



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS**

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**



**PRODUCCIÓN DE ETANOL POR SACARIFICACIÓN Y FERMENTACIÓN  
SIMULTÁNEA DE RESIDUOS PRETRATADOS DE *Zea mays***

**TESIS PROFESIONAL POR ETAPAS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
LICENCIATURA EN BIOLOGÍA**

**P R E S E N T A:**

**BRENDA MABEL CORTÉS OCAMPO**

**DIRECTOR DE TESIS:**

**Dr. LUIS CASPETA GUADARRAMA**

**CUERNAVACA, MORELOS**

**ENERO, 2021**

La presente Tesis de Licenciatura titulada "Producción de etanol por sacarificación y fermentación simultánea de residuos pretratados de *Zea mays*" fue desarrollada por Brenda Mabel Cortés Ocampo en el Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección del Dr. Luis Caspeta Guadarrama y contó con el apoyo económico del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) número TA200119.

## **Agradecimientos**

¡Gracias Dios por no abandonarme!

A mis padres, Marina y Ángel, este es un reconocimiento a todo su sacrificio y amor, ustedes hicieron posible esto. Papá esta va por ti hasta el cielo.

A las mujeres de mi vida mis hermanas, por todo su apoyo y aliento. Especialmente a mi hija Marbet por recordarme mi fuerza y valentía para lograr mis objetivos.

A mi mejor amigo y compañero Uriel porque siempre supo cómo sacarme una sonrisa y por acompañarme en este proceso.

Al Dr. Caspeta por recibirme en su grupo de trabajo, ser mi mentor, y por alentarme a seguir adelante pese a las dificultades.

A mis compañeros del Laboratorio de Ingeniería de Vías Metabólicas, en especial a mis compañeros León, Caheri, Fernando y Daniel por sus consejos y paciencia durante mi estancia en el laboratorio.

## INDICE GENERAL

Contenido	Página
1. Introducción .....	1
1.1. Abstract .....	3
2. Antecedentes .....	5
2.1. Retos actuales en la producción de etanol de segunda generación .....	5
2.1.1. Biomasa lignocelulósica .....	5
2.1.1.1 Rastrojo de <i>Zea mays</i> : disponibilidad .....	6
2.1.1.1.1 Características estructurales del rastrojo de maíz .....	7
2.2. Proceso general de producción de etanol de segunda generación .....	7
2.3. Uso de levaduras para la obtención de etanol .....	11
2.3.1 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	11
2.3.1.1. Tiempo de adición de las levaduras .....	13
2.4. Alternativas al proceso general de producción de etanol de segunda generación ....	14
2.4.1 Sacarificación y fermentación simultánea .....	17
3. Justificación .....	19
4. Hipótesis .....	20
5. Objetivos .....	21
5.1. Objetivo general .....	21
5.2. Objetivos específicos .....	21
6. Estrategia experimental .....	22
7. Materiales y métodos .....	23
7.1. Cepa de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	23
7.1.1. Preservación de las cepas .....	23
7.2. Medios de cultivo .....	23
7.3. Preparación del inoculo .....	24
7.3.1 Pre-inoculo .....	24
7.3.2 Inóculo .....	24
7.4. Cultivos en reactores .....	25
7.4.1. Rastrojo de <i>Zea Mays</i> .....	25
7.5. Sacarificación y fermentación simultanea .....	25
7.6. Determinación de carbohidratos .....	26
8.2.1. Tiempo de inoculación: 24 horas .....	31, 36
8. Resultados y discusión .....	28
8.2.1.1. Balance de masa .....	33
9. Conclusiones .....	44
10. Aportaciones y perspectivas .....	45
11. Bibliografía .....	46
12. Anexos .....	53

## INDICE DE FIGURAS

Contenido	Página
<b>Figura 1.</b> Estructura y composición química de la lignocelulosa).....	5
<b>Figura 2.</b> Esquema del proceso general para la obtención de etanol en 4 etapas .....	8
<b>Figura 3.</b> Diseño experimental basado en el desarrollo de un proceso de sacarificación y fermentación simultánea .....	22
<b>Figura 4.</b> Equipo de fermentación con 6 mini reactores o fermentadores en serie acoplados a una banda de rotación con caframos independientes y puertos de muestreo .....	26
<b>Figura 5.</b> Sacarificación de rastrojo de maíz pretratado con ácido sulfúrico diluido. Concentración de glucosa liberada en 10 y 20 % de rastrojo de maíz con carga enzimática de a) 1 % y b) 2 %.....	29
<b>Figura 6.</b> Cinéticas de SFS con las cepas de <i>S. cerevisiae</i> a) TT23 y b) S288C. Los inóculos se añadieron 24 h después de iniciar la hidrolisis enzimática. Al inicio de cargaron 20 % de sólidos y 2 % del coctel de enzimas. ....	32
<b>Figura 7.</b> Cinéticas de SFS con las cepas de <i>S. cerevisiae</i> a) TT23 y b) S288C. Los inóculos se añadieron 24 h después de iniciar la hidrolisis enzimática. Al inicio de cargaron 20 % de sólidos y 2 % del coctel de enzimas. ....	39
<b>Figura 8.</b> Modelo de superficie de respuesta tridimensional con curvatura) .....	55
<b>Figura 9.</b> Representación de las réplicas en un diseño factorial 22. ....	57

