



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**EFFECTO DE LA COMPOSICIÓN DE MATERIALES LIGNOCELULÓSICOS SOBRE EL RENDIMIENTO DE
GLUCOSA Y PENTOSAS OBTENIDAS POR MÉTODOS ENZIMÁTICOS**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICA DE ALIMENTOS

PRESENTA

ZULUETA SANTOYO LORENA



Ciudad de México

2016



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE: MARÍA DE LOS ÁNGELES VALDIVIA LÓPEZ

VOCAL: FRANCISCO ROJO CALLEJAS

SECRETARIO: INÉS MIRANDA MARTÍNEZ

1er SUPLENTE: MARICARMEN QUIRASCO BARUCH

2do SUPLENTE: CARMINA MONTIEL PACHECO

SITIO DONDE SE DESARROLLA EL TEMA: Universidad Nacional Autónoma de México.
Facultad de Química. Conjunto E. Departamento de Alimentos y Biotecnología. Ciudad
Universitaria. Ciudad de México.

Asesor de tema:

M. en C. María de los Ángeles Valdivia López

Sustentante:

Zulueta Santoyo Lorena

ÍNDICE		Página
	INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO I	ANTECEDENTES	
1.1	Celulosa	4
1.2	Hemicelulosa	5
1.3	Lignina	7
1.4	Materiales lignocelulósicos	8
	1.4.1 Bagazo de <i>Agave tequilana</i>	8
	1.4.2 Aserrín	10
	1.4.3 Bagazo de caña de azúcar	11
	1.4.4 Olote de maíz (<i>Zea mays</i>)	12
1.5	Pretratamiento ácido	14
1.6	Hidrólisis enzimática	15
	1.6.1 Celulasas	17
	1.6.2 Hemicelulasas	19
1.7	Fermentación	21
CAPÍTULO II	HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	25
CAPÍTULO III	METODOLOGÍA	23
3.1	Caracterización de las fibras con un pretratamiento ácido	27
3.2	Evaluación de la actividad enzimática	29
3.3	Optimización de condiciones de Hidrólisis	29
	3.3.1 Efecto del buffer	29
	3.3.2 Efecto de la concentración de enzima	29
3.4	Hidrólisis enzimática	30
3.5	Fermentación	30
CAPÍTULO IV	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	32
4.1	Análisis de Azúcares contenidos en las muestras recibidas con un Pretratamiento ácido diluido.	32

4.2	Evaluación de la actividad enzimática	33
4.3	Optimización de condiciones de Hidrólisis	34
	4.3.1 Efecto del buffer	34
	4.3.2 Efecto de la concentración de enzima	39
4.4	Hidrólisis enzimática	40
4.5	Fermentación	47
CAPÍTULO V	CONCLUSIONES	50

AGRADECIMIENTOS:

A lo largo de mi vida he tenido la dicha de tener la bendición de Dios, que ha puesto a mi alrededor a grandiosas personas que con su ejemplo me han guiado por el camino correcto para poder triunfar en mi destino. Y que me ha llenado de bendiciones y me ha permitido tener salud, vitalidad, fuerza y recursos para solventar este largo recorrido, por guiarme a través del camino del bien y por ayudarme a cumplir mis sueños.

A aquella mujer luchadora que con su esfuerzo, coraje y dedicación, me ha otorgado con bondad su amor y comprensión, le quiero agradecer por todo lo que ha hecho por mí, por inculcarme el deseo de superación, responsabilidad, entusiasmo, la fascinación por la Química y el amor a la vida. Ya que sin esos elementos hubiera sido más difícil concretar este gran paso en mi vida. Mamá, viene a mi memoria tu sonrisa al contarme tus anécdotas en nuestra hermosa Facultad de Química, es un sentimiento tan grande, el pensar que al titularme, tú lo haces conmigo, porque estuviste apoyándome todo este tiempo y es un gran privilegio poder decir que tú eres mi motor, mi preciosa madre Concepción Zulueta.

A otra persona, la mujer inquebrantable, valiente y dadivosa, el gran eslabón de mi familia, quiero externarle mi cariño y también agradecerle por su apoyo, abuela Guadalupe Zulueta, eres quién con sus caricias y palabras tiernas siempre me motivas a salir adelante, estoy muy feliz de saber que tú estarás presente en este gran momento y en mi vida, para siempre.

A mi tía Martha Zulueta, que es la alegría de la familia, que con sus historias y risas me ha permitido tomar la vida con un agradable sentido del humor, que me enseñó a tener respeto y amor hacia una parte muy importante de mi familia, nuestras mascotas, como mis hermosas Paby y Ginger que estuvieron conmigo alegrándome y ahora las llevo en mi corazón, también a Mallela, la Gris, Bombón, Keysey, el Negro, Apolo, Tango, Willie, la Totis y Porfirio.

A mi familia, tía Yolanda, Rosa, Malena, a mis padrinos Juan y Rebeca; a mis primos Ximena, Fernando, Carlos, Juan, Elena; gracias a todos por estar conmigo y apoyarme siempre.

Leonardo, de una manera especial llegaste a mi vida y encajaste en mis ideales y metas, quiero agradecerte por estar siempre conmigo y por demostrarme tu cariño hacia mí y a mi

familia, estoy segura que este es uno de los primeros y muchos momentos felices que viviremos juntos, eres mi valioso motivo para sonreír.

Amigos, gracias, sin ustedes la estadía universitaria no hubiera sido tan divertida y única, Ameyalli, esta es la Tesis de la amistad, gracias por compartir los mejores entrenamientos en gimnasia; Maricarmen las mejores clases las tuve a tu lado; Jorge gracias por hacerme reír siempre; Montserrat mi primer amiga de la Facultad; a todos mis amigos que estarán en mi mente y corazón.

Agradezco al Proyecto PAPIIT clave IG100815 “Producción de materiales con alto valor agregado a partir de residuos y subproductos de procesos de producción de bioetanol de segunda generación”, por las facilidades y recursos que permitieron llevar a cabo este trabajo.

Gracias a la Universidad Nacional Autónoma de México por regalarme los mejores momentos de mi juventud y formación profesional, por permitirme encontrar una de mis grandes pasiones, que es la Gimnasia Rítmica, por las buenas instalaciones, donde pude desarrollarme y concluir este triunfo.

Introducción:

Biomasa y Bioetanol

En los últimos años ha existido una necesidad de proteger el medio ambiente y maximizar el potencial de uso de los subproductos agrícolas, cuya disposición final es un problema ambiental, además de una constante preocupación por la disminución en las reservas mundiales de petróleo, lo que pone en peligro la seguridad energética. Esto ha motivado a científicos de todo el mundo a encontrar métodos que logren transformar estos subproductos agrícolas, siendo principalmente materiales lignocelulósicos, en compuestos más sencillos que se puedan comercializar o se utilicen como fuentes de energía renovable, para producir biocombustibles de segunda generación como el etanol, que se mezcla con petróleo para reducir la utilización de este.

Además el etanol se utiliza en grandes cantidades en la industria, es el segundo solvente más utilizado después del agua, es un material clave en la manufactura de plásticos, barnices, perfumes, cosméticos, pinturas, etcétera.⁽⁶⁴⁾

Existió una década definitiva para los biocombustibles, de 1996-2006, cuando la producción de etanol a partir de maíz o caña de azúcar se expandió en todo el mundo, el bioetanol de primera generación. Se elaboraron gran cantidad de publicaciones a nivel internacional sobre la participación de estos biocombustibles para disminuir los niveles de CO₂ emitidos a la atmósfera o el calentamiento global. Sin embargo en el 2006 comenzó una controversia contra estos, se citó una amplia gama de problemas, impacto en los precios de los alimentos debido a la producción de los biocombustibles y el colapso de la idea que eran amigables al medio ambiente las plantaciones de cultivos destinados a su producción, puesto que acabaron con los bosques del Sureste de Asia, por ejemplo.⁽⁹⁾

Afortunadamente a la par se investigaba una forma alternativa de biocombustibles, en 1996 se publicó una Enciclopedia que compilaba aspectos científicos, tecnológicos y económicos en etanol derivado de biomasa, conceptualmente separado de etanol producido de granos y jugo de caña de azúcar, es decir

bioetanol de segunda generación. Las oportunidades de poder utilizar ese recurso masivo como plantas o residuos agroindustriales, fue más atractiva en términos medio-ambientales y comerciales. Entonces la lignocelulosa se convirtió rápidamente en la opción preferida por su bajo costo, por ser un sustrato sin controversias para la producción de bioetanol.⁽⁴²⁾

Esta biomasa lignocelulósica es un recurso masivo con una tasa de síntesis de 4×10^9 t por año ⁽⁴⁹⁾, representa al principal componente de una inmensa variedad de desperdicios y residuos, domésticos, de la industria alimentaria, etcétera. Representa un gran potencial de uso debido a que es barata y renovable porque se crea con la energía solar. Pero al contener polímeros estructurales complejos como celulosa, hemicelulosa y lignina, existe la problemática logística y de procesamiento para conseguir una óptima conversión a compuestos más sencillos como azúcares reductores, glucosa y pentosas que son de interés y se utilizan en procesos como fermentaciones, así como para obtener aditivos alimentarios, ácidos orgánicos, enzimas y otros.⁽⁴³⁾

Características del sustrato lignocelulósico:

Clasificación de los materiales lignocelulósicos, dependiendo de su origen⁽⁹⁾:

- Residuos agrícolas
- Residuos agroindustrial
- Maderas duras
- Maderas suaves
- Biomasa herbácea
- Residuos celulosos
- Desechos sólidos (drenaje)

El material lignocelulósico puede ser dividido en tres componentes principales:

- Celulosa (30-50 %)
- Hemicelulosa (15-35 %)
- Lignina (10-20%)

La celulosa junto con la hemicelulosa están estrechamente ligadas a la lignina mediante enlaces covalentes y enlaces de hidrógeno que generan una estructura resistente a cualquier tratamiento.

Este proyecto tiene como propósito final garantizar de una manera sustentable la utilización de los recursos agrícolas como medio para la obtención de sustancias útiles como azúcares y/o biocombustibles. Que permitan una transformación de los procesos actuales de la generación y obtención de energía.

I. Antecedentes:

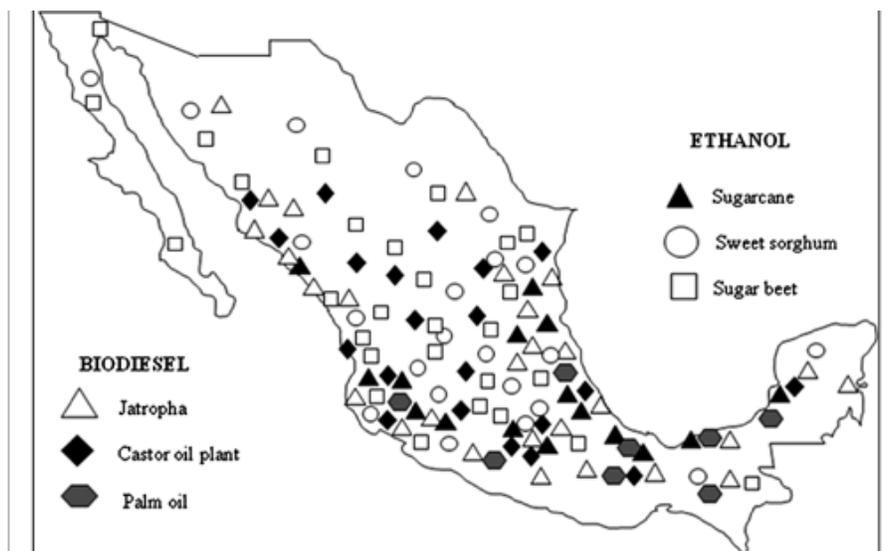


Figura 1. Cultivos que se utilizan para obtener bioenergía en México (PROINBIOS 2010)

Los cultivos que se observan en la figura 1, se han considerado para producir etanol y biodiesel a partir de ellos. En México la producción de energía proveniente de esta biomasa, fue de un 0.86 % del total⁽⁵⁸⁾. Además de estos cultivos, se comienza a utilizar agave, olote, aserrín, por lo que en México se tienen los suficientes recursos para comenzar a tener una adecuada producción de biocombustibles y así lograr incrementar el aporte energético de estos cultivos al país.

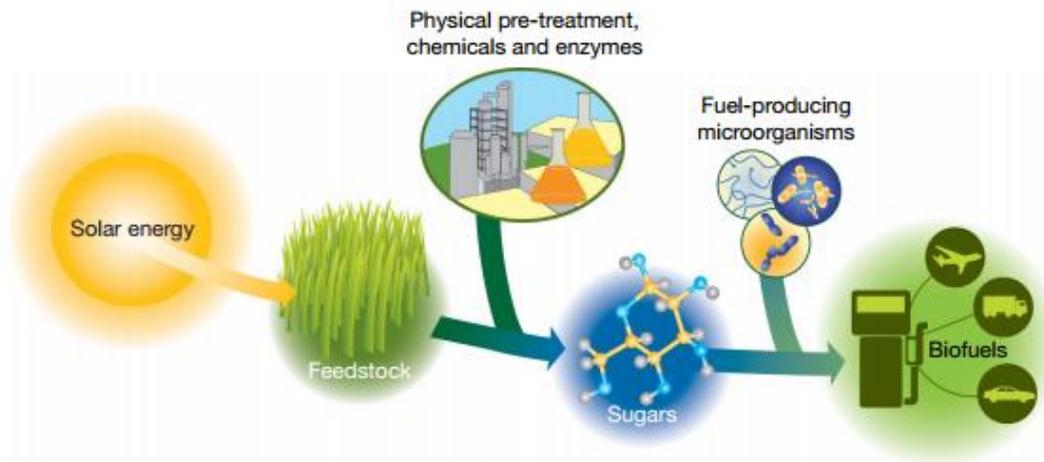


Figura 2. Esquema de la conversión de la Energía Solar en biocombustibles (Rubin, 2008)
 El proceso de obtención de biocombustibles a partir del material lignocelulósico se puede resumir en grandes etapas como se representa en la figura 2, donde se explica que mediante la conversión de la energía solar por las plantas, con la aplicación de tratamientos físicos, químicos y/o enzimáticos se obtienen azúcares los cuales son el sustrato de microorganismos que producen los biocombustibles.

La materia lignocelulósica contiene principalmente 2 biopolímeros, celulosa y hemicelulosa, que se utilizan para los fines antes mencionados, además contiene lignina que tiene otras aplicaciones como obtención de derivados aromáticos como vainillina, catecoles, guayacol; además que puede utilizarse como ligno-sulfonatos que se aplican como dispersantes de pesticidas o emulsificantes, etcétera⁽¹⁰⁾; sus características se explican a continuación:

1.1 Celulosa

Principal componente estructural de la materia vegetal. Es el polímero más abundante en el planeta Tierra, su síntesis esta en 10^{10} - 10^{11} toneladas por año. Es el polisacárido formado por unidades de glucosa unidas a través de enlaces β -1,4 glucosídicos, con una fórmula química de $H-(C_6H_{10}O_5)_n-OH$, donde n representa el grado de polimerización.

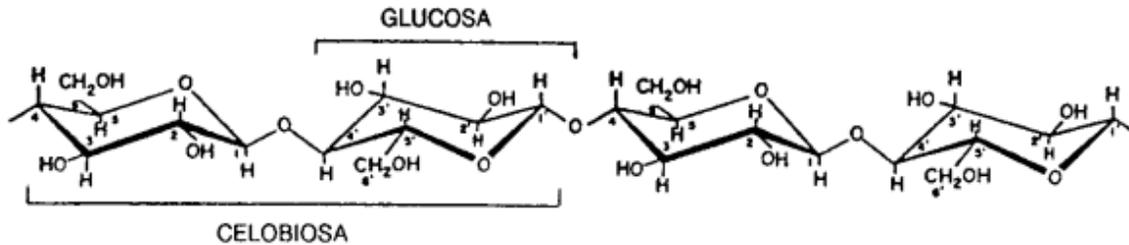


Figura 3. Estructura molecular de la celulosa (Macarron, 1992)

En la figura 3 se describe la estructura de este polímero, donde se distinguen las unidades básicas de glucosa, que conforman a su vez a la celobiosa con 2 unidades de glucosa, y la unión de celobiosas forma en conjunto a la celulosa.

La celulosa presenta cadenas lineales con varios miles de unidades de glucosa, estas cadenas se unen vía enlaces de hidrógeno formando microfibrillas organizadas en regiones cristalinas ocupando el centro de la estructura vegetal y amorfas en la superficie de esta. Las zonas amorfas son más susceptibles a los tratamientos hidrolíticos, contrario a las zonas cristalinas que están muy bien organizadas y estabilizadas por enlaces de hidrógeno entre los grupos hidroxilo.

En la pared celular de la planta las microfibrillas se agregan en macrofibrillas combinadas con material no celulósico como hemicelulosa y lignina, haciendo a la fibra de celulosa insoluble y muy resistente al ataque químico, siendo estas estructuras las que confieren rigidez a las plantas.

1.2 Hemicelulosa

Estructura amorfa y variable constituida de heteropolímeros que tienen hexosas (D-glucosa, D-galactosa y D-manosa) así como pentosas (D-xilosa y L-arabinosa) y puede tener ácidos urónicos (ácido D-glucurónico, D-galacturónico y ácidos metilgalacturónicos). La cadena principal está compuesta de enlaces β -1,4 xilanos que contienen alrededor del 90 % de D-xilosa y 10% de L-arabinosa. Se puede clasificar según la cadena principal en: xilanos, xiloglucanos, mananos y glucomanos⁽⁵⁶⁾. Son ramificados con una cadena principal de glucosa, xilosa y/o manosa con enlaces β -(1 \rightarrow 4).

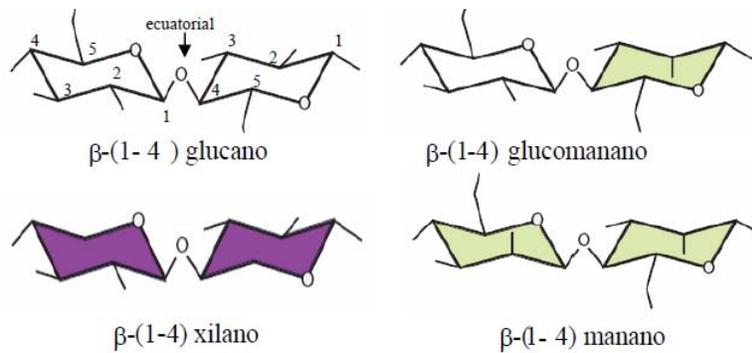


Figura 4. Estructura de las principales unidades de disacáridos presentes en la hemicelulosa. (Prinsen, 2010)

La estructura de la hemicelulosa varía según el tipo de planta, en general los enlaces β -(1 \rightarrow 4) que unen a los átomos C1-O-C4 en la hemicelulosa ocurren en posición ecuatorial, entre unidades de glucosa, xilosa y manosa, como se observa en la figura 4.

