UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO EN ALIMENTOS

“EFECTO DEL PRETRATAMIENTO Y FERMENTACIÓN SOBRE LA PRODUCCIÓN DE BIOETANOL A PARTIR DE PERICARPIO DE MAÍZ”

PRESENTADO POR

IAG. José Ángel Granados Arvizu

ASESOR

Dr. Carlos Regalado González

Santiago de Querétaro

Septiembre de 2015

REPOSITORIO INSTITUCIONAL DGBSDI-UAQ

La presente obra está bajo la licencia:
https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/deed.es

CC BY-NC-ND 4.0 DEED

Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0 Internacional

Usted es libre de:

Compartir — copiar y redistribuir el material en cualquier medio o formato

La licenciante no puede revocar estas libertades en tanto usted siga los términos de la licencia

Bajo los siguientes términos:

Atribución — Usted debe dar crédito de manera adecuada , brindar un enlace a la licencia, e indicar si se han realizado cambios . Puede hacerlo en cualquier forma razonable, pero no de forma tal que sugiera que usted o su uso tienen el apoyo de la licenciante.

NoComercial — Usted no puede hacer uso del material con propósitos comerciales .

SinDerivadas — Si remezcla, transforma o crea a partir del material, no podrá distribuir el material modificado.

No hay restricciones adicionales — No puede aplicar términos legales ni medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otras a hacer cualquier uso permitido por la licencia.

Avisos:

No tiene que cumplir con la licencia para elementos del material en el dominio público o cuando su uso esté permitido por una excepción o limitación aplicable.

No se dan garantías. La licencia podría no darle todos los permisos que necesita para el uso que tenga previsto. Por ejemplo, otros derechos como publicidad, privacidad, o derechos morales pueden limitar la forma en que utilice el material.

Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Química
Maestría en Ciencia y Tecnología de los alimentos

"EFECTO DEL PRETRATAMIENTO Y FERMENTACIÓN SOBRE LA PRODUCCIÓN DE BIOETANOL A PARTIR DE PERICARPIO DE MAÍZ"

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el Grado de
Maestría en ciencia y tecnología de los alimentos

Presenta:
IAG. José Ángel Granados Arvizu

Dirigido por:
Dr. Carlos Regalado González

Dr. Carlos Regalado González
DIRECTOR — Firma

Dra. Blanca Estela García Almendárez
ASESOR — Firma

Dr. Aldo Amaro Reyes
ASESOR — Firma

Dr. Jorge Gracida Rodríguez
ASESOR — Firma

Dr. Alfredo Martínez Jiménez
ASESOR — Firma

M.S.P. Sergio Pacheco Hernández
Director de la Facultad

Dra. Ma. Guadalupe Flavia Loarca Piña
Director de Investigación y Posgrado

Centro Universitario
Querétaro, Qro. México
Septiembre del 2015

RESUMEN

El pericarpio de maíz (PM) destaca por su alta disponibilidad en México (~0.1×10^6 T·año^{-1}). Resalta su contenido (p·p^{-1}) de hemicelulosa (35 %), celulosa (18 %) y almidón (17 %), convirtiéndolo en una atractiva fuente para producir bioetanol. Por lo cual, resulta esencial maximizar la liberación de azúcares para mejorar el rendimiento de bioetanol. El objetivo fue analizar el efecto del pretratamiento ácido y la fermentación usando *Pichia stipitis* para obtener bioetanol a partir de PM. Se estudió el efecto del tiempo (x_1), concentración de ácido sulfúrico (x_2) y de PM (x_3) sobre la producción de azúcares fermentables. Se utilizó la Metodología de Superficie de Respuesta (MSR) mediante un Diseño Factorial Completo (DFC) y un Diseño Central Compuesto (DCC). Las variables de respuesta fueron azúcares reductores, glucosa, PM hidrolizado y rendimiento de azúcares. Se evaluó la fermentación alcohólica de la fracción líquida hidrolizada del pericarpio (FLP) usando *Pichia stipitis.* La FLP se detoxificó con carbón activado y se ajustaron los azúcares reductores a 45 g·L^{-1} con y sin suplementación de nutrientes extra. La fermentación se llevó a cabo a 30 ºC por 120 h a 175 rpm, midiendo azúcares reductores, glucosa, biomasa y etanol. Finalmente, se simuló la producción de bioetanol mediante el programa SuperPro Designer. La condición óptima encontrada en la MSR fue: x_1 = 39 min, x_2 = 4.6 % (v·v^{-1}) y x_3 = 20 % (p·v^{-1}) a 120 ºC. Se obtuvieron 89 g·L^{-1} de azúcares reductores, de los cuales 19.2 g·L^{-1} correspondían a glucosa, hidrolizándose el 70 % del PM con una eficiencia de 42.95 g de azúcares reductores por cada 100 g de PM inicial. En la fermentación se produjeron 4.11 g·L^{-1} y 3.46 g·L^{-1} de bioetanol a partir de la FLP suplementada y sin suplementar, respectivamente. En la simulación se produjeron 57.89 kg de etanol a una concentración del 95.1 % a partir de 1 Ton de PM, considerando únicamente la FLP. Los resultados obtenidos confirman el potencial del PM para la obtención de bioetanol usando ácido sulfúrico diluido como pretratamiento

Palabras clave: Pericarpio de maíz, pretratamiento, ácido diluido, *Pichia stipitis*, bioetanol

SUMMARY

Corn pericarp (PM) features high availability in Mexico (~ 0.1x106 Ton • yr^{-1}). Highlight its percentage of ($p•p^{-1}$) hemicellulose (35%), cellulose (18%) and starch (17%), making it an attractive source to produce bioethanol. Therefore, it is essential to maximize release of sugars to improve performance of bioethanol. The objective was to analyze the effect of acid pretreatment and fermentation using *Pichia stipitis* for bioethanol from PM. Effect of time (x_1), concentration of sulfuric acid (x_2) and PM (x_3) on the production of fermentable sugars was studied. Response Surface Methodology (MSR) was used by a Full Factorial Design (DFC) and a Central Composite Design (DCC). Response variables were reducing sugars, glucose, PM hydrolyzate and sugar yield. Fermentation of hydrolyzed liquid fraction of pericarp (FLP) was evaluated using *Pichia stipitis*. FLP was detoxified with activated charcoal and sugars were adjusted to 45 $g•L^{-1}$ testing to conditions, with and without exta supplementation. Fermentation was at 30 ° C for 120 ha 175 rpm, measuring reducing sugars, glucose, ethanol and biomass. Finally, production of bioethanol was simulated by SuperPro Designer program. The optimum condition was found in the MSR: min x_1 = 39, x_2 = 4.6% ($v•v^{-1}$) and x_3 = 20% ($p•v^{-1}$) at 120 ° C. 89 $g•L^{-1}$ reducing sugar, which 19.2 $g•L^{-1}$ corresponding to glucose, hydrolyzed 70% of PM. An efficiency of 42.95 g of reducing sugars per 100 g of initial PM was obtained. In fermentation from FLP, it was obtained 4.11 g of ethanol$•L^{-1}$ using extra supplementation and 3.46 g of ethanol• L^{-1} without supplementation. In simulation, it was produced 57.89 kg of ethanol at 95.1% from 1 Ton of PM, considering only the FLP. It was confirm potential of PM to produce bioethanol from PM using diluted sulfuric acid pretreatment and *P. stipitis* to ferment FLP.

Key words: Corn pericarp, pretreatment, diluted sulfuric acid, *Pichia stipitis*, and bioethanol.

Tan sólo por la educación puede el hombre llegar a ser hombre,
el hombre no es más que lo que la educación hace de él.

Immanuel Kant

ÍNDICE

RESUMEN ii
SUMMARY iv
ÍNDICE vi
ÍNDICE DE FIGURAS ix
1. INTRODUCCIÓN 1
1.1 Biocombustibles 2
1.2 Bioetanol 5
1.3 Biomasa lignocelulósica 6
1.4 Pericarpio de maíz 9
1.5 Pretratamientos de la biomasa lignocelulósica 11
1.6 Hidrólisis y sacarificación 17
1.6.1 Hidrólisis directa 17
1.6.2 Hidrólisis enzimática (sacarificación) 17
1.7 Fermentación 18
1.8 Recuperación y purificación 20
2. JUSTIFICACIÓN 21
3. OBJETIVOS 22
3.1 Objetivo general 22
3.2 Objetivos específicos 22
4. MATERIALES Y MÉTODOS 23
4.1 Materia prima 23
4.2 Material biológico 23
4.3 Metodología 23
4.3.1 Pretratamiento 24
4.3.1.1 Optimización del pretratamiento por metodología de superficie de respuesta (MSR) 25
4.3.1.2 Diseño Factorial Completo (DFC) 26
4.3.1.3 Diseño central compuesto (DCC) 27
4.3.2. Fermentación del hidrolizado líquido 28
4.3.2.1 Activación de *Pichia stipitis* en medio YPDX 28

4.3.2.2 Detoxificación del hidrolizado líquido de pericarpio de maíz (HLD) 28
4.3.2.3 Adaptación de la P. stipitis en HLD 28
4.3.2.4 Fermentación del HLD usando *P. stipitis* 29
4.3.3 Simulación de producción de etanol a partir de pericarpio de maíz 30
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN 31
5.1 Optimización del pretratamiento por MSR 31
5.1.1 Diseño factorial completo (DFC) 31
5.1.2 Diseño central compuesto (DCC) 36
5.1.2.1 Azúcares reductores 38
5.1.2.2 Glucosa 41
5.1.2.3 Pericarpio de maíz hidrolizado 43
5.1.2.4 Rendimiento de azúcares 46
5.1.2.5 Punto óptimo 48
5.2 Fermentación del hidrolizado líquido de PM 50
5.2.1 Crecimiento de *P. stipitis* en medio YPD 50
5.2.2 Detoxificación del HLD 52
5.2.3 Adaptación de la Pichia stipitis en HLD 53
5.2.4 Fermentación del HLD con *P. stipitis* 53
5.3 Simulación de producción de etanol a partir de pericarpio de maíz 60
5.3.1 Etapa del pretratamiento 61
5.3.2 Etapa de la fermentación 62
5.3.3 Etapa de la destilación 63
5.3.4 Etapa de la obtención de productos 64
6. CONCLUSIONES 65
7. LITERATURA CITADA 66

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro Página

1. Composición de algunas materias primas con potencial para elaborar biocombustibles (% en peso seco). 9
2. Constituyentes del pericarpio de maíz. 10
3. Pretratamientos y condiciones de reacción representativas. 13
4. Características de los pretratamientos. 16
5. Ventajas y desventajas de potenciales organismos empleados para la fermentación de bioetanol basado en lignocelulosa. 19
6. Valores codificados de las variables en el DFC. 25
7. Factores y niveles para el DFC. 26
8. Factores y niveles para el DCC. 27
9. Resultados experimentales del DFC. 31
10. Análisis estadístico para las cuatro respuestas estudiadas en el DFC. 32
11. Resultados experimentales del DCC. 36
12. Análisis estadístico para las cuatro respuestas estudiadas mediante DCC. 37
13. Coeficientes estimados y su significancia para azúcares reductores. 38
14. Coeficientes estimados y significancia para glucosa. 41
15. Coeficientes estimados y significancia para pericarpio de maíz hidrolizado. 44
16. Coeficientes estimados y significancia para el rendimiento de azúcares 46
17. Confirmación del punto óptimo del pretratamiento usando 4.6 (% $v \cdot v^{-1}$) de ácido sulfúrico, 20 (% $p \cdot v^{-1}$) de PM inicial y 40 min de tratamiento. 50
18. Detoxificación del hidrolizado líquido de PM. 52
19. Parámetros de la fermentación del HLD de PM usando *P. stipitis.* 58

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura Página

1. Ejemplos de procesos para producir bioetanol de primera generación a partir de maíz, etanol de segunda generación a partir de residuos de maíz y biodiesel de tercera generación a partir de algas. 2
2. Representación esquemática de las etapas involucradas en la conversión de la biomasa proveniente de plantas a biocombustibles y otros productos de valor agregado. 3
3. Estructura de la lignocelulosa. La celulosa, hemicelulosa y la lignina forman estructuras llamadas microfibrillas, en conjunto dan lugar a las macrofibras que regulan la estabilidad de la pared celular de las plantas. 6
4. Estructura molecular de la celulosa. 7
5. Microfibrillas de celulosa. 7
6. Estructura de la hemicelulosa (arabinoglucuronoxilano). 8
7. Monómeros de la lignina. 8
8. Diagrama de flujo del proceso de molienda húmeda del maíz. 10
9. Esquema del pretratamiento en materiales lignocelulósicos. 11
10. Esquema experimental para la obtención de bioetanol a partir de pericarpio de maíz. 23
11. Metodología del pretratamiento del PM. 24
12. Esquema de la MSR. 25
13. Efecto de interacción entre la concentración del ácido sulfúrico y el PM inicial (sólidos) en el contenido de azúcares en la fracción líquida del PM hidrolizado. 33
14. Efecto de interacción entre la concentración del ácido sulfúrico y el tiempo en el contenido de azúcares en la fracción líquida del PM hidrolizado. 33
15. Efecto de interacción entre la concentración del ácido sulfúrico y los sólidos (PM inicial) en el contenido de glucosa en la fracción líquida del PM hidrolizado. 34
16. Efecto de interacción entre el tiempo y los sólidos (PM inicial) en el contenido de glucosa en la fracción líquida del PM hidrolizado 34
17. Efecto de interacción entre el tiempo y la concentración de ácido sulfúrico en el porcentaje de PM hidrolizado. 34

18. Figura Efecto de interacción entre el tiempo y la concentración de ácido sulfúrico sobre el rendimiento de azucares en PM. 35
19. Efecto de interacción entre la concentración de ácido sulfúrico y los sólidos (PM inicial) sobre el rendimiento de azucares en PM. 35
20. Curvas de nivel para el efecto del ácido sulfúrico y el tiempo. Sólidos al 20 % 39
21. Curvas de nivel para el efecto del PM inicial y el tiempo. Ácido sulfúrico al 5 % 39
22. Azúcares reductores en función del PM inicial y el tiempo de hidrólisis. Ácido sulfúrico al 5 % 40
23. Curvas de nivel para el ácido sulfúrico y el PM inicial. 40
24. Azúcares reductores en función del ácido sulfúrico y el tiempo. PM al 20 %. 41
25. Curvas de nivel para el efecto entre el ácido sulfúrico y el PM inicial. 42
26. Curvas de nivel para el efecto entre el ácido sulfúrico y el PM inicial. 42
27. Glucosa en función de la concentración del ácido sulfúrico y tiempo de hidrólisis. 43
28. Glucosa en función del PM inicial y la concentración del ácido sulfúrico. 43
29. Curvas de nivel para el efecto entre el ácido sulfúrico y el tiempo sobre el PM hidrolizado. 44
30. PM hidrolizado en función del ácido sulfúrico y el tiempo. 45
31. PM hidrolizado en función del PM inicial y el ácido sulfúrico. 45
32. Curvas de nivel para el efecto entre el ácido sulfúrico y el tiempo sobre el rendimiento de azúcares. 10 (% $p \cdot v^{-1}$) de PM inicial. 47
33. Curvas de nivel para el efecto entre el ácido sulfúrico y el tiempo sobre el rendimiento de azúcares. 20 (% p·v-1) de PM inicial 47
34. Rendimiento de azúcares en función del ácido sulfúrico y el PM inicial. Con 40 min de hidrólisis. 47
35. Rendimiento de azúcares en función del tiempo y el PM inicial. A 5 (% $v \cdot v^{-1}$) de ácido sulfúrico. 47
36. Rendimiento de azúcares en función del PM inicial y el tiempo. 48
37. Rendimiento de azúcares en función del ácido sulfúrico y el tiempo. 48
38. Rendimiento de azúcares en función del PM inicial y el ácido sulfúrico. 48
39. Deseabilidad global en función de la concentración de ácido sulfúrico y tiempo. 49

40. Crecimiento de la *P. stipitis* en medio YPD a 30 ºC y pH 5 con xilosa (20 $g \cdot L^{-1}$) como fuente de carbono. Promedio de tres réplicas. 51
41. Incremento de la biomasa de la *P. stipitis* en medio YPD a 30 ºC y pH 5 con xilosa (20 $g \cdot L^{-1}$) como fuente de carbono. Promedio de tres réplicas. 51
42. Crecimiento de la *P. stipitis* en HLD de PM a 30 ºC y pH 5.Promedio de tres réplicas. 53
43. Consumo de azúcares reductores y glucosa durante la fermentación de *P. stipitis* en el HLD de PM a 30 ºC y pH 5. Glucosa en HLD suplementado (Amarillo, ●) y sin suplementar (azul, ♦). Azúcares reductores en HLD suplementado (rojo, ■) y sin suplementar (verde, ∆). Desviación estándar (negro). Promedio de tres replicas 54
44. Incremento de la biomasa y consumo de azúcares de la *P. stipitis* durante la fermentación en el hidrolizado líquido detoxificado de PM a 30 ºC y pH 5. Azúcares reductores Cultivo con suplemento (rojo, ▼) y sin suplemento (verde, ○) y biomasa (amarillo, ■) Cultivo con suplemento y (azul, ♦) sin suplemento. Desviación estándar (negro). Promedio de tres réplicas. 55
45. Producción de etanol durante la fermentación del HLD de PM a 30 ºC y pH 5. Cultivo suplementado (Línea azul, ♦) y sin suplementar (línea amarilla, □). Desviación estándar (negro). Promedio de tres réplicas. 57
46. Esquema de simulación de la producción de bioetanol a partir de pericarpio de maíz en SuperPro ®. 60
47. Simulación del pretratamiento ácido del PM en SuperPro ®. 61
48. Simulación de la fermentación de la fracción líquida pretratada. 63
49. Simulación de la destilación para obtener el bioetanol a partir de PM. 63
50. Simulación de la etapa de obtención de productos. 64

1. INTRODUCCIÓN

La principal fuente de energía en la tierra proviene del sol, mientras que en la superficie y al interior de la misma se cuenta con recursos renovables y no renovables. Dentro de los no renovables los combustibles fósiles; como el petróleo, el carbón mineral y el gas natural, son recursos limitados. Una disminución de los suministros de combustibles fósiles y las crecientes preocupaciones ambientales sobre su uso ha dado lugar a un marcado interés en el uso de la biomasa como materia prima para obtener combustibles líquidos.

La transformación de residuos vegetales para obtener biocombustibles ha surgido como una alternativa para la generación de energía limpia y renovable en comparación a los combustibles fósiles.

Se ha señalado como perspectiva a futuro la utilización de las enormes cantidades de residuos procedentes de la agricultura y la silvicultura –paja, mazorcas de maíz, bagazo de caña de azúcar, residuos de la industria forestal– complementado por la amplia gama de desechos producto de la sociedad moderna. Particularmente, el bioetanol producido a partir de biomasa luce prometedor como un combustible alternativo a la gasolina o como agregado de la misma.

A pesar de que se han estudiado y propuesto diseños y modelos económicos de la conversión de la lignocelulosa proveniente de la biomasa, aún resulta poco viable económicamente. En tanto que, la bioconversión del almidón a azúcares para producir bioetanol ha sido un modelo más exitoso, en los últimos años ha surgido un debate importante sobre el uso de cultivos alimentarios destinados a la producción de biocombustibles que han frenado su avance. En este contexto, el aprovechamiento de los residuos agroindustriales juega un papel muy importante. Dentro del procesamiento del maíz, productos de desecho como el rastrojo, los olotes y el pericarpio lucen como materias primas con potencial para la producción de compuestos de valor agregado tales como el bioetanol.

1.1 Biocombustibles

Biocombustible es un término que describe al producto empleado para obtener energía, usando como materia prima la biomasa. Se aplica comúnmente a los combustibles líquidos, pero también se consideran los combustibles gaseosos y sólidos (Kumar et al., 2010). Chaturvedi y Verma (2013) señalan que los biocombustibles pueden ser de primera y segunda generación, en tanto que Philbrook et al (2013) mencionan una tercera generación, donde se considera la producción de biodiesel a partir de algas (Figura 1).

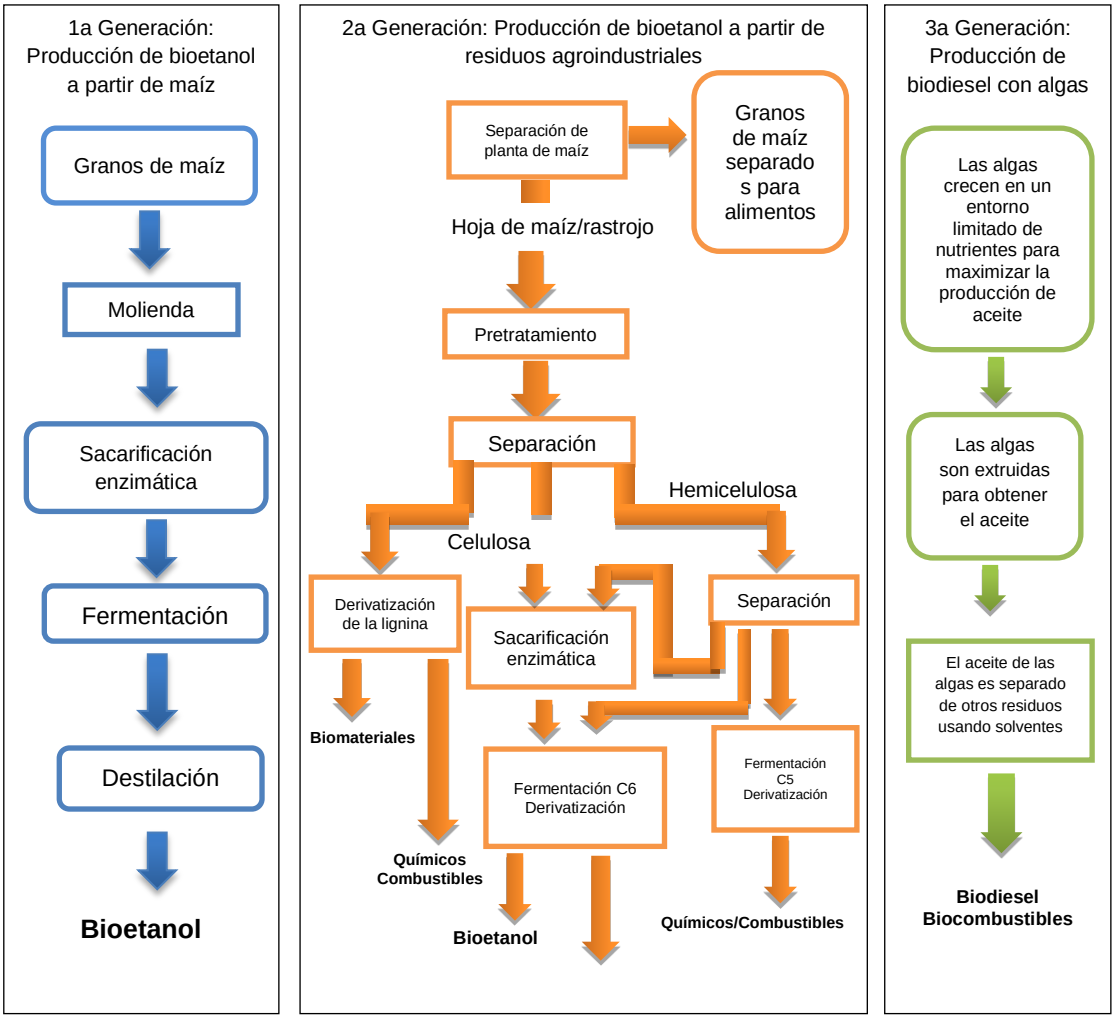


Figura 1. Ejemplos de procesos para producir bioetanol de primera generación a partir de maíz, etanol de segunda generación a partir de residuos de maíz y biodiesel de tercera generación a partir de algas. Adaptado de Philbrook et al (2013).

Peskett et al (2007) señalan dos tipos de biocombustibles de primera generación producidos a partir de cultivos específicos:

i. El bioetanol, alcohol derivado de azúcar o almidones; procedentes de cultivos como la caña de azúcar, la remolacha azucarera o el maíz, producido por fermentación.
ii. El biodiesel procedente de aceites vegetales tales como el aceite de colza, jatropa (*Jatropha curcas*), higuerilla (*Ricinus communis*), soya (*Glycine max*) o palma que se hace reaccionar con metanol. Se puede emplear en motores a diesel mezclado o solo.

Los biocombustibles de segunda generación son los obtenidos a partir de biomasa lignocelulósica proveniente de desechos de la agricultura y de la madera (Sun y Cheng, 2002), siendo más aceptados al no emplear cultivos destinados a alimentación, pero con el inconveniente de que los procesos para su conversión son complejos y costosos (Philbrook et al., 2013).

En el caso de los biocombustibles de tercera generación, la forma convencional de producción es mediante la conversión de aceite de algas en biodiesel mediante el proceso de transesterificación (Liew et al., 2014)

Una de las desventajas que tienen los combustibles de segunda generación, es el alto costo del proceso aplicado para remover la lignina, necesario para aumentar la disponibilidad de la celulosa (Yang y Wyman, 2008). La Figura 2 resume la conversión de la biomasa proveniente de plantas a biocombustibles y otros productos de valor agregado.

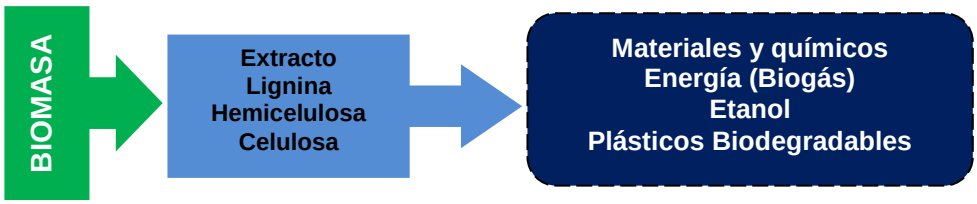


Figura 2. Representación esquemática de las etapas involucradas en la conversión de la biomasa proveniente de plantas a biocombustibles y otros productos de valor agregado. Adaptado de Alvira et al (2010).

La producción sostenible y económica de biocombustibles de primera generación (producidos mayormente a partir de cultivos azucareros, amiláceos y aceites vegetales), ha sido objeto de una estrecha vigilancia (Sims et al., 2010). Tal es el caso de los combustibles para el transporte basados en plantas, particularmente el biodiesel y el bioetanol. Este último fue foco de extensas críticas, sobre todo en 2008, se asoció a un alza en los precios mundiales de los alimentos, debido al crecimiento de la industria del etanol en Estados Unidos (Solomon et al., 2007; Thompson, 2012; Timilsina, 2014).

Sims et al., (2010) señalan tres limitantes importantes de los combustibles de primera generación para sustituir a los derivados del petróleo, mitigar el cambio climático y favorecer el crecimiento económico:

- Competencia por tierra y agua para la producción de fibras y alimentos.
- Altos costos de producción y procesamiento que requieren de subsidios por parte del gobierno para competir con los derivados del petróleo.
- Alta variabilidad en las reducciones netas de gases de efecto invernadero cuando se toma en cuenta el uso de suelo.

Para abordar estas preocupaciones, las políticas públicas están impulsando los biocombustibles de segunda generación (Timilsina, 2014).

Debido a la disponibilidad tan amplia, la biomasa ha recibido especial atención como materia prima sustentable que puede disminuir el uso de combustibles fósiles para la producción de energía.

Bhatia et al (2012) señalan fuentes de biomasa lignocelulósica no comestible tales como la paja de trigo y arroz, bagazo de caña, rastrojo de maíz, madera, tallos, hojas, cáscaras de frutas y verduras, bagazo generado a partir de caña de azúcar o sorgo dulce molido, desechos de molienda de café y desechos de cebada como materias primas que están atrayendo interés para la producción de biocombustibles de segunda generación.

Alonso et al (2010) señalan que cerca de 10^{10} T·año^{-1} de lignocelulosa aparentar ser relativamente accesibles en el mundo. A pesar de que los biocombustibles derivados de la celulosa son una tecnología prometedora, hay algunos obstáculos que interfieren

con el proceso de bioconversión para alcanzar un rendimiento óptimo (Limayem y Ricke, 2012).

Philbrook et al (2013), señalan además que los procesos para la transformación de la biomasa deben ser eficientes (minimizando las emisiones de carbono), de lo contrario los objetivos ambientales de la utilización de la biomasa resultan negativos. Para ello, la biotecnología juega un papel importante en contribuir a hacer de la conversión biológica de la biomasa lignocelulósica a azúcares fermentables una etapa con costos competitivos, resultando en pretratamientos con costos cercanos del 20 % del costo total del proceso (Yang y Wyman, 2008).

