (SAGARPA, 2008).

Las aplicaciones del fruto de coco en la industria cosmética se deben al alto contenido de ácido láurico en la copra. Las propiedades medicinales del fruto de coco también han sido ampliamente estudiadas (Yong y cols., 2009). Sorprendentemente el fruto de coco involucra a la industria automotriz y a la del petróleo, pues el aceite de coco puede ser usado como combustible en forma de biodiesel (Ma y Hanna, 1999). En condiciones de temperatura alta puede sustituirlo totalmente, y en sitios con temperatura inferior a los 25°C se le puede mezclar con diesel de petróleo para evitar que se solidifique y dañe el motor.

Por otro lado, la fibra que se extrae de la cáscara es muy resistente, por lo que se emplea en la fabricación industrial de tejido de cuerdas y amarres para barcos, tapetes o hasta cepillos (Artifibras, 2016).

En la agricultura, la cáscara se aprovecha como abono en el cultivo de hortalizas y es especialmente nutritiva para las orquídeas. La fibra que sobra después de su procesamiento, así como las hojas de la palma, pueden aprovecharse como alimento para ganado en épocas de sequía (Ferreira-Leitao y cols., 2010). En la industria química, la cáscara dura o casco también puede ser aprovechada para producir carbón activado (Cobb y cols., 2012).

Recientemente se publicó un trabajo de investigación original en Brasil, en el cual se menciona que la cáscara de coco se compone principalmente de lignina y celulosa, con una composición química muy similar a las maderas. En tal comparación, la cáscara del coco puede emplearse como fuente de compuestos fenólicos, en la producción de extractos útiles para el añejamiento artificial de bebidas alcohólicas (Rodrigues y Pinto, 2007).

Otra aplicación reciente y escasa para este subproducto, es la obtención de un material del tipo compuesto parcialmente biodegradable, adicionando a éste residuo una resina epóxica (Sarki y cols., 2011).

El empleo comercial principal de la fibra de coco se ha visto afectada por diferentes sustitutos sintéticos como el PET o el propileno. En 1999 la fibra de coco tuvo un mercado de 4.3 millones de dólares en los EUA, mientras que el del aceite de coco fue de 253 millones de dólares (Sánchez Feyer, 2016).

El residuo del fruto del cocotero: una nueva oportunidad

El fruto del cocotero es una drupa menosperma, es decir, un fruto carnoso que tiene una sola semilla encerrada en un hueso duro. El coco se compone de 4 partes esenciales: agua, copra, endocarpio y cáscara en las siguientes proporciones.

Tabla 1. Composición del coco(Abaunza Érika y cols., 2004).

Componente	Porcentaje de composición
Agua	12
Copra	30
Endocarpio	15
Cáscara	43

La cáscara se divide en epidermis lisa, que es la parte más externa de este fruto; y en mesocarpio espeso, que se aprecia como la parte fibrosa del coco.

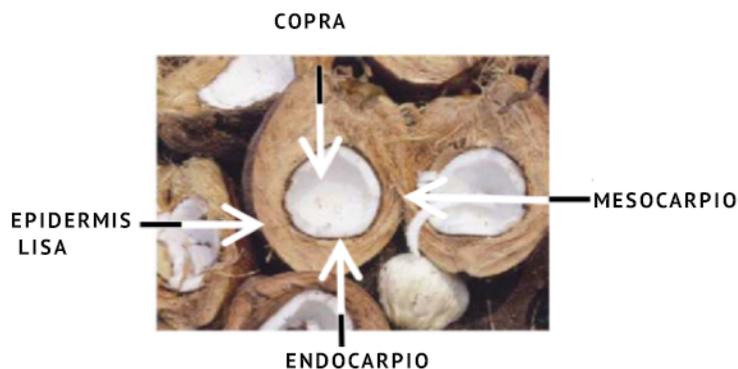


Figura 2. Partes del coco (Abaunza Érika y cols., 2004).

La fibra de coco, como cualquier biomasa lignocelulósica, se compone de tres polímeros diferentes: celulosa, hemicelulosa y lignina.

La estructura de este tipo de materiales es generalmente resistente a la hidrólisis enzimática, ya que las fibras de celulosa están protegidas por una matriz de lignina.

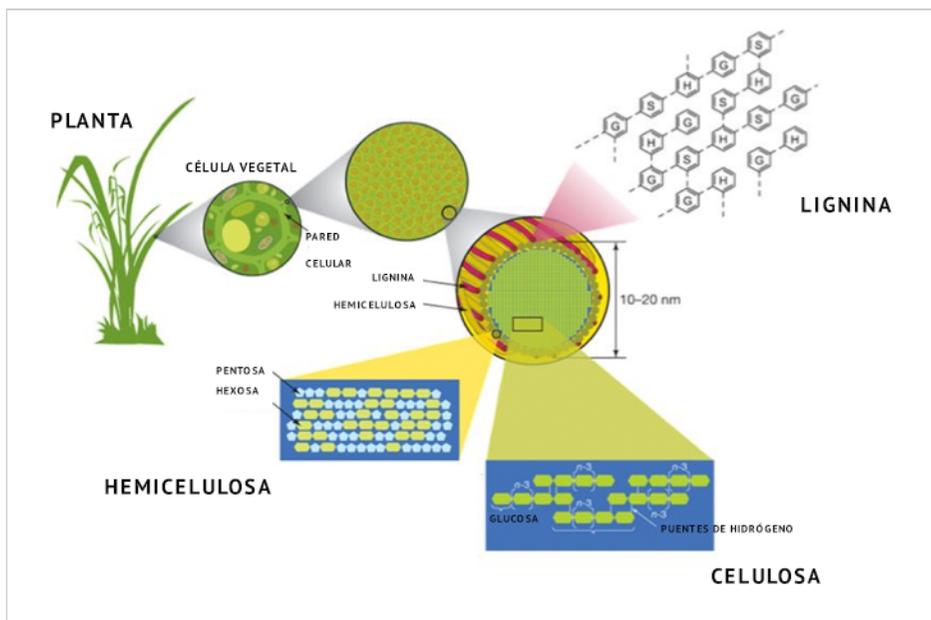


Figura 3. Composición general de la biomasa lignocelulósica (modificado de Gosselink y cols., 2012).

Celulosa

La celulosa es un homopolímero formado por unidades de glucosa unidas por enlaces glucosídicos beta-1,4. Típicamente, los puentes de hidrógeno entre las cadenas de celulosa dan lugar a una matriz cristalina. El grado de cristalinidad, es una medida indirecta de su grado de compactación y, por lo

general, éste parámetro varía de 0 a 100% (Benguin y cols., 1994).

Bajo condiciones normales la celulosa es insoluble en agua, una propiedad necesaria para que funcione como soporte estructural en las paredes celulares de las plantas (Wyman y cols., 2005).

Hemicelulosa

La hemicelulosa se clasifica de acuerdo al residuo principal de azúcar de cinco carbonos de la cadena principal, por ejemplo, los tres tipos más comunes son: xilanos, mananos y arabinanos, siendo los primeros dos los más prevalentes (Wyman y cols., 2005).

La adhesión mutua entre la celulosa y la hemicelulosa se debe a la presencia de puentes de hidrógeno y fuerzas de van der Waals (Wyman y cols., 2005), además de otros enlaces mediados por boro y/o calcio.

Lignina

La lignina es una molécula altamente ramificada y cuya base monomérica es una unidad de fenil-propano unida por diferentes enlaces, que incluyen los del tipo alquilo-arilo, alquilo-alquilo, arilo-arilo.

La lignina está ligada usualmente a la celulosa formando

estructuras complejas. Tanto estos complejos como la lignina sola son importantes ya que le dan a las células vegetales la resistencia característica a los ataques microbianos y a los agentes químicos (Balat y Balat, 2008).

Pretratamientos para biomasa lignocelulósica.

Las fuentes de biomasa lignocelulósica son cada día más amplias y cada una de ellas cuenta con distintas características, como el porcentaje lignina, celulosa, entre otras. Por ello, es necesario adoptar un pretratamiento adecuado para cada materia prima (Alvira y cols., 2010).

El propósito de implementar un pretratamiento a la biomasa es para aumentar su accesibilidad, es decir, romper la estructura de la lignina, disminuir la cristalinidad de la celulosa y reducir el tamaño de las partículas, entre otras. De esta forma, se mejora la producción de azúcares, posterior a un proceso de sacarificación química o enzimática (Alvira y cols., 2010).

Otros dos puntos de gran importancia para la elección de un pretratamiento es evitar la formación de productos inhibitorios para la hidrólisis enzimática (o para la fermentación posterior) y que tenga una relación costo-beneficio efectiva (Negro y cols., 2003).

Los pre-tratamientos pueden ser clasificados como biológicos, físicos, químicos y fisicoquímicos (Alvira y cols., 2010).

Procesos biológicos

La degradación de lignina bajo la acción de hongos blancos es el pretratamiento biológico de mayor efectividad gracias a las enzimas peroxidasas. El proceso biológico ofrece una baja inversión en la adquisición de equipo y sus condiciones de operación son intermedias. Su gran desventaja es la baja velocidad de la hidrólisis que se obtiene en comparación con otros tratamientos tradicionales (Alvira y cols., 2010).

Tratamientos físicos

Los tratamientos físicos son útiles para reducir el tamaño de las partículas y el grado de cristalinidad. Ejemplos son: molinos de bolas, molinos de rodillos, molinos de martillos, molienda coloidal y molienda vibro-energética. Los requerimientos de energía para operar son muy elevados, lo que complica su viabilidad económica (Alvira y cols., 2010).

Tratamiento químico

Los tratamientos químicos son variados e incluyen la hidrólisis alcalina y ácida, la ozonólisis, el proceso organosolvente, empleo de líquidos iónicos, etc.

En particular, el empleo de álcalis favorece la solubilización de la hemicelulosa y la lignina, y presenta un costo relativamente bajo. El hidróxido de sodio provoca el hinchamiento de la

matriz lignocelulósica, disminuyendo el grado de polimerización y de cristalinidad, lo que se traduce en la destrucción de la biomasa lignocelulósica. (Alvira y cols., 2010).

Por su parte, la hidrólisis ácida requiere de reactores resistentes a la corrosión y que el ácido concentrado sea recuperado posterior ala hidrólisis, para hacer el proceso más accesible en términos económicos (Sun y Cheng, 2002). Los ácidos concentrados pueden formar compuestos inhibitorios para las levaduras cuando se pretende producir etanol(Alvira y cols., 2010). Es factible realizar el pretratamiento a altas temperaturas (180°C), implementando tiempos de residencia cortos, o mediante temperaturas moderadas (120°C) y tiempos de residencia más largos.

La ozonólisis es una opción llamativa porque degrada la lignina de forma muy efectiva, por lo que se incrementa el rendimiento de la hidrólisis enzimática (Alvira y cols., 2010). Su segundo aspecto de viabilidad recae en que la reacción se puede llevar a temperatura ambiente. Sin embargo, este método no es muy usado, ya que se requieren grandes cantidades de energía eléctrica para generar el ozono y esto lo hace muy costoso (Sun y Cheng, 2002).

El proceso organosolvente resulta al mezclar un disolvente orgánico y un ácido inorgánico que actúa como catalizador,

con el fin de romper la estructura de la lignina y los enlaces lignina-hemicelulosa. La gran ventaja que ofrece es la posible recuperación de la lignina como subproducto, la cual tiene diversas aplicaciones en la industria (Alvira y cols., 2010).

Hoy en día uno de los pretratamientos más prometedores son los líquidos iónicos, éstos son sales orgánicas compuestas por diversos tipos de cationes y una pequeña cantidad de aniones inorgánicos. Presentan temperatura de fusión relativamente baja. Se requiere de investigaciones futuras para mejorar los aspectos económicos del empleo de líquidos iónicos a una escala industrial (Alvira y cols., 2010; Bautista, 2013).

Tratamientos físico-químicos

Finalmente, los tratamientos fisicoquímicos más comunes son la explosión de fibras con amoníaco (AFEX, por sus siglas en inglés), explosión con vapor y explosión con bióxido de carbono en estado supercrítico.

Para el primero, la materia lignocelulósica es expuesta a amoníaco líquido a alta temperatura y presión por un periodo de tiempo, posteriormente, la presión es reducida repentinamente. Este procedimiento disminuye el grado de cristalinidad de la celulosa y rompe los enlaces lignina-carbohidratos, sin embargo, sólo una pequeña cantidad de la materia sólida es solubilizada y pocas cantidades de hemicelulosa y lignina son removidas. Esta opción se debe

analizar con cautela, considerando la protección del medio ambiente, lo que implica que el amoniaco se debe reciclar (Alvira y cols., 2010).

En el método de explosión con vapor de agua las fibras pequeñas de la materia lignocelulósica son puestas en contacto con vapor saturado a alta presión durante un cierto tiempo, posteriormente, la presión es reducida rápidamente, provocando que la materia se someta a una descompresión explosiva. Esto causa la transformación y degradación de la lignina por la acción de la temperatura alta, lo que incrementa el potencial para hidrolizar la celulosa (Sun y Cheng, 2002; Moreno, 2011).

El método de explosión con bióxido de carbono en estado supercrítico puede remover efectivamente la lignina e incrementar la digestibilidad del sustrato (Alvira y cols., 2010). Además, el dióxido de carbono es fisiológicamente seguro y no es costoso (Zheng y cols., 1998). Los esfuerzos actuales por desarrollar este método aún no garantizan su viabilidad económica (Pimentel, 2013).

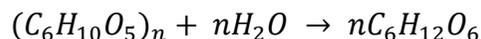
Sacarificación enzimática

Después de abrir la matriz lignocelulósica, los carbohidratos deben ser convertidos en azúcares simples para su posterior transformación. Existen dos caminos para llegar a azúcares simples: la hidrólisis química o la hidrólisis enzimática.

En el caso de la hidrólisis química, la reacción es catalizada por un ácido diluido o concentrado, sin embargo, existe el riesgo de formar sustancias como el furfural o el hidroximetilfurfural al implementarse altas temperaturas.

