



Secretaría de Educación Pública

TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO

Instituto Tecnológico de Veracruz



**“Producción de etanol de segunda generación a partir de rastrojo de
maíz”**

Tesis

Que para obtener el grado de:

Maestría en Ciencias en Ingeniería Bioquímica

Presenta:

IBT. Flor Argelia Tiburcio León

Asesores:

Dra. María Guadalupe Aguilar Uscanga

Dra. Beatriz Torrestiana Sánchez

“Producción de etanol de segunda generación a partir de rastrojo de maíz”

por:

IBT. FLOR ARGELIA TIBURCIO LEÓN

Tesis propuesta a la

Unidad de Investigación y Desarrollo de Alimentos

del

INSTITUTO TECNOLÓGICO DE VERACRUZ

Como requerimiento parcial para obtener el grado de

MAESTRO EN CIENCIAS EN INGENIERÍA BIOQUÍMICA

ASESORAS

Dra. Ma. Guadalupe Aguilar Uscanga

Dra. Beatriz Torrestiana Sánchez

Veracruz, Ver., 21 Junio de 2019

DEDICATORIA

A Dios por permitirme estar presente, por ser fuerza y guía para lograr los objetivos de mi vida.

A mis padres, J. Francisco Tiburcio García y Dinora M. León Gutierrez por el apoyo sin medida que me brindaron en este proceso y el cariño que siempre me han otorgado, por la paciencia y por su ejemplo de arduo trabajo y esfuerzo constante que me permitieron ser la persona que soy ahora.

A mi hermana Eva D. Tiburcio León, por ser fuente de inspiración en mi vida y por el apoyo que siempre me ha dado.

A mis abuelas Florentina (†), Argelia y abuelito Joel por su apoyo y gran cariño que me dan siempre.

A Ceci por las aventuras, el cariño y el apoyo a pesar de la distancia.

A Ricardo por la paciencia, el cariño y el apoyo en todo este tiempo.

A la Dra. Lupita, por la oportunidad de hacerme parte de este proyecto, por el aprendizaje, las experiencias en el Laboratorio de Bioingeniería y en la planta piloto y por el apoyo constante, muchas gracias.

A mis amigos Paty, Iván, David y Alicia que hicieron de mi estancia una muy agradable, gracias por todo su apoyo.

A Marili y Sandra por todo el apoyo brindado dentro del Laboratorio de Bioingeniería, GRACIAS POR TODO.

A mis amigos de la maestría, por todos los momentos compartidos en los pasillos, las canchas de volibol, en los laboratorios e instalaciones de la UNIDA, ustedes hicieron de esta experiencia recuerdos memorables.

A mis amigas y amigos del Laboratorio de Bioingeniería por las risas, la comida, los dulces, el cariño y las experiencias dentro del Laboratorio de Bioingeniería y en la planta piloto, pero sobretodo por su gran apoyo y ayuda brindada, MUCHAS GRACIAS.

RECONOCIMIENTOS

Al Instituto Tecnológico de Veracruz, que a través de la Unidad de Investigación y Desarrollo en Alimentos genera programas de calidad a través de la formación de científicos contribuyendo en el desarrollo social, científico e industrial.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada y las oportunidades e incentivos para realizar estancias fuera del país y el apoyo otorgado al proyecto CONACYT-SAGARPA No. 2017-03-291143.

A la Dra. María Guadalupe Aguilar Uscanga por haber contribuido en mi formación a través de su labor como docente, sus conocimientos y la confianza otorgada.

Al Dr. José Manuel Domínguez Gonzáles perteneciente a la Universidad de Vigo, Galicia y el grupo BioTecnIA en el Tecnópole por el apoyo y por hacer de mi estancia una experiencia de retos, satisfactoria y de mucho aprendizaje.

A la Maestra Dulce María Barradas Dermitz por el gran apoyo que me brindó durante mis actividades en el Laboratorio y a la Maestra Patricia M. Hayward Jones por su apoyo en la redacción del inglés.

A la Dra. Beatriz Torrestiana Sánchez, Dra. Mirna Leonor Suárez Quiroz y Dr. J. Joel Espinosa de Los Monteros por sus contribuciones en la presente tesis de maestría a través de su experiencia y conocimientos.

RESUMEN

Tiburcio León, Flor Argelia. Maestría en Ciencias en Ingeniería Bioquímica. Unidad de Investigación y Desarrollo en Alimentos del Instituto Tecnológico de Veracruz. Junio, 2019. “Producción de etanol de segunda generación a partir de rastrojo de maíz”. Asesores: Aguilar Uscanga, María Guadalupe, Torrestiana Sánchez, Beatriz.

Los biocombustibles son una opción viable para reemplazar a los combustibles fósiles debido a que se producen vía fuentes renovables. El bioetanol de segunda generación (2G) es un biocombustible producido a partir del material lignocelulósico proveniente de residuos agrícolas o industriales. México se encuentra entre los 10 mayores productores de maíz a nivel mundial (25 600 000 t, 2018-2019), en consecuencia el rastrojo es un subproducto generado en la cosecha. Debido a su estructura compleja, el rastrojo requiere de pretratamientos previos para la producción de bioetanol 2G. El propósito del pretratamiento es debilitar la estructura del material para facilitar la sacarificación o hidrólisis enzimática, una etapa limitante debido al costo alto de las enzimas. Para contribuir a la solución de esta problemática, la compañía Novozymes desarrolló enzimas de nombre comercial Cellic, las cuales han demostrado altos rendimientos de conversión de celulosa a glucosa siendo un factor potencial en la producción industrial de bioetanol 2G. Por ello, el objetivo de este proyecto fue establecer las mejores condiciones para la secuencia: pretratamiento-hidrólisis enzimática (o sacarificación) y fermentación del rastrojo de maíz. Se utilizaron dos pretratamientos: ácido más alcalino (ACAL) y alcalino (AL); las enzimas Cellic® CTec3 y Cellic® HTec3 y la cepa *Saccharomyces cerevisiae* ITV-01. Los resultados obtenidos mostraron que el proceso ACAL fue el mejor pretratamiento con 68.05% de glucanos, un 80% de deslignificación y 100% en la remoción de xilanos, las condiciones óptimas del pretratamiento ácido fueron: 2.27% v/v de H₂SO₄, un tiempo de 25 min, y relación líquido sólido (RLS) 4:1, para la hidrólisis alcalina fueron: 6% v/v de H₂O₂ y NaOH 10 M, un tiempo de 30 h y una RLS 12:1. La etapa de hidrólisis enzimática del proceso ACAL permitió obtener hasta un 93% de conversión de celulosa a glucosa con una concentración de 59 g/L, siendo 41% mayor al proceso AL con 41.92 g/L de glucosa y una conversión del 92%. Las condiciones óptimas del proceso ACAL fueron: una concentración de enzima CTec3 del 7% p/p, RLS de 12:1, un tiempo de 38 h y una conversión del 93%. Finalmente, en la fermentación del proceso ACAL se obtuvo una productividad de 0.90 g/Lh y una máxima producción de etanol de 20.9 g/L, superando en 87% y 64% a las obtenidas en el proceso AL. Por último, se concluye que mediante diseños experimentales Box Behnken se logró establecer las condiciones óptimas del proceso para la producción de etanol 2G del rastrojo de maíz con las enzimas Cellic® CTec3 y HTec3 y la levadura *S. cerevisiae* ITV-01, logrando obtener en el proceso ACAL y AL conversiones de 93% y 92%, y un rendimiento en la fermentación de 0.42 g/g y 0.30 g/g, respectivamente.

ABSTRACT

Tiburcio León, Flor Argelia. Master of Science in Biochemical Engineering. Food Research and Development Unit of the Veracruz Institute of Technology. June, 2019. "Production of second generation ethanol from corn stover". Advisors: Aguilar Uscanga, María Guadalupe, Torrestiana Sánchez, Beatriz.

Biofuels are a viable option to replace fossil fuels because they are produced via renewable sources. The second generation bioethanol (2G) is a biofuel produced from lignocellulosic material from agricultural or industrial waste. Mexico is among the 10 largest producers of corn worldwide (25,600,000 t, 2018-2019), consequently stover is a by-product generated in the harvest. Due to its complex structure, the stubble requires pre-treatments for the production of 2G bioethanol. The purpose of pretreatment is to soften the structure of the material to facilitate saccharification or enzymatic hydrolysis, a limiting step due to the high cost of the enzymes. To contribute to the solution of this problem, the company Novozymes developed enzymes of commercial name Cellic, which have shown high yields of conversion of cellulose to glucose being a potential factor in the industrial production of 2G bioethanol. Therefore, the objective of this project was to establish the best conditions for the sequence: pretreatment-enzymatic hydrolysis (or saccharification) and fermentation of corn stover. Two pretreatments were used: acid-alkaline (ACAL) and alkaline (AL); the Cellic® CTec3 and Cellic® HTec3 enzymes and the strain *Saccharomyces cerevisiae* ITV-01. The results obtained showed that the ACAL process was the best pretreatment with 68.05% of glucans, 80% of delignification and 100% in the removal of xylans, the optimal conditions of the acid pretreatment were: 2.27% v/v of H₂SO₄, a time of 25 min, and solid liquid ratio (RLS) 4: 1, for alkaline hydrolysis were: 6% v/v of H₂O₂ and 10 M NaOH, a time of 30 h and a RLS 12: 1. The enzymatic hydrolysis stage of the ACAL process allowed up to 93% conversion of cellulose to glucose at a concentration of 59 g/L, 41% higher than the AL process with 41.92 g/L of glucose and a conversion of 92%. The optimal conditions of the ACAL process were: a CTec3 enzyme concentration of 7% w/w, RLS of 12:1, a time of 38 h and a conversion of 93%. Finally, the fermentation of the ACAL process, a productivity of 0.90 g / Lh and a maximum ethanol production of 20.9 g/L were obtained, surpassing in 87% and 64% those in the AL process. Finally, it is concluded that through Box Behnken experimental designs it was possible to establish the optimal conditions for the production of 2G ethanol from corn stover with Cellic® CTec3 and HTec3 enzymes and *S. cerevisiae* ITV-01 yeast, obtaining in the ACAL and AL conversion process of 93% and 92%, and a fermentation yield of 0.42 g/g and 0.30 g/g, respectively.

CONTENIDO

RESUMEN	iv
ABSTRACT	v
LISTA DE TABLAS	xi
LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS	xiii
INTRODUCCIÓN	1
1. ANTECEDENTES	3
1.1 Cultivo de maíz	3
1.1.1 Variedades de maíz	5
1.1.2 Producción de maíz	6
1.2 Rastrojo de maíz	7
1.3 Materiales lignocelulósicos	9
1.4 Obtención de bioetanol a partir de rastrojo de maíz	11
1.5 Pretratamientos de materiales lignocelulósicos	11
1.5.1 Pretratamientos físicos	12
1.5.2 Pretratamientos químicos	13
1.5.2.1 Ácidos diluidos	13
1.5.2.2 Alcalino	14
1.5.3 Pretratamientos biológicos	14
1.6 Enzimas	15
1.6.2 Celulasas	16

1.6.3	Xilanasas	16
1.7	Hidrólisis de la biomasa lignocelulósica	17
1.7.2	Hidrólisis ácida	17
1.7.3	Hidrólisis alcalina	18
1.7.4	Hidrólisis enzimática	18
1.8	Fermentación	19
1.8.1	Factores que influyen en el proceso de la fermentación alcohólica	19
1.8.1.1	Material biológico	19
1.8.1.2	Condiciones fisicoquímicas	20
1.8.1.4	Medio de cultivo	21
	2. JUSTIFICACIÓN	23
	3. OBJETIVOS	24
3.1	Objetivo general	24
3.2	Objetivos específicos	24
	4. MATERIALES Y MÉTODOS	25
4.1	Obtención de rastrojo de maíz	25
4.2	Caracterización del rastrojo de maíz	26
4.3	Optimización del proceso de hidrólisis del rastrojo de maíz	27
4.3.1	Prehidrólisis ácida	27
4.3.2	Hidrólisis alcalina	27
4.3.2.1	Evaluación de factores para el diseño de experimentos de la hidrólisis alcalina	29
4.3.3	Hidrólisis enzimática	30
4.3.3.1	Evaluación de factores para el diseño de experimentos de la hidrólisis	31

	enzimática para el proceso ACAL	
4.3.3.2	Evaluación de factores para el diseño de experimentos de la hidrólisis enzimática para el proceso AL	32
4.4	Fermentación del hidrolizado del rastrojo de maíz	33
4.4.1	Material biológico	33
4.4.2	Medios de cultivo	34
4.4.2.1	Medio de conservación	34
4.4.2.2	Medio de fermentación	35
4.4.3	Condiciones de fermentación	35
4.4.3.1	Precultivo y preinóculo	35
4.4.3.2	Fermentación	36
4.4.4	Métodos analíticos	36
4.4.4.1	Análisis de biomasa	36
4.4.4.2	Cuenta celular	37
4.4.4.3	Viabilidad celular	37
4.4.4.4	Análisis de sustratos y productos	38
4.4.5	Análisis de datos experimentales	38
4.4.5.1	Rendimientos y productividad	38
4.4.5.2	Velocidades globales	39
4.4.5.3	Velocidades específicas	39
4.4.5.3	Porcentaje de conversión	40
	5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	41
5.1	Caracterización del rastrojo de maíz	41
5.2	Optimización del proceso de hidrólisis del rastrojo de maíz	42

5.2.1	Prehidrólisis ácida	42
5.2.2	Hidrólisis alcalina	45
5.2.2.1	Evaluación de factores para el diseño de experimentos de la hidrólisis alcalina del proceso ACAL	45
5.2.2.2	Evaluación de factores para el diseño de experimentos de la hidrólisis alcalina del proceso AL	49
5.2.3	Hidrólisis enzimática	53
5.2.3.1	Evaluación de factores para el diseño de experimentos de la hidrólisis enzimática para el proceso ACAL	54
5.2.3.2	Evaluación de factores para el diseño de experimentos de la hidrólisis enzimática para el proceso AL	57
5.2.4	Fermentación del hidrolizado del rastrojo de maíz	60
6. CONCLUSIONES		63
7. BIBLIOGRAFÍA		64

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. 1	Planta del maíz	4
FIGURA 1. 2	Rastrojo de maíz	8
FIGURA 1. 3	Composición del material lignocelulósico	10
FIGURA 1. 4	Producción de bioetanol a partir de materiales lignocelulósicos	11
FIGURA 4. 1	Metodología general para la producción de etanol de segunda generación	25
FIGURA 5. 1	Efecto de las condiciones de la hidrólisis ácida del RM sobre la producción de xilosa (g/L): a) RLS vs concentración de H ₂ SO ₄ b) RLS vs tiempo c) Tiempo vs concentración de ácido	44
FIGURA 5. 2	Efecto de las condiciones de la hidrólisis alcalina del RM sobre el porcentaje de lignina residual: a) RLS vs concentración de H ₂ O ₂ b) Tiempo vs concentración de H ₂ O ₂ c) RLS vs tiempo	48
FIGURA 5. 3	Efecto de las condiciones de la hidrólisis alcalina sobre el porcentaje de lignina residual en el RM sin pretratar: a) RLS vs concentración de H ₂ O ₂ b) Tiempo vs concentración de H ₂ O ₂ c) RLS vs tiempo.	52
FIGURA 5. 4	Efecto de las condiciones de la hidrólisis enzimática del RM en el proceso ACAL sobre el porcentaje de conversión: a) RLS vs concentración de CTec3 b) RLS vs tiempo c) Tiempo vs concentración de CTec3	56
FIGURA 5. 5	Efecto de las condiciones de la hidrólisis enzimática del RM en el proceso AL sobre el porcentaje de conversión: a) concentración de HTec3 vs concentración de CTec3 b) Tiempo vs concentración de CTec3 b) RLS v tiempo c) Tiempo vs concentración de HTec3.	59
FIGURA 5. 6	Consumo de glucosa y producción de etanol en la fermentación del proceso ACALH y ALH del rastrojo de maíz	60

LISTA DE TABLAS

TABLA 1. 1	Clasificación taxonómica del maíz	3
TABLA 1. 2	Variedades y usos del maíz en México	5
TABLA 1. 3	Principales países productores de maíz.	6
TABLA 1. 4	Principales estados productores de maíz	7
TABLA 1. 5	Pretratamientos físicos para los materiales lignocelulósicos	12
TABLA 1. 6	Pretratamientos químicos para los materiales lignocelulósicos	13
TABLA 1. 7	Complejos enzimáticos desarrollados por Novozymes	15
TABLA 4. 1	Parámetros para la caracterización del rastrojo de maíz	26
TABLA 4. 2	Diseño Box-Behnken con valores codificados y reales de la prehidrólisis ácida del rastrojo de maíz	28
TABLA 4. 3	Diseño Box-Behnken con valores codificados y reales de la hidrólisis alcalina del rastrojo de maíz.	30
TABLA 4. 4	Diseño Box Behnken para la hidrólisis enzimática del RM	32
TABLA 4. 5	Diseño Box Behnken para la hidrólisis enzimática del RM	33
TABLA 4. 6	Composición del medio para conservación de <i>S. cerevisiae</i> ITV01	34
TABLA 4. 7	Medio de activación para <i>S. cerevisiae</i> ITV01	35
TABLA 4. 8	Medio de preadaptación para <i>S. cerevisiae</i> ITV01	36
TABLA 5. 1	Caracterización lignocelulósica del RM	41
TABLA 5. 2	Condiciones de operación óptimas para la hidrólisis ácida en rastrojo de maíz	43

