



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO
FACULTAD DE QUÍMICA
DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO
MAESTRÍA EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

**Eficiencia en la obtención de azúcares fermentables del pericarpio de maíz
hidrolizado y su utilización para la producción de bioetanol**

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de Maestro en Ciencia y
Tecnología de Alimentos

Presenta:

I.A.I. Diana Victoria Melo Sabogal

Dirigido por:

Dr. Carlos Regalado González

Centro Universitario
Querétaro, Qro.
Noviembre 2017



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Química
Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos

**EFICIENCIA EN LA OBTENCIÓN DE AZÚCARES FERMENTABLES DEL
PERICARPIO DE MAÍZ HIDROLIZADO Y SU UTILIZACIÓN PARA LA
PRODUCCIÓN DE BIOETANOL**

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de Maestría en
Ciencias y Tecnología de Alimentos

Presenta:

Diana Victoria Melo Sabogal

Dirigido por:

Dr. Carlos Regalado González

Dr. Carlos Regalado González
Presidente


Firma

Dr. Aldo Amaro Reyes
Secretario


Firma

Dra. Blanca Estela García Almendárez
Vocal



Firma

Dr. Jorge Noel Gracida Rodríguez
Suplente


Firma

Dr. Eduardo Castaño Tostado
Suplente


Firma


MSP Sergio Pacheco Hernández
Director de la Facultad de Química


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

Universidad Autónoma de Querétaro
Querétaro, Qro.
Noviembre de 2017

RESUMEN

Los residuos agroindustriales son recursos renovables ampliamente distribuidos en la naturaleza, por lo cual se ha suscitado un fuerte interés para la producción de biocombustibles debido a su composición química, alta disponibilidad y no interferencia con la seguridad alimentaria de la población. Sin embargo, su uso se ve limitado por la compleja estructura del material, generación de inhibidores de la fermentación, bajos rendimientos de azúcares fermentables y de etanol. El objetivo de este trabajo fue evaluar la eficiencia en la obtención de azúcares fermentables del pericarpio de maíz hidrolizado (PMH) y su utilización para la producción de bioetanol. Se evaluó mediante un diseño experimental el efecto de pretratamientos con ácidos diluidos (sulfúrico y fosfórico), sobre la liberación de azúcares simples y la formación de compuestos inhibidores de la fermentación. Además, se determinó el efecto del complejo enzimático Cellic CTec2 sobre la sacarificación de celulosa del material sólido pretratado. Se establecieron los parámetros de fermentación de las fracciones líquidas de PMH, cuando se usó *Scheffersomyces stipitis* para producir bioetanol. La composición del pericarpio de maíz (% p/p) fue hemicelulosa (48.7), solubles (33.16), celulosa (16.78) y lignina (1.19). El pretratamiento de pericarpio de maíz (20 % p/v) con ácido sulfúrico al 2 % (v/v), durante 60 min a 121 °C, permitió la mayor liberación de glucosa (9.192 ± 0.336 g/L), arabinosa (13.908 ± 0.382 g/L) y xilosa (29.871 ± 0.856 g/L), y la generación de 3.311 ± 0.035 g/L de ácido acético. La sacarificación enzimática de la fracción sólida del PMH usando 5 % y 7 % (p/v) de sólidos y 40 UPF/mL de Cellic CTec2, a 50 °C, permitió una producción de 29.997 ± 2.376 y 34.172 ± 2.407 g de glucosa/L, respectivamente, con una conversión de celulosa de 99.988 ± 5.941 % a las 48 h usando 5 % sólidos, además, 83.691 ± 7.950 % a las 72 h con 7 % sólidos con la respectivamente. La mayor concentración de etanol (14.219 ± 0.986 g/L) y la eficiencia más alta (0.585 ± 0.041 g de etanol/g de azúcares consumidos), así como la menor generación de biomasa (0.009 ± 0.000 g/g azúcares consumidos) fueron obtenidos empleando la fracción líquida del PMH como sustrato, destoxificado con carbón activado al 8 % (p/v). La glucosa se consumió completamente a las 96 h y la xilosa a las 120 h de fermentación, tiempo en el que se obtuvo la mayor concentración de etanol. El pericarpio de maíz es una fuente de biomasa lignocelulósica con potencial para la obtención de azúcares simples que puedan ser fermentados a bioetanol, mediante hidrólisis con ácido sulfúrico diluido.

Palabras clave: Biomasa lignocelulosica, bioetanol, fermentación, pericarpio de maíz, pretratamiento, sacarificación.

ABSTRACT

Agroindustrial wastes are renewable resources widely distributed in nature, and due to their chemical composition, high availability without interfering with the food supply, there is strong interest in their application for biofuels production. However, their use is limited by the complex structure of the material, generation of products that are fermentation inhibitors, and low yields of fermentable sugars and ethanol. The objective of this work was to evaluate the efficiency of fermentable sugars released from hydrolyzed maize pericarp (PMH) and its use for the production of bioethanol. The effect of pretreatment with dilute acids (sulfuric and phosphoric), on the release of simple sugars and the formation of fermentation inhibiting compounds was evaluated by an experimental design. In addition, the effect of the Cellic CTec2 enzymatic complex on cellulose saccharification from the pretreated solid material was determined. The fermentation parameters of the PMH liquid fractions were established when *Scheffersomyces stipitis* was used to produce bioethanol. The composition of maize pericarp (% w/w) was: hemicellulose (48.7), soluble material (33.16), cellulose (16.78), and lignin (1.19). Pretreatment of corn pericarp (20 % w/v) with 2 % (v/v) sulfuric acid for 60 min at 121°C allowed the highest release of glucose (9.192 ± 0.336 g/L), arabinose (13.908 ± 0.382 g/L) and xylose (29.871 ± 0.856 g/L), and the generation of 3.311 ± 0.035 g/L acetic acid. The enzymatic saccharification of the PMH solid fraction using 5 % and 7 % (w/v) solids and 40 FPU/mL Cellic CTec2, at 50°C, produced $29.997 \pm 2,376$ and 34.172 ± 2.407 g of glucose/L, respectively. The cellulose conversion was 99.988 ± 5.941 % at 48 h, 5 % solids, and 83.691 ± 7.950 % at 72 h, 7 % solids, respectively. When the PMH liquid fraction, detoxified with 8 % (w/v) activated carbon, was used as substrate gave the highest ethanol concentration (14.219 ± 0.986 g/L), the highest efficiency (0.585 ± 0.041 g ethanol/g consumed sugars), but the lowest biomass generation (0.009 ± 0.000 g/g consumed sugars). Glucose was completely consumed at 96 h, while xylose lasted up to 120 h of fermentation, time at which the highest ethanol concentration was achieved. Corn pericarp is a source of lignocellulosic biomass showing potential to obtain simple sugars by dilute sulfuric acid hydrolysis, which can be fermented to produce bioethanol.

Key words: Lignocellulosic biomass, bioethanol, fermentation, corn pericarp, pretreatment, saccharification.

DEDICATORIA

A mi madre Olga Mercedes y a mi padre Jorge, por la dedicación, educación, confianza, apoyo y por el amor que me han brindado en cada etapa de mi vida.

A mi hermana Carolina, por su complicidad y el apoyo incondicional que me ha ofrecido siempre.

A mi sobrina Samantha, quien desde el vientre se convirtió en mi mayor motor, aunque desarrollar este trabajo significara que me perdiera de los acontecimientos más relevantes de su hasta ahora corta vida.

A toda mi familia, por su apoyo al emprendimiento de este viaje, por creer en mí y por la fortaleza que me han dado aún en la distancia.

A cada uno de mis amig@s en este bello país, quienes se convirtieron en mi familia, por aceptarme como una mexicana más, por enseñarme su cultura e historia, por esa hermandad y todo el apoyo brindado.

A mis hermanas colombianas que han estado antes y durante este emprendimiento, por su presencia, amistad, cariño y paciencia.

AGRADECIMIENTOS

A mi familia, por su apoyo incondicional, la confianza que han depositado en mí y por estar presentes en mi vida a pesar de la distancia.

Al Dr., Carlos Regalado González, asesor de mi tesis, por aceptarme en su grupo de trabajo, por su orientación y acompañamiento durante esta etapa. Al Dr. Aldo Amaro Reyes, la Dra. Blanca Estela García Almendárez, el Dr. Jorge Gracida Rodríguez y el Dr. Eduardo Castaño Tosatado, por su tiempo, contribuciones y orientación durante el desarrollo de este trabajo.

A quienes conformaron el grupo de trabajo del área de Biotecnología durante el tiempo que permanecí en la UAQ, por el compañerismo, paciencia, hermandad y amistad brindada.

A mis compañeros y amigos de la Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos de la Facultad de Química, generación 2015-2017, por compartir conmigo el reto que implicó sacar adelante este posgrado.

Al Centro de Investigación y Desarrollo Tecnológico en Electroquímica (CIDETEQ) y en especial a la Dra. María Yolanda Reyes Vidal, por permitirme hacer uso de sus instalaciones y su equipo de UPLC para el desarrollo de una importante etapa de la investigación.

Al laboratorio de Microscopía Electrónica de Barrido, perteneciente al Centro Nacional de Identificación y Caracterización Vegetal (UAQ), por brindarme su servicio en el análisis de mis muestras con SEM.

Al Dr. Pedro Alberto Vázquez Landaverde, profesor investigador de CICATA Querétaro, por su amable ayuda con el análisis de muestras por HPLC.

A CONCYTEQ por apoyo para la divulgación de este trabajo.

A CONACYT por su apoyo a través de la beca No. 5829099 para MCT.

Índice

Contenido	Página
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	3
2.1. Combustibles	3
2.1.1. Panorama	3
2.1.2. Combustibles alternativos.....	3
2.2. Bioetanol.....	5
2.3. Fuentes de biomasa para la producción de bioetanol.....	6
2.3.1. Fuentes de azúcares	6
2.3.2. Fuentes de almidón	7
2.3.3. Fuentes de biomasa lignocelulósica	7
2.3.4. Pericarpio de maíz.....	14
2.4. Proceso de producción de bioetanol a partir de biomasa lignocelulósica	16
2.4.1. Pretratamiento de biomasa lignocelulósica	17
2.4.2. Hidrólisis de la biomasa	24
2.4.3. Fermentación.....	27
3. JUSTIFICACIÓN	32
4. OBJETIVOS	34
4.1. Objetivo general.....	34
4.2. Objetivos específicos	34
5. METODOLOGÍA	35
5.1. Materiales	35
5.2. Evaluación del efecto de pretratamientos ácidos sobre la producción de azúcares fermentables y la formación de inhibidores de fermentación en pericarpio de maíz	35

5.2.1.	Pretratamiento de pericarpio de maíz.....	35
5.2.	Determinación del efecto de complejos enzimáticos sobre la sacarificación de la fracción sólida de pericarpio de maíz pretratado químicamente.....	40
5.2.1.	Enzima.....	40
5.2.2.	Determinación de actividad enzimática	40
5.2.3.	Hidrólisis enzimática.....	41
5.3.	Establecimiento de los parámetros de fermentación del hidrolizado de pericarpio de maíz para la producción de etanol	42
5.3.1.	Microorganismos	42
5.3.2.	Activación de la cepa de levadura	43
5.3.3.	Fermentación de la fracción líquida de pericarpio de maíz pretratado.....	43
6.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	47
6.1.	Composición química proximal del pericarpio de maíz	47
6.2.	Evaluación del efecto de pretratamientos ácidos sobre la producción de azúcares fermentables y la formación de inhibidores de fermentación en pericarpio de maíz.....	47
6.2.1.	Pretratamientos ácidos	47
6.2.2.	Pretratamientos con ácido sulfúrico y pericarpio de maíz lavado .	53
6.3.	Determinación del efecto de complejos enzimáticos sobre la sacarificación de la fracción sólida de pericarpio de maíz pretratado químicamente	70
6.3.1.	Determinación de actividad enzimática	70
6.3.2.	Hidrólisis enzimática.....	71
6.4.	Establecimiento de los parámetros de fermentación del hidrolizado de pericarpio de maíz para la producción de etanol	76

6.4.1. Fermentación de la fracción líquida de pericarpio de maíz pretratado	76
7. CONCLUSIONES	87
8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	88
9. ANEXOS	108

Índice de cuadros

Cuadro	Página
1. Biomasa lignocelulósica con potencial como materia prima para producción de etanol.	8
2. Contenido de celulosa, hemicelulosa y lignina para biomasas lignocelulósicas.	14
3. Composición proximal del pericarpio de maíz.	16
4. Comparación de diferentes métodos de pretratamiento de biomasa lignocelulósica.	19
5. Comparación entre métodos de hidrólisis con ácido concentrado y diluido.	21
6. Factores y niveles evaluados en el pretratamiento químico de pericarpio de maíz.	36
7. Diseño experimental por parcelas divididas.	37
8. Pretratamiento químico de pericarpio de maíz.	38
9. Factores y niveles para tratamientos de hidrólisis enzimática.	41
10. Tratamientos hidrólisis enzimática de la fracción sólida de pericarpio de maíz pretratado con ácido sulfúrico (FSPH) y del pericarpio de maíz (PM) sin pretratar.	42
11. Condiciones de pretratamientos de hidrolizados ácidos de pericarpio de maíz usados para fermentación.	44
12. Factores y niveles evaluados sobre la fermentación de la fracción líquida de pericarpio de maíz pretratado.	45
13. Composición proximal del PM.	47
14. Concentración de glucosa y xilosa presente en la fracción líquida de pericarpio de maíz pretratado y rendimientos.	49
15. Análisis de varianza de los factores estudiados y sus interacciones sobre la liberación de xilosa.	50
16. Análisis de varianza para factores estudiados y sus interacciones sobre la liberación de glucosa.	52
17. Concentración de azúcares reductores y rendimientos determinados para los hidrolizados ácidos de PM.	54
18. Tiempos de retención para carbohidratos a determinar en hidrolizados de PM.	55

19. Estimación de componentes de varianza por máxima probabilidad residual (REML) para glucosa.....	57
20. Análisis de varianza para los factores evaluados y sus interacciones sobre la liberación de glucosa, usando el diseño de parcelas divididas.....	57
21. Estimación de componentes de varianza por máxima probabilidad residual (REML) para xilosa.	59
22. Análisis de varianza para los factores evaluados y sus interacciones sobre la liberación de xilosa.	59
23. Estimación de componentes de varianza por máxima probabilidad residual (REML) para arabinosa.....	60
24. Análisis de varianza para los factores evaluados y sus interacciones sobre la liberación de arabinosa.....	61
25. Tiempos de retención para productos de degradación a evaluar en FLPH.	64
26. Estimación de componentes de varianza por máxima probabilidad residual (REML) para ácido acético.	65
27. Análisis de varianza para los factores evaluados y sus interacciones sobre la formación de ácido acético.	66
28. Composición estructural del PM pretratado y con pretratamiento	68
29. Liberación de glucosa por la enzima Cellic CTec2 usando papel filtro Whatman No. 4 como sustrato.	71
30. Análisis de varianza para un diseño factorial completo, sobre la sacarificación enzimática de PM sin pretratar (PM) y la fracción sólida de pericarpio hidrolizado (FSPH), sobre la producción de azúcares reductores, glucosa y conversión de celulosa a glucosa.....	72
31. Destoxificación de la fracción líquida de pericarpio de maíz hidrolizado (FLPH).	78
32. Parámetros de fermentación para FLPH usando <i>S. stipitis</i>	86

Índice de figuras

Figura	Página
1. Producción mundial de etanol.	6
2. Principales componentes estructurales de la biomasa lignocelulósica.	9
3. Organización estructural de la pared celular de la planta y molécula de celulosa.	10
4. Estructura de la celulosa).	10
5. Estructura química de la hemicelulosa.	11
6. Estructura química de la lignina.	13
7. Principales etapas del proceso de producción de bioetanol.	17
8. Efecto de diferentes pretratamientos sobre la estructura lignocelulósica.	18
9. Modelo clásico de la degradación enzimática de celulosa.	25
10. Modelo clásico de la degradación enzimática de hemicelulosa.	26
11. Visión esquemática de la producción de biocombustibles a partir de biomasa lignocelulósica por levadura transformada.	29
12. Efecto de la interacción tipo de ácido*concentración de ácido sobre la liberación de xilosa.	51
13. Efecto de la interacción tiempo de tratamiento en autoclave* concentración de PM sobre la liberación de xilosa.	51
14. Efecto de la interacción tipo de ácido* concentración de PM sobre la liberación de xilosa.	51
15. Efecto de la interacción tipo de ácido*concentración del ácido* concentración de pericarpio de maíz sobre la liberación de glucosa.	53
16. Concentración de glucosa, xilosa arabinosa presente en los hidrolizados ácidos de pericarpio de maíz.	56
17. Efecto del tiempo de pretratamiento en autoclave sobre la liberación de glucosa en hidrolizados ácidos de pericarpio de maíz.	58
18. Efecto de la interacción concentración de ácido*concentración de pericarpio de maíz.	58
19. Efecto de la interacción concentración de ácido*concentración de pericarpio de maíz.	60
20. Efecto de la concentración de ácido sobre la liberación de arabinosa en hidrolizados ácidos de pericarpio de maíz.	61

21. Efecto de la concentración de pericarpio de maíz sobre la liberación de arabinosa en hidrolizados ácidos de pericarpio de maíz.....	62
22. Efecto de la interacción concentración de ácido*concentración de pericarpio de maíz sobre la liberación de arabinosa en hidrolizados ácidos.....	62
23. Concentración de ácido acético formado durante pretratamientos ácidos de pericarpio de maíz.....	64
24. Efecto de la interacción tiempo de pretratamiento en autoclave*concentración de ácido*concentración de pericarpio de maíz.....	67
25. Micrografías de pericarpio de maíz sin pretratar.	69
26. Micrografías de pericarpio de maíz pretratado.	70
27. Actividad de la enzima Cellic CTec2 usando papel filtro Whatman No. 4 como sustrato.	71
28. Producción de azúcares reductores durante la hidrólisis enzimática de FSPH y PM.....	73
29. Producción de glucosa durante la hidrólisis enzimática de FSPH y PM.....	74
30. Conversión de celulosa a glucosa durante la hidrólisis enzimática de FSPH y PM.....	74
31. Curvas de crecimiento de <i>S. stipitis</i> y <i>S. cerevisiae</i>	77
32. Biomasa y consumo de azúcares reductores de <i>S. stipitis</i> durante la fermentación hidrolizados ácidos de PM.	81
33. Consumo de glucosa y xilosa de <i>S. stipitis</i> durante la fermentación hidrolizados ácidos de PM.	82
34. Producción de etanol (A) y rendimientos de etanol (B) durante la fermentación hidrolizados ácidos de PM con <i>S. stipitis</i>	84

1. INTRODUCCIÓN

La creciente preocupación por suplir las necesidades energéticas para cada sector de la economía moderna y el reto medioambiental que ello implica, ha conducido al estudio de fuentes alternas de energía. Actualmente, en los sectores comercial, doméstico, industrial, agrícola y de transporte se utilizan principalmente combustibles fósiles como el petróleo y derivados, gas natural y carbón mineral para generación de energía. Sin embargo, la tendencia a la disminución de estos recursos y las problemáticas ambientales que generan, han resaltado el interés por el empleo de recursos renovables para la producción de fuentes energéticas alternas.

Los combustibles alternativos muestran un gran potencial frente al uso de combustibles fósiles, principalmente aquellos de segunda generación, que pueden ser producidos a partir de biomasa lignocelulósica como lo son los residuos agroindustriales. Estos combustibles alternativos de segunda generación, a diferencia de los de primera generación, no compiten por el uso del suelo y agua, y no comprometen la seguridad alimentaria de la población.

Entre los combustibles alternativos, el más producido a nivel mundial es el bioetanol, el cual puede ser usado en lugar de la gasolina, o bien en mezcla con ésta. Se obtiene principalmente a partir de maíz y caña de azúcar. Sin embargo, el uso de biomasa lignocelulósica como pajas, cascarillas, bagazos, residuos forestales y cultivos energéticos, se muestran con gran potencial para la producción de este biocombustible por su alta disponibilidad y composición estructural. Además de la generación de valor agregado a estos materiales. El pericarpio de maíz, obtenido a partir de procesamiento del maíz, representa una fuente potencial para su uso en la producción de bioetanol.

Por otro lado, aunque se han desarrollado diversas metodologías para la producción de bioetanol a partir de diferentes materiales lignocelulósicos, aún es costoso obtenerlo debido a la complejidad de las etapas clave del proceso (pretratamiento, sacarificación y fermentación) y a los bajos rendimientos que

se obtienen. Es por esto que es necesario el estudio detallado del proceso, así como la optimización del mismo, ajustado al tipo de biomasa que se pretenda utilizar.

2. ANTECEDENTES

2.1. Combustibles

2.1.1. Panorama

Aunque los combustibles fósiles son la principal fuente para suplir la demanda energética del mundo, la tendencia actual apunta a que éstos se tornarían escasos y costosos en la medida en que aumenta la población mundial y que las economías se industrializan (IBRD, 2015). Además, debido a que su combustión produce gases de efecto invernadero que afectan la tasa de cambio climático (World Bank, 2017), ha aumentado el interés en el desarrollo de combustibles alternativos que sean renovables, sustentables, económicamente viables y que reduzcan el efecto sobre el clima mundial. Entre las alternativas de energía que han sido estudiadas para la sustitución de combustibles fósiles están el hidrógeno, el gas natural, el gas de síntesis y los biocombustibles, siendo estos últimos la fuente de energía más amigable con el ambiente, provienen de fuentes renovables, y son biodegradables (Bhatti *et al.*, 2008; Nigam y Singh, 2011). La IEA reporta que desde los años 70's la producción de biocombustibles ha aumentado ligeramente, pasando de 640.84 millones de toneladas equivalentes de petróleo en 1973 a 1,413.06 en 2014 (IEA, 2016).

2.1.2. Combustibles alternativos

Aunque los combustibles fósiles representan la principal fuente energética en el mundo, sus reservas se están agotando y son conocidos sus efectos negativos sobre el ambiente. Lo anterior se debe su contribución en la emisión de gases de efecto invernadero, provocando pérdida de biodiversidad, cambio climático, aumentos del nivel del mar, etc. Además, su alta demanda ocasiona el aumento en los precios de los mismos, como es el caso del petróleo (Gaurav *et al.*, 2017). Lo anterior ha conllevado al desarrollo de fuentes alternativas de energía como los biocombustibles. Los biocombustibles o combustibles alternativos son aquellos combustibles obtenidos a partir de materiales

biológicos derivados de plantas, animales, microorganismos y desechos (IEA, 2011; Acheampong *et al.*, 2017).

Tipos de biocombustibles

Acheampong *et al.* (2017), clasifican a los combustibles con base en la fuente o tecnología de producción en las siguientes generaciones:

a. Primera generación

Los biocombustibles de esta generación hacen referencia a aquellos que son producidos a partir de los azúcares y almidones de fuentes primarias como maíz, caña de azúcar, remolacha azucarera. Además de la utilización de semillas oleaginosas, entre las que se encuentran el girasol, soya y aceite de palma, etc. (Acheampong *et al.*, 2017; Pedroli *et al.*, 2013). La producción de biocombustibles a partir de semillas, granos y azúcares, ha sido analizada exhaustivamente, debido a su potencial para dar cumplimiento a las demandas energéticas como sustitutos del petróleo, cumplir con el objetivo de crecimiento económico y mitigar el cambio climático. Sin embargo, está limitado por los altos costos de producción y procesamiento que no permiten competir con los productos derivados del petróleo (Doornbosch y Steenblik, 2008), competencia por la tierra y el agua para la producción de alimentos y fibras (Fargione *et al.*, 2008; Sims *et al.*, 2010) y variaciones en las evaluaciones de emisiones de gases de efecto invernadero (Sims *et al.*, 2010).

b. Segunda generación

Las problemáticas anteriormente mencionadas para la producción de biocombustibles de primera generación han direccionado investigaciones para la producción de combustibles de segunda generación a través de procesos técnicos avanzados donde se emplean biomásas provenientes de residuos agrícolas y forestales, urbanos e industriales que son más económicas, abundantes en la naturaleza y cuyo contenido energético es comparable a las utilizadas en la primera generación (Lebaka, 2013).

c. Tercera generación

Los biocombustibles de tercera generación surgen a partir de las mejoras en la producción de biomasa, donde a través de biotecnología avanzada, las algas y otras materias primas usadas como fuentes energéticas son diseñadas (Chisti, 2007; Bonin y Lal, 2012; Acheampong *et al.*, 2017). En el caso de las algas, podrían tener un gran potencial como fuente energética, pero su disponibilidad comercial es limitada y aún son objeto de investigación (Acheampong *et al.*, 2017).

d. Cuarta generación

Esta generación consiste en un campo emergente que se basa en la conversión directa de energía solar en combustible usando materias primas inagotables, baratas y de alta disponibilidad, desarrolladas a partir de biología sintética, la cual comprende el diseño y construcción de nuevos sistemas y partes biológicas, y el mejoramiento de los sistemas biológicos naturales (Aro, 2016).

2.2. Bioetanol

El etanol (C_2H_5OH) es un compuesto químico inflamable, claro, biodegradable y ligeramente tóxico. Es el tipo de biocombustible más dominante que puede ser utilizado como combustible puro o en combinación con gasolina, y es producido principalmente a partir de azúcar (caña de azúcar, remolacha, sorgo dulce, etc.) y almidón (maíz, trigo, yuca, etc.), biomasa de algas y materiales lignocelulósicos (Talebna, 2015). Estos últimos han tenido mayor relevancia por su gran disponibilidad y bajo costo (Balat, 2011). Además de que su uso de manera eficaz minimiza la contaminación ambiental, no acarrea problemáticas de seguridad alimentaria y resulta ser un proceso adecuado para la disposición de residuos agrícolas (Potumarthi *et al.*, 2013).

El bioetanol es considerado el biocombustible más utilizado en el mundo para el transporte y se ha convertido en una alternativa al consumo de petróleo

crudo y en una propuesta que permite la reducción de la contaminación ambiental (Balat, 2011). En la Figura 1 se presenta la producción mundial de etanol durante los años 2007-2015, mostrándose un incremento notorio en la producción de este biocombustible. Estados Unidos y Brasil son los mayores productores, quienes pasaron de 24 y 19 billones de m³ de etanol para el año 2007 a producir 56 y 26 billones de galones para el 2015, respectivamente, representando para este último año alrededor del 85 % de la producción mundial (RFA, 2015). Aunque se debe considerar que el etanol producido es obtenido principalmente de maíz (Estados Unidos) y azúcar (Brasil).

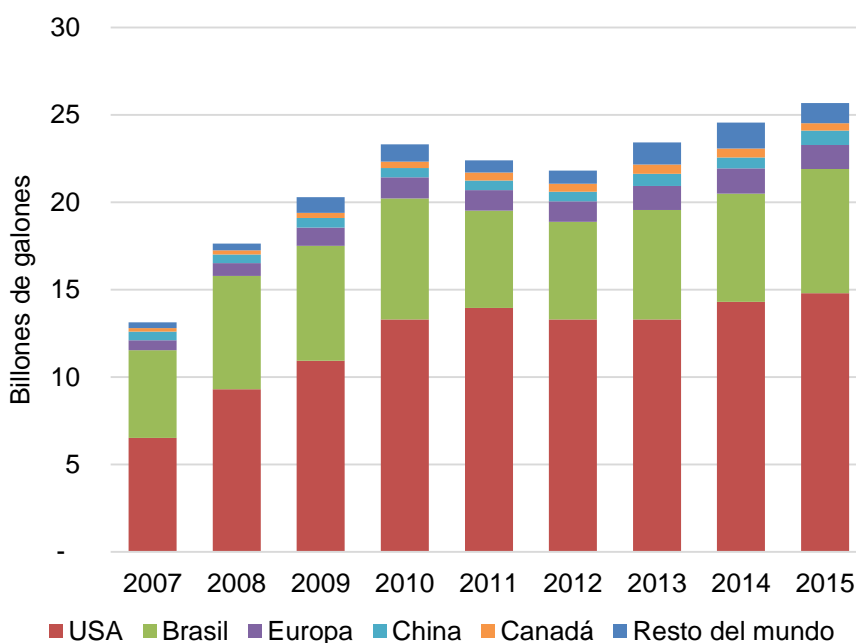


Figura 1. Producción mundial de etanol. Fuente: Renewable Fuels Association, tomada de www.afdc.energy.gov/data/

2.3. Fuentes de biomasa para la producción de bioetanol

2.3.1. Fuentes de azúcares

El bioetanol puede ser obtenido a partir de materias primas cuyas principales constituyentes son azúcares (Nwufo *et al.*, 2016; Zabed *et al.*, 2017). Estas fuentes representan un alto rendimiento de azúcares y bajos costos de

conversión a etanol; sin embargo, su principal factor limitante es su disponibilidad estacional (Vohra *et al.*, 2014).

2.3.2. Fuentes de almidón

Dentro de las principales fuentes de biomasa para la producción de bioetanol se encuentran los cultivos de almidón (cereales, tubérculos y raíces, leguminosas y frutos verdes e inmaduros). Los cuales se están ampliamente distribuidos en el mundo, son de fácil conversión, pueden ser almacenados durante largos períodos de tiempo y presentan altos rendimientos de etanol (Zabed *et al.*, 2017).

2.3.3. Fuentes de biomasa lignocelulósica

La biomasa es un material orgánico proveniente de animales y plantas, y es un recurso natural renovable ampliamente distribuido en la naturaleza, el cual puede ser utilizado como fuente de energía (Klass, 1998). La biomasa lignocelulósica es la forma más frecuente de carbono renovable en el planeta (Jae *et al.*, 2010). Grandes cantidades de este residuo se obtienen de la agricultura, silvicultura, centros municipales y otras actividades de carácter industrial (Zheng *et al.*, 2014). Ejemplos de este tipo de biomasa son angiospermas (maderas duras), gimnospermas (maderas blandas) y gramíneas (pastos, trigo, carrizo, etc.) (Quiroz-Castañeda y Folch-Mallol, 2013). En el Cuadro 1 se presentan las fuentes de biomasa lignocelulósica con potencial para la producción de bioetanol (Zabed *et al.*, 2017).

La biomasa lignocelulósica es un recurso que tiene un gran potencial para satisfacer la demanda mundial de energía, productos químicos y materiales de fuentes renovables y sustentables (Payne *et al.*, 2015). Siendo esta una alternativa al uso de recursos fósiles no renovables y sus derivados que actualmente generan una gran preocupación ambiental por su efecto sobre el calentamiento global (Cherubini, 2010; Laothanachareon *et al.*, 2015).

Cuadro 1. Biomasa lignocelulósica con potencial como materia prima para producción de etanol. Adaptado de Zabed *et al.* (2017).

Biomasa	Principales características
Hierbas perennes	<ul style="list-style-type: none"> • Alto rendimiento de biomasa, alto contenido de celulosa y fácil de cultivar y cosechar. • Tiene potencial para cubrir el 50-70 % de las materias primas totales para producción de bioetanol. • El rendimiento puede oscilar entre 0.9 y 37 t de materia seca/Ha y el rendimiento potencial de etanol es de 160-460 L/t de biomasa.
Plantas acuáticas	<ul style="list-style-type: none"> • Su crecimiento es rápido y se da en cuerpos de agua sin competir con tierras cultivables. • Se pueden utilizar también para purificación de agua, extracción de nutrientes y metales pesados. • Abundante en ciertas partes del mundo, lo que las han convertido en una materia prima adecuada para la producción de etanol.
Residuos agrícolas	<ul style="list-style-type: none"> • Altamente disponible y su uso minimiza la dependencia de la biomasa forestal, maderera y reduce la deforestación. • Valorización y gestión ecológica de los residuos agroalimentarios. • El rendimiento potencial de etanol es de 235-450 L/t de biomasa.
Biomasa forestal y residuos	<ul style="list-style-type: none"> • Tiene un menor contenido de cenizas en comparación con los residuos de los cultivos. • Una de las mayores biomásas inexploradas y subutilizadas. • Los rendimientos potenciales de etanol son 220-275 L/t para maderas blandas y 280-285 L/t para maderas duras.
Residuos sólidos municipales	<ul style="list-style-type: none"> • Su valorización para producción de etanol puede correlacionar tanto la seguridad energética como la gestión de residuos. • Su abundancia estimada es de 20.7 millones de t/año para un área urbana con 217 millones de habitantes. • El rendimiento potencial de etanol es de 154 L/t de biomasa.

Esta biomasa se compone principalmente de tres tipos de polímeros, como se ilustra en la Figura 2: celulosa (40-50 %), hemicelulosa (20-40 %) y lignina (20-30 %) (Quiroz-Castañeda y Folch-Mallol, 2013; Zabed *et al.*, 2017); donde la celulosa y hemicelulosa son polisacáridos fermentables después de su hidrólisis, lo que hace de esta biomasa una materia prima adecuada para la producción de bioenergía (Zheng *et al.*, 2014).

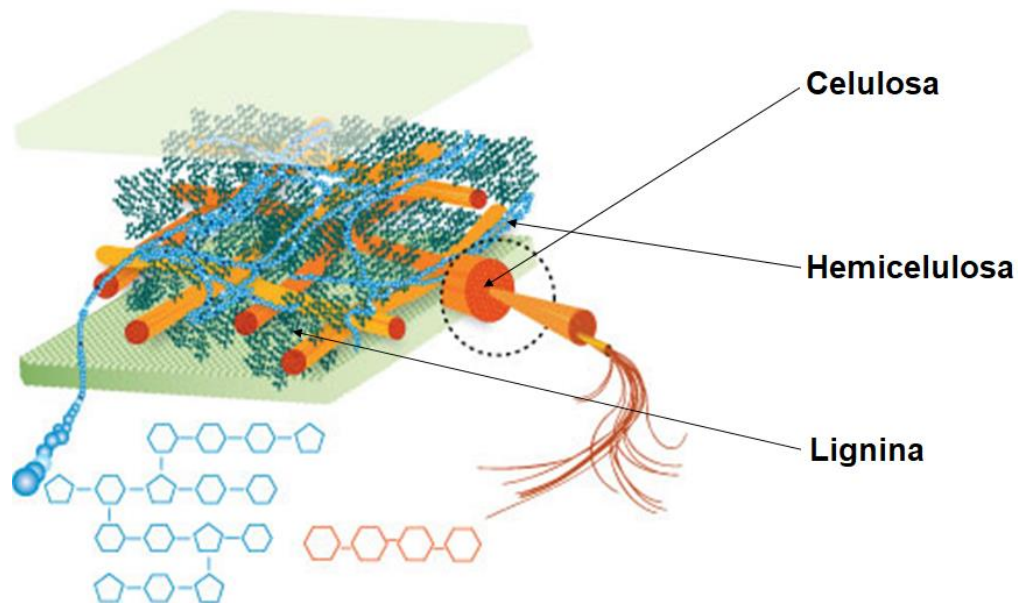


Figura 2. Principales componentes estructurales de la biomasa lignocelulósica. Adaptado de Toribio-Cuaya *et al.* (2014).

Los componentes de la biomasa lignocelulósica están unidos entre sí en una matriz heterogénea y su cantidad varía según la fuente de éste recurso (Chandra *et al.*, 2007; Horn *et al.*, 2012). Entre otros componentes, ésta biomasa también está constituida por agua y una pequeña cantidad de proteínas y otros compuestos que no participan significativamente en la formación de la estructura del material (Potumarthi *et al.*, 2013).

Dentro del complejo lignocelulósico, la celulosa conserva la estructura de fibras cristalinas que parecieran ser el núcleo del complejo. Por su parte, la hemicelulosa se encuentra ubicada entre las micro y macrofibras de la celulosa. Finalmente, la lignina tiene un papel estructural en la matriz donde están presentes la celulosa y la hemicelulosa (Potumarthi *et al.*, 2013).

Celulosa

La celulosa es el principal componente de las paredes celulares lignocelulósicas, que contienen glucosa unida a través de enlaces glucosídicos β -1.4. Las cadenas de celulosa interactúan entre sí a través de enlaces de hidrógeno y fuerzas de Van der Waals, originando microfibrillas que tienen alta

resistencia a la tracción (Zheng *et al.*, 2014) y alta cristalinidad (Jae *et al.*, 2010), lo que contribuye a tener un compuesto sólido y difícil de degradar en los materiales lignocelulósicos (Gomes *et al.*, 2015). Este homopolisacárido tiene la mayor proporción de potencial energético disponible en materiales lignocelulósicos; a través de su hidrólisis se obtienen únicamente moléculas de glucosa que pueden ser utilizadas fácilmente por la mayoría de los microorganismos fermentadores empleados tradicionalmente, como es el caso de *Saccharomyces cerevisiae* (Gomes *et al.*, 2015). En la Figura 3 se presenta la organización estructural de la pared celular de las plantas, con hincapié en la celulosa cristalina y la molécula de celulosa. Su estructura química se muestra en la Figura 4.