## INDICE DE TABLAS

Contenido	Página
<b>Tabla 1.</b> Composición de diferentes tipos de biomasa lignocelulósica (% en materia seca) (Adaptado de Demirbas, 2004).....	7
<b>Tabla 2.</b> Pretratamientos más utilizados para la hidrólisis no enzimática de la lignocelulosa.....	9
<b>Tabla 3.</b> Ejemplos de microorganismos que toleran altas temperaturas y que se pueden utilizar en el proceso de SFS (Choudhary, et al., 2016). .....	12
<b>Tabla 4.</b> Procesos alternativos para la producción de etanol de segunda generación	16
<b>Tabla 5.</b> Composición del medio YPD sólido con glucosa al 2% (concentraciones para 1 L) .....	24
<b>Tabla 6.</b> Carbohidratos identificados por análisis gravimétrico de sólidos remanentes después de 144 h de SFS con la cepa TT23. ....	34
<b>Tabla 7.</b> Carbohidratos identificados por análisis gravimétrico de sólidos remanentes después de 144 h de SFS con la cepa S288C.....	35
<b>Tabla 8.</b> Balance de masa global con respecto a la glucosa contenida en 20 g de sólidos añadidos a la SFS con las cepas TT23 Y S288C de <i>S. cerevisiae</i> . Los inóculos fueron adicionados a las 24 h de hidrólisis enzimática en mini-fermentadores operados a 150 rpm y 100 ml de volumen de trabajo. ....	38
<b>Tabla 9.</b> Carbohidratos identificados por análisis gravimétrico de sólidos remanentes después de 144 h de SFS con la cepa TT23. ....	40
<b>Tabla 10.</b> Carbohidratos identificados por análisis gravimétrico de sólidos remanentes después de 144 h de SFS con la cepa S288C.....	41
<b>Tabla 11.</b> Productos obtenidos de la SFS con inóculos de las cepas TT23 Y S288C de <i>S. cerevisiae</i> adicionados a las 48 h de hidrólisis enzimática en mini-fermentadores. ....	43

## 1. Resumen

La quema desmedida de combustibles fósiles ha provocado un aumento sustancial de las concentraciones de gases de efecto invernadero (GHG) en la atmósfera, especialmente de CO<sub>2</sub>. El problema relacionado con el incremento de los GHG es el cambio climático, el cual se asocia al calentamiento global que ha causado un gran deterioro ambiental (Hook y Tang, 2013). La problemática mencionada ha impulsado la búsqueda de combustibles alternativos con bajas emisiones de CO<sub>2</sub> al medio ambiente. Una solución plausible es la producción de biocombustibles mediante el uso de fuentes renovables como la biomasa – cualquier materia orgánica generada recientemente (Hughes y Benemann, 1997).

Entre los biocombustibles que más destacan se encuentra el etanol o bioetanol, el cual se fabrica a escala industrial principalmente a partir de la fermentación de los azúcares del almidón de maíz y la sacarosa de la caña de azúcar (Ragauskas *et al.*, 2006). Sin embargo, el uso de estas dos fuentes de azúcares compite con la producción de alimento, y, por lo tanto, no representan una alternativa a largo plazo para la producción de biocombustibles. Una fuente de azúcares fermentables más adecuada es la materia lignocelulósica, la cual se encuentra en abundancia ya que se puede obtener de los residuos de la agroindustria (Abril y Navarro, 2012).

La producción de etanol a partir de lignocelulosa se lleva a cabo en cuatro etapas: i) el pretratamiento; ii) la hidrólisis enzimática (sacarificación); iii) la fermentación de los azúcares a etanol con la ayuda de levaduras; y iv) la purificación del etanol. Para disminuir los costos de producción y las emisiones de CO<sub>2</sub> se ha buscado realizar la sacarificación y la fermentación simultáneas (SFS) de la celulosa generada en el pretratamiento. El reto para realizar estas dos operaciones es que los microorganismos, en especial las levaduras, no pueden fermentar a temperaturas por encima de 37°C; y, sin embargo, temperaturas mayores a 40°C son necesarias para mantener la actividad de las celulasas en nivel adecuado para asegurar una buena productividad de etanol (Caspeta *et al.*, 2019). Aunado a lo anterior, también se requiere de cargas elevadas de sólidos (lignocelulosa pretratada) para alcanzar altas concentraciones de azúcares, necesarias para producir títulos de etanol adecuados para disminuir los costos de producción, la energía utilizada en la purificación y las emisiones de CO<sub>2</sub> (Caspeta y Nielsen, 2014). Sin embargo, altas concentraciones de glucosa inhiben la actividad de las celulasas. En el presente trabajo se realizó la sacarificación por separado, así como