TABLA 5. 3	Antecedentes de la etapa de hidrólisis ácida en RM	44
TABLA 5. 4	Resultados a partir del diseño Box-Behnken para la hidrólisis alcalina del proceso ACAL	46
TABLA 5. 5	Condiciones de operación óptimas para la hidrólisis alcalina en rastrojo de maíz del proceso ACAL.	47
TABLA 5. 6	Antecedentes de la etapa de hidrólisis alcalina en RM del proceso ACAL	49
TABLA 5. 7	Resultados a partir del diseño Box-Behnken para la hidrólisis alcalina del proceso AL.	50
TABLA 5. 8	Condiciones de operación óptimas para la hidrólisis alcalina en rastrojo de maíz del proceso AL	51
TABLA 5. 9	5. 9 Antecedentes de la etapa de hidrólisis alcalina en RM del proceso AL	53
TABLA 5.10	Condiciones de operación óptimas para la hidrólisis enzimática en rastrojo de maíz del proceso ACAL	54
TABLA 5. 11	Antecedentes de la etapa de hidrólisis enzimática en RM del proceso ACAL	56
TABLA 5. 12	Condiciones de operación óptimas para la hidrólisis enzimática en rastrojo de maíz del proceso AL	58
TABLA 5. 13	Antecedentes de la etapa de hidrólisis enzimática en RM del proceso AL.	59
TABLA 5. 14	Resultados obtenidos en la fermentación del hidrolizado de rastrojo de maíz del proceso ácido-alcalino-enzimático y el proceso alcalino-enzimático	61

LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

2G	segunda generación
ACAL	pretratamiento ácido más alcalino
AL	pretratamiento alcalino
HE	hidrólisis enzimática
FE	fermentación
RLS	relación líquido sólido
$Y_{p/s}$	rendimiento de etanol
$Y_{x/s}$	rendimiento de biomasa
Q	productividad de etanol
μ	velocidad específica de crecimiento
ACALH	proceso ácido-alcalino y enzimático
ALH	proceso alcalino enzimático
GE	glucosa experimental
GT	glucosa teórica

INTRODUCCIÓN

Uno de los grandes desafíos del siglo XXI es satisfacer la demanda de energía para el transporte y procesos industriales, y proveer materia prima para las industrias químicas de una manera sustentable. Los biocombustibles han surgido como una opción ideal para cubrir estos requerimientos de una manera sostenible para el medio ambiente. Se resalta el interés de estos productos debido a la incertidumbre en el suministro del petróleo por el aumento en su demanda, en la preocupación sobre el calentamiento global y emisiones de gases de efecto invernadero asociados con el uso de combustibles fósiles (Corre *et. al.*, 2019).

De acuerdo con la materia prima utilizada los biocombustibles se clasifican en primera generación, el cual utiliza azúcares fermentables de cultivos tales como maíz, caña y sorgo dulce, el de segunda generación, que son los biocombustibles generados a partir de materiales lignocelulósicos tales como madera y residuos agroindustriales, y el de tercera generación se basa en el uso de microalgas. Una ventaja de los biocombustibles de segunda generación es que no compite en materias primas con la cadena alimentaria en comparación con los biocombustibles de primera generación (Correa *et al.*, 2019).

El bioetanol es uno de los biocombustibles líquidos más demandados a nivel mundial ya que puede ser producido a partir de una variedad de sustratos de bajo costo. Estados Unidos como primer productor mundial utiliza principalmente el maíz para la producción de bioetanol y Brasil en tercer lugar con el bagazo de caña (Zhao *et al.*, 2018).

En México, el maíz es un cultivo destinado principalmente para la alimentación, sin embargo, a partir de este se obtiene el rastrojo, el cual es un residuo generado después de la cosecha del maíz (Galarza, 2008). El rastrojo de maíz comprende la cáscara de la mazorca, el tallo y las hojas, el contenido que posee de hemicelulosa, celulosa y lignina lo hace un material lignocelulósico potencial para la producción de etanol.

En la generación de bioetanol a partir de materiales lignocelulósicos es necesario implementar pretratamientos que permitan obtener altas concentraciones de azúcares fermentables. Sin Radquisición de enzimas a un costo alto (Kumar *et. al*, 2015). Actualmente, la empresa Novozymes ha desarrollado enzimas de última generación de la familia Cellic®, las cuales han demostrado tener altos rendimientos de conversión de celulosa a glucosa y un gran potencial para su uso en la producción de bioetanol de segunda generación.

De esta manera el objetivo de este proyecto es establecer las mejores condiciones de fermentación del rastrojo de maíz utilizando *Saccharomyces cerevisiae* ITV-01 y las enzimas Cellic® CTec3 y Cellic® HTec3 para el proceso secuencial de pretratamiento-hidrólisis-fermentación de la producción de etanol de segunda generación. Por tal efecto se plantean los siguientes objetivos específicos: 1) Caracterizar el material lignocelulósico en cuanto a su composición en lignina, hemicelulosa y celulosa de residuos, 2) Establecer las mejores condiciones del proceso de hidrólisis ácida y/o alcalina y enzimática utilizando enzimas de última generación Cellic® CTec3 y Cellic® HTec3 para la producción de xilosa y glucosa, y 3) Evaluar el uso del hidrolizado enzimático utilizando la levadura *Saccharomyces cerevisiae* ITV01 para la producción de etanol en biorreactor por cultivo por lote.

El Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) suministró dos variedades de rastrojo de maíz resultando ser la variedad H520 con un 20% más de glucanos con respecto a la variedad H567. Posteriormente para el pretratamiento se plantearon dos procesos: (1) pretratamiento ácido-alcalino (ACAL), seguido de hidrólisis enzimática (HE) y fermentación (FE) y (2) un pretratamiento alcalino (AL), HE y FE.

En este trabajo se identifica como primera parte una revisión bibliográfica sobre el rastrojo de maíz, los materiales lignocelulósicos, las enzimas y los pretratamientos que intervienen dentro del proceso de la producción de bioetanol de segunda generación, posteriormente se presentan los materiales y métodos utilizados y finalmente se describen los resultados obtenidos y las conclusiones.

1. ANTECEDENTES

1.1 Cultivo de maíz

Es un cereal del género *Zea* de la familia *Poaceae*, su nombre científico es *Zea mays* (Tabla 1.1). A través de distintos hallazgos arqueológicos se determinó que el maíz fue domesticado en cuatro lugares en México hace 8000 años aproximadamente, dos centros que comprenden la región de Oaxaca y Chiapas, y dos centros ubicados en el estado de Morelos y Guerrero (Benz, 1997).

TABLA 1. 1 Clasificación taxonómica del maíz

Reino	Plantae
División	Magnoliophyta
Clase	Liliopsida
Orden	Poales
Familia	Poaceae
Subfamilia	Panicoideae
Género	<i>Zea</i>
Especie	<i>mays</i>

Fuente: Sánchez, 2014

Es una planta robusta de producción anual, de tierras calientes y húmedas, aunque existen variedades que se adaptan fácilmente (Figura 1.1). Las condiciones agroecológicas ideales para la producción de este cultivo deben ser donde la época de siembra coincida con la iniciación de las lluvias, el suelo debe tener disponibilidad de nutrientes, ser permeable y profundo, debe tener una capacidad ideal de retención de agua y un pH entre 5.5 y 7.0, una temperatura ambiente de 25°C hasta 30°C, luminosidad alta, así como precipitación anual mayor a 450mm (Cardona *et al.*, 2005).



FIGURA 1. 1 Planta del maíz

Entre las características morfológicas principales se encuentra lo siguiente:

Tallo: Es de apariencia similar a una caña, robusto y sin ramificaciones alcanzando de 0.5 metros a 6 metros de altura. En el extremo se observa una panoja de pequeñas flores masculinas de color amarillo que posee de entre 20 a 25 millones de granos de polen.

Inflorescencia: es una planta de inflorescencia monoica masculina y femenina separadas dentro de la misma planta. La inflorescencia femenina posee de 800 a 1000 granos de polen y se forman en unas estructuras llamadas espádices en forma lateral.

Hojas: son largas y de gran tamaño, lanceoladas y paralelinervias. Estas abrazan al tallo y presentan vellosidades por el haz, además son afiladas en la zona de los extremos.

Raíces: son fasciculadas y aportan anclaje a la planta, pueden observarse raíces secundarias o adventicias.

Mazorca: nacen de dos a tres inflorescencias envueltas en espatas en la axila de las hojas. Además, se observan filas de granos, los cuales varían en número entre ocho a treinta, a cada uno le corresponde un hilo largo sedoso sobresaliente en el extremo de la mazorca.

1.1.1 Variedades de maíz

En América Latina se han descrito cerca de 220 razas de maíz, de las cuales 64 se han identificado para México, donde 59 razas se consideran nativas y 5 identificadas en otras regiones, pero también han sido reportadas en el país. Anderson y Cutler (1942) definieron el término raza como un grupo de individuos relacionados con suficientes características en común, las cuales son generalmente reconocidas por los campesinos como una variedad agrícola. Estas razas se han clasificado principalmente según su uso en las variedades mostradas en la Tabla 1.2.

TABLA 1. 2 Variedades y usos del maíz en México

NOMBRE	USOS
Maíz cerero o ceroso	Elaboración de adhesivos y gomas
Maíz cristalino	Alimentación
Maíz palomero	Alimentación
Maíz dulce	Alimento enlatado
Maíz dentado	Alimentos en la industria y ensilaje
Maíz semidentado	Alimento para mejoramiento genético
Maíz truncado	Mejoramiento genético.

Fuente: SIAP, 2015

En México, el maíz es el cultivo de mayor presencia y es parte de la alimentación diaria, es un insumo para la obtención de diversos productos industriales y para la ganadería, siendo desde el punto de vista económico, político y social, el cultivo agrícola más importante. Generalmente se mencionan dos variedades principales de maíz: el blanco y el amarillo o forrajero. El maíz blanco se produce principalmente para el consumo humano.,por otra parte, el maíz amarillo se destina al procesamiento industrial y a la alimentación animal (Reyes *et al.*, 2013).

1.1.2 Producción de maíz

El maíz es un cultivo que se produce en los ciclos agrícolas primavera-verano y otoño-invierno. La producción global de maíz la encabeza Estados Unidos con 366 millones de toneladas, la Tabla 1.3 muestra los principales productores en el mundo.

TABLA 1. 3 Principales países productores de maíz.

País	Millones de toneladas
E.U.A.	366
China	257
Brasil	94
Unión Europea	60
Argentina	46
Ucrania	35
México	25

Fuente: SADER, 2019

México es el séptimo productor de maíz en el mundo, se produce un promedio anual de 25 millones toneladas de maíz en una superficie de 7.4 millones de hectáreas, esto representa el 2.32% del total cosechado globalmente. En el ciclo primavera-verano, la producción de maíz comprende el 87% de la superficie el cual depende de las lluvias y, por otro lado, el ciclo otoño-invierno corresponde a la modalidad de riego y comprende el 62% de la superficie destinada a su producción (SADER, 2019).

En la producción nacional (Tabla 1.4) de maíz, Sinaloa ocupa el primer lugar con 5,273 millones toneladas reportadas entre el 2018 y 2019.

TABLA 1. 4 Principales estados productores de maíz

PAÍS	Millones de toneladas
Sinaloa	5,273
Jalisco	3,561
Michoacán	1,983
México	1,930
Guanajuato	1,661
Guerrero	1,166
Tamaulipas	950
Veracruz	516

Fuente: SADER,2019

1.2 Rastrojo de maíz

El rastrojo de maíz es un residuo que se genera después de la cosecha, este comprende la cáscara de la mazorca, la panoja, el tallo y las hojas (Figura 1.2) Según distintos autores (Van Dongen *et al.*, 2011; Eylon *et al.*, 2011; Lee *et al.*, 2015) se ha determinado que el porcentaje

de lignina presente se encuentra en un rango de 8 a 29%, de hemicelulosa de 14 a 35% y de celulosa de 29 a 45%, esta composición permite identificarlo como un material lignocelulósico.



FIGURA 1. 2 Rastrojo de maíz

El rastrojo de maíz ha sido utilizado en menores escalas como combustible en cocinas rústicas, como alimento para ganado y fertilización del suelo. Kadam (2003) estima que de la producción anual de rastrojo de maíz, 34 mil de toneladas se destinan para los usos anteriormente mencionados, es decir, alrededor del 60-80% de rastrojo de maíz se encuentra disponible para su uso como bioetanol.

En México, se usa principalmente para alimentación en la ganadería representando el 24% de la materia seca disponible para este fin. Además representa el 50% del total de la materia seca producida en una hectárea de grano, esto significa que por cada kilogramo de maíz se genera uno de rastrojo (SIAP,2015).

Debido a su composición, el rastrojo resulta ser un material lignocelulósico potencial en la producción de bioetanol por demostrar altos contenidos en celulosa. El bioetanol es producido en la fermentación de azúcares a través de levaduras o bacterias al contrario del producido por fuentes fósiles de forma sintética. Actualmente el bioetanol es un producto de gran valor debido a que el petróleo, la principal fuente de energía, ha ido aumentando su precio de adquisición a consecuencia de la alta demanda energética mundial y promueve daños al medio ambiente, por otro lado, el bioetanol resulta ser un combustible que no afecta al medio ambiente ya que presenta altos porcentajes de reducción en la generación de gases de efecto invernadero (Zhao *et al.*, 2018). El bioetanol, a partir del material lignocelulósico como es el

rastrojo de maíz, es obtenido mediante la hidrólisis de celulosa que este contiene siendo fragmentada a glucosa.

1.3 Materiales lignocelulósicos

Los materiales lignocelulósicos son la fuente renovable más abundante en el mundo y sus aplicaciones como materia prima son amplias. Describe la composición de las plantas ya que compone su pared celular, la cual se conforma por estructuras dinámicas formada por un complejo de: polisacáridos, compuestos aromáticos y proteínas. Este complejo se constituye por la celulosa, la hemicelulosa y la lignina, en conjunto forman una estructura donde la celulosa está rodeada por la hemicelulosa y la lignina formando una matriz lignocelulósica compleja, robusta, y reacia a la despolimerización (Figura 1.3). El fraccionamiento del material lignocelulósico derivado de tratamientos químicos o bioquímicos depende de la composición y estructura de la biomasa para poder generar productos de interés económico o industrial (Zabed *et al.*,2017).

La celulosa es un componente altamente presente en la pared celular, representa aproximadamente el 40% de la biomasa. Es un homopolisacárido lineal compuesto de unidades (500-15,000) de D-glucosa que están unidos por enlaces glicosídicos β -1-4, siendo la celobiosa la unidad repetitiva más pequeña. Los enlaces β -1-4 dan resultado a la formación de puentes de hidrógeno y enlaces van der Waals lo que contribuye a que sea altamente cristalina (Kumar *et al.*,2015). Esta característica, la hace completamente insoluble en una solución acuosa, lo cual provoca una alta resistencia del material en la hidrólisis evitando una conversión eficiente de este polímero a monómeros en los procesos de las biorrefinerías (Maity *et al.*, 2015).

La hemicelulosa es un heteropolímero complejo, corto y ramificado por diferentes monómeros de pentosas (β -D-xilosa y α -L-arabinosa) y hexosas (β -D-manosa, α -D-galactosa y β -D-glucosa) con alrededor de 50 a 200 unidades. También puede contener azúcares ácidos (ácidos urónicos) como, α -D-glucurónico, α -D-galacturónico y ácido α -D-4-O-metilgalacturónico, éstos ácidos se encuentra asociados con la celulosa en la pared celular. Algunos otros azúcares en pequeñas cantidades también están presentes tales como α -L-ramnosa y α -L-fructosa. La cadena medular de la hemicelulosa está hecha principalmente de

xilanos unidos por enlaces β -1-4, donde está presente la D-xilosa en un 90% y L-arabinosa, en un 10%. El papel de la hemicelulosa es proveer la unión entre la lignina y la celulosa (Kumar *et al.*, 2015). La hemicelulosa difiere de la celulosa debido a su característica amorfa lo que facilita el proceso de hidrólisis (Canilha *et al.*, 2012).