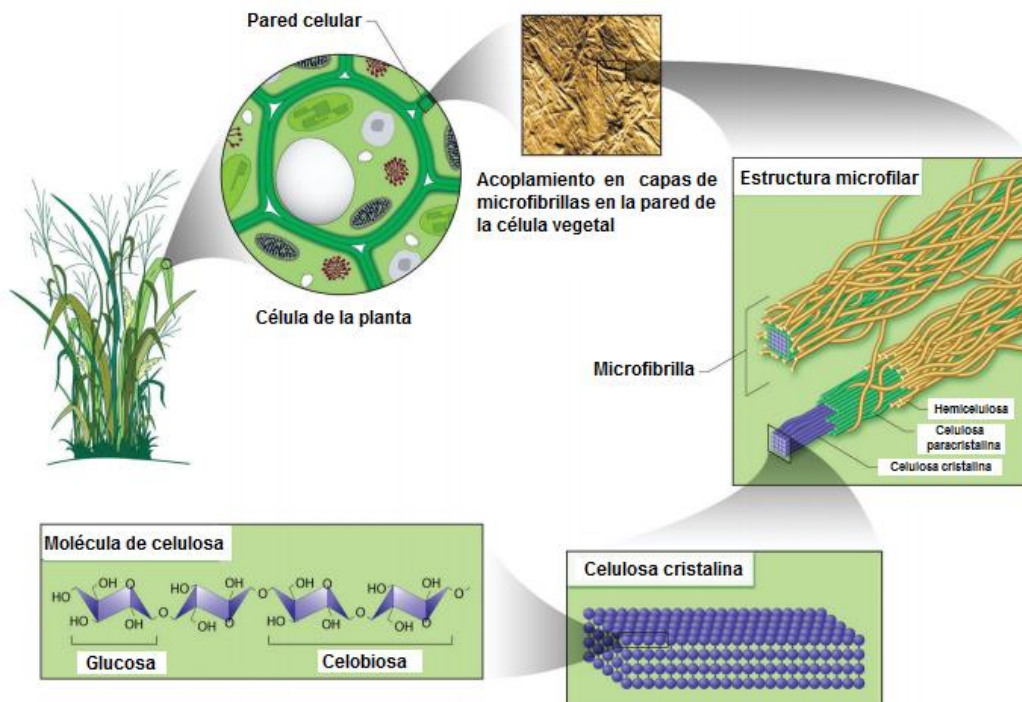


Figura 3. Organización estructural de la pared celular de la planta y molécula de celulosa (Quiroz-Castañeda y Folch-Mallol, 2013).

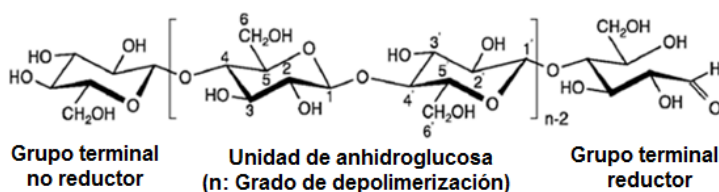


Figura 4. Estructura de la celulosa (Agbor *et al.*, 2011).

Hemicelulosa

La hemicelulosa es el segundo polímero más abundante de la naturaleza, presente principalmente en la pared celular de las plantas (Haghighi *et al.*, 2013). Es un polímero heterogéneo y ramificado, con una estructura aleatoria y amorfa, que está compuesta por heteropolímeros como el xilano, arabinoxilano, galactomanano, glucuroxilano, xiloglucano y glucomanano (Isikgor y Becer, 2015). Los heteropolímeros de hemicelulosa están compuestos por pentosas (β -D-xilosa y α -L-arabinosa), hexosas β -D-glucosa, α -D-galactosa y β -D-manosa) y azúcares acetilados (α -D-glucurónico, α -D-galacturónico y α -D-4-O-metilgalacturónico) (Limayem y Ricke, 2012; Saha, 2003); su estructura química se presenta en la Figura 5.

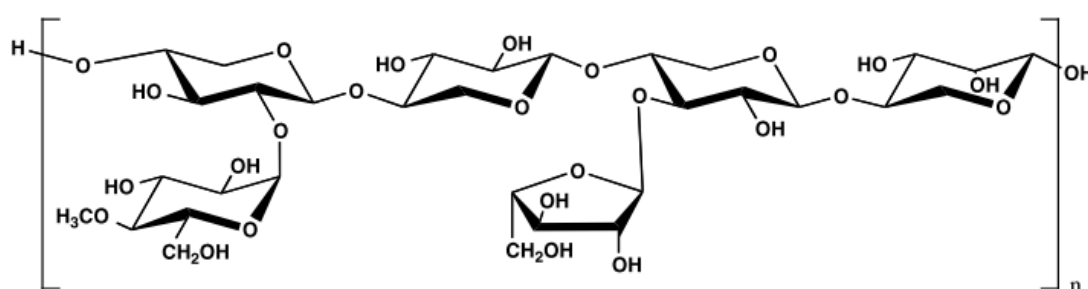


Figura 5. Estructura química de la hemicelulosa. Tomado de Fernandes *et al.* (2013).

Las hemicelulosas tienen diferente composición; en el caso de biomásas procedentes del sector agrícola, estas se componen principalmente de xilano, y la hemicelulosa presente en las maderas blandas contiene principalmente glucomanano (Agbor *et al.*, 2011). Los xilanos son un diverso grupo de polisacáridos que tienen en común una cadena principal de residuos de xilosa unidos por enlaces β -(1 \rightarrow 4) (Scheller y Ulvskov, 2010), que además puede contener arabinosa, ácido glucurónico, o sus ácidos 4-O-metil éter, ácido acético, ferúlico y *p*-cumárico (Agbor *et al.*, 2011).

Por otro lado, la hemicelulosa tiene diversas aplicaciones industriales de alto valor agregado, como hidrogeles a base de este polisacárido, termoplásticos, recubrimientos y aditivos en fabricación de papel, productos cosméticos y farmacéuticos (Farhat *et al.*, 2017; Fredon *et al.*, 2002; Jain *et al.*, 2000; Qi *et al.*, 2016). La extracción de este polisacárido a partir de biomasa es muy importante para la fabricación de biomateriales, productos químicos y diversos combustibles (Farhat *et al.*, 2017). En el caso del empleo de biomasa lignocelulósica para producción de biocombustibles, la hemicelulosa presente en el material debe ser removida con la finalidad de aumentar la fermentabilidad de la celulosa debido a que esta cubre las fibrillas de celulosa, lo que limita su disponibilidad para la hidrólisis enzimática (Agbor *et al.*, 2011; Haghighi *et al.*, 2013). La eliminación de la hemicelulosa aumenta el tamaño medio de los poros del material lignocelulósico, aumentando la accesibilidad y la probabilidad para que la celulosa sea hidrolizada (Alvira *et al.*, 2010; Chandra *et al.*, 2007). La hidrólisis de la hemicelulosa es relativamente fácil, debido a su estructura amorfa y ramificada, así como por su bajo peso molecular (Horn *et al.*, 2012; Haghighi *et al.*, 2013; Gomes *et al.*, 2015).

Alvira *et al.* (2010), sugieren que, para obtener mayores rendimientos de azúcares fermentables para su posterior conversión a combustibles como el etanol, deben recuperarse los azúcares de la hemicelulosa. Se han estudiado diferentes métodos para la remoción de la misma, entre los que se encuentran los pretratamientos con ácido diluido y agua caliente (Lehto *et al.*, 2017), extracción alcalina (Farhat *et al.*, 2017), microondas (Bai, Xiao, y Sun, 2015), etc., o combinación de ellos (Liu *et al.*, 2017; Singh *et al.*, 2017). Para la selección de los métodos a usarse en la remoción o la hidrólisis de la hemicelulosa debe considerarse las condiciones de operación, tiempo y temperatura, debido a que es relativamente sensible y el control de estos parámetros podría evitar la formación de compuestos no deseados (furfural y/o hidroximetilfurfural), que son inhibidores en el proceso de fermentación (Haghighi *et al.*, 2013).

Lignina

La lignina es un polímero amorfo, después de la celulosa y la hemicelulosa es uno de los más abundantes en la naturaleza, presente en la pared celular de las plantas, cuyas funciones principales son dar soporte estructural a la planta, impermeabilidad y resistencia contra el estrés oxidativo y ataques microbianos (Hendriks y Zeeman, 2009). Tiene una estructura química fenólica y es un complejo en red conformado por diferentes unidades de fenilpropanol como alcoholes *p*-cumarílico, coniferílico y sinapílico (Figura 6) (Gomes *et al.*, 2015; Horn *et al.*, 2012; Jae *et al.*, 2010) actúan como un escudo protector de la microestructura de la celulosa y hemicelulosa (Laathanachareon *et al.*, 2015).

La lignina es un heteropolímero insoluble en agua y ópticamente inactivo, lo que hace que su degradación sea difícil. Bajo condiciones neutras, la lignina comienza a hidrolizarse a los 180 °C, al igual que la hemicelulosa; su solubilidad en ambientes ácidos, neutros y alcalinos depende, sin embargo, de los alcoholes precursores o combinaciones de éstos (Hendriks y Zeeman, 2009).

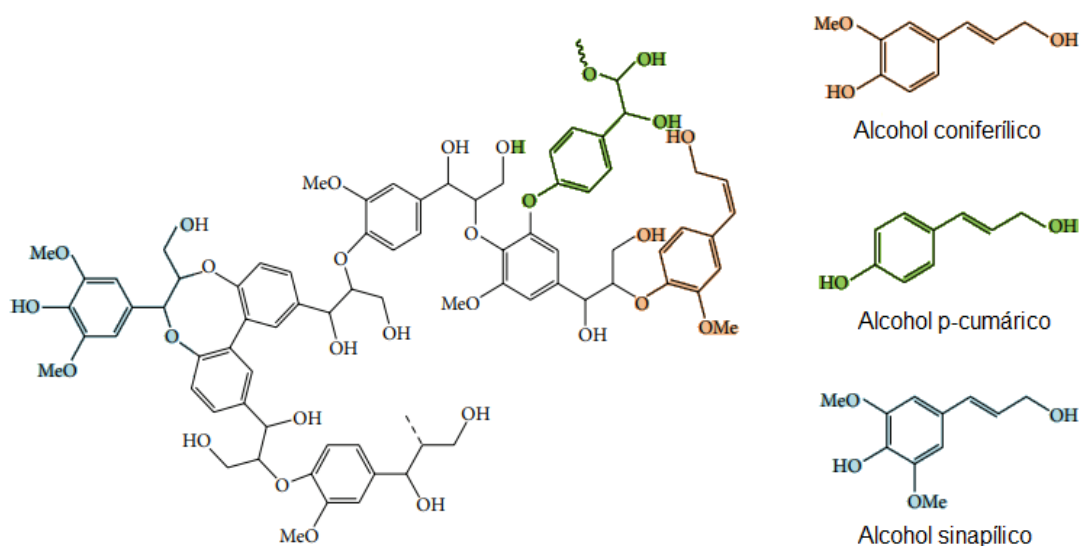


Figura 6. Estructura química de la lignina. Adaptado de Lee *et al.* (2014).

En el Cuadro 2 se presenta el contenido de celulosa, hemicelulosa y lignina para algunas biomásas lignocelulósicas con potencial como materia prima para la producción de bioetanol.

Cuadro 2. Contenido de celulosa, hemicelulosa y lignina para biomásas lignocelulósicas. Adaptado de *Zabed et al.* (2017).

Biomasa	Celulosa (%)	Hemicelulosa (%)	Lignina (%)
Pasto varilla	5–20	30–50	10–40
<i>Miscanthus</i>	38–40	18–24	24–25
Hierbas generales	25–40	25–50	10–30
Residuos sólidos urbanos	33–49	9–16	10–14
Papel periódico	40–55	25–40	18–30
Elote	42–45	35–39	14–15
Rastrojo de maíz	38–40	24–26	7–19
Bagazo de caña de azúcar	42–48	19–25	20–42
Paja de arroz	28–36	23–28	12–14
Paja de trigo	33–38	26–32	17–19
Paja de cebada	31–45	27–38	14–19
Bagazo dulce de sorgo	34–45	18–27	14–21
Paja de avena	31–37	27–38	16–19
Paja de centeno	33–35	27–30	16–19
Cáscara de arroz	25–35	18–21	26–31
Madera blanda	27–30	35–40	25–30
Madera dura	20–25	45–50	20–25

2.3.4. Pericarpio de maíz

El pericarpio de maíz es un subproducto obtenido a partir de la molienda húmeda del maíz para producción industrial de almidón, que está compuesto por la cascarilla del maíz y el almidón residual no extraído durante este proceso (Gáspár *et al.*, 2007) y representa el 5.3 % (p/p) de todo el grano de maíz (Watson y Ramstad, 1987). Se estima una producción anual en el mundo de 4 millones de toneladas (Yoshida *et al.*, 2013) , siendo altamente disponible en México (0.1 millones de t/año), lo que podría representar una materia prima de fácil acceso y de bajo costo (Díaz-Malváez, *et al.*, 2013).

El pericarpio de maíz es generalmente utilizado como ingrediente en la alimentación animal con la adición de proteína de maíz (Shukla y Cheryan, 2001), pero se estudian aplicaciones de mayor valor. Yoshida *et al.* (2012), evaluaron la extracción de la mezcla de arabinoxilano y β -glucano del pericarpio de maíz mediante el disolvente NaOH-urea, concluyendo que el proceso de extracción es eficaz y que los materiales extraídos podrían ser fuente para biopelículas. Díaz-Malvárez *et al.* (2013), aislaron y evaluaron las propiedades de β -xilosidasas producidas a partir de fermentación en estado sólido con *Aspergillus niger* GS1 y pericarpio de maíz como sustrato pretratado con agua electrolizada, encontrando una enzima con propiedades bioquímicas, estructurales y termodinámicas diferentes a las reportadas. Sin embargo, recomiendan realizar otros estudios para determinar sus aplicaciones en procesos industriales. Por otro lado, Monroy *et al.* (2016), evaluaron la extracción de compuestos bioactivos a partir de la mazorca y el pericarpio de maíz morado (*Zea mays* L.) por extracción secuencial en extractor de lecho fijo utilizando CO₂ supercrítico, etanol y agua como disolventes, obteniendo altos rendimientos de extracción, lo que muestra el posible potencial de mercado para los compuestos extraídos.

En cuanto a su composición, Watson y Ramstad (1987) reportan que el pericarpio de maíz comprende un 70 % (p/p) de hemicelulosa. Por su parte, Sugawara *et al.* (1994) determinaron que la hemicelulosa es el mayor componente del pericarpio de maíz con un 72 % (p/p), conteniendo alrededor de 30 % (p/p) de arabinosa y 50 % (p/p) de xilosa, por su parte la celulosa está presente en un 16 % y la lignina en un 2 %. Este resultado concuerda con el reporte de Yoshida *et al.*, (2012), donde polisacáridos hemicelulósicos representan alrededor del 73.6 % (p/p) de la composición del pericarpio de maíz, constituido principalmente de arabinoxilano (66.1 % p/p). Por su parte, Díaz-Malvárez *et al.* (2013), encontraron también que el polímero que se encuentra en mayor proporción en el pericarpio de maíz es la hemicelulosa (64.25 % p/p), seguido de la celulosa (18.12 % p/p) y finalmente lignina (2.58 %). La composición proximal de pericarpio de maíz se muestra en el Cuadro 3. Entre otros componentes del pericarpio de maíz están almidón (7.3 % p/p),

proteína (3.7 % p/p), ácidos grasos (1 % p/p) y cenizas (0.8 % p/p) (Shukla y Cheryan, 2001).

Cuadro 3. Composición proximal del pericarpio de maíz. Tomado de Díaz-Malvárez *et al.* (2013).

Composición química	Pericarpio de maíz (% base seca)
Humedad	8.15 ± 0.06*
Proteína	5.47 ± 0.03
Extracto etéreo	0.25 ± 0.03
Fibra detergente neutra	0.80 ± 0.03
Fibra detergente ácida	84.95 ± 0.77
Cenizas	20.70 ± 0.23*
Hemicelulosa	64.25 ± 0.96*
Celulosa	18.12 ± 0.23*
Lignina	2.58 ± 0.40*

*Media de tres réplicas ± desviación estándar

2.4. Proceso de producción de bioetanol a partir de biomasa lignocelulósica

El proceso de producción del bioetanol varía dependiendo de la materia prima involucrada, dado que deben manejarse diferentes condiciones de temperatura, presión y microorganismos (Bajpai, 2013). Para la producción de este biocombustible a partir de biomasa lignocelulósica es fundamental degradar la red lignocelulósica a sus fracciones individuales (celulosa, hemicelulosa y lignina) mediante un pretratamiento. La celulosa y hemicelulosa liberadas se hidrolizan posteriormente química o enzimáticamente en azúcares solubles, que se convierten en etanol durante el proceso de fermentación; éste se recupera y purifica por destilación (Zabed *et al.*, 2017). Las principales etapas del proceso productivo de etanol se presentan en la Figura 7.

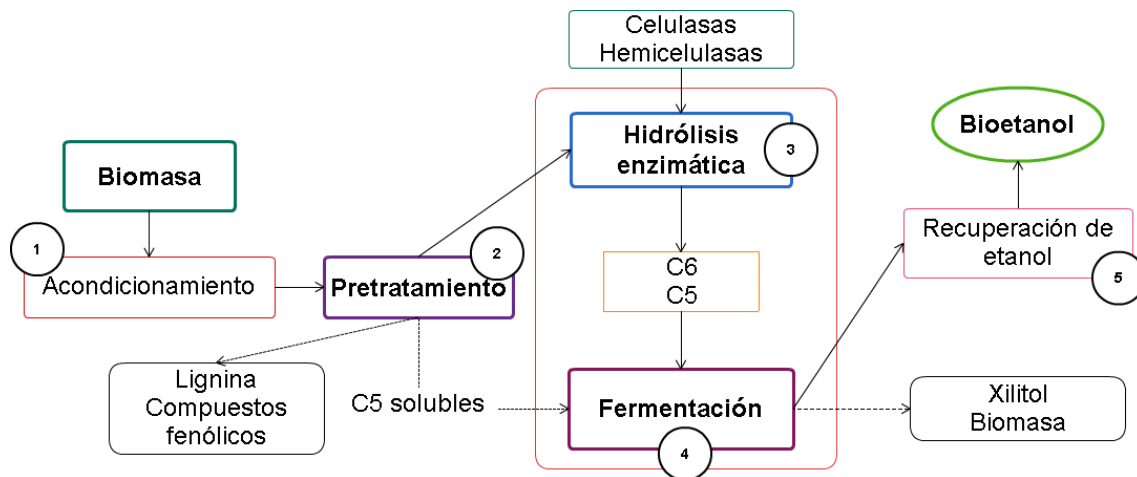


Figura 7. Principales etapas del proceso de producción de bioetanol. Adaptado de Merino y Cherry (2007). 1. Reducción del tamaño de partícula de la biomasa; 2. Aplicación de pretratamiento termoquímico para exponer polímeros de azúcar a la fase líquida; 3. Hidrólisis enzimática para convertir polímeros de azúcares en azúcares monoméricos; 4. Fermentación de azúcares monoméricos a etanol; 5. Recuperación de etanol mediante destilación. C5 hace referencia a pentosas (procedentes de la hemicelulosa) y C6 a hexosas (derivados de la celulosa).

En lo referente a la obtención de bioetanol a partir de recursos lignocelulósicos, la biotecnología se enfrenta a tres grandes retos, el primero incluye la etapa de pretratamiento, que es generalmente la etapa más costosa. El segundo reto se centra en el desarrollo de enzimas o microorganismos de bajo costo para la producción de azúcares a nivel industrial. El tercer reto se enfoca en la optimización del proceso de fermentación para la obtención de etanol a partir de microorganismos que toleren condiciones adversas (Batidzirai *et al.*, 2012).

2.4.1. Pretratamiento de biomasa lignocelulósica

El pretratamiento es una de las principales etapas en la conversión de energía a partir de biomasa lignocelulósica (Hongyan Chen *et al.*, 2017). Sus objetivos son reducir el tamaño de partícula (Graf y Koehler, 2000); exponer sus componentes estructurales para posterior hidrólisis en azúcares simples (Mosier, 2005); reducir el grado de cristalinidad de la matriz de celulosa (Patel, Onkarappa, y Shobha, 2007) y proveer mejor acceso de las enzimas para la hidrólisis de carbohidratos en azúcares fermentables (Sánchez y Cardona, 2008). Lo anterior sugiere la necesidad de elegir un pretratamiento eficaz que permita la liberación de azúcares, evite la degradación de éstos y la formación

de productos inhibidores de la fermentación, reduciendo las demandas energéticas y los costos del proceso (Aditya *et al.*, 2016; Gupta, 2016). La elección del pretratamiento depende de la materia prima, enzimas y organismos a utilizar (Hongyan Chen *et al.*, 2017). El efecto de pretratamientos sobre materiales lignocelulósicos se muestra en la Figura 8.

Keikhosor *et al.* (2013), citan los aspectos que son deseables cuando se aplican pretratamientos sobre materiales lignocelulósicos; mencionando que se desean altos rendimientos en la hidrólisis enzimática con baja cantidad de enzimas u operaciones de fermentación con costos mínimos; bajo consumo químico para pretratamiento, neutralización y posterior acondicionamiento; posibilidad de reutilización del producto químico usado en el pretratamiento; mínima producción de residuos; reacciones químicas rápidas y no corrosivas para reducir costos del pretratamiento en el reactor. Además, la concentración de azúcares de la hemicelulosa para el pretratamiento debe ser mayor al 10 % para mantener el tamaño del reactor para la fermentación a niveles razonables y con ello facilitar la recuperación de residuos líquidos y finalmente, el pretratamiento debe facilitar la recuperación de lignina para la conversión a subproductos valiosos.

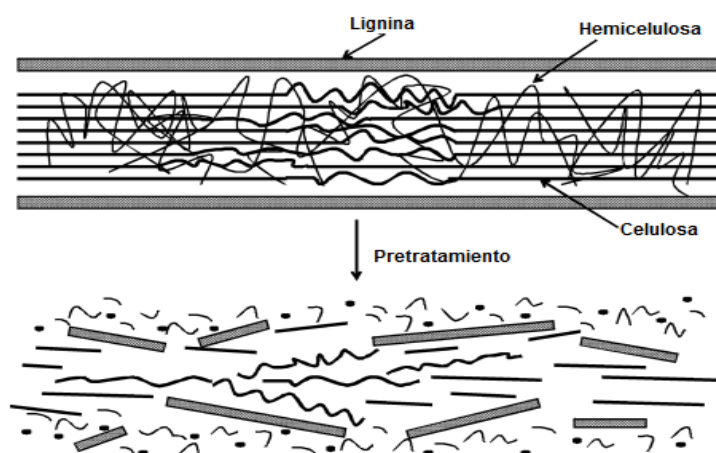


Figura 8. Efecto de diferentes pretratamientos sobre la estructura lignocelulósica. Adaptado de Chaturvedi y Verma (2013).

Se han estudiado diversos métodos de pretratamiento sobre la biomasa lignocelulósica para facilitar la hidrólisis de celulosa, hemicelulosa y lignina, que

se dividen en diferentes categorías: físicos, químicos, físico-químicos y biológicos (Cuadro 4).

Cuadro 4. Comparación de diferentes métodos de pretratamiento de biomasa lignocelulósica. Adaptado de Hongyan Chen *et al.* (2017).

Métodos de pretratamiento		Ventajas	Desventajas
Pretratamiento físico	Astillado mecánico	Reduce el tamaño de partícula y la cristalinidad de la celulosa	No se puede eliminar lignina y hemicelulosa, y se requiere alta energía
	Microondas	Operación sencilla, ahorro de energía, poco tiempo	Alto costo
	Ultrasonido	Mejora la accesibilidad y la reactividad de la celulosa	Negativo a hidrólisis enzimática
	Radiación de electrones de alta energía	Reduce el grado de polimerización de celulosa	Alto costo
	Pirólisis de electrones a alta temperatura	Descompone rápidamente la celulosa	Alto consumo de energía y baja productividad
Pretratamiento químico	Ácido concentrado	Alta conversión de azúcar	Altamente tóxico y corrosivo, de alto costo
	Ácido diluido	Rápido y no necesita reciclar el ácido	Alta temperatura y presión, formación de inhibidores
	Pretratamiento alcalino	Temperatura ambiente, destruye la lignina	Menor degradación del azúcar
	Pretratamiento de oxidación	Elimina eficazmente la lignina	Alto costo
	Pretratamiento con solventes orgánicos	Obtención de lignina pura, celulosa y hemicelulosa	Alto costo, ciertos efectos sobre el medio ambiente y la fermentación
Pretratamiento con líquido iónico	Amplio rango de temperatura	Alto costo	
Pretratamiento físico-químico	Explosión de vapor	Transformación de la lignina y solubilización de la hemicelulosa Económico	Alta temperatura y presión
	Método AFEX Explosión de CO ₂	Aumento del área superficial de la celulosa Ausencia de sustancias inhibitorias	Alto costo, No es eficiente para el material crudo de alto contenido de lignina
	Catálisis eléctrica	No produce compuestos inhibidores Rentable Aumenta la superficie Elimina lignina eficazmente	Alta presión, no afecta la lignina y la hemicelulosa Menor eficiencia
Pretratamiento biológico		Degrada la lignina y la hemicelulosa Bajo consumo de energía	Bajo índice de hidrólisis

Pretratamientos físicos

Los pretratamientos físicos están orientados principalmente a la reducción del tamaño de partícula de la biomasa, reduciendo tanto la cristalinidad como el grado de polimerización de la celulosa (Mohapatra *et al.*, 2017). Métodos mecánicos de trituración, microondas, ultrasonido y de radiación de electrones pertenecen a esta clasificación (Chen *et al.*, 2017). Tienen como ventaja que no producen subproductos o inhibidores tóxicos en el sustrato, pero son procesos costosos debido al alto requerimiento energético (Gupta y Verma, 2015).

Pretratamientos químicos

Los pretratamientos químicos se usan principalmente para degradar la lignina y hemicelulosa presentes en la biomasa, mediante la ruptura de los enlaces internos de estos polímeros (Behera *et al.*, 2014); es decir, de los enlaces químicos entre residuos de lignina y residuos de las cadenas laterales de la hemicelulosa, como son galactosa y arabinosa (Chen, 2014), esto se puede realizar mediante el uso de ácidos (clorhídrico y sulfúrico), bases (hidróxido de sodio), líquidos iónicos y ácidos orgánicos (ácido oxálico, ácido acetilsalicílico y ácido salicílico) (Behera *et al.*, 2014).

Los pretratamientos químicos son los más comúnmente empleados para biomasa lignocelulósica donde los polisacáridos, principalmente hemicelulosas son hidrolizados a monosacáridos que permiten una mayor accesibilidad de la celulosa para hidrólisis enzimática (Haghighi *et al.*, 2013). Estos pretratamientos son los más comúnmente empleados (Tahezadeh y Karimi, 2008). Sin embargo, estos pretratamientos presentan como desventajas la necesidad de contar con equipos resistentes a la corrosión, la exclusión de diversos productos químicos y problemáticas de contaminación ambiental (Chen, 2014).

Tahezadeh y Karimi (2008), reportan que los pretratamientos ácidos se pueden realizar ya sea en virtud de la concentración de ácido, baja y alta temperatura o con alta concentración de ácido y temperatura más baja. Gírio *et*

al. (2010), hacen referencia al uso de ácido concentrado como el más económico debido a que es un proceso que se hace a bajas temperaturas, sin embargo, se reporta una alta toxicidad, corrosión de equipos y difícil recuperación del ácido (Sun y Cheng, 2002). Otros autores también señalan degradación de glucosa y producción de inhibidores como 5-hidroximetil furfural y 2-furfuraldehído (Almeida *et al.*, 2007; Pedersen *et al.*, 2010; Haghghi *et al.*, 2013), razones por las cuales no es conveniente su uso. Al emplearse altas temperaturas, los inhibidores producidos, como el furfural, pueden degradarse a ácidos fórmico y levulínico (Larsson *et al.*, 1999). Hsu *et al.* (2010), reportan que el pretratamiento con ácido diluido genera cantidades más bajas de inhibidores de la fermentación, por lo que es el más atractivo para su aplicación a nivel industrial. En el Cuadro 5 se presentan las ventajas y desventajas de los pretratamientos con ácido concentrado y diluido.

Cuadro 5. Comparación entre métodos de hidrólisis con ácido concentrado y diluido. Adaptado de Taherzadeh y Karimi (2008).

Método de hidrólisis	Ventajas	Desventajas
Proceso con ácido concentrado	<ul style="list-style-type: none"> • Operado a bajas temperaturas. • Alto rendimiento de azúcar. 	<ul style="list-style-type: none"> • Alto consumo de ácido. • Corrosión de equipos. • Alto consumo de energía para la recuperación del ácido. • Largos tiempos de reacción (2-6 h).
Proceso con ácido diluido	<ul style="list-style-type: none"> • Baja consumo de ácido. • Poco tiempo de residencia. 	<ul style="list-style-type: none"> • Operado a alta temperatura. • Bajo rendimiento de azúcar • Corrosión de equipos. • Formación de productos indeseables.

En diferentes estudios se reporta el uso de ácidos para el pretratamiento de materiales lignocelulósicos, entre los que se encuentran los ácidos sulfúrico, clorhídrico, fosfórico y nítrico diluidos. El ácido más utilizado para pretratamiento de materiales lignocelulósico es el ácido sulfúrico y se ha reportado que se obtienen altos rendimiento durante la hidrólisis (Alvira *et al.*, 2010). Schell *et al.* (2003) obtuvieron entre 70 y 77 % de rendimiento de xilosa y un 80 a 87 % de celulosa al pretratar rastrojo de maíz con ácido sulfúrico diluido (0.5-1.4 % p/p). Saha *et al.* (2005) obtuvieron un rendimiento de sacarificación del 74 %, al someter paja de trigo a pretratamiento con este ácido al 0.75 % (v/v) a 121 °C durante 1 h. Por otro lado, Cara *et al.* (2008) obtuvieron de la hidrólisis de biomasa de árbol de oliva 76.5 % de rendimiento al usar este ácido al 1.4 % y a 210 °C. Hsu *et al.* (2010), utilizaron ácido sulfúrico al 1 % (p/p) sobre paja de arroz y evaluaron su efecto sobre las propiedades estructurales e hidrólisis enzimática; mientras que Shen y Wyman (2011), utilizaron ácido sulfúrico al 0.5 % (p/p) sobre rastrojo de maíz, obteniendo rendimientos de xilosa de 93.1 %. En cuanto al rendimiento de etanol, Rocha *et al.* (2009) reportan que al tratar bagazo de manzana de marañón con H₂SO₄ (0.8 mol/L) a 121 °C durante 15 min obtuvieron etanol con rendimiento de 0.47 g/g glucosa.

Por su parte, Marcotullio *et al.* (2011), pretrataron paja de trigo con HCl (100 mM en agua pura) para la producción combinada de carbohidratos derivados de hemicelulosa y un residuo sólido. Zheng *et al.* (2009) estudiaron la cinética del pretratamiento de rastrojo de maíz con ácido nítrico diluido a concentraciones de 0.2, 0.4 y 0.6 %, siendo esta última la que permitió una mayor efectividad durante la hidrólisis del material que puede ser utilizado para producción de metano. Diversos estudios han demostrado que el uso de ácido fosfórico (2-6 % p/p) como pretratamiento, hidroliza eficientemente la hemicelulosa presente en rastrojo de maíz (Um *et al.*, 2003), bagazo de caña de azúcar (Gámez *et al.*, 2006) y paja de sorgo (Vázquez *et al.*, 2007). Este ácido (1 % p/p) fue empleado por Geddes *et al.* (2010) sobre bagazo de caña de azúcar para evaluar su efectividad sobre la hidrólisis de hemicelulosa a azúcares monómeros, siendo un pretratamiento eficaz para la posterior hidrólisis enzimática; de igual forma, Boonmanumsin *et al.* (2012), reportaron

rendimientos de 62.28 % de azúcares monoméricos en *Miscanthus senensis* pretratada con 1.78 % (v/v) de ácido fosfórico.

Pretratamientos físico-químicos

Los pretratamientos físico-químicos permiten la alteración de la estructura de la lignina y la disolución de la hemicelulosa, mejorando la accesibilidad de la celulosa para enzimas hidrolíticas (Hendriks y Zeeman, 2009). En esta categoría se incluyen métodos de explosión de vapor, agua líquida caliente, explosión de fibra de amoníaco, oxidación húmeda, amoníaco acuoso y explosión con CO₂ (Kumar *et al.*, 2009; Behera *et al.*, 2014; Hongyan Chen *et al.*, 2017).

Pretratamientos biológicos

Los pretratamientos biológicos envuelven el uso de microorganismos productores de enzimas que descomponen lignina, hemicelulosa y polifenoles presentes en las biomásas (Behera *et al.*, 2014). Los microorganismos más utilizados son los hongos pudridores de madera (hongos blancos y marrones) y hongos de pudrición blanda (Chen *et al.*, 2017). Se conoce que algunos hongos como *Phanerochaete chrysosporium*, *Trichoderma reesei*, *Trichoderma viride*, *Aspergillus niger*, y algunas bacterias como *Clostridium* sp., *Cellulomonas* sp., *Bacillus* sp., *Thermomonospora* sp., y *Streptomyces* sp., hidrolizan biopolímeros naturales (Sharma *et al.*, 2017).

Los pretratamientos biológicos para la producción de etanol a partir de biomasa tienen como ventajas que económicamente viables para mejorar la tasa de sacarificación enzimática, no liberan compuestos tóxicos y no hay necesidad de reciclar productos químicos (Sindhu *et al.*, 2016). Sin embargo, son procesos que requieren de mucho tiempo, control de las condiciones de crecimiento de los microorganismos y amplios espacios para su desarrollo (Chandra *et al.*, 2007).

2.4.2. Hidrólisis de la biomasa

Galbe y Zacchi (2007) sugieren a la biomasa lignocelulósica como materia prima para la producción de bioetanol de segunda generación. Para llevar a cabo dicho proceso, Gusakov (2011) plantea que se requiere de una etapa crucial, donde la hemicelulosa y la celulosa sean hidrolizadas en azúcares simples que serán fermentados posteriormente. La hidrólisis de la lignocelulosa puede realizarse químicamente mediante el uso de ácidos como el sulfúrico o enzimáticamente con el empleo de enzimas celulolíticas y/o hemicelulolíticas (Zhang *et al.*, 2012).

La hidrólisis enzimática se presenta como una etapa adecuada debido a que se requiere de equipos simples, las condiciones son suaves, bajo consumo energético y menor contaminación. Sin embargo, su aplicación industrial es limitada debido a costos de preparación de las enzimas, tasa de hidrólisis lenta y a la carencia de un sistema de respuesta eficaz para satisfacer la compleja reacción catalítica (Chen, 2014). Kumar *et al.* (2009), sugieren que el proceso de hidrólisis enzimática se puede dividir en dos etapas: durante la primera etapa, se forman oligómeros solubles a partir de la hidrólisis de las cadenas largas; posteriormente, estos se hidrolizan a monómeros de azúcar en una segunda etapa.

La hidrólisis enzimática puede realizarse empleando diferentes enzimas fúngicas y bacterianas como lacasas, hemicelulasas y celulasas, que degradan lignina, hemicelulosa y celulosa de manera eficiente, respectivamente (Quiroz-Castañeda y Folch-Mallol, 2013). Las enzimas que se usan principalmente para la hidrólisis de biomasa lignocelulósica son celulasas (Khare *et al.*, 2015), debido a que la celulosa es el componente mayoritario de la mayoría del material a hidrolizar (Singhania *et al.*, 2013).

Las celulasas son biocatalizadoras altamente específicos que degradan la lignocelulosa para generar principalmente glucosa (Chen, 2014). Es un sistema que comprende diversas enzimas con efectos sinérgicos entre sí (exo-1,4- β -glucanasa, endo-1,4- β -glucanasa, β -glucosidasa y celobiasa). La apropiada

combinación de sus actividades determina la eficiencia de la sacarificación, pero varía según el tipo de biomasa (Khare *et al.*, 2015). Estas enzimas son producidas por hongos (*Trichoderma* spp. y *Aspergillus* spp.), bacterias (*Cytophaga* y *Cellulomonas* spp) y actinomicetos (*A. roseus* y *A. cellulosa*); siendo los hongos los principales productores de celulasa (Chen, 2014).

Las exoglucanasas hidrolizan las unidades de glucosa de los extremos no reductores, y las endoglucanasas actúan aleatoriamente sobre los enlaces glucosídicos internos, en la región amorfa de la celulosa, liberando diversos oligosacáridos. En la Figura 9 se presenta un modelo clásico de la degradación de celulosa por enzimas celulolíticas.