1.2 Bioetanol

De los biocombustible para transporte, el bioetanol es el más utilizado y puede producirse a partir de diferentes tipos de biomasa tales como: materiales que contienen sacarosa, almidón, y materiales lignocelulósicos (Buruiana et al., 2014).

Los países que encabezan la producción de bioetanol de primera generación son Estados Unidos y Brasil, que acumulan el 90% del total mundial. Sin embargo, los combustibles de segunda generación aún no se producen a escala comercial aunque la Unión Europea, Estados Unidos y Canadá, además de China, Brasil, India y Tailandia están invirtiendo en investigación y proyectos a escala demostrativa (Timilsina, 2014).

Dentro de las ventajas del bioetanol anhidro es que puede ser mezclado con la gasolina o usado como combustible único en motores especialmente diseñados para ello, además de que posee un alto número de octanos; 92 contra 82 – 92 de la gasolina, pero el calor neto de combustión es menor; 27 $MJ \cdot kg^{-1}$ contra 43.5 $MJ \cdot kg^{-1}$ de la gasolina. El alto octanaje en el combustible ayuda al motor a operar más suavemente y mantiene el sistema de inyección de combustible limpio, para un óptimo funcionamiento (Kumar et al., 2010).

Sumado a esto, se reduce tanto el consumo de combustibles fósiles como la contaminación ambiental (compuestos orgánicos volátiles, óxidos de nitrógeno, benceno y otras partículas) asociada con la gasolina (Gavrilescu y Chisti, 2005).

La producción de bioetanol de materiales lignocelulósicos se puede lograr siguiendo distintas estrategias, las cuales incluyen la hidrólisis y fermentación separadas (HFS);

sacarificación y fermentación simultáneas (SFS); así como la prehidrólisis, sacarificación y fermentación simultánea (PSFS) (López-Linares et al., 2014).

A pesar de que la producción de bioetanol a partir de lignocelulosa (segunda generación) requiere de infraestructura desarrollada para la producción de primera generación (azúcares y almidones), es necesario desarrollar cambios para optimizar los rendimientos debido a la variedad de azúcares obtenidos a partir de la biomasa (Rubin, 2008).

1.3 Biomasa lignocelulósica

La lignocelulosa es un material orgánico renovable y es el mayor componente estructural en todas las plantas. Químicamente está conformado mayoritariamente por tres tipos de compuestos (Figura 3) (Bhatia et al., 2012).

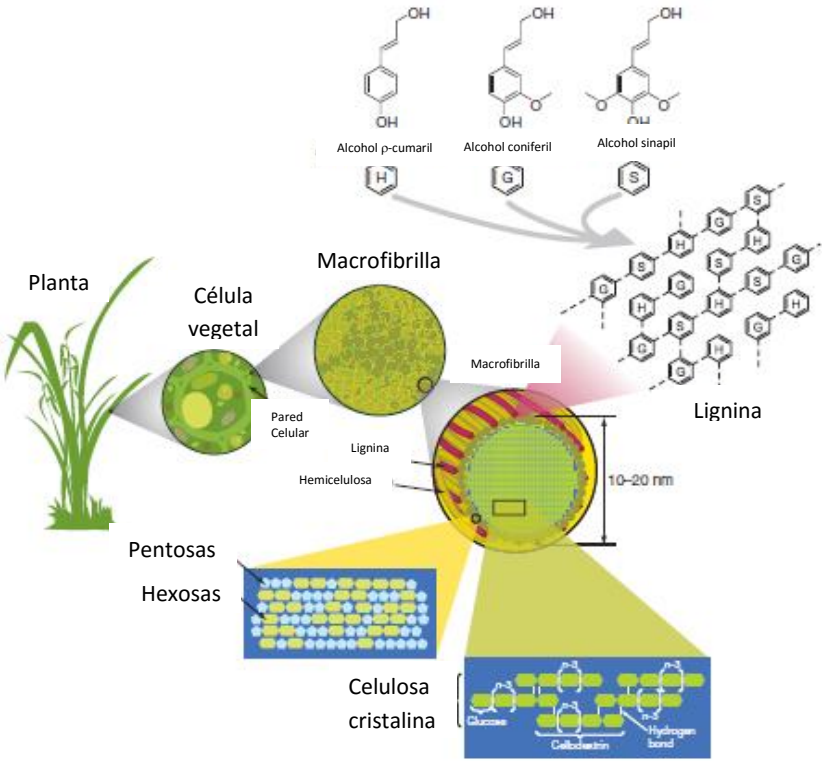


Figura 3. Estructura de la lignocelulosa. La celulosa, hemicelulosa y la lignina forman estructuras llamadas microfibrillas, en conjunto dan lugar a las macrofibras que regulan la estabilidad de la pared celular de las plantas. Adaptado de Rubin (2008).

i. Celulosa. Es el mayor constituyente de las plantas y la molécula orgánica más abundante en la tierra, es un biopolímero lineal de moléculas de β - glucopiranosa unidas por enlaces glucosídicos β 1- 4 (Figura 4). Cada dos residuos de glucosa están ordenados en dirección opuesta y forman unidades de celobiosa, estas unidades se repiten miles de veces creando cadenas de celulosa que están enlazadas por puentes de hidrogeno, lo que da lugar a las microfibrillas (Villadsen et al., 2011) (Figura 5).

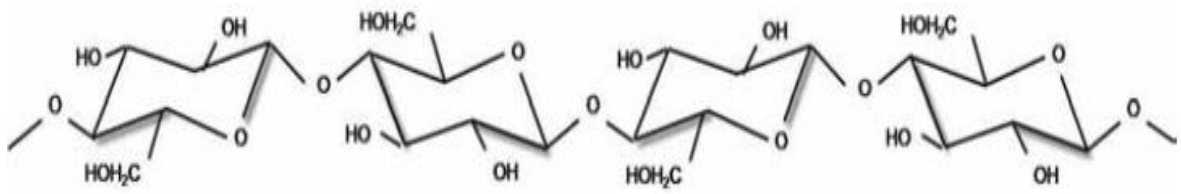


Figura 4. Estructura molecular de la celulosa.

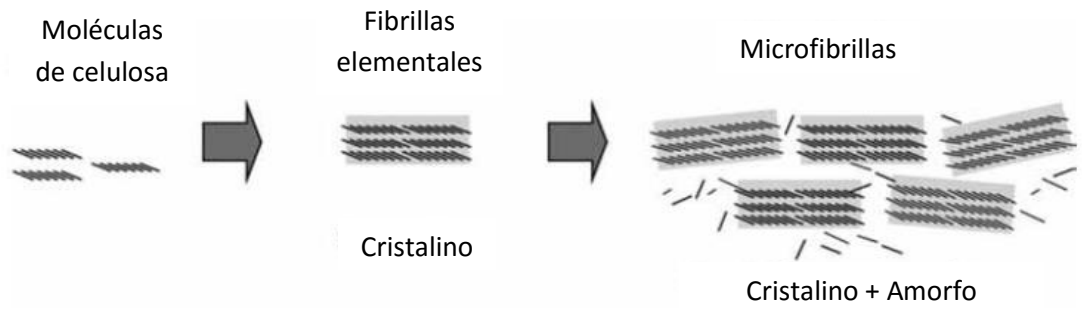


Figura 5. Microfibrillas de celulosa.

ii. Hemicelulosa. Es el segundo mayor componente de la biomasa, es un polímero heterogéneo de pentosas (incluyendo xilosa y arabinosa), hexosas (mayormente manosa, seguido de glucosa y galactosa) y azúcares ácidos (Figura 6).

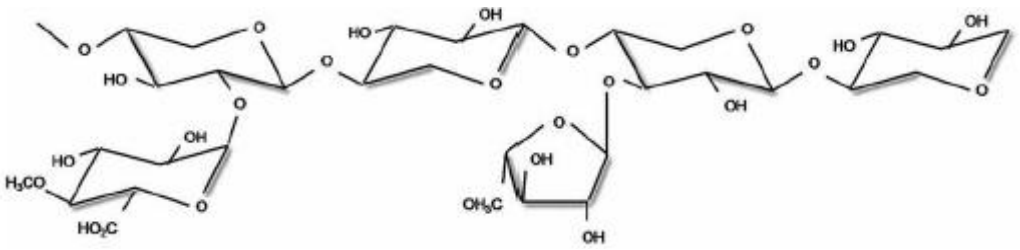


Figura 6. Estructura de la hemicelulosa (arabinoglucuronoxilano).

iii. Lignina. Es un polímero heterogéneo, el tercero en importancia, generalmente contiene tres alcoholes aromáticos (Figura 7). La lignina actúa como una barrera contra cualquier tipo de solución o enzima por medio de una matriz alrededor de las fibras de celulosa y hemicelulosa (Villadsen et al., 2011).

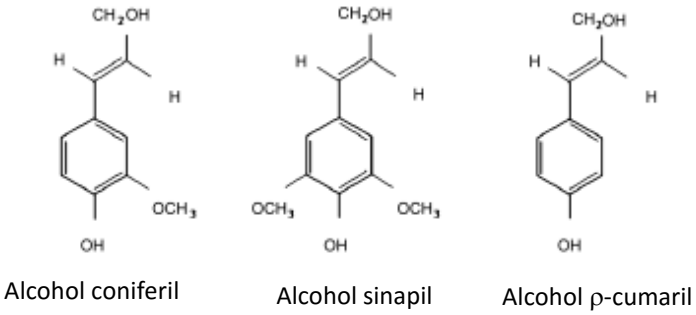


Figura 7. Monómeros de la lignina.

El Cuadro 1 muestra la composición de algunos materiales que tienen potencial como biomasa lignocelulósica (Haghighi et al., 2013). Las porciones de celulosa y hemicelulosa pueden ser transformadas en biocombustibles y químicos por medio de fermentación, pero este material debe estar hidrolizado para producir diversos azúcares monoméricos (Kim, 2013). Desafortunadamente, la biomasa lignocelulósica al ser muy recalcitrante, sin un pretratamiento apropiado, impide la liberación de los azúcares fermentables como glucosa, usualmente convirtiendo a la etapa del pretratamiento, en la parte más cara del proceso para la obtención del bioetanol (Luo et al., 2013).

Cuadro 1. Composición de algunas materias primas con potencial para elaborar biocombustibles (% en peso seco). Adaptado de (Haghighi et al., 2013).
ND: No determinado

Materia Prima	Celulosa	Hemicelulosa				Lignina	
		Xilano	Arabinano	Galactano	Manano	Soluble en ácido	Insoluble en ácido
Cáscara de cebada	33.6	30.5	6.1	0.6	Trazas	19.3	ND
Paja de cebada	33.8	21.9				13.8	
Mazorcas de maíz	33.7	31.9				6.1	
Rastrojo de maíz	38.3	21.0	2.7	2.1	ND	17.4	
Tallos de algodón	14.4		14.4			21.5	
Paja de trigo	30.2	18.7	2.8	0.8	ND	17	
Paja de arroz	31.1	18.7	3.6	ND	ND	13.3	
Paja de centeno	30.9	21.5	ND	ND	ND	22.1	3.2
Paja de avena	39.4	27.1				17.5	
Tallos de soya	34.5	24.8				9.8	
Tallos de girasol	42.1	29.7				13.4	
Pasto varilla (*Panicum virgatum*)	39.5	20.3	2.1	2.6	ND	17.8	4.0
Bagazo de caña	43.1	31.1				11.4	
Bagazo de sorgo dulce	27.3	13.1	1.4	ND	ND	14.3	
Sorgo forrajero	35.6	18.4	1.8	ND	ND	18.2	
Poda de olivo	25.0	11.1	2.4	1.5	0.8	16.2	2.2
Álamo	43.8	14.8	ND	ND	ND	29.1	
Picea	43.8	6.3	ND	ND	14.5	28.3	0.53
Roble	45.2	20.3	ND	ND	4.2	21.0	3.3

1.4 Pericarpio de maíz

Los residuos agroindustriales tales como pericarpio de maíz, olote, rastrojo de trigo y paja de arroz contienen de 20 a 40% de hemicelulosa (Saha, 2003). Entre ellos, el PM destaca por ser altamente disponible en México, aproximadamente 0.1 millones de toneladas por año (Cuadro 2) (Díaz-Malváez et al., 2013).

El pericarpio de maíz es un subproducto de la molienda húmeda del maíz, compuesto por cascarillas de maíz y almidón residual no extraído por el proceso de molienda (Figura 8). Esto lo convierte en un material altamente atractivo para la producción de bioetanol (Gáspár et al., 2007). Aunque actualmente no se han implementado estrategias para el aprovechamiento de este residuo en México, resulta importante el comenzar a trabajar con un material de tales características.

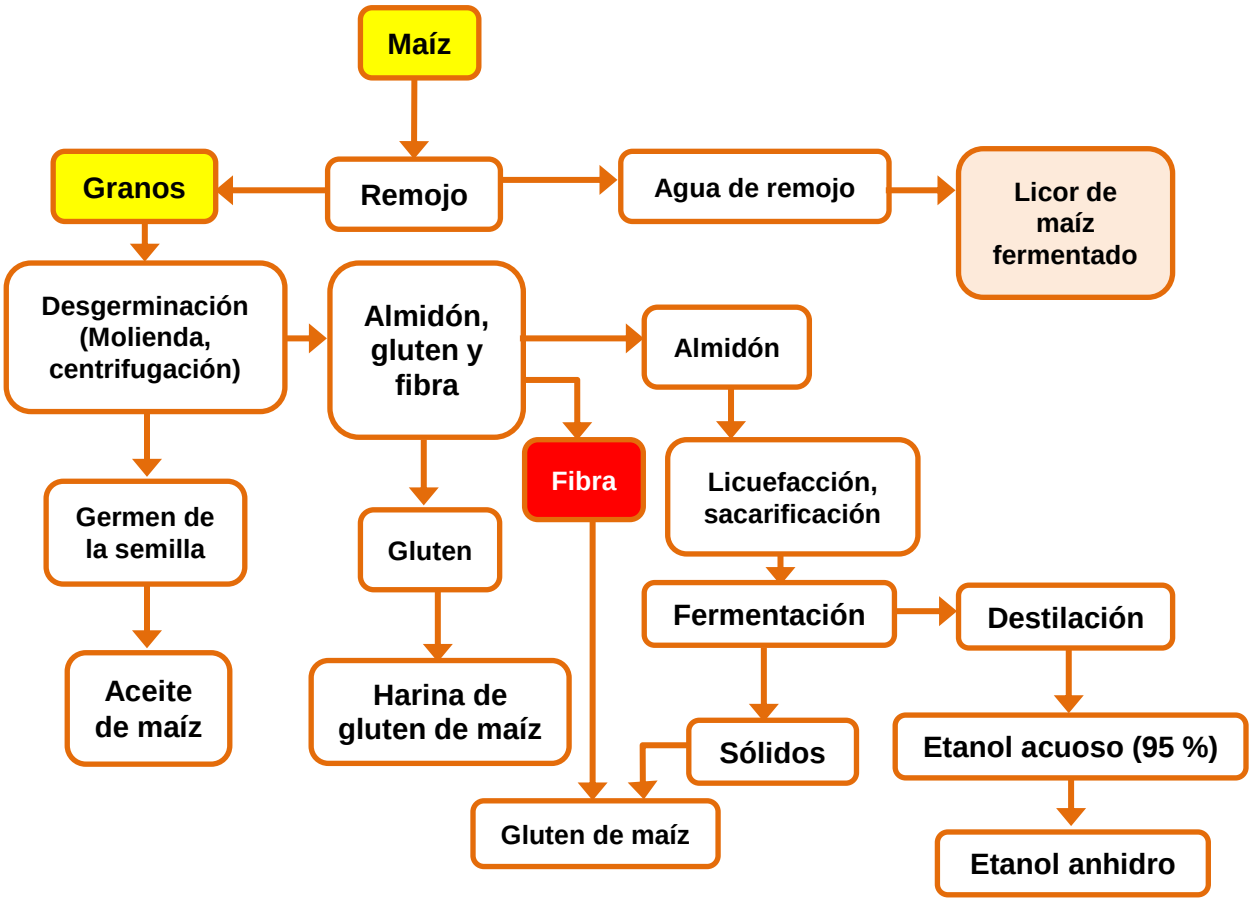


Figura 8. Diagrama de flujo del proceso de molienda húmeda del maíz.

En trabajos previos, el PM empleado para este trabajo fue caracterizado en su composición, la cual se muestra en el Cuadro 2.

Cuadro 2. Constituyentes del pericarpio de maíz. Tomado de Díaz-Malváez et al (2013)

Composición química	Pericarpio de maíz (%Base seca)
Humedad	8.15 ±0.06*
Proteína (Nx6.25)	5.47±0.03
Extracto etéreo	0.25±0.03
Cenizas	0.8±0.03
Fibra detergente neutral	84.95±0.77
Fibra detergente ácida	20.70±0.23*
Hemicelulosa	64.25±0.96
Celulosa	18.12±0.23*
Lignina	2.58±0.40*

*Medias de tres réplicas ± desviación estándar

1.5 Pretratamientos de la biomasa lignocelulósica

Las principales dificultades en los esquemas de bioconversión de la biomasa radican en la composición heterogénea de los polisacáridos de las paredes celulares de las plantas y la naturaleza recalcitrante de la parte celulósica de los sustratos. Es decir, fibras celulósicas altamente cristalinas y por lo tanto muy resistentes a la hidrólisis catalizada por enzimas (Kim, 2013).

El proceso de hidrólisis de la lignocelulosa a monosacáridos fermentables continúa siendo técnicamente problemático porque la digestibilidad de la celulosa se ve obstaculizada por factores fisicoquímicos, estructurales y de composición (Alvira et al., 2010). Uno de los inconvenientes más importantes es la degradación de la lignina, ya que está presente como recubrimiento protector convirtiendo a la celulosa y la hemicelulosa, recalcitrante a la hidrólisis enzimática (Figura 9) (Chaturvedi y Verma, 2013).

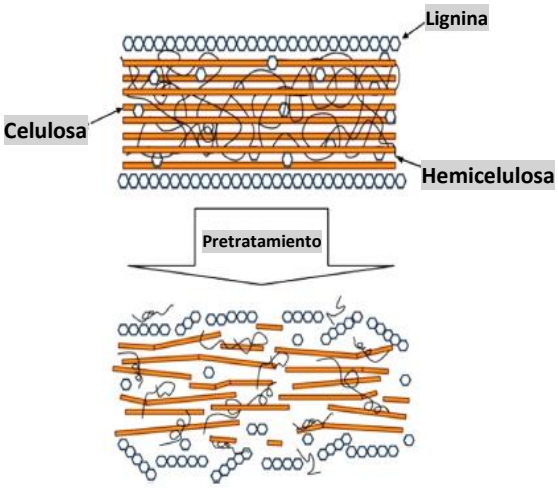


Figura 9. Esquema del pretratamiento en materiales lignocelulósicos. Adaptado de Haghighi et al (2013).

Por lo tanto, los pretratamientos van encaminados a incrementar la accesibilidad de las enzimas hacía la biomasa y aumentar los rendimientos de los azúcares fermentables. Este tipo de tecnologías pueden clasificarse en cuatro diferentes categorías incluyendo: físicos, químicos, fisicoquímicos y biológicos (Haghighi et al., 2013).

Los efectos comunes que tiene el pretratamiento sobre la biomasa son los siguientes (Kim, 2013):

- Decremento de la lignina, hemicelulosa y componentes extraños.
- Aumento del área superficial, tamaño y área del poro.
- Reducción de la cristalinidad de la celulosa.
- Mejora en la accesibilidad de la enzima al sustrato celulósico.

La hidrólisis ácida de la biomasa puede despolimerizar celulosa y hemicelulosa a monómeros sin un pretratamiento, pero el ácido debe ser recuperado por razones económicas y ambientales, mientras que la hidrólisis enzimática emplea microorganismos o sus enzimas en alguna etapa del proceso.

Bhatia et al. (2012) mencionan que los objetivos comunes del pretratamiento incluyen:

- Producción de sólidos altamente digeribles que mejoran los rendimientos de azúcares durante la hidrólisis enzimática, evitar la degradación de los mismos (principalmente pentosas), incluyendo los derivados de la hemicelulosa.
- Minimización de la formación de inhibidores que interfieran en la fermentación.
- Recuperación de la lignina para la conversión a subproductos de valor agregado.
- Rentabilidad bajo la operación de reactores de tamaño medio y minimizando los requerimientos de calor y energía.

En el Cuadro 3 se presentan algunos de los tratamientos que han surgido como alternativa para aumentar la reactividad de la celulosa e incrementar los azúcares fermentables.

El objetivo de los pretratamientos físicos tales como la molienda (usualmente considerada como el primer paso del pretratamiento), picado, cortado en trozos pequeños o el molido es incrementar el área superficial y reducir el tamaño de partícula de los materiales lignocelulósicos. Esto ayuda a un mayor grado de despolimerización y reducción de los cristales en la materia prima (Haghighi et al., 2013).

Los tipos de molinos más comunes usados en el proceso de producción de bioetanol son los molinos de bolas, rodillos, martillos o discos, el tamaño de partícula alcanzado dependerá del pretratamiento físico, ya que después del triturado, molienda o molturación el tamaño de partícula se reduce a 10-30 mm y 0.2-2 mm respectivamente (Sun y Cheng, 2002).

Cuadro 3. Pretratamientos y condiciones de reacción representativas. Adaptado de (Kim, 2013).

Método	Condiciones de reacción	Características
Ácido diluido	130-220 ºC, Alta presión (3-4 atm), ácido sulfúrico del 0.1 – 3.0 %, 2 a 30 min, carga de sólidos del 10 – 40 %	La mayoría de la hemicelulosa solubilizada, deslignificación del 20 al 40 %
Explosión de vapor	Impregnación ácida con H_2SO_4,SO_2, 160 – 270 ºC, de 1 a 30 minutos	70-90 % de hemicelulosa en disolución, 20-40 % deslignificación
Agua caliente (pH controlado)	160-190 ºC, 20-60 min, altas presiones (6-14 atm), carga de sólidos de 5 a 30 %	La mayoría de la hemicelulosa es solubilizada, 30-40 % de deslignificación
Percolación con amoniaco reciclado (ARP)	150-190 ºC,10-20 min, 10-15 % amonio, alta presión (9-17 atm), carga de sólidos de 10-30 %	50 % de hemicelulosa disociada, 70-95 % de deslignificación
Remojo en amoniaco (SAA)	30-90 ºC, 4-72 h, 5-30 % amoniaco, carga de sólidos de 15 al 30 %	10-20 % Hemicelulosa en disolución, 60-70 % deslignificación; condiciones suaves, proceso simple
(Baja concentración de hidróxido de amonio) LAAM	Tratamiento con hidróxido de amonio de 30 segundos a 10 minutos, pretratamiento a 30-150 ºC de 4h a 7 días, 30-80 % de mezcla	Restos de hemicelulosa en forma sólida, lignina no removida, cargas de químico/agua extremadamente bajas, sin etapa de lavado, largo tiempo de reacción
Aplicación de amoniaco a alta temperatura y presión (AFEX)	70-90 ºC, >5 min, altas presiones (15-20 atm), hidróxido de amonio (carga de sólidos de 60-90%)	Restos de hemicelulosa en forma sólida; sin remoción de lignina.
Cal (con o sin aireación)	De 25-130 ºC, 1h – 2 meses, 0.05 – 0.15 g de $Ca(OH)_2$ en agua/g de biomasa (carga de sólidos de 5 a 20 %)	20-40 % de hemicelulosa en disolución; 60-80 % de deslignificación, desacetilación, baja intensidad de energía

El inconveniente más importante de la molienda es el alto consumo de energía aunque una alternativa que ha surgido para resolver esta problemática es la molienda húmeda de discos. Sin embargo los rendimientos más altos de glucosa y xilosa se han obtenido empleando el molino de bolas en comparación a la molienda húmeda con discos (Haghighi et al., 2013).

Se han estudiado numerosos agentes que causan hinchazón en la celulosa y un rompimiento de la estructura cristalina por escisión de los puentes de hidrógeno, esto se puede lograr por medio de tratamientos químicos de dos maneras (Kim, 2013). El primero es la hinchazón intercristalina causada por la absorción de agua y sustancias químicas, lo que provoca un cambio de volumen reversible de hasta aproximadamente 30 %. El segundo modo es la hinchazón intercristalina, que implica la penetración en la estructura cristalina, lo que puede conducir a un aumento de tamaño ilimitado o la disolución completa de la celulosa.

El pretratamiento ácido; en particular donde se usa ácido sulfúrico, es el más comúnmente empleado para hidrolizar lignocelulosa ya que es el más efectivo en cuanto a costos y está más cerca de ser comercializado (Jung and Kim, 2015). Esto debido a que en el proceso, los polisacáridos (principalmente hemicelulosas) son degradados a monosacáridos (Haghighi et al., 2013) también se pueden emplear ácidos como oxálico o peracético (Chaturvedi y Verma, 2013).

Bhatia et al (2012) señalan que el ácido sulfúrico (H_2SO_4) diluido es el más comúnmente usado, se emplea en el pretratamiento de una amplia variedad de biomasa como algunos tipos de pasto, rastrojo, picea (madera suave) y álamo. También han sido usados ácidos tales como ácido sulfúrico (H_2SO_4) o clorhídrico (HCl) concentrados. Sin embargo, a pesar de que son altamente efectivos en la hidrólisis de la celulosa, son tóxicos, corrosivos y peligrosos además de que requieren reactores que sean resistentes a la corrosión (Sun y Cheng, 2002).

La mayoría de los pretratamientos químicos para mejorar la digestibilidad enzimática generan hidrolizados que contienen una mezcla de azúcares de seis y cinco carbonos además de lignina. Sin embargo el hidrolizado requiere de una detoxificación ya que los microorganismos usados en la fermentación subsecuente se desarrollan de una

manera muy pobre debido al ambiente inhibitorio, lo que convierte en la desventaja de la mayoría de los tratamientos químicos deben superar (Kim, 2013).

El pretratamiento biológico usa microorganismos y sus enzimas para la deslignificación selectiva de la lignocelulosa (Bhatia et al., 2012). Esta etapa se diseña empleando microorganismos celulolíticos, los cuales sintetizan enzimas durante la hidrólisis, entre ellos destacan los hongos filamentosos, que son omnipresentes en el medio ambiente, el suelo, las plantas y los residuos lignocelulósicos (Chaturvedi y Verma, 2013).

Philbrook et al (2013) señalan que existen ciertas ventajas en el uso de microorganismos en comparación a los pretratamientos físicos y químicos, las cuales son: el funcionamiento de los microorganismos en condiciones ambientales, con lo que se minimiza el uso de energía térmica y eléctrica. Sin embargo, la tasa de hidrólisis en la mayoría de los pretratamientos biológicos es muy baja comparada con los físicos o químicos (Bhatia et al., 2012).

La eficiencia más alta de los pretratamientos biológicos se ha alcanzado por medio de la degradación de la lignina, a través de los hongos de pudrición blanca y una posterior degradación de la celulosa, por medio de los hongos de pudrición parda y blanda. Usando Ceriporiopsis subvermispora para la producción de bioetanol a partir de rastrojo de maíz, se degradó poco más de 31.59 % de la lignina, mientras se mantenía el 94 % de la celulosa por 18 días de pretratamiento. Entre las especies más conocidas de hongos de pudrición blanca que degradan la lignina utilizados hasta la fecha, los más eficientes son los *Phanerochaete chrysosporium*, debido a su alta capacidad de biodegradación de la lignina y una elevada tasa de crecimiento (Haghighi et al., 2013).

Trichoderma reesei es uno de los hongos más eficientes y productivos para obtener enzimas a un grado industrial, el grupo de celulasas más comunes que produce son β - glucosidadas, glucanasas y exoglucanasas que atacan los enlaces β→1,4 (Limayem y Ricke, 2012). El Cuadro 4 presenta los pretratamientos físicos, químicos y biológicos más representativos para la biomasa lignocelulósica.

Por otro lado se debe tener en cuenta que, independientemente del pretratamiento usado, se producen compuestos inhibidores durante el proceso, los cuales inciden sobre la actividad microbiana en la etapa de la hidrólisis, los cuales se pueden clasificar en tres grandes grupos (Haghighi et al., 2013): ácidos débiles tales como el ácido

levulínico, acético y fórmico; derivados del furano tales como el 5-hidroxi-2-metil furfural (HMF), furfural y compuestos fenólicos.