El empleo de enzimas tiene numerosas ventajas, requieren condiciones moderadas de pH y de temperatura (318-323 K), costos de mantenimiento bajos comparados con la vía química y no tienen problemas de corrosión (Balat y cols., 2008). Los productos de esta hidrólisis llevada a cabo de manera óptima son usualmente azúcares reductores incluyendo a la glucosa (Shun y Cheng, 2002).

Los carbohidratos glucanos, galactanos y mananos siguen al igual que la celulosa la siguiente estequiometría en la reacción:



La hidrólisis enzimática es un proceso complejo porque toma lugar en la interfase sólido-líquido. Cuando el sistema de

enzimas actúa sobre el sustrato celulósico insoluble, ocurren tres procesos simultáneamente:

1) Cambios físicos y químicos en la fase sólida(aún no solubilizada).

2) Hidrólisis primaria: liberación de intermediarios solubles a partir de la superficie de las moléculas de celulosa reaccionantes.

3) Hidrólisis secundaria: hidrólisis de intermediarios solubles a intermediarios de bajo peso molecular como la celobiosa y, finalmente, en glucosa (Balat y cols., 2008).

De hecho, se ha demostrado que las enzimas celulasas también se unen permanentemente a la lignina, formando complejos enzima-lignina, lo cual reduce la cantidad de enzima disponible para actuar sobre la holocelulosa (Wyman y cols., 2005).

Por lo menos hay tres grandes grupos de enzimas celulasas involucradas en el proceso de hidrólisis:

- (1) endoglucanasas (EG, endo 1,4-D-glucohidrolasa, o EC 3.2.1.4.).
- (2) exoglucanasas o celobiohidrolasas (CBH, celobiohidrolasa 1,4- β -D-glucano, o EC 3.2.1.9.1).
- (3) β -glucosidasas (EC 3.2.1.21).

Las primeras atacan regiones de baja cristalinidad de la celulosa para crear terminales libres. Posteriormente, las segundas degradan la molécula por la eliminación de las unidades de celobiosa provenientes de las cadenas terminales libres. Finalmente, las terceras hidrolizan a la celobiosa para producir glucosa. Cabe resaltar que hay enzimas auxiliares de gran valor que pueden estar presentes en la mezcla y que atacan a la hemicelulosa, por ejemplo, feruloilestearasas o xilanasas. La estructura de la hemicelulosa hace su hidrólisis enzimática un proceso de mayor complejidad comparado con el de la celulosa, requiriendo un mayor grado de coordinación entre las enzimas involucradas. Particularmente, la acción de las enzimas xilanasas es más compleja porque el xilano es estructuralmente más complejo que otros polisacáridos presentes en las células vegetales (Wyman y cols., 2005).

Objetivos

El grupo de investigación encabezado por el Dr. Eduardo Bárzana García se ha dedicado a estudiar por casi dos décadas la síntesis de materiales a partir de residuos agroindustriales, así como la producción de bioetanol a partir del bagazo residual producido por la industria del tequila. Como parte de este esfuerzo se adquirió un reactor temo-mecano-químico a partir de una colaboración internacional financiada por la Comunidad Europea. En dicha plataforma se

procesan de manera óptima diversos residuos lignocelulósicos y ha sido fuente de diversos resultados en publicaciones y patentes(Vilarem y cols., 2013, 2014 y 2015).

Objetivo general

Evaluar el potencial, es decir, la cantidad de azúcares reductores del material resultante de un pretratamiento alcalino de la cáscara de coco (mesocarpio) cuando se emplea un reactor termo-mecano-químico disponible en el laboratorio.

Objetivos particulares

1. Determinación de la composición proximal de la cáscara del coco (Ecotipo 2) implementando el método de Van Soest y Wine para cuantificar los diferentes constituyente como compuestos solubles, hemicelulosa, lignina, celulosa y minerales.
2. Pretratamiento mediante un reactor termo-mecano-químico para el mesocarpio de coco implementando diseños experimentales factoriales 2^3 para las variables:
 - 1) Concentración de la disolución alcalina de hidróxido de sodio.
 - 2) Temperatura en el reactor.

3. Evaluación de la composición proximal de los materiales procesados (posterior a la neutralización con ácido fosfórico) mediante el método de Van Soest y Wine. Cuantificar nuevos componentes orgánicos solubles.
4. Caracterización de la actividad enzimática de un coctel celulolítico disponible en el laboratorio.
5. Evaluación del rendimiento en la hidrólisis enzimática de los materiales pretratados y neutralizados para obtener azúcares reductores.

Hipótesis

Al aplicar un pretratamiento alcalino en combinación con un reactor termo-mecano-químico, la estructura cristalina de la celulosa presente en el mesocarpio del coco cambiará y permitirá aumentar la cantidad de azúcares reductores obtenidos en un proceso de hidrólisis enzimática en comparación con aquellos obtenidos del residuo crudo.

Materiales y metodología

Caracterización del cóctel enzimático

Los siguientes métodos se usaron para identificar la capacidad de desdoblamiento de material lignocelulósico por parte del cóctel NS-22192.

El Coctel NS-22192 (donación a la Facultad de Química por la empresa danesa Novozymes en el año 2014) disponible en el laboratorio fue tomado como biocatalizador de referencia para el desarrollo de éste trabajo. Dicho complejo enzimático ha sido empleado exitosamente en el desdoblamiento de bagazo de agave mezcalero y en residuos de madera y sorgo (Caspeta, 2014; Cavalaglio, 2016; Trulea, 2016).

Acondicionamiento de la enzima

Se realizaron 10 diluciones a partir del coctel inicial para tener diferentes puntos de medición en los siguientes experimentos (Ghose. 1987). Dichas disoluciones se realizaron tomando 0.5 mL de cada disolución anterior y agregando 0.5 mL de citrato de sodio 0.05 M. Las concentraciones que se obtuvieron se muestran en la tabla 3.

Tabla 2. Concentraciones de las soluciones de enzima utilizadas

No. de Solución	Concentración (mL de enzima/ mL de buffer)
1	0.5
2	0.25
3	0.125
4	6.25 E-02
5	3.13 E-02
6	1.56 E-02
7	7.81 E-03
8	3.91 E-03
9	1.95 E-03
10	9.77 E-04

Determinación de proteína (Bradford, 1976)

En este trabajo se utilizó un colorante hidrofóbico conocido como reactivo de Bradford (Bio-Rad Laboratories, Inc. California EUA), cuyas disoluciones en presencia de una

proteína viran al color azul, cuya intensidad puede medirse en un espectrofotómetro (Perkin Elmer, EUA) a una longitud de onda de 595 nm.

La curva de calibración se realizó con suero de albúmina bovina (Sigma Aldrich, EUA) en un rango de concentración 0.2 a 1.0 mg/mL. Se preparó una disolución madre formada por 10 miligramos de suero y 10 mL de una disolución de buffer de citrato 0.05 molar. Se realizaron las diluciones necesarias para ajustar la curva patrón de proteína en el intervalo mencionado.

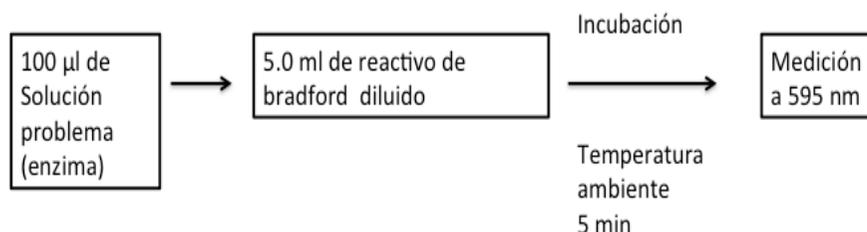


Figura 4. Método de Bradford, ensayo de 5 mL (Bradford, 1976).

Actividad enzimática(Ghose, 1987)

Actividad celulasa / análisis de papel filtro Whatman No.1

Para cada concentración de enzima previamente mencionada se realizó la prueba FPU(Filter Paper Units por sus siglas en

inglés) con las cantidades mostradas en la Tabla 2 y en la Figura 5.

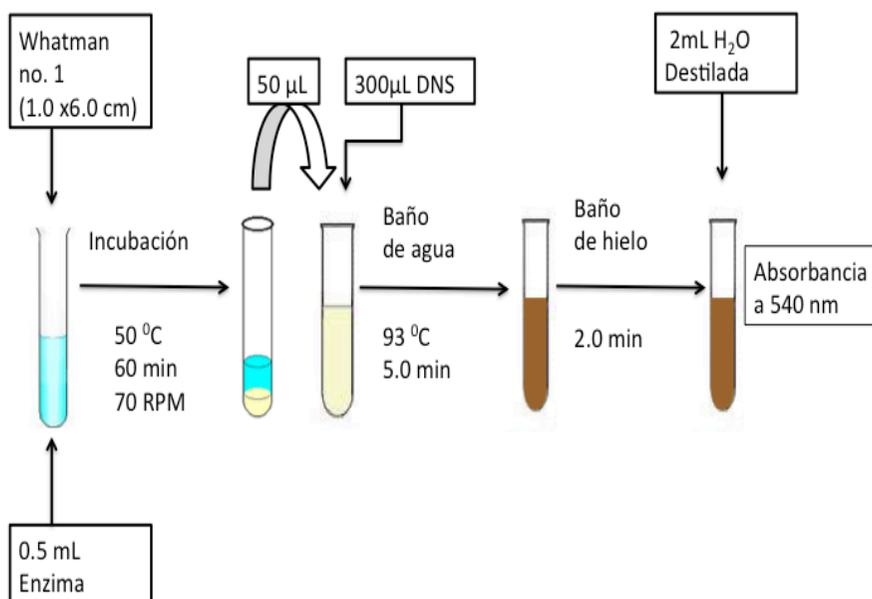


Figura 5. Método de determinación de la actividad de las celulasas mediante papel Whatman No 1.

Notas:

Los estándares de glucosa se prepararon en un rango de 1mg/0.5 mL a 0.25 mg/0.5 mL y fueron los mismos que se emplearon para las pruebas con el sustrato de carboximetilcelulosa. Adicionalmente se prepararon las siguientes muestras. A) Blanco cero: buffer Citrato 0.05 M en misma cantidad que muestras problema. B) Blanco de enzima: disolución de la enzima en buffer citrato 0.05M en la misma cantidad que las muestras problema.

El cálculo de unidades se realizó de acuerdo con la fórmula:

$$\text{FPU} = \frac{0.37}{\text{concentración de enzima que produzca 2.0 mg de glucosa}}$$

Actividad Endoglucanasa mediante el sustrato carboximetilcelulosa(Ghose, 1987)

Nuevamente, para cada concentración previamente mencionada se realizó la prueba con carboximetilcelulosa (CMC) (Sigma-Aldrich, EUA) como sustrato según muestra la figura 6, mediante las diluciones mostradas en la Tabla 2.

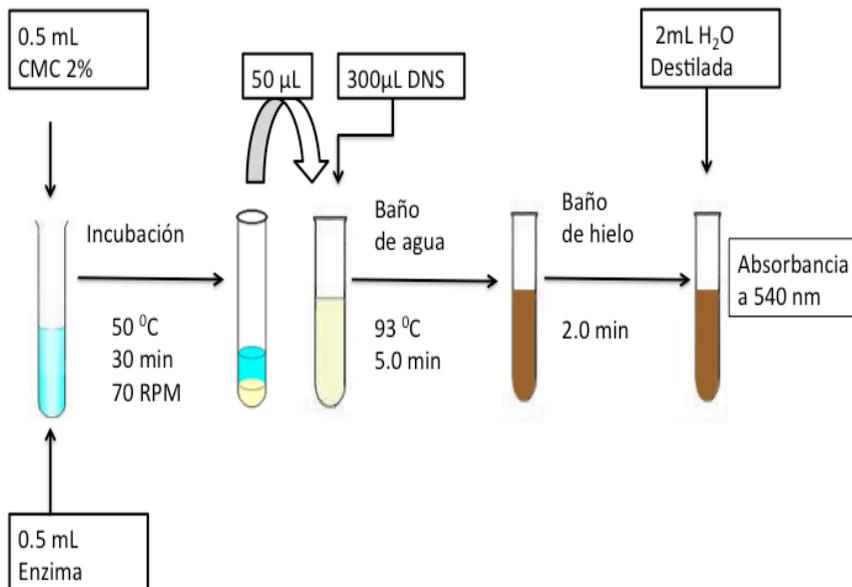


Figura 6. Método de determinación de actividad de las endoglucanasas mediante CMC como sustrato

Se consideraron las mismas definiciones y consideraciones para los blancos de enzima y blanco cero que en la prueba FPU.

Cálculo de unidades:

$$\text{CMC} = \frac{0.185}{\text{concentración de enzima que produzca 2.0 mg de glucosa}}$$

Actividad de las enzimas xilanólicas (Bailey y cols., 1992)

Para cada concentración previamente mencionada (Tabla 3) se realizó la prueba de determinación de actividad xilanólica mediante el esquema mostrado en la Figura 7.