Los xilanos se encuentran en la mayoría de las células de las plantas, compuestos principalmente de xilosa, a veces pueden estar parcialmente acetilados, las formas en las que se encuentran pueden ser como glucuronoxilanos, arabinoglucuronoxilanos y arabinoxilanos. Los mananos también se encuentran en casi todas las plantas y están compuestos principalmente de manosa y glucosa unidas de formas aleatorias.⁽³³⁾

Las cadenas de hemicelulosa no se agregan entre ellas como la celulosa, solamente forman enlaces de hidrógeno con la celulosa para proveer de integridad estructural a la pared vegetal. Además tiene otras funciones como mantener y determinar la forma de la células de la planta y la señalización célula a célula, donde se liberan oligosacáridos cuando, por ejemplo, un hongo libera hemicelulasas para alimentarse de la planta, por lo que se estimulan los sistemas de defensa. Debido a la diversidad en sus azúcares, se requiere un amplio rango de enzimas para alcanzar una hidrólisis completa.

1.3 Lignina

Polímero fenólico complejo, compuesto por unidades de propano fenol, con enlaces éter (C-O-C) y uniones carbono-carbono (C-C), con una estructura amorfa y tridimensional. ⁽⁹⁾

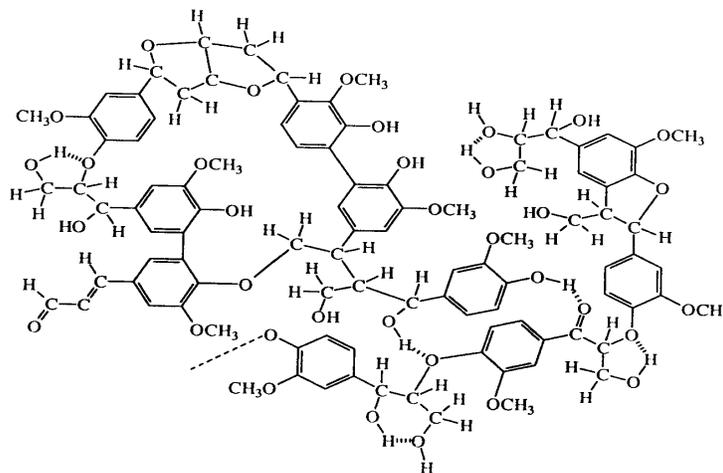


Figura 5. Estructura de la lignina (Chávez-Sifontes, 2013)

Como se observa en la figura 5, es un heteropolímero muy complejo, de composición variable. Compuesto de unidades de fenilpropileno-alcohol que están interconectadas por enlaces éter y éster estables, sus principales precursores son tres monómeros del fenilpropano llamados alcohol colifenirico, cumárico y sinapílico. Tiene características hidrofóbicas, su función principal es mantener unidas las células de la planta, como pegamento. Al estar enlazado covalentemente a xilanos de la hemicelulosa confiere una alta compactación a la pared celular vegetal lo que dificulta su degradación por lo que también sirve como el mayor sistema de defensa contra patógenos e insectos, para las plantas.

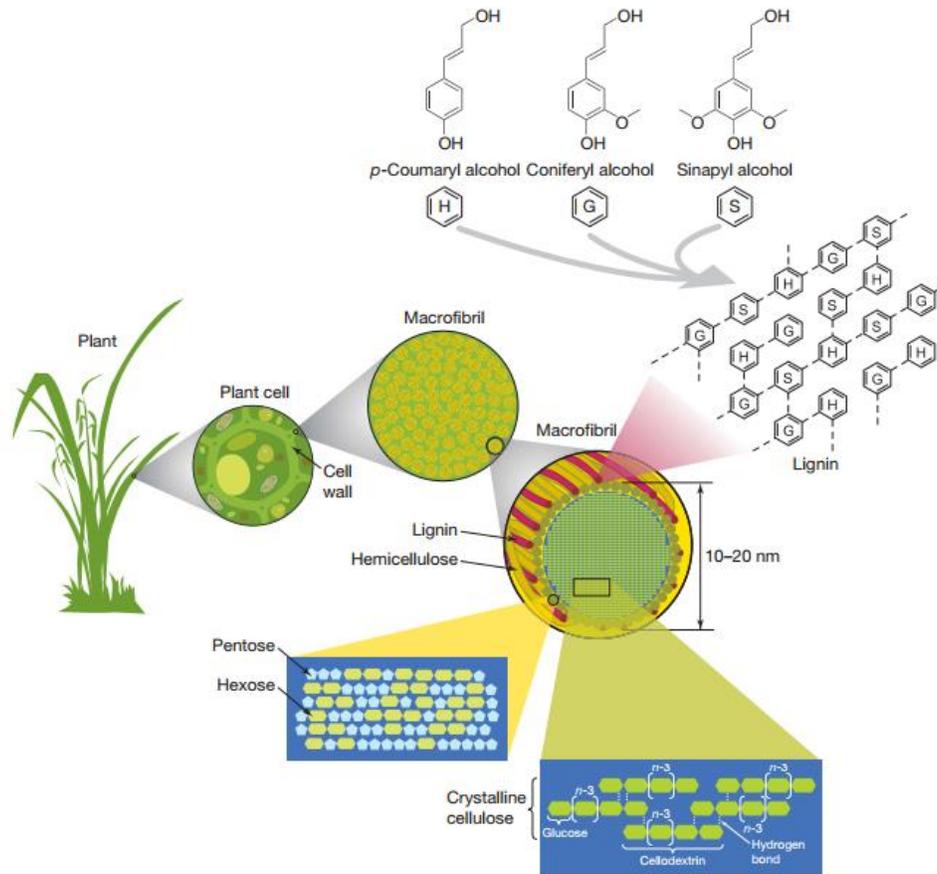


Figura 6. Estructura de la lignocelulosa en las plantas. (Rubin, 2008)

La unión de estos tres compuestos conforma a la lignocelulosa, la cuál constituye a las microfibrillas que en conjunto forman a las macrofibrillas que existen en las células de la planta, como se observa en la figura 6, en general todas las plantas tienen esta composición con cantidades variables de celulosa, hemicelulosa lignina.

1.4 Materiales lignocelulósicos:

1.4.1 Bagazo de *Agave tequilana*:

Existen al menos 200 especies de *Agave* en el mundo, en México se encuentran más de 150 ⁽²¹⁾. El área de cultivo ha incrementado en los últimos años, en 2014 se cosecharon 27689.34 ha, es decir 2408884. 28 t de agaves, de donde solamente la piña es lo que se utiliza para la producción de esta bebida. El bagazo

de agave es el material residual fibroso que queda después de haber cortado, cocinado y molido la piña del *Agave tequilana Weber var. Azul* que se utiliza para la producción del tequila en México. El bagazo representa el 40 % del agave procesado ⁽³⁰⁾ y puede servir para producir 28 millones de litros de etanol por año, se generan anualmente alrededor de 1.05×10^5 t ^(49,55), de las cuales solamente una pequeña porción es utilizada para preparar composta y el resto se desecha. Por ejemplo el *Agave tequilana* que tiene una densidad de 2500 plantas/ ha puede llegar a producir 21 300 L etanol/ ha ^(19; 25). La Secretaría de Energía (SENER) tiene identificados 13 proyectos de investigación para la producción de etanol de segunda generación, utilizando residuos de podas y de algas, siendo el más relevante el de la empresa Blue Fuel, ubicada en el estado de Jalisco, dedicada a la producción de etanol anhidro a partir de agave y sus residuos, la cual alcanza los 9.2 millones de litros mensuales⁽⁵⁹⁾.

El agave es buen sustrato por su bajo contenido en lignina y una pared celular con poca presencia de polisacáridos no-celulósicos, cuya función es proteger a las microfibrillas de celulosa. Al tener cantidades pequeñas de estos, en un ataque enzimático, las enzimas tendrán más fácil acceso a la celulosa, así que tiene una baja recalcitrancia, es decir que existe un gran potencial de liberación de azúcares con un pretratamiento y/o una hidrólisis para transformarlo en bioetanol. ⁽³⁴⁾

De manera adicional su siembra ofrece atributos como evitar la desertificación y ayuda a remover iones de metales pesados del suelo contaminado. Como utiliza la vía metabólica Crassulacea Ácida (CAM) por sus siglas en inglés, que es una adaptación fotosintética que facilita a la planta la toma de CO₂ en la noche disminuyendo el gradiente de agua hacia las hojas y optimizando el requerimiento de agua, es una forma eficiente de asimilar la fuente de carbono de plantas que crecen en hábitats áridos⁽⁵⁾, reditúa en una alta productividad de biomasa con la mínima necesidad de agua y nutrientes. Puede crecer en tierras semiáridas (ocupan el 18 % de la superficie terrestre), donde no se necesita mucha agua para crecerlo.

Los materiales lignocelulósicos comunes tienen hasta un 30 % de lignina ⁽⁶³⁾, que le brinda fuerza al xilema de la planta para soportar tensiones que ocurren durante la transpiración, en plantas con metabolismo CAM la tensión creada en el xilema es baja debido a la baja transpiración, por lo que requieren poca cantidad de lignina.

1.4.2 Aserrín:

La madera es una de las fuentes de energía más utilizadas por la humanidad, proveyendo del 9% de energía renovable al mundo.

En México, la industria del aserrío genera alrededor de 0.35 m³ de aserrín de pino por m³ de madera⁽⁵⁷⁾, lo cual representa en promedio 206,000 m³ al año⁽²⁹⁾. Considerando que su densidad promedio es de 500 kg/m³⁽⁶⁸⁾, esta producción equivale a 103,000 ton anuales, a partir de los cuales se podría obtener alrededor de 33x10⁶ L de etanol combustible.

El estado de Durango tiene las mayores de reservas de bosques de pino en México. Con un área total de 12.3 millones de hectáreas, de las cuales el 40 % se dedica a la producción forestal. Alrededor de 2.7 millones m³ de árboles son cortados anualmente representando un 30 % de la producción de madera en México. Debido a la forma en que se cortan los árboles, una cantidad considerable de biomasa se deja en el suelo (alrededor del 5-10 % del volumen cortado). Una parte de este residuo es cortado en piezas pequeñas y colocadas en el suelo para prevenir incendios forestales y la erosión de este, lo que favorece su incorporación al suelo como materia orgánica. Aun así mucho material que sobra como el aserrín y los co-productos industriales, son simplemente apilados y quemados para reducir los costos de contar con una apropiada manera de deshacerse de ello, lo que nuevamente conlleva a una mayor contaminación.⁽⁶²⁾

1.4.3 Bagazo de caña de azúcar:

Es uno de los cultivos más importantes en el mundo. Se comenzó a utilizar para obtención de bioetanol a mediados de 1990 en Brasil, como alcohol de primera generación.

El bagazo es un co-producto de la industria azucarera, la producción global se puede estimar en 312 kg de bagazo /ton de caña, con un rendimiento de 140 L de Etanol/ ton de bagazo.⁽⁹⁾ Y representa alrededor del 25 – 40 % del total de la materia procesada, dependiendo del contenido de fibra de la caña y la eficiencia en la extracción del jugo.⁽⁵⁰⁾

En Brasil existen plantas de producción con una capacidad de 109 -180 L de bioetanol/ t de bagazo. En México el rendimiento teórico de etanol que se puede obtener de esta materia prima es de 422 L/t de materia seca.⁽⁵⁴⁾

México es el séptimo productor de azúcar en el mundo y la agroindustria cañera es la más antigua del país. Su cultivo ocupa alrededor de 675 mil hectáreas, con una producción de 50 millones de toneladas de caña al año, las que se procesan en 57 ingenios distribuidos en quince estados de la República y cuya producción promedio en los últimos cinco años es de 5.2 millones de toneladas de azúcar; asimismo, genera alrededor de 3 millones de empleos directos e indirectos y es el sustento de casi 5 mil familias campesinas por ingenio en promedio. Es por ello que esta industrial es considerada de interés público y como un importante detonador del desarrollo económico regional. Entre las industrias en México que producen azúcares a partir de caña, se encuentran los ingenios azucareros; de estos, 18 cuentan con destilería para la producción de etanol y únicamente lo producen La Concepción (19 751 m³/año), San José de Abajo (2027 m³/año), San Nicolás (4159 m³/año), Constancia (1709 m³/año), Puljitic (8640 m³/año), Tamazula (1795 m³/año), Calipan (426 m³/año) y San Pedro (196 m³/año). Dicha producción se destina a satisfacer la demanda de bebidas alcohólicas y de la industria química⁽⁴⁶⁾.

Por su parte, Veracruz es la entidad que registra la mayor producción de azúcar en el país; para ello utiliza aproximadamente 260 mil hectáreas de cañaverales, y en sus 22 ingenios se genera 40% de la producción nacional. Y si bien la superficie cultivada se ha incrementado, su productividad se ha estancado en un rendimiento promedio de 72 toneladas por hectárea, que es el mismo que se registra en el resto del país. Pero potencialmente, y tomando en consideración la calidad de las tierras, con un cultivo y riego adecuados, se podrían alcanzar más de las 100 toneladas anuales por hectárea; de hecho, en el estado hay campos cañeros que obtienen hasta 120 toneladas por hectárea.⁽⁶⁾

El gobierno de México inició una serie de medidas para crear un mercado interno de biocombustibles, elevar los niveles de eficiencia en el uso final de la energía y disminuir emisiones de gases de efecto invernadero. El 22 de Agosto del 2005 se publicó la Ley de Desarrollo Sustentable de la Caña de Azúcar, en la que se fundan los lineamientos para su futuro aprovechamiento como energético.⁽¹⁾

1.4.4 Olote de maíz (*Zea mays*):

Es un subproducto o residuo agrícola que se genera en grandes cantidades en el proceso de separación del grano de la mazorca y se estima que por cada tonelada de maíz se obtienen 170 kg de olote⁽¹¹⁾. En México se produjeron más de 35 millones de t de maíz en el 2010; y se puede llegar a obtener 428 L de EtOH/ t de masa seca de olote.⁽⁵⁴⁾ Es la cuarta potencia mundial en producción de maíz.⁽⁵³⁾

El uso del olote ha estado muy restringido debido a que es difícil acceder a sus componentes (tiene un gran carácter recalcitrante), solamente se ha esparcido a la intemperie generando problemas de contaminación ambiental por lo que se ha buscado utilizarlo para otras funciones como forraje para rumiantes⁽¹²⁾, soporte para disminuir la erosión en la tierra y como sustrato para producir enzimas xilanasas.⁽³²⁾ Por otro lado teniendo un alto contenido de hemicelulosas, del cual el 94 % corresponde a xilanas lo hace muy atractivo para desarrollar fertilizantes nitrogenados con acción de lenta liberación.⁽³¹⁾ Por lo anterior en este trabajo se

buscó darle otro uso potencial al olote, que es hidrolizarlo enzimáticamente para obtener glucosa y posteriormente mediante una fermentación obtener bioetanol.

En México el 2 de Febrero del 2008 entró en vigor la Ley de Promoción y Desarrollo de los Bioenergéticos, en el artículo 11 fracción VIII de esta ley, se estipula el otorgamiento de permisos para la producción de biocombustibles a partir de granos de maíz cuando existan inventarios excedentes de producción interna de maíz para satisfacer el consumo interno.⁽¹⁾ Al contrario de esta ley se busca con el olote lograr la producción de bioetanol sin tener que comprometer la autosuficiencia alimentaria del país, los granos de maíz.

Se tienen datos de la producción mundial de maíz del 2010, de 844 millones de t y se estima que con esto se pueden generar alrededor de 144 millones de t por año.⁽¹⁶⁾

Tabla 1. Contenidos teóricos de celulosa, hemicelulosa y lignina en las fuentes de fibra utilizadas.

Fuente de fibra	% celulosa	% hemicelulosa	% lignina	Referencia
Agave	47.2	18.5	16.4	Iniguez-Covarrubias G. et al (2001)
Aserrín	40-55	24-40	18-25	Sung and Cheng (2002)
Caña de azúcar	48.8	24.4	25.8	Area, (2002)
Olote	45	35	15	Torney F. et al (2007)

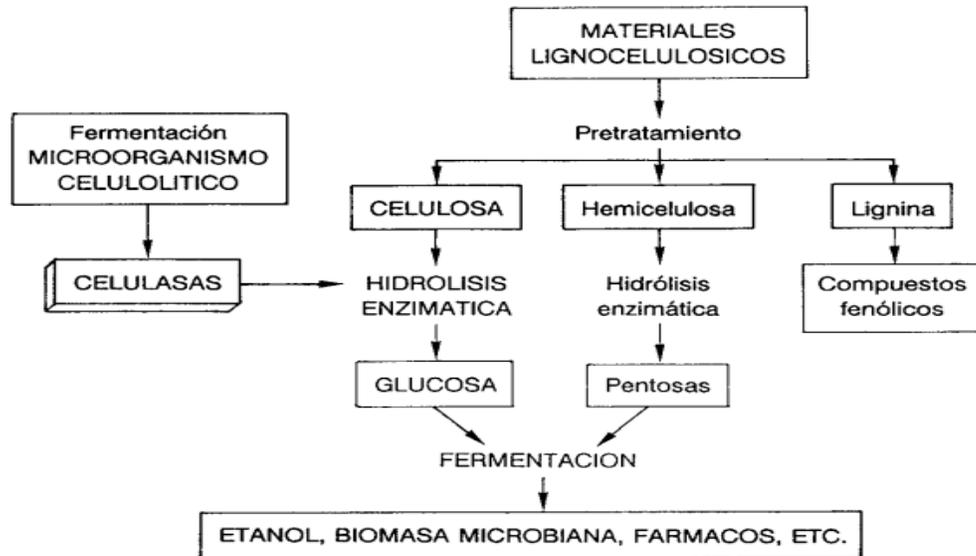


Figura 7. Esquema del proceso de Hidrólisis de residuos lignocelulósicos. (Macarron, 1992)

1.5 Pretratamiento ácido.

Para lograr un buen rendimiento en la hidrólisis enzimática se requiere de un tratamiento previo de la biomasa con el fin de mejorar la interacción enzima-sustrato, así como reducir la cantidad de celulosa cristalina y el grado de polimerización de esta, también para aminorar las interacciones lignina-hemicelulosa que rodean a la celulosa y para aumentar el área de accesibilidad de las enzimas en la hidrólisis, es decir generar un residuo celulósico hidrolizable más fácilmente que la biomasa nativa.⁽⁶⁴⁾

Varios procesos se han investigado como:

- Pulverización mecánica
- Pirólisis
- Explosión de vapor
- Explosión de CO₂
- Ozonolisis
- Proceso de Organosolv
- Hidrólisis ácida y alcalina

En este trabajo las muestras se recibieron con un pretratamiento ácido diluido. Una de las razones porque las muestras fueron pretratadas de este modo es porque se trata de un proceso barato y efectivo, permite un alto rendimiento de glucosa con poca formación de co-productos, lo que favorece la subsecuente hidrólisis, para utilizarse en la fermentación.