Cuadro 4. Características de los pretratamientos (Limayem y Ricke, 2012)

Pretratamiento	Característica clave
Acido diluido (H_2SO_4, HCl [0.5 – 5 %])	Técnica práctica y simple, temperaturas intermedias (120 ºC – 220 º C) Hidrólisis efectiva de la hemicelulosa con alto rendimiento de azúcares Generación de inhibidores tóxicos Requiere pasos de recuperación
Agua caliente	La mayoría de la hemicelulosa puede ser disuelta No hay generación de inhibidores químicos o tóxicos No es efectiva con madera suave
Cal	Alto rendimiento total en azúcares incluyendo pentosas y hexosas Efectivo en madera dura y desechos agroindustriales Altas temperaturas y presiones obstaculizan las operaciones químicas Problemas en la escalabilidad comercial
Aplicación de amoniaco a alta temperatura y presión (AFEX)	Efectivo contra residuos agroindustriales, principalmente rastrojo de maíz sin la formación de compuestos tóxicos finales No adecuado para materiales con altas cantidades de lignina Recuperación del amonio No contamina el agua
Percolación con amonio reciclado (ARP)	Alta redistribución de la lignina (85%) Reciclado del amonio Se alcanzan los rendimientos teóricos
Explosión de vapor con catálisis	Efectivo en residuos agroindustriales y madera dura Se remueven altas fracciones de hemicelulosa No es efectivo aplicado en madera suave
Solventes orgánicos	Se alcanzan altos rendimientos en combinación con ácido Es efectivo en madera dura y suave Baja concentración de azúcares de hemicelulosa Formación de inhibidores tóxicos Se requiere del reciclado de los solventes orgánicos Se requiere mucha inversión
Pretratamiento con sulfito para evitar recalcitrancia (SPORL)	Efectivo en materiales con alto contenido de lignina, madera dura y suave La más alta eficiencia energética de todos los pretratamientos Mínima formación de inhibidores Combinado con explosión de vapor se vuelve efectivo en madera suave Eficiencia en costos
Ozono	Efectivo en la remoción de la lignina en una amplia variedad de materiales celulósicos sin la formación de inhibidores Caro
Oxidación alcalina húmeda	La combinación de O_2, agua, altas temperaturas y álcali reduce los inhibidores Alta deslignificación y solubilización de los materiales celulósicos Baja hidrólisis de oligómeros
Bioconversión fúngica	Amigable con el ambiente Poco consumo de energía y químicos Bioconversión lenta

1.6 Hidrólisis y sacarificación

En la hidrólisis se rompen los enlaces glucosídicos β→1,4 y hay dos métodos convencionales para hidrolizar la biomasa lignocelulósica, como se detalla a continuación (Guo et al., 2012).

1.6.1 Hidrólisis directa

Este proceso emplea ácidos inorgánicos y puede ser aplicando una hidrólisis con ácidos diluidos o concentrados (Limayem y Ricke, 2012). Los ácidos concentrados pueden entrar a la estructura de la celulosa, lo cual provoca su hinchamiento y ruptura de los enlaces glucosídicos, esto se logra a presión atmosférica y temperaturas moderadas (ej. 50 ºC) con una concentración por arriba del 50 % ($v \cdot v^{-1}$) usando ácido sulfúrico (Guo et al., 2012).

Mientras que la reacción con ácidos diluidos (1–3 % $v \cdot v^{-1}$) requiere altas temperaturas (200 a 240 ºC) para romper los cristales de celulosa (Limayem y Ricke, 2012)

Estas condiciones son menos severas y se logran altos porcentajes de conversión de xilanos a xilosa. Dándole viabilidad económica al proceso, ya que el xilano representa más de la tercera parte de los carbohidratos en la mayoría de los materiales lignocelulósicos (Sun y Cheng, 2002).

1.6.2 Hidrólisis enzimática (sacarificación)

Este procedimiento se lleva a cabo usando celulasas después del pretratamiento, las celulasas constan de una mezcla de endoglucanasas, exoglucanasas y celobiohidrolasas y cataliza la degradación de celulosa a oligomeros bajo el siguiente mecanismo:

Las endoglucanasas atacan los enlaces glucosídicos β→1,4 de los polímeros de cadena larga, liberándose fragmentos de los extremos.

Las exoglucanasas, tales como β–glucosidasas actúan sobre los extremos reductores y no reductores para liberar oligosacáridos.

Las celobiohidrolasas escinden el polímero a partir de los extremos reductores para liberar celobiosa (Guo et al., 2012).

Tanto las bacterias como los hongos pueden producir celulasas capaces de hidrolizar materiales lignocelulósicos, estos pueden ser aerobios o anaerobios, mesófilos o termófilos (Sun y Cheng, 2002).

1.7 Fermentación

En el proceso de fermentación, los productos hidrolizables, que incluyen monómeros como hexosas (glucosa, manosa y galactosa) y pentosas (xilosa y arabinosa), son transformados a productos de valor agregado tales como etanol (Bhatia et al., 2012).

Una vez que la biomasa ha sido pretratada por medio de hidrólisis ácida o enzimática, la solución de celulosa se convierte en azúcares libres fermentables. Estos azúcares se fermentan con ayuda de *S. cerevisiae* bajo condiciones anaeróbicas y una temperatura controlada, 30 ºC como óptimo, hasta convertirse en etanol (Limayem y Ricke, 2012).

Tradicionalmente, la hidrólisis y la fermentación se han llevado a cabo de manera separada en la obtención del alcohol (Limayem y Ricke, 2012). La ventaja de este método es que ambos procesos pueden ser optimizados individualmente (ej: la temperatura óptima de la hidrólisis es de 45-50 ºC mientras que en la fermentación es de 30ºC). Sin embargo, su principal inconveniente es la acumulación de inhibidores durante el pretratamiento (Bhatia et al., 2012).

Por otro lado, la implementación simultánea de la hidrólisis y la fermentación ha sido la más importante mejora en la producción de bioetanol a partir de biomasa lignocelulósica. Este enfoque combina las celulasas y los microorganismos fermentadores en un reactor, permitiendo en un solo paso, la producción de azúcares y la fermentación a alcohol. (Bajpai, 2013).

La operación simultánea de hidrólisis y fermentación permite superar la inhibición enzimática ya que la concentración de la glucosa se mantiene baja y el etanol no inhibe de manera importante la actividad de las enzimas, además de que reduce los costos de operación (Kumar et al., 2010). Actualmente no existe un microorganismo capaz de llevar a cabo el proceso de hidrólisis y fermentación de manera rentable (Cuadro 5).

Cuadro 5. Ventajas y desventajas de potenciales organismos empleados para la fermentación de bioetanol basado en lignocelulosa. Adaptado de Limayem y Ricke, 2012.

Microorganismo	Ventajas	Inconvenientes
Saccharomyces cerevisiae	Productora de alcohol Alto rendimiento en alcohol (90 %) Alta tolerancia a alcohol (>10 % v/v) Modificaciones genéticas factibles	Incapaz de fermentar xilosa y arabinosa Termolábil y sensible a hidrólisis enzimática
Candida shehatae	Fermenta xilosa	Baja tolerancia a alcohol Poco rendimiento en fermentación Microaerofílica No fermenta xilosa a bajo pH
Zymomonas mobilis	Rendimientos de etanol superan a la *S. cerevisiae* Alta tolerancia al etanol (>14 % v/v) Modificaciones genéticas factibles No requiere de oxigeno adicional	No es capaz de fermentar xilosa Baja tolerancia a inhibidores Necesita condiciones de pH neutro
Pichia stipitis	Fermentación de xilosa Rendimientos de etanol (82 %) Fermenta hexosas Celulasas favorecen SSF	Intolerancia a altas concentraciones de etanol (cercanas a 40 g/L) No fermenta la xilosa a bajo pH Sensible a inhibidores químicos Microaerofílica Re asimila el etanol formado
Pachysolen tannophilus	Fermenta xilosa	Bajo rendimiento de etanol Microaerofílica No fermenta la xilosa a bajo pH
Escherichia coli	Fermenta pentosas y hexoas Susceptibilidad a modificaciones genéticas	La represión del catabolismo interfiere en la co-fermentación Tolerancia a etanol limitada pH y T de crecimiento estrechos Producción de ácidos orgánicos Estabilidad genética aun no probada Baja tolerancia a inhibidores y etanol
Kluveromyces marxianus	Térmofilo (38 ºC) Adecuado para el proceso SSF/CBP Costos de enfriamiento reducidos Contaminación reducida Fermenta muchos azúcares Modificaciones genéticas factibles	Exceso de azúcar afecta los rendimientos de alcohol Baja tolerancia al etanol Fermentación de la xilosa es pobre y conduce principalmente a la formación de xilitol
Bacterias termofílicas: *Thermoanaero-bacterium saccharolyticum* *Th. ethanolicus* *Clostridium thermocellum*	Termoestable (70 ºC) Usada en proceso SSCombF/CBP Fermenta variedad de azúcares Muestran actividad celulolítica Modificable genéticamente	Baja tolerancia al etanol

1.8 Recuperación y purificación

El producto de la fermentación de la biomasa lignocelulósica es una mezcla de etanol, masa celular y agua. En esta mezcla el etanol tiene una baja concentración (≤5 % $p \cdot p^{-1}$) en comparación al etanol proveniente de maíz (Bajpai, 2013).

Cuando el bioetanol es usado como combustible, la concentración debe ser superior a 99 % $p \cdot p^{-1}$) (Alvarez et al., 2012), para alcanzar estas concentraciones, el bioetanol requiere de sucesivas separaciones y purificaciones del agua que contiene.

En la primera etapa de la destilación, la mayor cantidad de agua permanece con los sólidos, mientras que el producto (30 a 40 % de etanol) es nuevamente destilado en una columna por rectificación o fraccionamiento, hasta alcanzar la concentración por debajo del azeótropo (95 – 96 %) (Bajpai, 2013).

Cuando se pretende alcanzar una concentración por arriba del 95 % se requiere de operaciones adicionales debido a las propiedades azeotrópicas de la mezcla agua – etanol (Bizzo et al., 2014). El etanol forma con el agua un azeótropo binario de mínimo punto de ebullición a 78.7 ºC (1 atm) con un contenido en peso de alcohol del 95.6%, por lo cual no es posible obtener etanol absoluto debido a que su punto de ebullición es ligeramente superior al del azeótropo (Pedraza, 2012). Para obtener etanol en estado anhidro se pueden emplear diversos métodos tales como: destilación azeotrópicas, destilación extractiva, extracción líquido – líquido, adsorción o alguno método de separación hibrido complejo (Huang et al., 2008).

Una de las técnicas de separación de mezclas azeotrópicas más usadas en la industria es la destilación extractiva con solventes como el benceno, pentano, furfural, etilenglicol, dietil éter y tolueno. La destilación extractiva con sales es muy similar a la que se lleva a cabo con solventes. Se lleva a cabo introduciendo la sal en la parte superior o cerca de la bandeja superior de la columna de destilación, fluye hacia abajo a lo largo de la columna y es removida con el producto de fondo (Ligero y Ravagnani, 2003). Entre las sales más comúnmente usadas son el acetato de potasio, acetato de sodio y cloruro de calcio (Huang et al., 2008).

2. JUSTIFICACIÓN

De los residuos agroindustriales que actualmente se generan, la mayoría son destinados a la alimentación animal o quemados para restituir minerales y carbono al suelo. Sin embargo, esta práctica trae como consecuencia emisiones nocivas para el ambiente lo cual representa una amenaza al ecosistema, haciendo necesario desarrollar metodologías que permitan la utilización de estos recursos y de esta manera, disminuir los desechos generados, al obtener subproductos con mayor valor agregado. Muchos de estos residuos tienen potencial para obtener derivados con aplicaciones industriales, además de beneficios económicos importantes.

En el caso de los biocombustibles, el uso de residuos agroindustriales está tomando auge debido a que es una alternativa a las fuentes convencionales de obtención de energía tales como los recursos fósiles, cuyas reservas han comenzado a disminuir, además de que han generado un alto impacto en el ambiente debido a la liberación de CO_2 a la atmósfera.

El uso de desechos agroindustriales para producir biocombustibles presenta diversas ventajas, ya que no compite directamente con la industria de los alimentos y permite manejar los desechos de manera adecuada. Aunque la producción a escala industrial todavía no se lleva a cabo, países como Estados Unidos, China, India, Brasil y en la Unión Europea ya han hecho avances importantes en esta materia, como el establecimiento de plantas piloto y desarrollo de microorganismos genéticamente modificados para optimizar la fermentación de los residuos. Todavía quedan retos que enfrentar, tales como el desarrollo de pretratamientos que sean adecuados para los distintos tipos de desechos, costeables y que no generen inhibidores para procesos posteriores. Además, se requiere de microorganismos que sean capaces de fermentar varios sustratos simultáneamente para obtener altos rendimientos de etanol, para reducir el costo de su producción y hacerlo más competitivo frente a los combustibles derivados del petróleo. Es por ello que surge la importancia de desarrollar investigaciones que permitan conocer el potencial que representan los residuos que actualmente están desaprovechados.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

Analizar el efecto del pretratamiento ácido sobre la producción de azúcares y la fermentación de estos usando *Pichia stipitis* para obtener bioetanol a partir de pericarpio de maíz.

3.2 Objetivos específicos

- Determinar, mediante diseños experimentales, el efecto del tiempo, concentración de ácido sulfúrico y de pericarpio de maíz sobre la producción de azúcares fermentables.

- Evaluar la fermentación alcohólica de los azúcares presentes en la fracción líquida producto de la hidrólisis ácida del pericarpio de maíz usando *P. stipitis*

- Simular el proceso de producción de bioetanol mediante el programa SuperPro Designer.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Materia prima

El pericarpio de maíz (PM) fue proporcionado por Ingredion, San Juan del Río, Querétaro, México. El PM se secó en horno a 60 ºC por 48 h (Memmert, Mod.100-800) hasta obtener un peso constante. Posteriormente se mezcló para homogenizar la muestra y se almacenó a temperatura ambiente en bolsas de polietileno.

4.2 Material biológico

P. stipitis ATCC28217, la cual se propagó en placas de agar con extracto de levadura, peptona, agar y xilosa (YPDX) compuesto por ($g \cdot L^{-1}$): extracto de levadura, 10; peptona, 20; agar, 20 y xilosa, 20 a pH 5.0. Para la conservación la cepa se mantuvo en crioconservación (- 70 ºC), según la metodología descrita por Reddy y Gherna (2007) utilizando esferas de acrílico de 2 mm de diámetro.

4.3 Metodología

La estrategia experimental que se siguió fue la siguiente (Figura **10**):

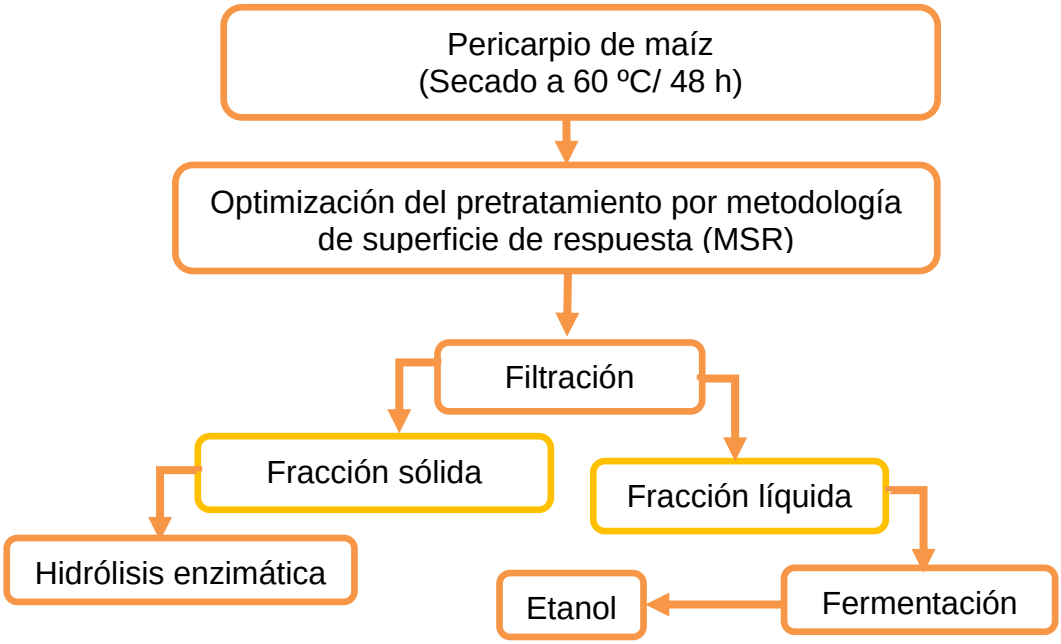


Figura 10. Esquema experimental para la obtención de bioetanol a partir de pericarpio de maíz.

4.3.1 Pretratamiento

Los factores de estudio en el pretratamiento se seleccionaron en base a lo reportado en la literatura para diversos materiales lignocelulósicos (Sun y Cheng, 2002; Ballesteros et al. 2008; Hsu et al., 2010; Guo et al., 2012; Ruiz et al. 2013). Por lo que se probó el tiempo de hidrólisis, la concentración de PM y la concentración de ácido sulfúrico. El pretratamiento del PM se llevó a cabo bajo la metodología de la Figura 11.

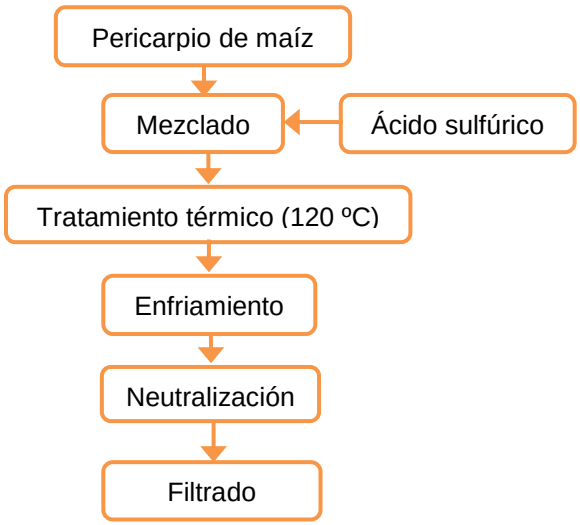


Figura 11. Metodología del pretratamiento del PM.

El PM se mezcló con el ácido sulfúrico diluido, se probaron tres concentraciones de ácido; 1.5, 3.25 y 5 (%v·v^{-1}) y tres relaciones PM inicial/líquido; 10, 15 y 20 (% p·v^{-1}) en un volumen final de 30 mL. El tratamiento térmico se dio en autoclave (Felisa, Fe-398) a 120 ºC con tres tiempos de hidrólisis; 15, 27 y 40 min. Después se enfriaron a 20 ºC para ser neutralizados con NaOH a pH 5 – 5.5. Las muestras de los diferentes tratamientos se filtraron y a la fracción liquida se le midieron azúcares reductores (Wood et al., 2012) y glucosa por kit enzimático (R-Biopharm, Darmstadt, Alemania). La fracción sólida se secó en estufa a 100 ºC por 24 h hasta peso constante con el fin de medir la eficiencia del pretratamiento en base al PM hidrolizado, utilizando la ecuación 1:

$$PM\ hidrolizado\ (\%) = \frac{(PM\ inicial - PM\ residual)}{PM\ inicial} x100 \quad (1)$$

También se calculó el rendimiento en azúcares por cada 100 g de PM. La codificación de los factores se manejó según el Cuadro 6.

Cuadro 6. Valores codificados de las variables en el DFC.

Factor	Variable codificada	Valores de los niveles codificados		
		-1	0	1
Tiempo de hidrólisis (min)	x_1	15	27	40
Ácido sulfúrico (% v·v^{-1})	x_2	1.5	3.25	5
PM inicial (%p·v^{-1})	x_3	10	15	20

4.3.1.1 Optimización del pretratamiento por metodología de superficie de respuesta (MSR)

Para optimizar el pretratamiento del pericarpio de maíz se siguió la MSR para identificar qué condiciones hacen que la variable de respuesta estimada alcance un valor óptimo (Castaño y Domínguez, 2010). Además, es una herramienta que se ha usado ampliamente para la optimización de la producción de bioetanol a partir de biomasa (Qi et al., 2009; Ballesteros et al., 2008; Yoshida et al., 2010; Saucedo-Luna et al., 2010; Ruiz et al., 2013). Al ubicarse en este tratamiento, se llevan a cabo experimentos adicionales en la región circundante con un diseño que permita conocer los efectos cuadráticos (Castaño y Domínguez, 2010) (Figura 12).

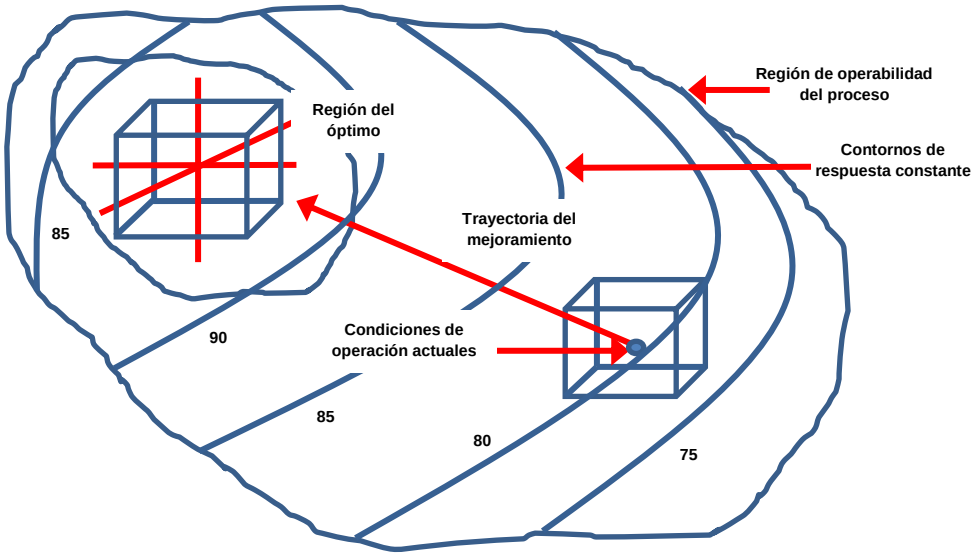


Figura 12. Esquema de la MSR. Tomado de Montgomery (2005).

4.3.1.2 Diseño Factorial Completo (DFC)

Como parte de la MSR, se usó al principio un DFC 2^3 (Cuadro 7) para identificar los factores que tuvieran significancia sobre los azúcares reductores ($g \cdot L^{-1}$) (y_1), glucosa ($g \cdot L^{-1}$) (y_2), PM hidrolizado (%) (y_3) y rendimiento de azúcares ($g \cdot 100$ g PM^{-1}) (y_4) (Montgomery, 2005).

Cuadro 7. Factores y niveles para el DFC.

Orden	Clave	Tiempo (min) (x_1)	Ácido sulfúrico (% $v \cdot v^{-1}$) (x_2)	PM inicial (% $p \cdot v^{-1}$) (x_3)
1	+++	40	5	20
2	−+−	15	5	10
3	−+−	15	5	10
4	−−−	15	1.5	10
5	−+−	15	5	10
6	−−−	15	1.5	10
7	+−−	40	1.5	10
8	0	27	3.25	15
9	0	27	3.25	15
10	0	27	3.25	15
11	++−	40	5	10
12	+−+	40	1.5	20
13	+−−	40	1.5	10
14	−++	15	5	20
15	++−	40	5	10
16	++−	40	5	10
17	−−−	15	1.5	10
18	−−+	15	1.5	20
19	+−−	40	1.5	10
20	+−+	40	1.5	20
21	+++	40	5	20
22	−−+	15	1.5	20
23	−−+	15	1.5	20
24	−++	15	5	20
25	−++	15	5	20
26	+++	40	5	20
27	+−+	40	1.5	20

Los factoriales 2^n o sus fracciones permiten identificar los factores significativos y las regiones de respuesta óptima (Kuehl, 2001)**.** El DFC (Cuadro 7) constaba de ocho tratamientos con tres repeticiones y tres réplicas al centro totalmente aleatorizado para verificar la posible existencia de curvatura en la respuesta (Castaño y Domínguez, 2010).

4.3.1.3 Diseño central compuesto (DCC)

Al detectar un cambio en la respuesta (curvatura) en el DFC, se construyó un DCC para determinar las condiciones donde la respuesta alcanzaba un óptimo. El DCC (Cuadro 8) se construyó con seis réplicas al centro, con seis puntos estrella (±α) y ocho tratamientos factoriales. Para generar un diseño rotable, se asignó un valor de α de 1.68.

Cuadro 8**.** Factores y niveles para el DCC.

Clave	**Tiempo (min)** x_1	**Ácido sulfúrico (% v·v^{-1}) (x_2)**	**PM inicial (% p·v^{-1}) (x_3)**
0	27	3.25	15
0	27	3.25	15
++−	40	5	10
0α0	27	0.307	15
00α	27	3.25	6.59
00A	27	3.25	23.4
+−−	40	1.5	10
0	27	3.25	15
0	27	3.25	15
A00	48	3.25	15
−−+	15	1.5	20
0	27	3.25	15
−++	15	5	20
α00	6	3.25	15
+++	40	5	20
+−+	40	1.5	20
0A0	27	6.19	15
−+−	15	5	10
−−−	15	1.5	10
0	27	3.25	15

Las variables a optimizar fueron el contenido de azúcares reductores (g·L^{-1}) (y_1), glucosa (g·L^{-1}) (y_2), PM hidrolizado (%) (y_3) y rendimiento de azúcares (g·100 g^{-1} PM^{-1}) (y_3). Se hicieron cinco pruebas confirmatorias del punto óptimo predicho. El análisis estadístico de los diseños experimentales se hicieron usando el programa Design Expert versión 9.0.4.1 (Stat-Ease Inc., MN, EUA).

4.3.2. Fermentación del hidrolizado líquido

4.3.2.1 Activación de *Pichia stipitis* en medio YPDX

Para conocer el perfil de crecimiento y el momento de la toma del inóculo, la conserva de *P. stipitis* (almacenada a -70 ºC), se activó en caldo YPDX estéril. Se incubó a 175 rpm por 24 h a 30 ºC en agitador orbital (MaxQ6000, ThermoScientific). Se realizaron dos resiembras (10 % $v \cdot v^{-1}$) bajo las mismas condiciones y se monitoreo el crecimiento por turbidimetría (A_{600}), tomando muestras a las 0, 2, 4 6, 8, 10, 12, 24 y 45 h (Genesys 10 UV, ThermoScientific).

4.3.2.2 Detoxificación del hidrolizado líquido de pericarpio de maíz (HLD)

Trabajando según las condiciones del punto óptimo, la fracción líquida generada a partir del proceso de hidrólisis del PM, se detoxificó usando carbón activado (C9157, Sigma, EUA) (Miyafuji et al., 2003; Arslan y Eken-Saraçoğlu, 2010; Klasson et al., 2013; Mateo et al., 2013). Para esto, el hidrolizado líquido se mezcló en proporción 5:1 ($v \cdot p^{-1}$) hidrolizado: carbón activado. Se mezclaron por 10 min y se filtraron mediante bomba de vacío (Fisher Scientific, M8C) usando papel filtro Whatman No. 1. Para comprobar la efectividad del pretratamiento se realizó un análisis espectrofotométrico (A_{280}) de los hidrolizados antes y después del tratamiento. A partir de los resultados generados, se calculó el índice R_{280} (Ecuación 2).

$$R_{280} = \frac{Absorbancia\ del\ hidrolizado\ tratado\ con\ carbón}{Absorbancia\ del\ hidrolizado\ \sin\ tratar} \qquad (2)$$

Este valor permite conocer de manera aproximada la efectividad del carbón activado en la remoción de furanos y compuestos fenólicos de los hidrolizados (Miyafuji et al., 2003). Además del índice R_{280}, se midieron los azúcares reductores por el método de Wood et al., (2012).

4.3.2.3 Adaptación de la *P. stipitis* en HLD

Después de conocer la dinámica de crecimiento de *P. stipitis* en caldo YPDX, se evaluó su crecimiento en el HLD para comparar ambas dinámicas y poder generar un inóculo capaz de crecer en el hidrolizado.