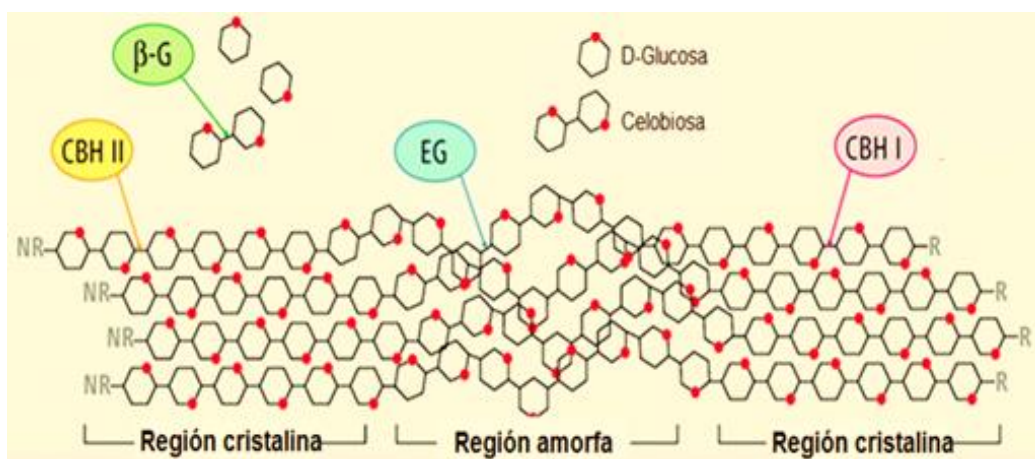


Figura 9. Modelo clásico de la degradación enzimática de celulosa. NR: extremo no reductor de la celulosa; R: extremo reductor de la celulosa; CBH II: exo- β -1,4-celobiohidrolasa; β -G: β -glucosidasa; EG: endo- β -1,4-glucanasa; CBH I: exo- β -1,4-celobiohidrolasa. Adaptado de Dutta *et al.* (2014).

En cuanto a la hidrólisis de la hemicelulosa, ésta requiere de un grupo de enzimas más complejo, conocidas como hemicelulasas, entre ellas se encuentran la endo- β -1,4-xilanasas que actúa aleatoriamente sobre los enlaces internos del xilano para liberar xiloligosacáridos, la β -xilosidasa que hidroliza los extremos no reductores de las cadenas de xilano para liberar xilosa, y diversas enzimas auxiliares como α -L-arabinofuranosidasa, α -galactosidasa, acetil xilanoesterasa y esterasa de ácido ferúlico (Maitan-Alfenas, Visser, y Guimarães, 2015). El modelo clásico de hidrólisis de la hemicelulosa se muestra en la Figura 10.

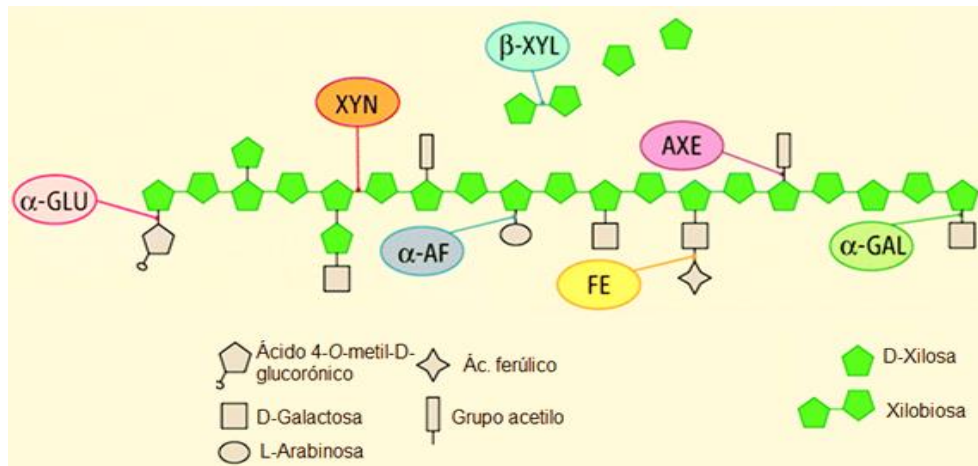


Figura 10. Modelo clásico de la degradación enzimática de hemicelulosa. α -GLU: α -D-Glucuronidasa; XYN: endo- β -1,4-Xilanasa; α -AF: α -L-Arabinofuranosidasa; β -D-Xilosidasa; FE: feruloil esterasa; AXE: acetil xilano esterasa; α -GAL: α -D-Galactosidasa. Adaptado de Dutta y Wu (2014).

Se han reportado diversos estudios de hidrólisis enzimática de biomazas lignocelulósicas bajo diferentes condiciones. Arantes *et al.* (2014), hidrolizaron enzimáticamente astillas de madera blanda y dura (2 % p/p), previamente pretratadas con vapor usando SO_2 como catalizador o con etanol, a 50 °C durante 72 h, obteniendo rendimientos de hidrólisis de celulosa menores al 20 %. Por su parte, Caspeta *et al.* (2014), pretrataron bagazo de agave (2, 5 y 10 % p/v) y lo sometieron a hidrólisis enzimática para su posterior conversión a etanol, utilizando celulasa [5 unidades de papel filtro (UPF)/g sólido] y β -glucosidasa [30 unidades de celobiohidrolasa (CBU)/g sólido], obteniendo 14.7 g/L y 34 g/L de glucosa después de 24 h de hidrólisis para 2 y 5 % de bagazo de agave, respectivamente, con una conversión de celulosa del 98 y 92.3 % para cada caso; para 10 % de bagazo obtuvieron 47.2 g/L de glucosa con porcentaje de conversión del 62.5 % a las 24 h. Rodrigues *et al.* (2015), hidrolizaron paja de trigo usando 10 UPF de 2 enzimas comerciales por separado (Cellic-CTec2 y Celluclast); la eficiencia de la hidrólisis para Cellic-Ctec2 fue >98 %, mientras que para Celluclast sin suplementar fue de 52 % y 81 % cuando se suplementó con β -Glucosidasa. Por otro lado, Brar *et al.* (2016), hidrolizaron enzimáticamente mazorca de maíz (10 % p/v) previamente pretratada con ácido sulfúrico diluido, evaluando diversas enzimas comerciales celulasas/xilanasas, donde la concentración más alta de azúcares totales fue de 732 mg/g sustrato. También, Auxenfans *et al.* (2017), sometieron diversas

biomasas lignocelulósicas pretratadas con explosión de vapor a hidrólisis enzimática (2 % p/v) con 40 UPF/g a partir de una mezcla enzimática comercial, y reportaron concentraciones de glucosa <11 g/L.

Finalmente, la compleja estructura de los materiales lignocelulósicos ha limitado la producción de biocombustibles de segunda generación, debido a su difícil degradación, lo que ha conducido a la producción de celulasas y otras enzimas eficientes para mejorar la sacarificación de dichos materiales (Andrić *et al.*, 2010; Chao *et al.*, 2012).

2.4.3. Fermentación

La fermentación es el término utilizado para describir la oxidación de un compuesto químico por la acción de organismos vivos, para producir energía. Este es el último paso para la producción de bioetanol a partir de hidrolizados de materiales lignocelulósicos. El material hidrolizado contiene de azúcares fermentables que son utilizados directamente por microorganismos etanologénicos, entre los que se encuentra la levadura *S. cerevisiae*, que ha sido ampliamente utilizada para la producción comercial de etanol debido a que tiene rápida tasa de crecimiento, eficaz utilización de la glucosa, eficiente producción de etanol y una alta tolerancia a altas concentraciones de etanol y bajos niveles de oxígeno (Binod *et al.*, 2013).

Además de las levaduras, otros hongos y bacterias pueden producir etanol bajo diferentes condiciones de fermentación. Un gran número de microorganismos tienen la capacidad de fermentar carbohidratos, principalmente pentosas o hexosas, en alcoholes. Binod *et al.* (2013) reportaron cepas bacterianas y fúngicas productoras de etanol, entre las que se encuentran:

- a. Cepas bacterianas: *Clostridium acetobutylicum*, *Klebsiella pneumoniae*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Sarcina ventriculi*, *Zymomonas mobilis*.
- b. Cepas de hongos y levaduras: *Aspergillus oryzae*, *Endomyces lactis*, *Kloeckera sp.*, *Kluyveromyces fragilis*, *Mucor sp.*, *Neurospora crassa*,

Rhizopus sp., *Saccharomyces beticus*, *S. cerevisiae*, *S. ellipsoideus*, *S. oviformis*, *S. saki*, *Torula sp.*, *Trichosporium cutaneum*.

Los componentes fundamentales en un proceso fermentativo son el microorganismo y el sustrato; y los principales factores que determinan la eficiencia total de la fermentación son el control del proceso, ausencia de contaminaciones, una alta velocidad de fermentación y el rendimiento (Binod *et al.*, 2013).

La técnica de fermentación de la biomasa lignocelulósica para la producción de etanol es igual a la fermentación convencional, siendo su única diferencia la fuente de carbono de la biomasa (Binod *et al.*, 2013). 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). Estos azúcares pueden ser fermentados por *S. cerevisiae* modificada genéticamente, bajo condiciones anaeróbicas y a 30°C como temperatura óptima, hasta convertirse en etanol (Limayem y Ricke, 2012), como se observa en la Figura 11.

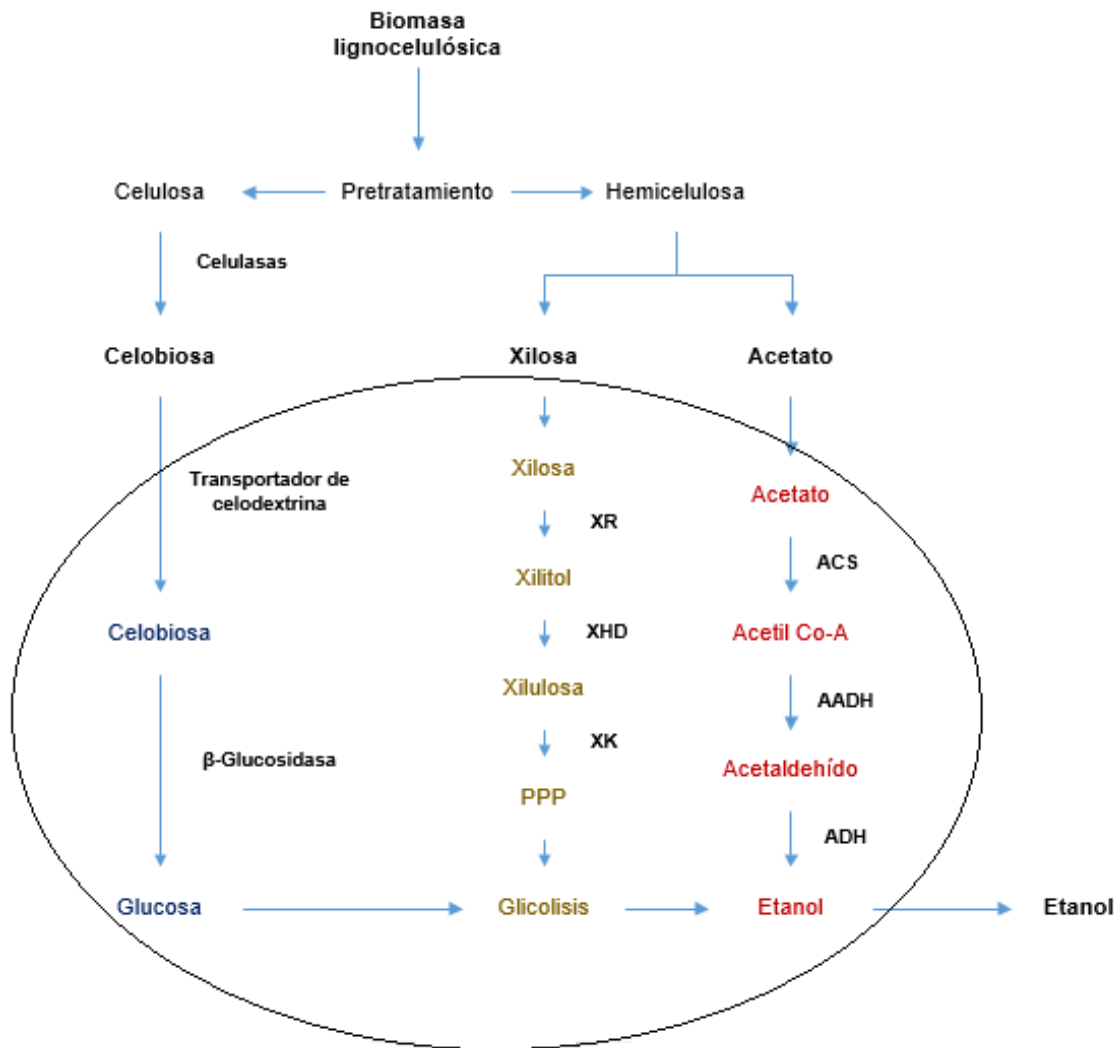


Figura 11. Visión esquemática de la producción de biocombustibles a partir de biomasa lignocelulósica por levadura transformada. XR: xilosa reductasa. XHD: xilitol deshidrogenasa. XK: xilulosa cinasa. ACS: acetil-CoA sintetasa. AADH: acetaldehído deshidrogenasa. ADH: alcohol deshidrogenasa. Adaptado de Wei *et al.* (2015).

La fermentación de biomasa hidrolizada puede ocurrir en una variedad de diferentes procesos; hidrólisis y fermentación separados, sacarificación y fermentación simultánea y simultánea sacarificación y cofermentación (Bajpai, 2013). Limayem y Ricke (2012), mencionan que, de forma tradicional, tanto la hidrólisis y la fermentación de materiales para obtener alcohol han sido de manera separada, lo que permite que ambos procesos puedan ser controlados y optimizados de manera individual. Sin embargo, la implementación simultánea de hidrólisis y fermentación para la producción de bioetanol a partir de materiales lignocelulósicos ha sido una alternativa a la manera tradicional por presentar mayores rendimientos; durante estos procesos simultáneos, se

combinan las enzimas y los microorganismos fermentadores en un reactor, produciéndose en un solo paso los azúcares y la conversión a alcohol (Bajpai, 2013). Según Kumar *et al.* (2009), la inhibición enzimática puede verse superada dado que la concentración de glucosa se mantiene baja y el etanol no puede inhibir la actividad de las enzimas; sin embargo, en la actualidad, ningún microorganismo puede llevar a cabo la hidrólisis y la fermentación de una manera rentable (Granados, 2015). Entre los principales microorganismos fermentadores se encuentra *S. cerevisiae*, que presenta altos rendimientos de alcohol (90 %), con alta tolerancia (>10 % v/v), sin embargo, es incapaz de fermentar xilosa y arabinosa, además, es termolábil y sensible a hidrólisis enzimática; también está *Schizosaccharomyces stipitis*, cuya ventaja radica en que fermenta xilosa con un rendimiento de conversión a etanol del 82 % y fermenta hexosas; pero como desventajas tiene que es intolerante a bajas concentraciones de etanol (40 g/L aproximadamente), no fermenta xilosa a pH bajo, es sensible a inhibidores químicos, etc. (Limayem y Ricke, 2012).

S. cerevisiae es uno de los microorganismos más utilizados para la producción de bioetanol a partir de biomasa celulósica, debido a sus altos flujos de carbono en el centro de vías metabólicas y maleabilidad genética (Wei *et al.*, 2015). Esta levadura tiene una alta eficiencia, alta tasa de conversión de azúcares a etanol (Van *et al.*, 2011), alta tolerancia al etanol y excelente resistencia a los inhibidores que puedan estar presentes en la biomasa lignocelulósica hidrolizada (Cai *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2016).

Sin embargo, *S. cerevisiae* no puede fermentar naturalmente xilosa, que es uno de los componentes más abundante en los hidrolizados lignocelulósicos, debido a la falta de una vía de asimilación funcional y a que el metabolismo de xilosa es altamente reprimido en presencia de glucosa, lo que dificulta su fermentación cuando se tienen hidrolizados que contienen ambos azúcares (Wei *et al.*, 2015). Debido a la necesidad de mejorar la eficiencia de *S. cerevisiae*, se han desarrollado y utilizado cepas capaces de fermentar xilosa. Romaní *et al.* (2015), reportan la producción de etanol por las cepas recombinantes PE-2 y CAT-1 de *S. cerevisiae* y utilizando mazorcas de maíz sometidas a sacarificación y co-fermentación simultánea, se observó que PE-2

fermenta xilosa y glucosa al mismo tiempo en presencia de inhibidores, mientras que CAT-1 consume primero glucosa y posteriormente xilosa. La primera cepa mostró el mayor rendimiento de etanol tras la fermentación, que fue de 0.47 g/g azúcares totales, representado el 92 % del rendimiento teórico.

De otro lado, está *Scheffersomyces stipitis*, que pertenece al grupo de levaduras aisladas de madera en descomposición y de las larvas de insectos que habitan en madera (Toivola *et al.*, 1984). Es capaz de producir etanol a partir de glucosa, galactosa, manosa, xilosa y celobiosa, con altos rendimientos y bajas cantidades de xilitol (Agbogbo y Wenger, 2006); también puede producir biomasa a partir de L-arabinosa (Nigam, 2002). Se conoce además que a altas tasas de aireación, *S. stipitis* produce solamente biomasa y a bajas tasas se produce etanol (Du-Preez, 1994).

3. JUSTIFICACIÓN

Los residuos agroindustriales son los recursos renovables más abundantes en la tierra; éstos son generados durante los diferentes procesos productivos tanto del sector agrícola como del industrial en forma líquida, semilíquida y sólida. Aunque una parte de estos residuos son destinados principalmente para la alimentación animal o son incinerados, para ser utilizados como fuente de carbono y minerales en los suelos. La disposición de los residuos agroindustriales aún continúa siendo motivo de discusión, ya que existe un desconocimiento del manejo que se les debe dar. Además no se cuenta con la tecnología apropiada para tratarlos y proporcionarles un destino final, y se carece de legislaciones y políticas públicas que promuevan su gestión, conllevando a que estos subproductos se conviertan en una problemática ambiental.

Durante los últimos años se ha suscitado el interés por el estudio de este tipo de residuos debido a que contienen azúcares y compuestos fenólicos que podrían tener un alto valor agregado, pudiendo ser utilizados en las industrias alimentaria, química, farmacéutica y de energía, etc. Los residuos agroindustriales difieren según la materia prima y el proceso que los produjo. Sin embargo, una de las principales características en común es que contienen materia orgánica, compuesta de proporciones diversas de lignina, celulosa y hemicelulosa. Lo que los hace una fuente energética ideal si estos componentes son tratados o separados con éxito, confiriendo un gran potencial para ser utilizados para la alimentación animal, obtención de productos químicos y producción de combustibles.

Por su parte, el uso de estos residuos renovables para la producción de combustibles se muestra como una alternativa al uso de materiales no renovables como los combustibles fósiles para la generación de energía. Debido a que el proceso de obtención de estos últimos al igual que su utilización en diferentes industrias, principalmente en la de transporte, genera una considerable contaminación ambiental, especialmente por las emisiones de CO y SO₂ al ambiente. Sin embargo, a pesar del potencial que tienen los

residuos agroindustriales para la producción de fuentes alternas de energía, debido a su composición química, alta disponibilidad y a que no compromete la seguridad alimentaria de la población. La producción de biocombustibles a partir de esta fuente se ha visto limitada por la compleja estructura del material, bajo rendimiento de azúcares fermentables, generación de inhibidores de la fermentación y baja producción de etanol. Requiriéndose el desarrollo de metodologías para realizar pretratamientos al material y estrategias aplicables industrialmente para la optimización de los procesos de hidrólisis y fermentación que conduzcan a un aprovechamiento eficiente del material pretratado y a la obtención de altos rendimientos de etanol.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general

- Evaluar la eficiencia en la obtención de azúcares fermentables del pericarpio de maíz hidrolizado y su utilización para la producción de bioetanol.

4.2. Objetivos específicos

- Evaluar el efecto de los pretratamientos ácidos sobre la producción de azúcares fermentables y la formación de productos de degradación en pericarpio de maíz.
- Determinar el efecto de un complejo enzimático sobre la sacarificación pericarpio de maíz pretratado.
- Establecer los parámetros de fermentación del hidrolizado de pericarpio de maíz para la producción de etanol y determinar la eficiencia de la producción de etanol a partir de pericarpio de maíz hidrolizado.

5. METODOLOGÍA

5.1. Materiales

Se empleó pericarpio de maíz (PM) proporcionado por la compañía Ingredion (San Juan del Río, Querétaro, México). El material fue secado en horno de convección forzada AP60 Air Performance (Froilabo, E.U.A.) a 50 °C durante 48 h, molido en un molino de cuchillas Krups GX410011 (Groupe SEB, Francia) y clasificado en tamices de acero inoxidable (Montiel, México). Se utilizó el producto retenido en la malla No. 40, con tamaño de partícula de 420 µm.

También se trabajó con pericarpio de maíz lavado. El lavado se realizó con la finalidad de remover los solubles presentes, y consistió en calentar agua de grifo a 60 °C y verterla sobre el material, mezclando manualmente hasta que el agua de lavado se tornó clara (5 lavados). Finalmente se dio un último lavado sumergiendo el pericarpio en agua a 60 °C durante 30 min. El material lavado fue filtrado, molido y tamizado bajo las mismas condiciones que el material sin lavar. Se determinó el contenido de humedad (SECOFI, 2001), contenido proteína cruda (AOAC, 2005), cenizas (AOAC, 2002), fibra detergente neutra (FDN) y fibra detergente ácida (FDA) (Vogel *et al.*, 1999).

5.2. Evaluación del efecto de pretratamientos ácidos sobre la producción de azúcares fermentables y la formación de inhibidores de fermentación en pericarpio de maíz

5.2.1. Pretratamiento de pericarpio de maíz

Se sometió pericarpio de maíz sin lavar a pretratamientos químicos con ácido diluido, evaluando el efecto del tipo de ácido (sulfúrico y fosfórico), concentración del ácido (2 y 4 % v/v), concentración de pericarpio de maíz (15 y 20 % p/v) y tiempo de tratamiento (30 y 60 min) (Cuadro 6). Se aplicó un diseño factorial 2⁴ en parcelas divididas donde el tiempo de tratamiento fue la parcela (Cuadro 7); los factores evaluados se seleccionaron con base en estudios previos (Granados, 2015).

Cuadro 6. Factores y niveles evaluados en el pretratamiento químico de pericarpio de maíz.

Factores	Niveles	
	-1	1
Tipo de ácido	Sulfúrico	Fosfórico
Concentración del ácido (% v/v)	2	4
Cantidad de pericarpio de maíz (% p/v)	15	20
Tiempo de tratamiento térmico (min)	30	60

Los tratamientos se realizaron en tubos de polipropileno (tipo Falcon) de 50 mL con fondo cónico. Se trabajó con un volumen de 30 mL, realizando mezclas de pericarpio de maíz y ácido diluido según las condiciones mencionadas anteriormente. Las mezclas se homogenizaron mediante una mezcladora Maxi-Mix-II (Barnstead-Thermolyne) durante 30 s y se sometieron a tratamiento térmico en autoclave vertical a 121 °C. Se detuvo la hidrólisis ácida del pericarpio por enfriamiento en hielo hasta temperatura ambiente y posteriormente se centrifugó a 5,000 rpm por 10 min. Las fracciones sólidas se secaron en horno a 50 °C durante 24 h o hasta peso constante y las fracciones líquidas se neutralizaron con NaOH en perlas hasta llevar a pH 5.0 y se filtraron en unidades swinnex-13 (Millipore Corporation, China) con membranas durapore tipo GVPP de 0.22 µm (Millipore Corporation, Irlanda). A las fracciones líquidas se les determinó la concentración glucosa a través del kit enzimático (R-BIOPHARM, Alemania) (Anexo 1) y xilosa por el kit K-xilosa 08/14 (MEGAZYME, Irlanda) (Anexo 2). Los pretratamientos se realizaron por triplicado, los resultados de las variables se expresaron como la media ± desviación estándar (DE) y se realizó un análisis de varianza en el software estadístico JMP 8.0 (SAS Institute Inc, EE. UU).

Cuadro 7. Diseño experimental por parcelas divididas.

Parcela	Tiempo de pretratamiento (min)	Tipo de ácido	Concentración de ácido (% p/v)	Cantidad pericarpio de maíz (% v/v)
1	60	Sulfúrico	4	20
	60	Sulfúrico	2	15
	60	Sulfúrico	4	15
	60	Fosfórico	2	20
	60	Fosfórico	2	15
	60	Fosfórico	4	15
	60	Sulfúrico	2	20
	60	Fosfórico	4	20
2	30	Fosfórico	4	15
	30	Sulfúrico	2	20
	30	Sulfúrico	4	15
	30	Sulfúrico	2	15
	30	Fosfórico	4	20
	30	Fosfórico	2	15
	30	Sulfúrico	4	20
	30	Fosfórico	2	20
3	60	Sulfúrico	4	20
	60	Sulfúrico	2	15
	60	Sulfúrico	4	15
	60	Fosfórico	2	20
	60	Fosfórico	2	15
	60	Fosfórico	4	15
	60	Sulfúrico	2	20
	60	Fosfórico	4	20
4	30	Fosfórico	4	15
	30	Sulfúrico	2	20
	30	Sulfúrico	4	15
	30	Sulfúrico	2	15
	30	Fosfórico	4	20
	30	Fosfórico	2	15
	30	Sulfúrico	4	20
	30	Fosfórico	2	20
5	60	Sulfúrico	4	20
	60	Sulfúrico	2	15
	60	Sulfúrico	4	15
	60	Fosfórico	2	20
	60	Fosfórico	4	20
	60	Fosfórico	2	15
	60	Sulfúrico	4	15
	60	Fosfórico	2	20
6	30	Fosfórico	4	15
	30	Sulfúrico	2	20
	30	Sulfúrico	4	15
	30	Sulfúrico	2	15
	30	Fosfórico	4	20
	30	Fosfórico	2	15
	30	Sulfúrico	4	20
	30	Fosfórico	2	20

Con base en las concentraciones de azúcares y sus rendimientos para los pretratamientos aplicados usando ácido fosfórico, se consideró estudiar

únicamente el efecto de los pretratamientos con ácido sulfúrico sobre el pericarpio de maíz esta vez previamente lavado, los demás factores y niveles se mantuvieron iguales, así como la metodología utilizada. Se aplicó un diseño factorial 2³ en parcelas divididas donde el tiempo de tratamiento fue la parcela (Cuadro 8); los pretratamientos se realizaron por triplicado.

Cuadro 8. Pretratamiento químico de pericarpio de maíz.

Muestra	Parcela	Concentración de ácido sulfúrico (% v/v)	Cantidad de pericarpio de maíz (% p/v)	Tiempo de tratamiento en autoclave (min)
1.1	1	4	20	60
2.1	1	2	15	60
3.1	1	4	15	60
4.1	1	2	20	60
2.2	2	2	15	60
4.2	2	2	20	60
3.2	2	4	15	60
1.2	2	4	20	60
2.3	3	2	15	60
3.3	3	4	15	60
1.3	3	4	20	60
4.3	3	2	20	60
5.1	4	4	20	30
6.1	4	4	15	30
7.1	4	2	20	30
8.1	4	2	15	30
5.2	5	4	20	30
8.2	5	2	15	30
7.2	5	2	20	30
6.2	5	4	15	30
5.3	6	4	20	30
7.3	6	2	20	30
6.3	6	4	15	30
8.3	6	2	15	30

Se determinó la concentración de azúcares reductores en la fracción líquida de los hidrolizados ácidos de pericarpio de maíz (PMH), usando el método del DNS (Wood *et al.*, 2012). La técnica consistió en mezclar 9 µL de muestra previamente diluida (1:4 muestra: agua destilada) con 171 µL de la solución de DNS (relación 1:20, muestra: reactivo DNS); las mezclas se calentaron a 100 °C durante 10 min, se enfriaron en hielo por 10 min y se llevaron a temperatura ambiente, luego 90 µL de cada mezcla se colocaron en una microplaca de 96 pozos y se midió su absorbancia a 570 nm en un varioskan flash Thermo

Scientific (MA, EE. UU). Se realizó una curva estándar de glucosa con concentraciones de 0.2, 0.5, 1.0, 1.5 y 2.0 M por triplicado (Anexo 3).

Se realizó la identificación de los monosacáridos presentes en los hidrolizados, usando estándares de glucosa, xilosa, arabinosa, galactosa, manosa y fructosa, y de los polisacáridos celobiosa y maltosa, a través de un equipo UPLC Acquity (WATERS, EUA) acoplado a un detector de índice de refracción (IR), empleando la columna Aminex HPX-87H (BioRad). Se establecieron las condiciones experimentales con base en reportes para el uso de esta columna con modificaciones (Landaeta *et al.*, 2013; Gong *et al.*, 2015; Sá *et al.*, 2015). Se utilizó H₂SO₄ 0.05 M con un flujo de 0.4 mL/min, la velocidad de flujo de las muestras fue de 10 µL/min, la temperatura de la columna fue de 55 °C y la del detector IR fue de 50 °C. Debido a que se identificó únicamente la presencia de glucosa, xilosa y arabinosa, se realizaron las curvas correspondientes para su cuantificación; glucosa (mM): 5, 15, 25, 35 y 45; xilosa (mM): 5, 50 100, 150 y 200; y arabinosa (mM): 5, 20, 40, 60 y 80 (Anexo 4, Anexo 5, Anexo 6).

Además, se realizó la identificación de inhibidores de la fermentación que pueden formarse al aplicar tratamientos químicos y térmicos a biomasa lignocelulósica (Landaeta *et al.*, 2013; Ribeiro *et al.*, 2015), usando estándares de ácido acético, furfural, hidroximetilfurfural, vainillina, 4-hidroxibenzaldehído y siringaldehído, bajo el método descrito previamente, usando un detector de arreglo de fotodiodos (PDA) a 210 nm para el ácido acético y 280 nm para los demás compuestos. Se identificó la presencia de ácido acético y furfural en los hidrolizados, pero solamente fue posible determinar la concentración de ácido acético mediante una curva estándar (mM): 10, 15, 20, 25 y 30 (Anexo 7).

A la fracción sólida recuperada de la hidrólisis química con H₂SO₄ (FSPH) a partir del pretratamiento que permitió la mayor liberación de azúcares, se le determinó la fibra detergente neutra (FDN) y ácida (FDA) basado en metodología reportada por Vogel *et al.* (1999). La concentración de lignina, celulosa y hemicelulosa se obtuvieron según las Ecuaciones 1 y 2 (Luterbacher *et al.*, 2010), respectivamente. Los solubles se obtuvieron según la Ecuación 3

(Pernalete *et al.*, 2008). También se realizaron los mismos análisis al pericarpio de maíz lavado sin pretratamiento químico (PM).

$$\text{Celulosa (\%)} = \text{FDA (\%)} - \text{Lignina (\%)} \quad (1)$$

$$\text{Hemicelulosa (\%)} = \text{FDN (\%)} - \text{FDA (\%)} \quad (2)$$

$$\text{Solubles (\%)} = 100 - \text{FDN (\%)} \quad (3)$$

Además, se aplicó un análisis de microscopía electrónica de barrido (SEM) para evaluar los cambios microestructurales en el pericarpio de maíz pretratado y sin tratar, previamente secado, usando un microscopio Carl Zeiss modelo evo 50 (Alemania). Las muestras fueron puestas en una cinta de doble cara de carbono y recubiertas con una capa metálica de oro con el metalizador de vacío (6.7 Pa) (Denton vacuum, 40 mA/s); las micrografías se tomaron mediante un software ImageJ 1.50I (USA).

5.2. Determinación del efecto de complejos enzimáticos sobre la sacarificación de la fracción sólida de pericarpio de maíz pretratado químicamente

5.2.1. Enzima

Se utilizó la solución enzimática Cellic-CTec2 (Novozymes A/S, Bagsvaerd, Denmark), la cual contiene celulasas principalmente, además de β -glucosidasas y hemicelulasas.

5.2.2. Determinación de actividad enzimática

Se determinó la actividad enzimática de celulasas a Cellic-CTec2 mediante la metodología estándar de Ghose (1987), expresada como unidades de papel filtro (UPF), es decir, como la cantidad de enzima requerida para producir 2 mg de azúcares reductores a partir de 50 mg de papel filtro Whatman No. 4 y una solución amortiguadora de citrato de sodio 0.5 M (pH 4.8) en 1 h. Se realizó una curva estándar de glucosa (1-3.5 mg/0.5 mL) (Anexo 8), teniendo un blanco de sustrato y un blanco de enzima. Para calcular las UPF se usó la Ecuación 4.

$$UPF = \frac{0.37}{\text{Concentración enzima para liberar 2 mg de glucosa}} \text{ unidades/mL (4)}$$

El valor de 0.37 se deriva del factor de conversión de 2 mg de equivalentes de glucosa generados durante el ensayo a mmoles de glucosa. Se realizó la cuantificación de azúcares reductores por el método de DNS.

5.2.3. Hidrólisis enzimática

La fracción sólida del pericarpio de maíz hidrolizado (FSPH) resultante del pretratamiento ácido con mayores concentraciones de azúcares y mayores rendimientos fue sometida a hidrólisis enzimática utilizando la solución enzimática Cellic Ctec2. Se aplicó un diseño factorial 2² completamente aleatorizado, donde los factores fueron el tipo de material y la cantidad de sólidos (Cuadro 9). Los experimentos se realizaron por triplicado; se realizó análisis de varianza y comparación de medias por Tukey en el programa estadístico JMP. Los niveles evaluados fueron seleccionados con base la bibliografía (Caspeta *et al.*, 2014; Michelin y Teixeira, 2016).

Cuadro 9. Factores y niveles para tratamientos de hidrólisis enzimática.

Factores	Niveles	
Tipo de sólido	Pretratado (FSPH)	Sin pretratar (PM)
Cantidad de sólidos (% p/v)	5	7

Para remover sólidos solubles, la FSPH fue lavada con agua destilada hasta conseguir un agua de lavado transparente y se secó a 50 °C durante 12 h. Posteriormente, ambos materiales (FSPH y PM) fueron sometidos a hidrólisis enzimática, en matraces de 125 mL, con 30 mL de una solución amortiguadora de citrato 0.5 M (neutralizado con NaOH 1N), pH 4.8, 7 µL/mL de cicloheximida al 10 % (v/v) como agente antimicrobiano (Resch *et al.*, 2015) y una dosis enzimática de 40 UPF/g _{celulosa} (Auxenfans *et al.*, 2017). Los tratamientos se realizaron por triplicado (Cuadro 10). Las soluciones se incubaron a 50 °C y 150 rpm durante 96 h, muestreando 1 mL en los tiempos 0, 4, 8, 12, 24, 48, 72

y 96 h. Se inactivó la enzima a 100 °C durante 10 min, posteriormente las muestras se enfriaron en hielo hasta temperatura ambiente y se centrifugaron a 10,000 rpm por 15 min (De Almeida *et al.*, 2011; Caspeta *et al.*, 2014; Brar *et al.*, 2016).

Cuadro 10. Tratamientos hidrolisis enzimática de la fracción sólida de pericarpio de maíz pretratado con ácido sulfúrico (FSPH) y del pericarpio de maíz (PM) sin pretratar.

Tratamiento	Tipo de sólido	Cantidad de sólidos (% p/v)
1	FSPH	5
2	FSPH	7
3	PM	5
4	PM	7

Se determinó la concentración de azúcares reductores por DNS (Wood *et al.*, 2012), mediante una curva de calibración de glucosa (Anexo 9), glucosa a través del kit enzimático R-Biopharm en un espectrofotómetro Genesys 10S UV-Vis (THERMO SCIENTIFIC, EE. UU), y el porcentaje de conversión de celulosa a glucosa ($\text{g}_{\text{glucosa}}/100_{\text{glucano}}$), según la Ecuación 5 (Michelin y Teixeira, 2016).

$$\text{Conversión de celulosa (\%)} = CG \frac{V}{m \cdot C_{Gn}} * 100 \quad (5)$$

CG: Concentración de glucosa (g/L)

V: Volumen de hidrólisis (L)

m: Masa de sólido empleado en la hidrólisis (g)

C_{Gn} : Contenido de glucanos (celulosa) presente en el sólido empleado (g/g).

5.3. Establecimiento de los parámetros de fermentación del hidrolizado de pericarpio de maíz para la producción de etanol

5.3.1. Microorganismos

La fermentación de la fracción líquida del pericarpio de maíz pretratado se llevó a cabo con *Scheffersomyces stipitis* ATCC28217 y *Saccharomyces cerevisiae* Monastery Ale WLP500.

5.3.2. Activación de la cepa de levadura

Las conservas de levaduras de *S. cerevisiae* y *S. stipitis* almacenadas a -70 °C se activaron en caldo estéril de YPD para *S. cerevisiae* (g/L) (extracto de levadura (DIFCO): 10, peptona de caseína (DIFCO): 20, glucosa (SIGMA): 10) y YPX para *S. stipitis* (g/L) (extracto de levadura: 10, peptona de caseína: 20, xilosa (SIGMA): 10), el inóculo fue de 10 % v/v. Se incubaron a 30 °C durante 24 h a 180 rpm en una incubadora con agitación orbital INO 650V9 (PRENDO, México) (Granados, 2015).