1.6 Hidrólisis Enzimática:

La hidrólisis enzimática es una reacción altamente selectiva que sirve para convertir polisacáridos en sus unidades más pequeñas que lo componen como dímeros y monómeros, a una gran velocidad.

En este trabajo se hidrolizó principalmente la celulosa, convirtiéndola a glucosa, según la siguiente reacción:



Tabla 2. Comparación entre hidrólisis ácida diluida e hidrólisis enzimática (Adaptado de Hamelinck et al, 2005; Taherzadeh et al, 2007)

Variable en comparación	Hidrólisis ácida diluida	Hidrólisis Enzimática
Condiciones amables para la Hidrólisis	NO	SI
Altos rendimientos de la Hidrólisis	NO	SI
Inhibición de los productos formados durante la Hidrólisis	NO	SI
Formación de productos de inhibición durante la Hidrólisis	SI	NO
Bajo costo de catálisis	SI	NO
Corto tiempo de la Hidrólisis	SI	NO
Insumo	< 1% H ₂ SO ₄	Celulasas
Temperatura	215 °C	50 °C
Tiempo	3 min	24 – 48 h
Sacarificación	50 – 70 %	75 – 95 %

La celulosa se puede hidrolizar de forma química con la ayuda de ácidos ya sea diluidos o concentrados, como H_2SO_4 o HCl ; con los ácidos diluidos se necesitan altas temperaturas de 200 a 240 °C, y se obtienen además de azúcares, hidroximetilfurfural (HMF) y otros productos no deseados; si se utilizan altas concentraciones de ácido se alcanza hasta un 90 % de rendimiento de glucosa en relativamente poco tiempo, 10 a 12 horas, pero la recuperación de ese ácido es un proceso costoso que implica mucha energía y la construcción de reactores resistentes a la corrosión.⁽⁹⁾

En la tabla 2 se ilustran las diferencias entre una hidrólisis ácida diluida y una enzimática, la cual puede sobrellevar las desventajas de la hidrólisis química y para conseguir un buen rendimiento (de 75-95 %) en esta hidrólisis se utilizan enzimas, catalizadores biológicos que no generan productos secundarios de degradación y trabajan a condiciones fáciles de alcanzar como:

- Temperatura: en el intervalo de 45 – 55 °C
- pH: 3 a 5.5⁽⁹⁾
- Agitación (mayor a 100 rpm hasta 200 rpm)

Aunque el tiempo de reacción es mayor en una hidrólisis enzimática que en una hidrólisis química y el costo de las enzimas es más elevado que el de los ácidos, como por ejemplo el ácido sulfúrico; se prefiere el método enzimático debido a su gran potencial de evolución, de mejora continua y la posibilidad de tener una reducción de costos a largo plazo.

Para lograr una eficiente hidrólisis enzimática de estos materiales se debe tomar en cuenta que existen ciertos factores que pueden limitar una hidrólisis completa. Algunos de estos, de importancia son la concentración del sustrato y del producto ya que una alta concentración del sustrato recae en una disminución de la hidrólisis, es decir la inhibe, el grado de inhibición depende de la cantidad de enzima agregada por el total del sustrato; factor de mezclado, si se presenta una deficiente agitación puede repercutir en una hidrólisis deficiente; la estructura de la celulosa; las interacciones entre las enzimas y la lignina, las cuales no permiten

que se formen azúcares; la disminución de la hidrólisis conforme avanza la conversión del sustrato; una dosis precisa de las enzimas; necesidad de suplementar las celulasas con β -glucosidasas para disminuir la inhibición que la celobiosa formada crea en las celulasas; incluso la inhibición que la glucosa liberada genera en la acción de la β -glucosidasa.⁽⁹⁾

Probablemente, en la degradación de celulosa participan también otras enzimas como la celobiosa-oxidasa, detectada en caldos de cultivo de otros hongos, que oxida celobiosa y celodextrinas a sus correspondientes ácidos aldónicos. Una función de esta enzima puede ser la oxidación del extremo reductor formado tras la acción de una EG, evitando que el enlace pudiera formarse de nuevo por transglicosilación. La celobiono-lactona no sólo se ha encontrado en caldos de cultivo de *T. reesei*, sino que además es un potente y específico inductor de la síntesis de celulasas⁽³⁹⁾

1.6.1 Celulasas

Existen 4 tipos nombradas en la Tabla 1.3, secretadas principalmente por microorganismos como hongos y bacterias, están se clasifican por la reacción a la que catalizan:

Tabla 3. Celulasas, sitios de acción y productos.

Celulasa	Número EC	Sitio de acción	Producto
Endocelulasas o endoglucanasas	EC 3.2.1.4	1,4- β -D-glucan-4-glucanohidrolasas	Oligómeros, como celobiosa, celotriosa
Exocelulasas o celobiohidrolasas	EC 3.2.1.91	1,4- β -D-glucancelobiohidrolasas	Celobiosa
Celobiasas o β -glucosidasas	EC 3.2.1.21	Celobiosa	Glucosa
Celulasas oxidativas	EC 3.2.1.4	Celulosa, celobiosa	Ácidoglucónico y celobiónico, oligosacáridos

Para hidrolizar la celulosa las celulasas deben ser absorbidas en la superficie del sustrato, la estructura tridimensional de estas, su tamaño y forma determinan si los enlaces beta-glicosídicos son o no accesibles a la ruptura enzimática, por lo que el proceso es más lento en comparación a la hidrólisis enzimática de otros biopolímeros. ⁽⁹⁾

Al menos tres de estas clases actúan sinérgicamente:

- Endocelulasas: que disminuyen el grado de polimerización de la celulosa mediante la hidrólisis de sitios accesibles de la celulosa, rompiendo cadenas lineales y creando nuevas cadenas más pequeñas, esta enzima se adsorbe fuerte pero reversiblemente a la celulosa microcristalina presente, la fuerza de la absorción se incrementa a bajas temperaturas
- Exocelulasas: remueven unidades de celobiosa (disacárido, 1,4-β-D-glucosil glucosa) de los extremos terminales de la cadena producidos por las endocelulasas, estas enzimas también se adsorben fuertemente en la celulosa cristalina y amorfa, si su actividad es muy alta la concentración de celobiosa aumenta y entonces la actividad de las exocelulasas es inhibida por la acumulación de celobiosa en solución
- Celobiasas o β-glucosidasas que hidrolizan celodextrinas solubles (1,4-β-D-glucanos) y celobiosa en β -D-glucosa. ⁽⁶⁵⁾

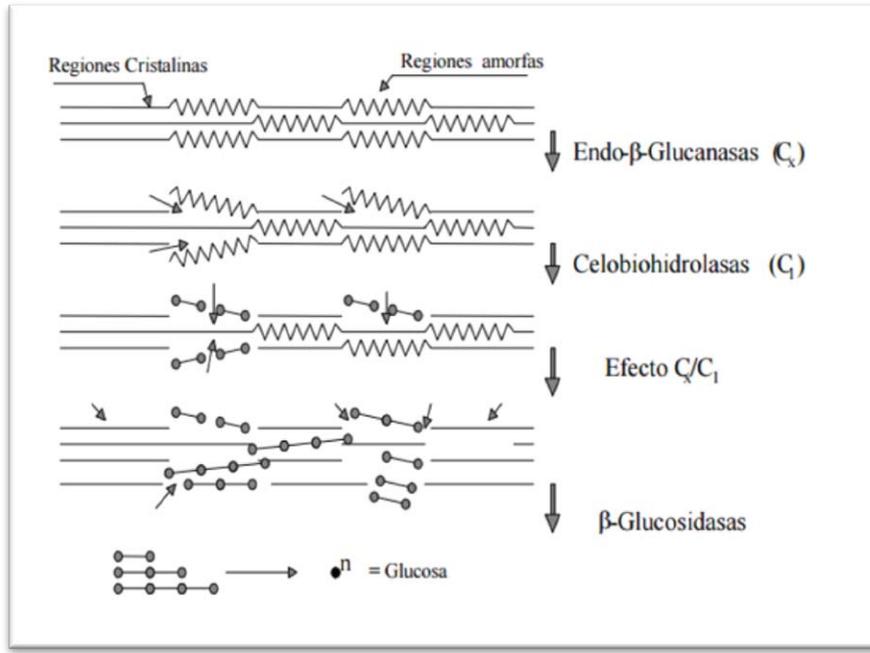


Figura 8. Mecanismo de Hidrólisis enzimática de la celulosa

La hidrólisis enzimática de la celulosa es complicada, tiene ciertas desventajas para lograr una eficiente sacarificación:

- Se sabe que las celulasas son catalogadas como enzimas catalíticamente inferiores a otras glucosidasas, el efecto es mayor cuando el sustrato es celulosa cristalina, la actividad catalítica aumenta si se encuentran las enzimas con zonas amorfas o más accesibles.
- Ocurre un rápido decaimiento de la hidrólisis cuando la celulasa entra en contacto con la celulosa, modelos cinéticos demuestran que los enlaces β -glucosídicos que son accesibles a las celulasas se van acabando conforme avanza la hidrólisis, por lo tanto es menor y se alenta la reacción.⁽⁴¹⁾

1.6.2 Hemicelulasas

En la tabla 1.4 se tiene las clases de hemicelulasas que existen, sus sitios de acción y sus productos.

Tabla 4. Hemicelulasas, sitios de acción y productos. (Adaptado de Mousdale, 2010)

Hemicelulosa	Número EC	Sitios de acción	Productos
Endo- β -1,4-xilanasas	3.2.1.8	Enlaces internos β -1,4 en xilanos, L-arabino-D-xilanos	Xilosa, xilobiosa, oligómerosxilanos
Exo- β -1,4-xilosidasas	3.2.1.37	Enlaces externos en oligómeros de xilanos	Xilosa
Endoarabinanasa	3.2.1.99	Enlaces internos α -1,5 y/o α -1,3 en arabinanos	Arabinosa
α -L-Arabinofuranosidasas	3.2.1.55	Cadenas laterales α -1,2 y/o enlaces α -1,3 en xiloarabinanos y enlaces externos α -1,5 en arabinanos	Arabinosa y oligómerosxilanos
Endo- β -1,4-mananasas	3.2.1.78	Enlaces internos β -1,4 en mananos, galatomananos y glucomananos	Manosa, oligómeros de mananos
Exo- β -1,4-manosidasas	3.2.1.25	Enlaces externos β -1,4 en oligómeros de mananos	Manosa
Endo- β -1,4-galactanasas	3.2.1.89	Enlaces internos β -1,4 en galactanos y arabinogalactanos	Galactosa, oligómerosgalactanos
α -galactosidasas	3.2.1.25	Cadenas laterales α -1,6 en oligómerosgalactomananos	Galactosa, oligómerosmananos
β -glucosidasas	3.2.1.21	Enlaces externos β -1,4 en oligómerosglucomananos	Glucosa, oligómerosmananos
α -glucuronidasas	3.2.1.139	Cadenas laterales 4-O-metil- α -1,2 en glucuronoxilanos	Galactosa, oligómerosmananos
Acetil esterasa	3.2.1.6	Grupos 2- o 3-Oacetilmananos y xilosa	Ácido acético, manosa, xilosa
Arilesterasa	3.2.1.2	Cadenas laterales 3-O-feruol/coumaril- α -L-arabinofuranosa	Ácidos ferúlico, coumárico, arabinoxilanos

Las estructuras de la hemicelulosa pueden ser lineales o ramificadas con una base de residuos de xilosa o polixilanos en angiospermas, en gimnospermas la estructura básica son residuos de glucomananos de D-manosa y D-glucosa. Para hidrolizarla actúan las endoxilanasas que fragmentan xilanos, las xilosidasas liberan xilosa de estos. Remueven las cadenas laterales las glucuronidasas, arabinofuranosidasas y acetilesterasas.

El principal producto de la hidrólisis es la D-glucosa, la cual tiene muchas posibilidades de uso como:

- Si se refina, se destina a la industria alimentaria
- Por isomerización se puede transformar en fructosa, un potente edulcorante
- Se puede usar como sustrato para procesos fermentativos que generan etanol, biomasa microbiana, biopolímeros, antibióticos, L-aminoácidos, acetona, butanol, ácido cítrico, etcétera.

1.7 Fermentación:

La palabra fermentación la pronunció por primera vez Louis Pasteur (1822-1895), como “vida sin aire”, refiriéndose a las células de levaduras, sobre como alteraban sus funciones respiratorias cuando el aire era limitado (más preciso, oxígeno, O₂). Estas células utilizan a la glucosa como una fuente de carbón orgánico para generar energía, parte de esta se transforma por reacciones bioquímicas, dentro de la célula, en sustancias para nuevas células (división celular), pero cuando el oxígeno es insuficiente pueden producir combinaciones de alcoholes (etanol, butanol, glicerol), ácidos (fórmico, láctico, acético). Esta fermentación siempre va acompañada de la formación de CO₂⁽³⁵⁾. La ecuación química que representa este proceso es la siguiente:



Entonces es una vía natural, biológica para transformar los azúcares producidos vía hidrólisis enzimática en biocombustibles como etanol, en este caso. Las fuentes más importantes de azúcares en la industria del etanol son el almidón y la celulosa.

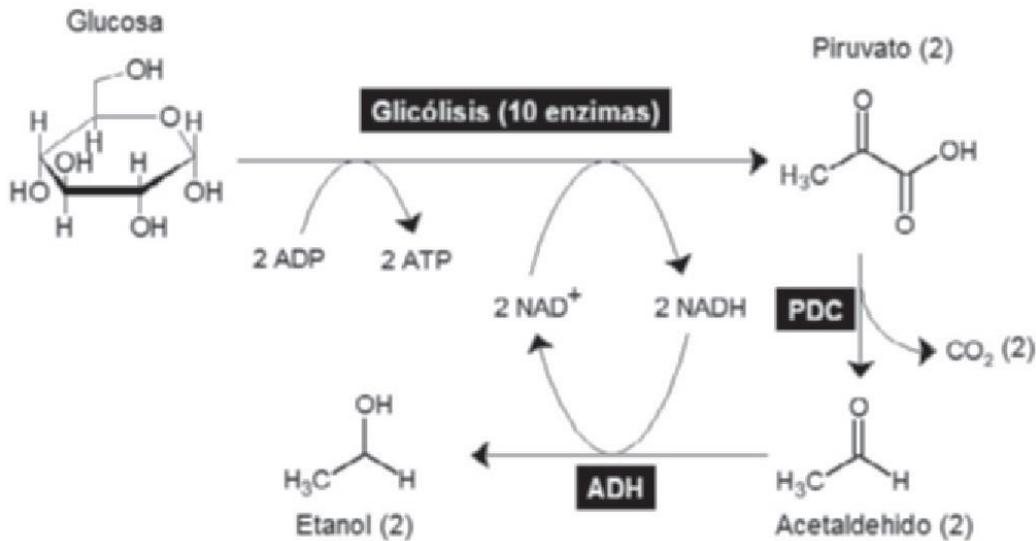


Figura 9. Rutas metabólicas de la glucólisis y fermentación por las cuales *Saccharomyces cerevisiae* sintetiza etanol.

Mediante una ruta bioquímica de 10 reacciones enzimáticas diferentes conocida como la glicólisis, una molécula de glucosa se oxida para producir dos moléculas de piruvato. En el proceso, también se sintetizan dos moléculas de Adenosin Trifosfato (ATP) a partir de Adenosin Difosfato (ADP) y dos de Dinucleótido de Adenina y Nicotinamida reducido (NADH) a partir de NAD^+ también llamado NAD oxidado.

El ATP es una molécula de alta energía que se utiliza en la célula para transportar la energía extraída de la glucosa, y el NADH es un acarreador de electrones. Para que la glicólisis continúe funcionando, el NAD^+ necesita ser regenerado a partir de NADH; esto se logra gracias a la fermentación. La fermentación consiste en la conversión de piruvato en etanol gracias a la catálisis de las enzimas piruvato descarboxilasa (PDC) y de la alcohol deshidrogenasa (ADH). Así, se puede considerar que el etanol es el residuo metabólico de la extracción de energía de la glucosa.⁽⁷⁴⁾

Esta etapa del proceso requiere el uso de microorganismos etanologénicos que deben tener tres rasgos esenciales⁽³⁵⁾:

1. Alto rendimiento
2. Alta tolerancia al etanol
3. Rango amplio de sustratos que pueda utilizar

Existe una suficiente variedad de microorganismos que sirven para ello, en este trabajo se utilizó la levadura más común *Saccharomyces cerevisiae*, catalogada como GRAS, es decir un aditivo seguro para su uso en la industria alimentaria. Utiliza la vía Embden-Meyerhof en condiciones anaerobias, para generar etanol. Con ayuda de un medio favorable, con una suplementación de fuente de Nitrógeno, con control de temperatura (alrededor de 30 °C).

Es un microorganismo adecuado puesto que puede generar un gran rendimiento de etanol (12.0 -17.0 % m/v) proveniente de hexosas. Además que resiste una alta presión osmótica así como bajos niveles de pH, de 4 a 5.5.