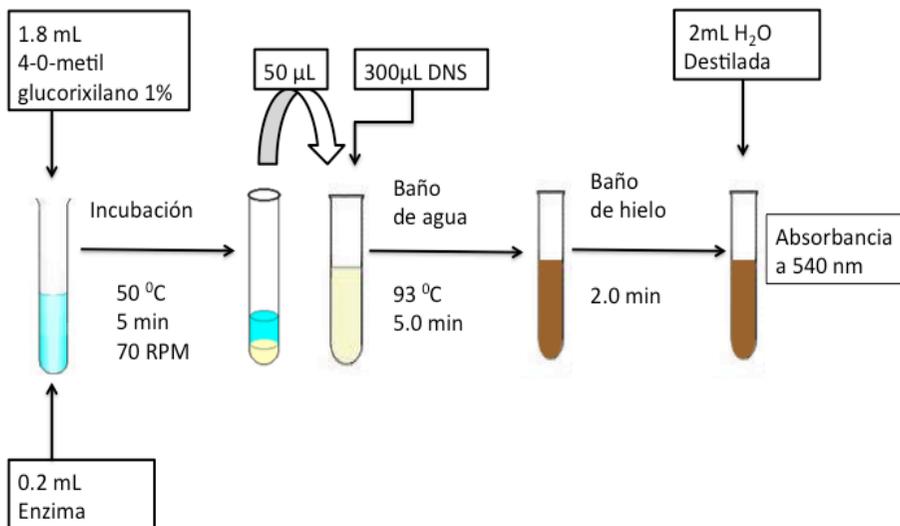


Figura 7. Método de determinación de la actividad de xilanólica (tomado de Bailey y cols., 1992)

Pretratamiento general de la cáscara de coco

La materia prima, es decir, el coco entero se obtuvo de puestos en la central de abastos de la Ciudad de México en dos temporadas diferentes: primavera e invierno. Es importante notar que el sustrato de elección para este trabajo es el mesocarpio espeso y la epidermis lisa del coco, se descartó la corteza dura del endocarpio, quedando ésta para una posterior investigación en el laboratorio.

Se llevó a cabo una molienda con un molino de martillos, posteriormente, se tamizó con mallas bajo las especificación A.S.T.M.E-11 del No.20 y No. 6. Se tomó como base aproximada 1 gramo de cada material (polvo fino, fibra corta y material mixto) para la caracterización proximal completa.

Cabe señalar que la “fibra corta” se refiere a las fibras con longitud superior a 1 centímetro, mientras que el material mixto está constituido por partículas menores a un 1 cm de longitud. El polvo fino se obtiene mediante el tamizado con una malla del No. 20.

Caracterización de la cáscara de coco.

Van Soest-Wine (Pimentel, 2013; Hernández-Meléndez, 2016) para la determinación de compuestos solubles, hemicelulosa, lignina, celulosa y minerales.

Sustratos

- polvo
- fibra corta
- material mixto

Reactivos

Disolución detergente neutro (NDF, por sus siglas en inglés)

- Disolución acuosa con 3%(m/v) de lauril sulfato de sodio, 2% (m/v) de etilendiaminatetracetato de sodio (EDTA), 0.5% (m/v) fosfato disódico, 0.7 % (m/v) de borato de sodio decahidratado y 1% (v/v) de etilcelulosa.

Disolución detergente (ADF, por sus siglas en inglés)

- Disolución acuosa con 2% (m/v) de bromuro de cetilmetilamonio y 3 % (v/v) de ácido sulfúrico concentrado.

Disolución de KMnO_4

Disolución acuosa saturada de permanganato de potasio.

Notas

1. Después de cada tratamiento las muestras se secaron a 105°C y se pesaron.

2. El detergente NDF se aplicó durante una hora a 100°C y se filtró.
3. El detergente ADF se aplicó durante una hora a 100°C y se filtró.
4. Se aplicó la disolución de KMnO_4 y se dejó reposar a temperatura ambiente hasta obtener un color púrpura constante (de 1- 7 días).

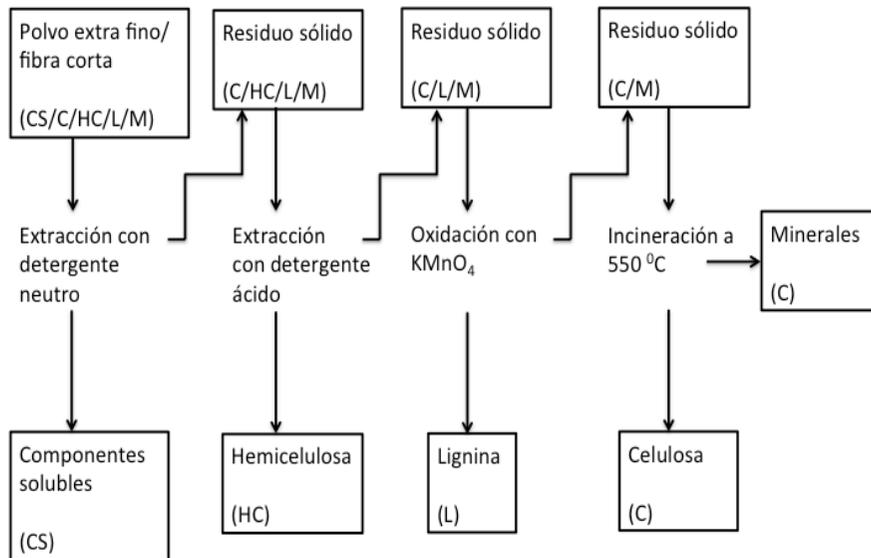


Figura 8. Método Van Soest modificado (Adaptado de Pimentel, 2013).

Densidad aparente

Los tres sustratos (polvo fino, fibra corta y material mixto) se colocaron en una probeta de 50 mL por separado y se pesó

cada uno de ellos. Con la ayuda de una espátula se compactaron los materiales para evitar tener espacios ocupados por aire. Se registró la cantidad de masa requerida para cubrir un volumen de 50 mL y entonces se calculó el valor de la densidad.

Humedad.

Los tres sustratos polvo fino, fibra corta y material mixto se sometieron a la determinación de humedad con la ayuda de una termo-balanza (AND, Japón).

Pretratamiento termo-mecano-químico

En el laboratorio se cuenta con un reactor que puede mantener la temperatura constante en cada una de las 10 secciones que lo componen y operar hasta una temperatura de 300°C. El pretratamiento se realizó a una velocidad de rotación constante de 100 rpm. Las temperaturas y las concentraciones de la disolución de hidróxido de sodio empleadas pueden apreciarse en la Tabla 2. Posterior al tratamiento químico, los materiales fueron recolectados y neutralizados con ácido fosfórico al 5% m/m (Van den bossche y cols., 2016).

Manejo de los materiales pretratados en el reactor

Cada producto pretratado y neutralizado fue colocado en un contenedor limpio y se separó en dos mitades, una de ellas se filtró con una malla metálica de 0.05 milímetros de tamaño de poro, con la finalidad de remover la mayor cantidad posible de líquido. La otra mitad permaneció como fue recibida.

Tabla 3. Condiciones de trabajo para el pretratamiento en el reactor termo-mecano-químico.

Material	Temperatura (°C)	Concentración de NaOH (% m/m)
Fibra	90	1.25
		2.5
		3.75
	70	1.25
		2.5
		3.75
	50	1.25
		2.5
		3.75
Mixto	90	1.25
		2.5
		3.75
	70	1.25
		2.5
		3.75
	50	1.25
		2.5
		3.75
Polvo	90	1.25
		2.5
		3.75
	70	1.25
		2.5
		3.75
	50	1.25
		2.5
		3.75

Caracterización de los productos crudos y pretrados

Porcentaje de agua y sustancias inorgánicas

Se colocaron 5 gramos de cada muestra y se mantuvieron a una temperatura constante de 103°C en una estufa de convección (Lindberg/Blue, Thermo Scientific, EUA) durante ocho horas. Posteriormente se colocaron 20 minutos en un desecador para equilibrarlas y se pesó la cantidad de materia restante. Finalmente, cada material restante se colocó en un crisol de porcelana para ser incinerado. Las muestras se mantuvieron a 550°C en una mufla (Thermolyne 1500, Sybron, EUA) hasta que las cenizas fueran de color blanco.

Porcentaje de sustancias orgánicas solubles

Se realizó una extracción con disolución detergente neutro (NDF) durante 60 minutos, a una temperatura de 100°C, con agitación magnética constante para cada muestra proveniente del pretratamiento alcalino y posteriormente neutralizada. Se tomaron 0.5 gramos de muestra seca tanto de material trabajado con malla como aquel proveniente directo del reactor y posterior neutralización. Para finalizar, se realizó una extracción con filtración Büchner usando papel filtro, el

cual fue colocado previamente dentro de un desecador durante 24 horas.

Hidrólisis enzimática

Medición de azúcares reductores

Para cada muestra pretratada sin filtración y con filtración con malla, se realizó la hidrólisis enzimática como muestra la Figura 9. Posteriormente como ahí también se indica se cuantificaron la cantidad de azúcares reductores totales a través del método DNS (Miller, 1959).

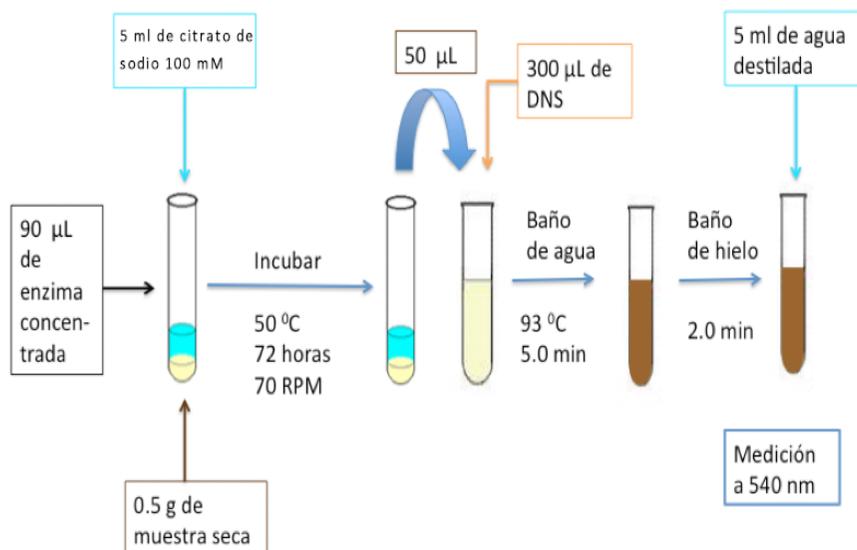


Figura 9. Método experimental de la hidrólisis enzimática.

Porcentaje de Glucosa

Para cada muestra proveniente de la hidrólisis enzimática se tomaron 50 microlitros de la fase líquida previamente centrifugada y se realizó una dilución 1:5 con agua destilada para poder medir la concentración de glucosa (en un intervalo de 123-167 mg/dL) mediante la enzima glucosa oxidasa presente en una tira reactiva y un potenciómetro glucómetro digital comercial (OneTouch Ultra, Johnson y Johnson, EUA).

Resultados y análisis

Caracterización de la enzima

Los jarabes enzimáticos comerciales contienen azúcares que funcionan como crioprotectores tales como la galactosa, glucosa y sacarosa entre otros azúcares. Los crioprotectores son necesarios para prevenir el daño enzimático en el proceso de enfriamiento y calentamiento (CryoBiotech, 2009). Al cóctel enzimático se le determinaron azúcares reductores por el método del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS, por sus siglas en inglés) y la cantidad de proteína por el método de Bradford (1976). Esto se hizo con el objetivo de ajustar la cantidad de azúcares presentes en cada una de las hidrólisis posteriores.

La proteína fue cuantificada para calcular la actividad específica del coctel.

La Tabla 4 muestra que el contenido de azúcares reductores es bajo, lo que se traduce en que el crioprotector debe ser un oligosacárido o un polisacárido, por ejemplo, la sacarosa.

Tabla 4. Cantidad de azúcares reductores y proteína presentes en el coctel enzimático

Cóctel enzimático	Azúcares Reductores mg/mL	Proteína mg/mL
NS-22192	15.39+/-0.77	167.17+/-11.53

Puede apreciarse que el contenido de proteína por mililitro es elevado en comparación con otros cocteles enzimáticos reportados (Méndez, 2010).

Determinación de la actividad enzimática

Se debe recordar que la prueba de actividad mediante papel filtro (FPU, por sus siglas en inglés) cuantifica solamente la actividad relacionada con la hidrólisis de la celulosa, aunque están involucradas un grupo complejo de enzimas conocidas como endoglucanasas, exoglucanasas y beta-glucosidasas, que trabajan de manera sinérgica para hidrolizar el sustrato (Ghose, 1987; Irwing y cols., 1993).

Tabla 5. Actividad celulolítica para el coctel NS-22192.

Cóctel enzimático	Actividad celulolítica (FPU/mL)	Actividad Endoglucanólítica específica (EGU/mgProteína)
NS-22192	172.10 +/- 5	5.24+/- 0.001

Tabla 6. Actividad endoglucanólítica para el coctel NS-22192

Cóctel enzimático	Actividad endoglucanólítica (EGU/mL)	Actividad Endoglucanólítica específica (EGU/mgProteína)
NS-22192	515.94 +/- 0.16	5.24+/- 0.001

El coctel disponible en el laboratorio presenta una actividad celulolítica alta en comparación con otros reportados, por ejemplo 132.14 FPU/mL (Méndez, 2010). Otros cocteles de la empresa Novozymes como el Celluclast 1.5L FG y Cellic CTec2 presentan una actividad celulolítica de 81 y 67 FPU/mL (Pimentel, 2013; Montiel y cols., 2016).

Por otro lado, la actividad del grupo de enzimas conocido como endoglucanasas fue moderada en comparación con los cocteles Celluclast 1.5L FG y Cellic CTec2 (991 y 1504 EGU/mL respectivamente) reportados por Montiel y cols., 2016.

Ya que las enzimas trabajan de forma sinérgica, es de esperarse que la actividad combinada de los tres grandes grupos de enzimas conocidos como: endoglucanasas, exoglucanasas y beta-glucosidasas sea elevada (Eriksson y cols., 2002) para generar los azúcares reductores a partir de la cáscara del coco.

Tabla 7. Actividad de xilanasas en el coctel NS-22192

Cóctel enzimático	Xilanasas (IU/mL)	Xilanasas (IU/mg proteína)
NS-22192	360.84+/- 4.92	2.16+/- 0.029

La actividad del grupo de enzimas conocido como xilanasas resulta ligeramente elevada, pero dentro de los valores promedio reportados, por lo que puede inferirse en que se dará una hidrólisis eficiente, permitiendo que desaparezca dicho ensamblaje presente en la hemicelulosa (De la Rosa, 2003; Montiel y cols., 2016).