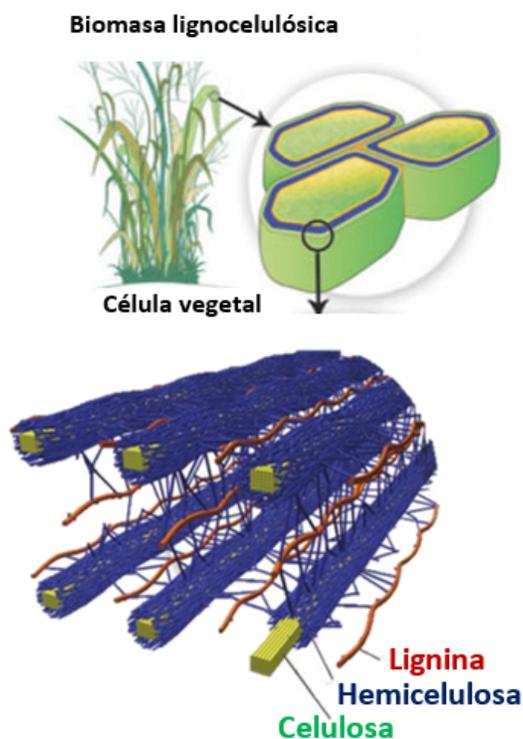


FIGURA 1. 3 Composición del material lignocelulósico

La lignina es un polímero aromático, amorfo y heterogéneo, formado principalmente por compuestos aromáticos: p-coumaril, coniferil y alcohol sinapílico. Además, este polímero está unido covalentemente con la hemicelulosa formando una matriz compleja que rodea a la celulosa. La existencia de enlaces éter y carbono-carbono en la lignina da protección y fuerza a la estructura vegetal evitando la degradación realizada por los microorganismos celulolíticos (Kumar *et al.*, 2015). La lignina es el componente más resistente de la pared celular de las plantas, mientras más alta sea la proporción de lignina, mayor resistencia tendrá el material en

la hidrólisis química y en la hidrólisis enzimática, siendo la principal barrera al usar materiales lignocelulósicos en el proceso de la fermentación (Mohammad *et al.*, 2008).

1.4 Obtención de bioetanol a partir de rastrojo de maíz

El proceso de conversión de biomasa a etanol consiste en distintas etapas que incluyen: el pretratamiento de la biomasa, la hidrólisis enzimática, la fermentación y la recuperación del producto (Figura 1.4). El etanol producido a partir de celulosa es conocido como etanol de segunda generación. La celulosa y hemicelulosa constituyen dos tercios del peso seco total de la biomasa como sustrato principal para la producción de etanol (Zabed *et al.*, 2017). La combinación propia de cada paso en este proceso es importante para alcanzar un rendimiento alto, que sea costo-efectivo y sustentable (Kumar *et al.*, 2015).



FIGURA 1. 4 Producción de bioetanol a partir de materiales lignocelulósicos

1.5 Pretratamientos de materiales lignocelulósicos

Uno de los desafíos en la producción de etanol a partir de materiales lignocelulósicos es la etapa de los pretratamientos. En esta etapa la matriz de celulosa y lignina unidos por la hemicelulosa deben ser separadas para reducir la cristalinidad y aumentar la fracción amorfa de celulosa, la cual es la forma más adecuada para una hidrólisis enzimática eficiente. El rendimiento de la hidrólisis de la celulosa después del pretratamiento suele ser mayor al 90% del teórico en comparación del 20% cuando no se realiza. (Kumar *et al.*, 2015).

Existen distintos pretratamientos lignocelulósicos que han sido desarrollados para aumentar la digestibilidad de la lignocelulosa, estos pueden clasificarse en físicos, químicos y biológicos.

El objetivo de los pretratamientos debe ser:

1. Mejorar la producción de los azúcares en la hidrólisis enzimática.

2. Evitar la formación de subproductos inhibidores en los procesos de hidrólisis posteriores.
3. Reducir el costo del proceso con requerimientos mínimos de reactivos y de energía.

1.5.1 Pretratamientos físicos

Debido a su naturaleza, las estructuras cristalinas discriminan moléculas grandes y moléculas de agua, así como las enzimas. Las partículas de menor tamaño tienen una mayor proporción superficie-volumen. El área superficial utilizable para la interacción entre la enzima y el sustrato se ve influenciada por el tamaño de poro y por la hemicelulosa a través de su efecto escudo. Los pretratamientos físicos (Tabla 1.5) como la molienda, la trituración, sonicación y radiación tienen como objetivo la reducción de tamaño y la descristalización. Los métodos no mecánicos como, por ejemplo, la pirólisis provoca cambios estructurales en la celulosa para mejorar el proceso de hidrólisis. Una desventaja de estos métodos es su efectividad limitada y los altos costos (Kumar *et al.*,2015).

TABLA 1. 5 Pretratamientos físicos para los materiales lignocelulósicos

PRETRATAMIENTO FÍSICO	PRINCIPIO
Molienda Trituración	Reduce la cristalinidad de la celulosa.
Pirólisis	
Sonicación	Altera morfología de biomasa lignocelulósica
Radiación	
Explosión de vapor	Liberación de hemicelulosa

Fuente: Kumar, 2015

TABLA 1. 6 Pretratamientos químicos para los materiales lignocelulósicos

PRETRATAMIENTO QUÍMICO	PRINCIPIO
Acido diluido	Remoción de hemicelulosa y lignina
Alcalino	Degradación de ésteres y glicósidos Modifica estructura de lignina
Ozonólisis	Remoción de lignina
Organosolv	
Líquidos iónicos	Compiten por puentes de hidrógeno rompiendo matriz lignocelulósica
Oxidación húmeda	Rompe anillos aromáticos degradando lignina
Explosión de fibras con amoniaco	Descristalización de celulosa Modifica la estructura de lignina

Fuente: Kumar, 2017

1.5.2 Pretratamientos químicos

Los pretratamientos químicos representados en la Tabla 1.6, aumentan la accesibilidad de las enzimas a la celulosa solubilizando una gran porción de lignina a través del rompimiento de los puentes de hidrógeno que mantiene unida a la celulosa conservándola intacta (Domínguez, 2013), las soluciones ácidas y alcalinas cumplen esta función. Los agentes más utilizados principalmente incluyen: hidróxido de sodio, ácido fosfórico, amoniaco acuoso, hidróxido de calcio, peróxido de hidrógeno en condiciones alcalinas, entre otros (Saini, 2015).

1.5.2.1 Ácidos diluidos

El pretratamiento con ácidos diluidos es el más empleado a escala industrial donde se utiliza una concentración entre 0.2%p/p y 2.5%p/p. Se utilizan dos tipos de pretratamiento: ácido a altas temperaturas (mayores a 180 °C) por una corta duración (1-5 min); y a temperaturas

menores a 160°C por una larga duración (30-90 min) (Kumar *et al.*,2017). El uso de ácido diluidos provoca la remoción completa de la fracción de hemicelulosa promoviendo altos rendimientos en la hidrólisis enzimática y en la obtención de azúcares solubles (Badiei, 2014). La eliminación de la hemicelulosa ocasiona el aumento en la porosidad lignocelulósica y una mayor accesibilidad hacia la fracción de celulosa. Los agentes ácidos más utilizados son el ácido sulfúrico, los ácidos dicarboxílicos, el ácido clorhídrico, entre otros (Dominguez, 2013).

1.5.2.2 Alcalino

En este pretratamiento la biomasa lignocelulósica se humedece y se mezcla con soluciones alcalinas como hidróxidos de potasio, sodio, calcio y sales de amonio. Al contrario del pretratamiento ácido, el método alcalino se realiza a presión y temperatura ambiente (Dutra, 2017). Los agentes alcalinos degradan las cadenas de ésteres y glicósidos conduciendo a una modificación estructural de lignina, un hinchamiento y descristalización de la celulosa y solvatación de la hemicelulosa (Ibrahim, 2011).

Por otra parte, Nochebuena (2013) reporta usando el peróxido de hidrógeno como pretratamiento en residuos en soluciones alcalinas, su mecanismo de acción consiste en que los aniones de hidroperóxido reaccionan con la lignina actuando como nucleófilo y oxidante formando superóxidos y radicales hidroxilos. Dutra (2017) establece que en condiciones alcalinas el peróxido de hidrógeno se desestabiliza y se descompone en presencia de ciertos metales de transición tales como manganeso, hierro y cobre generando los radicales hidroxilos y superóxidos promoviendo la deslignificación del material lignocelulósico.

1.5.3 Pretratamientos biológicos

En comparación a los métodos químicos y físicos convencionales, el pretratamiento biológico es considerado como un método eficiente, sustentable y con un bajo consumo energético. Este proceso es llevado a cabo por microorganismos tales como hongos (*Phanerochaete chrysosporium*, *Pleurotus ostreatus*, entre otros), que degradan la lignina y la hemicelulosa y una pequeña fracción de la celulosa. La mayor desventaja de este pretratamiento es su bajo rendimiento en la hidrólisis y el requerimiento de tiempos de incubación largos (Zabed *et al.*, 2017). Sin embargo, a pesar de su baja eficacia como pretratamiento independiente, los

pretratamientos microbianos pueden utilizarse para reducir la gravedad de los tratamientos químicos y físicos previos, lo que reduce la energía y el uso de sustancias químicas en el proceso (O'Hara, 2011).

1.6 Enzimas

Las enzimas son polímeros de aminoácidos con una función catalítica específica, aquellas que intervienen en la generación de azúcares fermentables a partir de materiales lignocelulósicos son las celulasas y las xilanasas.

El costo de las enzimas en los procesos de conversión de biomasa lignocelulósica a etanol, comúnmente es alto, siendo un factor limitante en el proceso. Klein-Marcuschamer (2011) menciona que se han reportado valores en términos de costo de la cantidad de enzima utilizada por galón de etanol producido en un rango de 0.10 a 0.40 dólares por galón producido de este biocombustible.

El término complejo enzimático, se refiere a un grupo de enzimas que actúan de forma sinérgica en la hidrólisis del material lignocelulósico. Actualmente, la empresa Novozymes ha desarrollado complejos enzimáticos de última generación de clase CELLIC® (Tabla 1.7), las cuales han logrado una reducción en la dosis enzimática de 1.9 veces para una conversión del 80% de celulosa y xilosa, además es 5 veces mejor que las enzimas estándares utilizadas para la degradación de biomasa reduciendo 30 veces el costo de producción (Teter, 2012).

TABLA 1. 7 Complejos enzimáticos desarrollados por Novozymes

COMPLEJO ENZIMÁTICO	CARACTERÍSTICAS
Cellic® CTec3	Actividad celulasa y xilanasas (EC: 3.2.1.4)
Cellic® HTec3	Actividad xilanasas (EC:3.2.1.3)

Fuente: Novozymes

1.6.2 Celulasas

Son enzimas que catalizan el proceso de degradación de celulosa a glucosa. El sistema está compuesto por tres principales enzimas: endoglucanasa (EC 3.2.1.4), celobiohidrolasa (EC 3.2.1.91) y β -glicosidasa (EC 3.2.1.21).

La endoglucanasa ataca aleatoriamente los enlaces internos O-glicosídicos, resultando en cadenas de glucanos de tamaño diverso y las β -glicosidasas actúan específicamente en los disacáridos de β -celobiosa produciendo glucosa. La exoglucanasa actúa en las terminaciones de la cadena de celulosa (Lee, 1997).

La naturaleza del sustrato lignocelulósico cambia durante el tiempo de acción de la hidrólisis enzimática. Inicialmente, el ataque es realizado en las regiones amorfas no cristalinas más disponibles, posteriormente conforme las regiones cristalinas aumentan en el sustrato, la velocidad de hidrólisis disminuye rápidamente. El acceso de las enzimas hacia los enlaces glicosídicos es el factor principal que limita la velocidad hidrolítica (Domínguez, 2013).

El complejo enzimático Cellic CTec3 contiene β -glicosidasas, endoglucanasas y xilanasas, las condiciones óptimas de hidrólisis son una temperatura de 50 °C y pH 5. La relación de dosis enzima-sustrato recomendada es 1 g de Cellic CTec por 100 g de celulosa. Para determinar la actividad enzimática, la compañía Novozymes desarrolló un método utilizando un marcador de fluorescencia para la cuantificación de Unidades de Hidrólisis de Biomasa (BHU). El complejo Cellic CTec3 contiene 1,700 BHU/g de producto (Novozymes).

1.6.3 Xilanasas

La hemicelulosa está compuesta principalmente por xilano, que son unidades 1,4- β -D xilosa, con sustituyentes tales como: L-arabinosa, D-galactosa, acetil, feruloil, p-cumaroil y residuos de ácido glucurónico, estos componen principalmente la pared celular, siendo el segundo polisacárido más abundante después de la celulosa (Suhang *et al.*, 2014)

Las xilanasas son enzimas hidrolíticas que llevan a cabo el proceso de degradación de los xilanos produciendo oligosacáridos. Las principales enzimas involucradas, que cortan los enlaces glicosídicos en la cadena de xilanos, son: endo-1,4- β -xilanasas y exo-xilanasas, que

actúan en las cadenas principales de xilanos e hidrolizan cadenas más pequeñas, la β -xilosidasa, ataca xilo-oligosacáridos y produce xilosa, la α -arabinofuranosidasa y α -glucuronidasa, actúan en la cadena de xilano removiendo arabinosa y ácido 4-o-metil glucurónico, respectivamente (Saha, 2003), las acetil esterasas atacan el sustituyente acetil en las fracciones de xilosa, mientras que, la feruloil esterasa hidroliza los enlaces éster entre el sustituyente de arabinosa y ácido ferúlico, además facilitan la liberación de la hemicelulosa y lignina (Howard *et al.*,2004).

El complejo enzimático Cellic HTec3 es un conjunto de hemicelulasas con actividad endoxilanasas y β -xilosidasa para una conversión efectiva de xilanos a xilosa. Las condiciones óptimas de hidrólisis son una temperatura de 50 °C y pH 5. La relación de dosis enzima-sustrato recomendada es 1 g de Cellic HTec por 100 g de xilanos (Novozymes).

1.7 Hidrólisis de la biomasa lignocelulósica

La hidrólisis es un proceso químico donde es fraccionada la molécula a través de la adición de una molécula de agua. Los procesos de hidrólisis más utilizados son con: ácido concentrado, ácido diluido en dos etapas y la hidrólisis enzimática. Al utilizar materiales lignocelulósicos en este proceso, diversos compuestos son liberados lo que puede causar una posterior inhibición en la fermentación para la producción de etanol (Canilha *et al.*2012).

1.7.2 Hidrólisis ácida

Los ácidos concentrados como H₂SO₄ y HCl han sido utilizados para tratar los materiales lignocelulósicos. A pesar de que son agentes poderosos en la hidrólisis de celulosa, los ácidos concentrados son tóxicos, corrosivos y requieren de reactores especiales que eviten la corrosión. Sin embargo, los ácidos diluidos han sido una mejor opción ya que se generan altas velocidades de reacción y un rendimiento mayor en la hidrólisis de la celulosa (Verardi *et al.*, 2012).

Vargas Tah y colaboradores (2015) reportaron con rastrojo de maíz en una hidrólisis con ácido sulfúrico al 2% (p/v) y condiciones de 40 minutos y 130°C con una concentración final de glucosa de 41 g/L , observando posteriormente que la accesibilidad de las enzimas celulolíticas en la etapa de hidrólisis enzimática se veía maximizada obteniendo 89% de conversión de celulosa a glucosa.

1.7.3 Hidrólisis alcalina

El efecto de la hidrólisis alcalina depende del contenido de lignina de los materiales. El mecanismo de este proceso es la saponificación de enlaces ésteres que comprenden la red formada por lignina y la hemicelulosa, la porosidad del material lignocelulósico aumenta con la remoción de estos entrecruzamientos.

El tratamiento con hidróxido de sodio ocasiona un hinchamiento del material lignocelulósico, que lleva al aumento en el área superficial interna, un decremento en el grado de polimerización y la cristalinidad, así como la separación de enlaces estructurales entre la lignina y los carbohidratos permitiendo la disrupción de la estructura de la lignina (Dutra *et al.*, 2017).

La biodegradación de la lignina también es catalizada en presencia de peróxido de hidrógeno. Banerjee y colaboradores (2015) reportaron con rastrojo de maíz en una hidrólisis con peróxido de hidrógeno al 18%v/v e hidróxido de sodio 5M, a temperatura ambiente, pH 11.5 y 48 h, un contenido final del 8% de lignina y 34% de celulosa, observaron que este pretratamiento es favorable en la etapa de hidrólisis enzimática debido a su efectividad en la conversión de celulosa a glucosa.

1.7.4 Hidrólisis enzimática

La hidrólisis enzimática o sacarificación, es el proceso en donde la celulosa es convertida a glucosa. Este proceso es clave para una producción costo-eficiente de etanol a partir de sustratos lignocelulósicos, siendo un proceso con altos rendimientos y costos de mantenimiento de equipos bajos ya que se lleva a cabo en condiciones moderadas (pH 4-6 y temperatura de 45-55 °C) (Kuhad *et al.*,1997). El proceso es compatible con diversos pretratamientos, sin embargo, debe removerse aquellos materiales que perjudiquen el proceso enzimático posterior al pretratamiento de la biomasa lignocelulósica. La eficiencia de la hidrólisis enzimática depende de diversos factores como el origen de la enzima y su concentración, la concentración de sustrato, la temperatura y el tiempo de sacarificación (Tucker *et al.*,2003, Banerjee *et al.* 2011, Dutra *et al.*, 2016)

1.8 Fermentación

La fermentación se define como el proceso en el cual las sustancias orgánicas o sustratos sufren una serie de reacciones (oxidaciones y reducciones) y cambios químicos que generan energía; posteriormente se presenta una acumulación de productos, ya sea, más oxidados (aceptador de iones) y reducidos (donador de iones) que el sustrato, con un balance de energía total positivo, siendo esta energía utilizada por el metabolismo de los microorganismos (Hernández, 2003).