En un estado completamente fermentativo, donde ni una molécula de glucosa es utilizada para la respiración aerobia y no hay formación de productos secundarios, 51.1 g de etanol se producen por cada 100 g de glucosa, es decir 0.51 g de etanol por g de glucosa. Cualquier crecimiento de células o formación de otros productos, como glicerol, reducirá la eficiencia de esta teórica máxima conversión.⁽⁴²⁾

El sistema de fermentación que se llevó a cabo se conoce como fermentación sumergida, es la forma de cultivar microorganismos en un medio líquido que contiene la fuente de carbón y nutrientes solubles, sin una agitación requerida. Permite que la interacción de las levaduras con los nutrientes sea uniforme para que funcionen bien, es fácil de mantener y controlar las condiciones como temperatura y pH, el control de la temperatura es favorecido por la alta conductividad del calor en el medio.⁽⁴³⁾

Estos azúcares liberados de los polisacáridos provenientes de los materiales lignocelulósicos, se pueden convertir vía fermentación en muchos productos de interés como, ácidos orgánicos, etanol, glicerol, aditivos alimentarios, butanol, etcétera.

Para lograr una bioconversión de los azúcares liberados, como hexosas y pentosas, se prefiere tener un microorganismo que sea capaz de consumir y convertir ambos tipos de carbohidratos.

La conversión de la lignocelulosa, en mayor proporción de la celulosa, se realiza con el fin principal de obtener bioetanol, pero se pueden obtener otros productos como biohidrógeno, H₂; biogás que es rico en H₂ y CH₄; también se fermenta para obtener ácidos orgánicos como el láctico, cítrico, acético; inclusive se logra la producción de carotenoides (pigmentos naturales utilizado como aditivo en la industria alimentaria) como la astaxantina. Esta variedad de conversiones se logra gracias a los diferentes metabolismos de las distintas levaduras y bacterias que se utilizan para cada una de estas fermentaciones.⁽⁴³⁾

En general se tienen objetivos dirigidos a la mejora ambiental y el aprovechamiento de estos recursos masivos que con ayuda de la tecnología se convierten en productos de valor agregado.

Los principales objetivos para el desarrollo de la bioenergía en México son ⁽²³⁾:

- Mitigar los cambios climáticos
- Mejorar el medio ambiente
- Aumentar la seguridad energética
- Promover el desarrollo rural
- Fomentar el desarrollo tecnológico

II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Hipótesis:

Al modificar las condiciones y los parámetros fisicoquímicos en la hidrólisis enzimática de diferentes materiales lignocelulósicos se obtiene un mayor rendimiento de azúcares reductores que son de interés para la industria alimenticia y energética.

La conversión de estos azúcares reductores obtenidos, glucosa principalmente, a bioetanol se logra mediante una Fermentación controlada.

Objetivos:

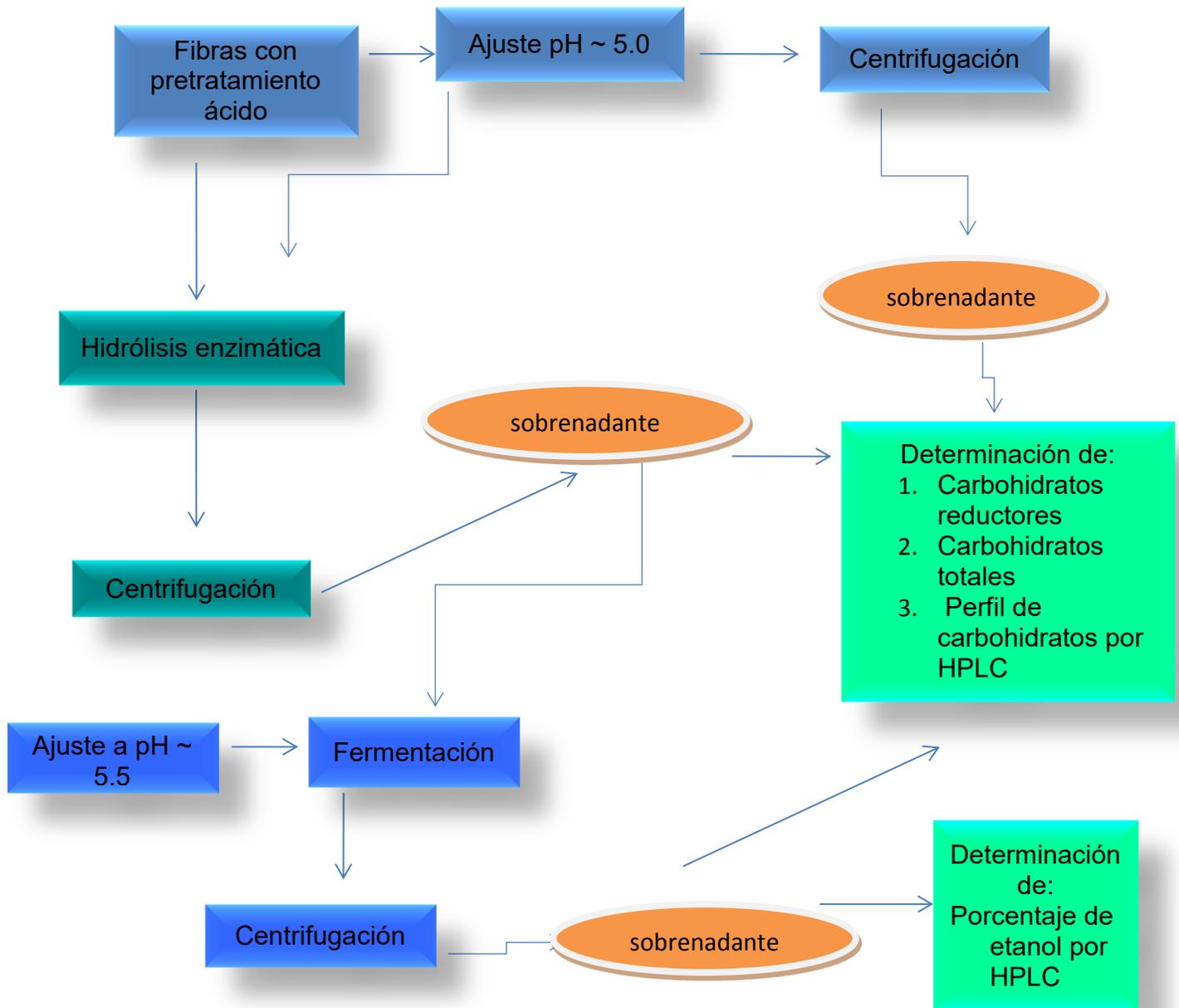
Objetivo General

- Evaluar el efecto de los materiales lignocelulósicos Bagazo de Agave, Aserrín, Bagazo de Caña de Azúcar y Olote sobre el rendimiento de azúcares reductores, como glucosa y pentosas (xilosa y arabinosa), obtenidos durante la hidrólisis enzimática.

Objetivos Particulares:

- Evaluar la actividad enzimática de distintas mezclas de enzimas comerciales para conocer su efectividad en el proceso de la hidrólisis enzimática de distintos materiales lignocelulosicos.
- Conocer el efecto de dos tipos de buffer en la hidrólisis enzimática.
- Modificar la concentración de enzima utilizada en la sacarificación para lograr un mayor rendimiento en los azúcares reductores.
- Determinar cuál de los cuatro materiales es el menos recalcitrante, es decir el más redituable.
- Fermentar la glucosa obtenida de la hidrólisis enzimática para obtener bioetanol, un producto de interés bioenergético.

III. METODOLOGÍA



3.1 Diagrama de flujo del procedimiento general

3.1 Caracterización de las fibras con un pretratamiento ácido

1) A las muestras tratadas previamente con un proceso ácido se les determinó carbohidratos reductores por el método del ácido dinitrosalicílico (DNS) (Miller, 1959).

El sobrenadante del pretratamiento ácido diluido se diluye a una concentración entre 0.2 – 2 mg/mL. Se compara con el carbohidrato de interés, en este caso la glucosa. Una vez realizada la dilución se sigue el método de Miller, se obtiene una absorbancia en un espectrofotómetro Perkin Elmer UV/Vis Lambda 3B a 540 nm frente a un blanco manipulado de la misma manera que las muestras.

En disolución alcalina el azúcar se hidroliza produciendo un compuesto que se reduce a un grupo nitro del DNS, para el producto mono amino correspondiente, esta reacción produce una ozazona colorida que se cuantifica espectrofotométricamente a una longitud de onda de 540 nm (Nielsen, 2003).

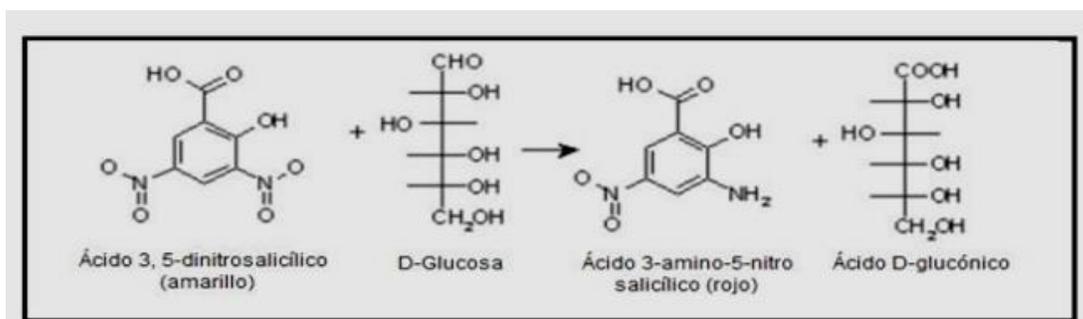


Figura 10. Esquema de la reacción con DNS y moléculas que participan . (Vázquez,2012)

2) Se determinó los carbohidratos totales por el método del Fenol-Sulfúrico (Dubois et al, 1956).

Al sobrenadante del pretratamiento ácido diluido se le hace una dilución entre 10-100 µg de glucosa/ mL. Se lleva a cabo la metodología descrita por Dubois et al, y se obtiene la absorbancia medida en un espectrofotómetro Perkin Elmer UV/Vis Lambda 3B a 490 nm frente a un blanco manipulado de la misma manera que las muestras.

El fundamento de esta metodología se basa en la sensibilidad de los carbohidratos hacia los ácidos fuertes y a las altas temperaturas, se llevan a cabo reacciones complejas en estas condiciones:

- Primero una deshidratación simple

- Se continúa el calentamiento se da una catálisis ácida, donde se producen derivados del furano que se condensan entre ellos y con otros subproductos que generan compuestos coloridos producto de la condensación de compuestos fenólicos y con heterociclos con el nitrógeno como heteroátomo, la condensación más común es con fenol. (Nielsen, 2003).

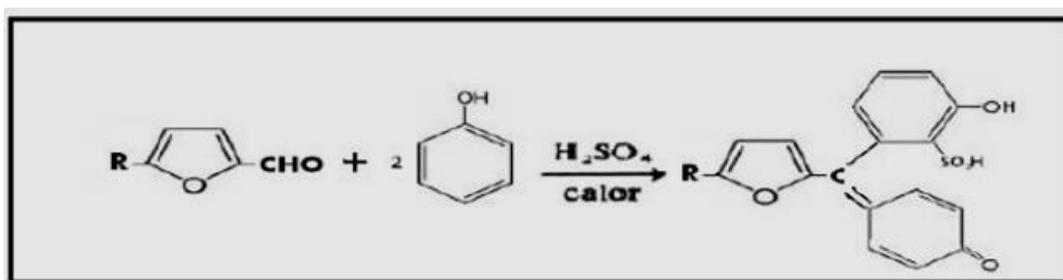


Figura 11. Esquema de la reacción global del método Fenol-Sulfúrico (Caballero, 2010).

3) Se calculó la concentración de glucosa y pentosas mediante HPLC (Cromatografía Líquida de Alta Resolución) con una Bomba Beckman, System Gold Programmable Solvent Module 126. Detector de Índice de refracción (IR) Perkin Elmer Modelo LC-30. Horno Knauer. Columna Unison Almkta, UKAmino, 250 x 4.6 mm, 3 μ m.

Para analizar las muestras durante todo el proceso, se utilizó una técnica de extracción en fase sólida, con los cartuchos Oasis WCX 1cc Cartridge 30 mg 30 μ m, Sep-PAK marca Waters. Permitiendo que los azúcares de interés se separen de los demás compuestos dañinos para la columna de separación, como las proteínas, es decir enzimas.

Tabla 5. Parámetros para determinar carbohidratos por HPLC

Fase móvil	Acetonitrilo: Agua, en proporción 75:25 respectivamente
Flujo	1.4 mL/minuto
Temperatura	40 °C

3.2 Evaluación de la actividad enzimática

Se evaluaron 4 tipos de enzimas diferentes para conocer con cual se tendría una mayor hidrólisis de las fibras. Mediante el método del ensayo del Papel filtro. (Ghose, 1987)

Tabla 6. Nombre comercial, proporciones y actividades de las enzimas que se utilizaron.

Nombre comercial de enzimas	Proporciones de la mezcla	Actividad de la mezcla
Acellerasa y Celic	3:2	Celulasa, xilanasas
Celuzyme XB, Zymafilt L-130 y β -glucanasa	2:1:1	Celulasa, hemicelulasa y β -glucanasa
Celuzyme XB y Zymafilt L-300	1.5:0.5	Celulasa, xilanasas y β -glucanasa
Celuzyme en polvo	0.5%	Celulasa, hemicelulasa y β -glucanasa

3.3 Hidrólisis enzimática

Se realizó de dos maneras:

1. En una incubadora Boekel scientific CAN/CSAC22.2 con control de temperatura y agitación.
2. En un reactor RX720 con control de temperatura y agitación

Tabla 7. Especificaciones para la hidrólisis enzimática:

Método	Temperatura (°C)	Agitación (rpm)	Tiempo (horas)
Incubadora	50	110	24
Reactor	50	600	24

Las enzimas que se eligieron fueron de la marca Enmex, con el nombre comercial de Celuzyme XB y Zymafilt L-300, obtenidas de la fermentación controlada de *Trichoderma longibrachiatum*, debido a que en la evaluación enzimática se obtuvo el mayor número de FPU.

3.4 Optimización de condiciones de Hidrólisis

Se modificaron ciertos parámetros para conocer sus efectos en la hidrólisis:

3.4.1 Efecto del buffer

Se utilizaron dos buffers:

- Buffer de acetatos 200 mM (acetato de sodio), pH 5.
- Buffer de fosfatos 50 mM (fosfato de potasio), pH 5.

3.4.2 Efecto de la concentración de enzima:

Se utilizaron concentraciones diferentes de la misma mezcla de enzimas para conocer su efecto en el rendimiento de carbohidratos fermentables.

- 0.05 mL/g
- 0.1 mL/g
- 0.2 mL/g

3.5 Fermentación

Se fermentó el sobrenadante de la hidrólisis enzimática.

Tabla 8. Especificaciones para el inóculo de levadura

Medio de cultivo	YPD (0.2 % de glucosa y 1% extracto de levadura)
Levadura	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Thermosacc®</i>
Preparación del inóculo	9.6 mg de levadura en 5 mL de medio de cultivo, incubado por 18 horas con un agitación de 150 rpm.

Tabla 9. Condiciones para llevar a cabo la fermentación

Porcentaje de inóculo	5 %
Temperatura	30°C (sin agitación)
Tiempo	70 horas

1) Al sobrenadante se le determinó carbohidratos reductores por el método del ácido dinitrosalicílico (DNS) (James, 1999).

2) Se determinó los carbohidratos totales por el método del Fenol-Sulfúrico (Dubois et al, 1956).

3) Se calculó la concentración de glucosa y pentosas mediante HPLC (Cromatografía Líquida de Alta Resolución). Con una Bomba Beckman, System Gold Programmable Solvent Module 126. Detector de Índice de refracción (IR) Perkin Elmer Modelo LC-30. Horno Knauer. Columna Unison Almkta, UKAmino, 250 x 4.6 mm, 3 µm.

4) Se calculó la concentración de Etanol mediante HPLC (Cromatografía Líquida de Alta Resolución). Con una Bomba Beckman, System Gold Programmable Solvent Module 126. Detector de Índice de refracción (IR) Perkin Elmer Modelo LC-30. Columna Biorad: HPLC Organic Acid Analyses, Aminex HPX-87H, ion exclusión column, 300 mm x 7.8 mm.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Análisis de Azúcares contenidos en las muestras recibidas con un Pretratamiento ácido diluido.

Los bagazos de los cuatro materiales lignocelulósicos se recibieron con un pretratamiento ácido, se determinaron los azúcares reductores y totales antes de la hidrólisis, por medios espectrofotométricos, y el porcentaje de glucosa y pentosas por HPLC. La eficacia de este pretratamiento radica en que se ha hidrolizado parcialmente la celulosa y hemicelulosa en conjunto, lo que facilita la hidrólisis.

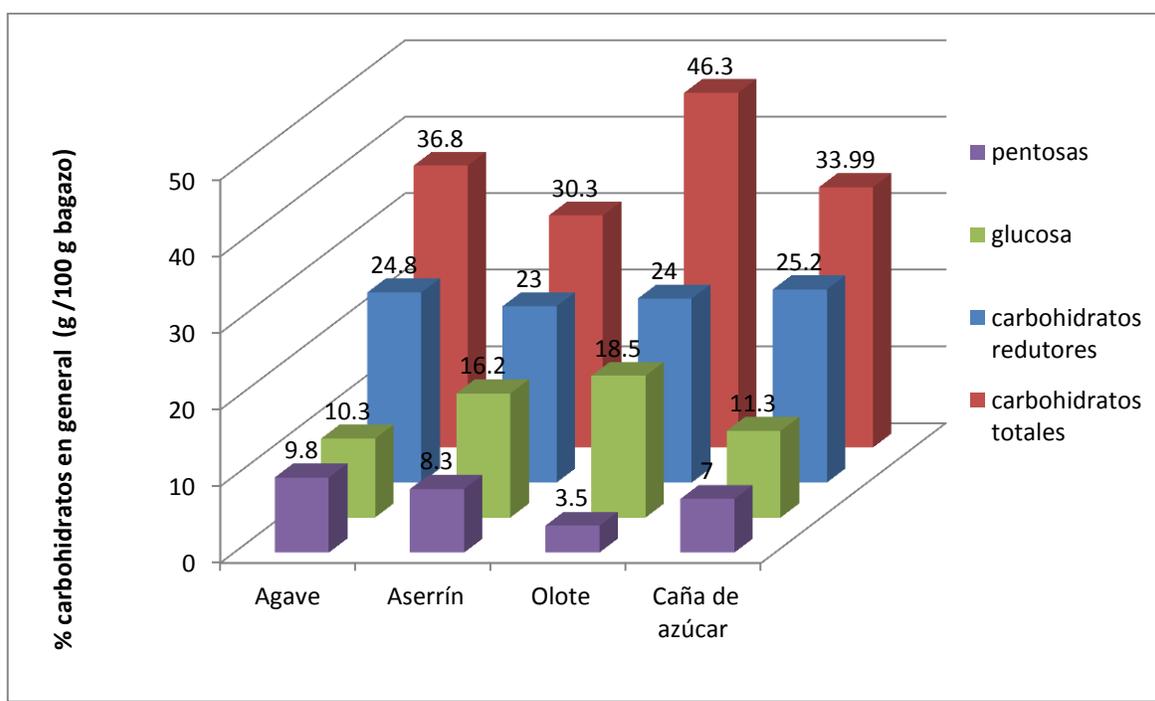


Figura 12. Concentración de carbohidratos reductores y totales, así como de glucosa y pentosas, obtenidos de las muestras de los 4 materiales lignocelulósicos con pretratamiento ácido diluido, (g / 100 g de bagazo).