Pretratamiento y caracterización general del material

El residuo del fruto de coco seco (mesocarpio espeso y epidermis lisa) se realizó mediante un proceso de molienda y tamizado, con el cual se obtuvieron tres tamaños de partícula diferentes, como se observa en la Figura 10. Se llevó a cabo este proceso de acondicionamiento de los residuos durante las estaciones de invierno y primavera.

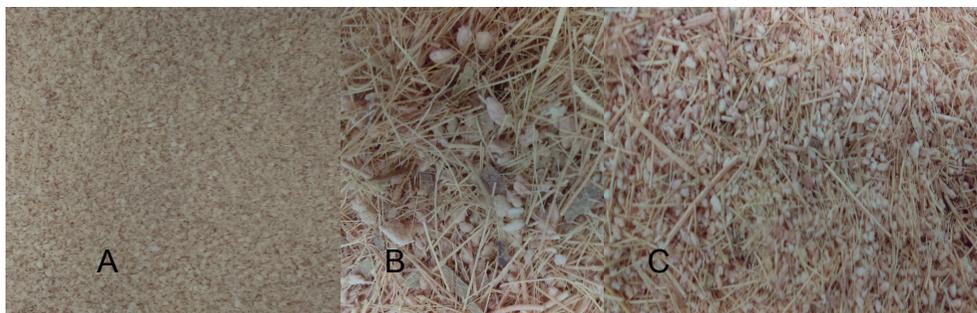


Figura 10. Tipos de material después del tamizado. A. Polvo B. Fibra corta C. Material mixto.

	Peso	
	Molienda 1 %	Molienda 2 %
Polvo	35.9	36.5
Mixto	37.6	38.4
Fibra	26.5	25.1
Total	100.0	100.0

Figura 11. Porcentaje del peso total obtenido para cada tipo de material.

Los resultados de la caracterización de la cáscara de coco se observa en las Figuras 11-14. De dichas figuras se concluye que la cantidad obtenida y las propiedades del polvo, material mixto y fibra son muy similares, independientemente de la temporada de producción del fruto de coco.

Esto vuelve tangible la posibilidad de tener un solo proceso de acondicionamiento para la cáscara de coco, independientemente de la calidad producida en cualquier temporada del año.

En términos del análisis proximal llevado a cabo sobre los diferentes cortes obtenidos durante la molienda y el tamizado, la cantidad de lignina es bastante elevada para los tres tipos de material, pero menor que el valor de la fibra de madera, que puede ser hasta del 37%, según reportó Tsoumis (1991). En particular, la cantidad de lignina de la fracción “polvo” se encuentra alrededor del valor del tallo del platanal (18.6%), otro cultivo importante en nuestro país; y del bagazo de caña (13.68%) (Pernalete, 2008), reafirmando así, que la cáscara de coco es un opción viable para obtener azúcares, pero bajo la consigna de someterla a un pretratamiento intenso.

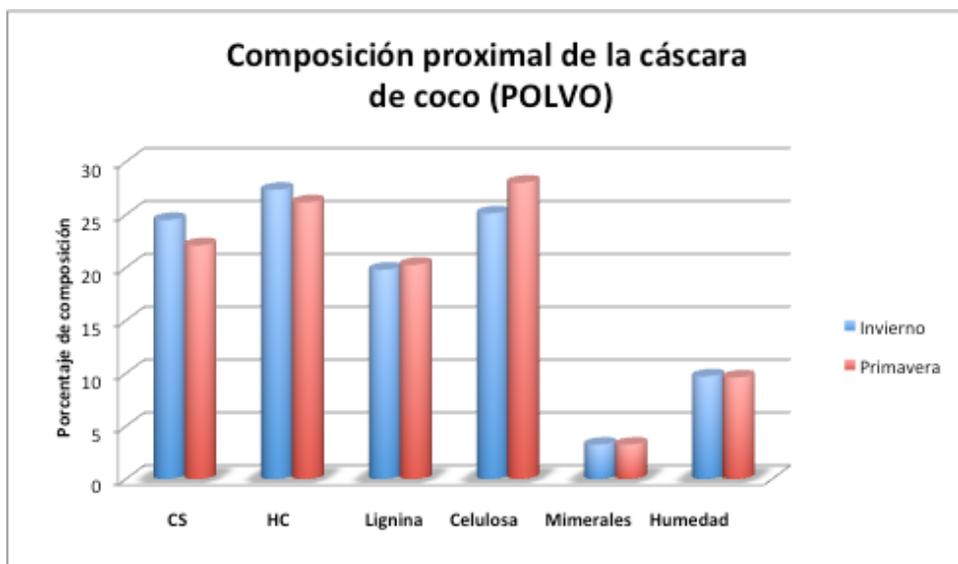


Figura 12. Composición proximal de la fracción polvo. (CS: compuestos solubles, HC: hemicelulosa, Cel.; celulosa, Min: minerales).

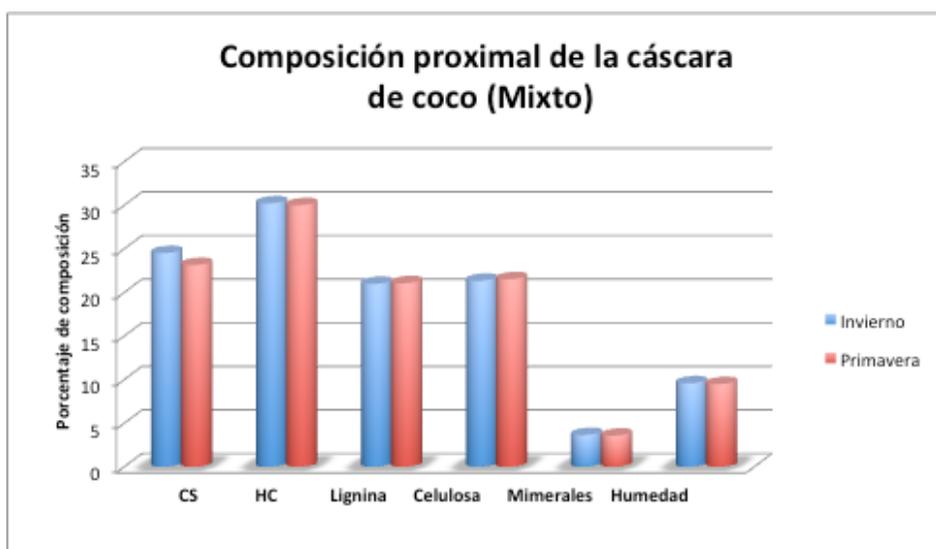


Figura 13. Composición proximal de la fracción mixto. (CS: compuestos solubles, HC: hemicelulosa, cel; celulosa, Min: minerales).

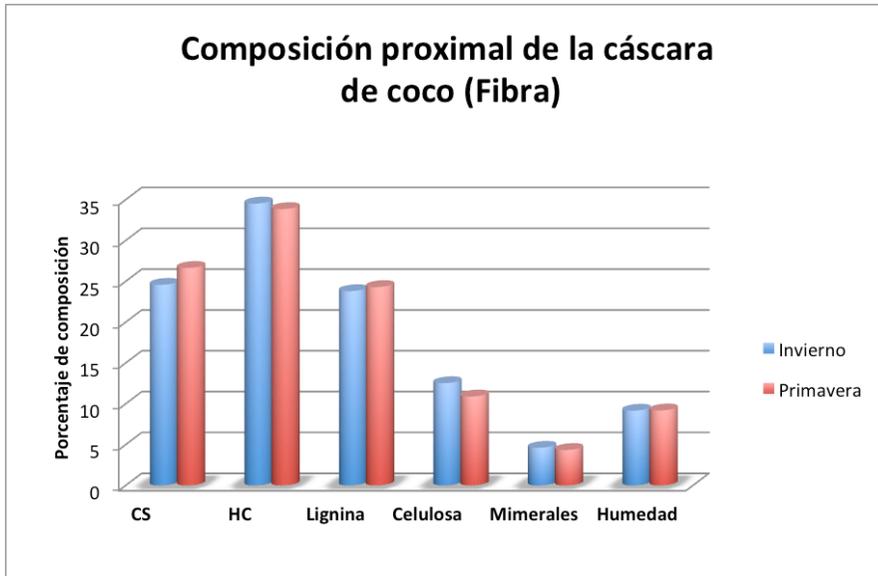


Figura 14. Composición proximal de la fracción Fibra. (CS: compuestos solubles, HC: hemicelulosa, cel; celulosa, Min: minerales).

Otros factores importantes para considerar en el tratamiento fisicoquímico son la cantidad de compuestos orgánicos solubles, alrededor de 24%, muy similar al reportado para el bagazo de agave (Moreno, 2011; Hernández-Meléndez y cols., 2016). El grado de acetilación en la hemicelulosa es un factor importante a considerar porque los grupos funcionales de la lignina están unidos a la matriz de hemicelulosa mediante grupos acetilos y ácido ferúlico, los cuales pueden impedir el acceso de las enzimas a la celulosa para hidrolizar el polisacárido (Alvira y cols., 2010).

De igual manera, se debe resaltar que hay mayor cantidad de celulosa en el polvo que en los otros dos materiales. Sin embargo, este valor es considerablemente menor en comparación con el tallo del platanal (63.9%), según reportaron Abdul Khalil y cols, 2006 y con el bagazo de caña de azúcar (50%), (Pernalet, 2008). Esto vuelve muy importante obtener grados de conversión elevados a azúcares reductores, para que la cáscara de coco sea un sustrato con potencial para aplicarse en procesos sustentables (Ewansiha y cols., 2012).

En la Figura15, se pueden apreciar los valores de la densidad para los tres cortes obtenidos posterior al proceso de molienda, donde destaca la ligereza de las partículas más finas (polvo), en comparación con el material fibroso y para el material mixto. Otros residuos lignocelulósicos disponibles en el laboratorio exhiben una densidad de 0.12 g/mL (olote de maíz tamizado) y 0.13 g/mL (bagazo de caña de azúcar) (Fajardo, 2016).

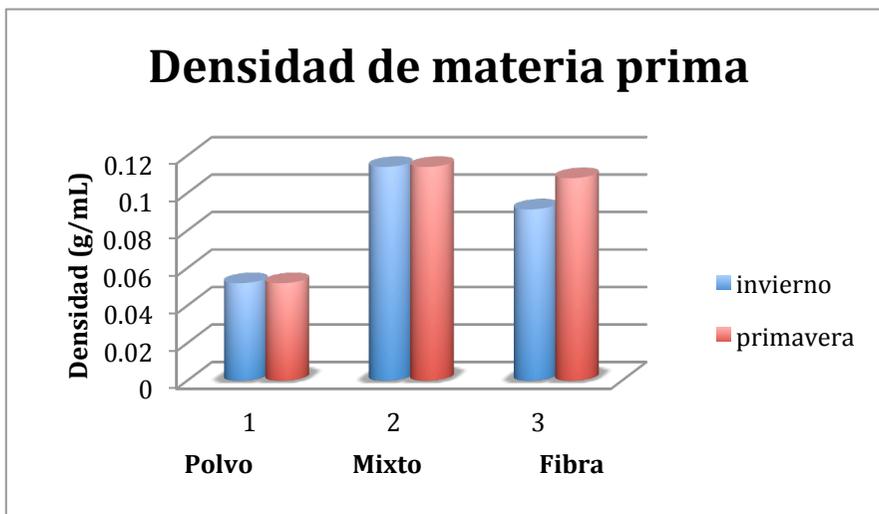


Figura 15. Densidad de los materiales después de la molienda

Pretratamiento general en un reactor termo-mecano-químico y posterior filtración con malla.

En la Figura 16, se observa que la cantidad de minerales se elevó tras el pretratamiento alcalino en el reactor y posterior neutralización con ácido fosfórico hasta en 5 puntos porcentuales. En contraste, posterior a la filtración con la malla de tamaño de poro de 0.05 mm, el porcentaje de minerales se reduce significativamente con respecto a los valores para los materiales pretratados.

Hay dos tendencias a resaltar en la Figura 16, donde la filtración es un componente importante, a mayor temperatura menor es la cantidad de minerales presentes en la materia seca pretratada, este comportamiento puede explicarse en

términos de la mayor solubilidad que puedan tener los minerales nativos de la cáscara de coco al entrar en contacto con la sosa, la cual es función de la temperatura.

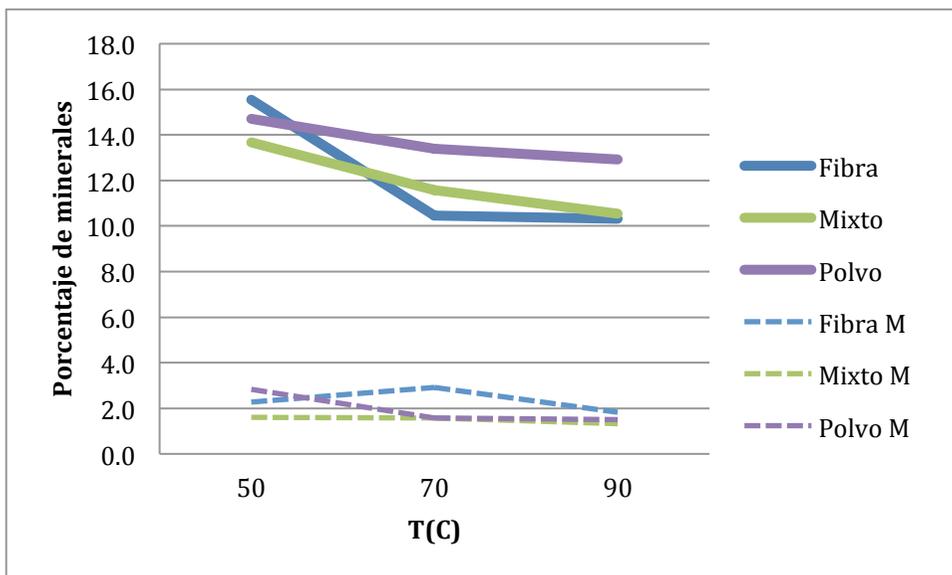


Figura 16. Porcentaje de minerales en función de la temperatura del pretratamiento al emplear una disolución de hidróxido de sodio 2.5% m/m. (Fibra M: fibra filtrada manualmente con malla, Mixto M: material mixto filtrado).