La fermentación alcohólica es un proceso metabólico de los microorganismos en ausencia de aire para transformar hidratos de carbono (azúcares como: glucosa, fructosa, sacarosa, etc.) y obtener como productos: un alcohol (etanol), dióxido de carbono y moléculas de ATP que consumen los mismos microorganismos en su metabolismo celular anaerobio energético (Sánchez *et al.*, 2010)

1.8.1 Factores que influyen en el proceso de la fermentación alcohólica

En la fermentación es importante tomar en cuenta ciertos factores que influyen en el proceso, estos son cuatro principalmente: 1) el material biológico, 2) las condiciones fisicoquímicas, 3) el modo de operación del biorreactor y 4) el medio de cultivo.

1.8.1.1 Material biológico

Un microorganismo etanológico típico debe tener características importantes, como 1) buen crecimiento en un medio simple, 2) rendimientos altos de etanol (>90% del teórico), 3) tolerancia a una alta concentración de etanol (>40 g/L) 4) buena productividad de etanol (>1.0 g/L/h) y 5) capacidad para retardar la producción de contaminantes en condiciones de crecimiento (Dien *et al.*, 2003).

El microorganismo de mayor aplicación en la fermentación del etanol es la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. El uso de esta levadura es uno de las prácticas más antiguas en la biotecnología y actualmente se ha dirigido el interés por sus características para la producción de biocombustibles a partir de biomasa de fuentes diversas. Primeramente, ha mostrado altas eficiencias (59%) en la conversión de azúcares a alcohol y una tolerancia a altas concentraciones de sustrato (>100g/L) (Snoek *et al.*, 2016). Segundo, tiene la capacidad de producir flocs durante su crecimiento en el medio de fermentación, facilitando su

sedimentación o suspensión. Tercero, es considerado un microorganismo seguro (GRAS) (Lin *et al.*, 2006). Además, la fermentación de algunos jugos de cultivos agrícolas conteniendo sacarosa es llevada a cabo por levaduras debido a su habilidad de hidrolizar sacarosa en glucosa y fructosa a través de la secreción de la enzima invertasa (Sarris *et al.*, 2017).

La levadura *S. cerevisiae* ITV01 es una levadura autóctona aislada de melaza de caña de azúcar por Ortiz-Zamora (2006) y fue seleccionada de entre 103 cepas por sus características favorables debido a su capacidad de crecimiento en altas concentraciones de sustrato superiores a 200 g/L, la resistencia a una concentración de etanol de 56.7 g/L y un rendimiento de etanol de 0.46 g/L (90% del teórico).

1.8.1.2 Condiciones fisicoquímicas

Las levaduras crecen a temperaturas templadas, ambientes húmedos, ricos en azúcares, aerobios y ligeramente ácidos. Sin embargo, existen factores determinantes en el crecimiento y la actividad fermentativa de estos microorganismos como son: la temperatura, el agua, pH y transferencia de oxígeno (Ortiz, 2010).

La temperatura es uno de los factores de mayor importancia por la influencia en el crecimiento de las levaduras. Gran parte de las levaduras son mesófilas, es decir, crecen entre 20 °C y 32 °C, la temperatura máxima de crecimiento para levaduras se encuentra en un intervalo de 35 a 40°C (Partida-Sedas, 2016). El pH óptimo para el crecimiento de la levadura se encuentra en un rango de 4.5 a 6.5, (Strehaiano, 1984).

Para desempeñar adecuadamente las funciones del metabolismo y del crecimiento, las levaduras requieren de altas concentraciones de agua, esto se relaciona con la propiedad osmotolerante de las levaduras y se define como la capacidad de una levadura de crecer en un medio con altas concentraciones de solutos (Walker, 1998). La osmotolerancia, se relaciona con el valor del potencial hídrico del medio, este se define como la cantidad de agua disponible en presencia de solutos disueltos y está directamente relacionado con la viabilidad celular, debido a que a concentraciones altas de sustrato la presión osmótica del medio aumenta causando una disminución de la velocidad de crecimiento de la levadura (Walker, 1998). La capacidad osmotolerante de las levaduras generalmente es en concentraciones de sustrato entre 150 a 250 g/L, siendo una característica deseable en la producción de etanol.

La transferencia de oxígeno está asociada al metabolismo respiratorio y fermentativo de las levaduras. El metabolismo respiratorio es un proceso catabólico que se desarrolla en presencia de oxígeno donde ocurre una oxidación completa de la fuente de carbono generando un crecimiento mayor de la masa celular. El proceso fermentativo, ocurre en ausencia de oxígeno donde el sustrato se degrada produciendo compuestos orgánicos como el etanol y CO₂ (Walker, 1998). Dependiendo de las condiciones de cultivo según la concentración inicial de sustrato y la influencia del oxígeno es que se presentan en las levaduras, también se conocen como efectos de represión catabólica o de regulación (Efecto Kluyver, Efecto Pasteur, Efecto Custer y Efecto Crabtree) (Pronk *et al.*, 1996)

1.8.1.4 Medio de cultivo

Los compuestos orgánicos e inorgánicos en un medio de cultivo activan el crecimiento del microorganismo, esto depende de la naturaleza y las concentraciones en el medio. Además, cada levadura requiere de necesidades nutricionales diferentes, estos requerimientos pueden ser: carbono, hidrógeno, oxígeno, nitrógeno, azufre, fósforo, oligoelementos y factores de crecimiento (Ortiz, 2010).

Las levaduras obtienen energía de los compuestos orgánicos y del carbono. La glucosa es el compuesto orgánico más empleado, además de otros azúcares como hexosas, pentosas y disacáridos, trisacáridos, oligosacáridos y polisacáridos, así como ácidos orgánicos, ácidos grasos y alcoholes alifáticos. El 5% de sus requerimientos de carbono puede ser obtenido del dióxido de carbono (Walker, 1998). El hidrógeno obtenido de los carbohidratos es importante para el crecimiento y metabolismo de las levaduras debido a la variación del pH intracelular y extracelular. El oxígeno participa en la oxidación de la biosíntesis de esteroides y ácidos grasos que forman parte de la membrana celular, además es uno de los factores que activa o reprime el metabolismo respiratorio-fermentativo de las levaduras (Feldman, 2012).

El nitrógeno se encuentra en un 10% del peso seco de la célula y es esencial para el crecimiento celular. El amonio es la fuente de nitrógeno utilizable por *Saccharomyces cerevisiae* obtenido de las sales como el sulfato de amonio y fosfato diamónico, estos aportan al mismo tiempo azufre y fósforo necesarios para la síntesis de aminoácidos y el crecimiento celular (Partida-Sedas, 2016).

Los oligoelementos, como el magnesio, son necesarios en bajas cantidades (0.1%) y funcionan como cofactores de las enzimas que participan en la división celular y la ruta glicolítica, influyen en el intercambio de iones, la permeabilidad y en los sistemas de señalización de la membrana (Feldman, 2012)

Los factores de crecimiento son aquellos que no puede sintetizar el microorganismo, los más empleados en levaduras son las vitaminas como por ejemplo: biotina, tiamina y piridoxina, y esteroides como el ergosterol, estos son rápidamente asimilados en la fermentación (Aguilar, 1998).

JUSTIFICACIÓN

- El aumento en la demanda energética y en la emisión de gases de efecto invernadero ha dirigido el interés hacia fuentes alternativas para la producción de combustibles, México cuenta con el potencial de producir biocombustibles como el etanol de segunda generación, ya que es un gran productor de maíz y en consecuencia, de residuos agrícolas.
- Los factores involucrados en las etapas del pretratamiento, hidrólisis y fermentación son puntos clave para obtener un máximo rendimiento y productividad en la producción de etanol de segunda generación a partir del rastrojo de maíz, siendo necesario conocer los parámetros óptimos del proceso.
- Las enzimas Cellic® CTec3 y Cellic® HTec3 se encuentran en proceso de evaluación para su aplicación a nivel industrial en la producción de etanol de segunda generación a partir de residuos lignocelulósicos, por lo que es necesario generar conocimiento sobre su capacidad de generar azúcares fermentables a partir de rastrojo de maíz.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

Establecer las condiciones óptimas para un proceso secuencial de hidrólisis (ácida-alcalina-enzimática) y fermentación del rastrojo de maíz utilizando las enzimas Cellic® CTec3 y Cellic® HTec3y *Saccharomyces cerevisiae* ITV-01 para la producción de etanol de segunda generación.

3.2 Objetivos específicos

- 1) Caracterizar el material lignocelulósico de rastrojo de maíz en cuanto a su composición en lignina, hemicelulosa y celulosa.
- 2) Establecer las mejores condiciones de hidrólisis ácida y alcalina de rastrojo de maíz.
- 3) Establecer las mejores condiciones del proceso de hidrólisis enzimática utilizando enzimas de última generación Cellic® Ctec3 y Cellic® Htec3 para la producción de xilosa y glucosa.
- 4) Evaluar el uso del hidrolizado de rastrojo de maíz en la producción de etanol utilizando *Saccharomyces cerevisiae* ITV-01.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

Con el fin de hacer viable el proceso de producción de etanol a partir del rastrojo de maíz (RM) se requiere el establecimiento de las mejores condiciones para la obtención de azúcares fermentables a partir de la fracción lignocelulósica, por lo que se propusieron dos procesos (Figura 4.1) de optimización en la etapa de los pretratamientos y la sacarificación. En el primer proceso se realizó la optimización de la hidrólisis ácida, alcalina y, posteriormente la hidrólisis enzimática utilizando la enzima Cellic® CTec3. En el segundo proceso se omitió el pretratamiento ácido, y se optimizó la hidrólisis alcalina y la hidrólisis enzimática utilizando las enzimas Cellic® CTec3 y Cellic® HTec3.

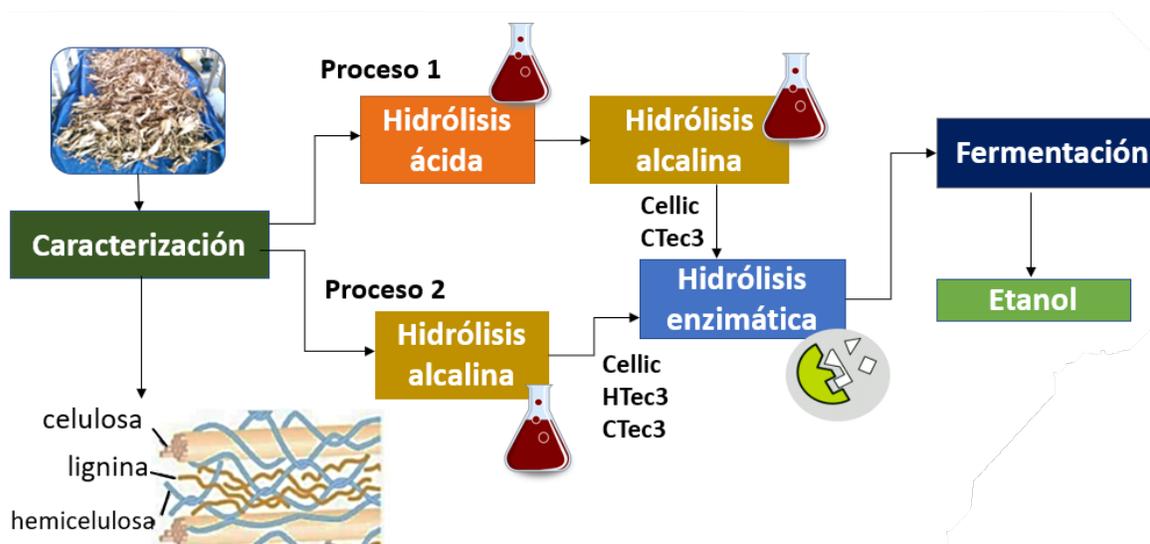


FIGURA 4. 1 Metodología general para la producción de etanol de segunda generación

4.1 Obtención de rastrojo de maíz

El rastrojo de maíz proviene de la zona de Cotaxtla, Ver. suministrado por el INIFAP zona Golfo-Centro y forma parte del proyecto CONACYT-SAGARPA 2017-2018, No. de Proyecto: 2017-03-291143, denominado: “Producción de bioetanol de 2^a generación a partir de residuos agroindustriales y enzimas obtenidas de microorganismos

autóctonos” el cual genera conocimientos básicos y aplicados al uso del rastrojo de maíz para la producción de etanol con el fin de establecer posteriormente el escalamiento a una planta piloto de etanol de segunda generación. Se otorgaron dos variedades de rastrojo de maíz denominadas H567 y H520, respectivamente.

El rastrojo de maíz fue llevado a un proceso de secado mediante exposición solar para eliminar el mayor contenido de humedad por 48 h, después fue llevado a un tratamiento de molienda o picado para reducir el tamaño de partícula, y tener mayor superficie de contacto al momento de realizar los tratamientos de hidrólisis posteriores.

4.2 Caracterización del rastrojo de maíz

Esta etapa consiste en determinar el contenido de hemicelulosa, celulosa y lignina. De esta manera tener conocimiento de la eficiencia de los métodos que se proponen para obtener azúcares reductores a partir de la materia prima, así también, se determinó la humedad, cenizas y cantidad de extractivos.

En la Tabla 4.1 se muestran los métodos estandarizados a partir de los que se determinó la composición del rastrojo de maíz.

TABLA 4. 1 Parámetros para la caracterización del rastrojo de maíz.

PARÁMETRO	MÉTODO
Humedad	AOCS Ab 2-49
Cenizas	AOCS Ba 5 ^a -49
Celulosa y Lignina	NREL
Hemicelulosa	NREL
Extractivos	NREL

Fuente: NREL, AOCS

4.3 Optimización del proceso de hidrólisis del rastrojo de maíz

Después de la reducción de tamaño del rastrojo de maíz, este fue hidrolizado en tres etapas principales para obtener la mayor cantidad de glucosa y posteriormente ser fermentado y convertido a etanol. Las etapas son: a) hidrólisis ácida (H_2SO_4 diluido), b) hidrólisis alcalina (H_2O_2 y NaOH) e c) hidrólisis enzimática utilizando celulasas y xilanasas comerciales.

4.3.1 Prehidrólisis ácida

En esta etapa se planteó un diseño experimental Box-Behnken (Tabla 4.2) evaluando tres factores: la concentración de ácido sulfúrico (0.5, 1.5, 2.5 % v/v), tiempo de pretratamiento (25, 35, 45 min) y la relación líquido-sólido (RLS) (4:1, 8:1, 12:1) teniendo como variable de respuesta a la concentración de xilosa (g/L), siendo cuantificada por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC modelo Waters 2414 con detector de índice de refracción).

Posteriormente se analizó el diseño experimental planteado con el software de optimización NCCS 2007 para determinar las condiciones óptimas para la producción de xilosa.

El pretratamiento ácido del rastrojo de maíz se llevó a cabo en una autoclave (marca AESA, modelo CV-250) a una temperatura de 121°C , una presión de 1.2 atmósferas, con tiempo de calentamiento de la resistencia de 15 min y posterior tiempo de enfriamiento de 40 min, lo cual se considera importante debido a que la exposición prolongada del hidrolizado ácido podría derivar en la degradación de los azúcares por efecto de las altas temperaturas. Se realizó una filtración del hidrolizado ácido para cuantificar mediante cromatografía líquida de alta resolución los azúcares: xilosa, glucosa y arabinosa, así como los inhibidores: ácido acético, furfural y 5 hidroximetilfurfural (5HMF) derivados de la descomposición de pentosas y hexosas. Finalmente, el hidrolizado se sometió a una serie de lavados con agua corriente y a secado por radiación solar para eliminar totalmente el contenido de humedad.

TABLA 4. 2 Diseño Box-Behnken con valores codificados y reales de la prehidrólisis ácida del rastrojo de maíz

Experimento	Variables Codificadas			Variables Naturales		
	H ₂ SO ₄ (% v/v)	Tiempo (min)	RLS (mL/g)	H ₂ SO ₄ (% v/v)	Tiempo (min)	RLS (mL/g)
1	-1	-1	0	0.5	25	8
2	1	-1	0	2.5	25	8
3	-1	1	0	0.5	45	8
4	1	1	0	2.5	45	8
5	-1	0	-1	0.5	35	4
6	1	0	-1	2.5	35	4
7	-1	0	1	0.5	35	12
8	1	0	1	2.5	35	12
9	0	-1	-1	1.5	25	4
10	0	1	-1	1.5	45	4
11	0	-1	1	1.5	25	12
12	0	1	1	1.5	45	12
13	0	0	0	1.5	35	8
14	0	0	0	1.5	35	8
15	0	0	0	1.5	35	8

4.3.2 Hidrólisis alcalina

El obstáculo principal en la producción de glucosa durante la hidrólisis enzimática es la lignina, que impide el acceso de las enzimas al sustrato limitando la producción final de etanol después de la conversión de celulosa a glucosa. El tratamiento de oxidación alcalina,

utilizando peróxido de hidrógeno con un pH de 11.5, presenta gran selectividad hacia los fenoles procedentes del desprendimiento de la lignina.

4.3.2.1 Evaluación de factores para el diseño de experimentos de la hidrólisis alcalina

En esta etapa se planteó un diseño experimental Box-Behnken (Tabla 4.3) evaluando tres factores: la concentración de peróxido de hidrógeno alcalino (2, 4, 6 % p/v), tiempo de pretratamiento (10, 20, 30 h) y la relación líquido-sólido (RLS) (4:1, 8:1, 12:1), teniendo como variable de respuesta el porcentaje de lignina remanente en el rastrojo de maíz, siendo cuantificada con la metodología NREL para residuos lignocelulósicos.