Para esto, el HLD se esterilizó por filtración (membrana de 0.45 µm, Merck Millpore) y la concentración de azúcares iniciales se fijó en 20 $g \cdot L^{-1}$ de manera que fuera similar al caldo YPDX. Se tomó el inóculo del crecimiento realizado como se describe en el apartado 5.3.2.1, cuando este alcanzó una densidad óptica (A_{600}) de 1.7 y se inoculó en HLD al 5% ($v \cdot v^{-1}$).

El HLD no fue suplementado debido a que existen diferentes reportes que señalan que puede crecer sin suplementación (Lee et al., 2000; Nigam, 2001; Agbogbo y Wenger, 2006). Se midió el crecimiento celular a las 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24 y 36 h mediante la A_{600} (Genesys 10 UV, Thermo Scientific).

4.3.2.4 Fermentación del HLD usando *P. stipitis*

Después de conocer el perfil de crecimiento de *P. stipitis* en el HLD, se estudió la fermentación del HLD bajo dos condiciones, HLD suplementado y sin suplementar. El HLD suplementado se enriqueció con ($g \cdot L^{-1}$): extracto de levadura, 5; $(NH_4)SO_4$, 0.47; KH_2PO_4, 12.8; Na_2HPO_4, 0.5; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.47. Los sustratos se ajustaron a pH 5.0 con NaOH 1 M (Bellido et al., 2011) y fueron esterilizados por filtración (0.45 µm, Merck Millipore).

El contenido de azúcares reductores del HLD se fijó en 45 $g \cdot L^{-1}$ ya que se ha reportado efectos inhibitorios de la xilosa por encima de los 40 $g \cdot L^{-1}$ (Lee et al., 2000). Se inocularon al 10 % ($v \cdot v^{-1}$) con el cultivo desarrollado en el apartado 5.4.3.4 cuando este alcanzó una A_{600} de 1.7.

La fermentación se llevó a cabo en matraces de 250 mL en agitador orbital (MaxQ6000, Thermo Scientific) a 175 rpm a 30 ºC. Se trabajó con un volumen final de 50 mL y la fermentación se llevó a cabo por 120 h. Se tomaron muestras a las 0, 24, 36, 48, 72, 84, 96 y 120 h, midiendo la A_{600} (Genesys 10 UV), azúcares reductores (Wood et al., 2012), glucosa por kit enzimático (R-Biopharm), biomasa por diferencia de peso y etanol mediante el kit MAK076 (Sigma-Aldrich, EUA). Al final se calculó la productividad del etanol como los gramos de etanol producido por cada litro de HLD y hora del proceso. También se calculó el rendimiento producto/sustrato como los gramos de etanol producido por cada gramo de azúcar consumido, rendimiento producto/biomasa como gramos de etanol por cada gramo de biomasa generada.

Se calculó la velocidad de consumo de azúcares como los gramos de azúcares reductores consumidos por cada litro de HDL y hora del proceso. El rendimiento teórico de la fermentación se calculó como (Ecuación 3):

$$Rendimiento\ Teórico\ de\ la\ Fermentación = \frac{g\ etanol}{0.51\ x\ (g\ azúcares\ consumidos)}\ x\ 100 \quad (3)$$

4.3.3 Simulación de producción de etanol a partir de pericarpio de maíz

Para la simulación se empleó el software SuperPro Designer v8.5 (Intelligen, Scotch Plains, NJ) con el objetivo de esquematizar el proceso de producción a gran escala.

El proceso se diseñó en bloques, siguiendo el flujo de operaciones de la Figura 10, en tanto que los parámetros de operación se ajustaron en base a lo obtenido experimentalmente.

Para fines prácticos, se dividió el proceso en: (1) pretratamiento, (2) fermentación, (3) destilación y (4) productos obtenidos.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Optimización del pretratamiento por MSR

5.1.1 Diseño factorial completo (DFC)

Los resultados del experimento DFC se muestran en el Cuadro 9. El análisis estadístico se resume en el Cuadro 10. Las cuatro respuestas presentaron significancia de los modelos (p<0.01) y carencia de ajuste para los modelos lineales (p<0.01), por lo cual se presumía curvatura en la respuesta, haciendo necesario estimar los efectos cuadráticos.

Cuadro 9. Resultados experimentales del DFC.

Tratamiento	Variables codificadas	Valores reales			Azúcares reductores ($g \cdot L^{-1}$)	Glucosa ($g \cdot L^{-1}$)	PM hidrolizado (%)	Rendimiento de azúcares ($g \cdot [100\ g\ PM]^{-1}$)
		Tiempo (min) (x_1)	Ácido sulfúrico ($\% v \cdot v^{-1}$) (x_2)	PM inicial ($\% p \cdot v^{-1}$) (x_3)				
1	**+++**	**40.0**	**5.00**	**20**	**89.5**	**20.22**	**67.57**	**44.75**
2	−+−	15.0	5.00	10	40.75	8.96	70.92	40.75
3	−+−	15.0	5.00	10	40.78	8.98	70.51	40.78
4	−−−	15.0	1.50	10	20.18	7.08	58.69	20.18
5	−+−	15.0	5.00	10	41.89	9.46	70.91	41.89
6	−−−	15.0	1.50	10	19.86	7.87	58.90	19.86
7	+−−	40.0	1.50	10	38.01	8.79	69.43	38.01
8	**0**	**27.5**	**3.25**	**15**	**66.11**	**14.16**	**71.19**	**44.07**
9	**0**	**27.5**	**3.25**	**15**	**66.83**	**14.81**	**71.11**	**44.55**
10	**0**	**27.5**	**3.25**	**15**	**67.27**	**14.75**	**71.13**	**44.85**
11	++−	40.0	5.00	10	39.78	10.43	70.35	39.78
12	+−+	40.0	1.50	20	57.03	8.78	63.11	28.52
13	+−−	40.0	1.50	10	38.61	8.25	69.74	38.61
14	−++	15.0	5.00	20	82.96	11.81	64.59	41.48
15	++−	40.0	5.00	10	39.74	10.26	70.77	39.74
16	++−	40.0	5.00	10	40.08	12.15	70.65	40.08
17	−−−	15.0	1.50	10	20.98	7.30	58.40	20.98
18	−−+	15.0	1.50	20	28.74	5.28	53.62	14.37
19	+−−	40.0	1.50	10	37.94	8.29	69.66	37.94
20	+−+	40.0	1.50	20	57.53	8.77	63.63	28.77
21	**+++**	**40.0**	**5.00**	**20**	**89.03**	**21.00**	**67.34**	**44.52**
22	−−+	15.0	1.50	20	28.34	5.12	53.75	14.17
23	−−+	15.0	1.50	20	28.46	5.18	53.41	14.23
24	−++	15.0	5.00	20	82.45	10.98	64.53	41.23
25	−++	15.0	5.00	20	83.83	11.67	64.42	41.92
26	**+++**	**40.0**	**5.00**	**20**	**90.02**	**19.44**	**67.89**	**45.01**
27	+−+	40.0	1.50	20	57.55	8.67	63.04	28.78

Mejores tratamientos en negritas

Los tratamientos al centro: 8, 9 y 10 a 27.5 min, ácido sulfúrico, 3.25 % ($v \cdot v^{-1}$) y PM inicial, 15 % ($p \cdot v^{-1}$) resultaron con rendimientos en azúcares reductores de 66 $g \cdot L^{-1}$, 71 % del PM hidrolizado y un rendimiento en azúcares de 44 g por cada 100 g de PM. Por otro lado, los tratamientos 1, 21 y 26 resultaron ser los mejores en cuanto a azúcares reductores ya que alcanzaron hasta 90 $g \cdot L^{-1}$ a partir de 20 % ($p \cdot v^{-1}$) de PM al trabajar con 5 % de ácido sulfúrico. Considerando que se utiliza menor concentración de ácido sulfúrico y PM para obtener un mayor porcentaje de PM hidrolizado con rendimientos similares de azúcares reductores, los tratamientos al centro se consideran los más apropiados.

Cuadro 10. Análisis estadístico para las cuatro respuestas estudiadas en el DFC.

Modelo de regresión del DFF						Variables significativas	*p*-Value
Azúcares reductores ($g \cdot L^{-1}$)	**Grados de libertad**	**Suma de cuadrados**	**Cuadrado medio**	**F-valor**	***p*-Value**	**Azúcares reductores**	
Modelo	6	13111.34	2185.22	56.2	<.0001*	Tiempo	<0.0001
Residuales	20	777.64	38.88			Ácido	<0.0001
Carencia de ajuste	2	773.39	386.69	1634.6	<.0001*	PM inicial	<0.0001
Error puro	18	4.25	0.23			Tiempo*Ácido	0.0006
Total	20	777.64				Ácido*PM inicial	<0.0001
R^2adj	0.92						
Glucosa ($g \cdot L^{-1}$)						**Glucosa**	
Modelo	6	418.25	69.7	22.1	<.0001*	Tiempo	<0.0001
Residuales	26	63.07	3.15			Ácido	<0.0001
Carencia de ajuste	2	58.30	29.15			PM inicial	0.0032
Error puro	18	4.77	0.26	109.99	<.0001*	Tiempo*PM inicial	0.004
Total	20	63.07				Ácido*PM inicial	0.0001
R^2adj	0.82						
PM hidrolizado (%)						**PM hidrolizado**	
Modelo	6	789.94	131.65	22.87	<.0001*	Tiempo	<0.0001
Residuales	20	115.11	5.75			Ácido	<0.0001
Carencia de ajuste	2	1114.30	57.15		<.0001*	PM inicial	<0.0001
Error puro	18	0.81	0.04			Tiempo*Ácido sulfúrico	0.0002
Total	20	115.11					
R^2adj	0.83						
Rendimiento de azúcares ($g \cdot 100\ g\ PM^{-1}$)						**Rendimiento de azúcares**	
Modelo	6	2613.20	435.5	25.44	<.0001*	Tiempo	<0.0001
Residuales	20	342.30	17.11			Ácido	<0.0001
Carencia de ajuste	2	339.79	169.89	0.14	<.0001*	Tiempo*Ácido	0.0002
Error puro	18	2.58	0.14			Ácido*PM inicial	0.0058
Total	20	342.37					
R^2adj	0.84						

Azúcares reductores. El análisis de varianza (ANOVA) mostró significancia del modelo y carencia de ajuste lineal (Cuadro 10), los 3 factores analizados mostraron efecto sobre la cantidad de azúcares liberados.

Se encontraron dos interacciones significativas, entre el contenido de PM inicial y la concentración de ácido sulfúrico (Figura 13), operando con niveles de ácido de 1.5 % el contenido de azúcares es cercano. A medida que se incrementaba el ácido la mejor respuesta se observó con 20% de PM, ya que la pendiente es mayor que con 10 % de PM. Los tiempos de hidrólisis no tuvieron efecto cuando se trabajó con 5 % de ácido sulfúrico al no haber aumento de azúcares al pasar de 15 a 40 min, pero cuando se trabajó con 1.5 % de ácido si se observó una ganancia de azúcares casi del doble al pasar de 15 a 40 min (Figura 14), aunque menor en todos los casos que con 5 % de ácido.

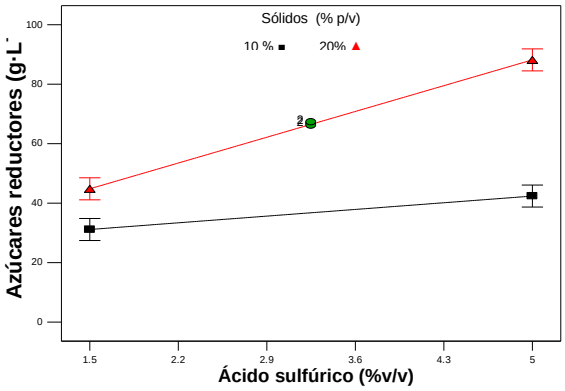


Figura 13. Efecto de interacción entre la concentración del ácido sulfúrico y el PM inicial (sólidos) en el contenido de azúcares en la fracción líquida del PM hidrolizado.

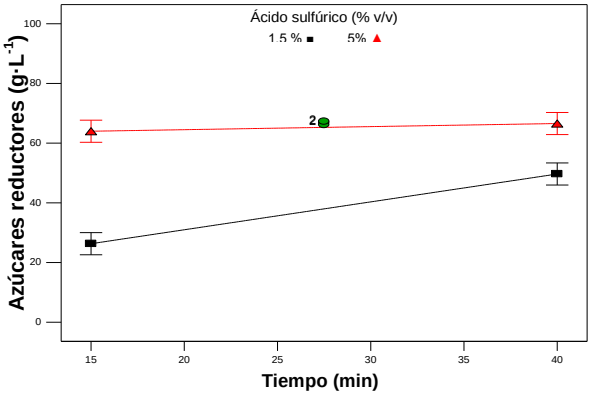


Figura 14. Efecto de interacción entre la concentración del ácido sulfúrico y el tiempo en el contenido de azúcares en la fracción líquida del PM hidrolizado.

Glucosa. El ANOVA mostró significancia de las variables sobre la respuesta, aunque se detectó carencia de ajuste para un modelo lineal. Los tres factores fueron significativos en lo individual y dos interacciones; tiempo de hidrólisis con el contenido de PM inicial y la concentración de ácido sulfúrico con el PM inicial (Cuadro 10). Por otro lado, cuando se trabajó con 20 % de PM inicial, empleando 5 % de ácido sulfúrico se obtuvieron mejores cantidades de glucosa en comparación a 1.5 % (Figura 15)

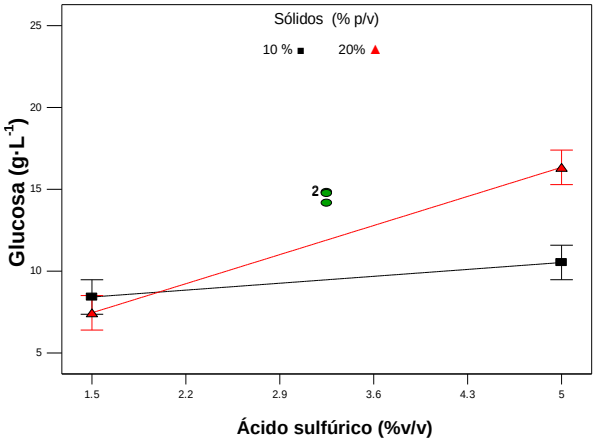


Figura 15. Efecto de interacción entre la concentración del ácido sulfúrico y los sólidos (PM inicial) en el contenido de glucosa en la fracción líquida del PM hidrolizado.

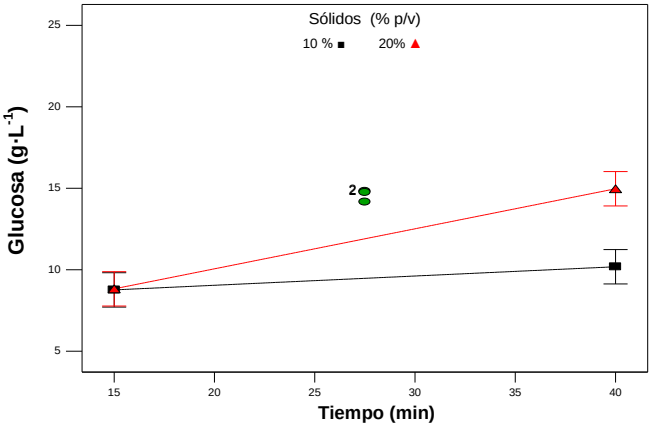


Figura 16. Efecto de interacción entre el tiempo y los sólidos (PM inicial) en el contenido de glucosa en la fracción líquida del PM hidrolizado

La Figura 16 muestra que utilizando una mayor concentración de PM es necesario aumentar el tiempo de hidrólisis para obtener mejores concentraciones de glucosa.

Pericarpio hidrolizado. Los tres factores estudiados para esta respuesta tuvieron significancia estadística (Cuadro 10), además una interacción fue significativa: tiempo de hidrólisis y concentración de ácido sulfúrico. Como se puede ver en la Figura 17, la mejor respuesta se encontró en los tratamientos al centro (punto verde), con porcentajes de hidrólisis del PM por encima del 70 %, mientras que a concentraciones de ácido del 5 % prácticamente no hubo diferencia al pasar de 15 a 40 min.

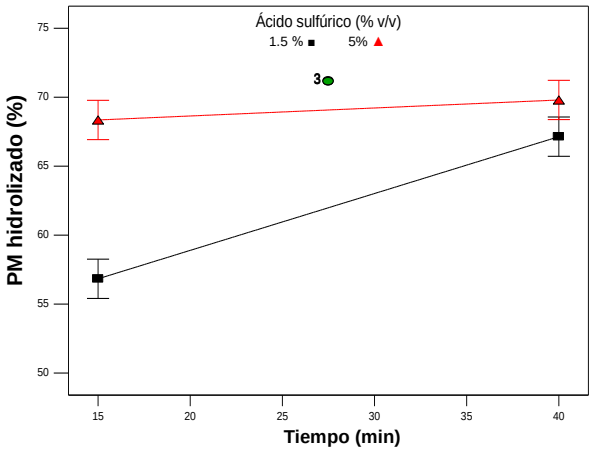


Figura 17. Efecto de interacción entre el tiempo y la concentración de ácido sulfúrico en el porcentaje de PM hidrolizado.

Por otro lado, cuando se trabajó con 1.5 % de ácido se requirió más tiempo para alcanzar niveles de hidrólisis semejantes que cuando se usó 5 %.

Rendimiento de azúcares. El rendimiento se calculó con base a 100 g de PM. Se encontró que el tiempo de hidrólisis, la concentración de ácido sulfúrico y el PM inicial tuvieron significancia estadística (Cuadro 10). Las interacciones entre el tiempo de hidrólisis con la concentración de ácido sulfúrico (Figura 18) y el ácido sulfúrico con el PM inicial (Figura 19) fueron significativas. El tratamiento al centro (punto verde): 3.25 % de ácido y 27.5 min fue el que mostró mejores rendimientos en azúcares. Por otro lado, operando con 5 % de ácido sulfúrico, no hubo diferencia en los rendimientos cuando se pasó de 15 a 40 min, mientras que a 1.5 % se observó un incremento significativo. El rendimiento de azúcares también se vio afectado por la interacción entre el contenido inicial de PM y la concentración de ácido. Es claro que a medida que se aumenta la concentración de ácido y sólidos, aumenta el rendimiento hasta llegar a 3.25 % de ácido sulfúrico y 15 % de PM inicial (punto verde, Figura 19).

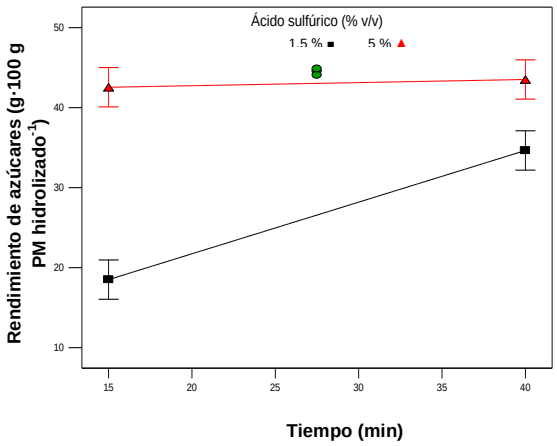


Figura 18. Figura Efecto de interacción entre el tiempo y la concentración de ácido sulfúrico sobre el rendimiento de azucares en PM.

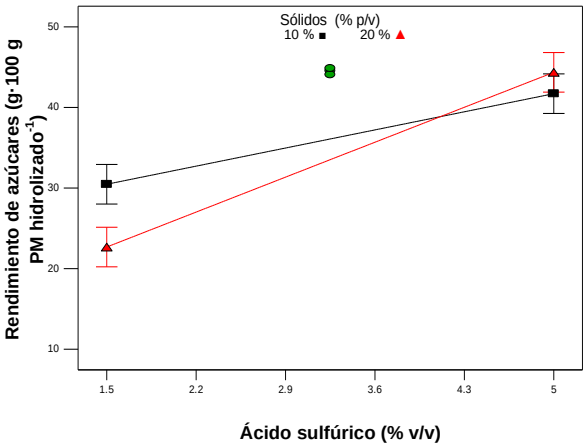


Figura 19. Efecto de interacción entre la concentración de ácido sulfúrico y los sólidos (PM inicial) sobre el rendimiento de azucares en PM.

Montgomery (2005) señala que la falta de ajuste para modelos de primer orden, observados para las cuatro respuestas estudiadas anteriormente, indica que se ha llegado a la vecindad del punto óptimo. Por lo cual a partir del punto al centro del DFC se generan experimentos adicionales para precisar la ubicación del punto óptimo.

5.1.2 Diseño central compuesto (DCC)

Debido a que en todas las respuestas se detectó carencia de ajuste, se procedió a implementar el DCC para poder explicar el comportamiento de los factores estudiados y poder encontrar una respuesta óptima. El DCC permite hacer un escrutinio más detallado de una región experimental, ya que considera a cada factor con cinco niveles (Castaño y Domínguez, 2010). Además, requieren menos combinaciones de tratamientos comparados con los factoriales 3^n para estimar las ecuaciones de la superficie de respuesta cuadrática y es más eficiente que el diseño Box-Behnken (Kuehl, 2001). Los DCC se forman a partir de diseños factoriales 2^k completos o fraccionados, más 2 tratamientos a una misma distancia α, a ambos lados del centro de cada factor (2k en total), por lo cual los niveles quedan como $-\alpha$ y α en escala codificada; al final el diseño se completa con uno o más tratamientos en el punto intermedio de los niveles de cada factor (repeticiones al centro) (Castaño y Domínguez, 2010). Los resultados se presentan en el Cuadro 11.

Cuadro 11. Resultados experimentales del DCC.

Tratamiento	Variable codificada	Valores experimentales			Azúcares reductores ($g \cdot L^{-1}$)	Glucosa ($g \cdot L^{-1}$)	PM hidrolizado (%)	Rendimiento de azúcares ($g \cdot 100\ g\ PM^{-1}$)
		Tiempo (min) (x_1)	Ácido sulfúrico ($\% v \cdot v^{-1}$) (x_2)	PM inicial ($\% p \cdot v^{-1}$) (x_3)				
6	+−+	40.0	1.50	20.00	58.37	8.51	63.26	29.19
3	−+−	15.0	5.00	10.00	40.09	8.60	70.78	40.09
8	+++	40.0	5.00	20.00	89.12	20.22	67.60	44.55
5	−−+	15.0	1.50	20.00	28.18	5.18	53.59	14.09
20	0	27.0	3.25	15.00	67.05	14.81	71.99	44.70
4	++−	40.0	5.00	10.00	41.20	10.95	70.59	41.20
1	−−−	15.0	1.50	10.00	20.34	7.42	58.66	20.34
10	A00	48.0	3.25	15.00	51.17	13.95	71.11	34.11
12	0A0	27.0	6.19	15.00	59.21	16.51	71.66	39.47
14	00A	27.0	3.25	23.40	92.33	10.46	67.55	39.44
7	−++	15.0	5.00	20.00	84.41	11.49	70.51	42.20
2	+−−	40.0	1.50	10.00	36.65	8.44	67.61	36.65
17	0	27.0	3.25	15.00	66.11	14.16	71.19	44.07
18	0	27.0	3.25	15.00	66.83	14.81	71.11	44.55
19	0	27.0	3.25	15.00	67.08	14.75	71.13	44.72
16	0	27.0	3.25	15.00	66.56	14.47	71.24	44.37
15	0	27.0	3.25	15.00	66.53	14.85	71.10	44.35
11	0α0	27.0	0.30	15.00	13.86	3.86	48.72	9.24
9	α00	6.0	3.25	15.00	34.18	8.08	69.85	22.78
13	00α	27.0	3.25	6.59	41.81	4.42	72.89	33.43

El ANOVA para las 4 respuestas se muestra a manera de resumen en el Cuadro 12. Se puede ver que los modelos cuadráticos para azúcares reductores ($p<0.0001$), glucosa ($p<0.0001$), PM hidrolizado ($p<0.0001$) y rendimiento de azúcares ($p<0.0001$) fueron altamente significativos según el *valor p*. El valor de la R^2 ajustada para azúcares reductores (0.992) mostró un buen ajuste de los datos al modelo, mientras que las R^2 ajustada para glucosa (0.951), PM hidrolizado (0.923) y rendimiento de azúcares (0.917) fueron aceptables, debido a que es deseable valores cercanos a 1 en los modelos de regresión para obtener predicciones adecuadas (Montgomery, 2005). Aunque todos los modelos mostraron carencia de ajuste, Tostado y Domínguez (2001) mencionan que se puede dar el caso de que aun cuando estadísticamente un modelo sea significativo, puede no explicar un patrón importante entre la respuesta y los factores estudiados.

Cuadro 12. Análisis estadístico para las cuatro respuestas estudiadas mediante DCC.

Modelo de regresión del DCC					
Azúcares reductores ($g \cdot L^{-1}$)	**Grados de libertad**	**Suma de cuadrados**	**Cuadrado medio**	**F-value**	**p-Value**
Modelo	9	9217.18	1024.13	281.56	<.0001
Residuales	10	777.64	38.88		
Carencia de ajuste	5	35.69	7.13	52.47	0.0003
Error puro	5	0.68	0.13		
Total	10	36.37			
R^2 ajustada	0.992				
Glucosa ($g \cdot L^{-1}$)					
Modelo	9	361.22	40.13	41.97	<.0001
Residuales	10	9.56	0.95		
Carencia de ajuste	5	9.18	1.83		
Error puro	5	0.37	0.07	24.61	0.0016
Total	10	9.56			
R^2 ajustada	0.951				
PM hidrolizado (%)					
Modelo	9	789.02	87.11	26.49	<.0001
Residuales	10	32.88	3.28		
Carencia de ajuste	5	32.86	6.57	2162.2	<.0001
Error puro	5	0.015	0.003		
Total	10	32.88			
R^2 ajustada	0.923				
Rendimiento de azúcares ($g \cdot 100$ g pericarpio^{-1})					
Modelo	9	2870.39	318.93	24.58	<.0001
Residuales	10	129.74	12.97		
Carencia de ajuste	5	129.44	25.88	423.57	<.0001
Error puro	5	0.305	0.061		
Total	10	129.74			
R^2 ajustada	0.917				

Box y Draper (1982), mencionan que la carencia de ajuste puede ocurrir debido al efecto de interacciones triples. Debido a la correlación natural de la respuestas en un experimento multirespuesta, la carencia de ajuste de una de ellas puede afectar el ajuste de las otras (Khuri y Mukhopadhyay, 2010).

5.1.2.1 Azúcares reductores

Se estimó que el tiempo (x_1), el ácido sulfúrico (x_2) y el PM inicial (x_3) tuvieron efecto sobre esta respuesta, así como la interacción entre ellos. También se encontraron efectos cuadráticos en la respuesta entre x_1 y x_2 (Cuadro 13). Saucedo-Luna et al (2010), encontraron que el ácido sulfúrico y el tiempo de hidrólisis tuvieron significancia sobre la liberación de azúcares fermentables en residuos lignocelulósicos de agave.
Sun y Cheng (2002), estudiaron el pretratamiento con ácido sulfúrico diluido en paja de centeno y pasto bermuda encontrando significancia de los mismos factores sobre los azúcares reductores liberados, coincidiendo con lo reportado en este trabajo.

Cuadro 13. Coeficientes estimados y su significancia para azúcares reductores.

	β_0	X_1	X_2	X_3	$X_1 X_2$	$X_1 X_3$	$X_2 X_3$	X_1^2	X_2^2
Coeficiente (β_n)	66.62	5.9	13.73	15.14	-5.08	2.18	7.83	-8.04	-10.21
***p=**	NA	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	0.008	<.0001	<.0001	<.0001

*Únicamente se muestran los coeficientes significativos (p<0.05)

El modelo matemático para los azúcares reductores fue el siguiente (Ecuación 4)

$$y_1 = 66.62 + 5.92x_1 + 13.73x_2 + 15.14x_3 - 5.08x_1x_2 + 2.18x_1x_3 + 7.83x_2x_3 - 8.04x_1^2 - 10.21x_2^2 \quad (4)$$

Cuando los factores son expresados en términos codificados, el coeficiente β_0 representa el valor de los azúcares reductores en los puntos centrales del diseño.
Los coeficientes de x_1, x_2 y x_3 expresan la influencia lineal de los factores sobre los azúcares. Los tres factores ejercen una influencia positiva, siendo mayor el PM inicial (15.14) seguido del ácido sulfúrico (13.73) y por último el tiempo (5.9). Esto contrasta con lo reportado por Noureddini y Byun (2010) quienes observaron mayores

rendimientos de azúcares monoméricos a concentraciones bajas de sustrato (5 a 10 %) y de ácido sulfúrico (1 a 1.5 %) aunque a una temperatura mayor, 140 ºC.