la SFS de celulosa de rastrojo de maíz obtenida por un pretratamiento termo-ácido. Para la SFS se utilizaron cepas de *Saccharomyces cerevisiae* resistentes a temperaturas iguales o superiores a 40°C, las cuales se obtuvieron por evolución adaptativa en laboratorio. Ambos procesos se realizaron en mini reactores con agitadores diseñados y construidos por nosotros en nuestro grupo de investigación. Los resultados generados durante la realización de esta tesis demuestran que: i) se puede lograr la sacarificación del 95% de la celulosa en procesos con alta carga de sólidos (20%), sin la inhibición total de las celulasas utilizadas; ii) se pueden generar hidrolizados con 110 g/L de glucosa, los cuales, según cálculos, son útiles para producir caldos de fermentación con hasta 55 g/L de etanol; iii) en experimentos de SFS, tanto las cepas termo tolerantes como sus parentales no evolucionadas lograron acumular 10 g/L de etanol y 2 g/L de glicerol, también se observaron remanentes de glucosa de 71 g/L, lo que sugiere una liberación total de azúcares correspondiente a 95 g/L; iv) comparado con el máximo de 110 g/L (ii), el obtenido con SFS es muy cercano y sugiere que la sacarificación es muy eficiente a 45°C; v) la productividad aumenta cuando la SFS se inocula después de 24 h con las levaduras; y iv) el etanol se destila aun a 45°C lo cual sugiere que en el proceso de SFS se puede realizar una destilación primaria del etanol producido. Con estos resultados, la perspectiva principal de este trabajo es realizar un diseño experimental de superficie de respuesta para evaluar temperaturas de SFS entre 40°C y 45°C, así como mayores inóculos de levadura para incrementar las concentraciones de etanol sin demeritar la liberación total de azúcares de la celulosa.

### 1.1. Abstract

The excessive burning of fossil fuels has led to a substantial increase in greenhouse gas concentrations (GHGs) in the atmosphere, especially CO<sub>2</sub>. The problem with the increase in GHGs is climate change, which is associated with global warming that has caused significant environmental deterioration (Hook & Tang, 2013). The above-mentioned problem has driven the search for alternative fuels with low CO<sub>2</sub> emissions into the environment. A plausible solution is the production of biofuels using renewable sources such as biomass – any newly generated organic matter (Hughes & Benemann, 1997).

Bioethanol is one of the most stand out biofuels, which is manufactured on an industrial scale mainly from the fermentation of the sugars of corn starch and the sucrose of sugar cane (Ragauskaset *al.*,2006). However, the use of these two sources of sugars competes with food production and therefore does not represent a long-term alternative to biofuels production. A more suitable source of fermentable sugars is lignocellulosic matter, which is found in abundance as it can be obtained as agro-industrial residues (April & Navarro, 2012).

The production of ethanol from lignocellulose is carried out in four stages: (i) pretreatment, (ii) enzymatic hydrolysis (saccharification), (iii) fermentation of ethanol sugars with the help of yeasts, and (iv) ethanol purification. To reduce production costs and CO<sub>2</sub> emissions, it has been sought to perform enzymatic hydrolysis and alcoholic fermentation simultaneously. The challenge for these two operations is that microorganisms, especially yeasts, cannot ferment at temperatures above 42-45 °C; however, this temperature is necessary to keep cellulase activity at the appropriate level to ensure good ethanol productivity (Caspeta *et al.*,2019). In addition, high loads of pretreated lignocellulose are also required to achieve the sugar concentrations needed to produce adequate ethanol titles to reduce production costs and CO<sub>2</sub> emissions (Caspeta & Nielsen, 2014).

However, high concentrations of glucose inhibit cellulase activity. In this work, the separate fermentation was carried out, as well as the SSF of corn stubble cellulose obtained by a thermo-acid pretreatment, for SSF, strains of *Saccharomyces cerevisiae* resistant to temperatures equal to or above 40 °C were used, which were obtained by adaptive laboratory evolution. Both processes were performed in mini reactors with agitators designed and built by us in our research group.