Por su parte, la cantidad de compuestos orgánicos solubles presente en los materiales pretratados y filtrados con malla disminuye al aumentar la temperatura, lo cual tiene relación directa con un mayor poder de solvatación de la sosa a altas temperaturas, que al ser filtrados, dejarán un material con menor cantidad de compuestos celulares fragmentados o

solubilizados, lo cual puede ser relevante si se desea lograr una posterior hidrólisis enzimática más eficiente del material resultante (Figura 17).

Por otro lado, puede apreciarse en la Figura 18 que la cantidad de compuestos orgánicos solubles (CS) formados aumentó al aumentar la concentración de la sosa, lo cual se ve magnificado por el trabajo mecánico intenso.

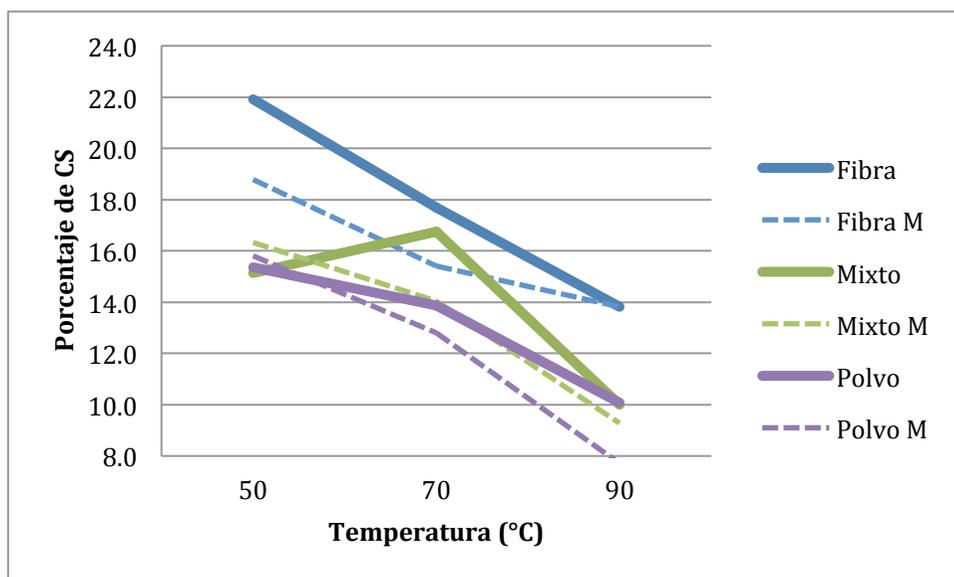


Figura 17. Porcentaje de compuestos orgánicos solubles en función de la temperatura para el pretratamiento a concentración constante (NaOH 2.5% m/m). (Fibra M: fibra filtrada manualmente con malla, Mixto M: material mixto filtrado manualmente con malla, Polvo M: polvo filtrado manualmente con malla).

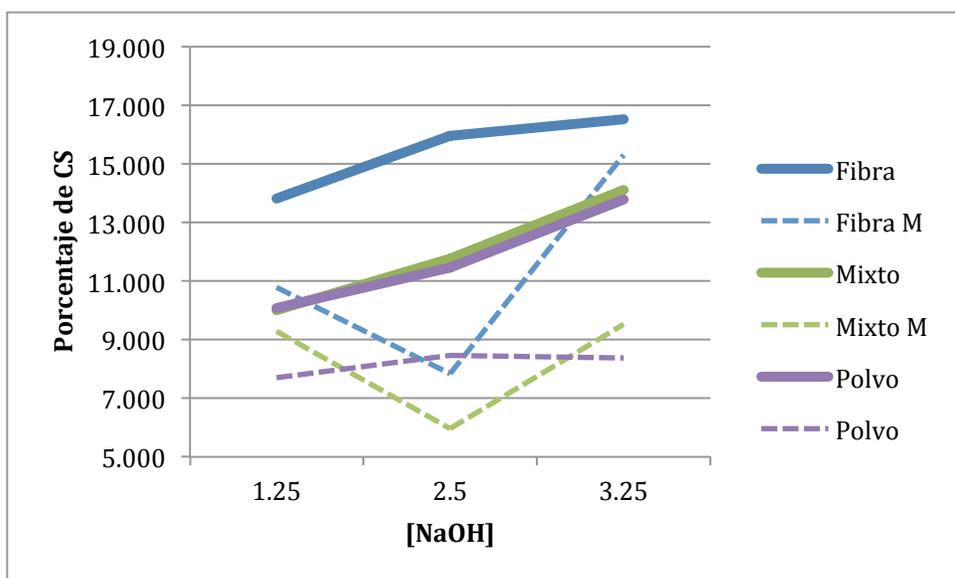


Figura 18. Porcentaje de compuestos orgánicos solubles en función de la concentración de hidróxido de sodio para el pretratamiento a temperatura constante (90°C). (Fibra M: fibra filtrada manualmente con malla, Mixto M: material mixto filtrado manualmente con malla, Polvo M: polvo filtrado manualmente con malla).

Hidrólisis enzimática del material sin tratamiento

El porcentaje de sacarificación se calculó como la relación de los gramos de azúcares reductores totales o gramos de glucosa obtenida por cada gramo de residuo seco empleado en la hidrólisis. Como es visible en la Figura 19, la cantidad de azúcares liberada tras la hidrólisis es pequeña para los tres tipos de cortes del residuo de coco: el porcentaje de producción de azúcares reductores no excede el 22% y para la glucosa éste valor se encuentran alrededor del 2%. Por lo

tanto, para elevar ambos porcentajes de conversión es indispensable llevar a cabo un proceso de pretratamiento (Vandenbossche y cols., 2014).

□

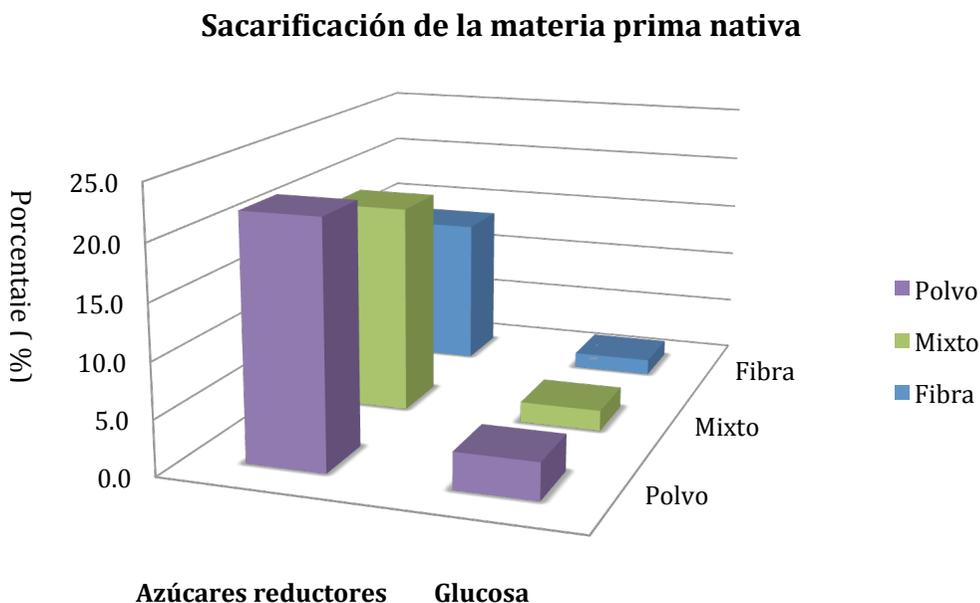


Figura 19. Porcentaje de azúcares generados en la sacarificación enzimática del material sin pretratamiento fisicoquímico.

En particular el polvo tiene un mejor rendimiento hacia la producción de azúcares, lo cual puede deberse a una mayor accesibilidad del material debido al tamaño de las partículas, que es significativamente menor que el de las fibras (0.6 mm aproximadamente). En términos del contenido de celulosa de

cada materia prima, hay una correlación directa, ya que su valor es mayor para el polvo (~25%), seguido del material mixto (~20%) y finalmente para la fibra(~10%) (Figuras 11-13). En términos del contenido de hemicelulosa no hay una relación directa con la producción de azúcares totales, ya que los tres materiales presentan una concentración similar (~25-30%).

Hidrólisis enzimática de los materiales pretratados, neutralizados y filtrados con malla

Es importante señalar que los tres materiales mejoran significativamente sus rendimientos con la filtración (Figura 20). Esencialmente lo que se elimina con la malla son los fragmentos celulares hidrolizados que pueden afectar negativamente la hidrólisis enzimática (Alvira y cols., 2010). Fue notoria la presencia de un color rojizo en los licores, posiblemente debido a la presencia de antocianinas, las cuales se hacen presentes al solubilizarlas en diversos valores de pH. Específicamente, la fibra es el material que se ve más beneficiado con la eliminación de los compuestos orgánicos solubles, con un aumento de casi el doble de conversión a azúcares reductores.

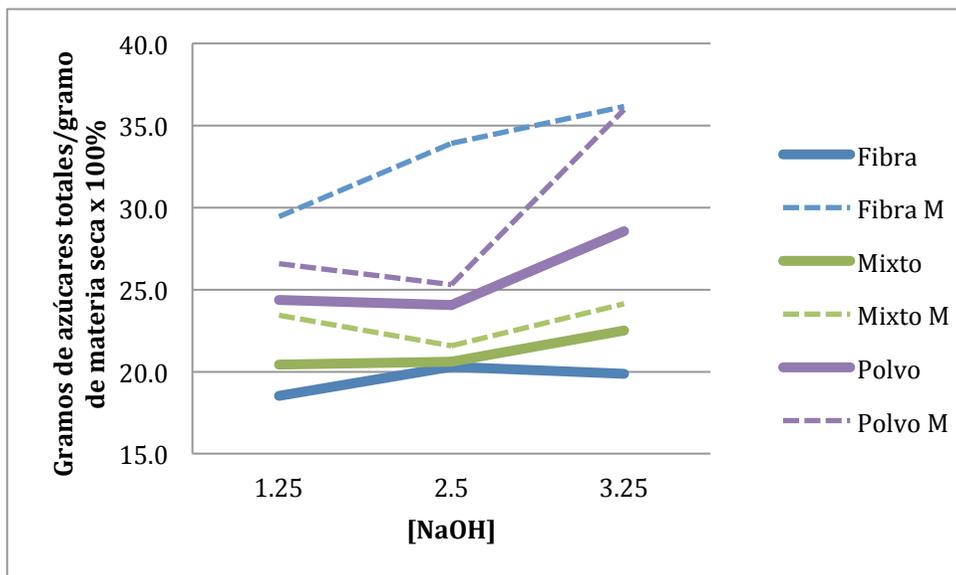


Figura 20. Porcentaje de conversión a azúcares reductores en función de la concentración del hidróxido de sodio en el pretratamiento a temperatura constante (90°C). Fibra M: fibra filtrada manualmente con malla, Mixto M: material mixto filtrado manualmente con malla, Polvo M: polvo filtrado manualmente con malla.

Puede apreciarse que a mayor concentración de hidróxido de sodio mayor es el porcentaje de conversión a azúcares reductores (Figura 20). Esto podría explicarse en términos de la erosión por parte de la base y del trabajo mecánico, que en conjunto provocan la apertura de la matriz de la cáscara de coco, y da lugar a más puntos amorfos en la celulosa, para que entre en acción el grupo de enzimas conocidas como endoglucanasas (Eriksson y cols, 2002).

En la Figura 21 encontramos tendencias diferentes para la fibra, polvo y para el material mixto. Para la fibra, la temperatura de pretratamiento no afecta el rendimiento de la hidrólisis enzimática, la filtración de los compuestos orgánicos solubles sí lo mejora hasta en 13 puntos porcentuales. Sin embargo, para el material mixto y para el polvo, la filtración no muestra una mejoría significativa. El polvo y el material mixto presentan una dependencia menor con la temperatura: a mayor temperatura menor producción de azúcares, lo cual podría ser explicado en términos de posibles reacciones de degradación de los carbohidratos cuando se introducen partículas de tamaño menor o más finas, lo cual se magnifica con el trabajo mecánico intenso.

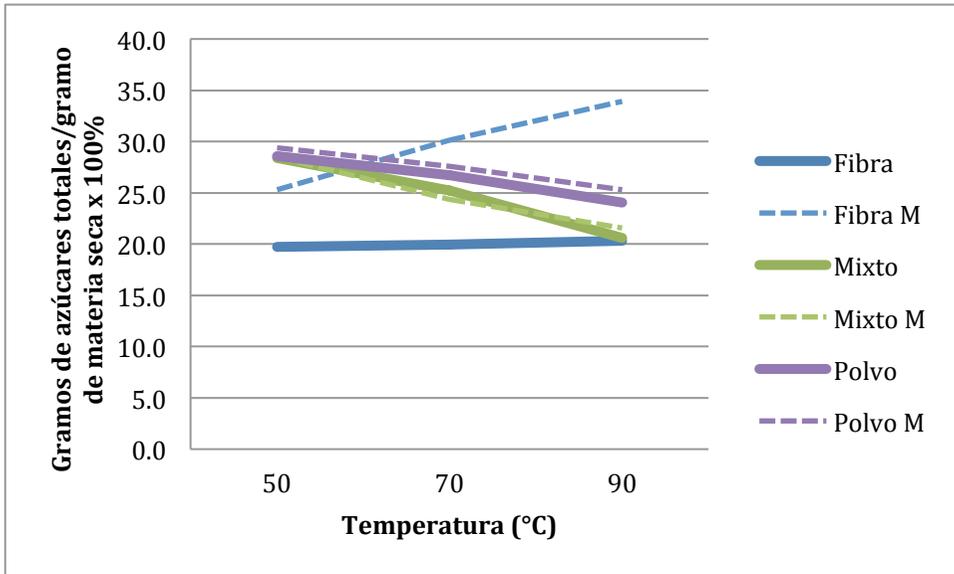


Figura 21. Porcentaje de conversión a azúcares reductores en función de la temperatura del pretratamiento a concentración constante de NaOH (2.5% m/m). Fibra M: fibra filtrada manualmente con malla, Mixto M: material mixto filtrado manualmente con malla, Polvo M: polvo filtrado manualmente con malla).