Fijando el contenido de PM inicial en 20 % ($p \cdot v^{-1}$), se observa que la región del óptimo (rojo) puede alcanzarse con tiempos cortos (< 25 min) pero con niveles de ácido por arriba de 3.6 % ($v \cdot v^{-1}$). Si se desea trabajar con menor cantidad de ácido (hasta 3.2 %) es necesario mayor tiempo de hidrólisis (Figura 20).

La Figura 21 muestra que para alcanzar niveles óptimos (rojo) de azúcares reductores es necesario hidrolizar el PM entre 24 y 35 min para alcanzar 90 $g \cdot L^{-1}$, esto operando con 5 % ($v \cdot v^{-1}$) de ácido sulfúrico.

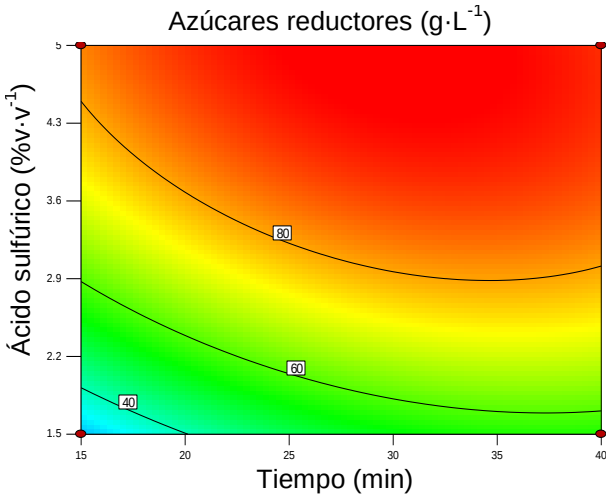


Figura 20. Curvas de nivel para el efecto del ácido sulfúrico y el tiempo. Sólidos al 20 %

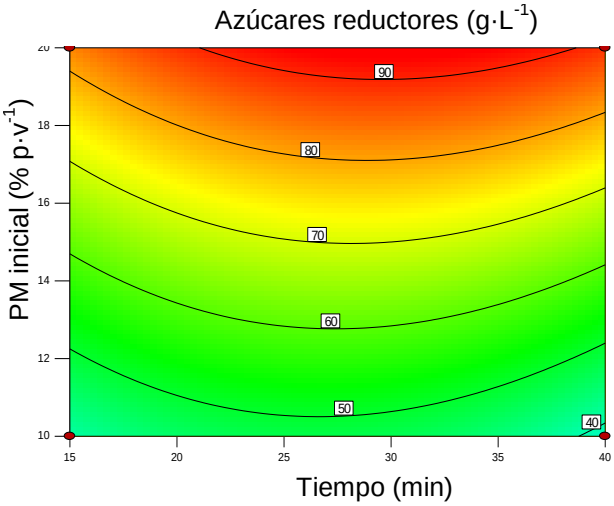


Figura 21. Curvas de nivel para el efecto del PM inicial y el tiempo. Ácido sulfúrico al 5 %

El efecto de interacción entre el PM inicial y el ácido se puede ver en la Figura 23.Se observa una influencia entre el contenido de PM y la cantidad de azúcares reductores obtenidos, los mejores resultados se obtuvieron tratando PM por encima del 18 % al usar soluciones de ácido sulfúrico con concentraciones por arriba del 3 %. Durante el pretratamiento, la relación sólido (biomasa)/ (ácido/base) tiene un papel muy importante, ya que tiene efecto sobre los azúcares obtenidos (Baadhe et al., 2014). La Figura 22 muestra la evolución de la extracción de azúcares en función del efecto cuadrático del tiempo de hidrólisis y se confirma la linealidad del efecto del PM inicial (Cuadro 13). Se puede ver que en los límites del tiempo de hidrólisis cae la respuesta, mientras que o en niveles intermedios, se obtienen los mejores resultados.

Esta condición ocurre cuando se llevan a cabo hidrólisis con soluciones de ácido al 5 % (Figura 22).

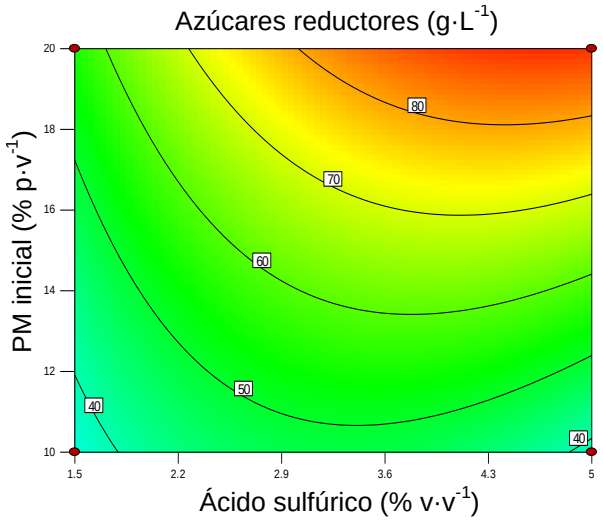


Figura 23. Curvas de nivel para el ácido sulfúrico y el PM inicial.

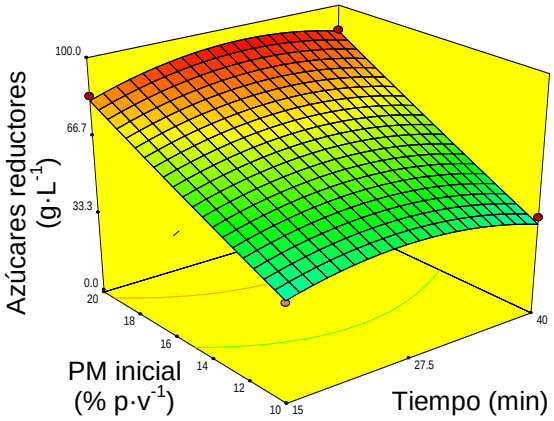


Figura 22. Azúcares reductores en función del PM inicial y el tiempo de hidrólisis. Ácido sulfúrico al 5 %

Tiempos cortos de hidrólisis no son suficientes para una buena extracción de azúcares reductores, mientras que tiempos prolongados, los azúcares disminuyen probablemente debido a la formación de furfural (2-furaldehído), hidroximetilfurfural (5-hidroximetilfurfural-2-furaldehido), ácido acético, ácido levulínico (ácido 4-oxopentanoico), ácido láctico y otros compuestos orgánicos (Larsson et al., 1999). Guo et al (2008) mencionan que el ácido acético es generado por la hidrólisis de los grupos acetilo de la hemicelulosa y es comúnmente encontrada junto con la xilosa, en tanto que el furfural es generado por la degradación de la xilosa bajo pretratamientos con condiciones severas.

La presencia de furfural y otros compuestos orgánicos no es deseable en productos hidrolizados, ya que se han reportado como inhibidores importantes de la fermentación (Nilvebrant et al., 2003; Agbogbo et al., 2006; Bellido et al., 2011).

La Figura 24 muestra la influencia de los efectos cuadráticos del ácido sulfúrico y el tiempo. La concentración de azúcares reductores es menor cuando se trabaja con tiempos cortos de hidrólisis y bajas concentraciones de ácido. Cuando se incrementa la concentración de ácido, puede alcanzarse una alta concentración de azúcares

reductores con poca influencia del tiempo de hidrólisis (15 – 40 min). Noureddini y Byun (2010) encontraron incrementos en la liberación de azúcares reductores en función del tiempo usando concentraciones de ácido de entre 0.5 y 1.5 %

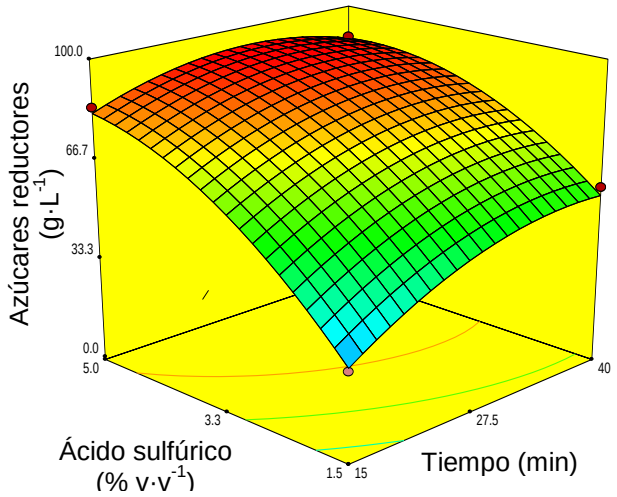


Figura 24. Azúcares reductores en función del ácido sulfúrico y el tiempo. PM al 20 %.

5.1.2.2 Glucosa

Los coeficientes del modelo generado para glucosa, se presentan en el Cuadro 14. Donde x_1 representa el tiempo (min), x_2 el ácido sulfúrico (% v·v^{-1}) y x_3 el PM inicial. La ecuación generada para la glucosa fue la siguiente (Ecuación 5):

$$y_2 = 14.61 + 1.81x_1 + 3.14x_2 + 1.47x_3 + 0.84x_1x_2 + 1.08x_1x_3 + 1.79x_2x_3 - 1.09x_1^2 - 1.39x_2^2 - 2.36x_3^2 \quad (5)$$

La ecuación (4) está expresada en términos codificados, el coeficiente β_0 de 14.61 representa el valor de glucosa cuando se opera en los puntos centrales del diseño.

Cuadro 14. Coeficientes estimados y significancia para glucosa.

	β_0	X_1	X_2	X_3	$X_1 X_2$	$X_1 X_3$	$X_2 X_3$	X_1^2	X_2^2	X_3^2
Coeficiente (β_n)	14.61	1.81	3.14	1.47	0.84	1.08	1.79	-1.09	-1.39	-2.36
***p**	NA	<.0001	<.0001	0.0002	0.035	0.0105	0.0004	0.0016	0.0003	<.0001

*Únicamente se muestran los coeficientes significativos (p<0.05)

La Figura 25 muestra la interacción entre el ácido sulfúrico y el tiempo. La región del óptimo (rojo) se encuentra en niveles por encima de 3.6 % de ácido con tiempos de hidrólisis por encima de los 27 min. El punto óptimo se localiza a mayores concentraciones de ácido y mayores tiempos de hidrólisis dentro de los límites del experimento. La Figura 26 muestra la interacción entre el ácido y el PM inicial. Los incrementos de glucosa están ligados de manera proporcional a los incrementos de ambos factores. Al trabajar con niveles de 3.3 % de ácido y 15 % de PM se consiguen alrededor de 14.5 $g \cdot L^{-1}$ de glucosa (tratamientos al central, punto rojo), mientras que un aumento en la concentración de ácido (<4.3%) al mismo PM producirá una concentración óptima de glucosa. Por lo tanto para obtener buenos rendimientos en glucosa, se debe aumentar la cantidad de ácido sulfúrico en solución (PM entre 15 y 20 %).

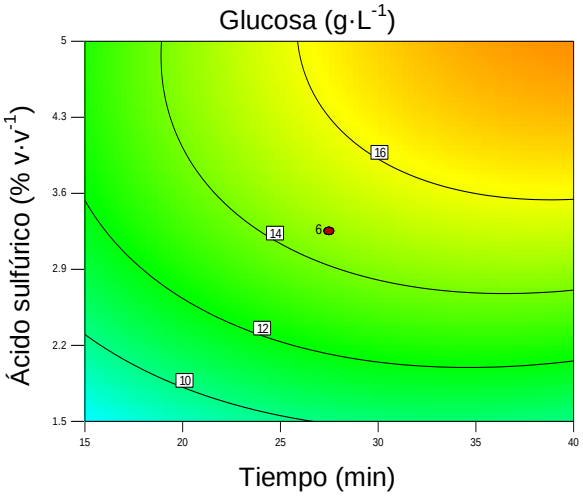


Figura 25**.** Curvas de nivel para el efecto entre el ácido sulfúrico y el PM inicial.

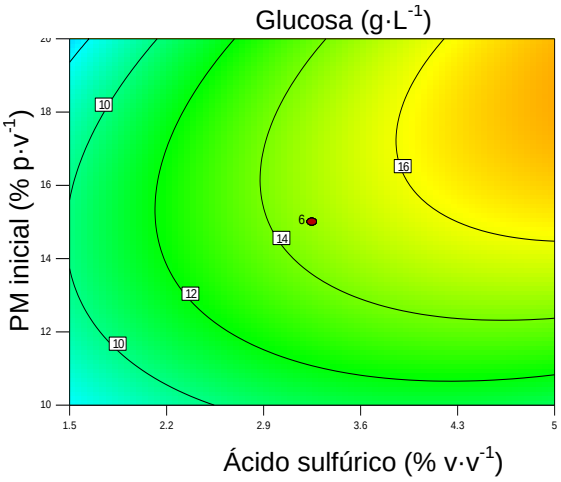


Figura 26. Curvas de nivel para el efecto entre el ácido sulfúrico y el PM inicial.

Considerando que el PM contiene 10 % de almidón residual, Van Eylen et al (2011), mencionan que la glucosa presente en el líquido hidrolizado proviene de la hidrólisis del almidón, porque se requieren condiciones menos severas comparadas con la celulosa.

La temperatura de hidrólisis ácida del PM se fijó en 120 ºC debido a que se ha reportado que la temperatura tiene mayor influencia en la degradación de glucosa que la concentración de ácido o el tiempo de reacción (Avci et al., 2013).

Los efectos cuadráticos de la ecuación (4) se muestran en las Figura 27 y Figura 28. La Figura 27 muestra el efecto que ejercen el ácido sulfúrico y el tiempo. Se observa que la concentración de glucosa crece a valores altos de PM y altas concentraciones de ácido. En la Figura 28 se observa que los niveles más altos de glucosa se alcanzan a concentraciones de ácido del 5 % y tiempos cercanos a 40 min (rojo). En paja de girasol usando ácido diluido se obtuvieron 5.14 g de glucosa en la fracción líquida pero usando temperaturas superiores y menor cantidad de ácido; 167.2 ºC y 1.3 % (Ruiz et al., 2013).

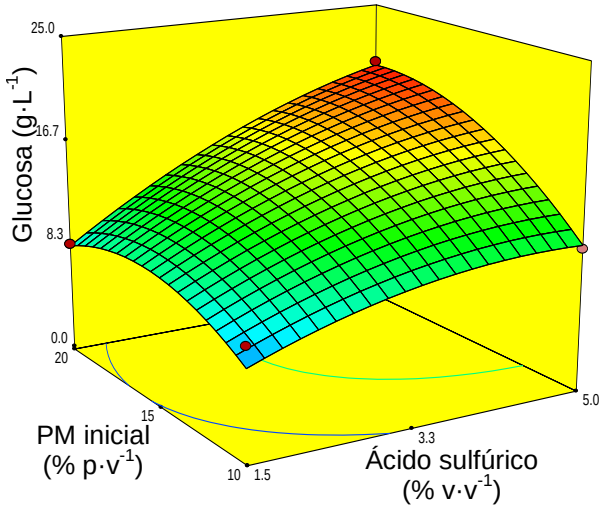


Figura 27. Glucosa en función de la concentración del ácido sulfúrico y el tiempo de hidrólisis.

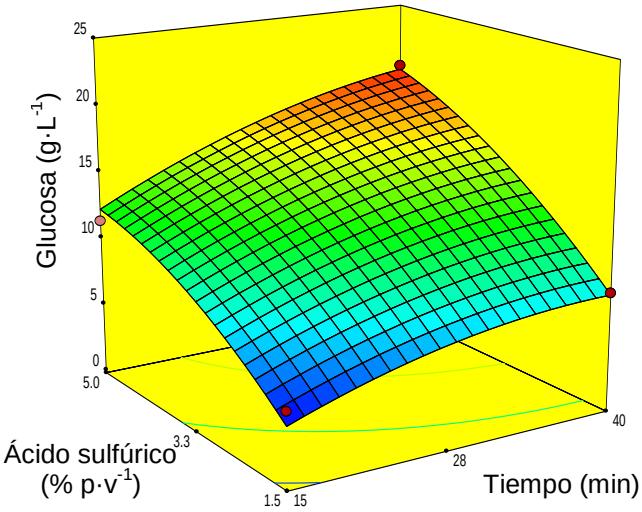


Figura 28. Glucosa en función del PM inicial y la concentración del ácido sulfúrico.

5.1.2.3 Pericarpio de maíz hidrolizado

Los coeficientes para el modelo calculado para el pericarpio de maíz hidrolizado (Ecuación 6) se muestran en el Cuadro 15.

$$y_3 = 71.2 + 1.29x_1 + 5.48x_2 - 1.58x_3 - 2.71x_1x_2 - 4.17x_2^2 \qquad (6)$$

Se puede ver que el tiempo (x_1), el ácido sulfúrico (x_2) y el PM inicial (x_3) tuvieron significancia estadística de manera individual, hubo una interacción significativa así como influencia de un efecto cuadrático.

Cuadro 15. Coeficientes estimados y significancia para pericarpio de maíz hidrolizado.

	β_0	X_1	X_2	X_3	$X_1 X_2$	X_2^2
Coeficiente (β_n)	71.2	1.29	5.48	-1.58	-2.71	-4.17
p*	NA	0.0251	<.0001	0.009	0.0017	<.0001

*Únicamente se muestran los coeficientes significativos (p<0.05)

El punto central del diseño (punto rojo), representado por β_0 en el modelo, indica que se hidroliza 71.2 % del PM (Figura 29). La gráfica indica que a medida que se incrementa el tiempo de hidrólisis, se requiere menos ácido sulfúrico para alcanzar niveles óptimos (rojo) de PM hidrolizado.

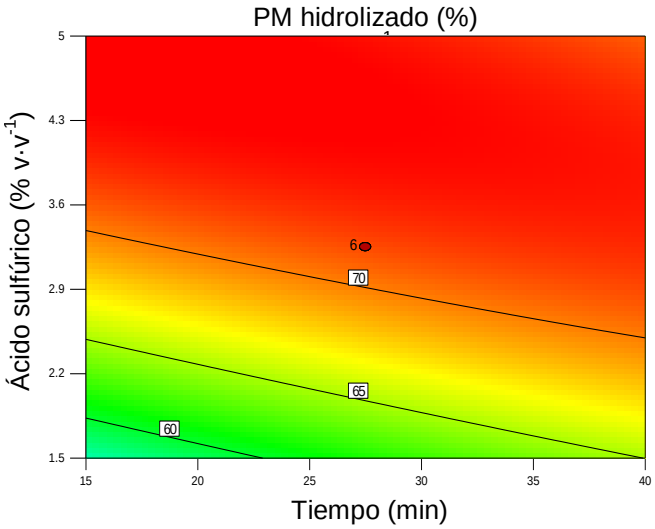


Figura 29. Curvas de nivel para el efecto entre el ácido sulfúrico y el tiempo sobre el PM hidrolizado.

La Figura 31 muestra el efecto del PM inicial y el ácido sobre el PM hidrolizado, se observa que a medida que se incrementa el contenido de ácido, la respuesta crece hasta llegar al óptimo (rojo) y cae ligeramente a 4.5 % de ácido con 10 % de PM inicial, si se incrementa el PM, la región del óptimo disminuye. El porcentaje de PM hidrolizado fue de casi 75 %. Este resultado es similar a lo reportado por Ruiz et al (2013) para paja de girasol, que alcanzó rangos de recuperación de sólidos de 20 a 62 %, pero usando tiempos de 5 minutos, temperaturas de entre 139.6 y 210.4 ºC y concentraciones de ácido sulfúrico de 0.5 a 2 (% p·v^{-1}).

También coincide con lo reportado por Ballesteros et al (2008) para cardón, donde estudió el efecto de la temperatura, 160 a 200 ºC, concentración de sólidos, 5 a 10 (% p·v^{-1}) y concentración de ácido sulfúrico, 0 a 0.2 (% p·p^{-1}). A diferencia de otros reportes, se demostró que se puede hidrolizar el material sin emplear temperaturas tan elevadas aunque es necesario incrementar la cantidad de ácido sulfúrico.

El residuo sólido, resultado del pretratamiento, contiene celulosa cristalina y fracciones de lignina que permanecen casi inalteradas y no es adecuado hidrolizarlas con ácido nuevamente (Baadhe et al., 2014). Por lo cual, es necesario tratarlo con celulasas para ser convertido a glucosa y posteriormente transformarlo a etanol (Cheng et al., 2010). Este residuo representa una oportunidad para incrementar el rendimiento de azúcares con potencial para ser fermentados a etanol.

La Figura 30 muestra la interacción entre el tiempo y el ácido sulfúrico. La región del óptimo se alcanza con concentraciones de ácido de 3.3 a 5 % y 15 min, manteniéndose en toda la superficie del gráfico e incrementándose a medida que aumenta el tiempo de hidrólisis. Por lo cual, se pueden seguir dos estrategias para alcanzar porcentajes de PM hidrolizado óptimos, tiempos cortos y concentraciones de ácido de 4 a 5 % o tiempos largos, de 30 a 40 min y concentraciones de ácido de 3 a 4 %.

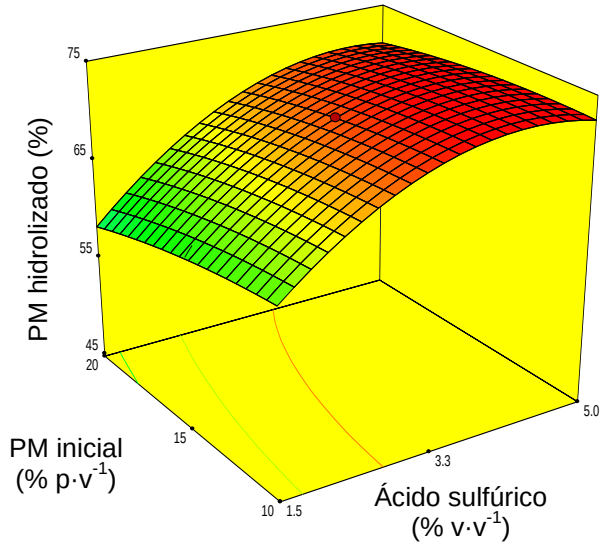


Figura 31. PM hidrolizado en función del PM inicial y el ácido sulfúrico.

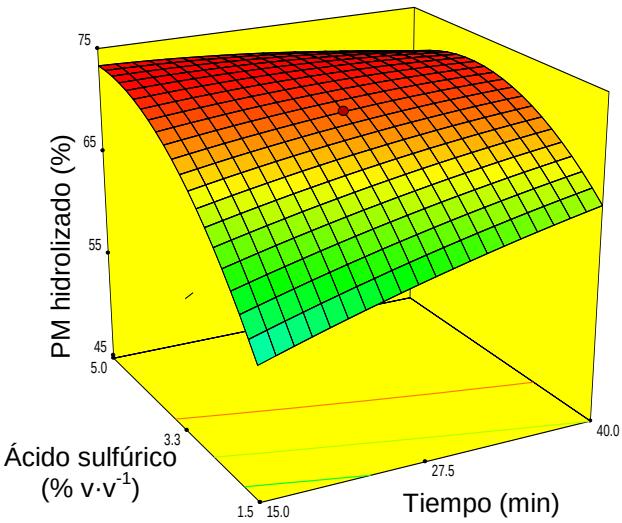


Figura 30. PM hidrolizado en función del ácido sulfúrico y el tiempo.

5.1.2.4 Rendimiento de azúcares

La ecuación 4 es el modelo generado para describir el rendimiento de azúcares reductores a partir de PM. La significancia de los coeficientes se muestra en el Cuadro 16. Destacan los marcados en rojo como no significativos (*p*>0.05).

La ecuación generada para los rendimientos de azúcares fue la siguiente (Ecuación 7):

$$\boldsymbol{y_4 = 44.47 + 3.94x_1 + 8.68x_2 - 3.55x_3 - 3.49x_1x_2 - 5.79x_1^2 - 7.23x_2^2 - 2.33x_3^2} \quad (7)$$

El β_0 representa el rendimiento de azúcares cuando se trabaja en el punto central del experimento. Los coeficientes de x_1 y x_2 expresan un aporte positivo del tiempo (3.94) y el ácido sulfúrico (8.68) de manera lineal, en tanto que, el PM inicial (-3.55) resta al rendimiento de los azúcares.

Cuadro 16. Coeficientes estimados y significancia estadística para el rendimiento de azúcares

	β_0	x_1	x_2	x_3	$x_1 x_2$	x_1^2	x_2^2	x_3^2
Coeficiente (β_n)	44.47	3.94	8.68	-3.55	-3.49	-5.79	-7.23	2.33
***p*=**	NA	0.0023	<.0001	0.0045	0.0207	0.0001	<0.0001	0.0336

*Únicamente se muestran los coeficientes significativos (p<0.05)

En el modelo se identificó una interacción significativa entre el tiempo y el ácido sulfúrico (*p*>0.0207). Se puede ver el efecto de interacción en las figuras Figura 32 y Figura 33, cuando se trabaja con 10 % de PM inicial, se alcanzan rendimientos superiores a los 50 g de azúcares.

La Figura 35 muestra el efecto entre el tiempo y el PM inicial a una concentración de 5 (% v·v^{-1}) de ácido, se puede ver una superficie tipo silla. En la región central de la gráfica se observan rendimientos de 46 g de azúcares, a medida que se disminuye o se aumenta el tiempo los rendimientos caen. Cuando se disminuye la cantidad de PM inicial, se puede ver un aumento del rendimiento cercano a 50 g. La Figura 34 muestra que los mejores rendimientos se obtienen cuando se emplea poca cantidad de PM y niveles de ácido por encima del 3 %.

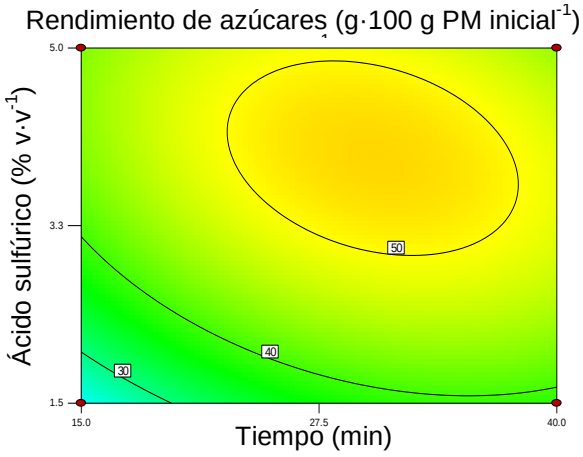


Figura 32. Curvas de nivel para el efecto entre el ácido sulfúrico y el tiempo sobre el rendimiento de azúcares. 10 (% p·v^{-1}) de PM inicial.

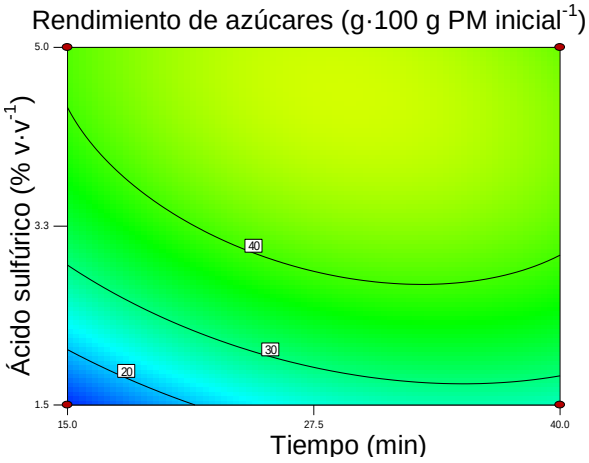


Figura 33. Curvas de nivel para el efecto entre el ácido sulfúrico y el tiempo sobre el rendimiento de azúcares. 20 (% p·v-1) de PM inicial

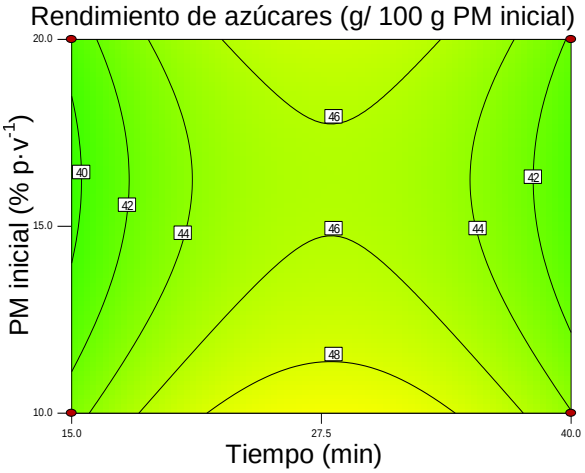


Figura 35. Rendimiento de azúcares en función del tiempo y el PM inicial. A 5 (% v·v^{-1}) de ácido sulfúrico.