Este proceso de hidrólisis es independiente a la temperatura, por lo que se trabajó a temperatura ambiente. La solución de peróxido de hidrógeno fue ajustada al pH alcalino de 11.5 con una solución de hidróxido de sodio a una concentración 10 M. Posteriormente se analizó el diseño experimental planteado con el software de optimización NCSS 2007 para determinar las condiciones óptimas para la cantidad de lignina remanente.

4.3.3 Hidrólisis enzimática

En el proceso de hidrólisis enzimática del RM, es necesario pretratar la materia prima con los tratamientos ácido y alcalino para permitir un acceso de las enzimas a la celulosa. Se realizaron dos procesos de hidrólisis enzimática, el primero utilizando la enzima Cellic® CTec3 y en el segundo, omitiendo el pretratamiento ácido, se realizó la hidrólisis enzimática posterior a la optimización de la hidrólisis alcalina utilizando las enzimas Cellic® Ctec3 y Cellic® Htec3 para la obtención de azúcares fermentables.

4.3.3.1 Evaluación de factores para el diseño de experimentos de la hidrólisis enzimática para el proceso ACAL.

En este proceso se estudió el comportamiento de una celulasa (Cellic CTec3), para ello fue necesario que el material se sometiera a la descomposición de la pared de hemicelulosa con una hidrólisis ácida y de la lignina mediante una reacción alcalina. Posteriormente se separó la

fase sólida de la líquida del proceso de deslignificación, realizando lavados con agua corriente según la relación líquido sólido, después se realizó un prensado para eliminar el agua, después el material se secó durante 48 h mediante exposición solar.

TABLA 4. 3 Diseño Box-Behnken con valores codificados y reales de la hidrólisis alcalina del rastrojo de maíz.

Experimento	Variables Naturales		
	H ₂ O ₂ (% v/v)	Tiempo (h)	RLS (mL/g)
1	2	10	8
2	6	10	8
3	2	30	8
4	6	30	8
5	2	20	4
6	6	20	4
7	2	20	12
8	6	20	12
9	4	10	4
10	4	30	4
11	4	10	12
12	4	30	12
13	4	20	8
14	4	20	8
15	4	20	8

En el diseño de experimentos se consideraron como variables independientes a tres niveles: la carga enzimática (2, 4 y 6 %), la relación líquido-sólido (2:1, 4:1 y 6:1) y el tiempo de reacción (12, 36, 60 h) y como variable de respuesta fue el porcentaje de conversión de celulosa a glucosa. Como resultado se obtuvo el diseño de experimentos Box Behnken presentado en la Tabla 4.4

Para cada experimento, fue necesario realizar el proceso de inactivación de la enzima, realizado a 90 °C en baño maría, se dejó enfriar por 15 minutos, posteriormente se separaron las fases sólida y líquida mediante centrifugación por 30 minutos a 10000 rpm (centrífuga), finalmente se almacenó una muestra líquida para su posterior análisis mediante HPLC, dichos resultados (g/L de glucosa) fueron analizados estadísticamente tomando como variable de respuesta el porcentaje de conversión de celulosa a glucosa mediante el software NCSS que proporcionó los valores óptimos en cuanto a tiempo, RLS y carga enzimática.

4.3.3.2 Evaluación de factores para el diseño de experimentos de la hidrólisis enzimática para el proceso AL

En este segundo proceso se estudió el comportamiento de dos enzimas diferentes utilizadas simultáneamente, siendo una celulasa (Cellic CTec3) y una hemicelulasa (Cellic HTec3). Para ello fue necesario que el RM estuviera deslignificado, logrando esto mediante una reacción alcalina.

Posteriormente se separó la fase sólida de la líquida, realizándose a la primera fase, lavados con agua corriente según la relación líquido sólido a fin de eliminar los rastros de lignina que aún pudiera contener. El material se expuso inmediatamente a secado durante 48 h mediante radiación solar.

Se consideraron como variables independientes a tres niveles: la carga enzimática (2, 4 y 6 %) de ambas enzimas y el tiempo de reacción (24, 48, y 72 h) y como variable de respuesta el porcentaje de conversión de celulosa a glucosa (g/L). Como resultado de ello se obtuvo el diseño de experimentos Box Behnken propuesto para ambas enzimas mediante la Tabla 4.5.

TABLA 4. 4 Diseño Box Behnken para la hidrólisis enzimática del RM

Experimento	Variables Naturales		
	Enzima (% p/p)	Tiempo (min)	RLS (mL/g)
1	2	12	4
2	6	12	4
3	2	60	4
4	6	60	4
5	2	36	2
6	6	36	2
7	2	36	6
8	6	36	6
9	4	12	2
10	4	60	2
11	4	12	6
12	4	60	6
13	4	36	4
14	4	36	4
15	4	36	4

Para cada experimento, se realizó el proceso de inactivación de la enzima (sección 4.3.3.1) y la obtención de una muestra líquida para su posterior análisis mediante HPLC, dichos resultados (g/L de glucosa) fueron analizados estadísticamente tomando como variable de respuesta el porcentaje de conversión de celulosa a glucosa la cual fue analizada

estadísticamente mediante el software NCSS que proporcionó los valores óptimos en cuanto a tiempo, RLS y carga enzimática.

TABLA 4. 5 Diseño Box Behnken para la hidrólisis enzimática del RM.

Experimento	Variables Naturales		
	Enzima CTec3 (% p/p)	Tiempo (min)	Enzima HTec3 (% p/p)
1	2	24	2
2	6	24	6
3	2	72	2
4	6	72	6
5	2	48	2
6	6	48	6
7	2	48	2
8	6	48	6
9	4	24	4
10	4	72	4
11	4	24	4
12	4	72	4
13	4	48	4
14	4	48	4
15	4	48	4

4.4 Fermentación del hidrolizado del rastrojo de maíz.

La etapa de fermentación se realizó con el hidrolizado proveniente del proceso ACAL y el hidrolizado del proceso AL.

4.4.1 Material biológico

La cepa de *S. cerevisiae* ITV01, que se utilizó fue aislada de melazas de caña de azúcar por Ortiz-Zamora (2006) y forma parte del cepario del Laboratorio de Bioingeniería del Instituto Tecnológico de Veracruz (ITVER).

4.4.2 Medios de cultivo

4.4.2.1 Medio de conservación

La cepa fue mantenida en refrigeración a 4° C, resemebrada cada mes en el medio de conservación (Tabla 4.6)

TABLA 4. 6 Composición del medio para conservación de *S. cerevisiae* ITV01

Componente	Concentración (g/L)
Agar-agar	20
Glucosa	100
Extracto de levadura	10

4.4.2.2 Medio de fermentación

Las fermentaciones se realizaron utilizando un medio cultivo sintético de activación (Tabla 4.7), un medio de preadaptación (Tabla 4.8) con hidrolizado y un medio con hidrolizado en presencia de nutrientes. Los medios contenidos en matraces Erlenmeyer de 250 mL se esterilizaron en autoclave a 121 °C durante 15 min, así como los matraces de 500 mL usados para la cinética.

4.4.3 Condiciones de fermentación

4.4.3.1 Precultivo y preinóculo

Con el objetivo de activar la levadura y obtener resultados mejores en el desarrollo del microorganismo durante la fermentación, se tomaron tres asadas de la caja Petri en la que se encontraba sembrada, y se incubó en un matraz Erlenmeyer de 250 mL conteniendo 100 mL de medio sintético a pH 5.5 durante 12 h a 250 rpm y 30° C. Posteriormente, se inocularon los matraces con 3×10^6 células viables/mL preparados para la cinética.

TABLA 4. 7 Medio de activación para *S. cerevisiae* ITV01

Componente	Concentración (g/L)
Glucosa	20
KH ₂ PO ₄	5
(NH ₄) ₂ SO ₄	2
Extracto de levadura	1
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.4

4.4.3.2 Fermentación

Las cinéticas de fermentación se llevan a cabo en matraces Erlenmeyer de 500m L utilizando una incubadora con agitación Marca LabTech, Modelo LSI3016A, con un volumen de operación de 300 mL de hidrolizado de RM suplementado a 150 rpm y 30° C por 24 h, tomando muestras cada 3 horas incluyendo el tiempo cero.

TABLA 4. 8 Medio de preadaptación para *S. cerevisiae* ITV01

Componente	Concentración (g/L)
Glucosa	20
KH ₂ PO ₄	5
(NH ₄) ₂ SO ₄	2
Extracto de levadura	1
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.4

4.4.4 Métodos analíticos

4.4.4.1 Análisis de biomasa

Se realiza a través de la medición de la densidad óptica (DO) ejecutada a 620 nm con un Espectrofotómetro ThermoSpectronic, Genesys 20, Modelo 4001/4, en celdas de metacrilato con una trayectoria óptica de 10 mm, con diluciones apropiadas para obtener valores menores a 0.8, en absorbancia. Utilizando consecutivamente la correlación para peso seco (g/L), reportada por Ortiz (2009) para *S. cerevisiae* ITV01, con una $R^2 = 0.99964$, según la Ecuación 1.

$$\text{Peso Seco (g/L)} = 0.3697 (DO) + 0.001 \quad \text{Ec. (1)}$$

4.4.4.2 Cuenta celular

Se realizó cuenta celular mediante el empleo de la cámara de Thoma. Las muestras fueron diluidas de tal manera que el número de células viables/m L se encontrara en un rango entre 30 y 300 células. El conteo se realizó a partir de 5 cuadros grandes (0.25 mm), sabiendo que el volumen de cada cuadro es de 4×10^6 mL.

La concentración de células (X) por mililitro está dada por la Ec. 2

$$X = \frac{N \cdot d}{N_c \cdot 4} \times 10^6$$

Donde:

N = Número de células contadas

d = Dilución empleada

N_c = Número de cuadros contados

4.4.4.3 Viabilidad celular

El conteo de células viables en el microscopio se llevó a cabo con una suspensión celular previa tinción con azul de metileno en una preparación 1:1, después de 10 min de reposo. Se determinaron las células vivas aquellas que no presentan color mientras que las células muertas se tiñen de un color azul. La fórmula para calcular el % de viabilidad está dada por la Ec. 3.

$$\%V = \frac{N_v}{N_t} \times 100 \quad \text{Ec. (3)}$$

Donde:

N_v = Número de células vivas.

N_t = Número de células vivas y muertas

La solución de azul de metileno se preparó con 1g de azul de metileno disuelto en 1 L de solución de tricitrato de sodio trihidratado al 2% (p/v). La solución se conservó en refrigeración a 4° C y protegida de la luz.

4.4.4.4 Análisis de sustratos y productos

Durante cada toma de muestra en la fermentación, se tomaron lecturas de pH, con la finalidad de asegurar la estabilidad del fermentado, centrifugando a 10 000 rpm a 4° C durante 10 min muestras de 1 mL que fueron almacenadas en congelación para su posterior análisis mediante HPLC.

La concentración de los sustratos (glucosa) y los productos (etanol y ácido acético) se determinaron por HPLC, utilizando una columna Shodex SH1011, específica para la separación de azúcares, ácidos orgánicos y alcoholes.

La fase móvil empleada fue H₂SO₄ 0.05 N, velocidad de flujo, 0.6 mL/min; temperatura de la columna, 55 °C; tipo de detector: índice de refracción marca Waters modelo 2414; volumen de inyección, 10 µL y 30 min de duración de análisis por muestra. El software utilizado fue Empower (Waters), que reporta directamente la concentración de la muestra mediante una correlación con estándares previamente realizados.

4.4.5 Análisis de datos experimentales

4.4.5.1 Rendimientos y productividad

Para el cálculo de rendimiento y productividad se basa en las siguientes ecuaciones (Ec.). El rendimiento se determina por la ecuación 4, $Y_{x/s}$ (g de biomasa / g de sustrato) y la ecuación 5, $Y_{p/s}$ (g de producto/ g de sustrato):

$$Y_{\frac{x}{s}} = \frac{x_f - x_0}{S_0 - S_f} \quad \text{Ec. (4)}$$

$$Y_{\frac{p}{s}} = \frac{P_f - P_0}{S_0 - S_f} \quad \text{Ec. (5)}$$

La ecuación 6 muestra la productividad Q (g de producto / Litro·hora):

$$Q = \frac{P_f}{t_f} \quad \text{Ec. (6)}$$

4.4.5.2 Velocidades globales

Para el cálculo de las velocidades globales se utilizan las siguientes fórmulas:

Producción de biomasa (r_x):

$$r_x (gl^{-1}h^{-1}) = \frac{dX}{dt} \quad \text{Ec. (7)}$$

Consumo de sustrato (r_s):

$$r_s (gl^{-1}h^{-1}) = \frac{dS}{dt} \quad \text{Ec. (8)}$$

Producción de producto (r_p):

$$r_p (gl^{-1}h^{-1}) = \frac{dP}{dt} \quad \text{Ec. (9)}$$

4.4.5.3 Velocidades específicas

Las velocidades específicas se calculan con las siguientes fórmulas:

Crecimiento (μ):

$$\mu (h^{-1}) = \frac{1}{x} \frac{dX}{dt} \quad \text{Ec. (10)}$$

Consumo (V_s):

$$V_s (ggh^{-1}) = \frac{1}{x} \frac{dS}{dt} \quad Ec. (11)$$

Producción (Vp):

$$V_p (gg^{-1}h^{-1}) = \frac{1}{x} \frac{dP}{dt} \quad Ec. (12)$$

4.4.5.3 Porcentaje de conversión:

El porcentaje de conversión de celulosa a glucosa de la hidrólisis enzimática se calcula como sigue:

$$\%Conversion = \frac{GE}{GT*H} \times 100 \quad Ec. (13)$$

GE= glucosa experimental del análisis en HPLC (gL⁻¹)

GT= sustrato pretratado (gL⁻¹)

H= factor estequiométrico de hidrólisis en relación del polisacárido y azúcar.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Caracterización del rastrojo de maíz

La caracterización del rastrojo de maíz se realizó de acuerdo a los métodos establecidos por las normas AOCS (Sociedad Americana de Químicos del Petróleo) para humedad y cenizas y el método NREL (Laboratorio Nacional de Energía Renovable) para la determinación de carbohidratos estructurales, lignina y contenido en extractivos en biomasa.

En la Tabla 5.1 se muestran los resultados obtenidos de cada variedad analizada de rastrojo de maíz.

TABLA 5. 1 Caracterización lignocelulósica del RM.

Variedad	Glucanos (%)	Xilanos (%)	Lignina (%)	Humedad (%)	Cenizas (%)	Extractivos (%)
H520	30.6	12.11	26.72	10.75	3.15	5.47
H567	26.5	10.57	23.51	10.57	4.45	6.2

Los resultados obtenidos concuerdan con lo reportado en la literatura por Vargas-Tah *et al.* (2015), Eylon *et al.* (2011) y Van Dongen *et al.* (2011) con respecto al contenido de glucanos y xilanos de la variedad H520. Sin embargo, la concentración de lignina es aproximadamente 8% mayor que lo reportado por Vargas-Tah *et al.* (2015) en ambas variedades, no obstante, se sabe que esta puede variar según el método utilizado para cuantificarla y la procedencia de la materia, así mismo esta puede oscilar en un rango de 7-29% (Carvalho *et al.*, 2014; Van Dongen *et al.*, 2011; Eylon *et al.*, 2011).

5.2 Optimización del proceso de hidrólisis del rastrojo de maíz

5.2.1 Prehidrólisis ácida

La finalidad del pretratamiento con ácido es hidrolizar la fracción de hemicelulosa contenida en la biomasa en monosacáridos como xilosa y glucosa, compuestos de interés para su conversión en etanol o xilitol, respectivamente, además promueve la accesibilidad de las enzimas hacia la celulosa en la etapa posterior.

Después de aplicar el diseño Box Behnken de la sección 4.3.1 para cada experimento, se utilizó el software estadístico NCSS para el análisis de regresión de los datos, posteriormente se empleó el método de superficie de respuesta para determinar el polinomio (Ecuación 5.1) que describe el comportamiento del proceso de hidrólisis ácida y se obtuvieron finalmente las condiciones óptimas para la mejor conversión de hemicelulosa del RM hacia xilosa (g/L).

Los resultados obtenidos con una mayor remoción de hemicelulosa (xilosa g/L) predichas por el software NCSS y que fueron validadas experimentalmente en el material lignocelulósico se muestran en la Tabla 5.2. En la Figura 5.1 se muestran los gráficos de superficie de respuesta con las combinaciones de los efectos de las variables.

Se puede observar que los niveles de los valores de mayor concentración de xilosa oscilan dentro de las condiciones óptimas reportadas (2.27% (v/v) de una solución de H₂SO₄, RLS 4:1(mL/g) y 25 min de reacción), de esta manera fueron validadas experimentalmente por triplicado obteniendo concentraciones de: 26.66 g/L, 26.95 g/L, 26.29 g/L teniendo como promedio una concentración de 26.61 g/L de xilosa, con lo que se valida el modelo matemático reportado en la Ecuación 5.1, el cual representa un ajuste (coeficiente de determinación, R²) de 0.9939, lo anterior significa que cuanto más cercano a 1 existe un mejor ajuste, por tanto la ecuación de predicción se ajusta bien a la respuesta observada.

$$\begin{aligned} Xilosa = & 4.89812 + 27.1637 * H_2SO_4 - 0.51525 * Tiempo - 0.16875 * RLS - \\ & 5.08375 * H_2SO_4^2 - 0.087 * H_2SO_4 * Tiempo - 0.49125 * H_2SO_4 * RLS + 0.0109375 * \\ & Tiempo^2 - 0.0194375 * Tiempo * RLS + 0.0396094 * RLS^2 \end{aligned}$$

Ec. (13)

TABLA 5. 2 Condiciones de operación óptimas para la hidrólisis ácida en rastrojo de maíz.