Si nos enfocamos en la glucosa, principal precursor para la producción de productos biotecnológicos con valor, observamos que es el polvo el que se distingue por sus buenos rendimientos. En la Figura 22 se confirma la influencia positiva que tiene la temperatura y el trabajo mecánico intenso sobre las partículas de polvo fino. Puede apreciarse un efecto negativo de ambos factores que vienen en detrimento de una menor producción de glucosa para la fibra y para el material mixto.

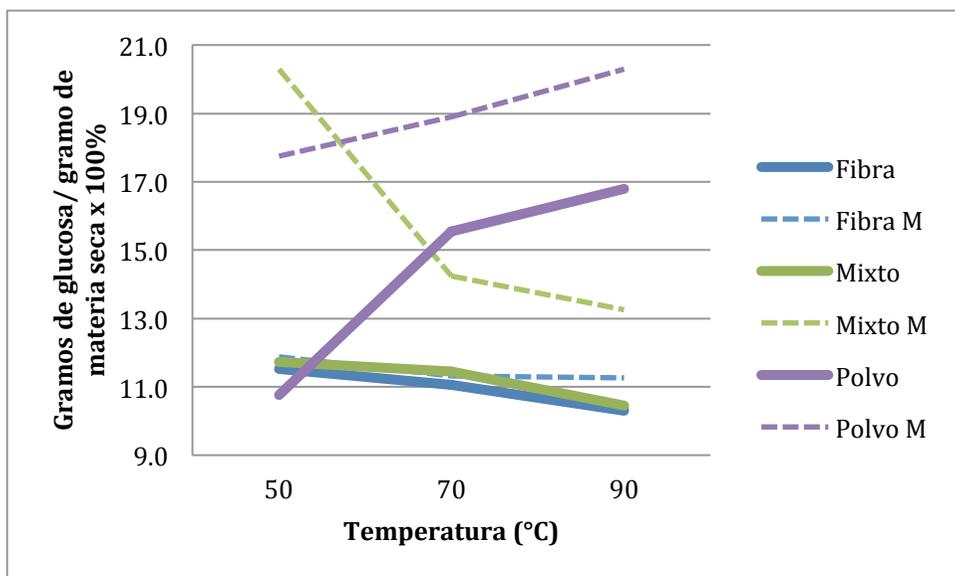


Figura 22. Porcentaje de conversión a glucosa en función de la temperatura del pretratamiento a concentración constante (NaOH 2.5% m/m). Fibra M: fibra filtrada manualmente con malla, Mixto M: material mixto filtrado manualmente con malla, Polvo M: polvo filtrado manualmente con malla.

En la Figura 23 puede apreciarse que a mayor concentración de hidróxido de sodio la fibra y el polvo de coco aumentan sus rendimientos de producción de glucosa, mientras que para el material mixto se mantiene constante. Se concluye que el proceso de filtrado con malla genera rendimientos más altos, lo cual se explica en términos del retiro de obstáculos que pueden afectar la interacción enzima-sustrato (Eriksson, 2002), es decir, la eliminación de inhibidores.

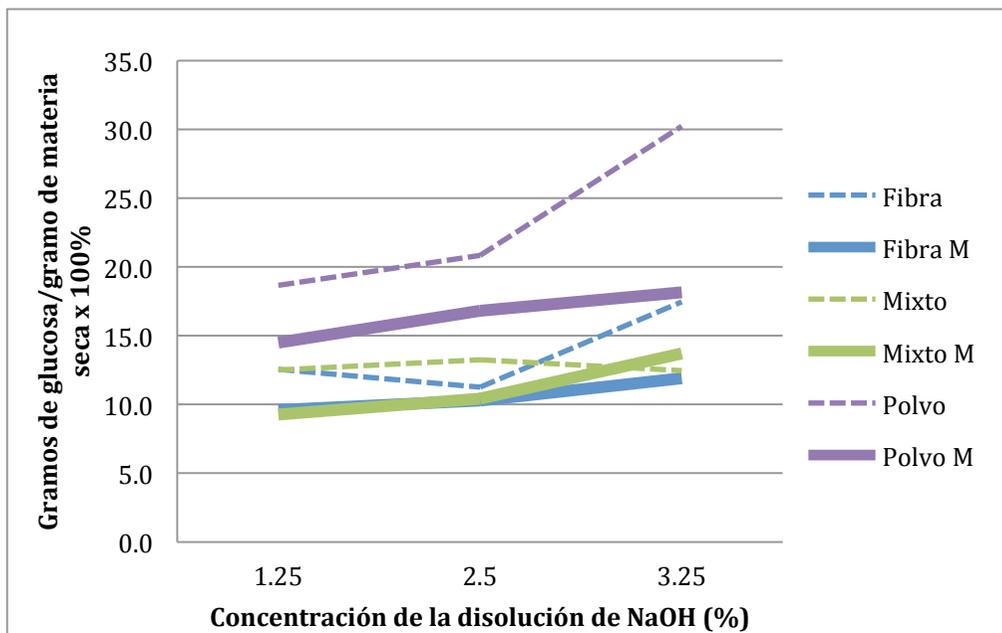


Figura 23. Porcentaje de conversión a glucosa en función de la concentración de la base a temperatura constante (90°C). Fibra M: fibra filtrada manualmente con malla, Mixto M: material mixto filtrado manualmente con malla, Polvo M: polvo filtrado manualmente con malla.

Una situación similar ocurrió en este grupo de investigación durante el procesamiento alcalino del lirio acuático, donde la filtración de compuestos orgánicos solubles permitió aumentar su digestibilidad en presencia de rumen (Rubio, 2015).

La fibra con pretratamiento a 90°C tiene el mejor rendimiento de liberación de azúcares reductores totales, pero el polvo a 90°C genera la mayor cantidad de glucosa liberada por gramo

de muestra. Esto se puede explicar en términos de un fraccionamiento parcial de la hemicelulosa durante el pretratamiento, que hizo accesible a la celulosa, de ahí el mayor rendimiento en la producción de azúcares reductores totales. Cabe mencionar que la cantidad de azúcares reductores obtenida se mantiene por encima de los valores correspondientes para la glucosa.

Análisis DRX de materia prima y las muestras tratadas.

A las muestras con mayor y menor rendimiento durante el proceso enzimático de cada material se les hizo un análisis de difracción de rayos X, así como a la materia prima cruda, para determinar si la reducción en el grado de cristalinidad de la celulosa original tiene un efecto benéfico directo para promover el aumento en la sacarificación.

Como se muestra en la Figura 24, el polvo y el material mixto presentan picos cristalinos característicos de la celulosa tipo I ubicados en las posiciones 12 a 18°, así como la posición 23°. Las fibras de coco presentan un comportamiento más amorfo en comparación con las fibras de bagazo de agave (Bárzana y cols., 2014), que presentan una intensidad aproximada de 20000 conteos en la región de 23° (Hernández-Meléndez y

cols., 2016), mientras que las fibras de coco rondan los 10000 conteos.

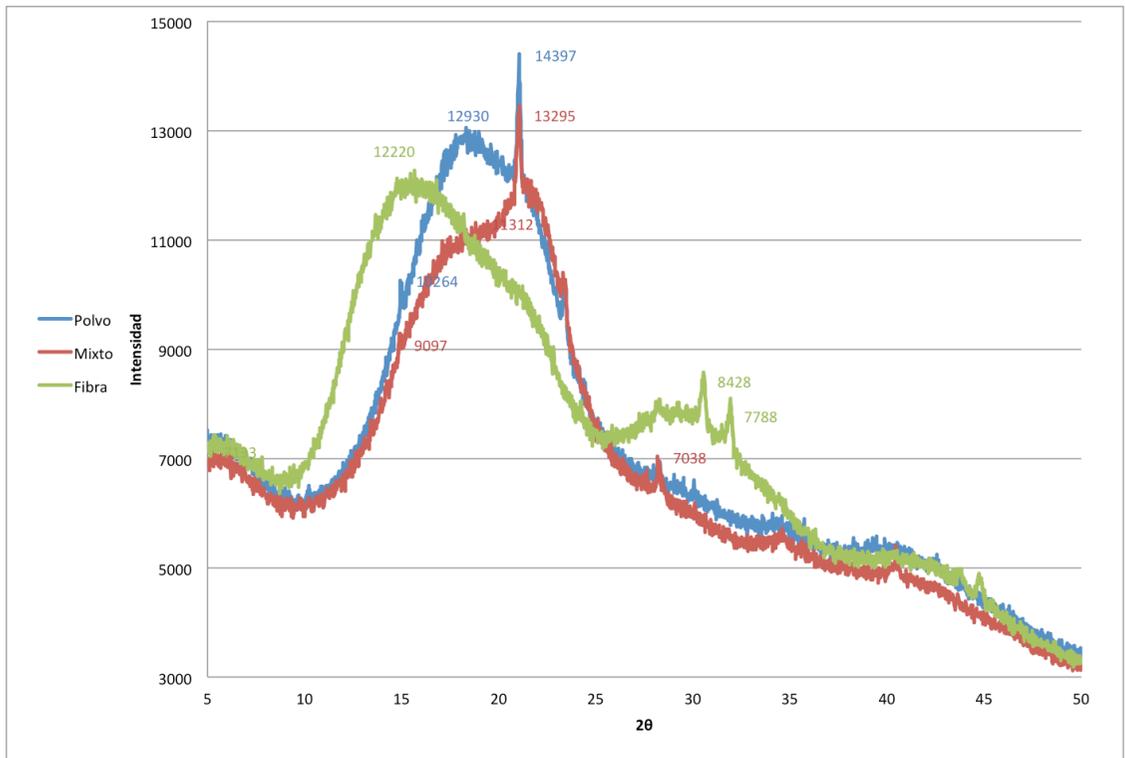


Figura 24. Difractograma de materias primas nativas.

El corte de bagazo de coco “polvo” presenta regiones amorfas y cristalinas, una señal que destaca es la región de 22°, la cual está presente también en el material mixto.

Tabla 9. Índice de cristalinidad para materia prima

Material	Índice de cristalinidad
Polvo	9.32
Mixto	16.93

El índice de cristalinidad se calculó según la ecuación 2 (Buschle-Diller, 1992).

$$CrI = \left[\frac{I_{002} - I_{am}}{I_{002}} \right] * 100$$

donde:

I_{002} es la intensidad del pico cristalino en el máximo entre 20° y 23° para celulosa

I_{am} es la intensidad en el mínimo entre 18° y 20°

En la tabla 9 se observa que el polvo tiene un menor índice de cristalinidad que el material mixto, aproximadamente un 50% menor. Al observar detenidamente los resultados de sacarificación enzimática presentados con anterioridad puede inferirse que a mayor índice de cristalinidad más fuerte es la adsorción no productiva de la enzima sobre el sustrato (Eriksson y cols, 2002).

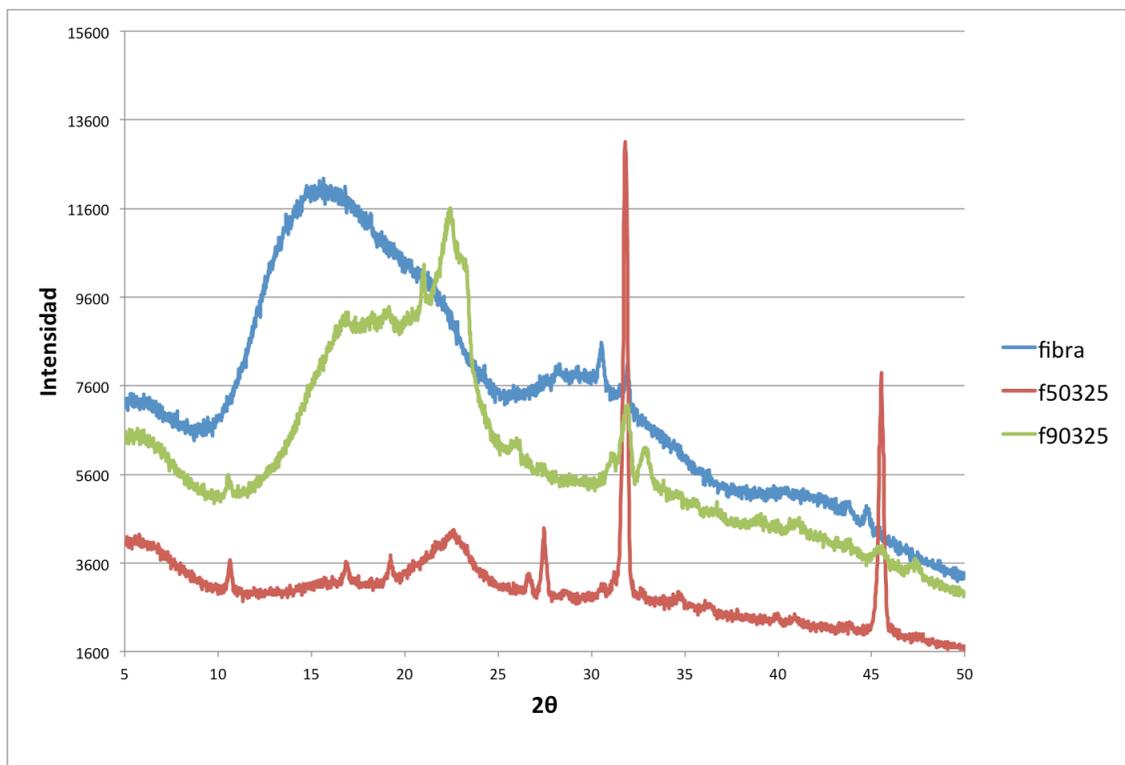


Figura 25. Diffractograma de fibra bajo las condiciones de pretratamiento con sosa 3.25% a una temperatura de 50°C (color rojo) y 90°C (color verde).