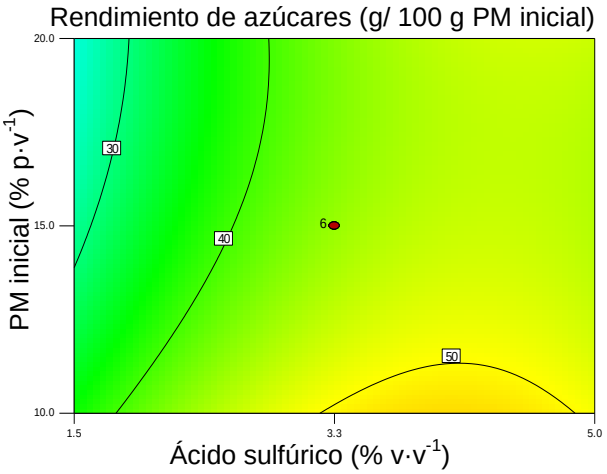


Figura 34. Rendimiento de azúcares en función del ácido sulfúrico y el PM inicial. Con 40 min de hidrólisis.

Los efectos cuadráticos de la ecuación 4 se pueden ver en las figuras Figura 36, Figura 37 y Figura 38. El coeficiente cuadrático del PM inicial es de 2.33, mientras que el de tiempo y ácido fueron de -5.79 y -7.23 dando superficies tipo silla en las figuras Figura 36 y Figura 38, ya que deforman la superficie. En la Figura 37 se puede ver que los coeficientes negativos del tiempo (-5.79) y el ácido sulfúrico (-7.23) contribuyen a una

caída del rendimiento de azúcares a medida que las condiciones experimentales se alejan del punto central.

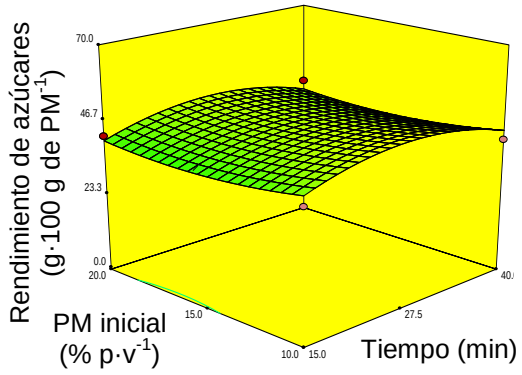


Figura 36. Rendimiento de azúcares en función del PM inicial y el tiempo.

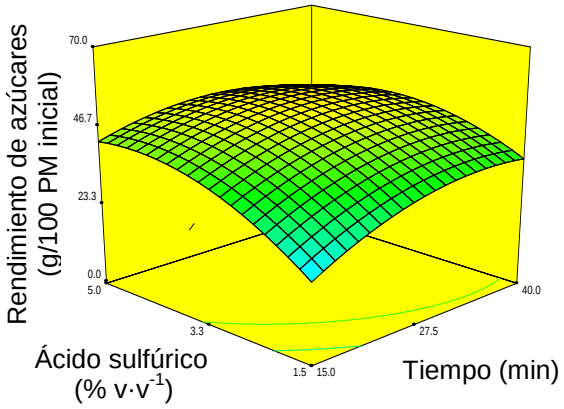


Figura 37. Rendimiento de azúcares en función del ácido sulfúrico y el tiempo.

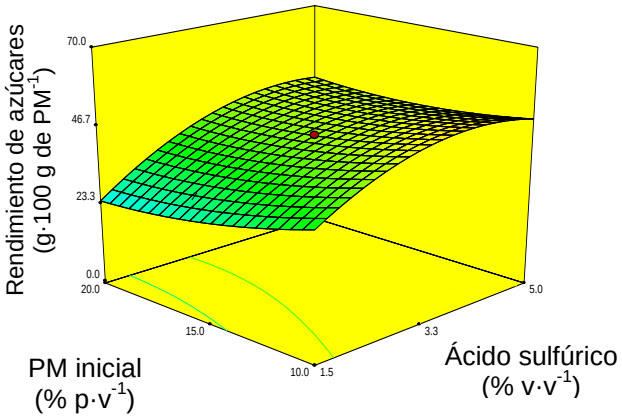


Figura 38. Rendimiento de azúcares en función del PM inicial y el ácido sulfúrico.

5.1.2.5 Punto óptimo

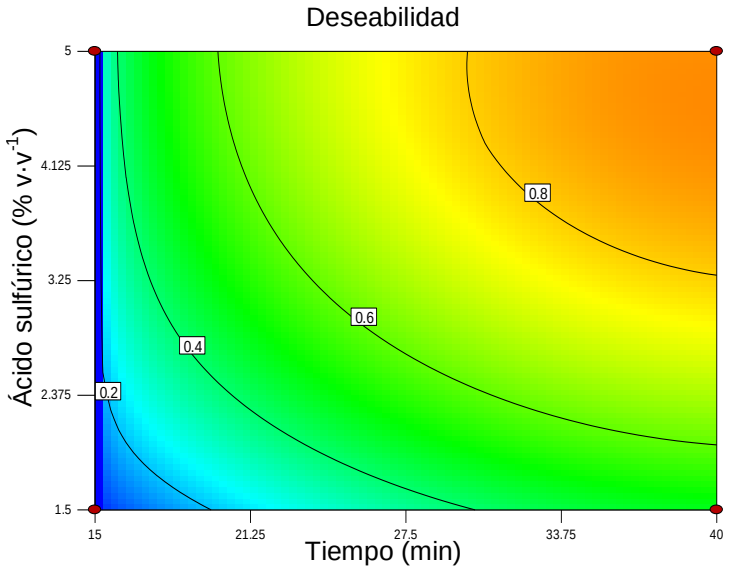
Para optimizar las cuatro respuestas en conjunto se usó la función de deseabilidad. Según Montgomery (2005), este enfoque consiste en convertir primero cada respuesta (y_i) en una función con condición de deseable individual $\boldsymbol{d_i}$ que varía en el rango (Ecuación 8):

$$\boldsymbol{0 \leq d_i \leq 1} \qquad (8)$$

Considerando que si y_i está en su meta u objetivo, entonces $\boldsymbol{d_i = 1}$, mientras que si la respuesta está fuera del rango aceptable $\boldsymbol{d_i = 0}$. Posteriormente, las variables del diseño se elegirán para maximizar la condición de deseabilidad global (Ecuación 9).

$$D = (d_1 \cdot d_2 \cdot \cdots \cdot d_m)^{1/m} \qquad (9)$$

Considerando a ***m*** como la cantidad de respuestas, para este casó fueron cuatro. El valor de deseabilidad va de 0 a 1, de manera detallada se muestra en la Figura 39. La deseabilidad se alcanza en función de las variables de estudio, fijando el contenido de PM inicial en 20 (% p·v^{-1}). A medida que se incrementan los tiempos de hidrolisis y se aumenta la cantidad de ácido sulfúrico la deseabilidad aumenta. En concentraciones de entre 3.25 y 5 (% v·v^{-1}) de ácido y tiempos de hidrólisis de 30 a 40 minutos se alcanzan niveles de deseabilidad superiores a 0.8. Esto es, cuando las respuestas alcanzan niveles óptimos de manera conjunta.



.

Figura 39. Deseabilidad global en función de la concentración de ácido sulfúrico y tiempo.

El óptimo global predicho por los modelos y la confirmación se presenta en el Cuadro 17 con tiempos de hidrólisis de 40 minutos, concentraciones de ácido de 4.6 (% v·v^{-1}) y 20 (% p·v^{-1}) de PM inicial.

Cuadro 17. Confirmación del punto óptimo del pretratamiento usando 4.6 (% v·v^{-1}) de ácido sulfúrico, 20 (% p·v^{-1}) de PM inicial y 40 min de tratamiento.

Respuesta	Azúcares reductores (g·L^{-1})	Glucosa (g·L^{-1})	PM hidrolizado (%)	Rendimiento de azúcares (g·[100 g de PM^{-1}])
Modelo	89	19.2	69.74	43
Experimental*	87.95±1.9	18.26±1.0	68.85±0.45	44.5±3.6

*Promedio de cinco réplicas.

En otros reportes, al usar ácido fosfórico (H_3PO_4) en el pretratamiento de paja de maíz, Avci et al (2013), obtuvieron rendimientos de azúcares mayores a lo obtenido en esta investigación, 55 g de azúcares por cada 100 de material tratándolo a 161.8 ºC, 0.78 % de ácido y 9.78 min. Mientras que Cai et al (2012) al optimizar el pretratamiento con ácido sulfúrico diluido, encontraron las mejores condiciones con menor cantidad de ácido al usado en esta investigación; 1 % a 123 ºC pero por mayor tiempo, 1.5 h con un rendimiento en xilosa del 87.2 %. En tanto, Castro et al (2011) reportaron que dependiendo del criterio en el que se base la optimización, el punto óptimo puede cambiar, al encontrar la máxima solubilización de la celulosa a 200 ºC por 27 min y 0.4 % de ácido sulfúrico, mientras que si lo que se busca es solubilizar la hemicelulosa, preservando la celulosa en la fracción sólida, basta con 144 ºC, 6 min y 2 % de ácido. Esto explica la diferencia entre los azúcares reductores obtenidos; 89 g·L^{-1} y que de estos, solo 19.2 g·L^{-1} sean glucosa, por lo cual la diferencia (69 g·L^{-1}) pueden ser xilosa y otros carbohidratos. Además de que el 30 % del PM no hidrolizado puede estar conformado en su mayoría por celulosa, está altamente disponible para la hidrólisis enzimática (Lloyd y Wyman, 2005).

5.2 Fermentación del hidrolizado líquido de PM

5.2.1 Crecimiento de *P. stipitis* en medio YPD

La concentración inicial de xilosa fue de 20 g·L^{-1}, al inocular el medio con la conserva se realizó un seguimiento del proceso de crecimiento aerobio por 45 h cuantificando la concentración celular (Figura 40) y la biomasa (Figura 41).

En la Figura 40 se observa que no hubo fase *lag*, esto puede ser debido a que las dos resiembras realizadas favorecieron la adaptación de la levadura al medio. La fase exponencial tuvo una duración aproximada de 12 h alcanzando una A_{600} de 1.7 y la biomasa alcanzó un peso de 4 $g \cdot L^{-1}$, siendo este punto el óptimo para tomar un inóculo debido a que las células en esta fase, están en un estado metabólico más activo (Madigan et al., 2004).

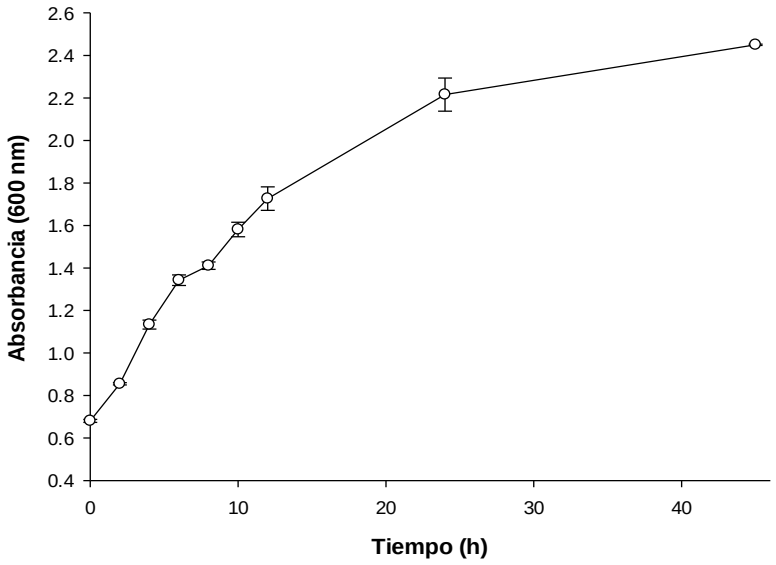


Figura 40. Crecimiento de la *P. stipitis* en medio YPD a 30 ºC y pH 5 con xilosa (20 $g \cdot L^{-1}$) como fuente de carbono. Promedio de tres réplicas.

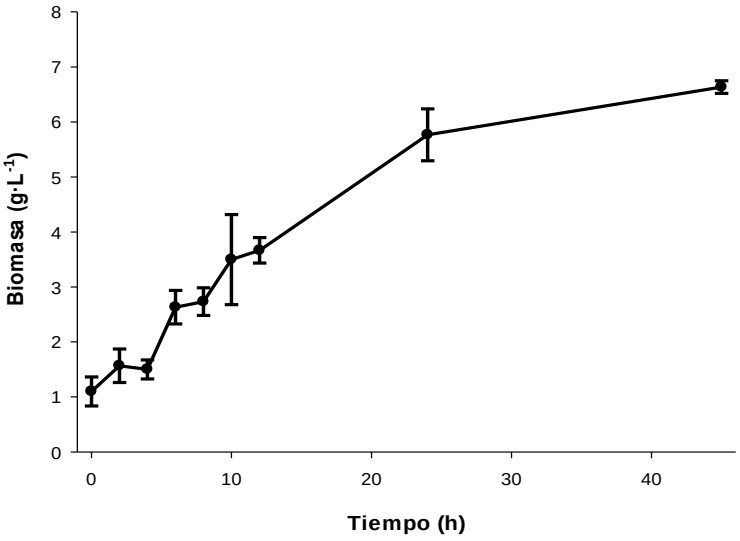


Figura 41. Incremento de la biomasa de la *P. stipitis* en medio YPD a 30 ºC y pH 5 con xilosa (20 $g \cdot L^{-1}$) como fuente de carbono. Promedio de tres réplicas.

5.2.2 Detoxificación del HLD

El líquido resultante del pretratamiento ácido se detoxificó usando carbón activado. El Cuadro 18 muestra los resultados de la detoxificación y como el índice R_{280} disminuyó con respecto al hidrolizado sin tratar. Estos resultados coinciden con lo reportado por la literatura (Arslan y Eken-Saraçoğlu, 2010; Mateo et al., 2013; Klasson et al., 2013). Además, Miyafuji et al (2003) encontraron que a medida que se incrementaba la proporción de carbón, el índice R_{280} disminuía.

Cuadro 18. Detoxificación del hidrolizado líquido de PM.

Muestra	Absorbancia (280 nm)	Índice R_{280}	Azúcares reductores ($g \cdot L^{-1}$)
Hidrolizado sin tratar	1.223 ± 0.055	1	88.53 ± 12.055
Hidrolizado tratado	0.021 ± 0.0076	0.02066	56.15 ± 2.574

Por otro lado, también se observó una disminución en la concentración de azúcares del 35 % sobre la cantidad inicial. Esto también fue observado por Arslan y Eken-Saraçoğlu, (2010) en la detoxificación de hidrolizados de cáscara de nuez, mientras que Miyafuji et al (2003) reportaron que el carbón no tuvo un efecto de disminución sobre los azúcares de hidrolizados de madera, al igual que Mateo et al (2013) en residuos de poda de olivo. Sin embargo, existen varios reportes que señalan pérdidas que van del 20 % (Lee et al., 2011) hasta el 30 % (Wang y Chen, 2011) coincidiendo con un alto índice de remoción de inhibidores (Mateo et al., 2013). Por lo tanto, la cantidad de azúcares eliminados durante el proceso de detoxificación estaría asociado al tipo de hidrolizado y las condiciones de detoxificación. La capacidad del carbón activado de retener los compuestos fenólicos y los furanos, proviene de sus propiedades como adsorbente e hidrofóbico al igual que muchos compuestos fenólicos y furanos (Miyafuji et al., 2003). Aunque la efectividad del tratamiento dependerá del pH, la temperatura, el tiempo de contacto y concentración de carbón activado usado (Mussatto and Roberto, 2004).

5.2.3 Adaptación de la *Pichia stipitis* en HLD

En la Figura 42, la fase *lag* o estacionaria tuvo una duración aproximada de 4 h, mientras que la fase exponencial transcurrió hasta las 12 h en las cuales se alcanzó una A_{600} de 1.8.

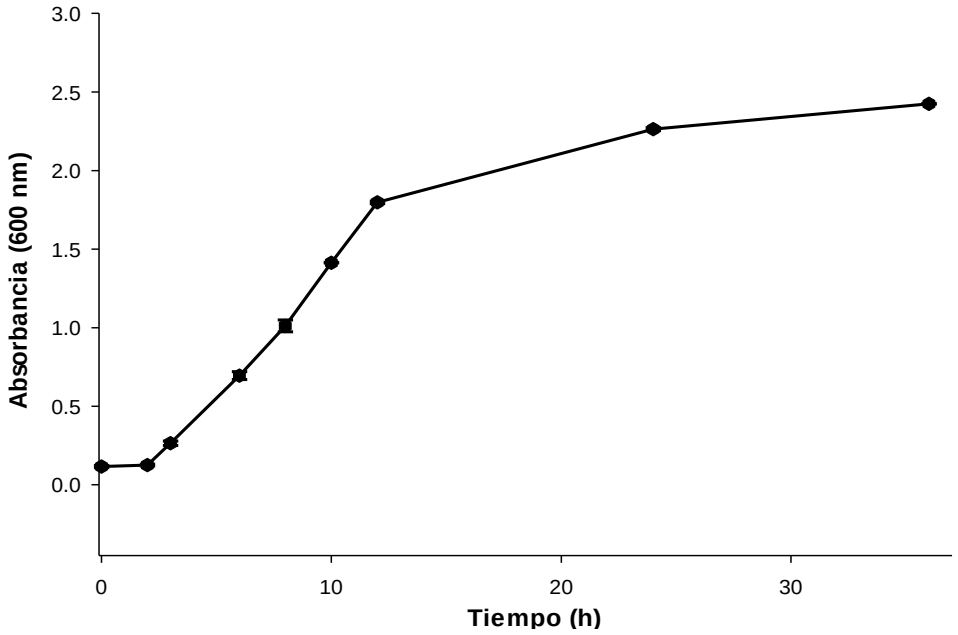


Figura 42. Crecimiento de la *P. stipitis* en HLD de PM a 30 ºC y pH 5.Promedio de tres réplicas.

Al final de la cinética se registró una A_{600} de 2.45. El crecimiento fue muy similar a lo observado en medio YPD. Por lo cual se puede tomar como inóculo para hacer fermentaciones con un mayor contenido de azúcares. Este tipo de estrategias de adaptación han sido adoptadas para mejorar el rendimiento de las fermentaciones en hidrolizados de biomasa lignocelulósica (Nigam, 2001; Tomás-Pejó et al., 2010).

5.2.4 Fermentación del HLD con *P. stipitis*

La Figura 43 muestra el consumo de azúcares durante la fermentación. Se puede ver que el cultivo suplementado consumió de manera más acelerada los azúcares en el medio, pero la tasa de consumo fue similar al no suplementado, 0.016 $g \cdot L^{-1} \cdot h^{-1}$, a partir de las 48 hasta las 120 h. El cultivo sin suplementar tuvo una tasa de consumo de

0.0163 $g \cdot L^{-1} \cdot h^{-1}$ pasadas las 48 h. Este patrón de consumo de azúcares es muy similar a lo reportado por Arslan y Eken-Saraçoğlu (2010) en la fermentación del hidrolizado detoxificado de cáscara de nuez. El consumo de glucosa se diferenció entre el cultivo suplementado y el no suplementado en el tiempo, ya que el cultivo con nutrientes la agotó pasadas las 24 h de fermentación a diferencia del cultivo sin suplementar que requirió 12 h más.

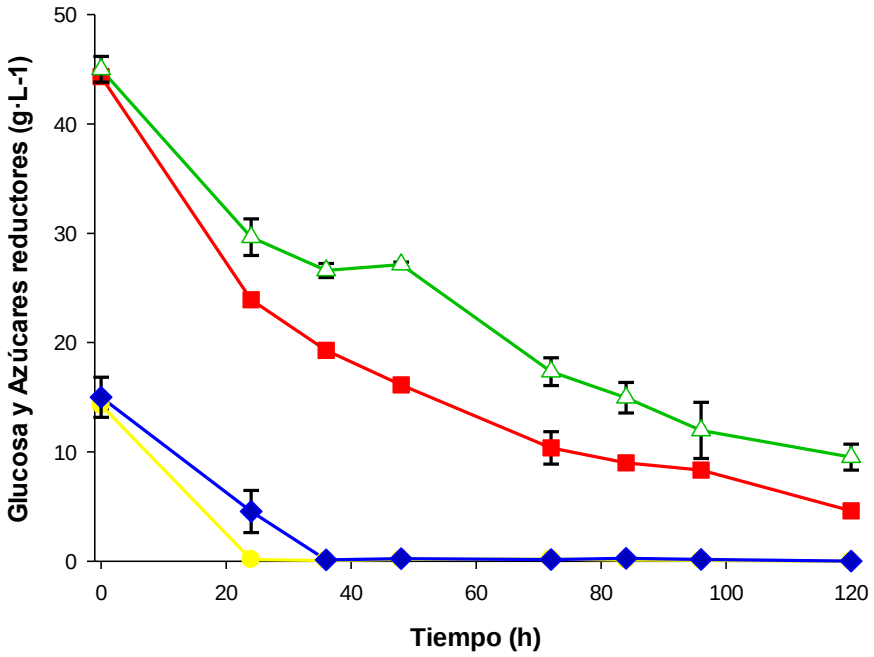


Figura 43. Consumo de azúcares reductores y glucosa durante la fermentación de *P. stipitis* en el HLD de PM a 30 ºC y pH 5. Glucosa en HLD suplementado (Amarillo, ●) y sin suplementar (azul, ♦). Azúcares reductores en HLD suplementado (rojo, ■) y sin suplementar (verde, △). Desviación estándar (negro). Promedio de tres replicas

La preferencia de la glucosa sobre otros azúcares reductores coincide con lo reportado por la literatura (Lee et al., 2000; Agbogbo et al., 2006; Bellido et al., 2011). Mientras que Panchal et al (1988) señalan que solo a concentraciones menores de 2 % ($p \cdot v^{-1}$) de glucosa, la xilosa es consumida. Esto ocurre debido a que la *P. sitipitis* tiene un sistema simporte con alta y baja afinidad que opera de manera simultánea (Agbogbo y Coward-Kelly, 2008). El transportador de baja afinidad es compartido entre la glucosa y la xilosa para el transporte de azúcares, resultando en una inhibición no competitiva por parte de la glucosa sobre la xilosa (Kilian y van Uden, 1988).

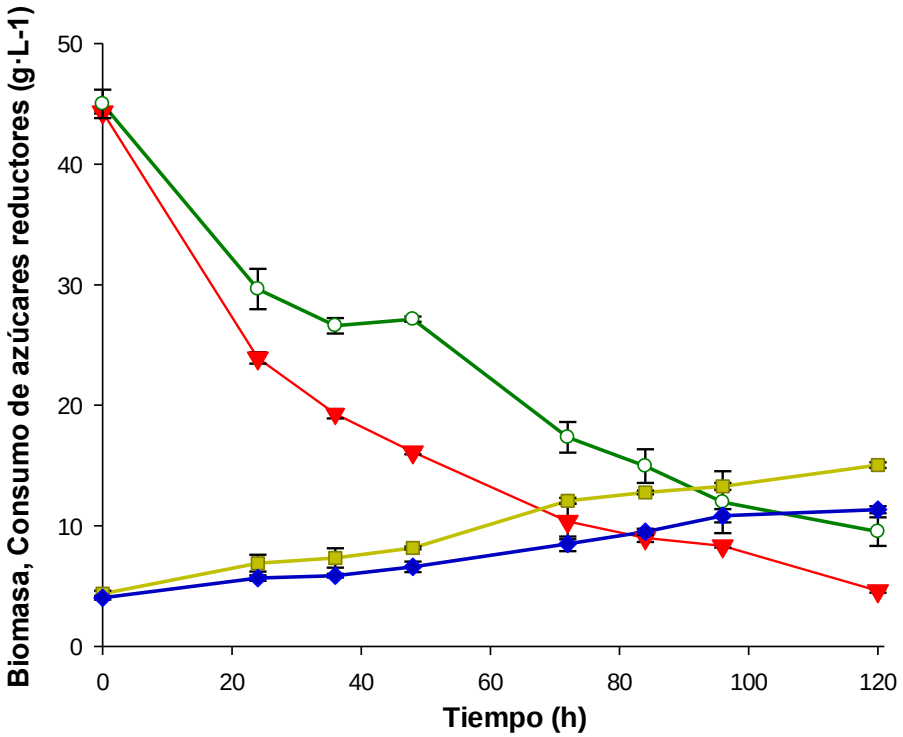


Figura 44. Incremento de la biomasa y consumo de azúcares de la *Pichia stipitis* durante la fermentación en el hidrolizado líquido detoxificado de PM a 30 ºC y pH 5. Azúcares reductores Cultivo con suplemento (rojo, ▼) y sin suplemento (verde, ○) y biomasa (amarillo, ■) Cultivo con suplemento y (azul, ♦) sin suplemento. Desviación estándar (negro). Promedio de tres réplicas.

Al término de las 120 h de fermentación, el cultivo suplementado consumió el 89.60 % de los azúcares iniciales, a diferencia del no suplementado, donde se consumieron 78.84 %. Arslan y Eken-Saraçoğlu (2010) reportan consumos del 80 % de los azúcares totales a las 90 h iniciando con 50 $g \cdot L^{-1}$; mientras que Agbogbo et al (2006) encontraron consumos del 83% al final de la fermentación probando $CaSO_4$, Na_2SO_4 o $(NH_4)_2SO_4$ como suplementos.

La Figura 44 muestra el consumo de los azúcares y el aumento de la biomasa durante la fermentación de los HLD. Se puede observar que el cultivo suplementado tuvo un incremento superior en biomasa comparado al no suplementado. La velocidad especifica de crecimiento del cultivo suplementado fue de 0.0088 $g \cdot L^{-1} \cdot h^{-1}$ con un rendimiento final de biomasa de 10.66 $g \cdot L^{-1}$ con una tasa de producción de biomasa de 0.265 g · g de azúcares reductores consumidos.

En contraste el cultivo sin suplementar tuvo una tasa de crecimiento de 0.0081 $g \cdot L^{-1} \cdot h^{-1}$ resultando en 7.3 $g \cdot L^{-1}$ de biomasa al final de la fermentación, con una eficiencia mucho menor; 0.205 g de biomasa· (g de azúcares reductores consumidos) $^{-1}$. Agbogbo et al (2006) reportaron concentraciones celulares de 7.95 $g \cdot L^{-1}$ a las 96 h en un medio 100 % de glucosa, mientras que en un medio donde el 100 % fue xilosa se alcanzó una concentración celular de 5.96 $g \cdot L^{-1}$ con concentraciones iniciales de 60 $g \cdot L^{-1}$. En contraste, Lee et al (2000) encontraron que; con 100 % de glucosa o xilosa, la concentración celular final de 7 $g \cdot L^{-1}$ con 20 $g \cdot L^{-1}$ de azúcares iniciales.

Es claro, por lo tanto que el cultivo suplementado tuvo un mejor desempeño en la fermentación comparado con el no suplementado. La eficiencia de los procesos de fermentación está vinculada a la composición del medio de cultivo y las condiciones de operación usadas (Silva et al., 2012). Entre los nutrientes usados, se ha reportado que el extracto de levadura tiene efectos protectores en el crecimiento y viabilidad, estimulando la tasa de fermentación y producción de etanol (Casey et al*.,* 1984; Díaz-Montaño et al., 2010). En tanto, el magnesio presente en el $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ se presume que ejerce un efecto protector en las levaduras durante la fermentación por un mecanismo donde disminuye la permeabilidad de la membrana plasmática bajo condiciones de estrés causadas por la presencia del etanol (Birch y Walker, 2000; Hu et al*.,* 2003).