The results generated during the realization of this thesis show that: (i) the 95% of cellulose can be obtained in processes with high solid load (20%), without the total

inhibition of the cells used; (ii) hydrolyzed with 110 g/L glucose can be generated, which according to calculations, are useful for producing fermentation broths with up to 55 g/L of ethanol; (iii) in SSF experiments, both thermotolerant and non-evolved parental strains managed to accumulate 10 g/L of ethanol and 2 g/L of glycerol, 71 g/L glucose remnants were also observed, suggesting a total sugar release corresponding to 95 g/L; (iv) compared to the maximum of 110 g/L (ii), the one obtained with SSF is very close and suggests that the saccharification is very efficient at 45°C; (v) productivity increases when SSF is inoculated after 24 hours with yeasts; and (iv) ethanol is distilled at even 45°C, suggesting that primary distillation of the produced ethanol can be performed in the SSF process. With these results, the main perspective of this work is to perform an experimental response surface design to evaluate SSF temperatures between 40°C and 45°C, as well as higher yeast inoculums to increase ethanol concentrations without decrementing the total release of cellulose sugars.

## 2. Antecedentes

### 2.1. Retos actuales en la producción de etanol de segunda generación

#### 2.1.1. Biomasa lignocelulósica

El término “biomasa lignocelulósica”, hace referencia a la biomasa residual vegetal que no es de consumo humano y que es aprovechable para la producción de combustibles líquidos (Gomez *et al.*, 2008). Los combustibles que se obtienen a partir de la biomasa lignocelulósica se conocen como biocombustibles de segunda generación. A diferencia de los biocombustibles de primera generación, los de segunda generación compiten muy limitadamente con el uso de suelos destinados a cultivos alimenticios y del mismo modo regulan la cantidad de residuos generados por las agroindustrias. (Antizar-Ladislao, y Turrion-Gomez, 2008).

La pared celular de la materia vegetal está compuesta de lignocelulosa, la cual contiene en promedio de materia seca; celulosa, 40-60 %; hemicelulosa, 20-40%; y lignina, 10-25% (Figura 1). Estos polímeros se encuentran en proporciones diferentes dependiendo de la especie vegetal (Cuervo *et al.*, 2009).

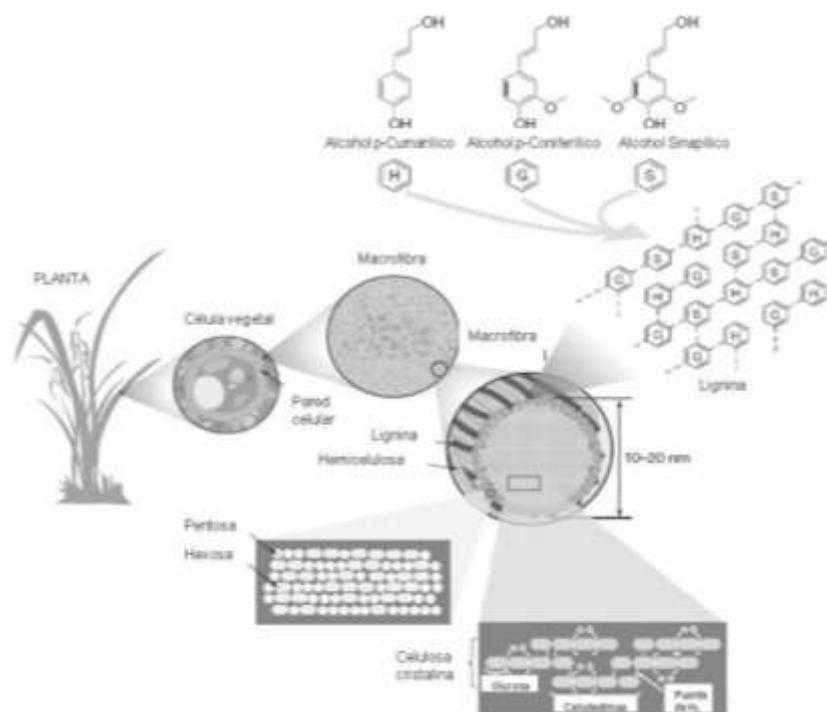


Figura 1. Estructura y composición química de la lignocelulosa (tomado de Cuervo *et al.*, 2009; Rubin, 2008)

La celulosa y hemicelulosa son polisacáridos estructurales. La primera está compuesta por monómeros de D-glucosa unidos por enlaces glucosídicos  $\beta$ -1,4, formando un

polímero cristalino. La hemicelulosa está compuesta de monómeros de pentosas (D-xilosas y L-arabinosa) y hexosas (D- glucosa, D-manosa y D-galactosa) (Figura 1). La lignina es un heteropolímero de compuestos fenólicos (alcoholes aromáticos) que brinda soporte estructural y protección a los polisacáridos estructurales. Los monómeros obtenidos de la lignina no son fermentables, por lo que este polímero es recuperado durante el proceso de producción de etanol y aprovechado para la producción de biopolímeros (Pérez *et al.*,2002; Jeffries, 1994).