5.3.3. Fermentación de la fracción líquida de pericarpio de maíz pretratado

5.3.3.1. Crecimiento de levaduras en hidrolizados ácidos de pericarpio de maíz

Se evaluó el crecimiento de *S. stipitis* y *S. cerevisiae* en FSPH sin destoxificar diluidos en agua destilada (1:2 p/v) y con hidrolizados previamente destoxificados con carbón activado (5:1 v/p) durante 10 min, las muestras de FSPH usadas se observan en el Cuadro 11. El pH de los hidrolizados se ajustó a 5.0 con NaOH y se enriquecieron con extracto de levadura (10 % p/v) y peptona de caseína (20 % p/v), y se esterilizaron por filtración en unidades swinnex-13 (Millipore) con membranas durapore tipo GVPP de 0.22 µm (Millipore). En cada pozo se pusieron 145 µL del hidrolizado y 5 µL de levadura con una densidad óptica (DO₆₀₀) de 0.3. La fermentación se llevó a cabo a 30 °C con agitación a 150 rpm durante 96 h. Se determinó el perfil de crecimiento de la levadura en los hidrolizados.

Cuadro 11. Condiciones de pretratamientos de hidrolizados ácidos de pericarpio de maíz usados para fermentación.

Tratamiento	Tipo de ácido	Concentración del ácido (% v/v)	Concentración de PM (% p/v)	Tiempo de pretratamiento (h)
1	H ₂ SO ₄	2	15	30
2	H ₂ SO ₄	2	15	60
3	H ₂ SO ₄	2	20	30
4	H ₂ SO ₄	2	20	60

5.3.3.2. Destoxificación de hidrolizados

La fracción líquida del pericarpio de maíz pretratado (FLPH) se destoxificó con carbón activado (C9157, Sigma) siguiendo la metodología descrita por Mateo (2013). La FLPH se llevó a pH 2 con NaOH y se mezcló con carbón activado al 2 % y 8 % p/v durante 30 min a 200 rpm y 30 °C; posteriormente se centrifugó a 5,000 rpm durante 10 min. Se determinó el índice R_{280} (Ecuación 6) por espectrofotometría a 280 nm, para conocer la efectividad del carbón activado sobre la remoción de inhibidores de fermentación. El índice R_{280} permite saber la efectividad aproximada del carbón activado en la remoción de furanos y compuestos fenólicos (Miyafuji *et al.*, 2003). También se determinó la concentración de azúcares reductores por DNS (Wood *et al.*, 2012).

$$R_{280} = \frac{\text{Absorbancia del hidrolizado tratado con carbón activado}}{\text{Absorbancia del hidrolizado sin tratar}} \quad (6)$$

5.3.3.3. Fermentación de la FLPH usando *S. stipitis*

Con base en los resultados de los pretratamientos y al perfil de crecimiento de *S. stipitis* en los hidrolizados, fue estudiada la fermentación del FLPH que presentó mayor concentración de azúcares y la FLPH que benefició en mayor medida el crecimiento de la levadura. Se aplicó un diseño factorial 2² completamente aleatorizado, por triplicado, donde los factores son el tipo de

pretratamiento y la concentración de carbón activado usado para destoxificar (Cuadro 12).

Cuadro 12. Factores y niveles evaluados sobre la fermentación de la fracción líquida de pericarpio de maíz pretratado.

Factores	Niveles	
	-1	1
Tipo de pretratamiento	a	b
Concentración de carbón activado usado para destoxificar (% p/v)	2	8

a H₂SO₄ al 2% (v/v), PM 15% (p/v) y 30 min de pretratamiento.

b H₂SO₄ al 2% (v/v), PM 20% (p/v) y 60 min de pretratamiento.

Se ajustó el pH de los hidrolizados a 5.0 con NaOH, se enriquecieron con 10 g/L de extracto de levadura y 20 g/L de peptona de caseína, y se esterilizaron por filtración en unidades swinnex-13 (Millipore Corporation, China) con membranas durapore tipo GVPP de 0.22 µm (Millipore Corporation, Irlanda); posteriormente fueron inoculados con 5% (v/v) de *S. stipitis* crecida en caldo YPX con una absorbancia (A_{600}) de 1.7.

La fermentación se realizó en matraces de 125 mL con un volumen final de 25 mL en una incubadora con agitación orbital INO 650V9 (Prendo, México) a 100 rpm y 30°C, durante 120 h. Se tomaron muestras en los tiempos 0, 12, 24, 48, 72, 96, y 120 h., a las cuales se les determinó la concentración de azúcares reductores (Wood *et al.*, 2012), glucosa, xilosa y etanol por HPLC (curvas de calibración en Anexo 10, 11 y Anexo 12), además de la biomasa producida, por diferencia de peso. Se calculó la eficiencia de la fermentación E_F (Ecuación 7), rendimiento producto/sustrato $Y_{P/S}$ (Ecuación 8), rendimiento biomasa/sustrato $Y_{X/S}$ (Ecuación 9), y la productividad volumétrica del consumo de azúcares reductores, glucosa, xilosa, y etanol (Ecuación 10); además, se determinó la velocidad específica de crecimiento de *S. stipitis* (Ecuación 11). Donde, R_{PS} teórico es el máximo rendimiento de etanol a partir de xilosa (principal constituyente de los hidrolizados ácidos de pericarpio de maíz fermentados), P_f

y P_i son la concentración final e inicial de etanol, respectivamente, S_f y S_i son la concentración de azúcares final e inicial consumidos para la producción máxima de etanol, t es el tiempo de fermentación donde se produjo la máxima concentración de etanol, μ es la tasa de crecimiento de la levadura, $\ln x_t$ y $\ln x_0$ son el logaritmo natural la biomasa para el tiempo de fermentación y la biomasa inicial, respectivamente.

$$E_F (g/g) = \frac{R_{PS}}{R_{PS \text{ teórico}}} \quad (7)$$

$$Y_{P/S} (g \text{ etanol}/g \text{ de azúcares consumidos}) = \frac{P_f - P_i}{S_i - S_f} \quad (8)$$

$$Y_{X/S} (g \text{ biomasa}/g \text{ azúcares reductores consumidos}) = \frac{B_f - B_i}{S_i - S_f} \quad (9)$$

$$P_{vol} (g/L * h) = \frac{(P_f - P_i) \text{ ó } (S_f - S_i)}{t} \quad (10)$$

$$\mu \left(\frac{g}{L} * h \right) = \frac{1}{x} * \frac{dx}{dt} = \frac{\ln x_t - \ln x_0}{\text{Tiempo de fermentación}} \quad (11)$$

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Composición química proximal del pericarpio de maíz

En el Cuadro 13 se presenta la composición proximal del PM; entre sus principales constituyentes se encontró la fibra detergente neutro (FDN) (66.84 %), que es una medida de la fibra insoluble total, cuyos componentes principales son la hemicelulosa, celulosa, lignina y algunas fracciones proteicas. Por su parte, la fibra detergente ácido (FDA) (17.97 %), representa a los componentes menos digestibles de las plantas, donde están incluidos la celulosa y lignina (IANR, 2017); también se encontró 10.86 % de proteína, 5.12 % de cenizas y una humedad de 4.43 %. Yoshida *et al.* (2012) y Díaz-Malvárez *et al.* (2013), reportan proporciones inferiores de proteína (5 y 5.47 %, respectivamente) y cenizas (1.1 y 0.8 %, respectivamente); estos últimos investigadores también encontraron mayor concentración de FDN (84.95 %) y FDA (20.70 %).

Cuadro 13. Composición proximal del PM.

Componente	Cantidad del componente (%)
Proteína cruda*	10.86
Cenizas*	05.19
Fibra detergente neutro*	66.84
Fibra detergente ácido*	17.97
Humedad	04.43

*Porcentaje en base seca.

6.2. Evaluación del efecto de pretratamientos ácidos sobre la producción de azúcares fermentables y la formación de inhibidores de fermentación en pericarpio de maíz

6.2.1. Pretratamientos ácidos

En el Cuadro 14 se presentan las concentraciones de xilosa y glucosa, así como sus rendimientos, encontrados en la FLPH con ácidos diluidos bajo diferentes condiciones. Se obtuvieron concentraciones de xilosa entre $1.20 \pm$

0.41 y 19.58 ± 2.61 g/L, con rendimientos que van desde 0.60 hasta 10.46 g xilosa por cada 100 gramos de PM. Las menores cantidades de xilosa (<5 g/L) y los menores rendimientos (<3 g/100 g _{pericarpio}) se encontraron en las fracciones líquidas del material tratado con ácido fosfórico. Las mayores concentraciones de xilosa se obtuvieron al pretratar PM (20 % p/v) con ácido sulfúrico al 2 % y 4 % (v/v) durante 60 min en autoclave (tratamientos 12 y 16), encontrándose 17.96 ± 2.46 y 19.58 ± 2.61 g/L, respectivamente. Sin embargo, los mayores rendimientos de xilosa se obtuvieron cuando se pretrató PM (15 % p/v) con ácido sulfúrico al 2 % (v/v) durante 30 y 60 min en autoclave (tratamientos 9 y 10), con 10.46 y 10.04 g de xilosa por cada 100 g de material.

En el caso de la glucosa, se obtuvieron concentraciones desde 2.69 ± 0.76 hasta 20.10 ± 0.43 g/L y rendimientos de 1.43 a 10.05 g/100 g PM. Al igual que para xilosa, los pretratamientos realizados con ácido fosfórico fueron los que arrojaron las menores concentraciones y rendimientos. El empleo de ácido sulfúrico al 4 % (v/v), con una carga de sólidos del 20 % (p/v) y un tiempo de pretratamiento de 30 y 60 min en autoclave permitió la mayor liberación de glucosa (17.89 ± 0.87 y 20.10 ± 0.43 g/L, respectivamente); siendo éste último el de mejor rendimiento.

La concentración de glucosa obtenida para el PM pretratado con ácido fosfórico es similares a los reportados en otros estudios para algunas biomásas. Por ejemplo, Gámez *et al.* (2006) obtuvieron 3.0 g _{glucosa}/L cuando pretrataron bagazo de caña con H₃PO₄ (4 % v/v) a 121 °C durante tiempos más prolongados a los evaluados (300 min). Sin embargo, bajo estas mismas condiciones obtuvieron 17.6 g _{xilosa}/L, concentración muy por encima de la obtenida en este trabajo. Por su parte, Vázquez *et al.* (2007) pretrataron paja de sorgo con H₃PO₄ (4 % v/v) a 134 °C durante 300 min y obtuvieron concentraciones de 4 g _{xilosa}/L y 2.9 g _{glucosa}/L, valores similares a los obtenidos en este estudio, aunque con condiciones de pretratamiento más severas a las usadas en esta investigación.

Cuadro 14. Concentración de glucosa y xilosa presente en la fracción líquida de pericarpio de maíz pretratado y rendimientos. Los resultados se expresan como la media \pm DE.

Tto	Tipo ácido	Ácido (%)	PM (%)	t Tto (min)	Xilosa (g/L)	R de xilosa (g/100 g PM)	Glucosa (g/L)	R de glucosa (g/100 g PM)
1	H ₃ PO ₄	2	15	30	1.80 \pm 0.42	1.20	3.03 \pm 0.49	2.02
2	H ₃ PO ₄	2	15	60	1.73 \pm 0.59	1.15	2.90 \pm 1.17	1.93
3	H ₃ PO ₄	2	20	30	1.20 \pm 0.41	0.60	2.87 \pm 0.24	1.43
4	H ₃ PO ₄	2	20	60	1.50 \pm 0.45	0.75	3.29 \pm 1.05	1.64
5	H ₃ PO ₄	4	15	30	4.14 \pm 0.70	2.76	3.41 \pm 0.55	2.27
6	H ₃ PO ₄	4	15	60	3.37 \pm 1.44	2.25	2.69 \pm 0.76	1.80
7	H ₃ PO ₄	4	20	30	3.38 \pm 0.87	1.69	4.05 \pm 0.65	2.02
8	H ₃ PO ₄	4	20	60	4.36 \pm 0.53	2.18	4.60 \pm 0.39	2.30
9	H ₂ SO ₄	2	15	30	15.69 \pm 1.59	10.46	12.44 \pm 1.26	8.29
10	H ₂ SO ₄	2	15	60	15.06 \pm 1.55	10.04	12.54 \pm 1.65	8.36
11	H ₂ SO ₄	2	20	30	15.68 \pm 0.66	7.84	11.76 \pm 1.75	5.88
12	H ₂ SO ₄	2	20	60	17.96 \pm 2.46	8.98	11.88 \pm 2.20	5.94
13	H ₂ SO ₄	4	15	30	13.82 \pm 0.26	9.21	13.51 \pm 0.87	9.01
14	H ₂ SO ₄	4	15	60	14.20 \pm 1.33	9.47	14.06 \pm 0.63	9.37
15	H ₂ SO ₄	4	20	30	16.02 \pm 3.13	8.01	17.89 \pm 0.87	8.95
16	H ₂ SO ₄	4	20	60	19.58 \pm 2.61	9.79	20.10 \pm 0.43	10.05

Tto: Número de tratamiento.

t Tto: Tiempo de tratamiento

R: Rendimiento.

Los resultados obtenidos evidenciaron que el ácido sulfúrico es más efectivo que el ácido fosfórico para pretratar PM. Lo anterior concuerda con lo reportado por Um *et al.* (2003), donde después de pretratar rastrojo de maíz (2-5% p/v) a 121 °C durante 30-120 min, con estos ácidos diluidos, encontraron que el H₂SO₄ incrementa significativamente las concentraciones de glucosa y xilosa comparado con H₃PO₄. En otro estudio comparativo, donde se pretrató bagazo de caña de azúcar (1% p/p) con H₃PO₄ y H₂SO₄ (2% v/v) a 160 °C por 10 min, Geddes *et al.* (2010), obtuvieron un efecto similar para ambos ácidos.

En el Cuadro 15 presenta el análisis de varianza para los factores analizados y sus interacciones sobre la liberación de xilosa. Se obtuvo un efecto significativo

del tipo de ácido ($p < 0.0001$), la concentración de PM ($p = 0.0216$), las interacciones tipo de ácido*concentración del ácido ($p = 0.0153$), tiempo de tratamiento en autoclave*concentración de PM ($p = 0.0405$) y tipo de ácido*concentración de PM ($p = 0.0106$) Debido a que los factores individuales que resultaron ser significativos están en las interacciones dobles que también lo fueron, se analizarán estas últimas.

Cuadro 15. Análisis de varianza de los factores estudiados y sus interacciones sobre la liberación de xilosa.

Factores	Nparm	gl	gld	Valor de la razón F	Prob > F
Tiempo de tratamiento en autoclave	1	1	4.113	3.3921	0.1373
Tipo de ácido	1	1	27.5	735.8827	<.0001*
Tiempo de tratamiento en autoclave*Tipo de ácido	1	1	27.5	1.4446	0.2396
Concentración del ácido	1	1	27.5	3.9627	0.0565
Tiempo de tratamiento en autoclave*Concentración del ácido	1	1	27.5	0.4573	0.5045
Tipo de ácido*Concentración del ácido	1	1	27.5	6.6868	0.0153*
Tiempo de tratamiento en autoclave*Tipo de ácido*Concentración del ácido	1	1	27.5	0.4785	0.4949
Concentración de PM	1	1	27.5	5.9300	0.0216*
Tiempo de tratamiento en autoclave*Concentración de PM	1	1	27.5	4.6227	0.0405*
Tipo de ácido*Concentración de PM	1	1	27.5	7.5273	0.0106*
Tiempo de tratamiento en autoclave*Tipo de ácido*Concentración de PM	1	1	27.5	1.1352	0.2959
Concentración del ácido*Concentración de PM	1	1	27.5	2.3256	0.1387
Tiempo de tratamiento en autoclave*Concentración del ácido*Concentración de PM	1	1	27.5	0.1225	0.7291
Tipo de ácido*Concentración del ácido*Concentración de PM	1	1	27.5	0.9706	0.3331
Tiempo de tratamiento en autoclave*Tipo de ácido*Concentración del ácido*Concentración de PM	1	1	27.5	0.1201	0.7315

*La información señalada en negrita hace referencia los factores y/o interacciones que resultaron significativas.

Nparm: Número de parámetros.

gl: Grados de libertad

gld: Grados de libertad del denominador.

En la interacción tipo de ácido*concentración de ácido (Figura 12) se observó que hay un mayor efecto del ácido sulfúrico sobre la liberación de xilosa en comparación con el ácido fosfórico, no encontrándose diferencias al variar las

concentraciones del ácido para el primer caso (ácido sulfúrico), mientras que para el fosfórico se evidenció mayor efecto al trabajar con éste al 4 %.

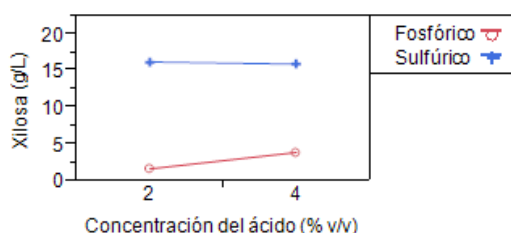


Figura 12. Efecto de la interacción tipo de ácido*concentración de ácido sobre la liberación de xilosa.

En el caso de la interacción entre tiempo de tratamiento en autoclave* concentración de PM (Figura 13), pretratar 15 % de PM durante 30 y 60 min tiene el mismo efecto sobre la liberación de xilosa. Para un 20 % de PM, la mayor liberación de éste azúcar se observa al pretratar durante 60 min. No se observaron diferencias al pretratar 15 % y 20 % de PM por 30 min.

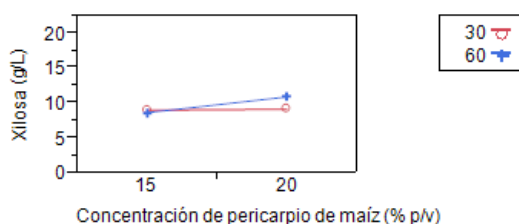


Figura 13. Efecto de la interacción tiempo de tratamiento en autoclave* concentración de PM sobre la liberación de xilosa.

En cuanto a la interacción tipo de ácido*concentración de pericarpio de maíz (Figura 14), el ácido sulfúrico presentó el mayor efecto sobre la liberación de xilosa, permitiendo obtener la mayor concentración cuando se pretrató 20 % de PM. En el caso del ácido fosfórico, este tiene el mismo efecto independientemente de la concentración de PM usado.

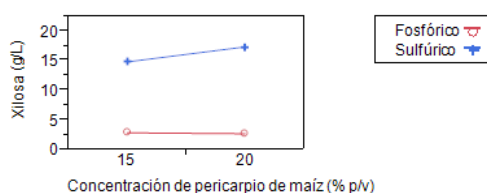


Figura 14. Efecto de la interacción tipo de ácido* concentración de PM sobre la liberación de xilosa.

Los factores tipo de ácido ($p < 0.0001$), concentración de ácido ($p < 0.0001$) y concentración de PM ($p < 0.0001$) mostraron un efecto significativo sobre la liberación de glucosa, al igual que las interacciones tipo de ácido*concentración de ácido ($p < 0.0001$), tipo de ácido*concentración de PM ($p = 0.0231$), concentración de ácido* concentración de PM ($p < 0.0001$), y tipo de ácido*concentración del ácido*concentración de PM ($p = 0.0012$) (Cuadro 16). Por ser esta última una interacción triple (efecto de un mayor número de factores), es la que se analizará a continuación.

Cuadro 16. Análisis de varianza para factores estudiados y sus interacciones sobre la liberación de glucosa.

Factores	Nparm	gl	gld	Valor de la razón F	Prob > F
Tiempo de tratamiento en autoclave	1	1	4.252	2.2102	0.2072
Tipo de ácido	1	1	27.6	1110.295	<.0001*
Tiempo de tratamiento en autoclave*Tipo de ácido	1	1	27.6	1.1609	0.2906
Concentración del ácido	1	1	27.6	56.1212	<.0001*
Tiempo de tratamiento en autoclave*Concentración del ácido	1	1	27.6	0.6367	0.4317
Tipo de ácido*Concentración del ácido	1	1	27.6	29.5974	<.0001*
Tiempo de tratamiento en autoclave*Tipo de ácido*Concentración del ácido	1	1	27.6	1.2778	0.2680
Concentración de PM	1	1	27.6	20.5431	0.0001*
Tiempo de tratamiento en autoclave*Concentración de PM	1	1	27.6	1.7904	0.1918
Tipo de ácido*Concentración de PM	1	1	27.6	5.7856	0.0231*
Tiempo de tratamiento en autoclave *Tipo de ácido*Concentración de PM	1	1	27.6	0.0032	0.9551
Concentración del ácido*Concentración de PM	1	1	27.6	28.8484	<.0001*
Tiempo de tratamiento en autoclave *Concentración del ácido*Concentración de PM	1	1	27.6	0.8258	0.3713
Tipo de ácido*Concentración del ácido*Concentración de PM	1	1	27.6	12.9231	0.0012*
Tiempo de tratamiento en autoclave *Tipo de ácido*Concentración del ácido*Concentración de PM	1	1	27.6	0.1200	0.7317

*La información señalada en negrita hace referencia los factores y/o interacciones que resultaron significativas.

Nparm: Número de parámetros.

gl: Grados de libertad

gld: Grados de libertad del denominador.

En la Figura 15 se presenta el efecto de la interacción de los factores tipo de concentración, concentración del ácido y de PM. En el caso del ácido fosfórico, cuando se trabajó al 2 % (v/v) no se evidenciaron diferencias de su efecto entre

las concentraciones de PM manejadas, tampoco con 4 % del ácido y 15 % de PM. El mayor efecto se observó al pretratar 20 % de PM con este ácido al 4 %. Sin embargo, los mayores efectos sobre la liberación de glucosa tras los pretratamientos se obtuvieron usando ácido sulfúrico, encontrándose concentraciones más altas de este azúcar cuando se pretrató con H₂SO₄ al 2 % y 15 % PM. La mayor liberación de glucosa se obtuvo con PM al 20 % y H₂SO₄ al 4 %.

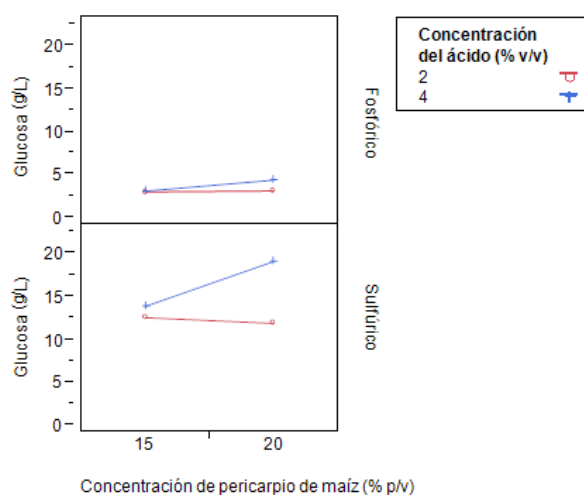


Figura 15. Efecto de la interacción tipo de ácido*concentración del ácido*concentración de pericarpio de maíz sobre la liberación de glucosa.

6.2.2. Pretratamientos con ácido sulfúrico y pericarpio de maíz lavado

Análisis de la fracción líquida

a. Determinación de azúcares reductores

Los tratamientos ácidos permitieron la hidrólisis del PM y con ello la liberación de azúcares reductores encontrándose desde 67.570 ± 8.677 hasta 109.387 ± 6.738 g/L, con rendimientos que van desde 44.673 ± 2.983 hasta 60.421 ± 4.328 g/100 g PM (Cuadro 17). Los pretratamientos de PM (20 % p/v) con H₂SO₄ al 2 % por 30 y 60 min (tratamientos 2 y 6) permitieron una mejor hidrólisis del PM, lo que se vio reflejado en la liberación de concentraciones mayores de azúcares reductores, en comparación con los otros tratamientos, con 109.387 ± 6.738 y 102.848 ± 5.310 g/L, respectivamente. El empleo de H₂SO₄ al 2 % sobre 15 % de PM y 60 min de reacción en autoclave generó la

menor liberación de azúcares (67.570 ± 8.677 g/L). Los mayores rendimientos se alcanzaron al pretratar 15 % de pericarpio con H₂SO₄ al 2 y 4 % (p/v), por 30 y 60 min, respectivamente (tratamientos 1 y 7). Granados *et al.* (2017), pretrataron PM (20 % p/v) con H₂SO₄ al 3.37 % (v/v) durante 22.3 min a 121 °C y obtuvieron 78.9 ± 1.9 g azúcares reductores/L y un rendimiento de 68.8 g/100 g PM, concentración inferior y rendimiento superior a los obtenidos en este trabajo, usando igual cantidad de PM con H₂SO₄ al 2 y 4 % (p/v), aunque en este caso el mayor tiempo de reacción pudo haber permitido la mayor liberación de los azúcares. Por su lado, Saha y Bothast (1999) pretrataron fibras de maíz (15 % p/v) con H₂SO₄ al 0.5, 0.75 y 1 % (v/v) a 121 °C durante 15-60 min y encontraron que a tiempos prolongados y mayores concentraciones de ácido se favorece la liberación de azúcares con un rendimiento máximo de 70.3 g/100 g biomasa, siendo 28.5 % más que el rendimiento usando PM (20 % p/v) con H₂SO₄ al 2 %, por 30 min, 121 °C.

Cuadro 17. Concentración de azúcares reductores y rendimientos determinados para los hidrolizados ácidos de PM.

Tto	Azúcares reductores (g/L)	Rendimiento de azúcares reductores (g/100 g PM)
1	88.841 ± 7.703	59.228 ± 5.136
2	109.388 ± 6.738	54.694 ± 3.369
3	88.002 ± 7.930	58.668 ± 5.287
4	89.345 ± 5.967	44.673 ± 2.983
5	67.570 ± 8.677	45.047 ± 5.784
6	102.848 ± 5.310	51.424 ± 2.655
7	90.631 ± 6.492	60.421 ± 4.328
8	93.087 ± 6.853	46.544 ± 3.427

Tratamiento (Tto): (1) H₂SO₄ 2 %, 15 % PM, 30 min en autoclave; (2) H₂SO₄ 2 %, 20 % PM, 30 min en autoclave; (3) H₂SO₄ 4 %, 15 % PM, 30 min en autoclave; (4) H₂SO₄ 4 %, 20 % PM, 30 min en autoclave; (5) H₂SO₄ 2 %, 15 % PM, 60 min en autoclave; (6) H₂SO₄ 2 %, 20 % PM, 60 min en autoclave; (7) H₂SO₄ 4 %, 15 % PM, 60 min en autoclave; (8) H₂SO₄ 4 %, 20 % PM, 60 min en autoclave. La información señalada en negrita corresponde a los tratamientos donde se obtuvieron las mayores concentraciones de azúcares reductores.

b. Identificación de la presencia de azúcares en hidrolizados de PM

Se determinaron los tiempos de retención para glucosa, xilosa, galactosa, manosa, fructosa y arabinosa, maltosa y celobiosa con la finalidad de

determinar posteriormente la presencia de éstos en la FLPH (Cuadro 18). Se detectó la presencia de: xilosa, arabinosa y glucosa (Anexo 13).

Cuadro 18. Tiempos de retención para carbohidratos a determinar en hidrolizados de PM

Carbohidrato	Tiempo de retención (min)	Carbohidrato identificado en las FLPH
Maltosa	10.164	ND
Celobiosa	10.471	ND
Glucosa	12.532	D
Xilosa	13.485	D
Galactosa	13.566	ND
Manosa	13.86	ND
Fructosa	14.105	ND
Arabinosa	14.723	D

D: Detectado; ND: No detectado.

En la Figura 16 se presentan las concentraciones medias de los azúcares identificados en los hidrolizados ácidos de pericarpio de maíz. El monosacárido más abundante encontrado en la FLPH fue la xilosa, donde se obtuvieron concentraciones de 21.620 ± 0.230 a 29.871 ± 0.856 g/L, seguido de arabinosa (10.440 ± 0.345 a 13.908 ± 0.382 g/L) y finalmente glucosa (6.55 ± 0.097 a 9.192 ± 0.336 g/L). La presencia mayoritaria de xilosa y arabinosa en la FLPH se debe a que el ácido diluido cataliza la degradación de hemicelulosa a altas temperaturas con bajos tiempos de reacción (Chandel *et al.*, 2012). Usando concentraciones menores de H₂SO₄ (1.85 %) a baja temperatura (90 °C) y por un largo periodo (18 h). Nigam (2001), pretrató paja de trigo obteniendo concentraciones de xilosa, glucosa y arabinosa inferiores a las determinadas en este estudio, teniendo 12.8, 1.7 y 2.6 g/L, respectivamente. Por otro lado, Baek y Kwon (2007) pretrataron paja de arroz con H₂SO₄ (1.5 %) a 130 °C durante 10 min, obteniendo concentraciones de xilosa, glucosa y arabinosa de 17.2, 4.3 y 3.3 g/L, respectivamente, de igual manera menores a las encontradas en este estudio. Al pretratar rastrojo de maíz con H₂SO₄ al 2.13 %, a 121 °C durante 180 min, Cao *et al.* (2009) encontraron concentraciones de 9.09, 2.13 y 1.01 g/L de xilosa, glucosa y arabinosa, respectivamente. Por su parte, las concentraciones de xilosa y arabinosa obtenidas por Carvalheiro *et*

al. (2004) al pretratar granos gastados de una cervecera con H₂SO₄ (3 %) a 130 °C durante 15 min están en el rango de concentraciones obtenidas, siendo 26.7 g xilosa/L y 12.8 g arabinosa/L; sin embargo la cantidad de glucosa es mucho menor a la encontrada en este estudio (4 g/L). Por su parte Granados *et al.* (2017) obtuvieron una mayor concentración de glucosa (11.7 ± 0.8 g/L) pretratando PM con H₂SO₄ al 3.37 %.

El tratamiento 6 (H₂SO₄ al 2 %, 20 % de pericarpio de maíz y 60 min de pretratamiento en autoclave) fue el que permitió la mayor hidrólisis del PM y con ello la mayor liberación de azúcares, con rendimientos de 0.149 ± 0.004 g xilosa/g PM, 0.070 ± 0.002 g arabinosa/g PM y 0.046 ± 0.002 g glucosa/g PM.

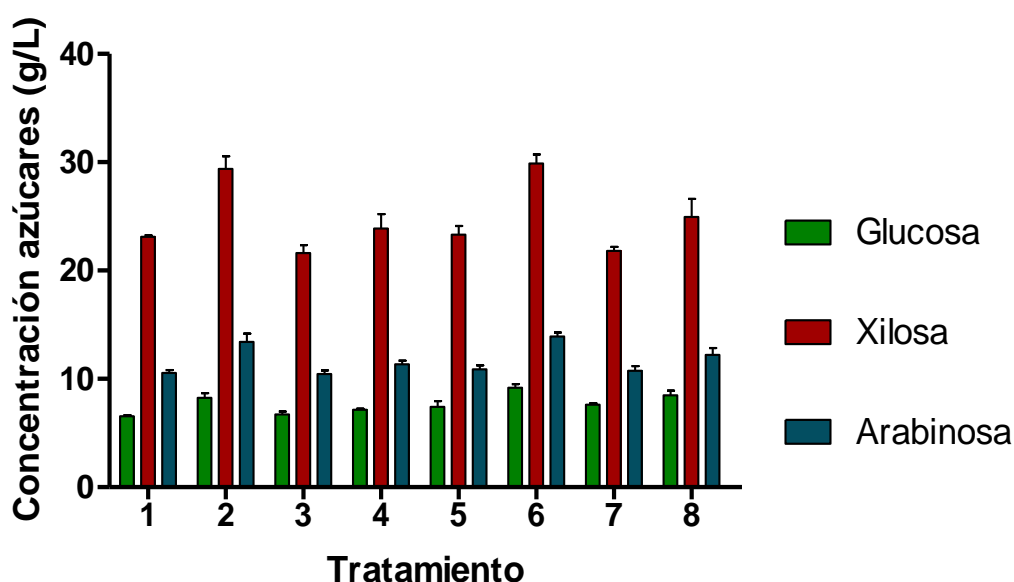


Figura 16. Concentración de glucosa, xilosa arabinosa presente en los hidrolizados ácidos de pericarpio de maíz. (1) H₂SO₄ 2 %, 15 % PM, 30 min en autoclave; (2) H₂SO₄ 2 %, 20 % PM, 30 min en autoclave; (3) H₂SO₄ 4 %, 15 % PM, 30 min en autoclave; (4) H₂SO₄ 4 %, 20 % PM, 30 min en autoclave; (5) H₂SO₄ 2 %, 15 % PM, 60 min en autoclave; (6) H₂SO₄ 2 %, 20 % PM, 60 min en autoclave; (7) H₂SO₄ 4 %, 15 % PM, 60 min en autoclave; (8) H₂SO₄ 4 %, 20 % PM, 60 min en autoclave. Los resultados se expresan como la media de tres réplicas ± DE.

- **Efecto de los pretratamientos ácidos sobre la liberación de glucosa**

En el Cuadro 19 se presenta la estimación de componentes de varianza, donde se muestra que la parcela (tiempo de pretratamiento en autoclave) representa un 7.577 % del error experimental. En el análisis de varianza de los factores evaluados y sus interacciones sobre la liberación de glucosa (Cuadro 20) se

presentan en negrita los factores e interacciones que resultaron significativas, encontrándose que el tiempo de pretratamiento en autoclave ($p=0.026$), la concentración de PM ($p=0.0004$) y la interacción concentración de ácido*concentración de PM ($p=0.006$), tienen un efecto significativo sobre la cantidad de glucosa liberada tras la aplicación de los pretratamientos ácidos.

Cuadro 19. Estimación de componentes de varianza por máxima probabilidad residual (REML) para glucosa.

Efecto aleatorio	Relación de varianza	Componente de varianza	Error estándar	Límite de confianza inferior del 95 %	Límite de confianza superior del 95 %	Porcentaje del total
Parcela	0.0820	0.0210	0.0657	-0.1078	0.1498	7.577
Residual		0.2561	0.1076	0.1296	0.7236	92.423
Total		0.2771	0.1019	0.1507	0.6689	100.000

R^2 : 0.808
 $R^2_{ajustado}$: 0.718

Cuadro 20. Análisis de varianza para los factores evaluados y sus interacciones sobre la liberación de glucosa, usando el diseño de parcelas divididas.

Fuente de variación	Nparm	gl	gld	Razón F	Valor p
Tiempo de pretratamiento en autoclave	1	1	4.256	11.203	0.026*
Concentración de ácido	1	1	11.61	0.677	0.427
Tiempo de pretratamiento en autoclave*Concentración de ácido	1	1	11.61	0.035	0.855
Concentración de PM	1	1	11.61	23.730	0.0004*
Tiempo de pretratamiento en autoclave*Concentración de PM	1	1	11.61	2.080	0.176
Concentración de ácido*Concentración de PM	1	1	11.61	11.499	0.006*
Tiempo de pretratamiento en autoclave*Concentración de ácido*Concentración de PM	1	1	11.61	1.224	0.291

*La información señalada en negrita hace referencia los factores y/o interacciones que resultaron significativas.

Nparm: Número de parámetros.

gl: Grados de libertad

gld: Grados de libertad del denominador.

- **Efecto del tiempo de pretratamiento en autoclave**

El efecto del tiempo de pretratamiento en autoclave sobre la liberación de glucosa en la FLPH se muestra en la Figura 17, en la cual se observa que con

pretratamientos ácidos de 60 min en autoclave se obtiene la mayor concentración de glucosa (8.160 ± 0.168 g/L).

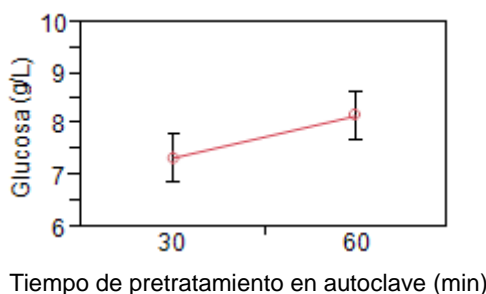


Figura 17. Efecto del tiempo de pretratamiento en autoclave sobre la liberación de glucosa en hidrolizados ácidos de pericarpio de maíz.

- **Efecto de la interacción concentración de ácido*concentración de PM**

En la Figura 18 se presenta el efecto de la interacción concentración de ácido*concentración de pericarpio de maíz sobre la liberación de glucosa en hidrolizados ácidos, donde se observa que al pretratar 15 % de pericarpio de maíz con ácido sulfúrico al 4 % se obtiene una concentración mayor de glucosa (7.820 ± 0.245 g/L) que al usar el ácido al 2 % (6.951 ± 0.215 g/L); pero al pretratar 20 % de pericarpio, la mayor cantidad de glucosa se obtiene cuando se utiliza ácido al 2 % (8.726 ± 0.215 g/L), siendo esta condición la que más favorece la liberación de este carbohidrato.