En el caso del $(NH_4)SO_4$, se ha reportado que en vinos, se activa el transporte de azúcares, sin embargo, parte de este, es desviado a la síntesis de aminoácidos, lo cual causa un incremento en la concentración de NADH y por tanto, síntesis de glicerol (Albers et al.,1996). Por último, en el caso del KH_2PO_4 y Na_2HPO_4 promueven una fermentación eficiente ya que incrementan la formación de ATP (Rubio-Arroyo et al., 2011) y su limitación afecta el crecimiento celular y la formación de biomasa (Boulton et al., 1998). En cuanto a producción de etanol, el cultivo suplementado tuvo mejor rendimiento final, ya que se produjeron 4.11 $g \cdot L^{-1}$, en comparación al no suplementado; 3.46 $g \cdot L^{-1}$. La Figura 45 muestra el comportamiento en la producción de etanol durante la fermentación.

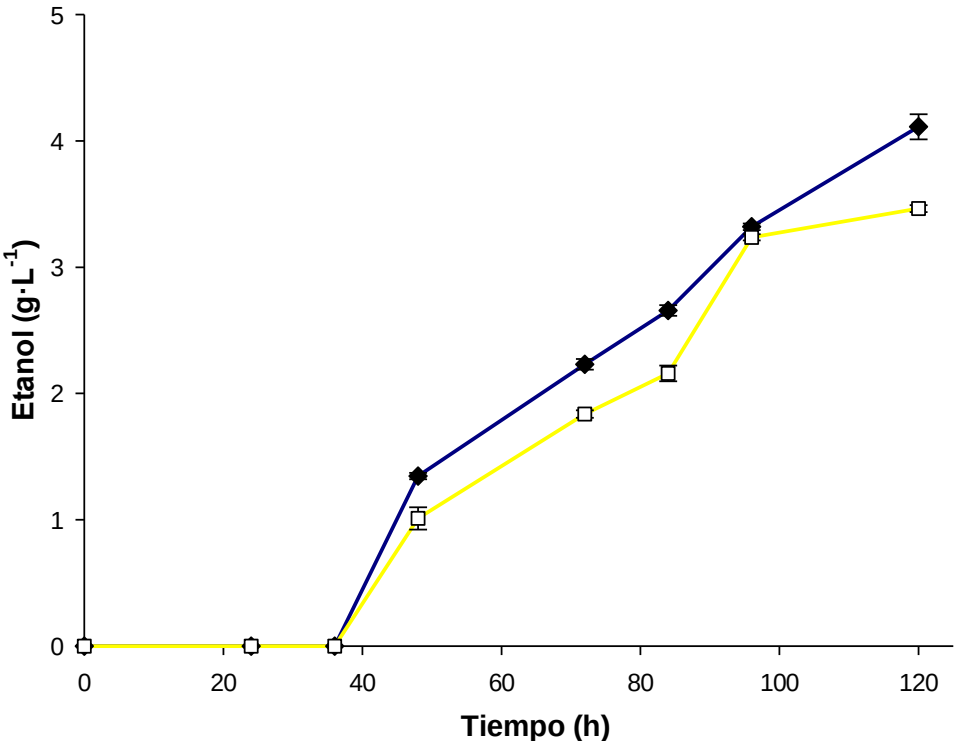


Figura 45. Producción de etanol durante la fermentación del HLD de PM a 30 ºC y pH 5. Cultivo suplementado (Línea azul, ♦) y sin suplementar (línea amarilla, □). Desviación estándar (negro). Promedio de tres réplicas.

La producción de etanol inició alrededor de las 40 h de fermentación alcanzando su máximo a las 120 h, para el caso del cultivo donde se usó suplementación. Agbogbo y Wenger (2006) mencionan que el NH_3 producido de la disociación del NH_4^+; proveniente del $(NH_4)_2SO_4$ estimula la producción de etanol en *P. stipitis*. Esto contribuyó a que el cultivo suplementado tuviera mejor rendimiento.

El rendimiento producto/sustrato se definió como la relación entre el etanol producido y los azúcares consumidos (Bellido et al*.,* 2011) y la productividad de la fermentación (Cuadro 19) fue inferior a lo reportado en la literatura para sustratos conteniendo xilosa (Lee et al., 2000; Agbogbo y Wenger, 2006) e hidrolizados detoxificados (Arslan y Eken-Saraçoğlu, 2010; Günan Yücel y Aksu, 2015). En medios con mezclas de azúcares provenientes de hidrolizados o simples, las células emplean primero los azúcares simples para crecer y sintetizar las enzimas necesarias para la producción de

etanol, posterior a esto, las células pueden continuar su crecimiento usando los azúcares de hidrolizados (Günan Yücel y Aksu, 2015). Esto explica el retraso en la producción de etanol hasta alrededor de las 40 h aunque el crecimiento de la levadura se da desde las primeras horas.

Cuadro 19. Parámetros de la fermentación del HLD de PM usando *P. stipitis*.

Tratamiento	**Con suplementación**	**Sin suplementación**
Concentración máxima de etanol ($g \cdot L^{-1}$)	4.11 ± 0.09	3.46 ± 0.027
Productividad de etanol ($g \cdot L^{-1} \cdot h^{-1}$)	0.034 ± 0.00	0.028 ± 0.00
Rendimiento producto/sustrato ($g \cdot g^{-1}$)	0.091 ± 0.002	0.076 ± 0.0011
Rendimiento producto/biomasa ($g \cdot g^{-1}$)	0.385 ± 0.003	0.475 ± 0.023
Rendimiento biomasa/sustrato ($g \cdot g^{-1}$)	0.274 ± 0.004	0.206 ± 0.008
Consumo de azúcares reductores ($g \cdot L^{-1} \cdot h^{-1}$)	0.016 ± 0.00	0.0163 ± 0.00

Por otro lado, la producción de etanol está fuertemente ligada a la asimilación de los nutrientes por parte de la levadura, volviendo importante el uso de componentes como el extracto de levadura pero teniendo como consecuencia el incremento del costo de producción (Silva et al., 2012). El rendimiento teórico de la fermentación usando suplementación fue del 20.28 % con una producción final de 4.11 $g \cdot L^{-1}$ mientras que el no suplementado fue de 19.12 % y 3.46 g de etanol como producto. Las cantidades de etanol producido se asemejan a lo reportado para medio sintético adicionado con ácido acético (6.9 $g \cdot L^{-1}$), furfural (0.15 $g \cdot L^{-1}$) y derivados de la lignina (Nigam, 2001), hidrolizado de bagazo de caña de azúcar (Canilha et al., 2009) e hidrolizados de papel (Dubey et al., 2012). Pero mucho menores a lo reportado para hidrolizados de cáscara de nuez (Arslan y Eken-Saraçoğlu, 2010), hidrolizados de paja de arroz (Yadav et al., 2011) y medios sintéticos (Agbogbo y Coward-Kelly, 2008).

En el Cuadro 19 se puede ver que el rendimiento producto/sustrato y biomasa/sustrato para el HLD con suplementación fue más alto comparado con el que no fue suplementado, pero en ambas condiciones, el rendimiento de la biomasa fue más alto en comparación al del etanol. Esto puede ser debido a que los azúcares fueron metabolizados por la vía oxidativa, reduciendo la producción de etanol y aumentando la

producción de biomasa (Silva et al., 2012). También pudo ser causado por la presencia de compuestos inhibitorios que permanecen aún después de la detoxificación (Canilha et al., 2009).

En cuanto a productividad de etanol y rendimiento biomasa/sustrato, el cultivo suplementado tuvo mejores características que el no suplementado, por lo cual, el uso de nutrientes extra favorece la conversión de azúcares a etanol. Silva et al (2012) señalan que no solo la presencia de nutrientes, sino también la concentración de los mismos en los medios de fermentación tienen influencia sobre la producción de etanol por parte de la *P. stipitis*. Esto pudo tener impacto en la fermentación ya que en el medio suplementado se usó la mitad del extracto de levadura reportado para otras fermentaciones (Arslan y Eken-Saraçoğlu, 2010; Bellido et al., 2011) y no se empleó peptona. Otro factor a considerar fue la aireación, ya que los matraces solo se mantuvieron en agitación, Fiaux et al (2003) señalan que *P. stipitis* no produce etanol a partir de glucosa en condiciones de aerobiosis, por lo cual, la producción de etanol o biomasa por parte de la levadura dependerá de la suplementación adecuada de oxigeno (Agbogbo y Coward-Kelly, 2008).

5.3 Simulación de producción de etanol a partir de pericarpio de maíz

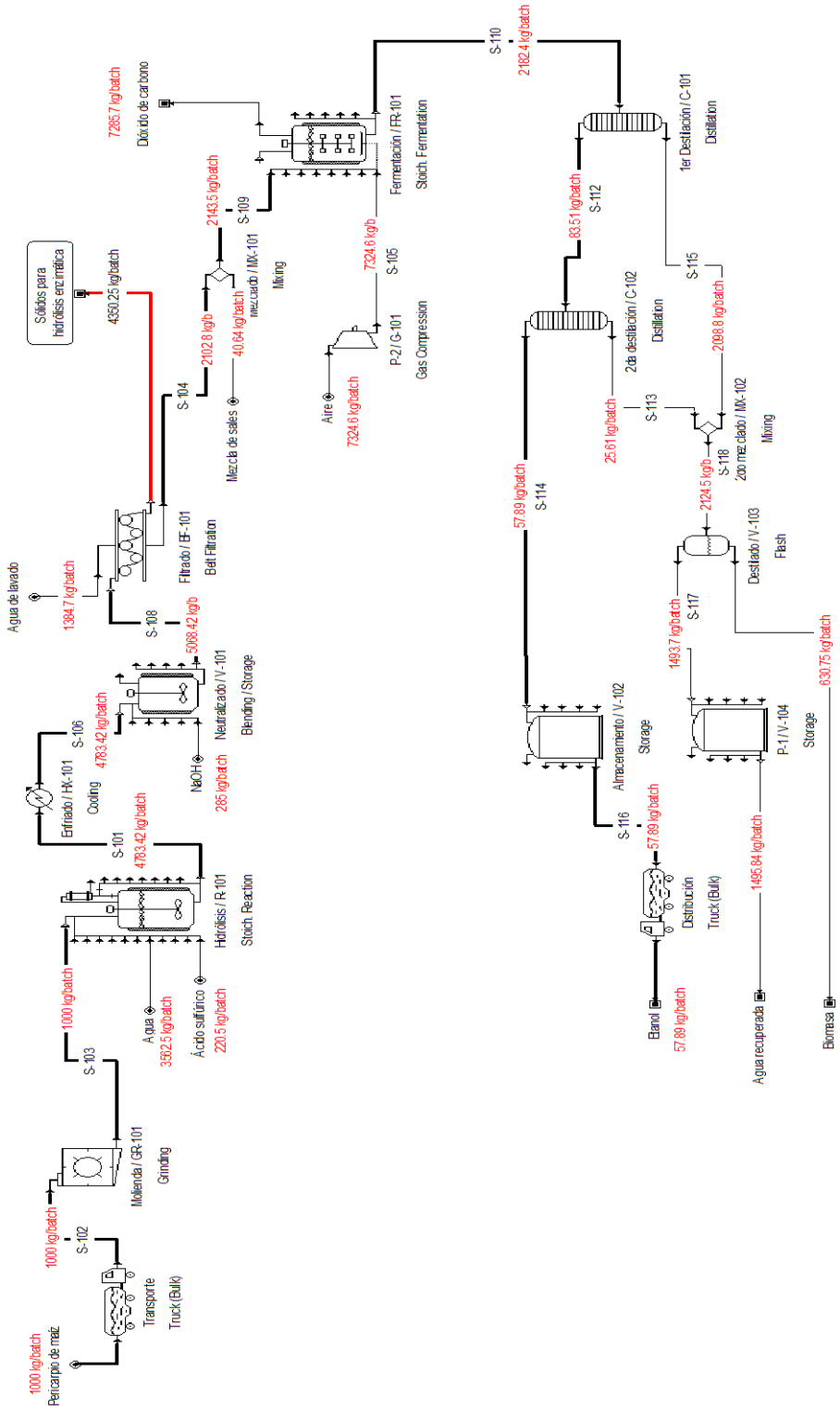


Figura 46. Esquema de simulación de la producción de bioetanol a partir de pericarpio de maíz en SuperPro ®.

Se construyó el diagrama de proceso simplificado de la producción de bioetanol a partir del PM (Figura 46) tomando en cuenta las cuatro etapas necesarias para su producción: (1) pretratamiento, (2) fermentación, (3) destilación y (4) almacenamiento de productos. Cada etapa del proceso contempló una serie de operaciones necesarias para la producción del bioetanol a partir del PM. Las simulaciones han permitido entender los procesos y las implicaciones que tienen las modificaciones que se hacen a nivel laboratorio (Ferrari et al., 2013). En la literatura ya se han reportado modelos de producción usando diferentes materias primas usando el software SuperPro Designer® (Kim et al., 2014).

5.3.1 Etapa del pretratamiento

Para esta etapa se contemplaron las siguientes operaciones: transporte, molienda, tamizado, hidrólisis ácida, enfriado, neutralizado y filtrado (Figura 47).

Se simuló un proceso con una base de producción de 1000 kg de PM·lote^{-1} tomando como composición del PM la reportada por Díaz-Malváez et al (2013).

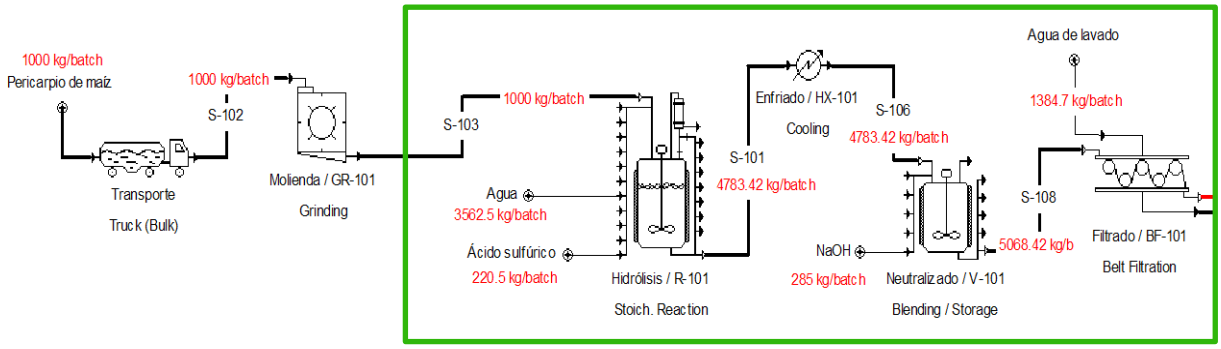


Figura 47. Simulación del pretratamiento ácido del PM en SuperPro ®.

El proceso inició con el transporte y posteriormente la molienda (3 h) (GR-101), si bien este proceso no fue considera previamente se incluiría para obtener una distribución más homogénea de la materia prima. Después de la reducción del tamaño de partícula, se transfirió el material (S-103) al reactor (R-101) para llevar a cabo la hidrólisis ácida, usando 220.5 kg de ácido sulfúrico y 3562.5 kg de agua para crear una solución al 4.6 %. Las condiciones de trabajo del reactor fueron 120 ºC y 39 min de reacción, el

volumen de trabajo del reactor fue de 90 %. Se consideraron 3 reacciones para la hidrólisis ácida: (1) hidrólisis del almidón, (2) hidrólisis de la celulosa, (3) hidrólisis de la hemicelulosa. Bajo estas condiciones se obtuvo en flujo S-101 25.81 kg·lote^{-1} de glucosa y 612.96 kg·lote^{-1} de xilosa. Esta corriente se enfrió a 25 ºC (S-106) y se neutralizó con NaOH (285 kg·lote^{-1}), la corriente resultante (S-108) se filtró y lavó con 1384.7 kg·lote^{-1} de agua, esta cantidad se ajustó automáticamente por el programa (BF-101). El resultado del filtrado fue 2 flujos, la que contenía los sólidos hidrolizados (rojo) con alto potencial para una hidrólisis enzimática y la corriente rica en azúcares (S-104) 2102.8 kg·lote^{-1}.

5.3.2 Etapa de la fermentación

Para la etapa de fermentación (Figura 48) se tomó la corriente rica en azúcares (S-104) y se mezcló (MX-101) con 40.64kg·lote^{-1} de la suplementación previamente usada (extracto de levadura, $[NH_4]SO_4$, KH_2PO_4, Na_2HPO_4 y $MgSO_4{\cdot}7H_2O$) para llevarlos al fermentador (FR-101). En esta etapa se consideraron tres reacciones: (1) conversión de xilosa a etanol, (2) conversión de glucosa a etanol y (3) síntesis de biomasa. El fermentador se operó a 30 ºC por 120 h con una inyección de aire de 7298 kg·lote^{-1}. La inyección de aire se ajustó automáticamente por el programa. Se consideró la inyección de aire debido que cuando la *P. stipitis* sintetiza etanol a partir de glucosa o xilosa depende de una suplementación adecuada de oxigeno (Silva et al., 2012), aunque este requerimiento no fue determinado experimentalmente. La corriente resultante de la fermentación (S-110) alcanzó una concentración de etanol de 65.46 kg·lote^{-1} (2.99 %) y se produjeron 49.45 kg·lote^{-1} de biomasa. No se consumieron todos los azúcares ya que en la corriente de salida; 2182.4 kg·lote^{-1}, el 0.35 % correspondía a glucosa y 8.6 % a xilosa. Por lo que la optimización de la fermentación resulta en un nuevo reto. Una fermentación eficiente resulta esencial, ya que tiene influencia sobre el consumo total de energía, impactando directamente en los costos totales del proceso (Ferrari et al., 2013).

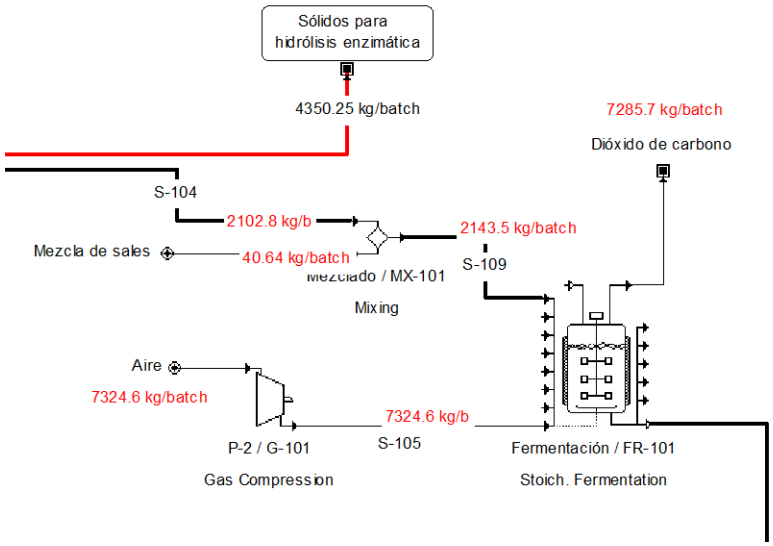


Figura 48. Simulación de la fermentación de la fracción líquida pretratada.

5.3.3 Etapa de la destilación

Para recuperar el etanol, se requerirían dos unidades de destilación fraccionada (C-101 y C-102) (Figura 49).

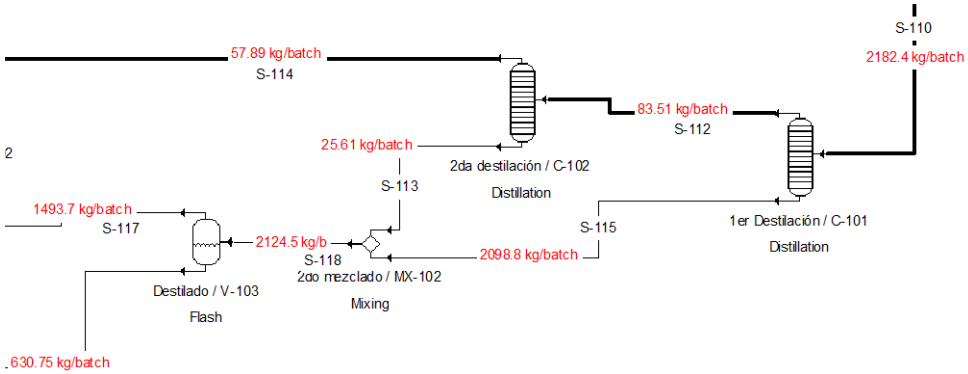


Figura 49. Simulación de la destilación para obtener el bioetanol a partir de PM.

El tiempo de destilación requerido sería de 6 h por unidad, de la unidad de destilación C-101 resultaron dos flujos, S-112 como la fracción ligera de 83.51 kg·lote^{-1} con una concentración de 77.60 % de etanol y el resto agua. La fracción pesada S-115 de 2098 kg·lote^{-1}, esta fracción estaba compuesta por la biomasa, agua y los azúcares no fermentados. La unidad de destilación C-102 generó una fracción ligera S-114 de 57.89 kg·lote^{-1} a una concentración de etanol del 95.1 % que fue depositada en un tanque de almacenamiento V-102 para su posterior distribución. La fracción pesada de C-102 (S-

113) se mezcló con la corriente S-115 para pasarla por un destilador flash y recuperar la mayor cantidad de agua posible, como resultado se generaron dos corrientes, la S-117 a un flujo de 1493.7 kg·lote^{-1} y una composición de agua del 100%, en tanto que la fase pesada tenía un flujo de 630.75 kg·lote^{-1} concentrando la levadura y los azúcares sin fermentar.

5.3.4 Etapa de la obtención de productos

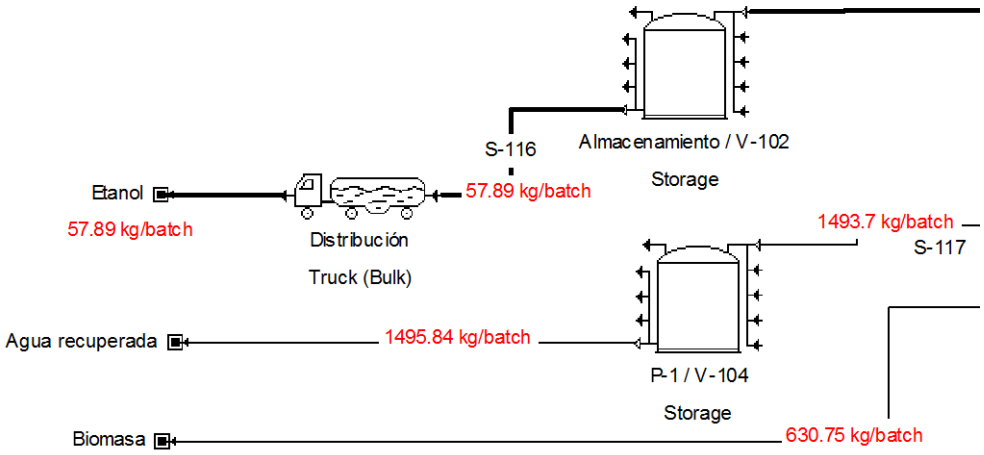


Figura 50. Simulación de la etapa de obtención de productos.

En la etapa de obtención de productos (Figura 50) se consideraría el almacenamiento y distribución del etanol, alcanzando un rendimiento de etanol de 57.89 kg por cada tonelada de PM a una concentración de 95.1 % y el resto agua. Además se producirían 630.75 kg·lote^{-1} de biomasa y azúcares sin fermentar y 1495.84 kg·lote^{-1} de agua recuperada.

El esquema de simulación desarrollado (Figura 46) permite sentar las bases para establecer escenarios de producción donde se puedan determinar los costos y rendimientos del proceso. Para esto, todavía es necesario optimizar la fermentación y destilación así como refinar los parámetros cinéticos de las reacciones en cada etapa, esto con el fin de tener mayor precisión a la hora de llevar a cabo la simulación.

6. CONCLUSIONES

Las conclusiones de este trabajo se presentan a continuación:

- La optimización del pretratamiento ácido en la producción de azúcares a partir de pericarpio de maíz permitió la producción de un máximo de azúcares reductores de 89 $g \cdot L^{-1}$, de los cuales 19.2 $g \cdot L^{-1}$ constituyen glucosa. Se logró hidrolizar cerca del 70 % del pericarpio inicial alcanzando rendimientos de azúcares de 42 $g \cdot (100\ g\ de\ PM)^{-1}$. El pretratamiento usando ácido sulfúrico diluido resultó ser una alternativa para producir azúcares fermentables a partir del pericarpio de maíz.

- Si bien se confirmó el potencial del HLD como medio de producción de bioetanol utilizando *P. stipitis*, es necesario optimizar la fermentación de los azúcares en la fracción liquida del pericarpio de maíz hidrolizado para incrementar la producción de etanol y por ende, aumentar la eficiencia del proceso.

- Se simuló la producción de etanol a partir de pericarpio de maíz, usando SuperPro Design. A partir de 1000 kg de pericarpio de maíz, se produjeron 57.89 kg de etanol a una concentración del 95.1 %. La disparidad entre los resultados experimentales y lo obtenido en la simulación es debido a la falta de datos cinéticos y experimentales que permitan desarrollar un esquema más apegado a la realidad. La simulación del proceso sirve como punto de partida para el estudio de la producción de etanol a partir de pericarpio de maíz a nivel industrial.

7. LITERATURA CITADA

Agbogbo, F. K., and G. Coward-Kelly. 2008. Cellulosic ethanol production using the naturally occurring xylose-fermenting yeast, Pichia stipitis. Biotechnol. Lett. 30:1515–1524.

Agbogbo, F. K., G. Coward-Kelly, M. Torry-Smith, and K. S. Wenger. 2006. Fermentation of glucose/xylose mixtures using *Pichia stipitis.* Process Biochem. 41:2333–2336.

Agbogbo, F. K., and K. S. Wenger. 2006. Effect of pretreatment chemicals on xylose fermentation by *Pichia stipitis*. Biotechnol. Lett. 28:2065–2069.

Albers, E., C. Larsson, G. Lidén, C. Niklasson, and L. Gustafsson. 1996. Influence of the nitrogen source on *Saccharomyces cerevisiae* anaerobic growth and product formation. Appl. Environ. Microbiol. 62:3187–3195.

Alonso, D. M., J. Q. Bond, and J. A. Dumesic. 2010. Catalytic conversion of biomass to biofuels. Green Chem. 12:1493–1513.

Alvarez, M. E. T., E. B. Moraes, J. C. Rodrigues, A. J. Bonon, and M. R. Wolf-Maciel. 2012. Evaluation of the batch distillation process in the ethanol production. Computer Aided Chemical Engineering. 30: 632–636.

Alvira, P., E. Tomás-Pejó, M. Ballesteros, and M. J. Negro. 2010. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review. Bioresour. Technol. 101:4851–4861.

Arslan, Y., and N. Eken-Saraçoğlu. 2010. Effects of pretreatment methods for hazelnut shell hydrolysate fermentation with *Pichia Stipitis* to ethanol. Bioresour. Technol. 101:8664–8670.

Avci, A., B. C. Saha, B. S. Dien, G. J. Kennedy, and M. A. Cotta. 2013. Response surface optimization of corn stover pretreatment using dilute phosphoric acid for enzymatic hydrolysis and ethanol production. Bioresour. Technol. 130:603–612.

Baadhe, R. R., R. Potumarthi, and N. K. Mekala. 2014. Influence of dilute acid and alkali pretreatment on reducing sugar production from corncobs by crude enzymatic method: A comparative study. Bioresour. Technol. 162:213–217.

Bajpai, P. 2013. Production of Bioethanol. In: Advances in Bioethanol. Springer India. p. 21–53. Available from: http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-81-322-1584-4_3

Ballesteros, I., M. Ballesteros, P. Manzanares, M. J. Negro, J. M. Oliva, and F. Sáez. 2008a. Dilute sulfuric acid pretreatment of cardoon for ethanol production. Biochem. Eng. J. 42:84–91.

Ballesteros, I., M. Ballesteros, P. Manzanares, M. J. Negro, J. M. Oliva, and F. Sáez. 2008b. Dilute sulfuric acid pretreatment of cardoon for ethanol production. Biochem. Eng. J. 42:84–91.

Bellido, C., S. Bolado, M. Coca, S. Lucas, G. González-Benito, and M. T. García-Cubero. 2011. Effect of inhibitors formed during wheat straw pretreatment on ethanol fermentation by *Pichia stipitis.* Bioresour. Technol. 102:10868–10874.

Bhatia, L., S. Johri, and R. Ahmad. 2012. An economic and ecological perspective of ethanol production from renewable agro waste: a review. AMB Express 2:65.

Birch, R. M., and G. M. Walker. 2000. Influence of magnesium ions on heat shock and ethanol stress responses of *Saccharomyces cerevisiae.* Enzyme Microb. Technol. 26:678–687.