Para el caso de la fibra, se aprecia que tras el pretratamiento se reconoce un patrón típico de la celulosa con picos en 15-18° y 23°. Esto nos habla de una matriz muy bien protegida por los puentes de hidrógeno presentes en la celulosa, y en menor grado por la presencia de lignina y la hemicelulosa. Para los materiales de fibra pretratados con sosa 3.25% a 50°C y 90°C, se aprecia una disminución en la cristalinidad de los materiales

en comparación con la fibra cruda y la aparición de dos señales típicas de fosfato de sodio ubicadas en 32° y 46° .

Como es visible en las Figuras 26 y 27, hay una disminución significativa de la cristalinidad debido al pretratamiento para los materiales mixto y polvo: el área bajo los picos se reduce cuando mayor es la concentración de NaOH.

Para el caso del tratamiento con sosa 3.75% se observan picos muy elevados en 30° y 45° . Esto se puede explicar en términos de la presencia de minerales que son altamente cristalinos por ejemplo: fosfato de sodio, que es resultante del proceso de neutralización de la base NaOH.

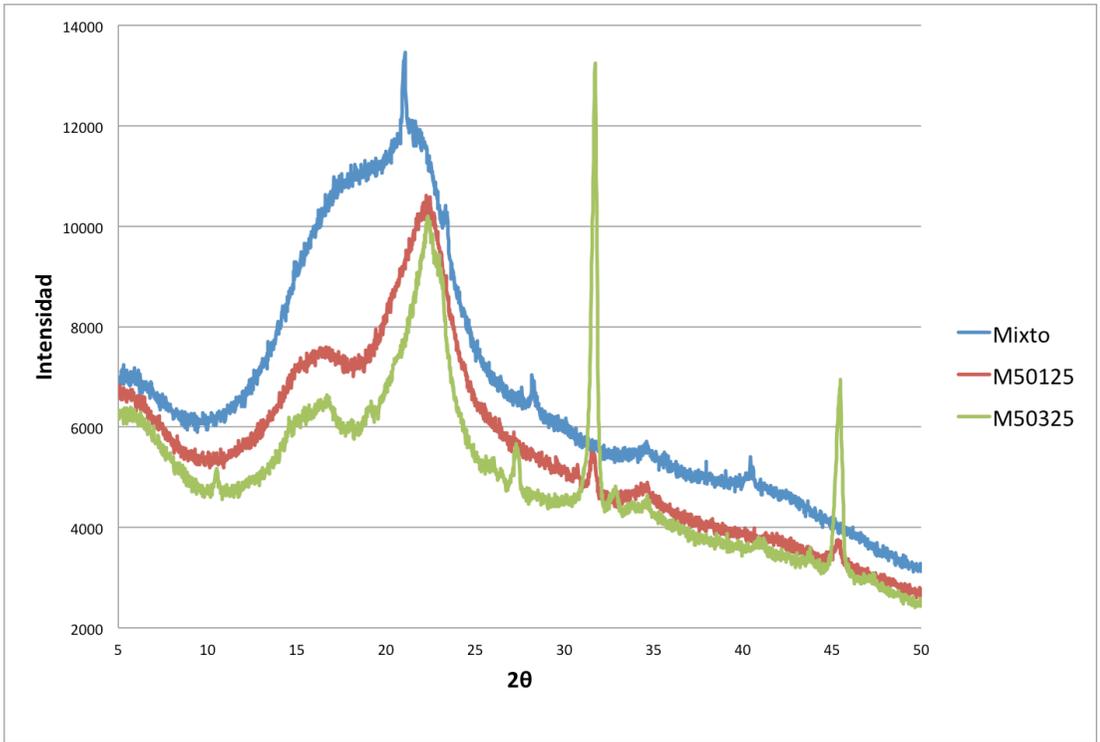


Figura 26. Difractograma de rayos X para el material mixto bajo la condiciones de pretratamiento con sosa 1.25%(color rojo) y 3.25% (color verde) a una temperatura de 50°C.

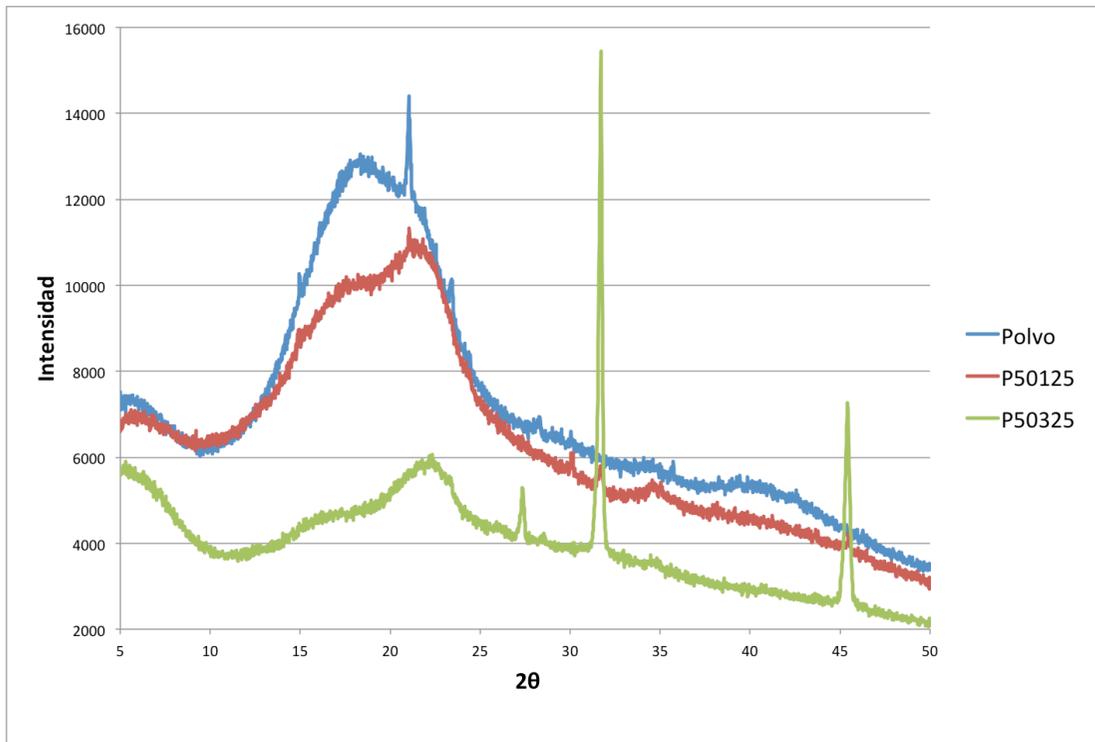


Figura 27. Difractograma de rayos X para el material “polvo” bajo las condiciones de pretratamiento con sosa 1.25% (color rojo) y 3.25% (color verde) a una temperatura de 50°C.

Conclusiones

La caracterización del coctel enzimático NS-22192 mostró una actividad catalítica moderada para las enzimas endoglucanasas y un buen balance para la actividad de las enzimas celulolíticas y xilanolíticas en comparación con cócteles enzimáticos parecidos estudiados en otros laboratorios. La hidrólisis enzimática puede mejorarse al provocar más regiones amorfas en la celulosa o una

disminución en la cristalinidad de la misma mediante un tratamiento a temperaturas y concentraciones de NaOH altas (3.25% m/m).

Al realizar la hidrólisis enzimática de los tres materiales se justifica el uso del reactor termo-mecano-químico, ya que los rendimientos mejoraron. El material “polvo” de coco pretratado a una temperatura de 90°C con una disolución acuosa de sosa al 3.25% m/m y filtrado con malla de 0.05 mm fue el material que presentó valores más altos para la obtención de glucosa, con un rendimiento de 30.3% por cada gramo de materia seca.

Sin embargo, fue la fibra pretratada a una temperatura 90°C en combinación con una disolución acuosa de sosa al 3.25% m/m y filtrada con malla que obtuvo los mejores rendimientos en la transformación de azúcares reductores totales con 36.2% por cada gramo de materia seca.

Para optimizar la hidrólisis orientada a la producción de glucosa, se aconseja trabajar cada material por separado bajo las siguientes condiciones manteniendo la cantidad de enzima constante por cantidad de fibra, mixto y polvo.

Material	Temperatura (°C)	Concentración NaOH (% m/m)
Fibra	50	3.25
Mixto	50	3.25
Polvo	90	3.25

Recomendaciones

Debido a que se observó una tendencia de mejores rendimientos con temperaturas y concentraciones de NaOH más altos, se recomienda realizar un estudio con los materiales pretratados empleando disoluciones acuosas de sosa a 3.25, 4.75 y 6.25% m/m en combinación con temperaturas de 50, 75 y 100°C . Sin dejar de valorar en todo momento la viabilidad económica por el gasto que representa tener materiales resistentes a corrosión. .

De igual manera, ya que sólo se trabajó un cóctel de enzimas, sería muy útil llevar a cabo un estudio con diferentes cocteles y así poder incrementar los porcentajes de conversión, sin mayor gasto en disoluciones básicas y aparatos resistentes a la corrosión y a temperaturas altas.

Anexo A

Curvas de calibración de azúcares para DNS, proteína y xilano en espectrofotómetro (Perkin Elmer, EUA) a una longitud de onda de 595nm

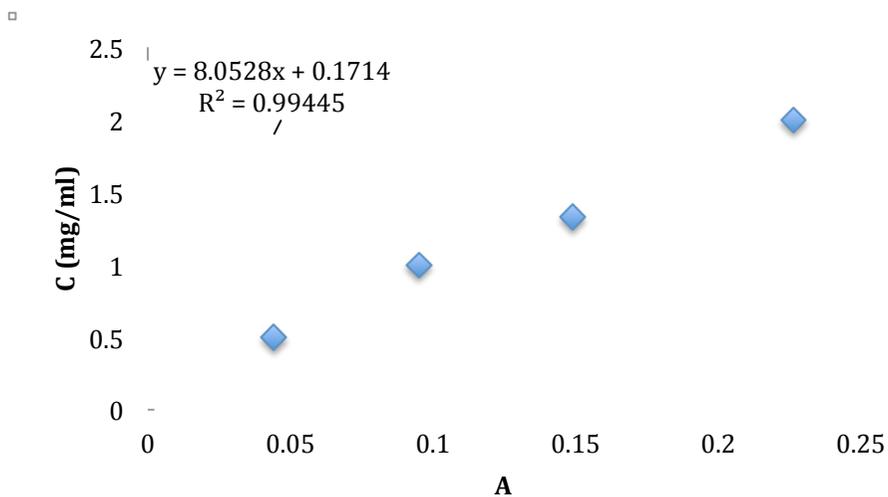


Figura 28. Curva de calibración de glucosa para tratamientos con DNS para prueba FPU (Filter Papee Unit) y pruebas para actividad enduglocanasa.

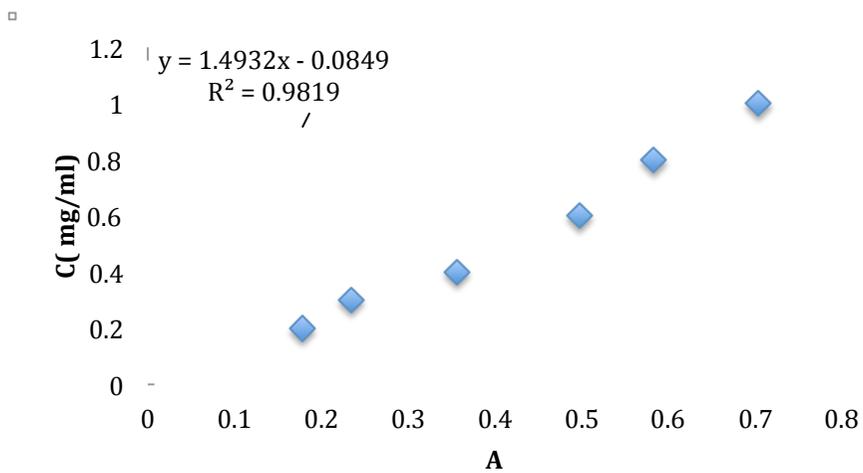


Figura 29. Curva de calibración de proteína para método de Bradford

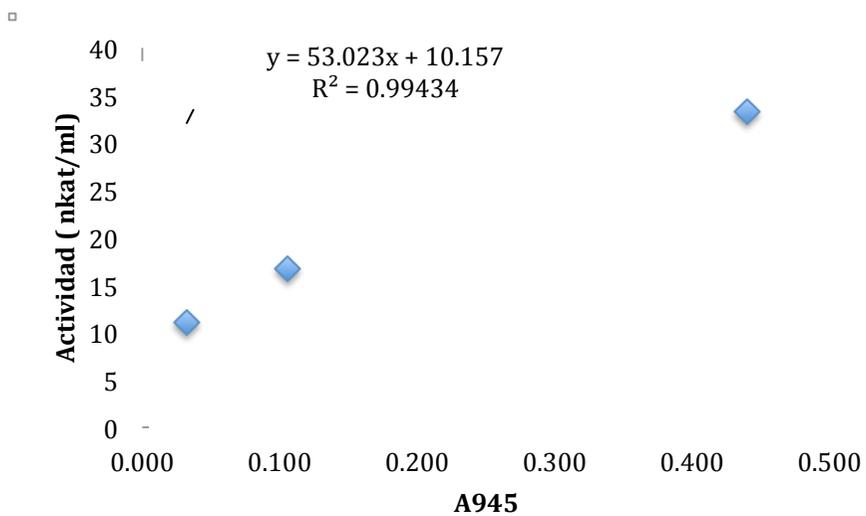


Figura 30. Curva de calibración de xilanasa para el método de medición de actividad de enzimas xilanolíticas