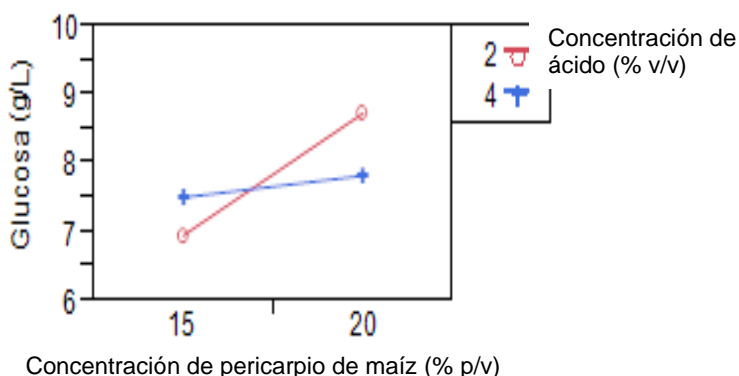


Figura 18. Efecto de la interacción concentración de ácido*concentración de pericarpio de maíz.

- **Efecto de los pretratamientos ácidos sobre la liberación de xilosa**

Para la variable de respuesta xilosa, no se encontró aporte de la parcela (tiempo de pretratamiento en autoclave) al error experimental (Cuadro 21). El análisis de varianza se muestra en el Cuadro 22 y se presentan en negrita los factores e interacciones que resultaron significativos, donde los factores concentración de ácido ($p < .0001$) y concentración de PM ($p < .0001$), así como su interacción tienen un efecto importante sobre la xilosa liberada ($p = 0.0010$). Los factores individuales significativos forman parte de la interacción que mostró significancia, por lo cual se analiza únicamente esta última.

Cuadro 21. Estimación de componentes de varianza por máxima probabilidad residual (REML) para xilosa.

Efecto aleatorio	Relación de varianza	Componente de varianza	Error estándar	Límite de confianza inferior del 95 %	Límite de confianza superior del 95 %	Porcentaje del total
Parcela	-0.0621	-0.0631	0.1719	-0.3999	0.2736	0.000
Residual		1.0170	0.4246	0.5163	2.8532	100.000
Total		1.0170	0.4248	0.5163	2.8532	100.000

R^2 : 0.928
 $R^2_{ajustado}$: 0.894

Cuadro 22. Análisis de varianza para los factores evaluados y sus interacciones sobre la liberación de xilosa.

Fuente de variación	Nparm	gl	gld	Razón F	Valor p
Tiempo de pretratamiento en autoclave	1	1	4.255	1.7426	0.2534
Concentración de ácido	1	1	11.83	61.9299	<.0001*
Tiempo de pretratamiento en autoclave*Concentración de ácido	1	1	11.83	0.1092	0.7468
Concentración de PM	1	1	11.83	113.7432	<.0001*
Tiempo de pretratamiento en autoclave*Concentración de PM	1	1	11.83	0.4449	0.5176
Concentración de ácido*Concentración de PM	1	1	11.83	19.0367	0.0010*
Tiempo de pretratamiento en autoclave*Concentración de ácido*Concentración de PM	1	1	11.83	0.1287	0.7261

*La información señalada en negrita hace referencia los factores y/o interacciones que resultaron significativas.

Nparm: Número de parámetros.

gl: Grados de libertad

gld: Grados de libertad del denominador.

- **Efecto de la interacción concentración de ácido*concentración de PM**

Al pretratar PM al 15 o 20 % con ácido sulfúrico al 2 % se obtienen las mayores concentraciones de xilosa (23.215 ± 0.399 y 29.628 ± 0.399 g/L, respectivamente) comparado con ácido al 4 % para ambas concentraciones de PM; siendo el pretratamiento con ácido sulfúrico al 2 % sobre 20 % de PM, el que más favorece la liberación de xilosa (Figura 19).

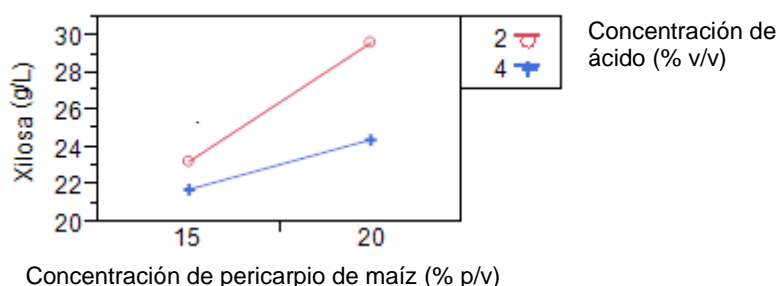


Figura 19. Efecto de la interacción concentración de ácido*concentración de pericarpio de maíz.

- **Efecto de los pretratamientos ácidos sobre la liberación de arabinosa**

La parcela (tiempo de pretratamiento en autoclave) tiene una incidencia del 37.067 % sobre el error experimental (Cuadro 23). Los factores y sus interacciones que resultaron significativos para la liberación de arabinosa fueron la concentración de ácido ($p=0.003$) y concentración de PM ($p<.0001$) y se presentan en negrita (Cuadro 24).

Cuadro 23. Estimación de componentes de varianza por máxima probabilidad residual (REML) para arabinosa.

Efecto aleatorio	Relación de varianza	Componente de varianza	Error estándar	Límite de confianza inferior del 95 %	Límite de confianza superior del 95 %	Porcentaje del total
Parcela	0.5890	0.2661	0.2720	-0.2670	0.7993	37.067
Residual		0.4519	0.1845	0.2324	1.2313	62.933
Total		0.7180	0.3017	0.3633	2.0298	100.000
R²: 0.868						
R²_{ajustado}: 0.810						

Cuadro 24. Análisis de varianza para los factores evaluados y sus interacciones sobre la liberación de arabinosa.

Fuente de variación	Nparm	gl	gld	Razón F	Valor p
Tiempo de pretratamiento en autoclave	1	1	4	0.035	0.860
Concentración de ácido	1	1	12	14.304	0.003*
Tiempo de pretratamiento en autoclave*Concentración de ácido	1	1	12	0.174	0.684
Concentración de PM	1	1	12	55.107	<.0001*
Tiempo de pretratamiento en autoclave*Concentración de PM	1	1	12	0.522	0.484
Concentración de ácido*Concentración de PM	1	1	12	3.009	0.108
Tiempo de pretratamiento en autoclave*Concentración de ácido*Concentración de PM	1	1	12	1.179	0.299

*La información señalada en negrita hace referencia los factores y/o interacciones que resultaron significativas.

Nparm: Número de parámetros.

gl: Grados de libertad

gld: Grados de libertad del denominador.

- **Efecto de la concentración de ácido**

En la Figura 20 se muestra el efecto de la concentración de ácido sobre la liberación de arabinosa. Aunque no se observan diferencias entre los niveles de concentración de ácido, se obtiene mayor cantidad de xilosa al pretratar pericarpio de maíz con ácido sulfúrico al 2 % (12.413 ± 0.286 g/L).

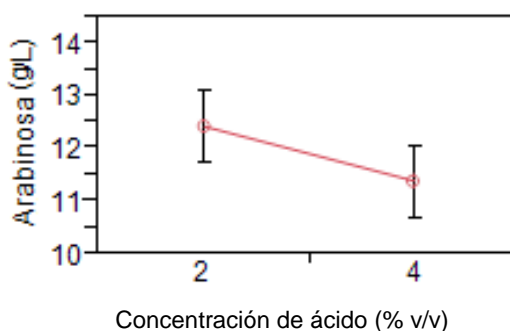


Figura 20. Efecto de la concentración de ácido sobre la liberación de arabinosa en hidrolizados ácidos de pericarpio de maíz.

- **Efecto de la concentración de pericarpio de maíz**

El efecto de la concentración de pericarpio de maíz se presenta en la Figura 21. Se evidenció diferencias entre los niveles evaluados para este factor,

encontrándose que al usar un 20 % de pericarpio de maíz, se obtiene la mayor cantidad de arabinosa (12.913 ± 0.286 g/L).

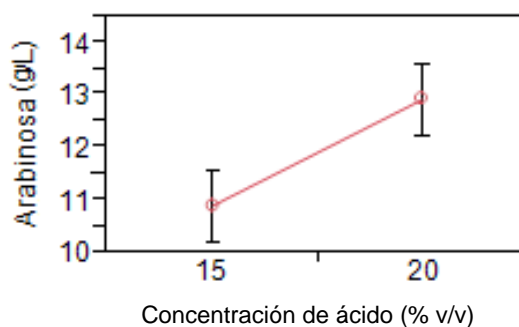


Figura 21. Efecto de la concentración de pericarpio de maíz sobre la liberación de arabinosa en hidrolizados ácidos de pericarpio de maíz.

- **Efecto de la concentración de ácido**

El efecto de la interacción concentración de ácido*concentración de pericarpio de maíz sobre la liberación de arabinosa en hidrolizados ácidos se muestra en la Figura 22. Aunque la prueba de efecto fijo no señaló diferencias significativas para la interacción entre los niveles evaluados de los factores (valor de $p=0.1084$), se analiza esta debido a que ambos factores individuales tuvieron efecto significativo sobre la concentración de arabinosa liberada durante los pretratamientos. Se observan diferencias significativas entre todas las interacciones, donde, independientemente de la concentración del ácido, las mayores cantidades de arabinosa se obtuvieron cuando se pretrató 20 % de pericarpio de maíz, siendo el mejor tratamiento el que combina ácido sulfúrico al 2 % y 20 % de material lignocelulósico, con el cual se liberaron 13.670 g/L de arabinosa.

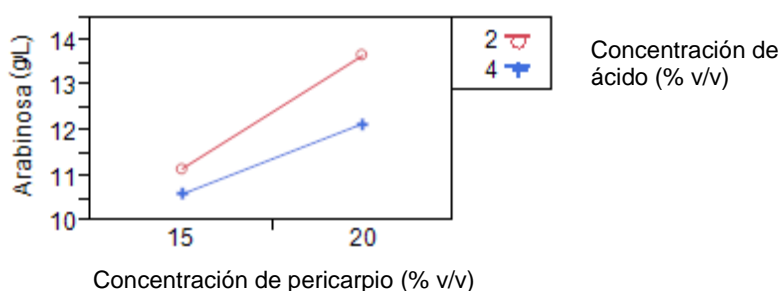


Figura 22. Efecto de la interacción concentración de ácido*concentración de pericarpio de maíz sobre la liberación de arabinosa en hidrolizados ácidos.

Los análisis estadísticos sugieren que la mejor condición para pretratar pericarpio de maíz que permita la mayor liberación de glucosa, xilosa y arabinosa es el uso de ácido sulfúrico al 2 % sobre 20 % de biomasa, independientemente del tiempo, sin embargo, se observó que con 60 min de tratamiento en autoclave, es posible obtener para concentraciones más altas de estos azúcares. Hsu *et al.* (2010), reportan que entre la concentración del ácido diluido, la temperatura y el tiempo de reacción, la variación de este último mostró la mayor sensibilidad sobre la liberación de azúcares.

c. Identificación de la formación de productos de degradación durante pretratamientos ácidos de pericarpio de maíz

Se determinaron los tiempos de retención de los productos de degradación de pretratamientos: ácido acético, furfural, hidroximetilfurfural, vainillina, 4-hidroxibenzaldehído y siringaldehído para posteriormente comprobar la presencia de éstos en la FLPH (Cuadro 25). Bajo las condiciones en que se realizó el análisis de estos compuestos por UPLC, se determinaron según los tiempos de aparición de los picos en cromatogramas de la FLPH, que los productos de degradación formados durante la hidrólisis ácida de la biomasa fueron ácido acético y furfural, debido a los límites de detección del equipo, de estos dos solamente fue posible determinar la concentración de ácido acético en los hidrolizados (Anexo 14). El ácido acético es liberado de grupos acetilos de la hemicelulosa y el furfural es producto de la degradación de pentosas (Almeida *et al.*, 2007). Diversos estudios donde se empleó H₂SO₄ diluido reportaron la generación de estos compuestos, por ejemplo, Gonzales *et al.* (2016), encontraron furfural al pretratar biomasa con H₂SO₄ al 5 % (v/v), 10 % sólidos (p/v) y 121 °C; Nigam (2001), Carvalheiro *et al.* (2004), Baek y Kwon (2007) y Cao *et al.* (2009), reportan la degradación de azúcares a este compuesto en diferentes biomásas, obteniendo valores inferiores a 1 g/L. Estos inhibidores proporcionan ambientes estresantes para los microorganismos fermentativos, conduciendo a una menor utilización de azúcares y baja eficiencia de la fermentación (Gonzales *et al.*, 2016).

Cuadro 25. Tiempos de retención para productos de degradación a evaluar en FLPH.

Compuesto	Tiempo de retención (min)	Producto de degradación identificado en las FLPH
Vainillina	18.582	ND
4-		ND
Hidroxibenzaldehído	20.841	
Ácido acético	21.732	D
Hidroximetilfurfural	29.295	ND
Furfural	42.897	D

D: Detectado; ND: No detectado.

En la Figura 23 se presentan las concentraciones de ácido acético que se formó durante la aplicación de los pretratamientos con ácido sulfúrico a PM. Se encontraron cantidades de ácido acético que van de 2.105 ± 0.096 (tratamiento 3) hasta 3.311 ± 0.035 g/L (tratamiento 2); concentración similar, 2.7 g ácido acético/L, obtuvo Nigam (2001), al pretratar paja de trigo con H_2SO_4 al 1.85 %; mientras que Cao *et al.* (2009) y Carvalheiro *et al.* (2004), obtuvieron concentraciones de ácido acético menores, siendo de 1.48 g/L al pretratar rastrojo de maíz con H_2SO_4 al 2.13 % y 1.5 g/L al pretratar granos gastados de una cervecera con H_2SO_4 al 3 % a 130 °C durante 15 min, respectivamente.

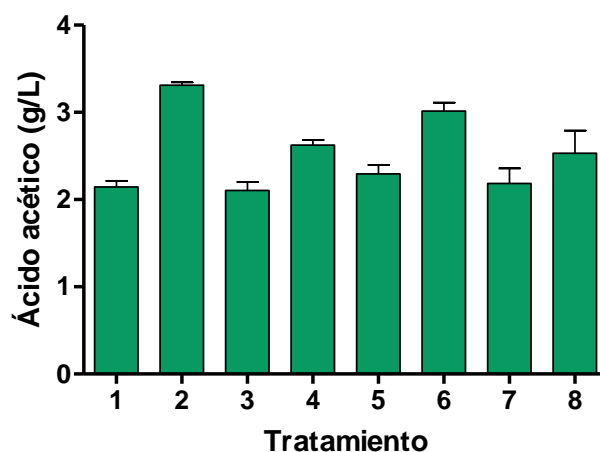


Figura 23. Concentración de ácido acético formado durante pretratamientos ácidos de pericarpio de maíz. (1) H_2SO_4 2 %, 15 % PM, 30 min en autoclave; (2) H_2SO_4 2 %, 20 % PM, 30 min en autoclave; (3) H_2SO_4 4 %, 15 % PM, 30 min en autoclave; (4) H_2SO_4 4 %, 20 % PM, 30 min en autoclave; (5) H_2SO_4 2 %, 15 % PM, 60 min en autoclave; (6) H_2SO_4 2 %, 20 % PM, 60 min en autoclave; (7) H_2SO_4 4 %, 15 % PM, 60 min en autoclave; (8) H_2SO_4 4 %, 20 %

PM, 60 min en autoclave. Los resultados se expresan como la media de tres réplicas \pm DE.

- **Efecto de los pretratamientos ácidos sobre la formación de ácido acético**

La estimación de componentes de variancia para la variable ácido acético se presenta en el Cuadro 26, donde se observa que la parcela (tiempo de pretratamiento en autoclave) representa un 36.617 % del error experimental. En la prueba de efecto fijo para los factores evaluados y sus interacciones sobre la formación de ácido acético (Cuadro 27Cuadro 20) se presentan en negrita los factores e interacciones que resultaron significativas, encontrándose que la concentración de ácido ($p < 0.0001$) y la concentración de PM ($p < 0.0001$), así como la interacción de estos dos factores ($p = 0.0001$) y la interacción tiempo de pretratamiento en autoclave*concentración de PM ($p = 0.0047$) tienen un efecto relevante sobre la cantidad de ácido acético formado durante la aplicación de los pretratamientos ácidos.

Cuadro 26. Estimación de componentes de variancia por máxima probabilidad residual (REML) para ácido acético.

Efecto aleatorio	Relación de variancia	Componente de variancia	Error estándar	Límite de confianza inferior del 95 %	Límite de confianza superior del 95 %	Porcentaje del total
Parcela	0.578	0.007	0.007	-0.007	0.020	36.617
Residual		0.011	0.005	0.006	0.0328	63.383
Total		0.018	0.008	0.009	0.052	100.000
R²: 0.962						
R²ajustado: 0.944						

Cuadro 27. Análisis de varianza para los factores evaluados y sus interacciones sobre la formación de ácido acético.

Fuente de variación	Nparm	gl	gld	Razón F	Valor p
Tiempo de pretratamiento en autoclave	1	1	4.039	0.3046	0.6101
Concentración de ácido	1	1	11.2	54.4261	<.0001*
Tiempo de pretratamiento en autoclave*Concentración de ácido	1	1	11.2	0.7376	0.4084
Concentración de pericarpio de maíz	1	1	11.2	233.0381	<.0001*
Tiempo de pretratamiento en autoclave*Concentración de pericarpio de maíz	1	1	11.2	12.3917	0.0047*
Concentración de ácido*Concentración de PM	1	1	11.2	32.8491	0.0001*
Tiempo de pretratamiento en autoclave*Concentración de ácido*Concentración de PM	1	1	11.2	2.6715	0.1299

*La información señalada en negrita hace referencia los factores y/o interacciones que resultaron significativas.

Nparm: Número de parámetros.

gl: Grados de libertad

gld: Grados de libertad del denominador.

- **Efecto de la interacción tiempo de pretratamiento en autoclave*concentración de ácido*concentración de PM**

Aunque la interacción triple no mostró significancia, se observa que al cambiar la concentración del PM hay un efecto significativo sobre la formación de ácido acético, al igual que al modificar la concentración de ácido sulfúrico cuando se trabaja con 20 % de PM, para 30 y 60 min de pretratamiento en autoclave (Figura 24). Si se desea la formación de la menor concentración de este producto de degradación, lo más conveniente es pretratar 15 % de este material lignocelulósico, con ácido sulfúrico al 4 % y 30 min de pretratamiento.

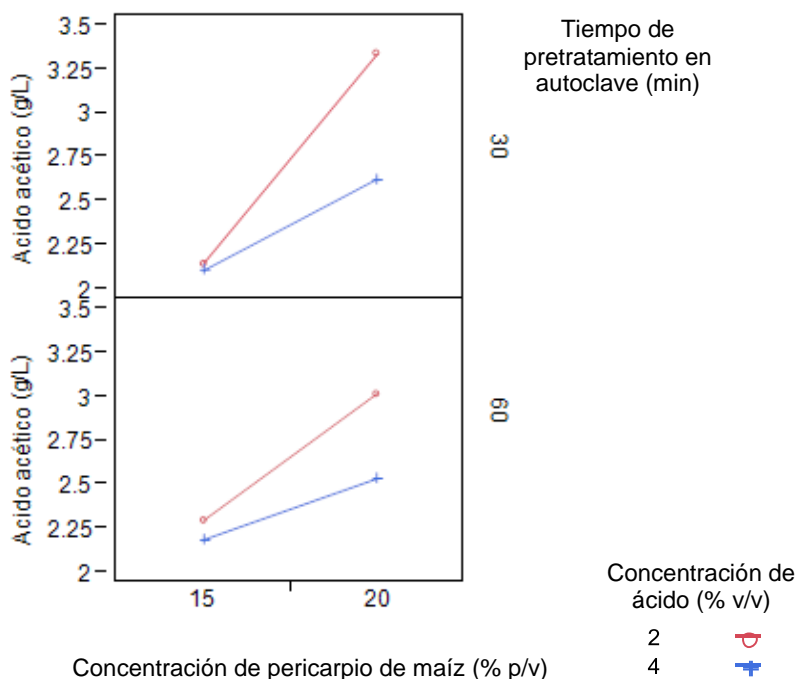


Figura 24. Efecto de la interacción tiempo de pretratamiento en autoclave*concentración de ácido*concentración de pericarpio de maíz.

Análisis fracción sólida

a. Composición estructural pericarpio de maíz sin pretratar

Se determinó la composición estructural del PM y PMH (H_2SO_4 al 2 %, 20 % PM y 60 min de tratamiento en autoclave), que se muestra en el Cuadro 28. Se encontró que la hemicelulosa es el componente más abundante del PM (48.7 %), seguido de solubles (33.16 %), celulosa (16.78 %) y lignina en menor cantidad (1.19 %). Estudios reportan que la hemicelulosa y la celulosa son los principales constituyentes de la fibra de maíz, con valores que están entre un 30-50 % de hemicelulosa y del 15-20 % de celulosa en base seca (Leathers, 1988); además, presenta 10-25 % de almidón y concentraciones bajas de lignina (Leathers, 2003). Por su parte, Saha *et al.* 1998), mencionan contenidos de hemicelulosa del 33 %, 20 % almidón y 15 % de celulosa. Díaz-Malvárez *et al.* (2013), encontraron cantidades superiores de hemicelulosa (54.25 %) y celulosa (18.12 %) para PM, además reportan un contenido de lignina del 2.58 % en base seca; mientras que (Granados *et al.*, 2017), encontraron que el pericarpio de maíz sin pretratar contiene 21.48 % de hemicelulosa, 8.41 % de celulosa y 0.37 % de lignina.

En cuanto a la FSPH, se determinó como principal constituyente la celulosa (60.56 % p/p), seguido de solubles (33.36 % p/p), lignina (3.59 % p/p) y una mínima parte de hemicelulosa (2.49 % p/p). Las proporciones de celulosa y lignina aumentaron en un 201.68 % y 260.90 %, respectivamente, con relación a las determinadas para PM sin pretratar. La proporción de solubles se mantuvo similar con respecto al material sin pretratar. Por su parte, la proporción de hemicelulosa fue la única que se redujo al aplicar el pretratamiento ácido, el cual permitió la remoción del 94.90 % de este polisacárido, este valor es mayor al reportado por Brar *et al.* (2016), quienes lograron la remoción del 80.5 % (p/p) de hemicelulosa empleando H₂SO₄ (1 % v/v) sobre elote (1:15 líquido-sólido).

La evidente reducción de la hemicelulosa en la FSPH, se atribuye al efecto de pretratamientos con ácido sulfúrico a 121 °C, debido a que este es capaz de hidrolizar completamente la hemicelulosa (Saha, 2003). Además, Agbor *et al.* (2011), mencionan que los pretratamientos con ácido diluido hidrolizan las unidades de hemicelulosa a sus unidades monoméricas, lo que hace que la celulosa está más disponible, haciéndola más susceptible a otros procesos como la sacarificación enzimática (Jung y Kim, 2015).

La reducción de la hemicelulosa en la FSPH con ácido sulfúrico concuerda con los resultados obtenidos para la fracción líquida de los hidrolizados, donde se encontró principalmente xilosa y arabinosa, monosacáridos que son producto de la hidrólisis de hemicelulosa.

Cuadro 28. Composición estructural del PM pretratado y con pretratamiento

Muestra	Hemicelulosa (%)	Celulosa (%)	Lignina (%)	Solubles (%)
PM	48.87	16.78	1.19	33.16
FSPH	2.49	60.56	3.59	33.36

*Los resultados se expresan como % en base seca.

b. Microscopía electrónica de barrido

La microscopía electrónica de barrido (SEM) es un método comúnmente empleado para describir las características anatómicas, la degradación celular y la nano-resolución de la superficie de la biomasa. Esta se aplicó a PM sin pretratar y pretratado (H_2SO_4 2 %, 20 % PM, 60 min en autoclave); las micrografías para cada material se presentan en las Figura 25 y Figura 26, respectivamente. Las imágenes de SEM muestran claramente diferencias estructurales del PM sin pretratar y pretratado. En la Figura 25 se observa que la biomasa sin pretratar tiene una estructura rígida, compacta, fibrosa, con fracciones de material agregado a la misma, y sin presencia aparente de daño, lo que concuerda con lo descrito por algunos autores para PM nativo (Gutiérrez-Cortez *et al.*, 2016; Myat y Ryu, 2014; Yoshida *et al.*, 2012). En el PM pretratado (Figura 26), se evidencia daño de la estructura superficial, con la exposición de microfibrillas de celulosa y solubilización de la hemicelulosa (Fonseca *et al.*, 2014), posible pérdida de cristalinidad y reducción del grado de polimerización, lo que hace más susceptible el material a la degradación enzimática (Myat y Ryu, 2014).

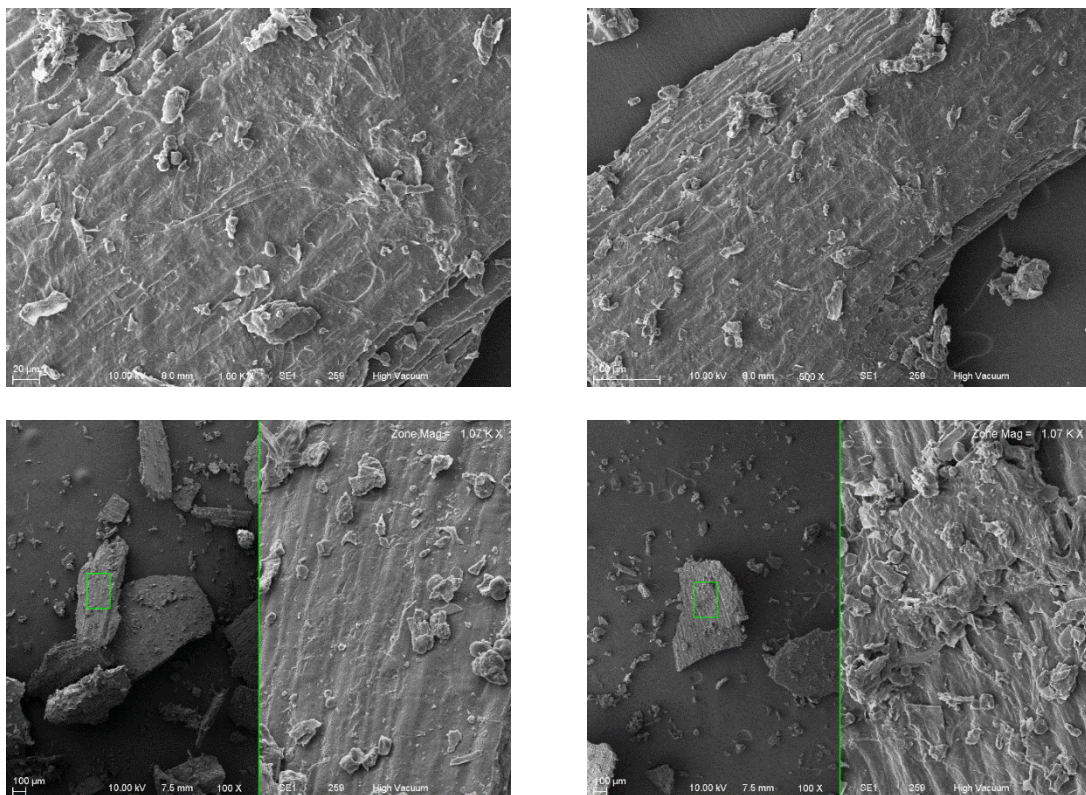


Figura 25. Micrografías de pericarpio de maíz sin pretratar. El cuadro pequeño fue amplificado en la microscopía de su lado derecho (1.07 kX).

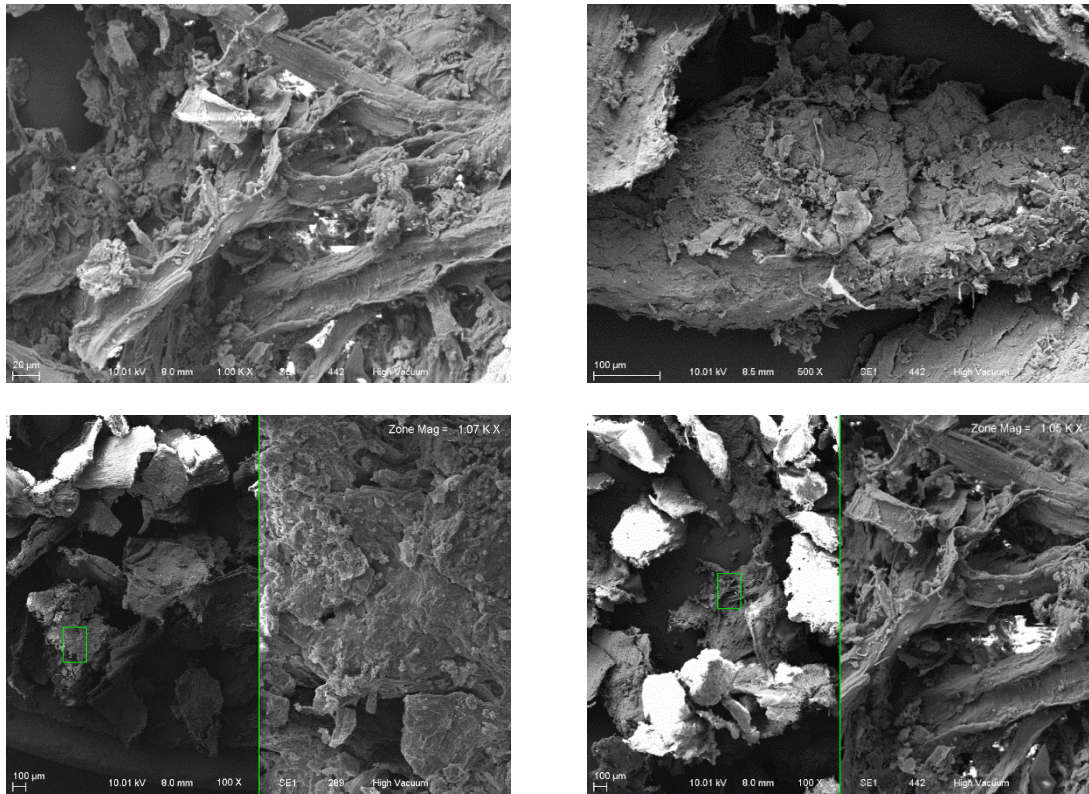


Figura 26. Micrografías de pericarpio de maíz pretratado. El cuadro pequeño fue amplificado en la microscopía de su lado derecho (1.05-1.07 kX).

6.3. Determinación del efecto de complejos enzimáticos sobre la sacarificación de la fracción sólida de pericarpio de maíz pretratado químicamente

6.3.1. Determinación de actividad enzimática

Se determinó la cantidad de glucosa liberada para tres concentraciones de enzima Cellic CTec2 donde se evaluó su actividad usando como sustrato papel filtro Whatman No.4 (Cuadro 29). A partir de estos resultados se realizó una curva de tres puntos entre los que estuviera 2 mg glucosa/0.5 mL de solución para determinar la concentración de la enzima necesaria para liberar dicha concentración de azúcar en 60 min (Figura 27), que resultó en la fracción equivalente a 0.0019, representando una actividad enzimática de 194.737 UPF/mL. Para el complejo enzimático Cellic CTec2, se reportan diversas actividades enzimáticas; Gonçalves *et al.* (2016), encontraron una actividad de 126 UPF/mL, Michelin y Teixeira (2016), determinaron una actividad de 160

UPF/mL, mientras que Ishola *et al.* (2015), Zhao *et al.* (2015) y Rodrigues *et al.* (2015), reportaron actividades de 185, 189 y 223 UPF/mL, respectivamente.

Cuadro 29. Liberación de glucosa por la enzima Cellic CTec2 usando papel filtro Whatman No. 4 como sustrato.

N° Dilución	Amortiguador de citrato 0.5 M (mL)	Enzima diluida 1:20 (v/v) (mL)	Concentración enzima*	Glucosa liberada (mg/0.5 mL)
1	0.97	0.03	0.0015	1.714
2	0.95	0.05	0.0025	2.412
3	0.9	0.1	0.005	4.580

*El término concentración enzima representa la proporción de la solución original de enzima presente en la dilución adicionada a la mezcla.

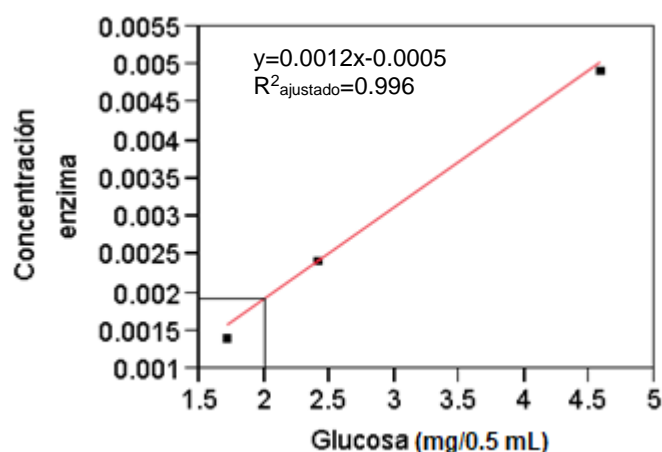


Figura 27. Actividad de la enzima Cellic CTec2 usando papel filtro Whatman No. 4 como sustrato.

6.3.2. Hidrólisis enzimática

Se realizó la sacarificación enzimática de la FSPH y PM (H_2SO_4 2 %, 20 % PM, 60 min en autoclave) con Cellic CTec2 (40 UPF/g celulosa), evaluando 5 y 7 % (p/v) de sólidos. Se determinó la concentración de azúcares reductores y glucosa producidas durante las 96 h de hidrólisis (Figura 28 y Figura 29, respectivamente) y el porcentaje de conversión de celulosa a glucosa (Figura 30). Se encontró efecto significativo de la sacarificación enzimática sobre la producción de azúcares reductores, glucosa y la conversión de celulosa a glucosa (Cuadro 30).

Cuadro 30. Análisis de varianza para un diseño factorial completo, sobre la sacarificación enzimática de PM sin pretratar (PM) y la fracción sólida de pericarpio hidrolizado (FSPH), sobre la producción de azúcares reductores, glucosa y conversión de celulosa a glucosa.

Fuente	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Valor de F	Prob > F
Azúcares reductores					
Modelo	23	220398.71	9582.55	230.5975	<.0001*
Error	46	1911.54	41.56		
C. Total	69	222310.25			
R ²	0.991401				
R ² _{ajustado}	0.987102				
Glucosa					
Modelo	23	12810.112	556.961	193.0433	<.0001*23
Error	46	132.718	2.885		
C. Total	69	12942.829			
R ²	0.989746				
R ² _{ajustado}	0.984619				
Conversión de celulosa a glucosa					
Modelo	23	74812.779	3252.73	133.5961	<.0001*
Error	46	1119.985	24.35		
C. Total	69	75932.763			
R ²	0.98525				
R ² _{ajustado}	0.977875				

Los perfiles de sacarificación enzimática presentan similar comportamiento para ambas concentraciones de sólidos, tanto para el PM, como para las FSPH. La hidrólisis enzimática del PM después de 96 h, permitió la obtención de 29.346 ± 1.310 g azúcares reductores/L y 4.310 ± 0.412 g glucosa/L cuando se trabajó con 7 % de sólidos, mientras que para 5 % de sólidos se obtuvieron concentraciones más bajas: 22.430 ± 2.651 g azúcares reductores/L y 3.071 ± 0.527 g/L. Asimismo, la conversión obtenida de celulosa a glucosa para estas muestras fue de 36.215 ± 3.463 % y 36.123 ± 6.200 %, respectivamente.

Al término del tiempo de hidrólisis enzimática, las FSPH presentaron 129.7485 ± 7.709 g azúcares reductores/L y 29.997 ± 2.376 g glucosa/L, cuando se trabajó con 5 % de sólidos, mientras que cuando se trabajó con 7 % se obtuvieron 148.774 ± 9.562 g azúcares reductores/L y 34.172 ± 2.407 g glucosa/L. La concentración de azúcares reductores incrementó 5.785 (5 % sólidos) y 5.070 (7 % sólidos) veces al pretratar el PM y la cantidad de glucosa también incrementó 9.768 y 7.930 veces para 5 % y 7 % de sólidos hidrolizados, respectivamente. El porcentaje de conversión de celulosa a glucosa para estos tratamientos para

las 96 h de hidrólisis fue de 98.352 ± 7.790 y 80.028 ± 5.637 %, para la FSPH (5 % y 7 % de sólidos, respectivamente). Sin embargo, la conversión máxima de celulosa para la FSPH cuando se empleó 5 % de sólidos fue de 99.988 ± 5.941 % a las 48 h, y al usar 7 % de sólidos la conversión más alta fue de 83.691 ± 7.950 % a las 72 h de hidrólisis.