En la Figura 12 se muestran los resultados obtenidos de los azúcares cuantificados, donde se obtuvo alrededor de un 30 a 46 % de los carbohidratos totales existentes en los cuatro tipos de bagazos. Se observa que el pretratamiento ácido es útil para convertir alrededor de un 25 % de las fibras en

carbohidratos reductores, los cuales fueron de principal interés en este trabajo. Pero esta evaluación todavía no es representativa debido a que permanece el bagazo residual no hidrolizado, donde los azúcares de interés siguen siendo insolubles, pues no se han hidrolizado de la celulosa y hemicelulosa remanentes como polímeros.

4.2 Evaluación de la actividad enzimática

Se determinó usando la metodología descrita por Ghose, 1987, para celulasas, obteniendo unidades FPU (Unidades de Papel Filtro) para cada mezcla de enzimas. Esta unidad se define en términos de la cantidad necesaria de enzima para formar 0.10 mg de glucosa en un minuto, medida como azúcares reductores, usando como sustrato una tira de papel filtro Whatman No.1, en determinadas condiciones (pH = 4.8, buffer de citrato de sodio 0.05 M, 50°C). Es una medida de las actividades combinadas de los tres tipos de enzima en el sustrato.⁽⁶⁴⁾

Tabla 10. Actividad enzimática medida como Unidades de Papel Filtro , de distintas mezclas de enzimas

Enzima	FPU (Unidades de Papel Filtro)
1.Celic y acellerasa (3:2)	11.4
2. Enmex, mezcla Celuzyme XB + Zymafilt L-300 + beta glucanasa (2:1:1)	4.93
3. Enmex, mezcla Celuzyme XB+ Zymafilt L-300 (1.5:0.5)	28.9
4. Celuzyme en polvo	1.98

La mezcla con la actividad enzimática más alta, fue la de Enmex, mezcla Celuzyme XB+ Zymafilt L-300, porque tiene 28.9 FPU, lo que significa que al tener una mayor cantidad de unidades de papel filtro hidrolizadas por ml de enzima se sugiere que tiene una conversión mayor de la fibra, permite una hidrólisis simultánea de los componentes hidrolizables de las fibras (celulosa y hemicelulosa) en una mayor proporción. Además de que la mezcla tiene tres actividades específicas de celulasa, hemicelulasa y beta-glucanasa, cuya

combinación tiene mayor potencial para hidrolizar el material lignocelulósico, en comparación a las otras mezclas pues no todas tienen las 3 actividades.

4.3 Optimización de condiciones de Hidrólisis

Al no obtener los resultados esperados, es decir un alto rendimiento de azúcares, se buscó modificar las condiciones de la hidrólisis enzimática para mejorar y optimizar el proceso así como la obtención de una mayor cantidad de monosacáridos fermentables como la glucosa y de las pentosas arabinosa y xilosa.

4.3.1 Efecto del buffer

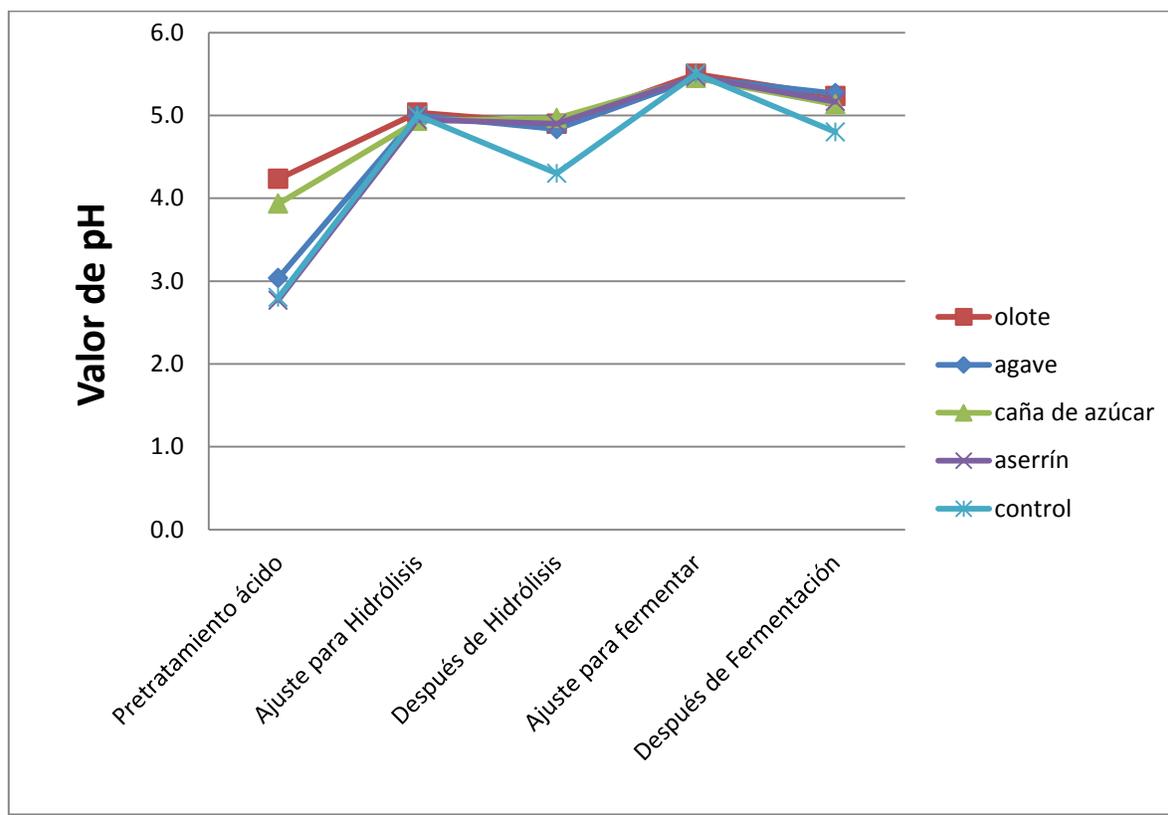


Figura 13. Variación del pH en cada paso del proceso, con los 4 materiales lignocelulósicos. Condiciones: buffer fosfatos 50mM, 0.25 mL de buffer / g de material. Control: se ajustó el pH con hidróxido de Sodio 0.5 M}

Tabla 11. Valores de pH en cada paso del proceso, con los 4 materiales lignocelulósicos.

Muestra	Pretratamiento ácido	Ajuste para hidrólisis	Después de hidrólisis	Ajuste para fermentar	Después de la fermentación
Olote	4.2	5.0	4.9	5.5	5.2
Agave	3.0	5.0	4.8	5.5	5.3
Caña de azúcar	3.9	4.9	5.0	5.5	5.1
Aserrín	2.8	5.0	4.9	5.5	5.2
Control	2.8	5.0	4.3	5.5	4.8

Se realizó una prueba de la hidrólisis enzimática sin adición del buffer, el tratamiento control. En la figura 13 se observa que en el tratamiento Control, donde no se añadió buffer para llevar a cabo la hidrólisis enzimática, solamente se ajustó el pH con ayuda de un potenciómetro y se utilizó NaOH 0.5 M, el pH disminuyó drásticamente en comparación con los tratamientos regulados por el buffer. Y se sabe que el control del pH es crucial para obtener altos rendimientos de azúcares en la hidrólisis enzimática así como altos rendimientos de etanol en la Fermentación. Y al utilizar un buffer el pH se mantuvo en el rango necesario para lograr la hidrólisis enzimática así como la fermentación, por lo tanto se decidió utilizar un buffer y comparar con dos tipos de buffer, el mismo procedimiento:

- Buffer de acetatos 200 mM (acetato de sodio), pH 5. Se escogió este debido a que en las recomendaciones de Enmex es el buffer más útil para que las enzimas trabajen adecuadamente.
- Buffer de fosfatos 50 mM (fosfato de potasio), pH 5. Se encontró en la literatura que este buffer también se utilizaba en hidrólisis enzimáticas de materiales lignocelulósicos, por lo que se decidió probarlo. Como en el artículo de Galindo, 2005⁽¹³⁾, que utilizó buffer fosfatos (sodio) para determinar la actividad enzimática de celulasas.

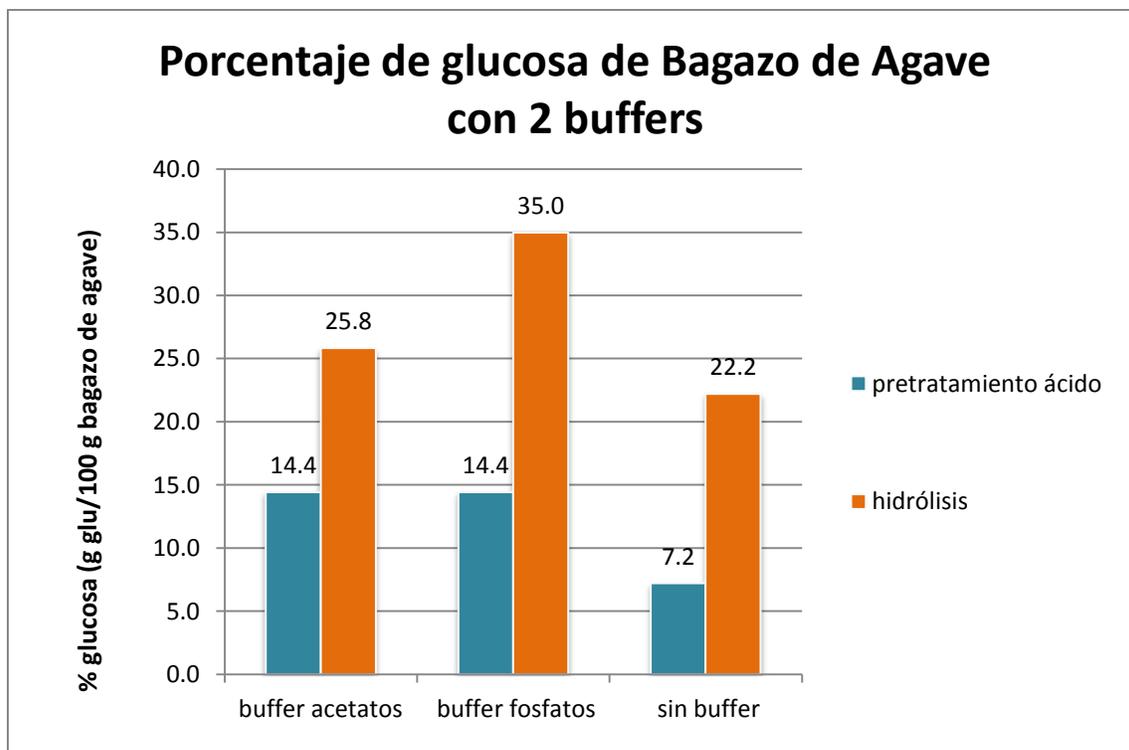


Figura 14. Porcentaje de glucosa obtenido de Bagazo de Agave con 2 tipos de buffer, acetatos 200 mM y fosfatos 50 mM. (0.2 mL de enzima/g de bagazo, 24 h de hidrólisis, 110 rpm).

En el experimento sin buffer, se obtuvo un menor rendimiento de glucosa, demostrando que la reducción del pH desde 5 a 4.3, resulta en una disminución de un 63 % en el rendimiento de la hidrólisis enzimática con buffer fosfatos.

Se determinó por duplicado por medio de HPLC el porcentaje de glucosa del bagazo de agave al tiempo cero, es decir, con pretratamiento ácido y después de la hidrólisis enzimática, con los dos tipos de buffer. En la gráfica se presentan los promedios, observándose que se obtuvo un rendimiento mayor con el buffer fosfatos. Los dos buffer permitieron una hidrólisis adecuada del bagazo, pero fue más eficaz el buffer de fosfatos.

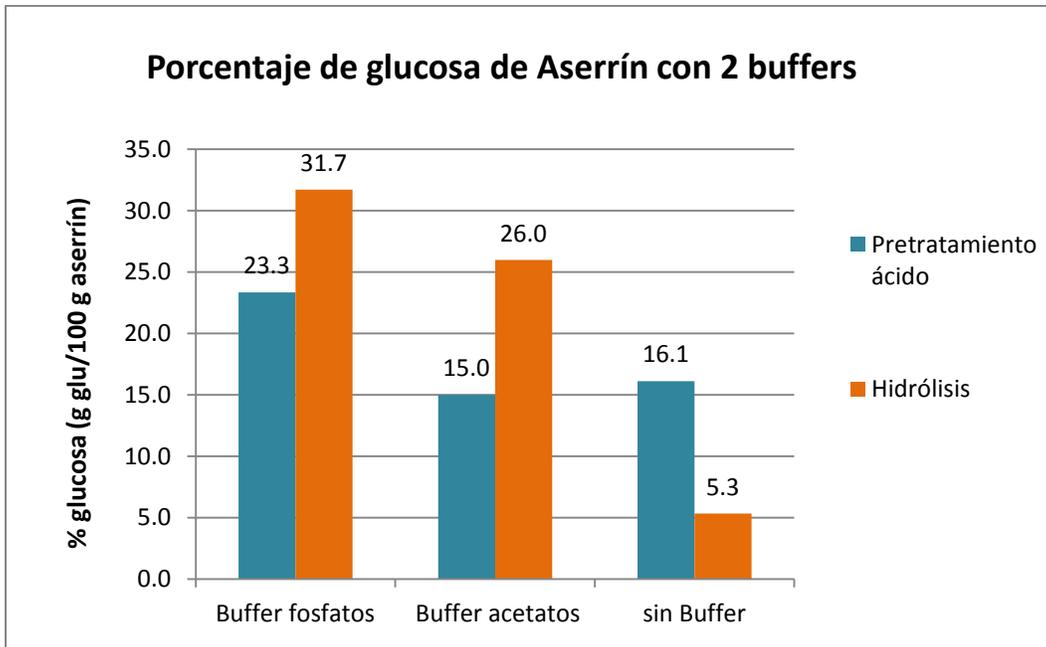


Figura 15. Porcentaje de glucosa obtenido de Aserrín con 2 tipos de buffer, acetatos 200 mM y fosfatos 50 mM. (0.2 mLde enzima/g de bagazo, 24 h de hidrólisis, 110 rpm).

En el caso de la hidrólisis con el aserrín sucedió lo mismo, el mayor contenido de glucosa se obtuvo con el buffer fosfatos y la menor cantidad sin la presencia de un buffer, solamente controlándose el pH del medio.

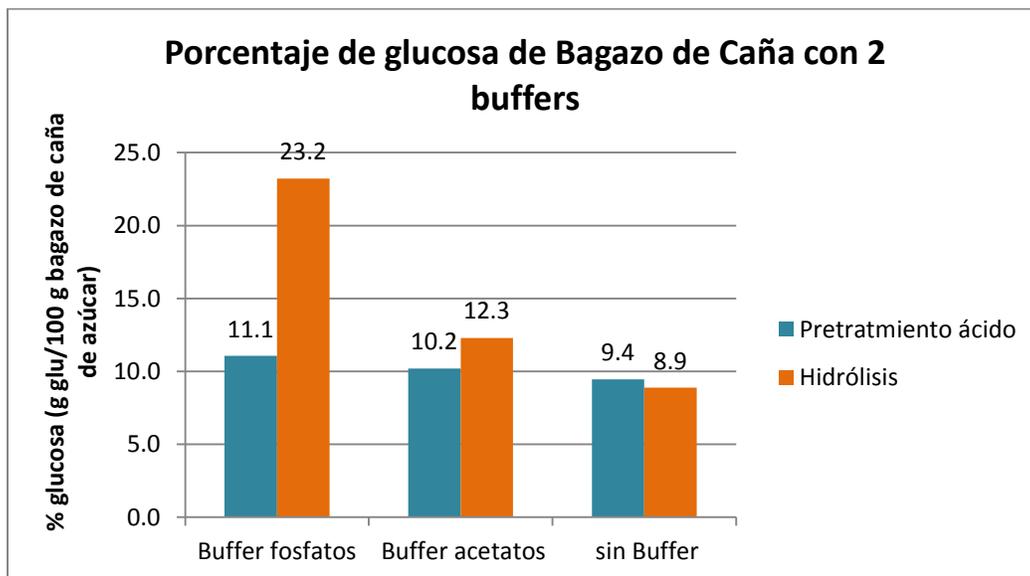


Figura 16. Porcentaje de glucosa obtenido del Bagazo de caña de azúcar con 2 tipos de buffer, acetatos 200 mM y fosfatos 50 mM. (0.2 mLde enzima/g de bagazo, 24 h de hidrólisis, 110 rpm).

Se realizó el mismo procedimiento para el bagazo de caña de azúcar y se obtuvo el mismo patrón, denotando así que la influencia del buffer y su concentración juegan un rol importante al momento de sacarificar estos materiales. Las diferencias en las variables de operación y la naturaleza de sustrato contribuyen a la eficiencia del tratamiento.

Al comparar los tratamientos con o sin buffer, el rendimiento de glucosa y pentosas es mayor cuando está presente el buffer lo que denota una mayor actividad enzimática al tener un medio controlado por un buffer. Debido a la capacidad de regulación del pH por el buffer. Basándose en esta información es necesaria la presencia de un buffer para regular el pH y así mantener la óptima actividad enzimática de las celulasas.