Anexo B

Tabla 9. Resultados generales de caracterización

	Material	Compuestos solubles		Humedad		Minerales	
		Malla	Sin Malla	Malla	Sin Malla	Malla	Sin Malla
NaOH 1.25	F90	10.780	13.820	69.064	82.175	1.814	10.311
	F70	15.420	17.700	69.371	83.483	2.260	10.459
	F50	18.780	21.920	71.065	82.875	2.918	15.546
	M90	9.280	10.000	69.124	82.807	1.326	10.539
	M70	14.040	16.760	71.051	84.922	1.568	11.566
	M50	16.340	15.140	73.144	85.210	1.615	13.671
	P90	7.700	10.080	73.916	86.556	1.505	12.925
	P70	12.800	13.860	73.945	85.321	1.589	13.404
	P50	15.800	15.360	73.022	84.690	2.839	14.709
NaOH 2.5	F90	7.840	15.960	28.183	88.191	2.771	12.510
	F70	10.340	19.920	37.562	89.256	2.928	14.074
	F50	14.220	22.220	57.181	91.589	2.981	37.055
	M90	5.960	11.760	57.909	88.281	3.181	20.334
	M70	7.620	17.020	58.028	88.392	3.531	24.245
	M50	16.380	21.060	60.740	89.519	5.286	28.389
	P90	8.460	11.460	52.880	94.790	3.453	16.779
	P70	10.000	14.800	51.945	87.226	5.740	25.010
	P50	12.200	19.600	48.774	86.582	8.950	36.330
NaOH 3.25	F90	15.320	16.520	11.573	15.325	2.991	13.173
	F70	14.820	20.720	13.875	15.444	3.110	17.401
	F50	16.740	21.940	20.620	21.499	3.548	41.259
	M90	9.520	14.120	12.939	25.476	2.834	22.577
	M70	17.100	18.700	13.903	26.046	3.003	27.484
	M50	20.140	21.980	14.879	26.096	5.491	45.765
	P90	8.380	13.780	11.487	13.480	3.099	25.215
	P70	11.400	19.400	12.147	13.415	3.769	30.191
	P50	14.420	20.220	11.933	12.681	4.574	46.148

Tabla 10. Resultados generales de la hidrólisis enzimática

	Material	% conversión AR %		% conversión glucosa %	
		Malla	Sin Malla	Malla	Sin Malla
NaOH 1.25	F90	29.451	18.522	12.550	9.600
	F70	22.721	14.919	10.500	9.600
	F50	19.624	14.710	11.870	10.920
	M90	23.436	20.428	12.500	9.250
	M70	24.121	21.887	13.620	9.800
	M50	28.141	23.525	15.800	11.150
	P90	26.593	24.368	18.660	14.500
	P70	29.002	26.741	18.200	13.840
	P50	26.890	27.962	13.360	12.550
NaOH 2.5	F90	33.928	20.304	11.260	10.300
	F70	30.121	19.937	11.320	11.050
	F50	25.304	19.731	11.880	11.520
	M90	21.566	20.602	13.250	10.450
	M70	24.364	25.258	14.250	11.450
	M50	28.538	28.423	20.300	11.720
	P90	25.304	24.043	20.850	16.800
	P70	27.598	26.749	18.900	15.550
	P50	29.387	28.584	17.750	10.750
NaOH 3.25	F90	36.170	19.885	17.450	11.900
	F70	33.269	19.069	19.100	12.100
	F50	25.958	16.725	20.050	13.150
	M90	24.145	22.513	12.450	13.700
	M70	31.154	26.139	16.600	14.500
	M50	33.511	27.468	17.050	25.950
	P90	34.478	28.556	30.250	18.150
	P70	34.961	32.363	26.700	17.600
	P50	35.988	34.780	19.400	17.450

Bibliografía

1. Abaunza Chávez, Erika, Callejas Rojas Sara, Villegas Olaez María Alicia (2004). Industrialización de la copra de coco. Tesis. Universidad Autónoma Metropolitana. Unidad Iztapalapa.
2. Alvira, P. Tomás-Pejó, E. M. Ballesteros, M.J. Negro (2010). Pretreatment Technologies for an efficient bioethanol production based on enzymatic hydrolysis: A review. *Bioresource Technology* 101: 4851-4861.
3. Artifibras S. A. de C.V (s.f.). Recuperado el 15 septiembre de 2016, de www.artifibras.com.mx
4. Balat, M. Balat, H. Öz, C. (2008) "Progress in bioethanol". *Processing Progress in Energy and Combustion Science* . 34: 551-573.
5. Bautista, G. (2013). Efecto de líquidos iónicos en la hidrólisis enzimática del bagazo de agave. Tesis. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Química.
6. Bailey, MJ., Biely, P., Poutanen, K. (1992). Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity. *Journal of Biotechnology*. Vol. 23. 257-270.
7. Benguin, P., J.P. Aubert.(1994). The biological degradations of cellulose. *FEMS Microbiol. Rev.* 13. 25-28.

8. Bradford, MM. (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. Vol. 72, 248-254.
9. Buschle-Diller, G. Enhancing the reactivity and strength of cotton fibers, *Journal of Applied Polymer Science*, Vol. 45, 967.
10. Caspeta, L., Caro-Bermúdez, MA., Ponce-Noyola, T., Martínez, A. (2014). Enzymatic hydrolysis at high-solids loadings for the conversion of agave bagasse to fuel ethanol. *Applied Energy*. Vol. 113. 277-286.
11. Cavalaglio, G., Gelosia, M., D'Antonio, S., Nicolini, A., Pisello, AL., Barbanera, M., Cotana, F. (2016). Lignocellulosic ethanol production from the recovery of stranded driftwood residues. *Energies*. Vol. 9. 1-10.
12. Cryobiotech: Crioprotectores . [En línea]. Sin lugar de publicación [Fecha de consulta : 18 octubre 2016]. Disponible en:
<http://laplace.us.es/cryobiotech/index.php?option=com_content&view=article&id=15:crioprotectores&catid=8:introduccion&itemid=38>
13. De la Rosa, A. (2003). Utilización papelera de fibras no madereras. Terrasa: Universidad politécnica de Cataluña.

14. El sistema producto cocotero en Michoacán [en línea]. Ciudad de México:SAGARPA [fecha de consulta: 11 octubre 2016]. Disponible desde Internet: <http://www.sagarpa.gob.mx/Delegaciones/michoacan/Lists/Evaluaciones%20Externas1/Attachments/39/compt_coco.pdf >.

15. Eriksson, T., Karlsson, J., Tjerneld, F. (2002). A Model Explaining Declining Rate in Hydrolysis of Lignocellulose Substrates with Cellobiohydrolase I (Cel7A) and Endoglucanase I (Cel7B) of *Trichoderma reesei*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. Vol. 101. 41-60.

16. Ewansiha, C.J., Ebhoaye, J.E., Asia, I.O., Ekebafé, L.O., Ehigie, C. (2012). Proximate and mineral composition of coconut (*cocos nucifera*) Shell. *International Journal of Pure and Applied Science and Technology*. Vol. 13, 57-60.

17. Fajardo, A. (2016). Derivatización de residuos lignocelulósicos para la obtención de nuevos materiales del tipo éster a base de anhídridos, sustentados a la producción de alcoholes. Tesis. Universidad Nacional Autónoma de México.

18. Ghose, TK. (1987). Measurement of cellulase activities. *Pure & Applied Chemistry*. Vol. 59 (2), 257-268.

19. Hernández-Meléndez, O., Miguel-Cruz, F., Montiel, C.,

Vivaldo-Lima, E., Hernández-Luna, M., Mena-Brito, C., Bárzana, E. (2016). Characterization of Blue Agave Bagasse (BAB) as Raw Material for Bioethanol Production Processes by Gravimetric, Thermal, Chromatographic, X-ray Diffraction, Microscopy, and Laser Light Scattering Techniques. *Bioenergy Research*. Vol. 9. 985-997.

20. Irwing, DC., Spezio, M., Walker, LP., Wilson, DB. (1993). Activity Studies of Height Purified Cellulases: Specificity, Synergism, and Binding Domain Effects. *Biotechnology and Bioengineering*. Vol. 42, 1002-1013.

21. Khalil A., Alwani M.S, Mohd A.K. (2006). Chemical composition, anatomy, lignin, distribution and cell Wall structure of malaysian plant waste fibers. *Bioresources of the School of industrial Technology, Universiti Sains Malaysia*.

22. Ma, F., Hanna, MA. (1999). Biodiesel production. *Bioresource Technology*. Vol. 70.1-15.

23. Méndez Quero, E. (2014). Caracterización de cócteles enzimáticos celulíticos comerciales y su potencial en la producción de jarabes azucarados. Tesis. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Química.

24. Montiel, C., Hernández-Meléndez, O., Vivaldo-Lima, E., Hernández-Luna, M., Bárzana, E. (2016). Enhanced Bioethanol Production from Blue Agave Bagasse in a

Combined Extrusion-Saccharification Process. Bioenergy Research. Vol. 9. 1005-1014.

25. Moreno, M. (2011). Pretratamiento de residuos lignocelulósicos (bagazo de agave) para su enriquecimiento en celulosa y valoración de azúcares reductores. Tesis. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Química.

26. Negro, MJ., Manzanares, P., Ballesteros, I., Oliva, JM., Cabañas, A., Ballesteros, M. (2003). Hydrothermal Pretreatment Conditions to Enhance Ethanol Production from Poplar Biomass. Applied Biochemistry and Biotechnology. Vol. 105-108. 87-100.

27. Plan Rector Sistema Producto Nacional Palma de Coco [en línea]. Ciudad de México: palma de coco a.c./ Tecnológico de Monterrey [fecha de consulta: 11 octubre 2016]. Disponible desde Internet: <<http://dev.pue.itesm.mx/sagarpa/nacionales/EXP_CNSP_PALMA%20DE%20COCO/PLAN%20RECTOR%20QUE%20CONTIENE%20PROGRAMA%20DE%20TRABAJO%202012/PR_CNSP_PALMA%20DE%20COCO_2012.pdf>.

28. Pernalet Zoycris, Piña Francibell, Suárez Madeleine, Ferrer Alexis, Aiello Cateryna. (2008). Fraccionamiento del bagazo de caña de azúcar mediante tratamiento amoniacal :

Efecto de la humedad del bagazo y la carga de amoniaco. Revista de Decanato de Agronomía, Universidad Centro Occidental "Lisandro Alvarado", Venezuela.

29. Pimentel, M. (2013). Pretratamiento de residuos lignocelulósicos mediante expansión de dióxido de carbono en estado supercrítico. Tesis. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Química.

30. Rodrigues, S., Pinto, GAS. (2007). Ultrasound extraction of phenolic compounds from coconut (*Cocos nucifera*) shell powder. Journal of Food Engineering. Vol. 80, 869-872.

31. Rubio, M. (2015). Valorización de lirio acuático (*Eichhornia crassipes*): pretratamiento del material lignocelulósico, estudios de digestibilidad y obtención de enzimas hidrolíticas a partir de compost. Tesis. Universidad Nacional Autónoma de México.

32. Sánchez Teyer, Lorenzo Felipe. Coco, industria con futuro [en línea] Mérida, Yucatán [fecha de consulta: 11 octubre 2016]. Disponible en: <http://mundoejecutivo.com.mx/economia-negocios/2016/05/19/coco-industria-futuro>

33. Sun, Y., Cheng, J. (2002). Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. Bioresource Technology. Vol. 83. 1-11.

34. Tsoumis, G. (1991). Science and technology of Wood: structure, properties and utilization. Van Nostrand Reinhold, New York.
35. Trulea, A., Vintila, T., Popa, N., Pop, G. (2016). Mild alkaline pretreatment applied in the biorefinery of sorghum biomass for ethanol and biogas production. *Agrolife Scientific Journal*. Vol. 5. 156-159.
36. Vandenbossche, V., Brault, J., Vilarem, G., Hernández-Meléndez, O., Vivaldo-Lima, E., Hernández-Luna, M., Bárzana, E., Rigal, L. (2014). A new lignocellulosic biomass deconstruction process combining thermo-mechano chemical action and bio-catalytic enzymatic hydrolysis. *Industrial Crops and Products*. Vol. 55. 258-266.
37. Vilarem, G., VandenBossche, V., Rigal, L., Bárzana, E., Hernández-Meléndez, O., Vivaldo-Lima, E., Hernández-Luna, M. *Procédé de Traitement Enzymatique d'une Matière Lignocellulosique Solide*. (2013). Institut National de la Propriété Industrielle. NEN1255394.
38. Vilarem, G., VandenBossche, V., Rigal, L., Bárzana, E., Hernández-Meléndez, O., Vivaldo-Lima, E., Hernández-Luna, M. *Method of Enzymatic Treatment of a Solid Lignocellulosic Material*. (2014). Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle. WO2013/182827A1.

39. Vilarem, G., VandenBossche, V., Rigal, L., Bárzana, E., Hernández-Meléndez, O., Vivaldo-Lima, E., Hernández-Luna, M. Method of Enzymatic Treatment of a Solid Lignocellulosic Material. (2015). Patent Application US20150299751A1.
40. Woodroof, Jasper Guy (1979) "Coconuts : production, processing, products"[En línea]Sin lugar de publicación [Fecha de consulta : 18 octubre 2016]. Disponible en :<<http://www.cbltrading.com/whychooseus.html>>
41. Wyman, C.E Decker, S. R. Himmel, M. E. Brady, J. W. Skopec, C. E. Vikari, L. (2005). Hydrolysis of cellulose and Hemicellulose. Polysaccharides structural diversity and functional versatility. S. Dimitriu, New York, Marcel Dekker 995 – 1025.
42. Van Soest P.J., Wine, R.H. (1963). Use of detergents in the analysis of fibrous feeds. II. A rapid method for the determination of fiber and lignin. Journal of the A.O.A.C. Vol. 46, 829-835.
43. Zheng, Y. Lin, H-M. Tsao, G. T. (1998). Pretreatment for Cellulose Hydrolysis by Carbon Dioxide Explosion. Biotechnology Progress. Vol 14.890-896