Entre los diversos problemas que obstaculizan la producción de biocombustibles de segunda generación esta la elección de la biomasa, ya que existen diferentes tipos de materias primas que se pueden utilizar, sin embargo, se busca que estas cumplan las siguientes características: especies no cultivadas de rápido crecimiento en suelos marginales, con alto contenido de glucosa y bajo contenido en lignina, con una producción mínima de inhibidores de levaduras, como compuestos fenólicos y furfural, así como un suministro estable de la materia prima para garantizar la producción de bioetanol todo el año (Hadar, 2013)

En relación con lo mencionado anteriormente se ha observado que los mayores recursos para la producción de biocombustibles son las plantaciones forestales, los residuos agrícolas y subproductos orgánicos (Puri *et al.*, 2012). Las materias primas también se pueden clasificar en 4 grupos según el tipo de recursos: madera, residuos sólidos urbanos, papel de desecho y residuos de cultivos. Algunos ejemplos de estas biomásas se enuncian en la Tabla 1.

Los residuos de cultivos como la paja de trigo y el rastrojo de maíz se pueden suministrar a un precio bajo comparado con otro tipo de materias primas. Para el rastrojo de maíz, el costo total de cosecha y suministro se estima entre \$ 82.19 Mg<sup>-1</sup> (seco) y \$ 100.56 Mg<sup>-1</sup> (seco). Estos costos varían considerablemente de un área de cosecha a otra y de un año a otro, dependiendo de las condiciones climáticas (Thompson y Tyner, 2014).

#### **2.1.1.1. Rastrojo de *Zea mays*: disponibilidad**

El cultivo de maíz (*Zea mays*) es el más grande respecto a la producción global de granos, ya que se producen alrededor de 820 millones de toneladas en el mundo. Con esta producción se obtiene una cantidad proporcional de productos residuales después de su cosecha (tallo, brácteas de mazorca y espigas). Al subproducto resultante de esta actividad se le conoce como rastrojo de maíz (Somerville *et al.*, 2010; Sheehan *et al.*, 2003). Para México, en el 2017 la producción de maíz fue de 27.8 millones de toneladas (ASERCA, 2018), lo que generó un total de aproximadamente 25.5 millones de

toneladas de rastrojo de maíz. En Morelos, la cantidad de residuos producidos es de cerca de 107 mil toneladas (SAGARPA, 2015). Si por cada kg de rastrojo se obtienen 0.4 kg de celulosa (Tabla 1), entonces, solamente en Morelos se podrían obtener 43.9 mil toneladas de glucosa. Esta cantidad de azúcar se podría convertir en 21.9 mil toneladas de etanol (27.8 mil metros cúbicos de etanol).

Tabla 1. Composición de diferentes tipos de biomasa lignocelulósica (% en materia seca) (Adaptado de Demirbas, 2004)

<b>Material</b>	<b>Celulosa</b>	<b>Hemicelulosa</b>	<b>Lignina</b>
<i>Algas (verdes)</i>	20-40	20-50	-
<i>Pastos</i>	25-40	25-50	10-30
<i>Maderas duras</i>	45±2	30±5	20±4
<i>Maderas blandas</i>	42±2	27±2	28±3
<b>Rastrojo de maíz</b>	<b>38-40</b>	<b>28-32</b>	<b>7-21</b>
<i>Paja de trigo</i>	37-41	27-32	13-15
<i>Periódicos</i>	40-55	25-40	18-30
<i>Bagazo de agave</i>	43	19	15

*Fuente:* Caspeta *et al.*, (2014) ; Demirbas (2004); Rastogi y Shrivastava (2017).

#### 2.1.1.1.1. Características estructurales del rastrojo de maíz

El porcentaje de rastrojo en una planta es de alrededor de 53.4% mientras que el restante 46.6% es grano, por lo cual se puede deducir que se obtiene mayor cantidad de residuos que de grano (Reyes-Muro *et al.*, 2013). Según estudios previos, el rastrojo de maíz tiene una composición promedio de: 36.64% celulosa, 31.68 % hemicelulosa y 10.6 % lignina (Avalos *et al.*, 1985). Al contener una menor cantidad de lignina hay un mayor acceso de las enzimas a la celulosa puesto que la lignina esta formada por compuestos como: alcohol p-cumárico, alcohol coniferílico y alcohol sinapílico. Dichos compuestos fenólicos brindan rigidez a la pared celular y por tanto limitan el acceso de las enzimas a la celulosa, por esto, un mayor porcentaje de lignina en la materia vegetal implicaría un mayor número de pasos para obtener la celulosa, lo que se traduciría en un aumento en el costo de producción del etanol carburante.

#### Proceso general de producción de etanol de segunda generación

El proceso general de conversión de la biomasa lignocelulósica a etanol se lleva a cabo en 4 pasos: i) el pretratamiento, ii) la sacarificación enzimática, iii) la fermentación y iv) la purificación (Figura 2).