Como la producción industrial se lleva a cabo en reactores donde el pH es controlado, se sugiere que este control podría ser suficiente para tener una buena actividad y productividad de las celulasas, sin embargo en estudios previos donde se ha escalado de laboratorios a reactores con medios sin buffer pero con control de pH no se ha encontrado que esta hipótesis sea certera, de hecho se observó una menor actividad de las celulasas, lo que sugiere que un buffer puede mejorar el rendimiento de las enzimas y este mecanismo de mejoramiento de la producción no solamente se puede explicar por el control del pH.⁽¹⁸⁾

La concentración del ácido sin disociar está en función del pH. La concentración de estos en hidrolizados lignocelulósicos es variable de acuerdo a desviaciones mínimas alrededor de un pH=5.

Para conocer cuál de los dos sería más eficaz en controlar el pH y permitir a las levaduras fermentar los azúcares en el proceso de fermentación, se fermentaron los sobrenadantes ya hidrolizados de esta experimentación.

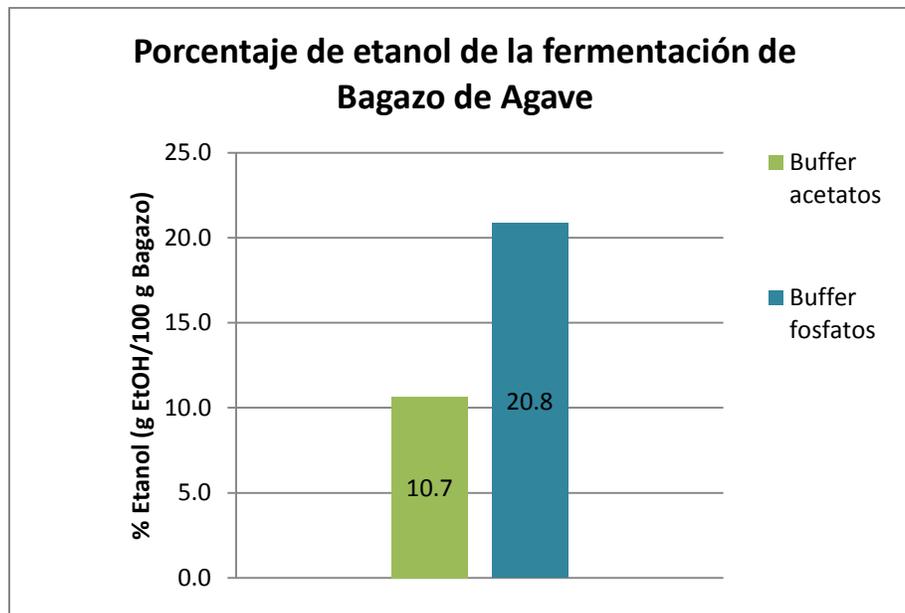


Figura 17. Porcentaje de etanol obtenido de la fermentación de Bagazo de Agave, con buffer de acetatos 200mM y fosfatos 50 mM. (Condiciones: 5 % de inóculo, 1 % de extracto de levadura, 68 h, 30 °C, sin agitación).

Se puede observar en la figura 17 que el rendimiento de etanol con el buffer fosfatos es un 49 % mayor que con el buffer acetatos, así que resulta ser más efectivo, siendo un punto importante del porque se decidió también utilizar el buffer de fosfatos, porque las levaduras se reproducen, rinden mejor con este buffer, y es menos dañino para las células.

Se encontró en la literatura que los ácidos débiles, como el ácido acético utilizado para el buffer de acetatos, inhiben el crecimiento de las células, es por ello que se usan como conservadores de alimentos, al estar sin disociar son liposolubles y se pueden difundir a través de la membrana plasmática de las levaduras, aumentan en el citosol y se comienzan a disociar debido al pH intracelular que es neutro, lo que disminuye el pH del citoplasma y por ende se inhibe la proliferación de las levaduras. Dos mecanismos se han propuesto para explicar el efecto inhibitorio de ácidos débiles⁽⁶⁵⁾:

1.- Desacoplamiento : al entrar el ácido débil a la membrana celular, disminuye el pH intracelular y la ATPasa de la membrana busca neutralizarlos y bombea protones fuera de la célula con ayuda de la Hidrólisis de ATP, pero este debe

seguirse generando para controlar el pH interno, y la capacidad de la bomba de protones se acaba, resultando en una caída del contenido de ATP de la célula, y el citoplasma de la célula se acidifica lo que dificulta la generación de energía y otros procesos celulares.

2.- Acumulación intracelular de aniones: la forma aniónica del ácido es capturada en la célula y la forma no disociada del ácido se difunde a la célula hasta que se alcanza el equilibrio, como la concentración en equilibrio del ácido sin disociar está en función del pH, la acumulación intracelular de aniones está en función del gradiente de pH alrededor de la membrana plasmática, es decir a un pH extracelular bajo, la acumulación intracelular de aniones aumenta en *S. cerevisiae* que intenta mantener su pH intracelular neutro, y deja de ser viable para producir etanol.

Una baja concentración de ácidos débiles (<100 mM) ayuda a mantener el rendimiento de etanol a un pH=5.5, pero el rendimiento disminuye a mayores concentraciones (>200 mM).⁽⁶⁵⁾ Es por esto que el buffer de fosfatos resultó benigno para el funcionamiento de las levaduras, al tener una menor concentración de ácido y sal conjugado (50 mM), permitió que el rendimiento de etanol aumentara. El buffer acetatos (200 mM) con una alta concentración del ácido conjugado tuvo un efecto contraproducente en la producción de etanol en este trabajo. Por lo que se decidió realizar las posteriores experimentaciones con buffer fosfatos a una concentración 50 mM.

4.3.2 Efecto de la concentración de enzima

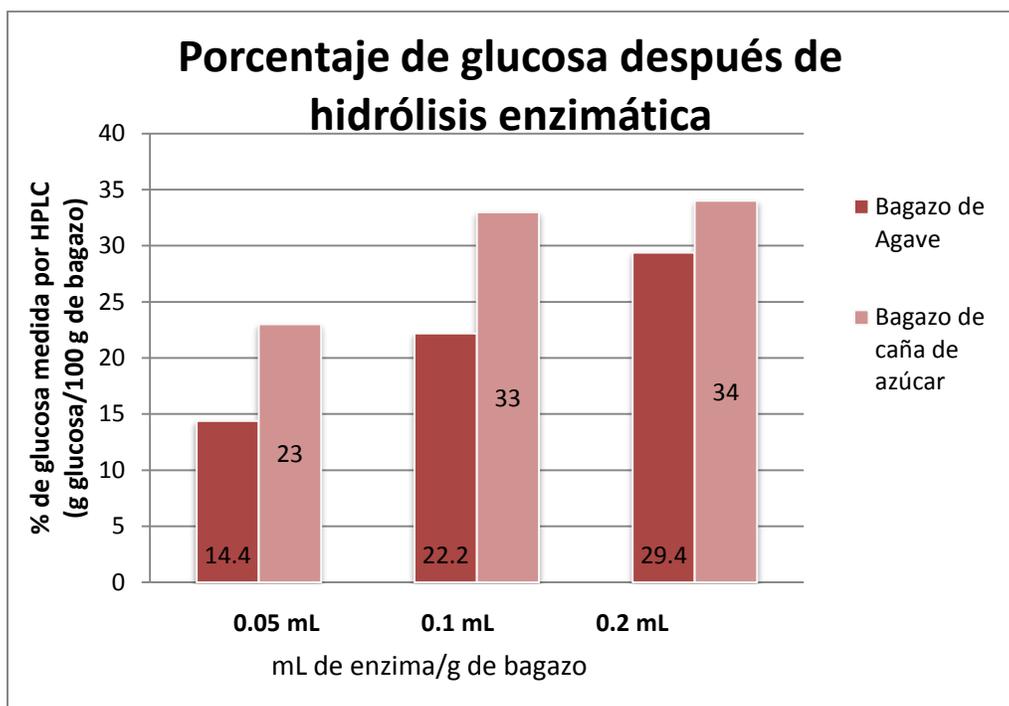


Figura 18. Porcentaje de glucosa, después de la Hidrólisis enzimática, con distintas cantidades de enzima, mezcla de EnmexCeluzyme XB y Zymafilt L-300 con proporciones 1.5:0.5 (0.05 mL, 0.1 mL y 0.2 mL por gramo de bagazo) en bagazo de caña y agave.

En la figura 18 se muestran los rendimientos totales (pretratamiento ácido + hidrólisis enzimática) de glucosa, con los dos tipos de fibra, donde el mayor rendimiento se alcanzó con la dosis de 0.2 mL por g de sustrato, lo que indica que a mayor concentración de enzima hay una mayor interacción con la celulosa y hemicelulosa. Existe una diferencia mayor entre las concentraciones de glucosa obtenidas a cada concentración de enzima para el Agave, en el caso de la caña de azúcar las concentraciones de enzima 0.1 y 0.2 mL/g liberaron alrededor de 34 % de glucosa.

4.4 Hidrólisis enzimática

Después de haberse evaluado los diferentes cocteles enzimáticos, al obtener el mejor resultado con las enzimas Enmex, Celuzyme XB y Zymafilt L-300, con actividades de celulasa, hemicelulasa y β -glucanasa, se llevó a cabo la hidrólisis de los diferentes materiales lignocelulósicos con esta mezcla de enzimas.

Al conocer las óptimas condiciones para una eficaz Hidrólisis Enzimática, se realizó esta con:

- Buffer fosfatos 50 mM, 0.25 mL/g sustrato
- 0.2 mL enzimas, EnmexCeluzyme XB y Zymafilt L-300 / g sustrato

En busca de hidrolizar el 100 % de los cuatro materiales lignocelulósicos, se llevó a cabo la sacarificación; las hidrólisis se realizaron por 24 h, a 50 °C con agitación constante a 110 rpm. Con la adición de 0.5 mL de buffer fosfatos 50 mM/g de muestra pretratada ácidamente.

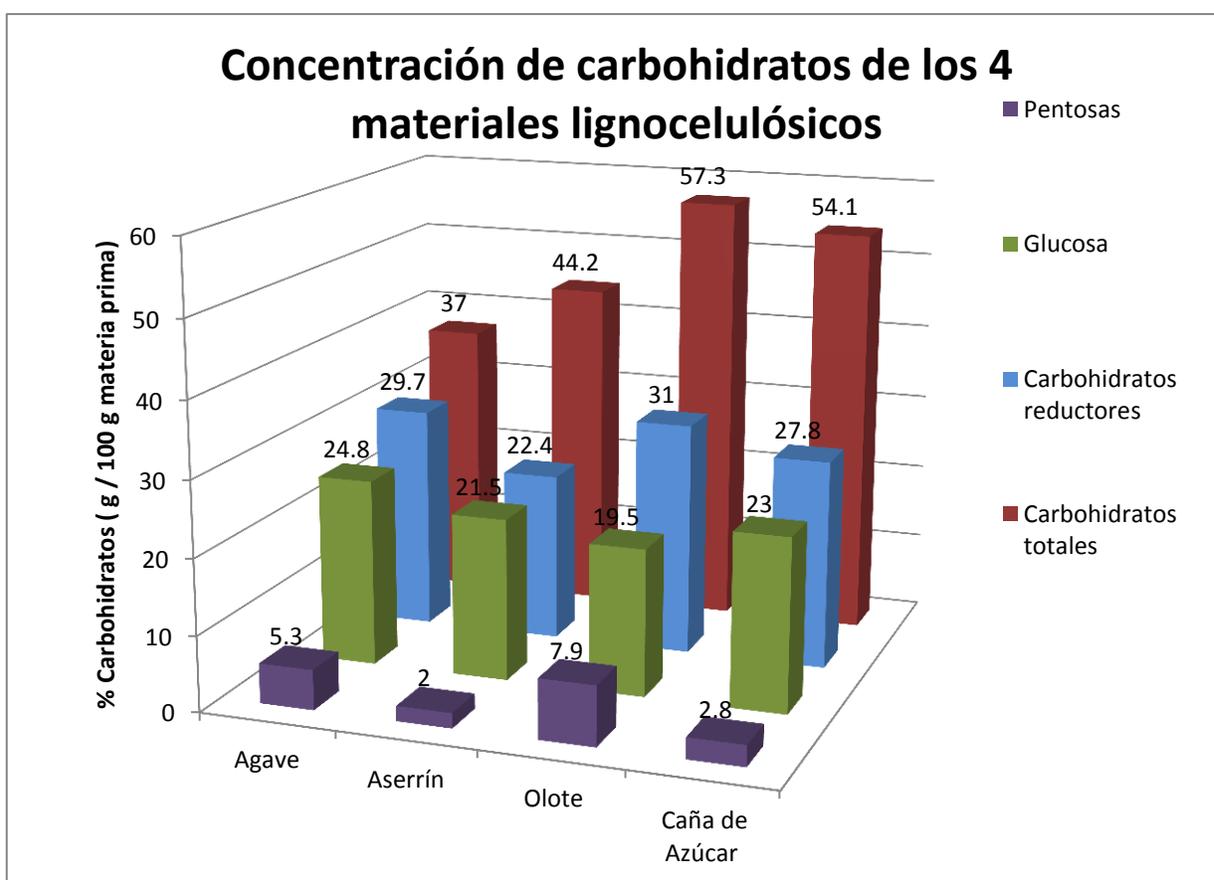


Figura 19. Concentración de carbohidratos reductores y totales, así como de glucosa y pentosas, obtenidos de las muestras de los 4 materiales lignocelulósicos después de la Hidrólisis enzimática, (g / 100 g de bagazo).

En la figura 19 se observa la concentración de los azúcares que se obtuvieron después de la hidrólisis, sin tomar en cuenta los del pretratamiento ácido.

Al comparar las figuras 12 y la 19, es posible observar que en la hidrólisis enzimática se obtiene un mayor rendimiento de azúcares totales para los cuatro materiales, un 0.6 % más para el Agave, un 31.5 % más para el Aserrín, un 19.2% más para el Olote y un 37.2 % más para Caña de Azúcar, lo que es lógico debido a que las enzimas son altamente específicas en el rompimiento de los polisacáridos contenidos en las fibras, mejores que el pretratamiento ácido diluido.

En cuanto a la concentración de azúcares reductores se mantiene similar a la obtenida del pretratamiento ácido, es decir del rendimiento alcanzado en el pretratamiento se obtuvo una cantidad similar al hidrolizar enzimáticamente las fibras.

Para analizar más de cerca el rendimiento de glucosa y pentosas en la hidrólisis se puede observar la figura 20.

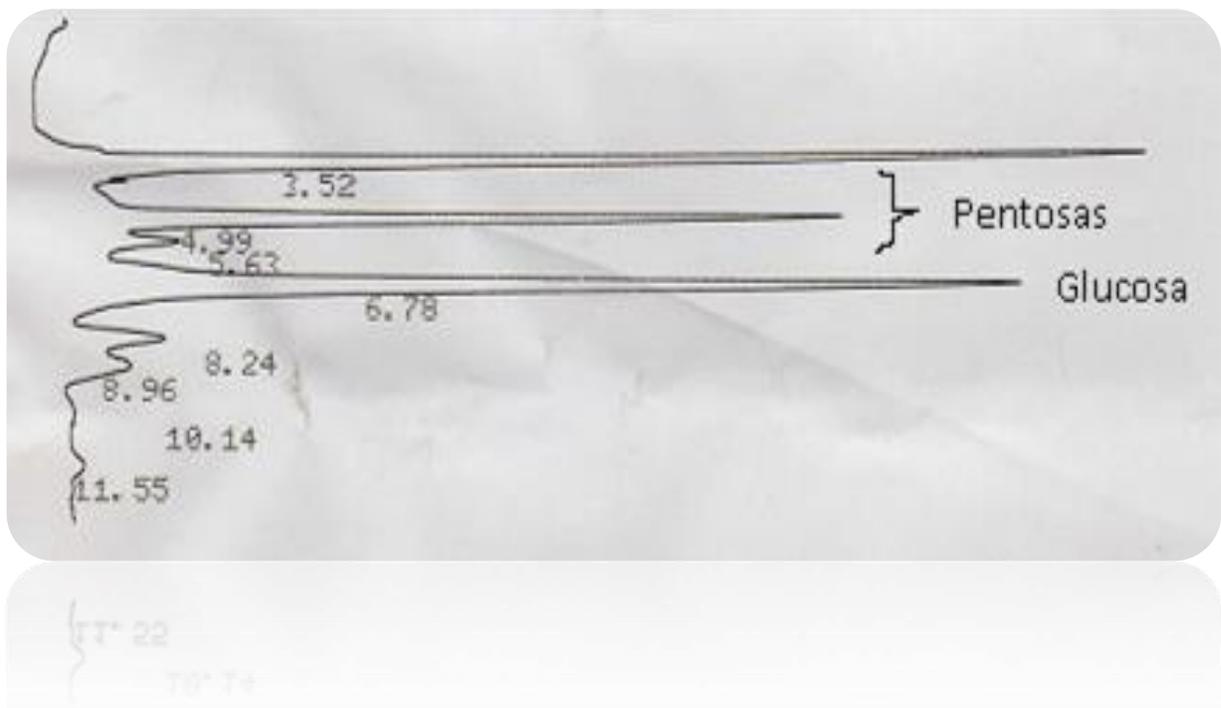


Figura 4.4.1 Cromatograma de Glucosa y Pentosas.