La prueba de comparación de medias por Tukey arrojó que hay diferencias significativas ($\alpha=0.05$) de los valores encontrados para las variables medidas para todo el tiempo de hidrólisis, lo que significa que el PM y la FSPH son diferentes entre sí (Figura 28, Figura 29 y Figura 30). No se encontraron diferencias significativas entre las concentraciones de azúcares reductores, glucosa y la conversión de celulosa a glucosa para PM hidrolizado enzimáticamente con 5 % y 7 % de sólidos. Para la FSPH sometida a sacarificación con 5 % y 7 % de sólidos, no se observaron diferencias significativas de las concentraciones de azúcares reductores y glucosa, excepto para las 72 h de hidrólisis enzimática, donde mostraron ser significativamente diferentes; para este caso, cuando se usó un 7 % de sólidos se encontraron mayores cantidades de azúcares. En la conversión de celulosa a glucosa para FSPH, durante toda la hidrólisis se evidenciaron diferencias significativas, independientemente del tiempo, la conversión usando 7 % de sólidos fue inferior a la de 5 %, excepto para las 72 h; cuando se empleó 5 % de sólidos la conversión fue significativamente mayor a las 48 h, sugiriendo que la mejor conversión se obtiene usando 5 % de la FSPH.

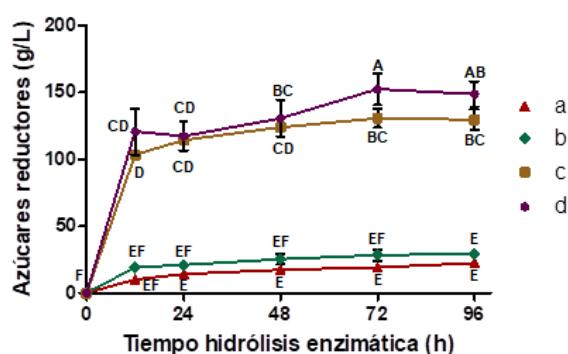


Figura 28. Producción de azúcares reductores durante la hidrólisis enzimática de FSPH y PM. (a) Pericarpio de maíz sin pretratar (5 % sólidos); (b) Pericarpio de maíz sin pretratar (5 % sólidos); (c) Fracción sólida de pericarpio de maíz hidrolizado con H_2SO_4 al 2 % durante 60 min con 20 % de PM (5 % sólidos); (d) Fracción sólida de pericarpio de maíz hidrolizado con H_2SO_4 al 2 % durante 60 min con 20 % de PM (7 % sólidos). Promedio de tres réplicas \pm desviación estándar. Los niveles no conectados por la misma letra son significativamente diferentes.

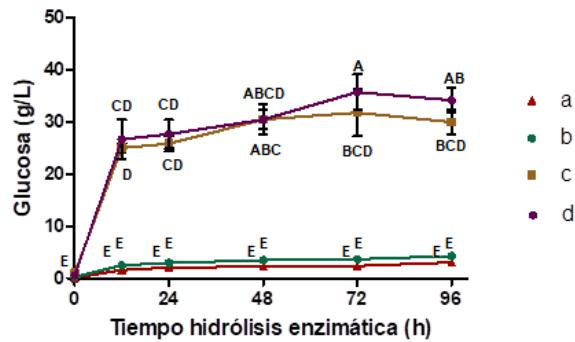


Figura 29. Producción de glucosa durante la hidrólisis enzimática de FSPH y PM. (a) Pericarpio de maíz sin pretratar (5 % sólidos); (b) Pericarpio de maíz sin pretratar (5 % sólidos); (c) Fracción sólida de pericarpio de maíz hidrolizado con H_2SO_4 al 2 % durante 60 min con 20 % de PM (5 % sólidos); (d) Fracción sólida de pericarpio de maíz hidrolizado con H_2SO_4 al 2 % durante 60 min con 20 % de PM (7 % sólidos). Promedio de tres réplicas \pm desviación estándar. Los niveles no conectados por la misma letra son significativamente diferentes.

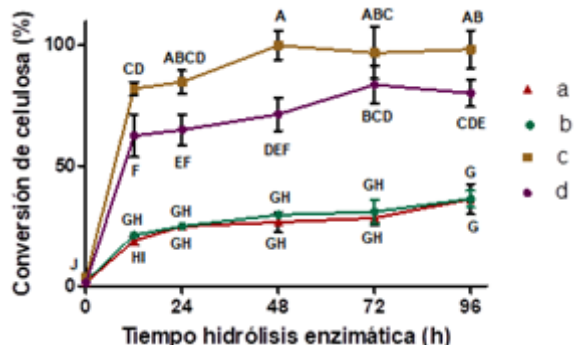


Figura 30. Conversión de celulosa a glucosa durante la hidrólisis enzimática de FSPH y PM. (a) Pericarpio de maíz sin pretratar (5 % sólidos); (b) Pericarpio de maíz sin pretratar (5 % sólidos); (c) Fracción sólida de pericarpio de maíz hidrolizado con H_2SO_4 al 2 % durante 60 min con 20 % de PM (5 % sólidos); (d) Fracción sólida de pericarpio de maíz hidrolizado con H_2SO_4 al 2 % durante 60 min con 20 % de PM (7 % sólidos). Promedio de tres réplicas \pm desviación estándar. Los niveles no conectados por la misma letra son significativamente diferentes.

Auxenfans *et al.* (2017), realizaron la sacarificación enzimática de *Micanthus giganteus*, álamo y paja de trigo (2 % p/v), pretratado (H_2SO_4 diluido) y sin pretratar, con la enzima comercial Cellic CTec2 (40 UPF/g glucano), durante 48 h a 50 °C y 200 rpm; y encontraron concentraciones de glucosa de 1.82, 0.71 y 4.41 g/L para cada material sin pretratar, respectivamente, al terminar la hidrólisis; las cantidades de glucosa reportadas para las dos primeras biomásas fue inferior al obtenido en este estudio durante el mismo tiempo de

hidrólisis, como se observa en la Figura 30, siendo entre 1.2 y 1.9 veces menor en el caso de *Micanthus x giganteus* y de 3.2 a 5.0 veces inferior para el álamo. Lo anterior sugiere que a mayor concentración de sólidos, mayor hidrólisis y conversión de glucosa; sin embargo, en el caso de paja de trigo a las 48 h de hidrólisis enzimática se produjo entre 1.3 y 2.0 veces más glucosa que lo obtenido para el PM, lo que podría indicar que la paja de trigo presenta una estructura menos compleja que el PM que permite un mejor acceso de las enzimas. En cuanto a la biomasa pretratada, ellos obtuvieron concentraciones de glucosa máximas de 10.67, 10.15 y 10.46 g/L para *Micanthus x giganteus*, álamo y paja de trigo, respectivamente; cantidades que están por debajo de las alcanzadas para FSPH tratado con el mismo ácido, lo que podría sugerir que el pretratamiento impartido al pericarpio permitió una mayor exposición de la celulosa y mejor acceso a las enzimas.

Se reporta el empleo de diversos complejos enzimáticos para la sacarificación de algunas biomásas lignocelulósicas, con diferentes concentraciones de glucosa y conversión de celulosa, según el material y pretratamiento aplicado, enzimas usadas y cantidades, concentración de sólidos y tiempo de hidrólisis. Caspeta *et al.* (2014), hidrolizaron bagazo de agave pretratado (mezcla de H₂SO₄, etanol y agua), empleando concentraciones de 2, 5 y 10 % de sólidos /100 mL), obteniendo concentraciones máximas de glucosa de 15.1, 34.0 y 42 g/L, con 100, 93.0 y 62.5 % de conversión de celulosa respectivamente, al usar 15 UPF de celulosa y 30 unidades de celobiosa (CBU) mediante el uso de β -glucosidasa por cada gramo de sólido. Gonçalves *et al.* (2015), utilizaron Cellic CTec2 y Cellic HTec2 (30 UPF, 75 CBU y 130 IU por gramo de una mezcla de fibra de coco madura, cáscara de coco verde, cáscara de coco madura y cactus), obteniendo un porcentaje de conversión de glucosa del 92.52 % (0.43 g/g) después de 96 h de hidrólisis. Por su parte, Sindhu *et al.* (2011), hidrolizaron caña de azúcar (11.25 % p/p), previamente pretratada con HCl y H₂SO₄, con una celulasa comercial (50 UPF/ g material pretratado), durante 60 h, obteniendo un rendimiento máximo de 0.685 g azúcares reductores/ g material pretratado. Vintila *et al.* (2010), hidrolizaron paja de trigo, rastrojo de maíz pretratado y *Miscanthus*, con celulosas comerciales, obteniendo rendimientos de sacarificación de 52 %, 59 % y 61 %.

Los resultados obtenidos para la hidrólisis enzimática de PM evidencian que para la obtención de altas concentraciones de azúcares fermentables como la glucosa, es necesaria la previa aplicación de pretratamientos (Saha *et al.*, 1998), que permitan la disminución del grado de cristalinidad de la celulosa (Sánchez y Cardona, 2008), aumentando la exposición de sus principales componentes (Mosier, 2005) y mejorando la accesibilidad de las enzimas hidrolíticas en la superficie de la biomasa (Patel *et al.*, 2007). El ácido sulfúrico diluido degrada principalmente la hemicelulosa haciendo que la celulosa sea más susceptible a la digestión enzimática (Esteghlalian *et al.*, 1997). El medio rico en glucosa obtenido de la sacarificación enzimática podría ser usado para la producción de bioetanol usando *S. cerevisiae*, dado que es una levadura comúnmente usada para la producción de este biocombustible debido al rápido consumo de glucosa y alta tolerancia al etanol (Li *et al.*, 2017).

6.4. Establecimiento de los parámetros de fermentación del hidrolizado de pericarpio de maíz para la producción de etanol

6.4.1. Fermentación de la fracción líquida de pericarpio de maíz pretratado

6.4.1.1. Crecimiento de levaduras en hidrolizados ácidos de pericarpio de maíz

En la Figura 31 se presentan las curvas de crecimiento de *S. stipitis* y *S. cerevisiae*, cuyos sustratos fueron la FLPH destoxificados y sin destoxificar diluido (1:2). No se observan curvas de crecimiento características de las levaduras en los hidrolizados ácidos, debido posiblemente a la composición de los sustratos, probablemente asociado a una mayor complejidad que al medio tradicional (YPD). Para *S. stipitis*, cuando se destoxificaron los hidrolizados (Figura 31 A), se evidenció un lento desarrollo con un mayor crecimiento en la FLPH destoxificado (1), con una DO de 1.7 al finalizar 94 h de fermentación; seguido de la FLPH destoxificado (3); en los demás sustratos se observó un crecimiento mínimo (2 y 4). Cuando se diluyeron los hidrolizados sin

destoxificar (Figura 31 B) los tratamientos 1 y 4 presentaron el mejor comportamiento de crecimiento de la levadura, con una DO máxima de 1.8. En el caso de *S. cerevisiae*, se evidencia un lento crecimiento, sobre todo cuando se destoxificaron los medios (Figura 31 C), en ese caso la DO más alta (alrededor de 1.5) se alcanzó con el tratamiento 2. En los medios diluidos (Figura 31 D), *S. cerevisiae* presentó un crecimiento más rápido; sin embargo, al finalizar el tiempo de fermentación alcanzó una DO similar a la del medio destoxificado (DO máxima de 1.57), el crecimiento más alto se alcanzó con el tratamiento 3.

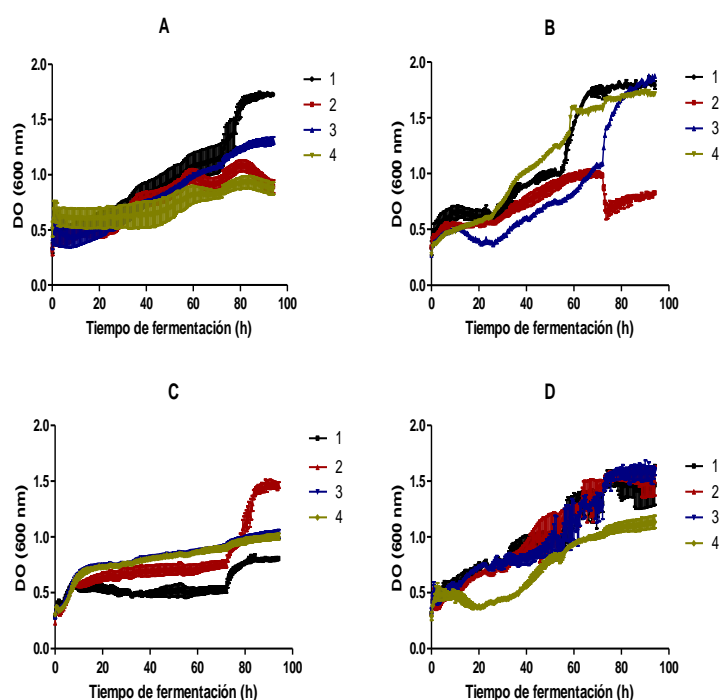


Figura 31. Curvas de crecimiento de *S. stipitis* y *S. cerevisiae*. (A) Crecimiento de *S. stipitis* en FLPH destoxificado; (B) Crecimiento de *S. stipitis* en FLPH diluido (1:2) sin destoxificar; (C) Crecimiento de *S. cerevisiae* en FLPH destoxificado; (D) Crecimiento de *S. cerevisiae* en FLPH diluido (1:2) sin destoxificar. (1) H₂SO₄ al 2 % (v/v), PM 15 % (p/v) y 30 min de pretratamiento; (2) H₂SO₄ al 2 % (v/v), PM 15 % (p/v) y 60 min de pretratamiento; (3) H₂SO₄ al 2 % (v/v), PM 20 % (p/v) y 30 min de pretratamiento; (4) H₂SO₄ al 2 % (v/v), PM 20 % (p/v) y 60 min de pretratamiento. Los datos se expresan como la media \pm la desviación estándar (bandas de colores).

Al observar la Figura 31, se deduce que los resultados de destoxificación no produjeron mejores condiciones de crecimiento para ambas levaduras, usando concentración de carbón activado de 2 % y un tiempo de reacción de 10 min.

6.4.1.2. Destoxificación de hidrolizados

La FLPH de los tratamientos: a. H₂SO₄ al 2 %, 20 % PM y 60 min en autoclave; b. H₂SO₄ al 2 %, 15 % PM y 30 min en autoclave, fueron destoxificados con carbón activado al 2 y 8 %. Los resultados de índice R₂₈₀ y los azúcares reductores para estos medios se muestran en el Cuadro 31. Se obtuvo la reducción del índice R₂₈₀ para ambos hidrolizados, entre más proporción de carbón activado se usó, más disminuyó este índice, lo que concuerda con los reportado por (Miyafuji *et al.*, 2003). Para la FLPH (a), la concentración de azúcares reductores se redujo mínimamente cuando se empleó 2 % de carbón activado (3.985 %), pasando de 102.848 ± 5.310 a 98.750 ± 2.034 g/L, lo que indica que la concentración de carbón activado no tuvo un efecto sobre estos azúcares, esto concuerda con lo reportado por Miyafuji *et al.* (2003) y Mateo *et al.* (2013), quienes usaron hidrolizados de madera y residuos de poda de olivo. Cuando usaron 8 % de carbón activado obtuvieron 83.911 ± 3.132 g/L de azúcares reductores, con una disminución del 18.413 %, mientras que para el hidrolizado de poda de olivo los azúcares reductores disminuyeron en mayor medida, 27.058 y 30.882 % para las 2 concentraciones de carbón activado usadas en la destoxificación (2 y 8 %, respectivamente). La disminución de azúcares utilizando este método de destoxificación está entre el 20 y 30 % (Lee *et al.*, 2011; Wang y Chen, 2011), dependiendo de la composición del hidrolizado, las condiciones de adsorción, concentración de carbón activado, pH, temperatura y tiempo de contacto y la remoción de compuestos de degradación que son inhibidores (Mussatto, 2004; Mateo *et al.*, 2013).

Cuadro 31. Destoxificación de la fracción líquida de pericarpio de maíz hidrolizado (FLPH).

N° Muestra	Destoxificado	Absorbancia (280 nm)	Índice R ₂₈₀	Azúcares reductores (g/L)
1	ND	1.851 ± 0.013	1	102.848 ± 5.310
2	D 2 %	1.805 ± 0.005	0.975	98.750 ± 2.034
3	D 8 %	1.583 ± 0.006	0.855	83.911 ± 3.132
4	ND	1.807 ± 0.013	1	88.841 ± 7.703
5	D 2 %	1.783 ± 0.011	0.987	64.802 ± 2.010
6	D 8 %	1.444 ± 0.005	0.799	61.405 ± 4.915

El número de muestra representa el tratamiento dado a las FLPH. ND: No destoxificado; D: Destoxificado.

6.4.1.3. Fermentación de hidrolizados usando *S. stipitis*

Las FLPH que fueron destoxificadas se emplearon como medio de fermentación para *S. stipitis*. La Figura 32 muestra el consumo de azúcares reductores y el aumento de la biomasa durante las 120 h de fermentación. En la Figura 32 a, se presentan los resultados cuando se trabajó con el PMH (20 % p/v, H₂SO₄ 2 %, y 60 min en autoclave), destoxificado con carbón activado al 2 % (p/v); se observa el consumo del 14.586 % de azúcares hasta las 72 h de fermentación, tiempo después del cual, se incrementa la concentración de los mismos, lo que pudo deberse a que *S. stipitis* a la hidrólisis de xilooligosacáridos a través de que pudieron estar presentes en la FLPH mediante una xilanasa producida por la levadura (Yang *et al.*, 2011). La biomasa, tuvo un comportamiento constante desde las primeras 12 h y se generaron 2.6 g/L al finalizar el tiempo de fermentación [0.0028 g/(L*h)]. El bajo consumo de azúcares y la poca generación de biomasa indica que la levadura no fue capaz de crecer en este medio, lo que puede deberse a la presencia de productos de degradación que se formaron junto con la liberación de azúcares simples durante el pretratamiento con el ácido diluido (Park *et al.*, 2013), lo que puede evidenciar que la destoxificación de este sustrato con 2 % de carbón activado no fue eficiente en la remoción de estos compuestos.

En la Figura 32 b, se muestra el consumo de azúcares y el incremento de biomasa cuando se usó como medio de fermentación el hidrolizado de PM (20 % p/v) pretratado con H₂SO₄ al 2 % y 60 min en autoclave, destoxificado con carbón activado al 8 % (p/v); se observa un consumo del 53.961 % de los azúcares y una generación de 11.6 g biomasa/L al finalizar las 120 h de fermentación, se determinó además, una tasa de crecimiento de 0.0092 g/L*h y un rendimiento de 0.261 g biomasa/ g azúcares reductores consumidos. Por otra parte, en la Figura 32 c, se presentan los resultados cuando se empleó como medio de fermentación el hidrolizado de PM (15 % p/v) pretratado con H₂SO₄ al 2 % y 30 min en autoclave, destoxificado con carbón activado al 2 % (p/v); para este caso, se presentó un consumo del 59.915 % de azúcares y la generación de 12.75 g biomasa/L, con una tasa de crecimiento mayor a la obtenida para los medios anteriores (0.0109 g/L*h) y una eficiencia de 0.352 g biomasa/ g azúcares

reductores consumidos. El mayor consumo de azúcares reductores (77.229 %), la generación más alta de biomasa (13.8 g/L), la mayor tasa de crecimiento de la levadura [0.0114 g/(L*h)] y el menor tiempo de duplicación de *S. stipitis* (60.362 h) durante las 120 h de fermentación fueron observadas cuando se usó como medio de fermentación el PMH (15 % p/v, H₂SO₄ 2 %, 30 min en autoclave), destoxificado con carbón activado al 8 % (p/v), aunque su eficiencia fue menor a la obtenida para los anteriores dos sustratos (0.236 g biomasa/g azúcares reductores consumidos) (Figura 32 d).

La tasa de crecimiento de la levadura para todos los hidrolizados fue menor a la reportada por Granados (2015) para un hidrolizados ácido de la misma biomasa (0.016 g/L*h), es decir, *S. stipitis* tardó más en adaptarse a los medios de fermentación aquí estudiados, lo que pudo deberse a que en la investigación citada, el inóculo utilizado para las fermentaciones fue crecido en un hidrolizado ácido de PM, permitiendo su mejor adaptación al medio; siendo ésta una estrategia utilizada para mejorar el rendimiento de las fermentaciones en hidrolizados de materiales lignocelulósicos (Tomás-Pejó *et al.*, 2010). Con referencia a la biomasa generada, los resultados obtenidos son mayores a los reportados por algunos autores, por ejemplo, Lee *et al.* (2000) encontraron que con 20 g/L iniciales de glucosa o xilosa la concentración de biomasa generada fue de 7 g/L durante las primeras 20 h de fermentación, mientras que Agbogbo y Wenger (2006) encontraron concentraciones de biomasa de 5.96 y 7.95 g/L, para medios de xilosa y glucosa, respectivamente, con concentraciones iniciales de azúcar de 60 g/L. En cuanto al consumo de azúcares reductores, éste se presentó menor al obtenido por Granados (2015) que fue de 78.84 % en hidrolizados no suplementados, al igual que de los reportados por Agbogbo y Wenger (2006) y Arslan y Eken-Saraçoğlu (2010), quienes reportan consumos del 83 y 80 %, respectivamente.

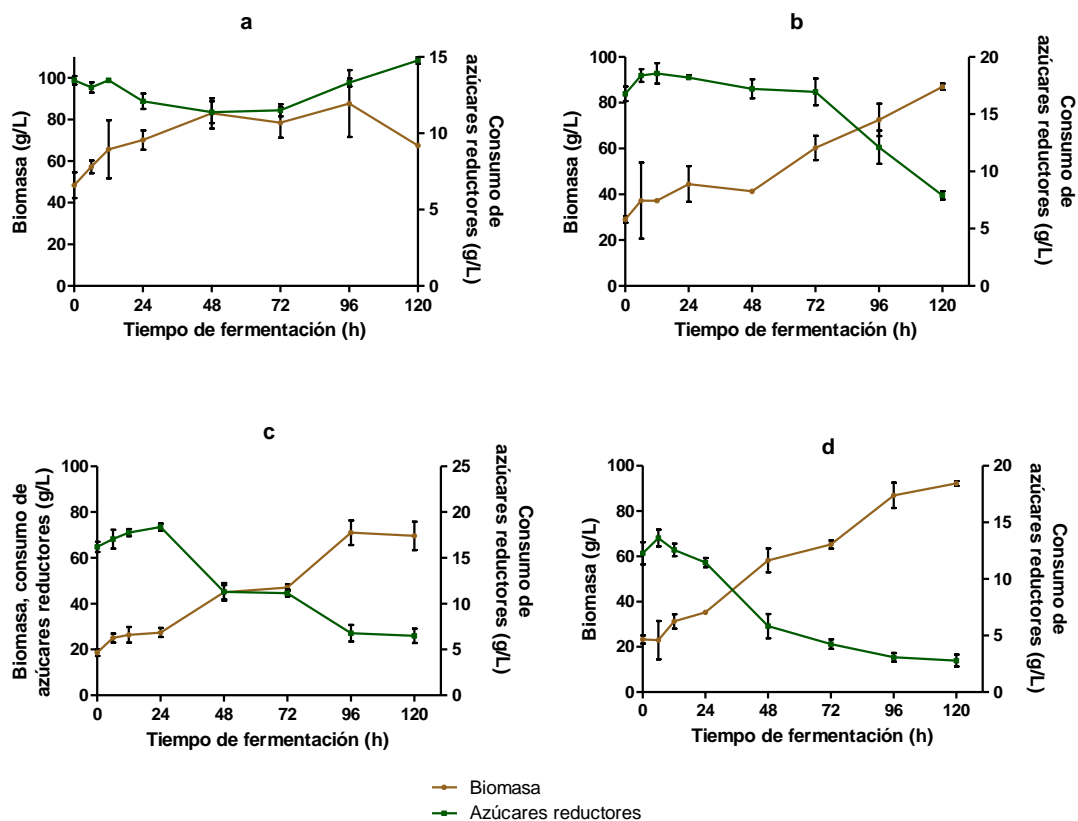


Figura 32. Biomasa y consumo de azúcares reductores de *S. stipitis* durante la fermentación hidrolizados ácidos de PM. (a). Hidrolizado de PM (20 % p/v) pretratado con H_2SO_4 al 2 % y 60 min en autoclave, destoxificado con carbón activado al 2 % (p/v); (b) Hidrolizado de PM (20 % p/v) pretratado con H_2SO_4 al 2 % y 60 min en autoclave, destoxificado con carbón activado al 8 % (p/v); (c) Hidrolizado de PM (15 % p/v) pretratado con H_2SO_4 al 2 % y 30 min en autoclave, destoxificado con carbón activado al 2 % (p/v); (d) Hidrolizado de PM (15 % p/v) pretratado con H_2SO_4 al 2 % y 30 min en autoclave, destoxificado con carbón activado al 8 % (p/v).

Se determinó el consumo de glucosa y xilosa por parte de *S. stipitis* durante la fermentación de la FLPH que presentaron consumo de azúcares reductores mayores al 50 % y que evidenciaron la generación de biomasa (Figura 33 A, B y C). Para cada una de las FLPH se observó un consumo del 100 % de glucosa y xilosa, a diferentes tiempos de fermentación. El consumo más rápido de estos azúcares se obtuvo para la FLPH (15 % p/v, H_2SO_4 2 %, 30 min en autoclave), y destoxificado con carbón activado al 8 % (p/v), en el cual para las primeras 24 h la glucosa se había consumido totalmente y la xilosa hasta las 48 h de fermentación (Figura 33 C), con tasas de consumo de 0.172 y 0.639 [g/(L*h)], respectivamente. En el caso de la FLPH (15 % p/v, H_2SO_4 2 %, 30 min en autoclave), destoxificado con carbón activado al 2 % (p/v), la glucosa fue

consumida totalmente a las 48 h de fermentación y la xilosa a las 96 h (Figura 33 B), con una tasa de consumo de 0.0880 y 0.157 [g/(L*h)], respectivamente. El consumo más lento de glucosa y xilosa se observó para el hidrolizado de PM (20 % p/v) pretratado con H₂SO₄ al 2 % y 60 min en autoclave, destoxificado con carbón activado al 8 % (p/v) (Figura 33 A), el cual presentó un consumo del 100 % de glucosa a las 96 h de fermentación y un consumo total de xilosa al término de la fermentación, con una tasa de consumo respectivo de 0.105 y 0.356 g/L*h; esto pudo deberse a una inhibición por sustrato, donde debido a la alta concentración de azúcares iniciales, que era mayor que en los otros medios, requirió de mayor tiempo de fermentación para conseguir su consumo total (Farias *et al.*, 2014).

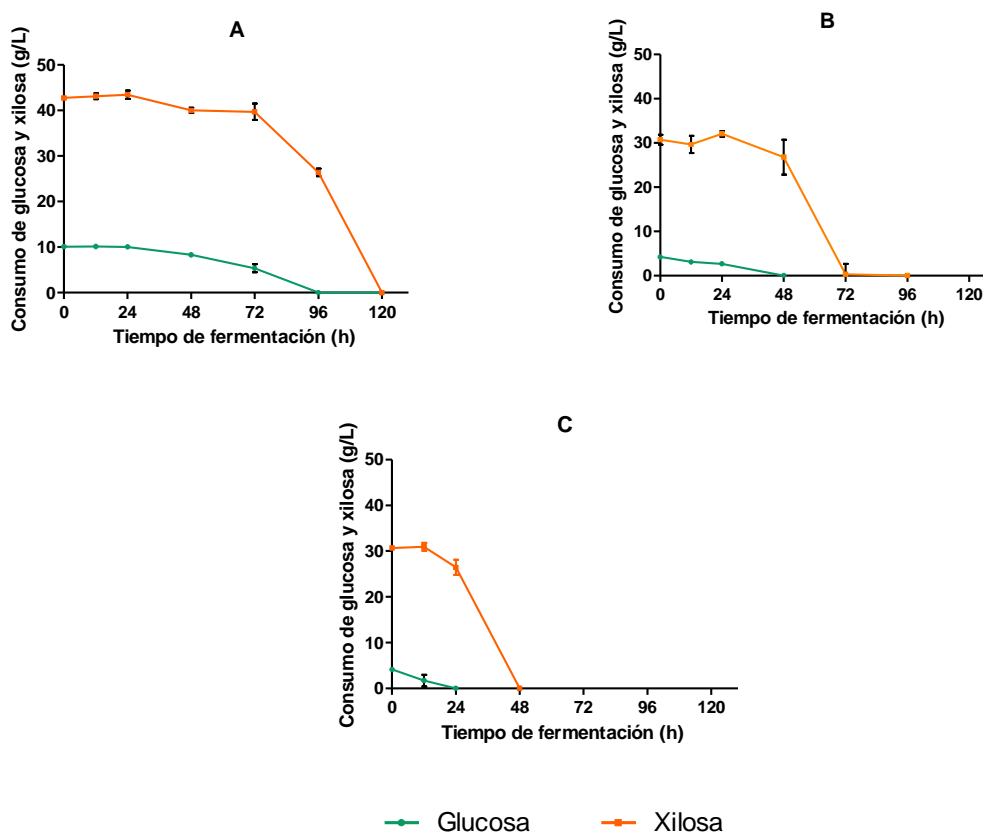


Figura 33. Consumo de glucosa y xilosa de *S. stipitis* durante la fermentación hidrolizados ácidos de PM. (A). Hidrolizado de PM (20 % p/v) pretratado con H₂SO₄ al 2 % y 60 min en autoclave, destoxificado con carbón activado al 8 % (p/v); (B) Hidrolizado de PM (15 % p/v) pretratado con H₂SO₄ al 2 % y 30 min en autoclave, destoxificado con carbón activado al 2 % (p/v); (C) Hidrolizado de PM (15 % p/v) pretratado con H₂SO₄ al 2 % y 30 min en autoclave, destoxificado con carbón activado al 8 % (p/v).

La Figura 34 muestra las concentraciones de bioetanol producidas por la fermentación de azúcares presentes en los hidrolizados ácidos de PM destoxificados, mediante *S. stipitis*, y los rendimientos del mismo. El hidrolizado de PM (20 % p/v) pretratado con H₂SO₄ al 2 % y 60 min en autoclave, y destoxificado con carbón activado al 8 % (p/v), presentó una fermentación lenta, la producción de etanol comenzó a las 72 h; sin embargo fue el medio en el que *S. stipitis* produjo mayor concentración de etanol, teniéndose 14.219 ± 0.986 g/L al finalizar las 120 h de fermentación; para el hidrolizado de PM (15 % p/v) pretratado con H₂SO₄ al 2 % y 30 min en autoclave, destoxificado con carbón activado al 2 % (p/v), la producción de etanol empezó después de las 24 h, siendo su máximo a las 72 h, alcanzando una concentración de 9.790 ± 1.240 (g/L), después de ese tiempo se evidencia reducción del etanol, lo que sugiere el consumo del mismo por parte de la levadura.

En cuanto a la FLPH (15 % p/v, H₂SO₄ 2 %, 30 min en autoclave), destoxificado con carbón activado al 8 % (p/v), la producción de etanol comenzó a las 12 h y tuvo su máximo a las 48 h de fermentación, produciéndose 9.075 ± 1.667 (g/L) (Figura 34 A). Las concentraciones de etanol producidas fueron mayores a las reportadas por Canilha *et al.*-(2010) y Granados (2015), para hidrolizados de bagazo de caña de azúcar y PM, respectivamente, que fueron 6.1 y 3.46 g/L, a las 48 y 120 h. Gonçalves *et al.* (2016) obtuvieron 11.29 g/L después de 48 h de la sacarificación y fermentación simultánea de hidrolizados de fibra de coco deslignificada, concentración inferior a la obtenida para la FLPH con el que se obtuvieron mejores resultados, que fue de 14.219 g/L, siendo esta concentración mayor a las obtenidas para los demás medios fermentados. Por su parte, Nigam (2001), obtuvo 22.3 g_{etanol}/L a partir de la fermentación de hidrolizados ácidos de paja de trigo usando *Pichia stipitis*, con un consumo del 85.8 % de azúcares.

En la Figura 34 B se presentan los rendimientos de etanol por cada gramo de azúcares (glucosa y xilosa) obtenidos durante la fermentación; el máximo rendimiento de etanol se obtuvo para el hidrolizado de PM (20 % p/v) pretratado con H₂SO₄ al 2 % y 60 min en autoclave, y destoxificado con carbón activado al 8 % (p/v), resultando en 0.269 ± 0.019 g_{etanol}/g_{azúcares} al finalizar las

120 h de fermentación; los rendimientos para los otros medios fueron de 0.186 ± 0.024 y 0.172 ± 0.000 g etanol/g azúcares, que se dieron para las 72 y 48 h, respectivamente (hidrolizado de PM (15 % p/v) pretratado con H₂SO₄ al 2 % y 30 min en autoclave, destoxificado con carbón activado al 2 % y 8 % (p/v)). Los rendimientos encontrados son mayores a los obtenidos por Granados (2015), para la FLPH (0.076 g/g). Sin embargo, son menores comparados con el valor teórico de R_{PS}=0.46 g/g y con otros estudios, donde concentraciones iniciales de xilosa de 7 a 150 g/L, otros investigadores han obtenido mayores rendimientos de etanol (R_{PS}=0.39-0.50) empleando *S. stipitis* (Slininger *et al.*, 1985; Linko *et al.*, 1986; Farias *et al.*, 2014). La eficiencia de fermentación para los sustratos (E_f) empleados fue 0.585, 0.041, 0.405 ± 0.051 y 0.373 ± 0.000 g/g (Cuadro 32), siendo la FLPH (20 % p/v, H₂SO₄ 2 %, 60 min en autoclave), y destoxificado con carbón activado al 8 % (p/v) el que permitió la mayor eficiencia, lo que pudo deberse a que era el sustrato con mayor concentración de azúcares, sin embargo sigue siendo una baja eficiencia del proceso de fermentación.

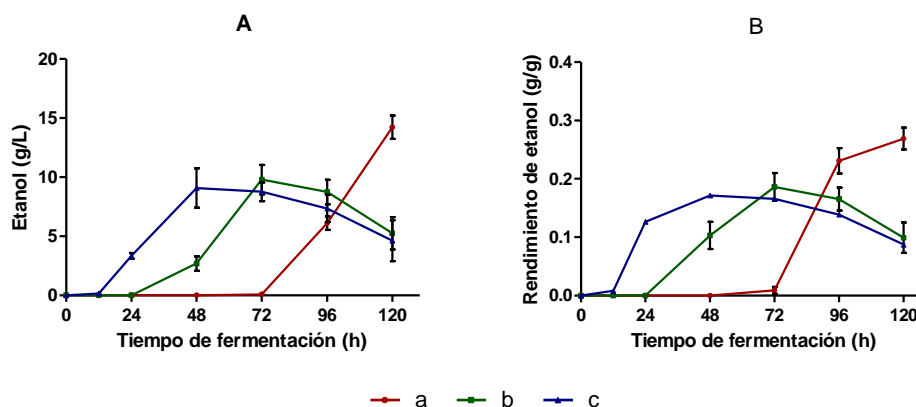


Figura 34. Producción de etanol (A) y rendimientos de etanol (B) durante la fermentación hidrolizados ácidos de PM con *S. stipitis*. (a) Hidrolizado de PM (20 % p/v) pretratado con H₂SO₄ al 2 % y 60 min en autoclave, destoxificado con carbón activado al 8 % (p/v); (b) Hidrolizado de PM (15 % p/v) pretratado con H₂SO₄ al 2 % y 30 min en autoclave, destoxificado con carbón activado al 2 % (p/v); (c) Hidrolizado de PM (15 % p/v) pretratado con H₂SO₄ al 2 % y 30 min en autoclave, destoxificado con carbón activado al 8 % (p/v).

Canilha *et al.* (2010), evaluaron la producción de bioetanol a partir de hidrolizados hemicelulósicos de bagazo de caña de azúcar sin destoxificar y

destoxificados con carbón activado y resina de intercambio iónico, utilizando *Pichia stipitis*; el medio destoxificado con resina de intercambio iónico resultó en rendimientos más altos de biomasa (0.37 g/g), 12.5 g células/L, 7.5 g etanol/L y un rendimiento de etanol de 0.3 g/g para un tiempo de fermentación de 48 h. Por otro lado, cuando usaron tratamiento con carbón activado, obtuvieron 0.27 g biomasa/g, 8.5 g células/L, 6.1 g etanol/L y un rendimiento de este producto similar al utilizar el sustrato anterior, para 48 h de fermentación. Los parámetros para el hidrolizado sin destoxificar fueron de 0.21 g biomasa/g, 8.0 g células/L, 4.9 g etanol/L y un rendimiento de etanol de 0.20 g/L para las 120 h de fermentación. Las concentraciones de etanol y sus rendimientos para las FLPH, resultaron más altos que para los valores que se observan en la literatura, de igual manera, se presentó una mayor generación de biomasa y rendimientos. En otro estudio, concentraciones de xilosa entre 30 y 50 g/L en sustratos para fermentación, fueron convertidos a 12.3 y 17.7 g/L de etanol, con rendimientos de 0.37 y 0.36 g etanol/g, respectivamente, y 7.0 g biomasa/g (Lee *et al.*, 2000); en este caso la concentración de etanol con 30 g/L de xilosa está por encima de las obtenidas para los sustratos con similar cantidad de xilosa, también, para todos los casos, los rendimientos de etanol fueron más bajos, además de menor concentración de biomasa.