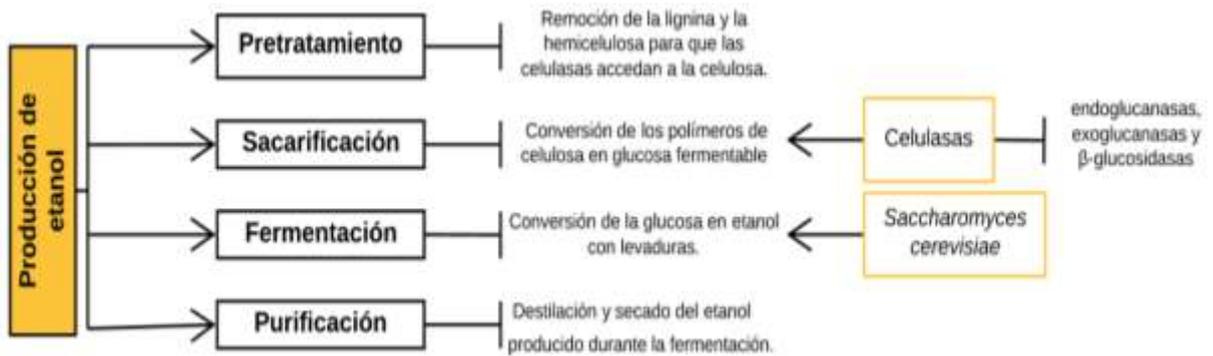


Figura 2. Esquema del proceso general para la obtención de etanol en 4 etapas (Adaptado de Nigam y Singh, 2011).

La lignina presente en la biomasa lignocelulósica reduce la accesibilidad de las enzimas a la celulosa, la cual es la fuente principal de materia prima para producir biocombustibles. Para el aprovechamiento de la energía contenida en la biomasa vegetal es necesario aplicar el pretratamiento que mejor se adecue a la especie vegetal (González, 2009).

Con el fin de obtener los azúcares contenidos en la materia vegetal se pueden llevar a cabo diferentes procesos: mecánicos (fraccionamiento, presado y reducción del tamaño), bioquímicos (fermentación y conversión enzimática), térmicos (gasificación y pirólisis) y químicos (hidrólisis ácida). Sin embargo, los hidrolizados de la biomasa requieren de un proceso de fragmentación antes de que puedan usarse en el proceso de sacarificación y fermentación. Por lo que el primer paso es el pretratamiento de la biomasa lignocelulósica, a partir de diferentes tratamientos: físicos (reducción del tamaño de las partículas), termoquímicos (hidrólisis ácida) o bioquímicos (hidrólisis enzimática) (Sifontes, 2019). De los muchos pretratamientos existentes (Tabla 2), el pretratamiento termoquímico que utiliza ácidos fuertes y calor es el más económico cuando se aplica en procesos a escala industrial y este es, por lo tanto, el más utilizado.

Tabla 2. Pretratamientos más utilizados para la hidrólisis no enzimática de la lignocelulosa.

Pretratamiento	Reactivos	Efectos de tratamiento
<sup>a</sup> Alcalino	Hidróxido de sodio, hidróxido de potasio, hidróxido de calcio, hidróxido de amonio, cal, entre otros.	Remoción de la lignina.
<sup>b</sup> Ácido diluido	Ácido sulfúrico, ácido hidroclorehídrico, ácido nítrico, ácido fosfórico, entre otros.	Fraccionamiento de la hemicelulosa.
<sup>c</sup> Organosolv	Etanol, ácido acético, ácido fórmico, ácido peracético con catálisis inorgánica y orgánica.	Remoción de la lignina y fraccionamiento de la hemicelulosa.
<sup>d</sup> Líquidos iónicos	Aniones de cloruro, formato, acetato o alquilfosfato.	Reducción de la cristalinidad de la hemicelulosa y remoción de la lignina.

Fuente: <sup>a</sup>Amiri *et al* (2014) ; <sup>b</sup>Chandel *et al* (2012); <sup>c</sup>Park y Kim (2012): <sup>d</sup>Li *et al* (2010).

Cabe mencionar que durante el pretratamiento se producen varios subproductos que actúan como inhibidores en la actividad de los microorganismos encargados de la fermentación de los azúcares como: furfural (generados a partir de las pentosas tales como xilosa y arabinosa), compuestos fenólicos y ácidos débiles (ácidos acético, fórmico y ferúlico). Es por lo que uno de los retos actuales relacionados con el proceso de producción es la aplicación de un pretratamiento que cumpla con las siguientes características: menor generación de inhibidores tóxicos durante el pretratamiento, menores demandas de energía, bajo costo y reciclaje de químicos producidos durante este proceso (Bhatia *et al.*, 2020).