Variable	Condición
Concentración de H₂SO₄	2.27 % v/v
RLS	4 mL/g
Tiempo	25 min
Temperatura	121° C
Valor óptimo	22.92 g/L xilosa
Validación	26.61 g/L de xilosa
%Conversión	61.68%

En la Tabla 5.3 se muestran las concentraciones de xilosa obtenidos en este trabajo en comparación con otros reportados, utilizando rastrojo de maíz. En donde se muestra que se alcanzan valores similares obtenidos por Vargas-Tah (2015) en un periodo de tiempo y una RLS menor (25min y RLS 4:1). En comparación con Lee (2015) el proceso se realizó a una menor temperatura y RLS. Considerando lo anterior se tiene como resultado una remoción del 61.68% de xilanos en el RM en un proceso con ahorro de reactivo y de requerimiento energético del 50%.

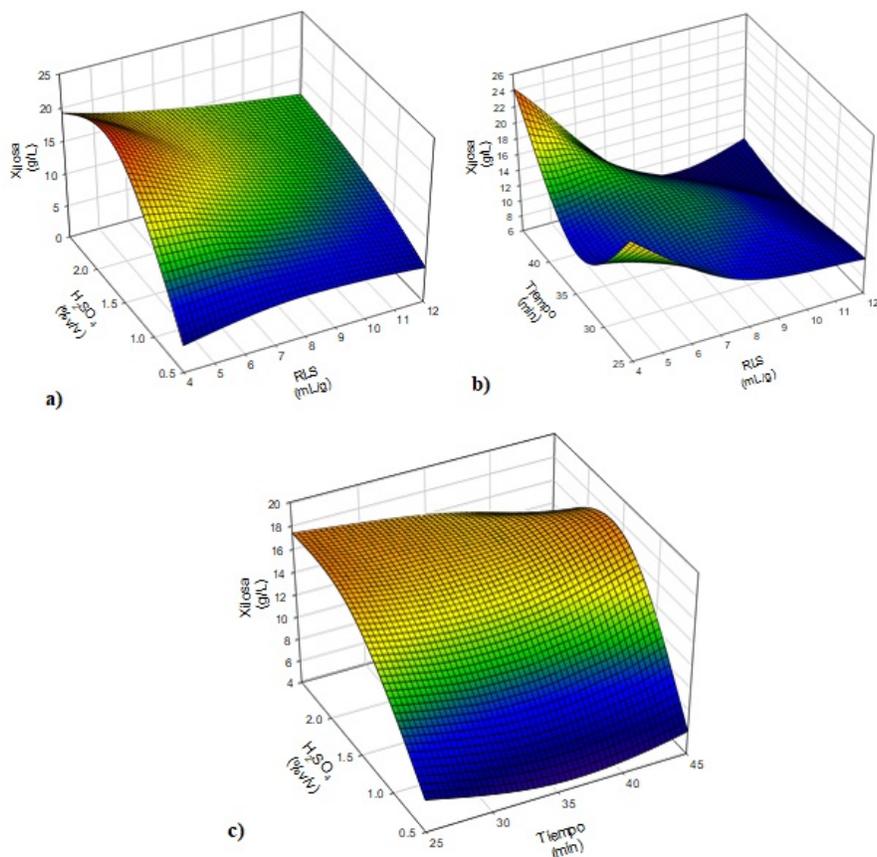


FIGURA 5. 1 Efecto de las condiciones de la hidrólisis ácida del RM sobre la producción de xilosa (g/L): a)RLS vs concentración de H₂SO₄ b) RLS vs tiempo c) Tiempo vs concentración de ácido.

TABLA 5. 3 Antecedentes de la etapa de hidrólisis ácida en RM.

Concentración H ₂ SO ₄ (%p/p)	RLS (mL/g)	Tiempo	Temperatura °C	Concentración de xilosa (g/L)	Referencia
1	6:1	40 min	130	30.7	Vargas-Tah <i>et al.</i> , 2015
0.27	10:1	10min	160	48.45	Lee <i>et al.</i> , 2015
0.022	4:1	25 min	121	26.61	Presente trabajo

5.2.2 Hidrólisis alcalina

El pretratamiento alcalino aumenta la digestibilidad de la celulosa en la hidrólisis enzimática y es más efectivo para la solubilización de la lignina, demostrando una menor solubilización en la celulosa y hemicelulosa (Zhao,2018).

5.2.2.1 Evaluación de factores para el diseño de experimentos de la hidrólisis alcalina del proceso ACAL

En esta etapa se aplicaron las condiciones del diseño Box Behnken descrito en la sección 4.3.2.1 utilizando rastrojo de maíz tratado con las mejores condiciones ácidas (Tabla 5.2) con la finalidad de remover la mayor cantidad posible de lignina. Después de cada experimento el porcentaje de lignina presente se analizó utilizando la metodología de NREL para residuos lignocelulósicos, como variable de respuesta se tomó el porcentaje de lignina remanente en el material pretratado.

Los resultados obtenidos del diseño Box Behnken para la optimización del pretratamiento alcalino se describen en la Tabla 5.4. Se puede observar en la que los rangos de lignina remanente abarcan de 6.07-16.35%, de esta manera se muestra que concentraciones bajas de peróxido de hidrógeno tienen la menor remoción de lignina (8-10%), por otro lado las concentraciones mayores (6% v/v) deslignifican hasta un 75.33% de este polímero.

Posteriormente se empleó el software NCSS para el análisis de regresión estadístico utilizando el método de superficie de respuesta para determinar las condiciones óptimas de las variables propuestas (Tabla 5.5) y generar el valor mínimo de la variable de respuesta, es decir, la lignina remanente.

TABLA 5. 4 Resultados a partir del diseño Box-Behnken para la hidrólisis alcalina del proceso ACAL.

Experimento	H ₂ O ₂ (% v/v)	Tiempo (min)	RLS (mL/g)	% Lignina remanente	% Lignina Removida
1	2	10	8	16.35	8.25
2	6	10	8	8.84	15.76
3	2	30	8	13.47	11.13
4	6	30	8	6.75	17.85
5	2	20	4	14.58	10.02
6	6	20	4	11.20	13.40
7	2	20	12	13.34	11.26
8	6	20	12	6.07	18.53
9	4	10	4	15.70	8.90
10	4	30	4	10.85	13.75
11	4	10	12	11.63	12.97
12	4	30	12	8.39	16.21
13	4	20	8	10.34	14.26
14	4	20	8	11.62	12.98
15	4	20	8	11.22	13.38

TABLA 5. 5 Condiciones de operación óptimas para la hidrólisis alcalina en rastrojo de maíz del proceso ACAL.

Variable	Condición
Concentración de H₂O₂	5.97% v/v
RLS	12
Tiempo	30 h
%Lignina remanente	4.93%
%Remoción	79.92%

Las condiciones óptimas se validaron de manera experimental por triplicado obteniendo como resultado 4.03, 4.54, 4.42 % de lignina residual después del pretratamiento alcalino, dando como promedio 4.33% de lignina remanente, lo que generó un 82.40% de remoción de este polímero. La ecuación 5.2 describe el comportamiento de la hidrólisis alcalina del proceso ACAL, el cual representa un ajuste (coeficiente de determinación, R²) de 0.9713, lo anterior significa que cuanto más cercano a 1 existe un mejor ajuste, por tanto la ecuación de predicción se ajusta bien a la respuesta observada.

$$\begin{aligned}
 (\%) \text{ Lignina} = & 24.505 - 0.7275 * H_2O_2 - 0.41075 * \text{Tiempo} - 0.381875 * RLS - \\
 & 0.0065625 * H_2O_2^2 + 0.009875 * H_2O_2 * \text{Tiempo} - 0.121562 * H_2O_2 * RLS + \\
 & 0.0031875 * \text{Tiempo}^2 + 0.0100625 * \text{Tiempo} * RLS + 0.0164844 * RLS^2
 \end{aligned}$$

Ec. (14)

Las gráficas de superficie de respuesta obtenidas con el análisis estadístico se muestran en la Figura 5.2, se puede observar que aumentando la concentración de peróxido de hidrógeno, el tiempo y la RLS se obtiene una mayor deslignificación del rastrojo de maíz pretratado.

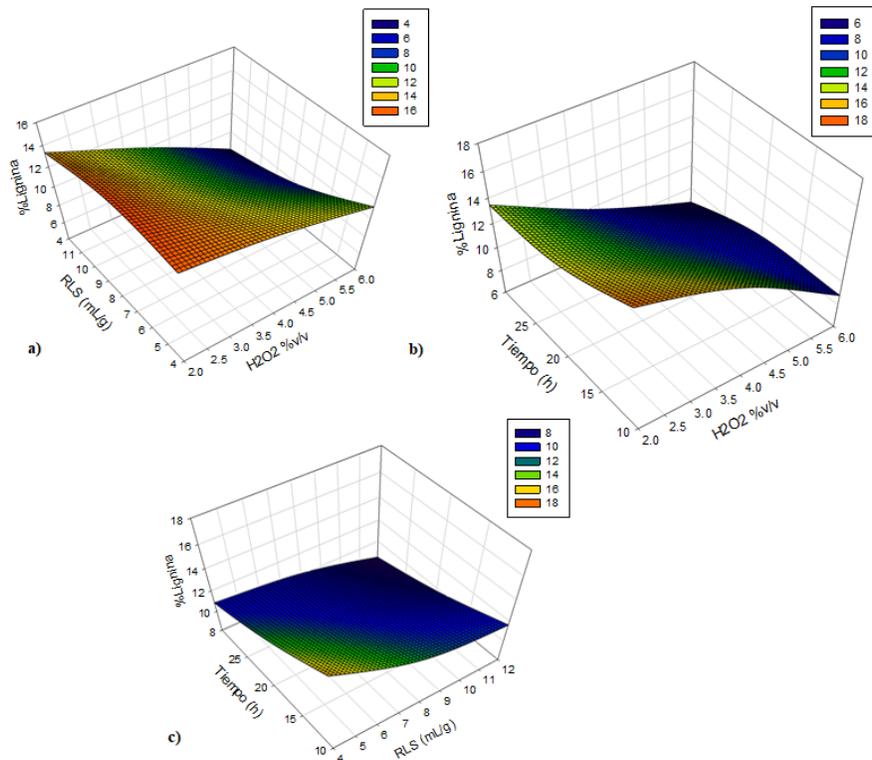


FIGURA 5. 2 Efecto de las condiciones de la hidrólisis alcalina del RM sobre el porcentaje de lignina residual: a) RLS vs concentración de H₂O₂ b) Tiempo vs concentración de H₂O₂ c) RLS vs tiempo

En la Tabla 5.6 se comparan las condiciones óptimas de remoción de lignina obtenidos en este trabajo con otros autores utilizando rastrojo de maíz. En comparación con Banerjee (2011) el proceso se realizó con un tiempo menor y una concentración de H₂O₂ 35 veces menor obteniendo una remoción de lignina del 30%, 2.7 veces menor que el presente trabajo, así se compara con Li (2018) quien reportó el proceso con un porcentaje de remoción similar y una concentración de peróxido de hidrógeno 4 veces mayor. Considerando lo anterior se tiene

como resultado 4.33% de lignina en el rastrojo de maíz pretratado en un proceso con un ahorro de reactivo superior al 50%.

TABLA 5. 6 Antecedentes de la etapa de hidrólisis alcalina en RM del proceso ACAL.

H₂O₂ (%p/p)	RLS (mL/g)	Tiempo (h)	Temperatura (°C)	Lignina (%)	Remoción Lignina (%)	Referencia
0.5	10	24	30	3.48	80	Li <i>et al.</i> , 2018
4.27	10	48	22	6	30	Banerjee <i>et al.</i> , 2011
0.12	10	30	22	4.33	82.40	Presente trabajo

5.2.2.2 Evaluación de factores para el diseño de experimentos de la hidrólisis alcalina del proceso AL

En esta etapa se aplicaron las condiciones del diseño Box Behnken descrito en la sección 4.3.2.1 utilizando rastrojo de maíz sin pretratar. Después de cada experimento el porcentaje de lignina presente se analizó utilizando la metodología de NREL para residuos lignocelulósicos, como variable de respuesta se tomó el porcentaje de lignina remanente en el material.

Los resultados obtenidos del diseño experimental para la optimización del pretratamiento alcalino del proceso AL se describen en la Tabla 5.7. Se puede observar que el rango del porcentaje de lignina remanente abarca de 11.58% a 19.98%, comportándose de manera similar al proceso ACAL con una disminución de lignina remanente del 50%.

Posteriormente empleando el software NCSS para el estudio estadístico de datos utilizando un análisis de regresión y el método de superficie de respuesta se determinaron las condiciones

(Tabla 5.8) con un valor mínimo de la variable de respuesta, es decir, el porcentaje de lignina remanente.

TABLA 5. 7 Resultados a partir del diseño Box-Behnken para la hidrólisis alcalina del proceso AL.

Experimento	H ₂ O ₂ (% v/v)	Tiempo (min)	RLS (mL/g)	% Lignina remanente	% Lignina Removida
1	2	10	8	15.41	9.19
2	6	10	8	13.39	11.21
3	2	30	8	13.59	11.01
4	6	30	8	19.00	5.60
5	2	20	4	19.98	4.62
6	6	20	4	14.32	10.28
7	2	20	12	16.74	7.86
8	6	20	12	11.58	13.02
9	4	10	4	18.05	6.55
10	4	30	4	22.37	2.23
11	4	10	12	12.25	12.35
12	4	30	12	12.42	12.18
13	4	20	8	12.02	12.58
14	4	20	8	13.96	10.64
15	4	20	8	13.29	11.31

TABLA 5. 8 Condiciones de operación óptimas para la hidrólisis alcalina en rastrojo de maíz del proceso AL.

Variable	Condición
Concentración de H₂O₂	6% v/v
RLS	10
Tiempo	10 h
%Lignina remanente	10.95%
%Remoción	55.46%

Las condiciones descritas en la Tabla 5.8 se evaluaron experimentalmente por triplicado obteniendo concentraciones de: 10.39, 7.69, 8.58 %, resultando un promedio 8.88%, lo que generó un porcentaje de remoción del 63.89%. El polinomio que describe el comportamiento del proceso 2 se muestra con la ecuación 15, esta representa un ajuste (coeficiente de determinación, R²) de 0.9751 por tanto la ecuación de predicción se ajusta bien a la respuesta observada.

$$\begin{aligned}
 (\%) \text{ Lignina} = & 38.595 - 4.025 * H_2O_2 - 0.647875 * \text{Tiempo} - 2.09156 * \text{RLS} - \\
 & 0.174062 * H_2O_2^2 + 0.10525 * H_2O_2 * \text{Tiempo} - 0.015625 * H_2O_2 * \text{RLS} + \\
 & 0.0131375 * \text{Tiempo}^2 + 0.0259375 * \text{Tiempo} * \text{RLS} + 0.116797 * \text{RLS}^2
 \end{aligned}$$

Ec. (15)

En la Figura 5.3 se muestran los gráficos de superficie de respuesta con las combinaciones de los efectos de las variables. Se puede observar que al aumentar la concentración de peróxido y el tiempo de reacción hay un mayor desprendimiento de la lignina en el rastrojo de maíz sin pretratar. La gráfica que representa el tiempo vs la RLS indica que el mayor porcentaje de lignina removida oscila entre una RLS de 1:7 a 1:12 y un tiempo desde 10 h hasta 20 h.