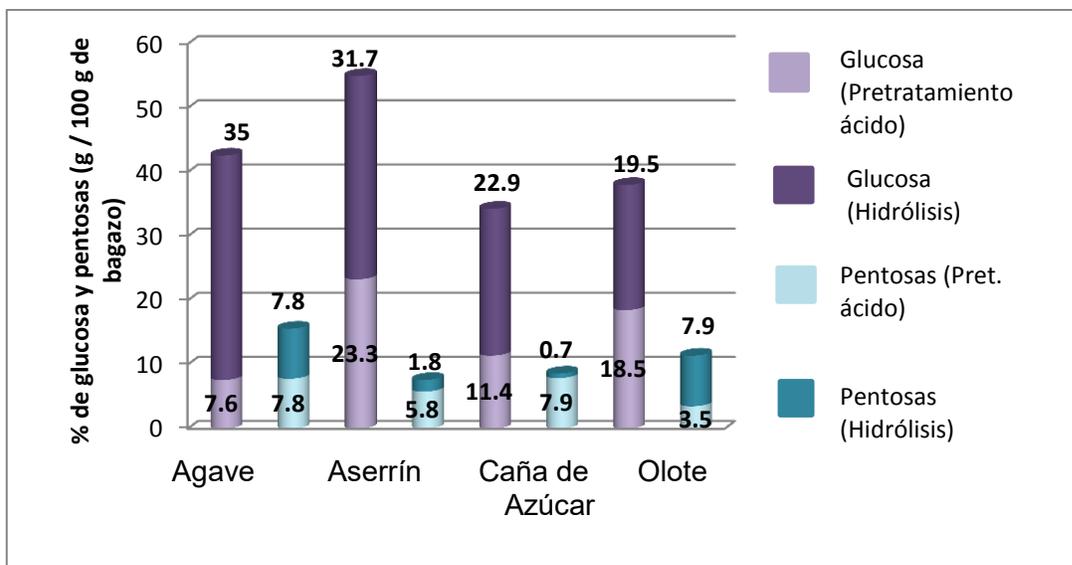


Figura 20. Porcentaje de glucosa y pentosas obtenidos antes y después de hidrolizar las fibras medidos por HPLC.

Condiciones de Hidrólisis: 0.2 mL enzima/g de bagazo, 0.25 mL de buffer fosfatos 50 mM/g de bagazo, pH 5, 110 rpm, 50 °C, 24 h.

Se buscó tener una hidrólisis eficaz de estos materiales, se observa que después de la hidrólisis se obtuvo una mayor liberación de glucosa para las cuatro fibras, pero la mayor liberación de pentosas se obtuvo con el pretratamiento ácido, excepto con el Olote donde se obtuvo mayor concentración de pentosas después de la Hidrólisis. La mayoría de los reportes de la literatura muestran que las pentosas, en mayor medida la xilosa, se liberan en mayor proporción como producto de la Hidrólisis ácida, es decir con el pretratamiento ácido.⁽⁷¹⁾

Para el Agave se obtuvo un 78.3 % de glucosa más que en el pretratamiento, del Aserrín se obtuvo un 26.5 % más de glucosa, para el bagazo de Caña de azúcar un 50.2 % más, para el Olote un 5.2 % más de glucosa.

En el caso de las pentosas el rendimiento para el Agave con el pretratamiento e Hidrólisis fue el mismo, para el Aserrín se obtuvo un 69 % más de pentosas en el pretratamiento, para la caña de azúcar se obtuvo un 91.2 % más de estas en el pretratamiento y para el Olote se obtuvo un 55.7 % más de estas en la hidrólisis.

En total hubo un mejor rendimiento para la glucosa que para las pentosas, debido a que estas fibras tienen un mayor contenido de celulosa que de hemicelulosa,

además que la hemicelulosa también contiene glucosa en sus cadenas, por lo que en suma la glucosa obtenida resulta siempre mayor en estas determinaciones.

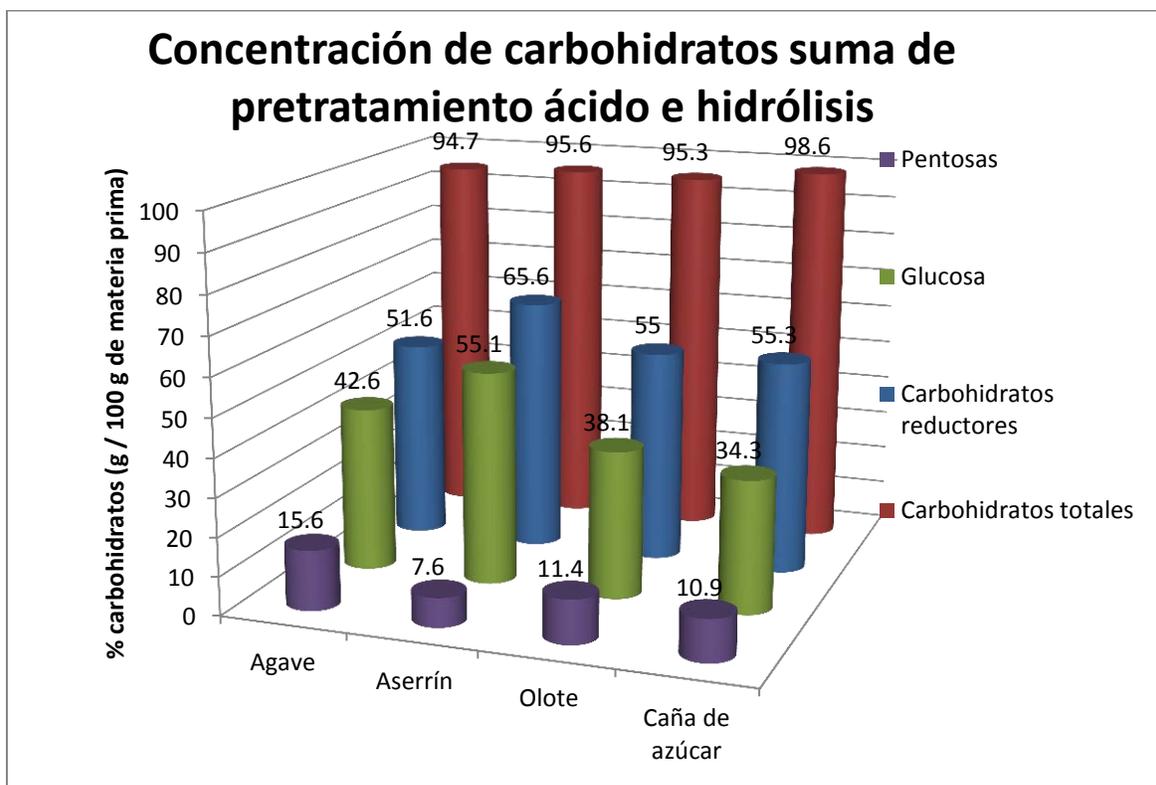


Figura 21. Concentración total, suma del pretratamiento ácido + hidrólisis enzimática, de carbohidratos reductores y totales, así como de glucosa y pentosas, obtenidos de las muestras de los 4 materiales lignocelulósicos (g / 100 g de bagazo).

En la figura 21 se muestra el valor total de los carbohidratos, la suma del rendimiento del pretratamiento más la hidrólisis enzimática. Con el dato de los carbohidratos totales se observa que se alcanzó una hidrólisis mayor al 90 % de los polisacáridos contenidos en las 4 fibras, se obtuvo un porcentaje de carbohidratos reductores mayor al 50 % para las 4 fibras, por lo que se puede asegurar que el complejo enzimático es eficaz para sacarificar estas materias primas.

Para analizar el porcentaje en peso, de glucosa y pentosas obtenidas en todo el proceso se realizó la Tabla 12, comparando el porcentaje de glucosa y pentosas teóricos, de la literatura, con los obtenidos experimentalmente.

Tabla 12. Comparación entre porcentajes obtenidos teóricos y experimentales de glucosa y pentosas.

Materia l	% Glucos a Teórico	% Glucosa Experimenta l	% de diferenci a	% Pentosa s Teórico	% Pentosas Experimenta l	% de diferenci a
Agave	47.2	42.6	9.8	18.5	15.6	15.7
Aserrín	40-55	55.1	0	24-40	7.6	68.4
Caña de Azúcar	40	34.3	14.25	27	8.6	68.2
Olote	45	38.1	15.4	35	11.4	67.4

Al analizar los datos se observa que el rendimiento teórico de glucosa y pentosas es mayor para todas los materiales excepto en el caso del rendimiento de glucosa del aserrín, donde de acuerdo a las determinaciones prácticas se logró obtener el 100 % de rendimiento de glucosa.

Se tuvo una hidrólisis de celulosa más eficiente quede la hemicelulosa, pues se logró obtener más del 85% de glucosa en todos los casos y de pentosas se logró obtener alrededor del 30 %, excepto para el Agave donde se obtuvo el 84 % de pentosas.

Lo que significa que la mezcla enzimática tiene una actividad más eficiente de celulasa que de hemicelulasa, aunque se debe tomar en cuenta que las pentosas calculadas por HPLC son solamente 2, xilosa y arabinosa, y el polisacárido hemicelulosa contiene otras pentosas como manosa, galactosa, ramnosa, etcétera, que se hidrolizaron pero no se cuantificaron, es así que el rendimiento de estas resulta menor.

Aunque esta biomasa lignocelulósica tiene un gran potencial de utilización, posee una estructura recalcitrante, compleja que recae en un obstáculo económico y técnico para hidrolizarla.⁽⁷⁵⁾ Esto se debe a su composición y matriz fisicoquímica propia de cada material, donde la celulosa y hemicelulosa están encapsuladas vía

enlaces de hidrógeno y covalentes a la lignina, lo que además de brindar la estructura compacta también limita el acceso de las enzimas.

Por lo que para obtener una exitosa conversión de estos materiales se requiere de un pretratamiento eficiente, que también se busca consuma menos energía y que produzca la mínima cantidad de compuestos de inhibición, tradicionalmente el ácido diluido es el más usado. Como sea, además de estas complejidades del material, la composición de distintas fuentes lignocelulósicas varía dependiendo su origen y locación geográfica.

Las materias primas ricas en lignina poseen una mayor recalcitrancia y resistencia.⁽³⁸⁾ La exposición de las enzimas, sobre todo las celulasas a la lignina y a los compuestos fenólicos derivados de la lignina están sujetas a efectos adversos, pues tienen una acción inhibitoria en ellas, generando dos efectos:

- Adsorción no productiva
- Limitación de accesibilidad de la celulasas a la celulosa.⁽³⁶⁾

De otros artículos⁽³⁴⁾, se sabe que el Agave es poco recalcitrante, que es más fácil hidrolizarlo, que tiene la capacidad de acumular en sus tejidos, carbohidratos solubles no estructurales, entonces con el bajo contenido de lignina y las reservas de estos carbohidratos, requiere menos energía para convertirse en azúcares de interés⁽⁶⁰⁾; en este trabajo del bagazo de Agave se pudieron extraer fácilmente y obtener altos rendimientos de componentes como glucosa además de azúcares no celulósicos como pentosas, lo cual indica que tiene bajos niveles de resistencia contra la degradación enzimática, obteniendo así un rendimiento de 90 % de glucosa y de 84 % de pentosas.

De acuerdo a los resultados en la tabla 11, fue más complicado lograr una alta conversión de glucosa para el bagazo de caña de azúcar y el Olote, pues alrededor de un 15 % de celulosa permaneció sin hidrolizarse. En el caso de las pentosas para Aserrín, Bagazo de Caña de azúcar y Olote, se obtuvieron bajos rendimientos de estas debido a que la hemicelulosa está estructurada con

pentosas distintas, aunque en menor proporción, no solamente con xilosa y arabinosa.

4.5 Fermentación

Para este paso del proceso global se utilizó a la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, *Thermosacc*®, la cual permitió obtener etanol de los sobrenadantes de las hidrólisis enzimáticas previas.

Se conoce que el pH externo óptimo para un buen funcionamiento de *S. cerevisiae* es 5.0 - 5.5 ⁽⁷⁰⁾, por lo que se llevó a un pH de 5.5 a los sobrenadantes y se fermentaron como se explica en el capítulo de Metodología.

Se necesita una fuente de proteína a la cual las levaduras tengan acceso y puedan funcionar adecuadamente, además se sabe que su crecimiento es rápido en medios que contengan ingredientes complejos que en medios con ingredientes mínimos, pues juegan un papel no nutricional en la promoción del crecimiento y la sobrevivencia de las levaduras, además las protege de los efectos inhibitorios de ácidos orgánicos por ejemplo⁽⁶⁶⁾. En la literatura se sugiere que componentes como extracto de levadura ofrece algún tipo de protección contra condiciones de estrés en la fermentación, lo cual se llevó a cabo en este trabajo, se añadió el 1% de extracto de levadura a la formulación de la fermentación.

Es necesario que exista un control en el pH del medio puesto que un pH bajo en la Fermentación inhibe la proliferación y viabilidad de las células, debido a que el gradiente de protones aumenta en la membrana plasmática, por lo que es crucial mantener un pH neutro intracelular para mantener a las células viables, se encontró que la actividad replicativa de las células disminuye conforme el pH intracelular también disminuye⁽²⁸⁾.

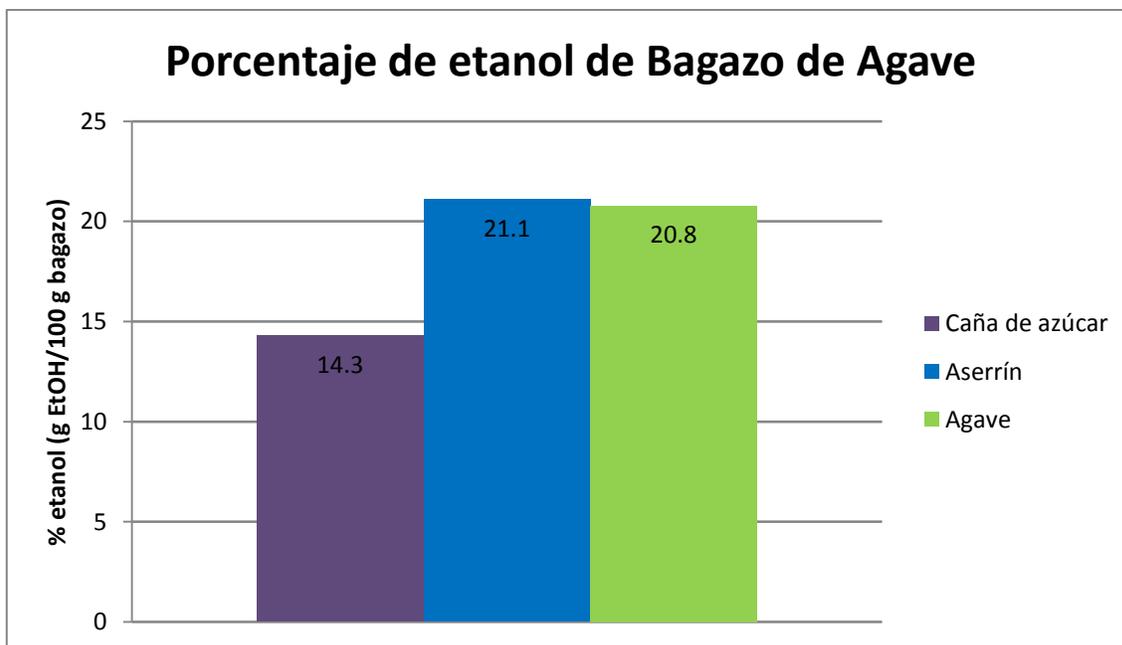


Figura 22. Porcentaje de etanol calculado mediante HPLC , obtenido después de la Hidrólisis enzimática con buffer fosfatos 50 mM. Condiciones: 5 % de inóculo, 1 % de extracto de levadura, 30 °C, sin agitación, 70 h.

Se llevó a cabo la fermentación solamente con tres materiales lignocelulósicos, puesto que no se contó con la suficiente cantidad de sobrenadante para fermentar el Olote. Se observa en la gráfica 22 que la levadura trabajó correctamente sintetizando etanol a partir de la glucosa en el medio, y se obtuvieron altos rendimientos de EtOH.

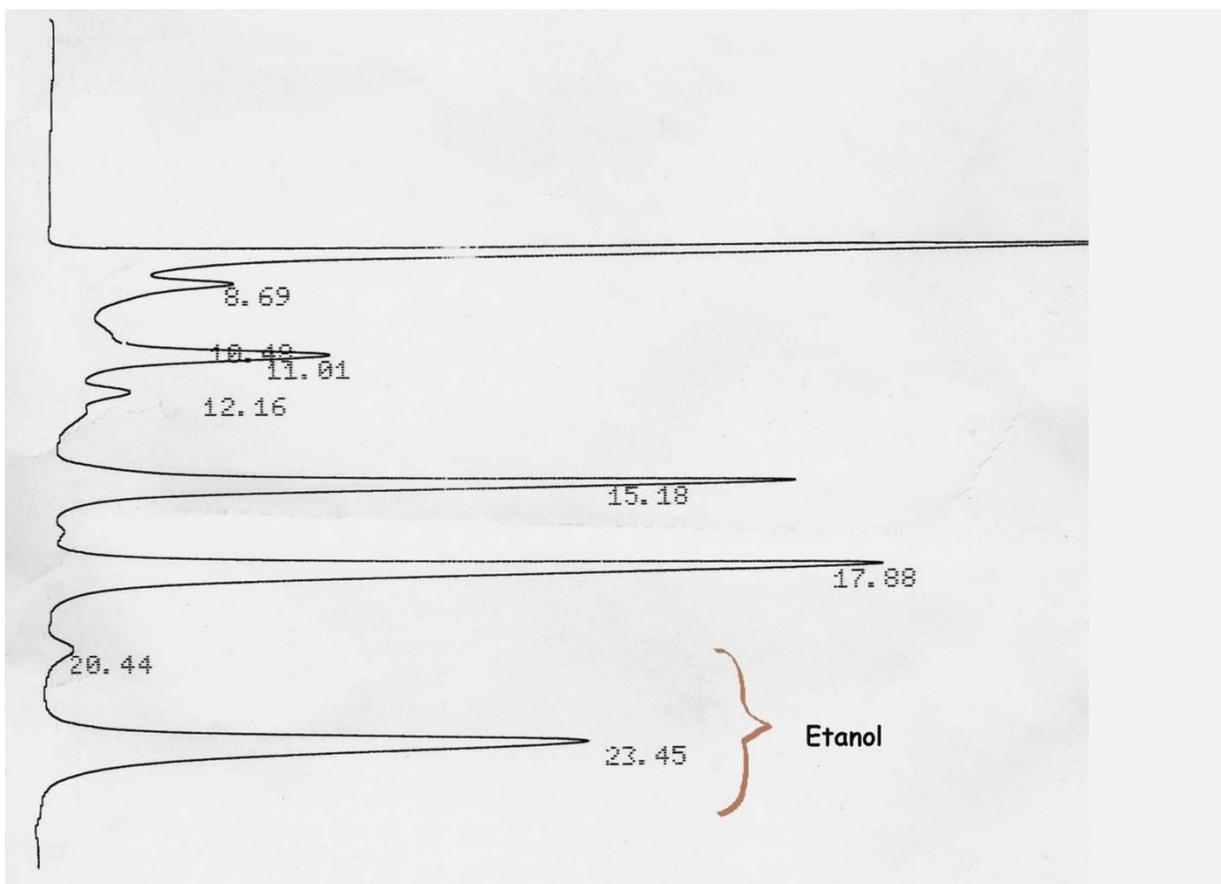


Figura 23. Cromatograma de Etanol

Tabla 13. Comparación entre el rendimiento de glucosa y etanol obtenidos en la fermentación.