El segundo paso en la producción de etanol lignocelulósico es la sacarificación. Éste es importante porque en él se obtienen los azúcares simples (monosacáridos) de la celulosa y la hemicelulosa que no se disolvieron en el pretratamiento. Estos monosacáridos son la fuente de carbono necesaria para la fermentación con diferentes

organismos. La liberación de los monosacáridos se produce a partir de la hidrólisis de los polisacáridos por diferentes enzimas como celulasas y hemicelulasas. Las celulasas son un complejo enzimático en donde actúan de forma simultánea endoglucanasas, exoglucanasas y  $\beta$ -glucosidasas, las cuales rompen los enlaces glucosídicos para liberar los azúcares contenidos en la biomasa pretratada (Anwar y Irshad , 2014). Por otro lado, las hemicelulasas o xilanasas son un grupo de enzimas que actúan sinérgicamente ( $\beta$ -xilosidasas y endo-xilanasas), estas pueden ser producidas por diversos organismos como hongos, levaduras, bacterias y micorrizas (Bribiesca, 2013). Algunas bacterias y levaduras producen estas enzimas, por lo que sería preferible el uso de este tipo de organismos en la producción de etanol. No obstante, muchos de ellos crecen muy lento y no producen etanol o tienen poca resistencia a elevadas concentraciones de éste, lo cual limita mucho su uso. La glucosa es un producto de la sacarificación y una de las fuentes de carbono más utilizada por las levaduras, como *Saccharomyces cerevisiae* debido a que estas metabolizan las hexosas a etanol muy eficientemente y de forma natural (Nelson y Cox, 2015).

El tercer paso del proceso de conversión de lignocelulosa a etanol es la fermentación. En esta etapa se utilizan organismos como *Saccharomyces cerevisiae*, la cual fermenta la glucosa a través de la glucólisis aunada a la conversión de piruvato a etanol. La primera etapa glucolítica consiste en una serie de reacciones en donde no hay oxidación ni reducción y se produce gliceraldeído-3-fosfato. En la segunda etapa se forman 2 moléculas de piruvato a partir de una serie de reacciones redox; además de formación de ATP. Finalmente, en la fermentación una última reacción redox da origen al etanol (Nelson y Cox, 2015).

El último paso en la producción de etanol carburante consiste en la purificación del etanol por medio de una doble destilación seguida de secado con solventes o malla molecular. Este último paso representa un gran consumo de energía porque requieren de cantidades significativas de calor para poder alcanzar los puntos de ebullición del etanol, por lo que involucra una mayor demanda en servicios de calefacción (Jobson, 2014).

De los pasos mencionados en este apartado, la sacarificación es la parte más costosa del proceso porque el precio de las enzimas es elevado, llegando a significar un 50% del costo de las materias primas (Caspeta y Nielsen, 2014). En este sentido, la SFS ofrece ventajas en la adición de enzima, ya que puede evitar la inhibición por sustrato de la actividad de las enzimas. Los detalles de esto se abordarán más adelante, después de discutir el uso de las levaduras en el proceso de fermentación.

## 2.2. Características de las enzimas utilizadas en la sacarificación

El coctel enzimático que se utilizó en el presente proyecto es de Novozymes (Cellic® CTec3), el cual consiste en conjunto de celulasas, hemicelulasas y niveles altos de  $\beta$ -glucosidasas.

Las características de dicho coctel enzimático son; alto rendimiento de conversión, eficaz en la conversión de altas concentraciones de sólidos, tolerancia a inhibidores, compatibilidad con diferentes materias primas y pretratamientos.

Las condiciones óptimas para la hidrólisis enzimática incluyen temperaturas en un rango de 45-55 °C (alcanzando su punto máximo de conversión a 55 °C) y pH 5.0-5.5. En estudios previos con rastrojo de maíz se ha observado que con cargas sólidas del 18% a 45 °C el rendimiento relativo de la hidrólisis es aproximadamente del 80% (Novozymes, 2017).

Una de las principales ventajas que tiene el uso de este coctel enzimático es la reducción en los costos operativos y de capital durante el proceso de optimización, por ejemplo: mayores cargas de sólidos totales y mayores títulos de etanol.

## 2.3. Uso de levaduras para la obtención de etanol.

### 2.3.1. *Saccharomyces cerevisiae*

Existe una amplia variedad de microorganismos (bacterias y hongos) que son capaces de fermentar los azúcares provenientes de la biomasa lignocelulósica, tanto por separado como simultáneamente (Tabla 3). Sin embargo, los organismos más estudiados y ampliamente utilizados para los procesos de fermentación son las levaduras (Rastogi y Shrivastava, 2017).