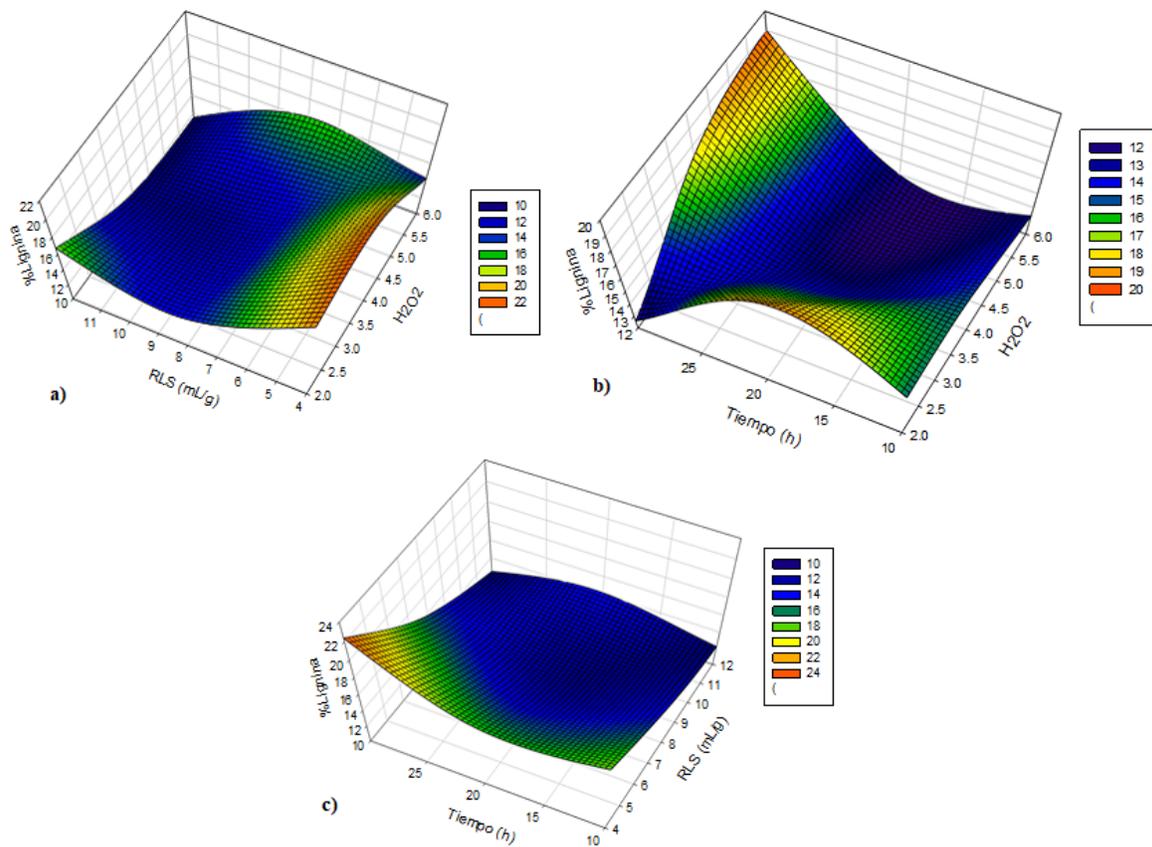


FIGURA 5. 3 Efecto de las condiciones de la hidrólisis alcalina sobre el porcentaje de lignina residual en el RM sin pretratar: a) RLS vs concentración de H₂O₂ b) Tiempo vs concentración de H₂O₂ c) RLS vs tiempo.

En la Tabla 5.9 se muestran las condiciones óptimas de remoción de lignina y los resultados obtenidos en este trabajo en comparación con los reportados por otros autores. Banerjee (2011) obtuvo una remoción final del 30% en 48 horas siendo una remoción 2 veces menor que en el presente trabajo y con el doble de tiempo del proceso. Li (2018) obtuvo un porcentaje de remoción del 80%, siendo mayor en comparación con el presente trabajo, sin embargo el tiempo del proceso es 2 veces mayor. La concentración de peróxido de hidrógeno es 3% y 34% mayor respectivamente.

TABLA 5. 9 Antecedentes de la etapa de hidrólisis alcalina en RM del proceso AL.

H₂O₂ (%p/p)	RLS (mL/g)	Tiempo (h)	Temperatura (°C)	Lignina (%)	Remoción Lignina (%)	Referencia
0.5	10	24	30	3.48	80	Li <i>et al.</i> , 2018
4.27	10	48	22	6	30	Banerjee <i>et al.</i> , 2011
0.12	10	10	22	8.88	63.89	Presente trabajo

Dutra y colaboradores (2016) señalan que para procesar 1 tonelada de rastrojo de maíz con un pretratamiento a bajas concentraciones de H₂O₂ el costo oscila entre \$1,953 y \$2,393 pesos, además que a altas concentraciones de peróxido de hidrógeno el tiempo del pretratamiento no es significativo respecto a la cantidad de azúcares liberados y que la mayor liberación en etapas posteriores ocurre con un pretratamiento alcalino de 3 hasta 24 h de proceso. Por lo que los resultados de este proceso muestran un ahorro en el tiempo y en la cantidad de reactivo con una remoción de lignina del 82.40% en el proceso ACAL y 63.89% en el proceso AL.

5.2.3 Hidrólisis enzimática

El proceso de hidrólisis ácida y alcalina tienen como finalidad permitir una accesibilidad mayor de las enzimas hacia el sustrato en la conversión de la celulosa a azúcares fermentables para ello el material pretratado es llevado al proceso de hidrólisis enzimática.

5.2.3.1 Evaluación de factores para el diseño de experimentos de la hidrólisis enzimática para el proceso ACAL

Obtenida la celulosa posterior al tratamiento alcalino del RM se aplicaron las condiciones descritas del diseño Box Behnken en la sección 4.3.3.1 con la finalidad de obtener las condiciones óptimas para la producción de glucosa. Posteriormente se utilizó el software estadístico NCSS para el análisis de regresión de los datos, se empleó el método de superficie de respuesta que determinó el polinomio (Ecuación 16) que describe el comportamiento del proceso con un ajuste (coeficiente de determinación, R^2) de 0.9958.

$$\begin{aligned}
 (\%) \text{ Conversión} = & 261.7369 - 21.91976 * CTec3 - 25.76561 * RLS + 1.160827 * \\
 & Tiempo + 1.63451 * CTec3^2 + 0.2250445 * RLS^2 - 0.07186124 * Tiempo^2 - \\
 & 2.909863 * CTec3 * RLS - 0.2537507 * CTec3 * Tiempo + 0.039 * RLS * Tiempo + \\
 & 0.3962307 * CTec3 * RLS^2 + 0.008267227 * CTec3 * Tiempo^2 + 0.003656033 * RLS * \\
 & Tiempo^2
 \end{aligned}$$

Ec. (16)

Los resultados de la optimización para la mejor conversión de celulosa a glucosa del RM realizados a través del programa estadístico NCSS se muestran en la Tabla 5.10.

TABLA 5. 10 Condiciones de operación óptimas para la hidrólisis enzimática en rastrojo de maíz del proceso ACAL.

Variable	Condición
Concentración de CTec3	7% p/p
RLS	12 mL/g

Tiempo	38 h
%Conversión	100%
Glucosa teórica	65.35 g/L

Las condiciones óptimas fueron validadas experimentalmente por triplicado donde se obtuvo un porcentaje de conversión de $93\% \pm 3.39$. En la figura 5.4 se muestran los gráficos de superficie de respuesta con las combinaciones de los efectos de las variables estudiadas.

En las gráficas de superficie de respuesta se observó la influencia de la concentración enzimática, el tiempo y la RLS mostrando una 100% de conversión con las condiciones óptimas obtenidas , éstas se evaluaron experimentalmente obteniéndose 59.31 ± 2.16 g/L de glucosa y un rendimiento ($Y_{g/s}$) de 0.80 ± 0.06 .

Los resultados obtenidos se compararon con las mejores condiciones de otros autores utilizando rastrojo de maíz (Tabla 5.11), Banerjee (2012) utilizó una mezcla de 2 cocteles enzimáticos (Acc 1000 y Multifect pectinase) y Vargas Tah (2015) utilizó el cóctel enzimático N222086, en ambos casos se observó una conversión y una concentración (68% y 43%) mayor en un proceso de 38 horas y disminuyendo la cantidad de enzima (1 mg/g_{glucano}), considerando lo anterior el proceso se vuelve 34% y 9% más eficiente, respectivamente.

TABLA 5. 11 Antecedentes de la etapa de hidrólisis enzimática en RM del proceso ACAL.

Enzima (mg/g _{glucano})	Tiempo (h)	Glucosa (g/L)	Conversión (%)	Referencia
15	48	35	69	Banerjee <i>et al.</i> , 2012
30	24	41	85	Vargas Tah <i>et al.</i> , 2015
1	38	59	93	Presente trabajo

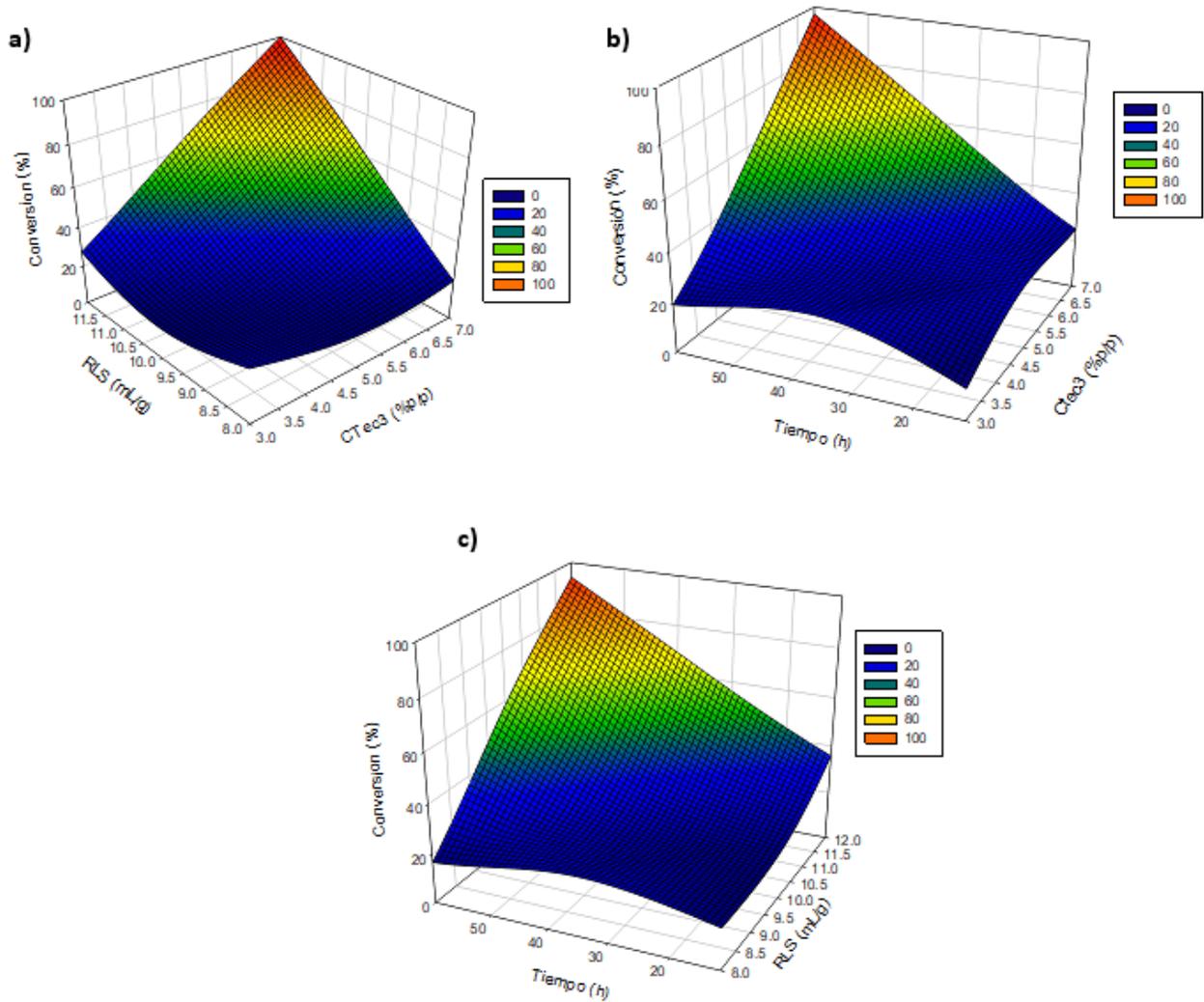


FIGURA 5. 4 Efecto de las condiciones de la hidrólisis enzimática del RM en el proceso ACAL sobre el porcentaje de conversión: a) RLS vs concentración de CTec3 b) RLS vs tiempo c) Tiempo vs concentración de CTec3

En el estudio de Teter (2012) se tomó como punto de referencia al complejo CZP00005, primera preparación enzimática para el estudio del desempeño de Cellic CTec3 en la conversión de celulosa a glucosa donde se comparó el efecto de la carga enzimática sobre el porcentaje de conversión. Se observaron conversiones superiores del 90% en un rango de 7 a 9 mg por gramo de sustrato, en el presente trabajo se logró obtener una disminución en la carga enzimática de 1mg por gramo de sustrato, demostrando la eficiencia en la hidrólisis enzimática con el rastrojo de maíz pretratado. Además de que la combinación del pretratamiento ácido y alcalino con una remoción del 100% en xilanos, 80% de lignina y una producción de glucanos del 68% demostró la eficiencia en el fraccionamiento del material lignocelulósico influyendo en la etapa de la hidrólisis enzimática.

5.2.3.2 Evaluación de factores para el diseño de experimentos de la hidrólisis enzimática para el proceso AL

En esta etapa se aplicaron las condiciones descritas del diseño Box Behnken en la sección 4.3.3.2 para obtener las condiciones óptimas para la producción de glucosa en el proceso AL. Posteriormente se utilizó el software estadístico NCSS para el análisis de regresión de los datos, se empleó el método de superficie de respuesta que determinó el polinomio (Ecuación 17) que describe el comportamiento del proceso con un ajuste (coeficiente de determinación, R^2) de 0.92.

$$\begin{aligned} \% \text{ Conversión} = & 45.359 - 8.18152 * CTec3 + 8.7196 * HTec3 + 2.31882 * Tiempo + \\ & 0.801365 * CTec3^2 + 0.548812 * CTec3 * HTec3 - 0.0694948 * CTec3 * Tiempo - \\ & 0.95126 * HTec3^2 - 0.0224427 * HTec3 * Tiempo - 0.0204836 * Tiempo^2 \end{aligned}$$

Ec. (16)

Los resultados obtenidos con la mayor conversión de celulosa a glucosa predichas por el software NCSS se muestran en la Tabla 5.12. Las condiciones óptimas fueron validadas experimentalmente por triplicado obteniendo un porcentaje de conversión promedio de $92.39\% \pm 3.87$. En la figura 5.5 se muestran los gráficos de superficie de respuesta con las combinaciones de los efectos de las variables estudiadas.

TABLA 5. 12 Condiciones de operación óptimas para la hidrólisis enzimática en rastrojo de maíz del proceso AL.

Variable	Condición
Concentración de CTec3	3% p/p
Concentración de HTec3	7% p/p
Tiempo	41 h
%Conversión	99.73%
Glucosa teórica	45.38 g/L

En las gráficas de superficie de respuesta se observó que con las condiciones óptimas se obtuvo una conversión total de celulosa a glucosa con una concentración del 3% p/p de CTec3 y 7%p/p de HTec3, éstas se evaluaron experimentalmente obteniéndose 41.92 ± 1.75 g/L de glucosa y un rendimiento ($Y_{g/s}$) de 0.50 ± 0.02 . Estos resultados se compararon con otros autores utilizando rastrojo de maíz (Tabla 5.13) donde se observó una aumento en la concentración de glucosa del 19% con respecto a Banerjee (2012) y similar a Vargas (2015) aumentando en 33% y 8% el porcentaje de conversión en cada caso y disminuyendo la cantidad de enzima ($0.66\text{mg/g}_{\text{glucano}}$).

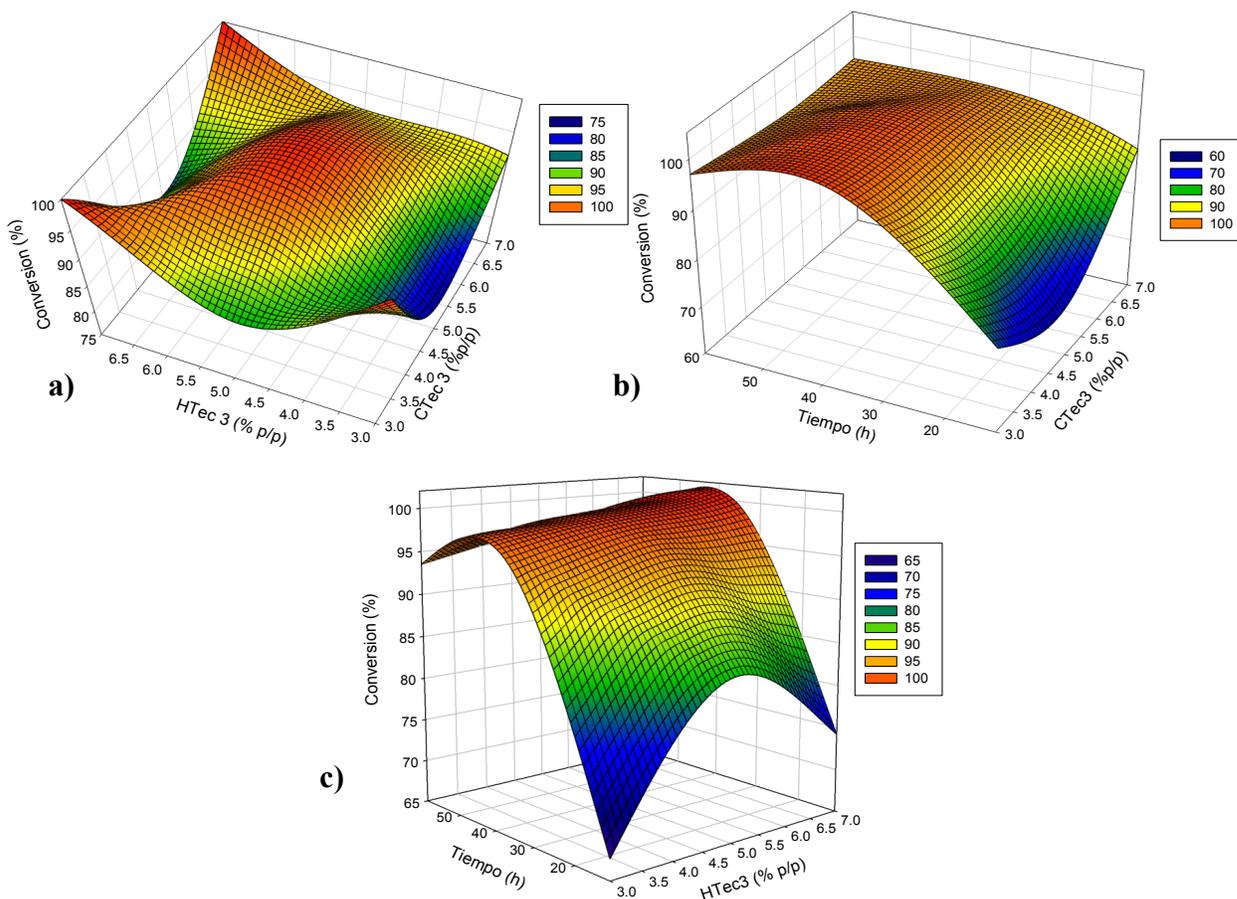


FIGURA 5. 5 Efecto de las condiciones de la hidrólisis enzimática del RM en el proceso AL sobre el porcentaje de conversión: a) concentración de HTec3 vs concentración de CTec3 b) Tiempo vs concentración de CTec3 b)RLS v tiempo c) Tiempo vs concentración de HTec3.