Bizzo, W., P. C. Lenço, D. J. Carvalho, and J. P. S. Veiga. 2014. The generation of residual biomass during the production of bio-ethanol from sugarcane, its characterization and its use in energy production. Renew. Sustain. Energy Rev. 29:589–603Boulton, R. B., V. L. Singleton, L. F. Bisson, and R. E. Kunkee. 1998. Principles and Practices of Winemaking. Springer.

Box, G. E. P., and N. R. Draper. 1982. Measures of Lack of Fit for Response Surface Designs and Predictor Variable Transformations. Technometrics 24:1–8.

Buruiana, C.-T., C. Vizireanu, G. Garrote, and J. C. Parajó. 2014. Bioethanol Production from Hydrothermally Pretreated and Delignified Corn Stover by Fed-Batch Simultaneous Saccharification and Fermentation. Energy Fuels 28:1158–1165.

Cai, B.-Y., J.-P. Ge, H.-Z. Ling, K.-K. Cheng, and W.-X. Ping. 2012. Statistical optimization of dilute sulfuric acid pretreatment of corncob for xylose recovery and ethanol production. Biomass Bioenergy 36:250–257.

Canilha, L., W. Carvalho, M. das G. de A. Felipe, J. B. de A. e Silva, and M. Giulietti. 2009. Ethanol Production from Sugarcane Bagasse Hydrolysate Using *Pichia stipitis*. Appl. Biochem. Biotechnol. 161:84–92.

Casey, G. P., C. A. Magnus, and W. M. Ingledew. 1984. High-Gravity Brewing: Effects of Nutrition on Yeast Composition, Fermentative Ability, and Alcohol Production. Appl. Environ. Microbiol. 48:639–646.

Castaño, E, and Domínguez, J. 2010. Diseño de Experimentos: Estrategias y Análisis en Ciencia y Tecnología. Primera. UAQ-CIMAT. Available from: http://www.uaq.mx/servicios/publicaciones/pdf/squi-Diseno-Eduardo.pdf

Castro, E., M. J. Díaz, C. Cara, E. Ruiz, I. Romero, and M. Moya. 2011. Dilute acid pretreatment of rapeseed straw for fermentable sugar generation. Bioresour. Technol. 102:1270–1276.

Chaturvedi, V., and P. Verma. 2013. An overview of key pretreatment processes employed for bioconversion of lignocellulosic biomass into biofuels and value added products. 3 Biotech 3:415–431.

Cheng, K.-K., J.-A. Zhang, E. Chavez, and J.-P. Li. 2010. Integrated production of xylitol and ethanol using corncob. Appl. Microbiol. Biotechnol. 87:411–417.

Díaz-Malváez, F. I., B. E. García-Almendárez, A. Hernández-Arana, A. Amaro-Reyes, and C. Regalado-González. 2013. Isolation and properties of β-xylosidase from *Aspergillus niger* GS1 using corn pericarp upon solid state fermentation. Process Biochem. 48:1018–1024.

Díaz-Montaño, D. M., E. Favela-Torres, and J. Córdova. 2010. Improvement of growth, fermentative efficiency and ethanol tolerance of *Kloeckera africana* during the fermentation of *Agave tequilana* juice by addition of yeast extract. J. Sci. Food Agric. 90:321–328.

Dubey, A. K., P. K. Gupta, N. Garg, and S. Naithani. 2012. Bioethanol production from waste paper acid pretreated hydrolyzate with xylose fermenting *Pichia stipitis*. Carbohydr. Polym. 88:825–829.

Van Eylen, D., F. van Dongen, M. Kabel, and J. de Bont. 2011. Corn fiber, cobs and stover: Enzyme-aided saccharification and co-fermentation after dilute acid pretreatment. Bioresour. Technol. 102:5995–6004.

Ferrari, M. D., M. Guigou, and C. Lareo. 2013. Energy consumption evaluation of fuel bioethanol production from sweet potato. Bioresour. Technol. 136:377–384.

Fiaux, J., Z. P. Çakar, M. Sonderegger, K. Wüthrich, T. Szyperski, and U. Sauer. 2003. Metabolic-Flux Profiling of the Yeasts *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia stipitis*. Eukaryot. Cell 2:170–180.

Gáspár, M., G. Kálmán, and K. Réczey. 2007. Corn fiber as a raw material for hemicellulose and ethanol production. Process Biochem. 42:1135–1139.

Gavrilescu, M., and Y. Chisti. 2005. Biotechnology—a sustainable alternative for chemical industry. Biotechnol. Adv. 23:471–499.

Günan Yücel, H., and Z. Aksu. 2015. Ethanol fermentation characteristics of *Pichia stipitis* yeast from sugar beet pulp hydrolysate: Use of new detoxification methods. Fuel 158:793–799.

Guo, F., Z. Fang, C. C. Xu, and R. L. Smith Jr. 2012. Solid acid mediated hydrolysis of biomass for producing biofuels. Prog. Energy Combust. Sci. 38:672–690.

Guo, G.-L., W.-H. Chen, W.-H. Chen, L.-C. Men, and W.-S. Hwang. 2008. Characterization of dilute acid pretreatment of silvergrass for ethanol production. Bioresour. Technol. 99:6046–6053.

Haghighi Mood, S., A. Hossein Golfeshan, M. Tabatabaei, G. Salehi Jouzani, G. H. Najafi, M. Gholami, and M. Ardjmand. 2013. Lignocellulosic biomass to bioethanol, a comprehensive review with a focus on pretreatment. Renew. Sustain. Energy Rev. 27:77–93.

Hsu, T.-C., G.-L. Guo, W.-H. Chen, and W.-S. Hwang. 2010. Effect of dilute acid pretreatment of rice straw on structural properties and enzymatic hydrolysis. Bioresour. Technol. 101:4907–4913.

Huang, H.-J., S. Ramaswamy, U. W. Tschirner, and B. V. Ramarao. 2008. A review of separation technologies in current and future biorefineries. Sep. Purif. Technol. 62:1–21.

Hu, C.-K., F.-W. Bai, and L.-J. An. 2003. Enhancing ethanol tolerance of a self-flocculating fusant of *Schizosaccharomyces pombe* and *Saccharomyces cerevisiae* by Mg2+ via reduction in plasma membrane permeability. Biotechnol. Lett. 25:1191–1194.

Jung, Y. H., and K. H. Kim. 2015. Chapter 3 - Acidic Pretreatment. In: A. P. N. B. Larroche, editor. Pretreatment of Biomass. Elsevier, Amsterdam. p. 27–50. Available from: http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128000809000037

Khuri, A. I., and S. Mukhopadhyay. 2010. Response surface methodology. Wiley Interdiscip. Rev. Comput. Stat. 2:128–149.

Kilian, S. G., and N. van Uden. 1988. Transport of xylose and glucose in the xylose-fermenting yeast *Pichia stipitis*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 27:545–548.

Kim, S. B., C. Park, and S. W. Kim. 2014. Process design and evaluation of production of bioethanol and β-lactam antibiotic from lignocellulosic biomass. Bioresour. Technol. 172:194–200.

Kim, T. H. 2013. Pretreatment of Lignocellulosic Biomass. In: S.-T. Yang, H. A. El-Enshasy, and N. Thongchul (ed). Bioprocessing Technologies in Biorefinery for Sustainable Production of Fuels, Chemicals, and Polymers. John Wiley & Sons, Inc. p. 91–110.

Klasson, K. T., B. S. Dien, and R. E. Hector. 2013. Simultaneous detoxification, saccharification, and ethanol fermentation of weak-acid hydrolyzates. Ind. Crops Prod. 49:292–298.

Kuehl, R. O. 2001. Diseño de experimentos: principios estadísticos de diseño y análisis de investigación. Thomson Learning.

Kumar, S., N. Singh, and R. Prasad. 2010a. Anhydrous ethanol: A renewable source of energy. Renew. Sustain. Energy Rev. 14:1830–1844.

Larsson, S., A. Reimann, N.-O. Nilvebrant, and L. J. Jönsson. 1999. Comparison of Different Methods for the Detoxification of Lignocellulose Hydrolyzates of Spruce. In: B.

H. Davison and M. Finkelstein, editors. Twentieth Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals. Humana Press. p. 91–103. Available from: http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-4612-1604-9_9

Lee, J. M., R. A. Venditti, H. Jameel, and W. R. Kenealy. 2011. Detoxification of woody hydrolyzates with activated carbon for bioconversion to ethanol by the thermophilic anaerobic bacterium *Thermoanaerobacterium saccharolyticum.* Biomass Bioenergy 35:626–636.

Lee, T.-Y., M.-D. Kim, K.-Y. Kim, K. Park, Y.-W. Ryu, and J.-H. Seo. 2000. A parametric study on ethanol production from xylose by *Pichia stipitis*. Biotechnol. Bioprocess Eng. 5:27–31.

Liew, W. H., M. H. Hassim, and D. K. S. Ng. 2014. Review of evolution, technology and sustainability assessments of biofuel production. J. Clean. Prod. 71:11–29.

Ligero, E. L., and T. M. K. Ravagnani. 2003. Dehydration of ethanol with salt extractive distillation—a comparative analysis between processes with salt recovery. Chem. Eng. Process. Process Intensif. 42:543–552.

Limayem, A., and S. C. Ricke. 2012. Lignocellulosic biomass for bioethanol production: Current perspectives, potential issues and future prospects. Prog. Energy Combust. Sci. 38:449–467.

Lloyd, T. A., and C. E. Wyman. 2005. Combined sugar yields for dilute sulfuric acid pretreatment of corn stover followed by enzymatic hydrolysis of the remaining solids. Bioresour. Technol. 96:1967–1977.

López-Linares, J. C., I. Romero, C. Cara, E. Ruiz, M. Moya, and E. Castro. 2014. Bioethanol production from rapeseed straw at high solids loading with different process configurations. Fuel 122:112–118.

Luo, J., M. Cai, and T. Gu. 2013. Pretreatment of Lignocellulosic Biomass Using Green Ionic Liquids. In: T. Gu, editor. Green Biomass Pretreatment for Biofuels Production. Springer Netherlands. p. 127–153. Available from: http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-94-007-6052-3_6

Madigan, M. T., J. M. Martinko, J. Parker, T. D. Brock, C. R. Fernández, and M. S. Pérez. 2004. Brock biología de los microorganismos. Pearson Educación.

Mateo, S., I. C. Roberto, S. Sánchez, and A. J. Moya. 2013. Detoxification of hemicellulosic hydrolyzate from olive tree pruning residue. Ind. Crops Prod. 49:196–203.

Miyafuji, H., H. Danner, M. Neureiter, C. Thomasser, J. Bvochora, O. Szolar, and R. Braun. 2003. Detoxification of wood hydrolysates with wood charcoal for increasing the fermentability of hydrolysates. Enzyme Microb. Technol. 32:396–400.

Montgomery, D. C. 2005. Diseño y análisis de experimentos. Limusa Wiley.

Mussatto, S. I., and I. C. Roberto. 2004. Alternatives for detoxification of diluted-acid lignocellulosic hydrolyzates for use in fermentative processes: a review. Bioresour. Technol. 93:1–10.

Nigam, J. N. 2001. Ethanol production from wheat straw hemicellulose hydrolysate by *Pichia stipitis*. J. Biotechnol. 87:17–27.

Nilvebrant, N.-O., P. Persson, A. Reimann, F. de Sousa, L. Gorton, and L. J. Jönsson. 2003. Limits for Alkaline Detoxification of Dilute-Acid Lignocellulose Hydrolysates. In: B. H. Davison, J. W. Lee, M. Finkelstein, and J. D. McMillan, editors. Biotechnology for Fuels and Chemicals. Humana Press. p. 615–628. Available from: http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-4612-0057-4_51

Noureddini, H., and J. Byun. 2010. Dilute-acid pretreatment of distillers' grains and corn fiber. Bioresour. Technol. 101:1060–1067.

Panchal, C. J., L. Bast, I. Russell, and G. G. Stewart. 1988. Repression of xylose utilization by glucose in xylose-fermenting yeasts. Can. J. Microbiol. 34:1316–1320.

Pedraza Berenguer, R. 2012. Deshidratación de etanol mediante destilación azeotrópica con hidrocarburos componentes de la gasolina: estudio de la viabilidad del proceso a escala semi-planta piloto. Available from: http://rua.ua.es/dspace/handle/10045/33032

Peskett, Leo, Slater, Rachel, Stevens, Chris, and Dufey, Annie. 2007. Biofuels, Agriculture and Poverty Reduction. Natural Resource Perspective:6.

Philbrook, A., A. Alissandratos, and C. J. 2013. Biochemical Processes for Generating Fuels and Commodity Chemicals from Lignocellulosic Biomass. In: M. Petre, editor. Environmental Biotechnology - New Approaches and Prospective Applications. InTech. Available from: http://www.intechopen.com/books/environmental-biotechnology-new-approaches-and-prospective-applications/biochemical-processes-for-generating-fuels-and-commodity-chemicals-from-lignocellulosic-biomass

Qi, B., X. Chen, F. Shen, Y. Su, and Y. Wan. 2009. Optimization of Enzymatic Hydrolysis of Wheat Straw Pretreated by Alkaline Peroxide Using Response Surface Methodology. Ind. Eng. Chem. Res. 48:7346–7353.

Reddy, C. A., and R. L. Gherna. 2007. Culture Preservation. In: G. A. Marzluf, C. A. Reddy, T. J. Beveridge, T. M. Schmidt, L. R. Snyder, and J. A. Breznak, editors. Methods for General and Molecular Microbiology, Third Edition. American Society of Microbiology. p. 1019–1034. Available from: http://www.asmscience.org/content/book/10.1128/9781555817497.chap47

Rubin, E. M. 2008. Genomics of cellulosic biofuels. Nature 454:841–845.

Rubio-Arroyo, M. F., P. Vivanco-Loyo, M. Juárez, M. Poisot, and G. Ramírez-Galicia. 2011. Bio-ethanol Obtained by Fermentation Process with Continuous Feeding of Yeast. J. Mex. Chem. Soc. 55:242–245.

Ruiz, E., I. Romero, M. Moya, C. Cara, J. D. Vidal, and E. Castro. 2013. Dilute sulfuric acid pretreatment of sunflower stalks for sugar production. Bioresour. Technol. 140:292–298.

Saha, B. C. 2003. Hemicellulose bioconversion. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 30:279–291.

Saucedo-Luna, J., A. J. Castro-Montoya, M. M. Martinez-Pacheco, C. R. Sosa-Aguirre, and J. Campos-Garcia. 2010. Efficient chemical and enzymatic saccharification of the lignocellulosic residue from *Agave tequilana* bagasse to produce ethanol by *Pichia caribbica*. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 38:725–732.

Silva, J. P. A., S. I. Mussatto, I. C. Roberto, and J. A. Teixeira. 2012. Fermentation medium and oxygen transfer conditions that maximize the xylose conversion to ethanol by *Pichia stipitis*. Renew. Energy 37:259–265.

Sims, R. E. H., W. Mabee, J. N. Saddler, and M. Taylor. 2010. An overview of second generation biofuel technologies. Bioresour. Technol. 101:1570–1580.

Solomon, B. D., J. R. Barnes, and K. E. Halvorsen. 2007. Grain and cellulosic ethanol: History, economics, and energy policy. Biomass Bioenergy 31:416–425.

Srilekha Yadav, K., S. Naseeruddin, G. Sai Prashanthi, L. Sateesh, and L. Venkateswar Rao. 2011. Bioethanol fermentation of concentrated rice straw hydrolysate using co-culture of *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia stipitis*. Bioresour. Technol. 102:6473–6478.

Sun, Y., and J. Cheng. 2002. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. Bioresour. Technol. 83:1–11.

Thompson, P. B. 2012. The Agricultural Ethics of Biofuels: The Food vs. Fuel Debate. Agriculture 2:339–358.

Timilsina, G. R. 2014. Biofuels in the long-run global energy supply mix for transportation. Philos. Trans. R. Soc. Math. Phys. Eng. Sci. 372:20120323.

Tomás-Pejó, E., M. Ballesteros, J. M. Oliva, and L. Olsson. 2010. Adaptation of the xylose fermenting yeast *Saccharomyces cerevisiae* F12 for improving ethanol production in different fed-batch SSF processes. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 37:1211–1220.

Villadsen, J., J. Nielsen, and G. Lidén. 2011. Chemicals from Metabolic Pathways. In: Bioreaction Engineering Principles. Springer US. p. 7–62. Available from: http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-4419-9688-6_2

Wang, L., and H. Chen. 2011. Increased fermentability of enzymatically hydrolyzed steam-exploded corn stover for butanol production by removal of fermentation inhibitors. Process Biochem. 46:604–607.

Wood, I. P., A. Elliston, P. Ryden, I. Bancroft, I. N. Roberts, and K. W. Waldron. 2012. Rapid quantification of reducing sugars in biomass hydrolysates: Improving the speed and precision of the dinitrosalicylic acid assay. Biomass Bioenergy 44:117–121.

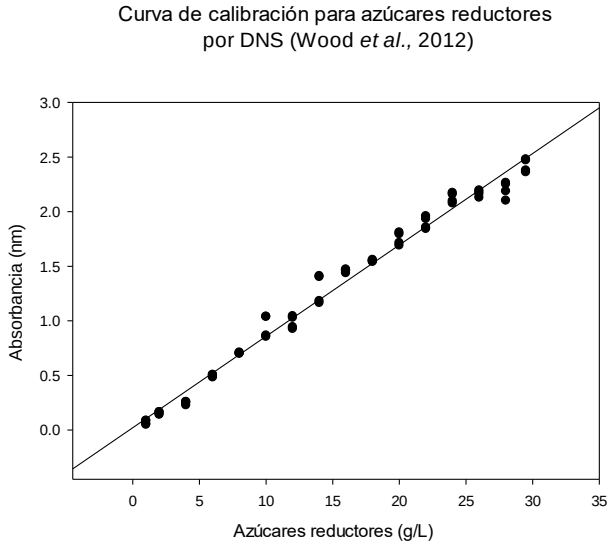
Yang, B., and C. E. Wyman. 2008. Pretreatment: the key to unlocking low-cost cellulosic ethanol. Biofuels Bioprod. Biorefining 2:26–40.

Yoshida, T., S. Tsubaki, Y. Teramoto, and J. Azuma. 2010. Optimization of microwave-assisted extraction of carbohydrates from industrial waste of corn starch production using response surface methodology. Bioresour. Technol. 101:7820–7826.

Anexo 1. Calculo de azúcares reductores

Cuadro de valores tomados para construir la curva de calibración de azúcares

Azúcares (g/L)	Absorbancia (nm)			
1	0.049	0.0837	0.0868	0.0568
2	0.141	0.164	0.1649	0.1489
4	0.2578	0.249	0.2576	0.227
6	0.4821	0.5047	0.5059	0.4917
8	0.7001	0.6991	0.7048	0.7102
10	0.8547	1.037	1.0388	0.8657
12	0.9266	1.0288	1.043	0.9426
14	1.1654	1.4024	1.4117	1.1827
16	1.4373	1.463	1.472	1.4598
18	1.5409	1.546	1.5526	1.5594
20	1.6905	1.7949	1.8104	1.7144
22	1.9346	1.8426	1.8567	1.9593
24	2.0768	2.1594	2.1726	2.0965
26	2.1622	2.1793	2.1953	2.1287
28	2.1015	2.2519	2.2642	2.1875
29.5	2.3616	2.4703	2.4796	2.378



Ecuación de la recta para el cálculo de la concentración de azucares en hidrolizados de pericarpio de maíz (R^2_{Adj} = 0.987).

$$Abs\ (nm) = Azúcares\ (g \cdot L^{-1}) * 0.08376 + 0.01344$$

Anexo 2. Determinación de glucosa por kit enzimático

(Cat. 10716251035)

El principio del kit se basa en la fosforilación de la D-glucosa a D-glucosa-6-fosfato (G-6-P) en presencia de la enzima hexoquinasa (HK) y ATP con la formación simultánea de ADP. En presencia de la enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, la G-6-P es oxidada por el NADP a D-gluconato-6-fosfato con la formación de NADPH. La cantidad de NADPH formado en esta reacción es equivalente a la cantidad de D-glucosa. El incremento en NADPH es medido por la absorbancia a 334, 340 o 365 nm.

Método

1. El kit contiene 3 frascos con etiqueta de **"1"** con aproximadamente 7.2 g de polvo formado por: amortiguador de trietanolamina (pH aprox 7.6), 110 mg de NADP, 260 mg de ATP y sulfato de magnesio.

2. 3 frascos con etiqueta **"2"** cada una con aproximadamente 1.1 mL de suspensión formada por: 320 U de hexoquinasa, 160 U de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa.

3. 3 frascos con D-glucosa como control.

Preparación de soluciones

1. Disolver el contenido de la botella con etiqueta **"1"**con 45 mL de agua bidestilada. (el contenido de la solución es estable por 4 semanas a 2- 8 ºC o por 2 meses a -15 a -25 ºC). Antes de usar la solución **"1"** atemperar a 20 – 25 ºC.

2. Usar el contenido de la botella con etiqueta **"2"** sin diluir.

Longitud de onda: 340 nm, Hg 365 nm o Hg 334 nm.

Cubetas o celda de vidrio: 1.0 cm

Temperatura: 20 – 25 ºC

Volumen final: 3.020 mL

Pipetear a la celda	Blanco	Muestra
Solución 1	1.000 mL	1.000 mL

Solución de muestra* Agua bidestilada	- 2.000 mL	0.100 mL 1.900 mL
Mezclar** y leer absorbancias de la solución (A_1) después de aproximadamente 3 min. Comenzar la reacción con la adición de:		
Suspensión 2	0.020 mL	0.020 mL
Mezclar**, esperar hasta que la reacción se detenga (aprox. 10-15 min) y leer la absorbancia de la solución (A_2). Si la reacción no se ha detenido después de 15 min, leer en intervalos de 2 min hasta que la absorbancia se incremente constantemente por 2 min.		

Resultados

Si la absorbancia A_2 incrementa constantemente, extrapolar la absorbancia al tiempo de la adición de la suspensión 2 (HK/G6P-DH).

Determinar la diferencia de absorbancias ($A_2 – A_1$) para ambos, blanco y muestra. Restar la diferencia en absorbancias de la muestra menos la diferencia en absorbancias de la muestra:

$$\Delta A = (A_2 - A_1)_{muestra} - (A_2 - A_1)_{blanco}$$

La diferencia entre absorbancias debe ser, como regla, al menos de 0.100 en unidades de absorbancia para alcanzar suficiente precisión en los resultados.

Cálculos

Se debe emplear la siguiente ecuación para calcular la concentración:

$$c = \frac{V\ x\ MW}{\varepsilon\ x\ d\ x\ v\ x\ 1000}\ x\ \Delta A\ [\frac{g}{l}]$$

V= volumen final (mL)

v= volumen de muestra (mL)

MW= peso molecular de la sustancia a ser analizada (g/mol)

d= longitud de trayectoria de la luz (cm)

ε= coeficiente de extinción del NADPH a

340 nm = 6.3

Hg 365 nm= 3.5

Hg 334 nm=6.18

Para glucosa quedaría como sigue:

$$c = \frac{3.020\ x\ 180.16}{\varepsilon\ x\ 1.00\ x\ 0.1\ x\ 1000}\ x\ \Delta A_{D-glucosa}$$ [g D-glucosa/L muestra]

Anexo 3. Calculo de etanol

La concentración de etanol se determina por un par de reacciones enzimáticas, las cuales resultan en un producto colorimétrico (570 nm)/ fluorimétrico (λ_{ex}=535/λ_{em} =587 nm) proporcional al etanol presente.

Componentes

Ethanol Assay Buffer. Usar a temperatura ambiente

Ethanol Probe, en DMSO. Usar a temperatura ambiente. Proteger de la luz y humedad almacenándolo a – 20 ºC. Para ensayos de fluorometría diluir una alícuota de Ethanol Probe con 5 o 10 veces el Ethanol Assay Buffer justo antes de usar.

Ethanol Enzyme Mix. Reconstituir en 220 µL de Ethanol Assay Buffer. Mezclar por pipeteo. La enzima es estable por al menos 2 meses después del mezclado conservándolo a -4 ºC.

Ethanol Standar, 17.15 N.

Procedimiento.

Preparación del estándar para detección colorimétrica.

Diluir 50 µL del estándar 17.15 N de Etanol con 808.7 µL de amortiguador de etanol para generar un estándar de 1 µmole/µL. Diluir 10 µL del estándar 1 µmole/µL con 990 µL para generar una solución a 10 µmole/µL. Después, diluir 100 µL de la solución a µmole/µL con 900 µL para generar un estándar con 1 nmole/µL. Del estándar final (1 nmole/µL) agregar 0, 2, 4, 6, 8 y 10 µL en la placa de 96 pozos, generando 0 (blanco), 2, 4, 6, 8 y 10 1 nmole/pozo. Agregar Ethanol Assay Buffer a cada pozo para completar 50 µL de volumen final.

Preparación de la muestra

Las muestras deben estar diluidas en Ethanol Assay Buffer a un volumen final de 50 µL. Para muestras que se desconoce su concentración se sugiere hacer varias diluciones para asegurar que las lecturas entren dentro del rango de la curva estándar.

Mezcla de reacción

1.0 Hacer la mezcla de reacción según la siguiente tabla. Colocar 50 µL de la mezcla de reacción en cada pozo.

Reactivo	Volumen

Ethanol Assay Buffer	46 µL
Ethanol Probe	2 µL
Ethanol Enzyme Mix	2 µL

2.0 Agregar 50 µL de la mezcla de reacción a cada pozo. Mezclar por pipeteo o usando un mezclador horizontal, posteriormente incubar la reacción por 30 minutos a 37 ºC o 60 minutos a temperatura ambiente. Cubrir la placa y protegerla de la luz durante la incubación.

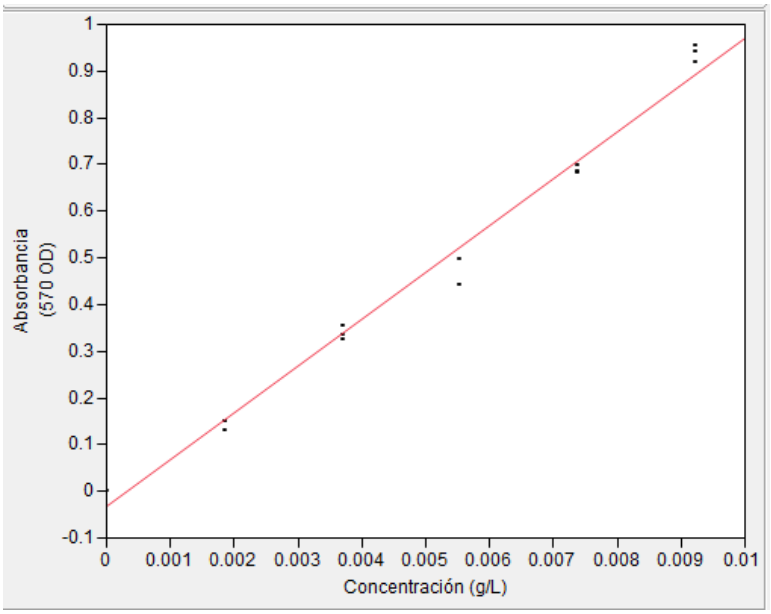
3.0 Para ensayos colorimétricos, medir la absorbancia a 570 nm (A_{570}). Para ensayos fluorimétricos, medir la intensidad de fluorescencia a λ_{ex}=535/λ_{em} =587 nm.

Resultados

Resultados para la curva estándar de bioetanol

Etanol (nmoles)	**Etanol ($g \cdot L^{-1}$)**	**Absorbancia (OD_{570})**		
0	**0**	0	0	0
2	**0.00184**	0.14913	0.12879	0.15128
4	**0.003685**	0.32586	0.33497	0.35444
6	**0.005529**	0.49730	0.49745	0.44050
8	**0.007371**	0.68541	0.69822	0.68292
10	**0.009214**	0.95617	0.92003	0.94033

Después de medir la absorbancia de los estándares, construir la curva de calibración para obtener la ecuación para calcular la concentración de etanol en las muestras problema.



Ajuste de la ecuación con respecto a los datos (R^2_{Adj} = 0.988)

Ecuación para el cálculo de la concentración de etanol

$$Etanol\ (g \cdot L^{-1}) = \frac{Abs\ (OD_{570}) + 0.030871}{100.3238}$$