Aunque *Scheffersomyces stipitis* es un biocatalizador potencial para la producción de combustibles de segunda generación, como el bioetanol, a partir de biomasa lignocelulósica, debido a que fermenta naturalmente pentosas (Farias *et al.*, 2014; Slininger *et al.*, 2014), es preciso mejorar los rendimientos y la productividad a través de la optimización del proceso para que la producción de etanol a partir de materiales lignocelulósicos sea rentable (Farias *et al.*, 2017).

Cuadro 32. Parámetros de fermentación para FLPH usando *S. stipitis*.

	a	b	c
Concentración máxima de etanol (g/L)	14.219 ± 0.986	9.790 ± 1.240	9.075 ± 1.667
E_F (g/g)	0.585 ± 0.041	0.405 ± 0.051	0.373 ± 0.000
$Y_{P/S}$ (g/g)	0.269 ± 0.019	0.186 ± 0.023	0.172 ± 0.000
$Y_{X/S}$ (g/g)	0.261 ± 0.013	0.352 ± 0.000	0.236 ± 0.004
Etanol producido [g/(L*h)]	0.118 ± 0.008	0.136 ± 0.017	0.189 ± 0.035
Azúcares reductores consumidos [g/(L*h)]	0.370 ± 0.011	0.324 ± 0.007	0.395 ± 0.0189
Glucosa consumida [g/(L*h)]	0.105 ± 0.001	0.088 ± 0.006	0.172 ± 0.004
Xilosa consumida [g/(L*h)]	0.356 ± 0.002	0.157 ± 0.006	0.639 ± 0.007
Biomasa generada [g/(L*h)]	0.009 ± 0.000	0.012 ± 0.000	0.020 ± 0.011
Tiempo de fermentación (h)	120	72	48

Hidrolizado de PM (20 % p/v) pretratado con H₂SO₄ al 2 % y 60 min en autoclave, destoxificado con carbón activado al 8 % (p/v); **b.** Hidrolizado de PM (15 % p/v) pretratado con H₂SO₄ al 2 % y 30 min en autoclave, destoxificado con carbón activado al 2 % (p/v); **c.** Hidrolizado de PM (15 % p/v) pretratado con H₂SO₄ al 2 % y 30 min en autoclave, destoxificado con carbón activado al 8 % (p/v).

7. CONCLUSIONES

Los pretratamientos con ácido sulfúrico diluido permitieron la liberación de glucosa, xilosa y arabinosa del PM, así como exposición de la celulosa para la sacarificación enzimática del hidrolizado ácido. Sin embargo, la formación de compuestos de degradación (furfural, ácido acético), debieron ser removidas de los hidrolizados antes de fermentarlos.

La hidrólisis de PM (20 % p/v) con ácido sulfúrico al 2 % (v/v), durante 60 min a 121 °C, fue el tratamiento que tuvo produjo las mayores concentraciones de azúcares fermentables.

La sacarificación enzimática de la fracción sólida del PM obtenida con la mayor liberación de azúcares fermentables, permitió la conversión de celulosa a glucosa hasta en un 100 % en 96 h. El pretratamiento de la biomasa lignocelulósica fue clave para mejorar el acceso de las enzimas a la celulosa.

Es necesario optimizar la etapa de fermentación de la FLPH usando *S. stipitis* para la producción de bioetanol con el fin de incrementar rendimientos del proceso, productividad volumétrica de etanol y la eficiencia del mismo. La mayor concentración eficiencia de fermentación y producción de bioetanol se obtuvo usando como sustrato la FLPH (20 % p/v, H₂SO₄ 2 %, a 121 °C, por 60 min), y destoxificado con carbón activado al 8 % (p/v).

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acheampong, M., Ertem, F. C., Kappler, B., y Neubauer, P. (2017). In pursuit of Sustainable Development Goal (SDG) number 7: Will biofuels be reliable? *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 75, 927–937. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2016.11.074>
- Aditiya, H. B., Mahlia, T. M. I., Chong, W. T., Nur, H., y Sebayang, A. H. (2016). Second generation bioethanol production: A critical review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 66, 631–653. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2016.07.015>
- Agbogbo, F. K., y Wenger, K. S. (2006). Effect of pretreatment chemicals on xylose fermentation by *Pichia stipitis*. *Biotechnology Letters*, 28(24), 2065–2069. <https://doi.org/10.1007/s10529-006-9192-6>
- Agbor, V. B., Cicek, N., Sparling, R., Berlin, A., y Levin, D. B. (2011). Biomass pretreatment: Fundamentals toward application. *Biotechnology Advances*, 29(6), 675–685. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.05.005>
- Almeida, J. R., Modig, T., Petersson, A., Hähn-Hägerdal, B., Lidén, G., y Gorwa-Grauslund, M. F. (2007). Increased tolerance and conversion of inhibitors in lignocellulosic hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Chemical Technology y Biotechnology*, 82(4), 340–349. <https://doi.org/10.1002/jctb.1676>
- Alvira, P., Tomás-Pejó, E., Ballesteros, M., y Negro, M. J. (2010). Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review. *Bioresource Technology*, 101(13), 4851–4861. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.11.093>
- Andrić, P., Meyer, A. S., Jensen, P. A., y Dam-Johansen, K. (2010). Reactor design for minimizing product inhibition during enzymatic lignocellulose hydrolysis: I. Significance and mechanism of cellobiose and glucose inhibition on cellulolytic enzymes. *Biotechnology Advances*, 28(3), 308–324. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2010.01.003>
- AOAC. (2001). NMX-Y-098-SCFI-Alimentos para animales-determinacion de humedad en alimentos balanceados e ingredientes mayores. Ciudad de México.

- AOAC. (2002). Method 942.05. Ash of animal feed. En *Official methods of analysis of AOAC international* (17a ed., Vol. 1). Maryland, USA: AOAC.
- AOAC. (2005). *Official method 2001.11-Protein (crude) in animal feed, forage (plant tissue), grain, and oilseeds*. USA.
- Arantes, V., Gourlay, K., y Saddler, J. N. (2014). The enzymatic hydrolysis of pretreated pulp fibers predominantly involves “peeling/erosion” modes of action. *Biotechnology for biofuels*, 7(1), 87.
- Aro, E.-M. (2016). From first generation biofuels to advanced solar biofuels. *Ambio*, 45(S1), 24–31. <https://doi.org/10.1007/s13280-015-0730-0>
- Arslan, Y., y Eken-Saraçoğlu, N. (2010). Effects of pretreatment methods for hazelnut shell hydrolysate fermentation with *Pichia stipitis* to ethanol. *Bioresource Technology*, 101(22), 8664–8670. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.05.085>
- Auxenfans, T., Crônier, D., Chabbert, B., y Paës, G. (2017). Understanding the structural and chemical changes of plant biomass following steam explosion pretreatment. *Biotechnology for Biofuels*, 10(1). <https://doi.org/10.1186/s13068-017-0718-z>
- Baek, S.-C., y Kwon, Y.-J. (2007). Optimization of the pretreatment of rice straw hemicellulosic hydrolyzates for microbial production of xylitol. *Biotechnology and bioprocess engineering*, 12(4), 404–409.
- Bai, Y.-Y., Xiao, L.-P., y Sun, R.-C. (2015). Microwave-assisted conversion of biomass derived hemicelluloses into xylo-oligosaccharides by novel sulfonated bamboo-based catalysts. *Biomass and Bioenergy*, 75, 245–253. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2015.02.023>
- Bajpai, P. (2013). *Advances in Bioethanol*. New Delhi: Springer India. Recuperado a partir de <http://link.springer.com/10.1007/978-81-322-1584-4>
- Balat, M. (2011). Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: A review. *Energy Conversion and Management*, 52(2), 858–875. <https://doi.org/10.1016/j.enconman.2010.08.013>
- Batidzirai, B., Smeets, E. M. W., y Faaij, A. P. C. (2012). New conversion technologies for liquid biofuels production in Africa. En R. Janssen y D. Rutz (Eds.), *Bioenergy for Sustainable Development in Africa* (pp. 117–

- 130). Dordrecht: Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-94-007-2181-4_11
- Behera, S., Arora, R., Nandhagopal, N., y Kumar, S. (2014). Importance of chemical pretreatment for bioconversion of lignocellulosic biomass. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 36, 91–106. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2014.04.047>
- Bhatia, L., Johri, S., y Ahmad, R. (2012). An economic and ecological perspective of ethanol production from renewable agro waste: a review. *AMB Express*, 2(1), 65. <https://doi.org/10.1186/2191-0855-2-65>
- Bhatti, H., Hanif, M., Qasim, M., y Ataurrehman. (2008). Biodiesel production from waste tallow. *Fuel*, 87(13–14), 2961–2966. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2008.04.016>
- Binod, P., Sindhu, R., y Pandey, A. (2013). The alcohol fermentation step: The most common ethanogenic microorganisms among yeasts, bacteria and filamentous fungi. En V. Faraco (Ed.), *Lignocellulose Conversion* (pp. 131–149). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-37861-4_7
- Bonin, C., y Lal, R. (2012). Agronomic and ecological implications of biofuels. En *Advances in Agronomy* (Vol. 117, pp. 1–50). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394278-4.00001-5>
- Boonmanumsin, P., Treeboobpha, S., Jeamjumnunja, K., Luengnaruemitchai, A., Chaisuwan, T., y Wongkasemjit, S. (2012). Release of monomeric sugars from *Miscanthus sinensis* by microwave-assisted ammonia and phosphoric acid treatments. *Bioresource Technology*, 103(1), 425–431. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.09.136>
- Brar, K. K., Kaur, S., y Chadha, B. S. (2016). A novel staggered hybrid SSF approach for efficient conversion of cellulose/hemicellulosic fractions of corncob into ethanol. *Renewable Energy*, 98, 16–22. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2016.03.082>
- Cai, Z., Zhang, B., y Li, Y. (2012). Engineering *Saccharomyces cerevisiae* for efficient anaerobic xylose fermentation: Reflections and perspectives. *Biotechnology Journal*, 7(1), 34–46. <https://doi.org/10.1002/biot.201100053>

- Canilha, L., Carvalho, W., de Almeida Felipe, M. das G., de Almeida e Silva, J. B., y Giuliatti, M. (2010). Ethanol production from sugarcane bagasse hydrolysate using *Pichia stipitis*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 161(1–8), 84–92. <https://doi.org/10.1007/s12010-009-8792-8>
- Cao, G., Ren, N., Wang, A., Lee, D.-J., Guo, W., Liu, B., Zhao, Q. (2009). Acid hydrolysis of corn stover for biohydrogen production using *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* W16. *International Journal of Hydrogen Energy*, 34(17), 7182–7188. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2009.07.009>
- Cara, C., Ruiz, E., Oliva, J. M., Sáez, F., y Castro, E. (2008). Conversion of olive tree biomass into fermentable sugars by dilute acid pretreatment and enzymatic saccharification. *Bioresource Technology*, 99(6), 1869–1876. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.03.037>
- Carvalho, F., Duarte, L. C., Medeiros, R., y Gírio, F. M. (2004). Optimization of brewery's spent grain dilute-Acid hydrolysis for the Production of Pentose-Rich Culture Media. En M. Finkelstein, J. D. McMillan, B. H. Davison, y B. Evans (Eds.), *Proceedings of the Twenty-Fifth Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals Held May 4–7, 2003, in Breckenridge, CO* (pp. 1059–1072). Totowa, NJ: Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-59259-837-3_86
- Caspeta, L., Caro-Bermúdez, M. A., Ponce-Noyola, T., y Martinez, A. (2014). Enzymatic hydrolysis at high-solids loadings for the conversion of agave bagasse to fuel ethanol. *Applied Energy*, 113, 277–286. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2013.07.036>
- Chandel, A. K., Antunes, F. A. F., de Arruda, P. V., Milessi, T. S. S., da Silva, S. S., y de Almeida Felipe, M. das G. (2012). Dilute acid hydrolysis of agro-residues for the depolymerization of hemicellulose: State-of-the-art. En S. S. da Silva y A. K. Chandel (Eds.), *D-Xylitol* (pp. 39–61). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-31887-0_2
- Chandra, R. P., Bura, R., Mabee, W. E., Berlin, A., Pan, X., y Saddler, J. N. (2007). Substrate Pretreatment: The key to effective enzymatic hydrolysis of lignocellulosics? En L. Olsson (Ed.), *Biofuels* (Vol. 108, pp.

- 67–93). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
https://doi.org/10.1007/10_2007_064
- Chao, Y., Singh, D., Yu, L., Li, Z., Chi, Z., y Chen, S. (2012). Secretome characteristics of pelletized *Trichoderma reesei* and cellulase production. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28(8), 2635–2641.
<https://doi.org/10.1007/s11274-012-1073-7>
- Chaturvedi, V., y Verma, P. (2013). An overview of key pretreatment processes employed for bioconversion of lignocellulosic biomass into biofuels and value added products. 3 *Biotech*, 3(5), 415–431.
<https://doi.org/10.1007/s13205-013-0167-8>
- Chen, Hongyan, Liu, J., Chang, X., Chen, D., Xue, Y., Liu, P., Han, S. (2017). A review on the pretreatment of lignocellulose for high-value chemicals. *Fuel Processing Technology*, 160, 196–206.
<https://doi.org/10.1016/j.fuproc.2016.12.007>
- Chen, Hongzhang. (2014). *Biotechnology of lignocellulose*. Dordrecht: Springer Netherlands. <https://doi.org/10.1007/978-94-007-6898-7>
- Cherubini, F. (2010). The biorefinery concept: Using biomass instead of oil for producing energy and chemicals. *Energy Conversion and Management*, 51(7), 1412–1421. <https://doi.org/10.1016/j.enconman.2010.01.015>
- Chisti, Y. (2007). Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances*, 25(3), 294–306. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2007.02.001>
- De Almeida, M. N., Guimarães, V. M., Bischoff, K. M., Falkoski, D. L., Pereira, O. L., Gonçalves, D. S. P. O., y de Rezende, S. T. (2011). Cellulases and hemicellulases from endophytic acremonium species and Its application on sugarcane bagasse hydrolysis. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 165(2), 594–610. <https://doi.org/10.1007/s12010-011-9278-z>
- Díaz-Malvárez, F. I., García-Almendárez, B. E., Hernández-Arana, A., Amaro-Reyes, A., y Regalado-González, C. (2013). Isolation and properties of β -xylosidase from *Aspergillus niger* GS1 using corn pericarp upon solid state fermentation. *Process Biochemistry*, 48(7), 1018–1024.
<https://doi.org/10.1016/j.procbio.2013.05.003>
- Doornbosch, R., y Steenblik, R. (2008). Biofuels: Is the cure worse than the disease? *Revista Virtual REDESMA*, 2, 63.

- Du Preez, J. C. (1994). Process parameters and environmental factors affecting d-xylose fermentation by yeasts. *Enzyme and Microbial Technology*, 16(11), 944–956. [https://doi.org/10.1016/0141-0229\(94\)90003-5](https://doi.org/10.1016/0141-0229(94)90003-5)
- Dutta, S., y Wu, K. C.-W. (2014). Enzymatic breakdown of biomass: enzyme active sites, immobilization, and biofuel production. *Green Chem.*, 16(11), 4615–4626. <https://doi.org/10.1039/C4GC01405G>
- Esteghlalian, A., Hashimoto, A. G., Fenske, J. J., y Penner, M. H. (1997). Modeling and optimization of the dilute-sulfuric-acid pretreatment of corn stover, poplar and switchgrass. *Bioresource Technology*, 59(2–3), 129–136. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(97\)81606-9](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(97)81606-9)
- Fargione, J., Hill, J., Tilman, D., Polasky, S., y Hawthorne, P. (2008). Land clearing and the biofuel carbon debt. *Science*, 319(5867), 1235–1238. <https://doi.org/10.1126/science.1152747>
- Farhat, W., Venditti, R., Quick, A., Taha, M., Mignard, N., Becquart, F., y Ayoub, A. (2017). Hemicellulose extraction and characterization for applications in paper coatings and adhesives. *Industrial Crops and Products*, 107, 370–377. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.05.055>
- Farias, D., Atala, D. I. P., y Maugeri, F. (2017). Improving bioethanol production by *Scheffersomyces stipitis* using retentostat extractive fermentation at high xylose concentration. *Biochemical Engineering Journal*, 121, 171–180. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2017.02.006>
- Farias, D., de Andrade, R. R., y Maugeri-Filho, F. (2014). Kinetic modeling of ethanol production by *Scheffersomyces stipitis* from xylose. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 172(1), 361–379. <https://doi.org/10.1007/s12010-013-0546-y>
- Fernandes, E. M., Pires, R. A., Mano, J. F., y Reis, R. L. (2013). Bionanocomposites from lignocellulosic resources: Properties, applications and future trends for their use in the biomedical field. *Progress in Polymer Science*, 38(10–11), 1415–1441. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2013.05.013>
- Fonseca, D. A., Lupitsky, R., Timmons, D., Gupta, M., y Satyavolu, J. (2014). Towards integrated biorefinery from dried distillers grains: Selective extraction of pentoses using dilute acid hydrolysis. *Biomass and Bioenergy*, 71, 178–186. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2014.10.008>

- Fredon, E., Granet, R., Zerrouki, R., Krausz, P., Saulnier, L., Thibault, J. F., Petit, C. (2002). Hydrophobic films from maize bran hemicelluloses. *Carbohydrate polymers*, 49(1), 1–12.
- Galbe, M., y Zacchi, G. (2007). Pretreatment of lignocellulosic materials for efficient bioethanol production. En L. Olsson (Ed.), *Biofuels* (Vol. 108, pp. 41–65). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. Recuperado a partir de http://link.springer.com/10.1007/10_2007_070
- Gámez, S., González-Cabriales, J. J., Ramírez, J. A., Garrote, G., y Vázquez, M. (2006). Study of the hydrolysis of sugar cane bagasse using phosphoric acid. *Journal of Food Engineering*, 74(1), 78–88. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2005.02.005>
- Gáspár, M., Kálmán, G., y Réczey, K. (2007). Corn fiber as a raw material for hemicellulose and ethanol production. *Process Biochemistry*, 42(7), 1135–1139. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2007.04.003>
- Gaurav, N., Sivasankari, S., Kiran, G., Ninawe, A., y Selvin, J. (2017). Utilization of bioresources for sustainable biofuels: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 73, 205–214. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2017.01.070>
- Geddes, C. C., Peterson, J. J., Roslander, C., Zacchi, G., Mullinnix, M. T., Shanmugam, K. T., y Ingram, L. O. (2010). Optimizing the saccharification of sugar cane bagasse using dilute phosphoric acid followed by fungal cellulases. *Bioresource Technology*, 101(6), 1851–1857. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.09.070>
- Ghose, T. K. (1987). Measurement of cellulase activities. *Pure and Applied Chemistry*, 59(2). <https://doi.org/10.1351/pac198759020257>
- Gírio, F. M., Fonseca, C., Carvalheiro, F., Duarte, L. C., Marques, S., y Bogel-Łukasik, R. (2010). Hemicelluloses for fuel ethanol: A review. *Bioresource Technology*, 101(13), 4775–4800. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.01.088>
- Gomes, D., Rodrigues, A. C., Domingues, L., y Gama, M. (2015). Cellulase recycling in biorefineries—is it possible? *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99(10), 4131–4143. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-6535-z>

- Gonçalves, F. A., Ruiz, H. A., dos Santos, E. S., Teixeira, J. A., y de Macedo, G. R. (2015). Bioethanol production from coconuts and cactus pretreated by autohydrolysis. *Industrial Crops and Products*, 77, 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.06.041>
- Gonçalves, F. A., Ruiz, H. A., Silvino dos Santos, E., Teixeira, J. A., y de Macedo, G. R. (2016). Bioethanol production by *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia stipitis* and *Zymomonas mobilis* from delignified coconut fibre mature and lignin extraction according to biorefinery concept. *Renewable Energy*, 94, 353–365. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2016.03.045>
- Gong, Y., Zhang, C., Yan, Q., He, W., Xiao, W., Lin, J., y Liu, Z. (2015). Enhanced enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse hemicellulose using recombinant glucose oxidase expressed by *Pichia pastoris*. *Industrial Crops and Products*, 77, 458–466. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.07.038>
- Gonzales, R. R., Sivagurunathan, P., y Kim, S.-H. (2016). Effect of severity on dilute acid pretreatment of lignocellulosic biomass and the following hydrogen fermentation. *International Journal of Hydrogen Energy*, 41(46), 21678–21684. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2016.06.198>
- Graf, A., y Koehler, T. (2000). Oregon cellulose-ethanol study. *Oregon Office of Energy*. Salem OR USA. Recuperado a partir de <http://www.pacificbiomass.org/documents/OregonCelluloseEthanolStudy.pdf>
- Granados, J. Á. (2015). Efecto del pretratamiento y fermentación sobre la producción de bioetanol a partir de pericarpio de maíz (Tesis para maestría en ciencia y tecnología de alimentos). Universidad Autónoma de Querétaro, Querétaro.
- Granados, J., Amaro Reyes, A., Estela García-Almendárez, B., Gracida-Rodríguez, J., y Regalado, C. (2017). Optimization of dilute acid pretreatment of corn pericarp by response surface methodology, 12, 7955–7963.
- Gupta, A., y Verma, J. P. (2015). Sustainable bio-ethanol production from agro-residues: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 41, 550–567. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2014.08.032>

- Gupta, R. (2016). Fuels, Furnaces and Refractories. Need and Their Significance. En *Fuels, Furnaces and Refractories*. PHI Learning Pvt. Ltd.
- Gusakov, A. V. (2011). Alternatives to *Trichoderma reesei* in biofuel production. *Trends in Biotechnology*, 29(9), 419–425. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2011.04.004>
- Gutiérrez-Cortez, E., Rojas-Molina, I., Zambrano-Zaragoza, M. L., Espinosa-Arbeláez, D. G., Rojas, A., García, J. C., Rodríguez-García, M. E. (2016). The mass transport phenomenon through pericarp during the nixtamalization process. *Food and Bioproducts Processing*, 100, 477–486. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2016.09.008>
- Haghighi, S., Hossein, A., Tabatabaei, M., Salehi, G., Najafi, G. H., Gholami, M., y Ardjmand, M. (2013). Lignocellulosic biomass to bioethanol, a comprehensive review with a focus on pretreatment. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 27, 77–93. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2013.06.033>
- Hendriks, A. T. W. M., y Zeeman, G. (2009). Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*, 100(1), 10–18. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.05.027>
- Horn, S. J., Vaaje-Kolstad, G., Westereng, B., y Eijsink, V. (2012). Novel enzymes for the degradation of cellulose. *Biotechnology for biofuels*, 5(1), 1.
- Hsu, T.-C., Guo, G.-L., Chen, W.-H., y Hwang, W.-S. (2010). Effect of dilute acid pretreatment of rice straw on structural properties and enzymatic hydrolysis. *Bioresource Technology*, 101(13), 4907–4913. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.10.009>
- IEA. (2011). *Technology Roadmap: Biofuels for Transport*. Francia.
- IEA. (2016). *Key World Energy Statistics*. IEA. https://doi.org/10.1787/key_energ_stat-2016-en
- Institute of Agriculture and Natural Resources. (2017). Understanding Feed Analysis. Recuperado el 2 de octubre de 2017, a partir de <https://beef.unl.edu/learning/feedanalysis.shtml>
- Ishola, M., Ylittervo, P., y Taherzadeh, M. (2015). Co-Utilization of glucose and xylose for enhanced lignocellulosic ethanol production with reverse

- membrane bioreactors. *Membranes*, 5(4), 844–856. <https://doi.org/10.3390/membranes5040844>
- Isikgor, F. H., y Becer, C. R. (2015). Lignocellulosic biomass: a sustainable platform for the production of bio-based chemicals and polymers. *Polym. Chem.*, 6(25), 4497–4559. <https://doi.org/10.1039/C5PY00263J>
- Jae, J., Tompsett, G. A., Lin, Y.-C., Carlson, T. R., Shen, J., Zhang, T., ... Huber, G. W. (2010). Depolymerization of lignocellulosic biomass to fuel precursors: maximizing carbon efficiency by combining hydrolysis with pyrolysis. *Energy y Environmental Science*, 3(3), 358. <https://doi.org/10.1039/b924621p>
- Jain, R. K., Sjöstedt, M., y Glasser, W. G. (2000). Thermoplastic xylan derivatives with propylene oxide. *Cellulose*, 7(4), 319–336.
- Jung, Y. H., y Kim, K. H. (2015). Acidic Pretreatment. En *Pretreatment of Biomass* (pp. 27–50). Elsevier. Recuperado a partir de <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128000809000037>
- Karimi, K., Shafiei, M., y Kumar, R. (2013). Progress in physical and chemical pretreatment of lignocellulosic biomass. En V. K. Gupta y M. G. Tuohy (Eds.), *Biofuel Technologies* (pp. 53–96). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. Recuperado a partir de http://link.springer.com/10.1007/978-3-642-34519-7_3
- Khare, S. K., Pandey, A., y Larroche, C. (2015). Current perspectives in enzymatic saccharification of lignocellulosic biomass. *Biochemical Engineering Journal*, 102, 38–44. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2015.02.033>
- Klass, D. L. (1998). Biomass for renewable energy, fuels, and chemicals. San Diego: Academic Press.
- Kumar, P., Barrett, D. M., Delwiche, M. J., y Stroeve, P. (2009). Methods for pretreatment of lignocellulosic biomass for efficient hydrolysis and biofuel production. *Industrial y Engineering Chemistry Research*, 48(8), 3713–3729. <https://doi.org/10.1021/ie801542g>
- Landaeta, R., Aroca, G., Acevedo, F., Teixeira, J. A., y Mussatto, S. I. (2013). Adaptation of a flocculent *Saccharomyces cerevisiae* strain to lignocellulosic inhibitors by cell recycle batch fermentation. *Applied Energy*, 102, 124–130. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2012.06.048>

- Laathanachareon, T., Bunterngsook, B., Suwannarangsee, S., Eurwilaichitr, L., y Champreda, V. (2015). Synergistic action of recombinant accessory hemicellulolytic and pectinolytic enzymes to *Trichoderma reesei* cellulase on rice straw degradation. *Bioresource Technology*, 198, 682–690. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.09.053>
- Larsson, S., Palmqvist, E., Hahn-Hägerdal, B., Tengborg, C., Stenberg, K., Zacchi, G., y Nilvebrant, N.-O. (1999). The generation of fermentation inhibitors during dilute acid hydrolysis of softwood. *Enzyme and Microbial Technology*, 24(3), 151–159.
- Leathers, T. (1988). Upgrading fuel ethanol coproducts.
- Leathers, T. (2003). Bioconversions of maize residues to value-added coproducts using yeast-like fungi. *FEMS Yeast Research*, 3(2), 133–140. [https://doi.org/10.1016/S1567-1356\(03\)00003-5](https://doi.org/10.1016/S1567-1356(03)00003-5)
- Lebaka, V. R. (2013). Potential Bioresources as Future Sources of Biofuels Production: An Overview. En V. K. Gupta y M. G. Tuohy (Eds.), *Biofuel Technologies* (pp. 223–258). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-34519-7_9
- Lee, H. V., Hamid, S. B. A., y Zain, S. K. (2014). Conversion of lignocellulosic biomass to nanocellulose: structure and chemical process. *The Scientific World Journal*, 2014, 1–20. <https://doi.org/10.1155/2014/631013>
- Lee, J. M., Venditti, R. A., Jameel, H., y Kenealy, W. R. (2011). Detoxification of woody hydrolyzates with activated carbon for bioconversion to ethanol by the thermophilic anaerobic bacterium *Thermoanaerobacterium saccharolyticum*. *Biomass and Bioenergy*, 35(1), 626–636. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2010.10.021>
- Lee, T.-Y., Kim, M.-D., Kim, K.-Y., Park, K., Ryu, Y.-W., y Seo, J.-H. (2000). A parametric study on ethanol production from xylose by *Pichia stipitis*. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 5(1), 27–31. <https://doi.org/10.1007/BF02932349>
- Lehto, J., Louhelainen, J., Huttunen, M., y Alén, R. (2017). Spectroscopic analysis of hot-water- and dilute-acid-extracted hardwood and softwood chips. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 184, 184–190. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2017.05.010>

- Li, Y.-C., Gou, Z.-X., Zhang, Y., Xia, Z.-Y., Tang, Y.-Q., y Kida, K. (2017). Inhibitor tolerance of a recombinant flocculating industrial *Saccharomyces cerevisiae* strain during glucose and xylose co-fermentation. *Brazilian Journal of Microbiology*, 48(4), 791–800. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2016.11.011>
- Li, Y.-C., Li, G.-Y., Gou, M., Xia, Z.-Y., Tang, Y.-Q., y Kida, K. (2016). Functional expression of xylose isomerase in flocculating industrial *Saccharomyces cerevisiae* strain for bioethanol production. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 121(6), 685–691. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2015.10.013>
- Limayem, A., y Ricke, S. C. (2012). Lignocellulosic biomass for bioethanol production: Current perspectives, potential issues and future prospects. *Progress in Energy and Combustion Science*, 38(4), 449–467. <https://doi.org/10.1016/j.pecs.2012.03.002>
- Linko, Y.-Y., Kautola, H., Uotila, S., y Linko, P. (1986). Alcoholic fermentation of D-xylose by immobilized *Pichia stipitis* yeast. *Biotechnology Letters*, 8(1), 47–52. <https://doi.org/10.1007/BF01044401>
- Liu, Y., Sun, B., Zheng, X., Yu, L., y Li, J. (2017). Integrated microwave and alkaline treatment for the separation between hemicelluloses and cellulose from cellulosic fibers. *Bioresource Technology*. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.08.059>
- Luterbacher, J. S., Tester, J. W., y Walker, L. P. (2010). High-solids biphasic CO₂-H₂O pretreatment of lignocellulosic biomass. *Biotechnology and Bioengineering*, 107(3), 451–460. <https://doi.org/10.1002/bit.22823>
- Maitan-Alfenas, G. P., Visser, E. M., y Guimarães, V. M. (2015). Enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass: converting food waste in valuable products. *Current Opinion in Food Science*, 1, 44–49. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2014.10.001>
- Marcotullio, G., Krisanti, E., Giuntoli, J., y de Jong, W. (2011). Selective production of hemicellulose-derived carbohydrates from wheat straw using dilute HCl or FeCl₃ solutions under mild conditions. X-ray and thermo-gravimetric analysis of the solid residues. *Bioresource Technology*, 102(10), 5917–5923. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.02.092>

- Mateo, S., Roberto, I. C., Sánchez, S., y Moya, A. J. (2013). Detoxification of hemicellulosic hydrolyzate from olive tree pruning residue. *Industrial Crops and Products*, 49, 196–203. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.04.046>
- Merino, S. T., y Cherry, J. (2007). Progress and challenges in enzyme development for biomass utilization. En L. Olsson (Ed.), *Biofuels* (Vol. 108, pp. 95–120). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/10_2007_066
- Michelin, M., y Teixeira, J. A. (2016). Liquid hot water pretreatment of multi feedstocks and enzymatic hydrolysis of solids obtained thereof. *Bioresource Technology*, 216, 862–869. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.06.018>
- Miyafuji, H., Danner, H., Neureiter, M., Thomasser, C., Bvochora, J., Szolar, O., y Braun, R. (2003). Detoxification of wood hydrolysates with wood charcoal for increasing the fermentability of hydrolysates. *Enzyme and Microbial Technology*, 32(3), 396–400.
- Mohapatra, S., Mishra, C., Behera, S. S., y Thatoi, H. (2017). Application of pretreatment, fermentation and molecular techniques for enhancing bioethanol production from grass biomass – A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 78, 1007–1032. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2017.05.026>
- Monroy, Y. M., Rodrigues, R. A. F., Sartoratto, A., y Cabral, F. A. (2016). Extraction of bioactive compounds from cob and pericarp of purple corn (*Zea mays* L.) by sequential extraction in fixed bed extractor using supercritical CO₂, ethanol, and water as solvents. *The Journal of Supercritical Fluids*, 107, 250–259. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2015.09.020>
- Mosier, N. (2005). Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*, 96(6), 673–686. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2004.06.025>
- Mussatto, S. (2004). Alternatives for detoxification of diluted-acid lignocellulosic hydrolyzates for use in fermentative processes: a review. *Bioresource Technology*, 93(1), 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2003.10.005>

- Myat, L., y Ryu, G.-H. (2014). Characteristics of destarched corn fiber extrudates for ethanol production. *Journal of Cereal Science*, 60(2), 289–296. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2014.06.006>
- Nigam, J. . (2002). Bioconversion of water-hyacinth (*Eichhornia crassipes*) hemicellulose acid hydrolysate to motor fuel ethanol by xylose-fermenting yeast. *Journal of Biotechnology*, 97(2), 107–116. [https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(02\)00013-5](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(02)00013-5)
- Nigam, J. N. (2001). Ethanol production from wheat straw hemicellulose hydrolysate by *Pichia stipitis*. *Journal of biotechnology*, 87(1), 17–27.
- Nigam, P. S., y Singh, A. (2011). Production of liquid biofuels from renewable resources. *Progress in Energy and Combustion Science*, 37(1), 52–68. <https://doi.org/10.1016/j.pecs.2010.01.003>
- Nwufo, O. C., Nwafor, O. M. I., y Igbokwe, J. O. (2016). Effects of blends on the physical properties of bioethanol produced from selected Nigerian crops. *International Journal of Ambient Energy*, 37(1), 10–15. <https://doi.org/10.1080/01430750.2013.866907>
- Park, J.-H., Cheon, H.-C., Yoon, J.-J., Park, H.-D., y Kim, S.-H. (2013). Optimization of batch dilute-acid hydrolysis for biohydrogen production from red algal biomass. *International Journal of Hydrogen Energy*, 38(14), 6130–6136. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2013.01.050>
- Patel, S. J., Onkarappa, R., y Shobha, K. S. (2007). Fungal pretreatment studies on rice husk and bagasse for ethanol production, 6(4), 1921–1926.
- Payne, C. M., Knott, B. C., Mayes, H. B., Hansson, H., Himmel, M. E., Sandgren, M., Beckham, G. T. (2015). Fungal Cellulases. *Chemical Reviews*, 115(3), 1308–1448. <https://doi.org/10.1021/cr500351c>
- Pedersen, M., Viksø-Nielsen, A., y Meyer, A. S. (2010). Monosaccharide yields and lignin removal from wheat straw in response to catalyst type and pH during mild thermal pretreatment. *Process Biochemistry*, 45(7), 1181–1186. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2010.03.020>
- Pedroli, B., Elbersen, B., Frederiksen, P., Grandin, U., Heikkilä, R., Krogh, P. H., ... Spijker, J. (2013). Is energy cropping in Europe compatible with biodiversity? – Opportunities and threats to biodiversity from land-based

- production of biomass for bioenergy purposes. *Biomass and Bioenergy*, 55, 73–86. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2012.09.054>
- Potumarthi, R., Baadhe, R. R., y Bhattacharya, S. (2013). Fermentable sugars from lignocellulosic biomass: Technical challenges. En V. K. Gupta y M. G. Tuohy (Eds.), *Biofuel Technologies* (pp. 3–27). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-34519-7_1
- Qi, X.-M., Chen, G.-G., Gong, X.-D., Fu, G.-Q., Niu, Y.-S., Bian, J., Sun, R.-C. (2016). Enhanced mechanical performance of biocompatible hemicelluloses-based hydrogel via chain extension. *Scientific Reports*, 6(1). <https://doi.org/10.1038/srep33603>
- Quiroz-Castañeda, R. E., y Folch-Mallol, J. L. (2013). Hydrolysis of biomass mediated by cellulases for the production of sugars. En *Sustainable degradation of lignocellulosic biomass - techniques, applications and commercialization* (Chandel, A y da Silva, S). Croacia: InTech.
- Resch, M. G., Baker, J. O., y Decker, S. R. (2015). Low solids enzymatic saccharification of lignocellulosic biomass. Recuperado a partir de <https://www.nrel.gov/docs/fy15osti/63351.pdf>
- RFA. (2015, mayo 14). Industry statistics. World fuel ethanol production. Recuperado el 18 de septiembre de 2017, a partir de <http://www.ethanolrfa.org/resources/industry/statistics/>
- Rocha, M. V. P., Rodrigues, T. H. S., de Macedo, G. R., y Gonçalves, L. R. B. (2009). Enzymatic hydrolysis and fermentation of pretreated cashew apple bagasse with alkali and diluted sulfuric acid for bioethanol production. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 155(1–3), 104–114. <https://doi.org/10.1007/s12010-008-8432-8>
- Rodrigues, A. C., Haven, M. Ø., Lindedam, J., Felby, C., y Gama, M. (2015). Celluclast and Cellic CTec2: Saccharification/fermentation of wheat straw, solid–liquid partition and potential of enzyme recycling by alkaline washing. *Enzyme and Microbial Technology*, 79–80, 70–77. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2015.06.019>
- Romaní, A., Pereira, F., Johansson, B., y Domingues, L. (2015). Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* ethanol strains PE-2 and CAT-1 for efficient lignocellulosic fermentation. *Bioresource Technology*, 179, 150–158. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.12.020>