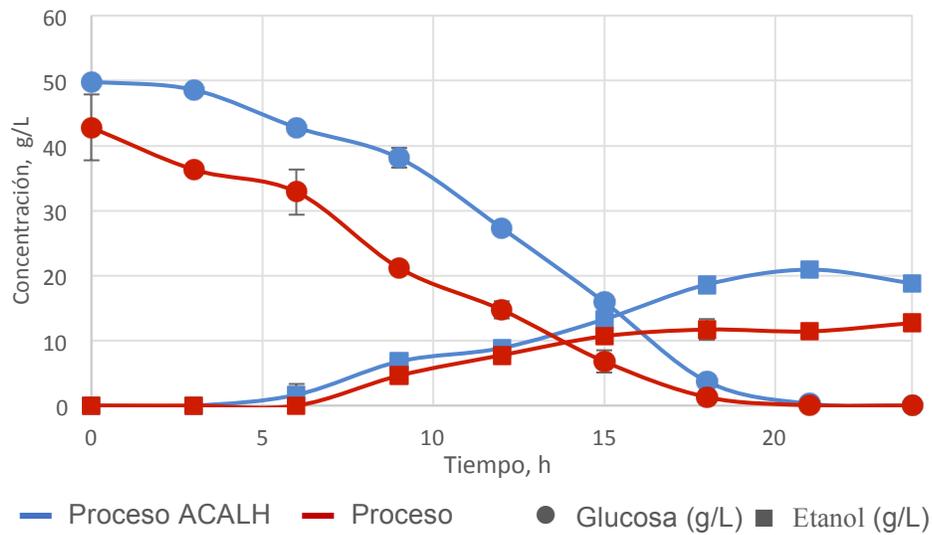
TABLA 5. 13 Antecedentes de la etapa de hidrólisis enzimática en RM del proceso AL.

Enzima (mg/g _{glucano})	Tiempo (h)	Glucosa (g/L)	Conversión (%)	Referencia
15	48	35	69	Banerjee <i>et al.</i> , 2012
30	24	41	85	Vargas Tah <i>et al.</i> , 2015
0.66	41	41	92.39	Presente trabajo

La concentración de glucosa mostró una disminución 1.4 veces respecto a la hidrólisis enzimática del proceso ACAL, esto se debe al contenido lignocelulósico posterior al pretratamiento en el proceso AL donde se obtuvo 53% menos de glucanos, 26.85% de xilanos y 8.88% de lignina. A pesar de ello las conversiones enzimáticas fueron de 93% en el proceso ACAL y 92% en el proceso AL demostrando la eficiencia de los complejos enzimáticos Cellic.

5.2.4 Fermentación del hidrolizado del rastrojo de maíz.

La etapa de fermentación se llevó a cabo de acuerdo a las condiciones descritas en la sección 4.4. En las primeras 6 horas del proceso, la generación de etanol fue muy baja teniendo concentraciones de 1.67 g/L en el proceso ácido-alcalino-enzimático (ACALH) y en el proceso alcalino-enzimático (ALH) no hubo producción de etanol en ese tiempo. Se presentó un incremento después de las 10 horas con una generación máxima de etanol en el proceso ACALH de 20.93 g/L y en el proceso ALH fue de 12.71 g/L. La figura 5.6 presenta los efectos del consumo de glucosa (g/L) en la generación de etanol (g/L), con un consumo total de glucosa al final de la fermentación.



ALH
 FIGURA 5. 6 Consumo de glucosa y producción de etanol en la fermentación del proceso ACALH y ALH del rastrojo de maíz.

TABLA 5. 14 Resultados obtenidos en la fermentación del hidrolizado de rastrojo de maíz del proceso ácido-alcalino-enzimático y el proceso alcalino-enzimático.

Parámetro	Proceso ACALH	Proceso ALH
Glucosa inicial, g/L	50.02	42.81
Eficiencia de fermentación, %	82.32	58.28
Rendimiento, $Y_{E/S}$, g/g	0.42	0.30
Productividad, Q, g/Lh	0.90	0.48
Etanol, g/L	20.93 ^a	12.71 ^b
Biomasa, g/L	2.02 ^a	3.06 ^b

Los resultados obtenidos en la fermentación del proceso ACALH (Tabla 5.14) se pueden compara con los reportados por Qing y colaboradores (2016) quienes reportaron en la

fermentación con hidrolizado de rastrojo de maíz un rendimiento de 0.34 g/g con una productividad de 0.25 g/Lh y una producción final de 8.06 g/L de etanol, obteniéndose valores mayor en el presente trabajo. De igual forma, el proceso ALH se compara con el trabajo de Banerjee y colaboradores (2011) obteniendo un rendimiento de 0.48 g/g, con una productividad de 0.45 g/L y una producción final de etanol de 13.7 g/L, siendo similar al presente trabajo.

6. CONCLUSIONES

- En la caracterización del rastrojo de maíz, la variedad H520 resultó ser el material lignocelulósico con una cantidad de glucanos 20% mayor con respecto a la variedad H567.
- El proceso ácido-alcalino resultó ser el mejor pretratamiento con una producción de glucanos del 68.05%, una deslignificación del 80% y remoción del 100% en xilanos, resultando ser un pretratamiento efectivo para la degradación de la celulosa en la etapa de hidrólisis enzimática.
- Utilizando las enzimas Cellic CTec3 y HTec3 se logró una conversión por arriba del 93% de celulosa a glucosa demostrando la alta eficiencia de estas enzimas para su uso en hidrolizados lignocelulósicos.
- En la fermentación del hidrolizado obtenido del proceso ácido-alcalino se logró una productividad de 0.90 g/Lh, que representa un incremento del 64% en comparación con el proceso del pretratamiento alcalino.

7. BIBLIOGRAFÍA

Aguilar, M.G. 1998. Caractérisation cinétique et métabolique d'une souche de *Brettanomyces*. Thèse Doctoral, I.P.N. Toulouse, France.

Anderson, E., Cutler, H. C. Races of *Zea mays*: I. Their recognition and classification. *Ann. Bot. Gard.*, 1942, vol. 29, p. 69-88.16.

AOCS. American Oil Chemist's Society. Official Methods and Recommended Practices of the AOCS. Version 2017.

Badiei, M., Asim, N., Jahim, J.M., Sopian, K. Comparison of chemical pretreatment methods for cellulosic biomass. *APCBEE Procedia*. (9) 170-174.

Balat, M. 2011 Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: a review. *Energy Convers. Manag.* (52):858–75.

Benz, B., 1997. Diversidad y distribución prehispánica del maíz mexicano. *Arqueología Mexicana*. 5 (25):16-23.

Brethauer, S, Wyman, C.E. 2010 Review: continuous hydrolysis and fermentation for cellulosic ethanol production. *Bioresource Technol.* (101):4862–74.

Canilha, L., Chandel, K.A., Santos-Milessi, T.S., Fernandes, F.A., Costa, W.L., Almeida, M.G, Silvério, S. 2012. Bioconversion of sugarcane biomass into ethanol: an overview about composition, pretreatment methods, detoxification of hydrolysates, enzymatic saccharification, and ethanol fermentation. *Biomed. Biotechnol.* (12):1-15

Cardona, C.A., Sánchez, O.J., Montoya, M.I.; Quintero, J.A. 2005. Producción de etanol carburante: material lignocelulósico una nueva alternativa. *Ingeniería de Recursos Naturales y del Ambiente* (3):47-55.

Correa, D.F., Hawthorne, B.L., Fargione, J.E., Hill, J.D., Possingham, H.P., Thomas-Hall, S.R., Schenk, P.M. 2019. Towards the implementation of sustainable biofuel production systems. *Renew. Sust. Energ. Rev.* (107):250-263.

Dien B, Cotta M, Jeffries, T. 2003 Bacteria engineered for fuel ethanol production: current status. *Appl. Microbiol. Biot.* (63):258–66

Domínguez, C.X., 2013. Optimización del pretratamiento (ácido/alcalino) y la determinación de la influencia del Tween 80 en la hidrólisis enzimática del olote. Tesis de Maestría en Ciencias en Ingeniería Bioquímica. Instituto Tecnológico de Veracruz. Veracruz, México.

Dutra, E.D., Santos, F.A., Alencar, B.R., Reis, A.L, Souza,R.F., Aquino, K.A., Morais, M.A., Menezes, R.S. 2017. Alkaline hydrogen peroxide pretreatment of lignocellulosic biomass: status and perspectives. *Biomass Conv. Bioref.* (8):225–234

Eylen V., Van Dongen, F., Kabel, M., De Bont, J., 2011. Corn fiber, cobs and stover: Enzyme-aided saccharification and co-fermentation after dilute acid pretreatment. *Bioresource Technol.* (10):5995-6004

Hernández, A. 2003. Microbiología Industrial 1ra Ed. Euned, Costa Rica, pp. 37-39.

Feldman, H. 2012. Yeast. Molecular and Cell Biology. 2a Ed. Wiley-Blackwell, Alemania.

Howard, R., Abotsi, E., Van Rensburg, E.J., Howard, S. 2004. Lignocellulose biotechnology: issues of bioconversion and enzyme production. *Afr. J. Biotechnol.* (2) 602–619

Ibrahim, M.M, El-Zawayy, W.K. Abdel-Fattah ,Y.R., Soliman, N.A., Agblevor, F.A. 2011. Comparison of alkaline pulping with steam explosion for glucose production from rice straw. *Carb. Poly.* (83): 720-726

Kadam, K. L., McMillan, J. D., (2003). Availability of Corn Stover as a Sustainable Feedstock for Bio-ethanol Production. *Bioresource Technol.* 88(1):17-23.

Klein-Marcuschamer, Oleskowicz-Popiel,P.,Simmons,B. 2011. The challenge of enzyme cost in the production of lignocellulosic biofuels. *Biotec and Bioeng.*, (109): 2012 486-4252

Kuhad, R.C., Singh, A., Ericksson KE. 1997. Microorganisms and enzymes involved in the degradation of plant fiber cell walls. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* (57):45–125

Kumar, J., Saini, R., Tewari, L. 2015. Lignocellulosic agriculture wastes as biomass feedstocks for second-generation bioethanol production: concepts and recent developments. *Biotech.* (5):337-353.

Kumar,A.K, Sharma, S. 2017. Recent updates on different methods of pretreatment of lignocellulosic feedstocks: a review. *Bioresur. Bioprocess.* 4-7

Lee J. 1997. Biological conversion of lignocellulosic biomass to ethanol. *J Biotechnol.* (56):1–24.

Lee W.J., Kim J.Y., Jang, H. M., Lee, M. W., Park, J. M. 2015. Sequential dilute acid and alkali pretreatment of corn stover: Sugar recovery efficiency and structural characterization *Bior. Tech* (182):296-301.

Lin Y, Tanaka S. 2006 Ethanol fermentation from biomass resources: current state and prospects. *Appl. Microbiol. Biot.* (69):627–42

Maity, S.K. 2015. Opportunities, recent trends and challenges of integrated biorefinery: Part I. *Ren. and Sust. Ener. Rev.* 1-19

Mohammad, J., Karimi, K. 2008. Pretreatment of Lignocellulosic Wastes to Improve Ethanol and Biogas Production: A Review. *Int. J. Mol. Sci.* (9):1621-1651.

Nochebuena Morando, L.E. 2013 Estudio del efecto del tratamiento oxidativo y del Tween 80 sobre la hidrólisis enzimática del bagazo de caña de azúcar. Tesis de Maestría. Instituto Tecnológico de Orizaba. Veracruz. México.

NREL. National Renewable Energy Laboratory. Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass. Laboratory Analytical Procedure (LAP) Version 2012.

O'Hara, I. 2011. Cellulosic ethanol from sugarcane bagasse in Australia: exploring industry feasibility through systems analysis, techno-economic assessment and pilot plant development. Tesis de Doctorado en Ciencias Químicas. Universidad Tecnológica de Queensland. Queensland, Australia.

Olsson L, Hahn-Hägerdal B. 1996 Fermentation of lignocellulosic hydrolysates for ethanol production. *Enzym. Microb. Technol.* (18):312–31.

Ortiz Muñiz, B. 2010. Estudio de la fisiología de *S. cerevisiae* ITV01 y su deficiencia respiratoria para la producción de etanol. Tesis doctoral. Instituto Tecnológico de Veracruz. Veracruz, México.

Partida-Sedas, G. 2016. Producción de etanol a partir de jugo y bagazo de sorgo dulce (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) mejorado genéticamente. Tesis doctoral. Instituto Tecnológico de Veracruz. Veracruz, México.

Pronk, J.T., Steensma, H. y Van Dijken, J. 1996. Pyruvate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast.* (12) 1607-1633.

Reyes, L., Camacho, T., Guevara, F. 2013. *Rastrojos: manejo, uso y mercado en el centro y sur de México*. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. (7):1-242 Aguascalientes, México.

Secretaría de agricultura y desarrollo rural SADER (Consultada en 2019), CIMA, ASERCA. Información de los mercados agropecuarios www.cima.aserca.gob.mx/swb/cima/Maiz

Saha BC. 2003. Hemicellulose bioconversion. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* (30):279–91.

Saini, J.K., Saini, R., Tewari, L. 2015. Lignocellulosic agriculture wastes as biomass feedstocks for second-generation bioethanol production: concepts and recent developments. *Biotech.* (5):337–353

Sánchez, A.M, Gutiérrez, A.I, Muñoz, J.A, Riviera, C.A. 2010. Producción de bioetanol a partir de subproductos agroindustriales lignocelulósicos. *Tumbaga* (5): 61-91

Sarris D, Papanikolaou S. 2016. Biotechnological production of ethanol: biochemistry, processes and technologies. *Eng. Life Sci.* (16):307-329

Servicio de Información y Estadística Agroalimentaria y Pesquera SIAP (Consultada en 2015), SIACON, SAGARPA. Consulta de Indicadores de Producción Nacional de Maíz www.siap.sagarpa.gob.mx/siacon

Galarza, J.M., 2008. Servicio de información agroalimentaria y pesquera (SIAP). Situación actual y perspectivas del maíz en México 1996-2012. Ciudad de México, México.

Snoek, T., Verstrepen, K.J., Voordeckers, K. 2016. How do yeast cells become tolerant to high ethanol concentrations. *Curr. Genet.* 1–6.

Strehaiano, P. 1984. Phénomènes d'inhibition et fermentation alcoolique. Thèse Dr. és Sciences, I.N.P. Toulouse, France

Suhang, M., Kumar A., Singh, J. 2014. Key Technologies for the Production of Lignocellulolytic Enzymes. *Environ. We Int. J. Sci. Tech.* (9):39-52

Teter,S.A. 2012. Development of a Commercial Ready Enzyme Application System for Ethanol. Novozymes Inc.

Tucker, M.P., Kim, K.H., Newman, M.M., Nguyen, Q.A. 2003. Effects of temperature and moisture on dilute-acid steam explosion pretreatment of corn stover and cellulase enzyme digestibility. *Appl. Biochem. Biotechnol.* (10):105–108

Verardi, A., De Bari, I., Ricca, E., Calabro, V. 2012. Hydrolysis of Lignocellulosic Biomass: Current Status of Processes and Technologies and Future Perspectives. *InTech.* (5):95-122

Walker, M.G. (1998) Yeast physiology and biotechnology. John Wiley & Sons. England

Zabed, H., Sahu, J.N., Suely, A., Boyce, A.N., Faruq, G. 2017. Bioethanol production from renewable sources: Current perspectives and technological progress. *Renew. Sust. Energ. Rev.* (71):475-501

Zhao, Y., Damgaard, A., Christensen, T. H. 2018. Bioethanol from corn stover a review and technical assessment of alternative biotechnologies. *Prog. Energ. Combust.*(1):1-17