Material lignocelulósico	% glucosa obtenido (g glucosa/100 g materia prima)	% etanol obtenido (g etanol/100 g materia prima)	% de glucosa transformada en etanol
Agave	42.6	20.8	97.6
Aserrín	55.1	21.1	76.6
Caña de azúcar	34.3	14.3	83.4

Se calculó el rendimiento de glucosa convertida a etanol. Se observa que el mayor porcentaje de conversión se alcanzó con el Agave, después con el bagazo de caña de azúcar y por último con el aserrín que a pesar de lograr el mayor contenido de glucosa no se logró convertir una mayor cantidad de esta a etanol.

5. CONCLUSIONES

- Se logró una alta conversión de las fibras. Para el agave: 42.6 % de glucosa y un 15.6 % de pentosas. Aserrín: 55.1 % glucosa y 7.6 % pentosas. Bagazo de caña de Azúcar: 34.3 % glucosa y 8.6 % pentosas. Olote: 38.1 % glucosa y 11.4 % de pentosas.
- La mezcla de enzimas Enmex, mezcla Celuzyme XB+ ZymafiltL – 300 (1.5:0.5) tiene una mayor actividad enzimática, con 28.9 FPU. Fue eficaz en la hidrólisis enzimática.
- El buffer más eficiente tanto para la hidrólisis enzimática como para la fermentación fue el buffer fosfatos 50 mM.
- La concentración de enzima 0.2 mL/ g sustrato, fue la que liberó la mayor cantidad de azúcares.
- El material lignocelulósico con mayor bioconversión fue el Bagazo de Agave, concluyendo así que las afirmaciones de la literatura son correctas, es menos recalcitrante que las otras fibras y una alternativa perfecta a las demandas de nuevos biocombustibles. Le brinda una oportunidad a México para aprovechar sus recursos y residuos y poder transformarlos en nuevos aditivos, biocombustibles, etcétera.
- Se logró utilizar los azúcares liberados en la hidrólisis para bioconvertirlos a etanol, con rendimientos favorables.

La utilización de estos materiales lignocelulósicos como los residuos forestales y agroindustriales, contienen un gran potencial de aprovechamiento para obtener productos de valor energético e industrial.

El desarrollo de una mejora en las condiciones de la hidrólisis enzimática es de gran interés para lograr mayores rendimientos y aprovechar la disposición de estos residuos que causan problemas ambientales si no se utilizan.

Un factor que debe ser considerado en caso de los residuos agrícolas, es que su utilización total puede terminar en una erosión del suelo y una reducción en su contenido de materia orgánica. Se debe definir una fracción de residuos

sustentable para ser utilizada, que depende de las condiciones climáticas, rotación de los cultivos, fertilidad del suelo, prácticas agronómicas empleadas. Por ejemplo se estima que para cubrir la superficie del suelo después de cosechar es necesario más del 30 % de los residuos de la cosecha para evitar la erosión del suelo.

Bibliografía:

- 1) Álvarez M. C. (2009). Biocombustibles: desarrollo histórico-tecnológico, mercados actuales y comercio internacional. Rev. Economía informa. Núm. 359.
- 2) Area, M.C., Aguilar, S., Felissia, F. et al. (2002). Pulpado Hidroalcohólico de alto rendimiento de Bagazo de caña de azúcar. Congreso Iberoamericano de Investigación en celulosa y papel. Campinas, Brasil.
- 3) Bailey, J.E. and Ollis, D.F., (1986). Biochemical Engineering Fundamentals. McGraw-Hill segunda edición, Nueva York.
- 4) BNDES y CGEE (2008). Bioetanol de caña de Azúcar. Energía para el desarrollo sostenible. 1ª edición. Río de Janeiro, Brasil.
- 5) Borland M. A., Griffiths H., Hartwell J., Smith C. J. (2009). Exploiting the potential of plants with crassulacean acid metabolism for bioenergy production on marginal lands. Journal of Experimental Botany. 60 (10): 2879-2896.
- 6) Bravo G. R., Cortés G. R. (2009). Producción de biocombustibles en México: la caña de azúcar. Revista de Divulgación Científica y Tecnológica de la Universidad Veracruzana. Vol XXII. Núm. 1.
- 7) Brown R. C., Brown T. R. (2014). Biorenewable resources, engineering new products from agricultura. WileyBlackwell. 2a edición. EUA.
- 8) Caballero, M. (2010). Evaluación de la producción de bioetanol a partir de residuos de malta. Tesis de licenciatura en Química de Alimentos. Facultad de Química. Universidad Nacional Autónoma de México.
- 9) Cardona C. A., Sanches O. J., Gutiérrez L.F. (2010). Process synthesis for fuel ethanol production. CRC Press. USA
- 10) Chávez-Sifontes M., Domine M.E. (2013). Lignina, estructura y aplicaciones: Métodos de despolimerización para la obtención de derivados aromáticos de interés industrial. Avances en Ciencias e Ingeniería: 4 (4), 15-46. España.

- 11) CIMMYT (1995). Manejo de los ensayos e informes de los datos para el Programa de Ensayo Internacionales de Maíz. México. ISBN: 970-648-045-5, 20 p.
- 12) Córdoba J. A., Salcedo E., Rodríguez R., Zamora J. F., Manríquez R., Contreras H., Robledo J., Delgado E. (2013). Caracterización y valoración química del olote: degradación hidrotérmica bajo condiciones subcríticas. *Rev. Latinoam. Quím.* 41/3.
- 13) Dale VH, Kline KL, Wiens J, Fargione J (2010) Biofuels: implications for land use and biodiversity biofuels and sustainability reports. *The Ecological Society of America*, pp. 1–13.
- 14) Davis SC, Dohleman FG, Long SP: The global potential for Agave as a biofuel feedstock. *GCB Bioenergy*. 2011, 3: 68-78.
- 15) Escamilla-Treviño, L. (2011). Potential of Plants from the Genus Agave as Bioenergy Crops. *Bioenerg. Res.*
- 16) FAOSTAT (2012). Producción mundial de maíz.
- 17) Fengel, D. y Wegener, G. (1984). *Wood: chemistry, ultrastructure, reactions*. Walter de Gruyter. Berlin. Alemania.
- 18) Ferreira, S.M.P.; Duarte, A.P.; Queiroz, J.A. y Domingues, F.C.(2009). Influence of buffer systems on *Trichoderma reesei* Rut C-30 morphology and cellulase production. *Electronic Journal of Biotechnology*. 12: 1-9.
- 19) Frias HJ (2009) Potencial y oportunidades de desarrollo de biocombustibles a partir de materiales no alimenticios en Guanajuato. *Ide@s CONCYTEG*, 54, 1271–1286
- 20) Galindo J., González N., Marrero Y., Aldama A.I. (2005). Cinética de la actividad de las celulasas microbianas en el líquido de rumen. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola*, vol. 39, núm. 4, pp.587-592. La Habana, Cuba.
- 21) García –Mendoza AJ. (2007). Los agaves de México. *Ciencias*. 87.
- 22) Garcia-Moya E, Romero-Manzanares A, Nobel PS (2011): Highlights for agave productivity. *GCB Bioenergy*, 3: 4-14.

- 23) GBEP. A review of the current state of bioenergy development in G8 + 5 countries. Disponible en [;http://www.globalbioenergy.org/fileadmin/user_upload/gbep/docs/2007](http://www.globalbioenergy.org/fileadmin/user_upload/gbep/docs/2007). Acceso en febrero de 2016.
- 24) Ghose, T.K. (1987). Measurement of cellulase activities. *Pure & Applied Chemistry* 59 (2):257-268.
- 25) Gonzalez PG (2009) *Producción potencial de bioetanol a partir de pencas de diferentes especies de agave en el estado de Guanajuato*. Unpublished Professional thesis. Universidad de Guanajuato, Mexico.
- 26) Gracida R. J., Pérez D. B. (2014). Factores previos involucrados en la producción de bioetanol, aspectos a considerar. *Rev. Int. Contam. Ambie.* 30 (2) 213-227.
- 27) Hamelinck, C. N. et al. (2005). Ethanol from lignocellulosic biomass: techno-economic performance in short, middle and long-term. *Biomass and Bioenergy*, v. 28 (4).
- 28) Imai, T., Ohono, T. (1995). The relationship between viability and intracellular pH in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Environmental Microbiology*. 61, 3604 - 3608.
- 29) INEGI (2008). Agenda Estadística de los Estados Unidos Mexicanos. http://www.inegi.gob.mx/prod_serv/contenidos/espanol/bvinegi/productos/integracion/pais/agenda/2008/Agenda_2008.pdf
- 30) Iñiguez-Covarrubias G, Lange SE, Rowell RM (2001) Utilization of byproducts from the tequila industry: part 1: agave bagasse as a raw material for animal feeding and fiberboard production. *Bioresource Technology*, 77, 25–32.
- 31) Kabel M. A., Bos G., Zeevalking J., Voragen A. G., Schols H.A. (2007). Effect of pretreatment severity on xylan solubility and enzymatic breakdown of the remaining cellulose from wheat straw. *Bioresource Technol.* 98, 2042.

- 32) Knob A., Cano-Carmona E. (2010). Purification and characterization of two extracellular xylanases from *Penicillium sclerotiorum*: A novel acidophilic xylanase. *Appl Biochem. Biotechnol.* 162, 429-443.
- 33) Kontturi E. (2015). Hemicellulose: structure, characterization, dissolution, modification. Aalto University. School of Chemical Technology.
- 34) Li H., Pattathil S., Foston M., Ding S., Kumar R., Gao X., Mittal A. et al. (2014). Agave proves to be a low recalcitrant lignocellulosic feedstock for biofuels production on semi-arid lands. *Biotechnology for Biofuels.* 7:50.
- 35) Limayem A., Ricke S.C. (2012). Lignocellulosic biomass for bioethanol production : Current perspectives, potential issues and future prospects. *Progress in Energy and Combustion Science* 38: 449-467.
- 36) Liu H., Zhu J.Y., Fu S. (2010). Effects of lignin-metal complexation on enzymatic hydrolysis of cellulose. *J Agric. Food Chem.* 58: 7233-8.
- 37) López-Miranda J., Soto-Cruz N., Rutiaga-Quiñones O., Medrano-Roldán H., Arévalo-Niño K. (2009). Optimización del proceso de obtención enzimática de Azúcares fermentables a partir de aserrín de pino. *Rev. Int. Contam. Ambient.* 25 (2) 95-102.
- 38) Mabee W.E., Gregg D.J., Arato C., Berlin A., Bura R., Gilkes N., et al (2006). Updates on softwood-to-ethanol process development. *Applied BiochemBiotechnol.* 129: 55-70.
- 39) Macarron, Larumbe R. (1992). Purificación y Caracterización de Endoglucanasa III de *Trichoderma reesei* QM9414. Tesis doctoral. Universidad Complutense de Madrid.
- 40) Miller, G. (1959). Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Anal. Chem.* 31: 426-428, 1959.
- 41) Mousdale, M. D. (2008). *Biotechnology, Chemistry and sustainable development.* Ed. CRC Press. Florida, USA.
- 42) Mousdale, M. D. (2010). *Introduction to Biofuels.* 1a edición. Ed. CRC Press. Florida, USA.

- 43) Mussatto, S., Teixeira, J., (2010). Lignocellulose as raw material in fermentation processes. Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology, 2 : 897-907.
- 44) Narendranath, N. V., K. C. Thomas, and W. M. Ingledew. (2001). Effects of acetic acid and lactic acid on the growth of *Saccharomyces cerevisiae* in a minimal medium. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 26:171-177.
- 45) Nielsen S. (2003). Food Analysis Laboratory Manual; Kluwer Academic/ Plenum Publishers, Nueva York.
- 46) Noriega L.E. (2009). Estimado del potencial de cogeneración. En: Estudio sobre la cogeneración en el sector industrial en México. CONUEE/CRE/GTZ. D.F., México, pp. 29-65.
- 47) Pampuhla, M.E., Loureiro-Dias, M.C., (1990). Activity of glycolytic enzymes of *Saccharomyces cerevisiae* in the presence of acetic acid. Applied Microbiology Biotechnology. 34, 375 - 380.
- 48) Pandey.A., C. Soccol, C. Nigam and V.Soccol. (2000). Biotechnological potential of agroindustrial residues . I: Sugarcane Bagasse. Bioresource Technology. 74 : 69-80
- 49) Pérez V. A., García P. E. (2013). Energía alterna y biocombustibles. Innovación e Investigación para un desarrollo sustentable. Editorial del Colegio de Postgraduados. 1ª edición. México.
- 50) Pernalet Z., Piña F., Suárez M., Ferrer A., Aiello C. (2008) Fraccionamiento del bagazo de caña de azúcar mediante tratamiento amoniacal: efecto de la humedad del bagazo y la carga de amoníaco. Bioagro 20(1): 3-10
- 51) Prinsen, P. (2010). Composición química de diversos materials lignocelulósicos de interés industrial y análisis estructural de sus ligninas. Universidad de Sevilla.
- 52) PROINBIOS (2009) Produccion Sustentable de Insumos para Bioenergeticos y de Desarrollo Cientifico y Tecnologico. *Gobierno Federal-Sagarpa2009-2012*. Mexico.

- 53) Robledo O. A., Aguilar C. N., Montañez S. J. (2012). Uso del olote de maíz como sustrato microbiano para la obtención de xilanasas. *Acta Química Mexicana*, 4 (7).
- 54) Sandoval G. (2010). Biocombustibles avanzados en México. Estado actual y perspectivas. *Red Mexicana de Bioenergía*.
- 55) Saucedo-Luna, J.; Castro-Montoya, A.J.; Rico, J.L.; Campos-García, J. (2010) Optimization of acid hydrolysis of bagasse from Agave tequilana Weber. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*. 9(1): 91-97
- 56) Scheller H.V.; Ulvskov P. (2010). Hemicelluloses. *Annual Review Plant Biology*, 61, 263-289.
- 57) SEMARNAP (2000). Guía forestal. Secretaría del Medio Ambiente Recursos Naturales y Pesca, México, D. F. 105 pp
- 58) SENER (2009) Programa Especial para el Aprovechamiento de Energías Renovables. Secretaria de Energía, Gobierno Federal, México
- 59) SENER (2013). Biocombustibles Líquidos. Secretaria de Energía, México [en línea]. <http://www.renovables.gob.mx/>
- 60) Smith AM (2008) Prospects for increasing starch and sucrose yields for bioethanol production. *The Plant Journal*, 54, 546–558
- 61) Somerville C (2007) Biofuels. *Current Biology*, 17, 115–119.
- 62) Soto A. C., López M. J., Rosales C. M., Pérez V. G., Rodríguez P. M., Chairez H. I. (2013). Alkaline pretreatment of Mexican pine residues for bioethanol production. *African Journal of Biotechnology*. Vol. 12 (31), pp. 4956-4965.
- 63) Sun, Y., and J. Cheng. (2002) Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production : A review. *Bioresource Technology* 83 : 1-11.
- 64) Sunggyu L., Speight J., Loyalka S. (2007). *Handbook of Alternative Fuel Technologies*. CRC Press. USA.
- 65) Taherzadeh, M.J; Karimi, K. (2007). Enzyme-based hydrolysis processes for ethanol from lignocellulosic materials: a review. *Bioresources*. 2 (4):707-738.

- 66) Thomas KC, Hynes SH, Ingledew WM.(2002) Influence of medium buffering capacity on inhibition of *Saccharomyces cerevisiae* growth by acetic and lactic acids. *Applied and Environmental Microbiology*.68:1616–1623.
- 67) USDE (2010). “Theoretical Ethanol Yield Calculator”, Energy Efficiency and Renewable Energy. Biomass Program. http://www1.eere.energy.gov/biomass/ethanol_yield_calculator.html
- 68) Valencia S. y López F. (1999). Variación de la densidad de la madera dentro y entre árboles de *Pinusrudis* Endl., en Sierra Las Alazanas, Arteaga, Coah. *Foresta-AN*. 102 J. López-Miranda et al. Nota Técnica No. 1. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Saltillo, Coah. 17 pp
- 69) Vázquez T. (2012). Evaluación de la Hidrólisis Enzimática de bagazo de sorgo para la obtención de azúcares fermentables a etanol y efecto de diferentes pretratamientos. Tesis de Licenciatura en Química de Alimentos. Facultad de Química. Universidad Nacional Autónoma de México.
- 70) Verduyn, C., Postma, E., Scheffers, W.A., Dijken, J.P. (1992). Effect of benzoic acid on metabolic fluxes in yeasts: a continuous-culture study on the regulation of respiration and alcoholic fermentation. *Yeast* 8, 501-517.
- 71) Villalobos Quintero J.N. (2012). Obtención de azúcares fermentables a partir del bagazo de caña de azúcar mediante la hidrólisis ácida diluida en dos etapas. Tesis para obtener el grado de maestría en Ingeniería Química. Universidad de Zulia. Facultad de Ingeniería. División de Postgrado. Maracaibo. República Bolivariana de Venezuela. p.83
- 72) Wang L. (2014). *Sustainable Bionergy Productions*. CRC Press. London.
- 73) Zaldivar J., Nielsen J., Olsson L. (2001). Fuel ethanol production from lignocellulose: a challenge for metabolic engineering and process integration. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 56, no 1-2, p 17-34
- 74) Zamora H. T., Prado F. A., Capataz T. J., Barrera F. B., Peña C. J. (2014). Demostraciones prácticas de los retos y oportunidades de la producción de bioetanol de primera y segunda generación a partir de

cultivos tropicales. Educación Química para un futuro sostenible. México.
25 (2), 122-127.

- 75) Zhang M, Eddy M.C., Deanda K., Finkelstein M., Picataggio S. (1995).
Metabolic engineering of a pentose metabolism pathway in ethanologenic
Zymomonas mobilis. Science 267:240-3