- Rozanov, A. S., Kotenko, A. V., Akberdin, I. R., y Peltek, S. E. (2015). Recombinant strains of *Saccharomyces cerevisiae* for ethanol production from plant biomass. *Russian Journal of Genetics: Applied Research*, 5(4), 375–382. <https://doi.org/10.1134/S2079059715040139>
- Sá, L., de Oliveira Moutta, R., Pinto da Silva Bon, E., Christe Cammarota, M., y Santana Ferreira-Leitão, V. (2015). Fermentative biohydrogen production using hemicellulose fractions: Analytical validation for C5 and C6-sugars, acids and inhibitors by HPLC. *International Journal of Hydrogen Energy*, 40(40), 13888–13900. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2015.08.014>
- Saha, B. C. (2003). Hemicellulose bioconversion. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 30(5), 279–291. <https://doi.org/10.1007/s10295-003-0049-x>
- Saha, B. C., y Bothast, R. J. (1999). Pretreatment and Enzymatic saccharification of corn fiber. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 76(2), 65–78. <https://doi.org/10.1385/ABAB:76:2:65>
- Saha, B. C., Dien, B. S., y Bothast, R. J. (1998). Fuel ethanol production from corn fiber current status and technical prospects. En *Biotechnology for fuels and chemicals* (pp. 115–125). Springer. Recuperado a partir de http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-4612-1814-2_12
- Saha, B. C., Iten, L. B., Cotta, M. A., y Wu, Y. V. (2005). Dilute acid pretreatment, enzymatic saccharification and fermentation of wheat straw to ethanol. *Process Biochemistry*, 40(12), 3693–3700. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2005.04.006>
- Sánchez, Ó. J., y Cardona, C. A. (2008). Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks. *Bioresource Technology*, 99(13), 5270–5295. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.11.013>
- Schell, D. J., Farmer, J., Newman, M., y McMillan, J. D. (2003). Dilute-sulfuric acid pretreatment of corn stover in pilot-scale reactor. En B. H. Davison, J. W. Lee, M. Finkelstein, y J. D. McMillan (Eds.), *Biotechnology for Fuels and Chemicals* (pp. 69–85). Totowa, NJ: Humana Press. Recuperado a partir de http://link.springer.com/10.1007/978-1-4612-0057-4_6

- Scheller, H. V., y Ulvskov, P. (2010). Hemicelluloses. *Annual Review of Plant Biology*, 61(1), 263–289. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042809-112315>
- Sharma, H. K., Xu, C., y Qin, W. (2017). Biological pretreatment of lignocellulosic biomass for biofuels and bioproducts: An overview. *Waste and Biomass Valorization*. <https://doi.org/10.1007/s12649-017-0059-y>
- Shen, J., y Wyman, C. E. (2011). A novel mechanism and kinetic model to explain enhanced xylose yields from dilute sulfuric acid compared to hydrothermal pretreatment of corn stover. *Bioresource Technology*, 102(19), 9111–9120. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.04.001>
- Shukla, R., y Cheryan, M. (2001). Zein: the industrial protein from corn. *Industrial crops and products*, 13(3), 171–192.
- Sims, R. E. H., Mabee, W., Saddler, J. N., y Taylor, M. (2010). An overview of second generation biofuel technologies. *Bioresource Technology*, 101(6), 1570–1580. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.11.046>
- Sindhu, R., Binod, P., y Pandey, A. (2016). Biological pretreatment of lignocellulosic biomass – An overview. *Bioresource Technology*, 199, 76–82. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.08.030>
- Sindhu, R., Kuttiraja, M., Binod, P., Janu, K. U., Sukumaran, R. K., y Pandey, A. (2011). Dilute acid pretreatment and enzymatic saccharification of sugarcane tops for bioethanol production. *Bioresource Technology*, 102(23), 10915–10921. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.09.066>
- Singh, R. D., Bhuyan, K., Banerjee, J., Muir, J., y Arora, A. (2017). Hydrothermal and microwave assisted alkali pretreatment for fractionation of arecanut husk. *Industrial Crops and Products*, 102, 65–74. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.03.017>
- Singhania, R. R., Patel, A. K., Sukumaran, R. K., Larroche, C., y Pandey, A. (2013). Role and significance of beta-glucosidases in the hydrolysis of cellulose for bioethanol production. *Bioresource Technology*, 127, 500–507. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.09.012>
- Slininger, P. J., Bothast, R. J., Okos, M. R., y Ladisch, M. R. (1985). Comparative evaluation of ethanol production by xylose-fermenting yeasts presented high xylose concentrations. *Biotechnology Letters*, 7(6), 431–436. <https://doi.org/10.1007/BF01166218>

- Slininger, P. J., Dien, B. S., Lomont, J. M., Bothast, R. J., Ladisch, M. R., y Okos, M. R. (2014). Evaluation of a kinetic model for computer simulation of growth and fermentation by *Scheffersomyces (Pichia) stipitis* fed D-xylose fermentation simulation model. *Biotechnology and Bioengineering*, 111(8), 1532–1540. <https://doi.org/10.1002/bit.25215>
- Sugawara, M., Suzuki, T., Totsuka, A., Takeuchi, M., y Ueki, K. (1994). Composition of corn hull dietary fiber. *Starch - Stärke*, 46(9), 335–337. <https://doi.org/10.1002/star.19940460904>
- Sun, Y., y Cheng, J. (2002). Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresource technology*, 83(1), 1–11.
- Taherzadeh, M. J., y Karimi, K. (2008). Pretreatment of Lignocellulosic Wastes to Improve Ethanol and Biogas Production: A Review. *International Journal of Molecular Sciences*, 9(9), 1621–1651. <https://doi.org/10.3390/ijms9091621>
- Talebnia, F. (2015). Bioethanol from lignocellulosic wastes: Current status and future prospects. En Keikhosro Karimi (Ed.), *Lignocellulose-Based Bioproducts* (Vol. 1, pp. 175–206). Cham: Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-14033-9_5
- Toivola, A., Yarrow, D., Van Den Bosch, E., Van Dijken, J. P., y Scheffers, W. A. (1984). Alcoholic fermentation of D-xylose by yeasts. *Applied and Environmental Microbiology*, 47(6), 1221–1223.
- Tomás-Pejó, E., Ballesteros, M., Oliva, J. M., y Olsson, L. (2010). Adaptation of the xylose fermenting yeast *Saccharomyces cerevisiae* F12 for improving ethanol production in different fed-batch SSF processes. *Journal of Industrial Microbiology y Biotechnology*, 37(11), 1211–1220. <https://doi.org/10.1007/s10295-010-0768-8>
- Toribio-Cuaya, H., Pedraza-Segura, L., Macías-Bravo, S., Gonzalez-García, I., Vasquez-Medrano, R., y Favela-Torres, E. (2014). Characterization of lignocellulosic biomass using five simple Steps, 4(5), 28–47.
- Um, B.-H., Karim, M. N., y Henk, L. L. (2003). Effect of sulfuric and phosphoric acid pretreatments on enzymatic hydrolysis of corn stover. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 105(1–3), 115–126. <https://doi.org/10.1385/ABAB:105:1-3:115>

- Van Eylen, D., van Dongen, F., Kabel, M., y de Bont, J. (2011). Corn fiber, cobs and stover: Enzyme-aided saccharification and co-fermentation after dilute acid pretreatment. *Bioresource Technology*, 102(10), 5995–6004. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.02.049>
- Vázquez, M., Oliva, M., Téllez-Luis, S. J., y Ramírez, J. A. (2007). Hydrolysis of sorghum straw using phosphoric acid: Evaluation of furfural production. *Bioresource Technology*, 98(16), 3053–3060. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2006.10.017>
- Vintila, T., Dragomirescu, M., Croitoriu, V., Vintila, C., Barbu, H., Sand, C., y others. (2010). Saccharification of lignocellulose with reference to Miscanthus-using different cellulases. *Romanian Biotechnological Letters*, 15(4), 5498–5504.
- Vogel, K. P., Pedersen, J. F., Masterson, S. D., y Toy, J. J. (1999). Evaluation of a filter bag system for NDF, ADF, and IVDMD forage analysis. *Crop Science*, 39(1), 276–279.
- Vohra, M., Manwar, J., Manmode, R., Padgilwar, S., y Patil, S. (2014). Bioethanol production: Feedstock and current technologies. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 2(1), 573–584. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2013.10.013>
- Wang, L., y Chen, H. (2011). Increased fermentability of enzymatically hydrolyzed steam-exploded corn stover for butanol production by removal of fermentation inhibitors. *Process Biochemistry*, 46(2), 604–607. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2010.09.027>
- Watson, S. A., y Ramstad, P. E. (Eds.). (1987). *Corn: chemistry and technology*. St. Paul, Minn., USA: American Association of Cereal Chemists.
- Wei, N., Oh, E. J., Million, G., Cate, J. H. D., y Jin, Y.-S. (2015). Simultaneous utilization of cellobiose, xylose, and acetic acid from lignocellulosic biomass for biofuel production by an engineered yeast platform. *ACS Synthetic Biology*, 4(6), 707–713. <https://doi.org/10.1021/sb500364q>
- Wood, I. P., Elliston, A., Ryden, P., Bancroft, I., Roberts, I. N., y Waldron, K. W. (2012). Rapid quantification of reducing sugars in biomass hydrolysates: Improving the speed and precision of the dinitrosalicylic acid assay.

- Biomass and Bioenergy*, 44, 117–121.
<https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2012.05.003>
- World Bank. (2017). *World development indicators 2017*. Washington, DC.: World Bank.
- Yang, H., Wang, K., Song, X., y Xu, F. (2011). Production of xylooligosaccharides by xylanase from *Pichia stipitis* based on xylan preparation from triploid *Populus tomentosa*. *Bioresource Technology*, 102(14), 7171–7176. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.03.110>
- Yoshida, T., Sakamoto, M., y Azuma, J. (2012). Extraction of Hemicelluloses from Corn Pericarp by the NaOH-Urea Solvent System. *Procedia Chemistry*, 4, 294–300. <https://doi.org/10.1016/j.proche.2012.06.041>
- Yoshida, Tomoki, Dwianto, W., Honda, Y., Uyama, H., y Azuma, J. (2013). Removal of arabinose substituents from corn pericarp arabinoxylan, 4(1).
- Zabed, H., Sahu, J. N., Suely, A., Boyce, A. N., y Faruq, G. (2017). Bioethanol production from renewable sources: Current perspectives and technological progress. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 71, 475–501. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2016.12.076>
- Zhang, Z., Liu, B., y Zhao, Z. (Kent). (2012). Efficient acid-catalyzed hydrolysis of cellulose in organic electrolyte solutions. *Polymer Degradation and Stability*, 97(4), 573–577.
<https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2012.01.010>
- Zhao, X., Moates, G. K., Elliston, A., Wilson, D. R., Coleman, M. J., y Waldron, K. W. (2015). Simultaneous saccharification and fermentation of steam exploded duckweed: Improvement of the ethanol yield by increasing yeast titre. *Bioresource Technology*, 194, 263–269.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.06.131>
- Zheng, Y., Pan, Z., Zhang, R., y Jenkins, B. M. (2009). Kinetic modeling for enzymatic hydrolysis of pretreated creeping wild ryegrass. *Biotechnology and Bioengineering*, 102(6), 1558–1569.
<https://doi.org/10.1002/bit.22197>
- Zheng, Y., Zhao, J., Xu, F., y Li, Y. (2014). Pretreatment of lignocellulosic biomass for enhanced biogas production. *Progress in Energy and Combustion Science*, 42, 35–53.
<https://doi.org/10.1016/j.pecs.2014.01.001>

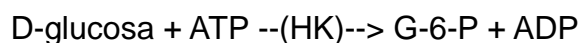
9. ANEXOS

Anexo 1. Método UV para la determinación de D-glucosa en alimentos y otros materiales. Medición en microplaca.

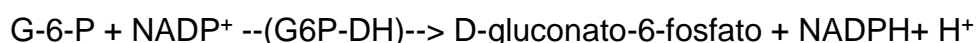
Kit R-Biopharm, catálogo N° 10 716 251 035

- **Principio del método**

La D-glucosa es fosforilada a D-glucosa-6-fosfato (G-6-P) en la presencia de la enzima hexoquinasa (HK) y adenosín-5'-trifosfato (ATP) con la formación simultánea de adenosin-5'-difosfato (ADP).



En la presencia de la enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6P-DH), G-6-P es oxidada por nicotinamida-adenina dinucleótido fosfato (NADP) a D-gluconato-6-fosfato con la formación de nicotinamida-adenina dinucleótido fosfato reducido (NADPH).



La cantidad de NADPH formada en esta reacción es estequiométrica a la cantidad de glucosa. El incremento en NADPH es medido por los promedios de su absorbancia de la luz a 340 nm.

a. **Preparación de las soluciones**

Solución 1: Se disuelve el contenido de uno de los botes N° 1 (que contiene 7.2 g de una mezcla en polvo: solución tampón de trietanolamina, pH 7.6; NADP, 110 mg; ATP, 260 mg; sulfato de magnesio) en 45 ml de agua bidestilada (agua HPLC) (estable 4 semanas a 2-8 °C o 2 meses de -15 a -20 °C).

***Preparación con 2 g del polvo:** $2 \frac{g \cdot 45ml}{7.2g} = 12.5ml$ agua bidestilada

Suspensión 2: Usar el contenido del bote N°2 (1.1 ml suspensión: hexoquinasa, 320 U; glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, 160 U), según indica la tabla 1 (estable a 2-8 °C).

b. Procedimiento

Longitud de onda: 340 nm (la absorción máxima de NADPH es a 340 nm; en espectrofotómetros, las mediciones son tomadas a la absorción máxima).

Temperatura de reacción: 20-25 °C.

Volumen final: 0.302 ml.

Solución muestra: 1-100 µg de la glucosa del ensayo (en 0.100-0.200 ml del volumen de la muestra).

Pipetear	Blanco	Muestra
A1		
Solución 1	100 µl	100 µl
Solución muestra	-	10.0 µl
Agua bidestilada	200 µl	190 µl
Mezclar y leer la absorbancia de la solución A1 después de 3 min. Empezar la reacción por la adición de:		
A2		
Suspensión 2	2.0 µl	2.0 µl
Mezclar, esperar hasta que la reacción termine (aproximadamente 10-15 min) y leer la absorbancia de la solución A2 .		
Si la reacción no ha terminado después de 15 min, continuar la lectura de las absorbancias en intervalos de 2 min hasta que la absorbancia incremente constantemente por 2 min.		

Si la absorbancia **A2** incrementa constantemente, extrapolar la absorbancia al tiempo de reacción de la suspensión 2.

Determinar la diferencia entre absorbancias (**A2-A1**) para el blanco y las muestras. Restar diferencia de absorbancias del blanco con la diferencia de absorbancias de las muestras.

$$\Delta A = (A2 - A1)_{muestra} - (A2 - A1)_{blanco}$$

Las diferencias de la medición de la absorbancia deberán, como una regla, ser menor a 0.100 unidades de absorbancia para lograr resultados suficientemente precisos.

c. Cálculos

La ecuación general para calcular la concentración es:

$$Glucosa (g/L) = \frac{\Delta A_{muestra}}{\Delta A_{estandar}} * \frac{g}{L} estandar * F$$

d. Instrucciones para ensayo

La cantidad de D-glucosa presente en las muestras del ensayo deben estar entre 1-50 µg a 340 nm. Para obtener una suficiente diferencia de absorbancia, la solución muestra debe ser diluida hasta tener de 0.08-0.5 g/L.

Tabla de dilución

Cantidad estimada de D-glucosa por litro medida a 340 nm	Dilución con agua	Factor de dilución F
<0.5 g	-	1
0.5-5.0 g	1+9	10
5.0-50 g	1+99	100
>50 g	1+999	1000

Anexo 2. Método UV para determinación de xilosa.

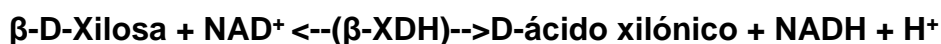
Kit K-Xilose 08/14 de Megazyme

a. Principio

La interconversión de las formas alfa y beta-anoméricas de la D-Xilosa es catalizada por la enzima xilosa mutarotasa (XMR)



La β -D-Xilosa es oxidada por NAD^+ a D-Ácido xilónico en presencia de β -Xilosa deshidrogenasa (β -XDH) a pH 7.5:



La cantidad de NADH formado en esta reacción es estequiométrica con la cantidad de D-xilosa. NADH se mide por el incremento de la absorbancia a 340 nm.

b. Kit enzimático

El kit contiene el método de ensayo completo más:

Botella 1: tampón (45 ml, pH 7,5) más azida de sodio (0,02 % p/v) como conservante. Estable durante > 2 años a 4 °C.

Botella 2: (x2) NAD + más ATP. Polvo liofilizado. Estable durante > 5 años a -20 °C.

Botella 3: suspensión hexoquinasa (2.2 ml). Estable durante > 2 años a 4 °C.

Botella solución 4: XDH/XMR (5.6 ml). Estable durante > 2 años a -20 °C.

Botella 5: solución de D-xilosa estándar (5 ml, 0.25 mg / ml). Estable durante > 2 años a 4 °C.

c. Preparación de las soluciones reactivos/suspensiones

1. Utilizar el contenido del bote 1 en las cantidades que indica la tabla. Estable por >2 años a 4 °C.

2. Disolver el contenido de uno de los botes 2 en 21 mL de agua destilada. Dividir en alícuotas de tamaño adecuado y guardarlas en tubos de polipropileno a -20 °C, mantenerse fresco durante el uso, si es posible. No disuelva el contenido de la segunda botella hasta que se requiera. Estable por >2 años a -20 °C.

3. Utilizar el contenido de la botella 3 en las cantidades que indica la tabla. Antes de abrir por primera vez, agitar la botella para eliminar cualquier proteína que pueda haber quedado en el tapón de goma. Posteriormente, almacenar la botella en una posición vertical. Estable por >2 años a 4 °C.

4. Utilizar el contenido de la botella 4 en las cantidades que indica la tabla. Antes de abrir por primera vez, agitar la botella para eliminar cualquier proteína que pueda haber quedado en el tapón de goma. Posteriormente, almacenar la botella en una posición vertical. Estable por >2 años a -20 °C.

5. Utilizar el contenido de la botella 5 en las cantidades que indica la tabla. Estable durante > 2 años a 4 °C.

d. Procedimiento del ensayo en microplatos

Longitud de onda: 340 nm.

Microplaca: 96 pozos.

Temperatura: 25 °C.

Volumen final: 0.297 mL.

Linealidad: 0.1-10 µg de D-xilosa por pozo (en 0.01-0.2 mL del volumen de la muestra).

Pipetear en cada pozo	Blanco (mL)	Muestra (mL)	Estándar (mL)
Agua destilada	0.210	0.200	0.200
Solución muestra	-	0.010	-
Solución estándar	-	-	0.010
Solución 1 (buffer)	0.040	0.040	0.040
Solución (NAD ⁺ /ATP)	2 0.040	0.040	0.040
Suspensión (Hexoquinasa)	3 0.002	0.002	0.002
Mezcla*, leer la absorbancia de las soluciones (A1) después de aproximadamente 4 min y empezar la reacción por la adición de:			
Solución (XDH/XMR)	4 0.005	0.005	0.005
Mezclar*, leer la absorbancia de las soluciones (A2) al final de la reacción (aproximadamente 6 min).			

e. Cálculos

$$Xilosa (g/L) = \frac{\Delta A_{muestra}}{\Delta A_{estándar}} * \frac{g}{L} estándar * F$$

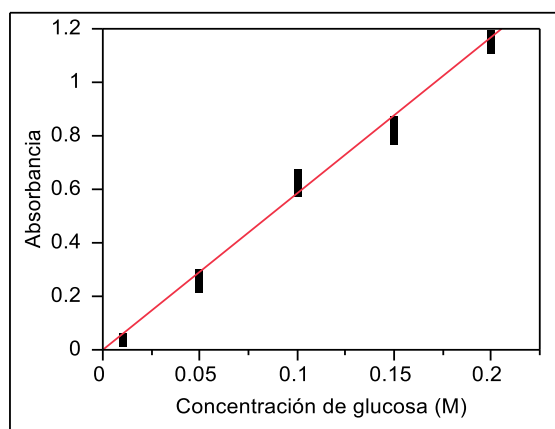
*Si se diluye la muestra durante la preparación, el resultado se debe multiplicar por el factor de dilución, F.

f. Preparación de muestras

La cantidad de D-xilosa presente en la cubeta (es decir, en el 0.1 ml de la muestra que se está analizando) debe oscilar entre 2 y 100 mg. Por tanto, la solución muestra debe ser diluida lo suficiente para producir una concentración de D-xilosa entre 0.002 y 1.00 g / L.

Estimación de la concentración de D-Xilosa (g/L)	Factor de dilución (F)	Dilución con agua
<1.00	No requiere dilución	1
1.00-10.0	1 + 9	10
10.0-100	1 + 99	100
>100	1 + 999	1000

Anexo 3. Curva estándar de glucosa para determinación de azúcares reductores de FLPH.



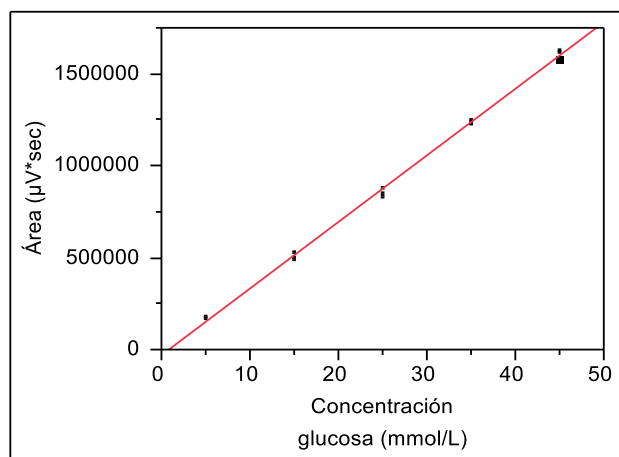
Ecuación

Absorbancia = $0.000279 + 5.8521664 \cdot \text{Concentración de glucosa (M)}$

R^2 0.99185

R^2_{Adj} 0.991636

Anexo 4. Curva estándar de glucosa para FLPH.



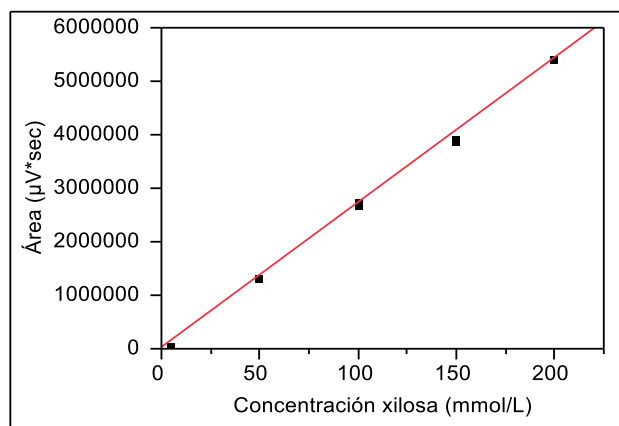
Ecuación

$$\text{Área } (\mu\text{V}\cdot\text{sec}) = -26574.45 + 36144.27 \cdot \text{Concentración glucosa (mmol/L)}$$

$$R^2 \quad 0.998611$$

$$R^2_{\text{Adj}} \quad 0.998534$$

Anexo 5. Curva estándar de xilosa para FLPH.



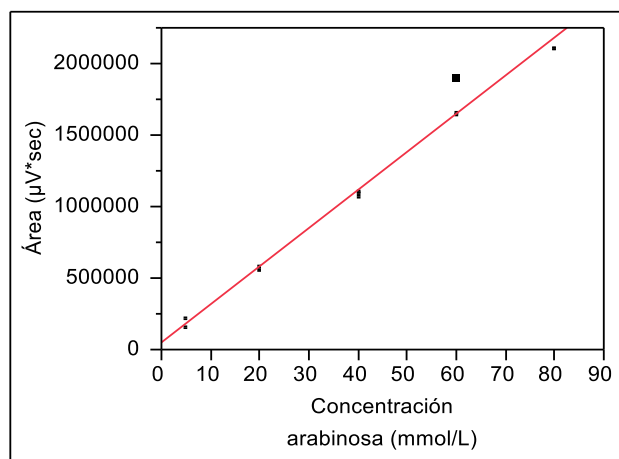
Ecuación

$$\text{Área } (\mu\text{V}\cdot\text{sec}) = 26192.485 + 27094.872 \cdot \text{Concentración xilosa (mmol/L)}$$

$$R^2 \quad 0.998959$$

$$R^2_{\text{Adj}} \quad 0.998902$$

Anexo 6. Curva estándar de arabinosa para FLPH.



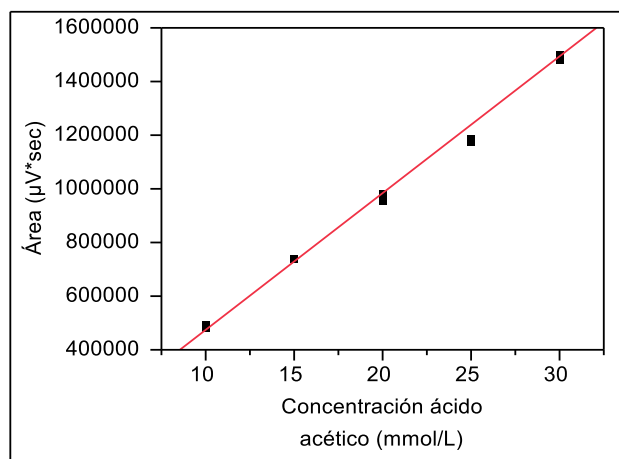
Ecuación

$$\text{Área } (\mu\text{V}\cdot\text{sec}) = 48730.836 + 26651.243 \cdot \text{Concentración arabinosa (mmol/L)}$$

$$R^2 \quad 0.980702$$

$$R^2_{\text{Adj}} \quad 0.979629$$

Anexo 7. Curva estándar de ácido acético para FLPH.



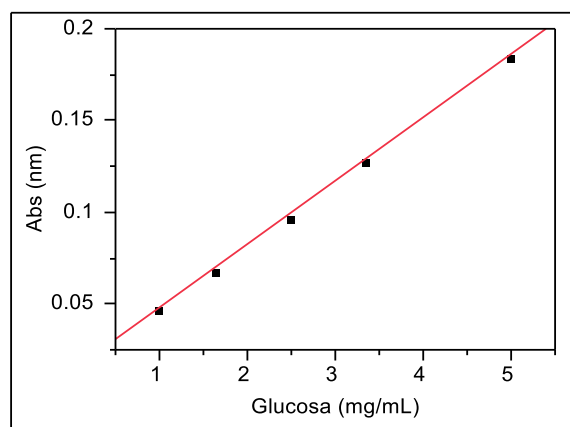
Ecuación

$$\text{Área } (\mu\text{V}\cdot\text{sec}) = -38202.05 + 51010.935 \cdot \text{Concentración ácido acético (mmol/L)}$$

$$R^2 \quad 0.991334$$

$$R^2_{\text{Adj}} \quad 0.990852$$

Anexo 8. Curva estándar de glucosa para determinación de actividad enzimática de celulasa para Cellic CTec2.



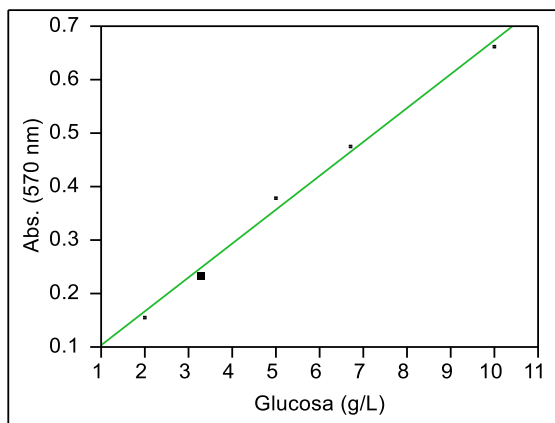
Ecuación

$$\text{Abs (nm)} = 0.0140674 + 0.0344442 * \text{Glucosa (mg/mL)}$$

$$R^2 \quad 0.999682$$

$$R^2_{\text{Adj}} \quad 0.999576$$

Anexo 9. Curva estándar de glucosa para determinación de azúcares reductores en FSPH y PM.



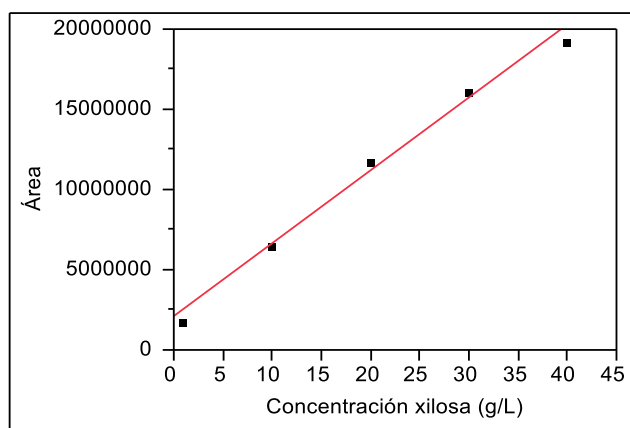
Ecuación

$$\text{Abs. (570 nm)} = 0.0383717 + 0.0635608 \cdot \text{Glucosa (g/L)}$$

$$R^2 \quad 0.994384$$

$$R^2_{\text{Adj}} \quad 0.992512$$

Anexo 10. Curva estándar de xilosa para los fermentados de la FLPH.



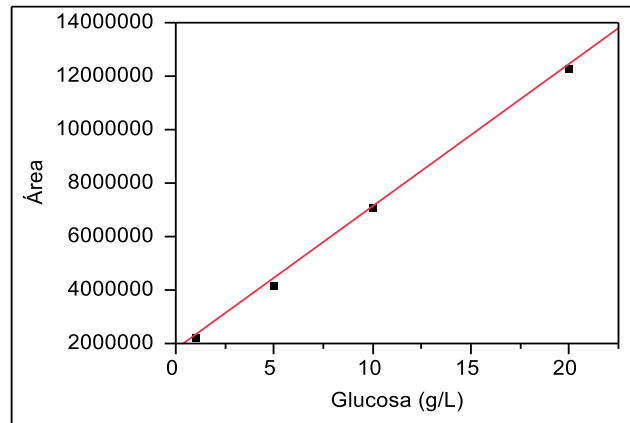
Ecuación

$$\text{Área } (\mu\text{V}\cdot\text{sec}) = 2149959.2 + 453301.02 \cdot \text{Concentración xilosa (g/L)}$$

$$R^2 \quad 0.988937$$

$$R^2_{\text{Adj}} \quad 0.98525$$

Anexo 11. Curva estándar de glucosa para fermentados de la FLPH.



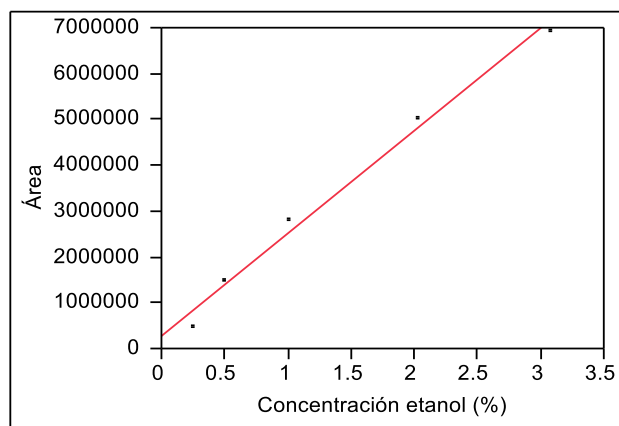
Ecuación

$$\text{Área } (\mu\text{V}\cdot\text{sec}) = 1799622.6 + 534231.64 \cdot \text{Glucosa (g/L)}$$

$$R^2 \quad 0.999505$$

$$R^2_{\text{Adj}} \quad 0.999257$$

Anexo 12. Curva estándar de etanol para fermentados de la FLPH.



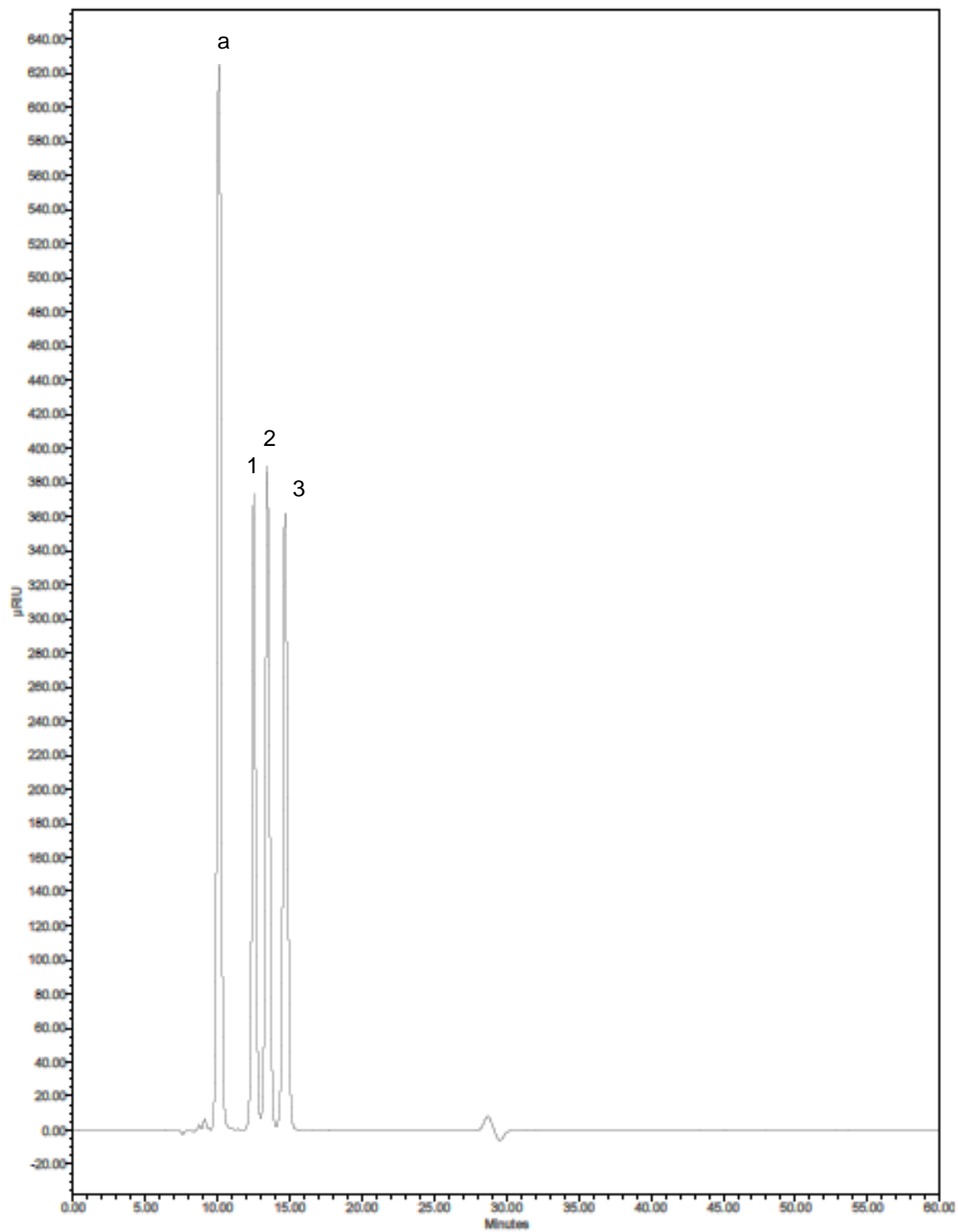
Ecuación

$$\text{Área } (\mu\text{V}\cdot\text{sec}) = 277157.28 + 2233125.6 \cdot \text{Concentración etanol } (\%)$$

$$R^2 \quad 0.988779$$

$$R^2_{\text{Adj}} \quad 0.985038$$

Anexo 13. Cromatograma para los carbohidratos identificados en hidrolizados ácidos de pericarpio de maíz. Fase móvil (H₂SO₄) (a), glucosa (1), xilosa (2), arabinosa (3).



Anexo 14. Cromatogramas de compuestos de degradación identificados en hidrolizados ácidos de pericarpio de maíz. Fase móvil (H₂SO₄) (a), ácido acético (1), furfural (2).