La levadura *Saccharomyces cerevisiae* es un hongo unicelular que se reproduce asexualmente por gemación o sexualmente. Esta levadura tiene alta capacidad fermentativa, ya que la mayor parte de su energía la obtiene por la fosforilación a nivel de sustrato de los compuestos orgánicos derivados de la glucosa, como lo es el piruvato, de la cual se obtiene como producto principal etanol y CO<sub>2</sub>. Este microorganismo juega un papel importante debido a que actúa como catalizador de la reacción de fermentación. Asimismo, la cantidad de etanol obtenido es proporcional al crecimiento de la levadura con rendimientos de 0.51 g de etanol por gramo de glucosa, el máximo posible (Suárez-Machín *et al.*, 2016).

Tabla 3. Ejemplos de microorganismos que toleran altas temperaturas y que se pueden utilizar en el proceso de SFS (Choudhary, *et al.*, 2016).

Organismo	Sustrato	Temperatura (°C)	Rendimiento de etanol (g/L)	Rendimiento de etanol (%)
<i>S. cerevisiae</i> ZMI-5	Bagazo de caña de azúcar	40	18.79	82.35
<i>K. marxianus</i> DBKKU-Y102	Jerusalem artichoke	40	97.46	92
<i>K. marxianus</i> TISTR5925	Savia de palma	40	45.4	92.2
<i>Blastobotrys ademinivorans</i> RCKP 2012	Bagazo de caña de azúcar	50	14.05	46.87
<i>Pichia kudriavzevii</i> HOP-1	Paja de arroz	45	24.25	82
<i>K. marxianus</i> OT-1	Jerusalem artichoke	40	73.6	90
<i>S. cerevisiae</i> JZ1C	Jerusalem artichoke	40	65.2	79.7
<i>S. cerevisiae</i> TJ 14	161 g/L de lodo de papel	42	40	74
<i>K. marxianus</i> IMB3	Pasto varilla	45	22.5	86
<i>S. cerevisiae</i> D <sub>5</sub> A	Pasto varilla	37	21.9	92

Los factores que más influyen en el crecimiento de *S. cerevisiae* son la temperatura, el pH y el grado alcohólico en el medio. Esta levadura crece de manera óptima a temperatura de 30°C, pH de 5 y concentraciones de etanol menores a 120 g/L (Kent, 1992; Caspeta *et al.*, 2019). Se ha observado que a temperaturas superiores a 37°C la levadura crece muy lentamente (de 0.3 1/h a 0.1 1/h) y el rendimiento de etanol disminuye considerablemente (de 0.48 g/g de glucosa consumida a 0.34 g/g), debido principalmente a la síntesis de glicerol (Caspeta *et al.*, 2014). Aunado a los factores

mencionados anteriormente también se ha observado que el crecimiento de las levaduras se ve afectado por los siguientes subproductos: compuestos fenólicos, furfural, ácido levulínico, ácido acético y ácido fórmico. La limitante principal para llevar a cabo procesos de SFS es la poca termotolerancia de la levadura.

### **2.3.2. Levaduras termo tolerantes**

Cepas termotolerantes de la levadura *S. cerevisiae* se pueden aislar de diferentes procesos de fermentación industrial u obtener por evolución adaptativa en laboratorio. Este método consiste en realizar una serie de diluciones de la población microbiana en medios frescos, manteniendo o incrementando el estrés de dicha población (Caspeta *et al.*, 2015, 20120; Elena y Lenski, 2003). Al cambiar las condiciones del medio paulatinamente, se pueden presentar cambios en los fenotipos de algunas cepas, por ejemplo; mayor tolerancia a altas temperaturas o mayor consumo de glucosa. Al estudiar la evolución de las poblaciones de interés, se pueden seguir las estrategias celulares de respuesta bajo ciertas condiciones y mejorar su desempeño para obtener un producto específico.

Para obtener etanol a partir de residuos lignocelulósicos las cepas de *S. cerevisiae* se exponen a diferentes factores inhibitorios tales como; residuos de compuestos tóxicos resultado del pretratamiento, ácidos orgánicos, altas concentraciones de etanol, cambios en el pH y altas temperaturas.

Uno de los principales problemas relacionados a la optimización del proceso de producción de etanol es la diferencia entre los rangos de temperatura óptimos para cada proceso, puesto que la actividad enzimática es mayor a altas temperaturas, la viabilidad de las levaduras se vería comprometida por este factor. En medios sometidos a altas temperaturas ( $\geq 45$  °C), las cepas de *S. cerevisiae* pueden presentar: modificaciones en las estructuras funcionales de la proteínas, mayor probabilidad de los efectos de los compuestos tóxicos, reducción de actividad metabólica y enzimática, reducción en el crecimiento celular (Caspeta *et al.*, 2015). Debido a los problemas fisiológicos causados por la temperatura, los inóculos de levadura se agregan una vez avanzada la sacarificación, por ejemplo 24 o 48 h después.

#### **2.3.2.1. Tiempo de adición de las levaduras**

Como se ha mencionado anteriormente, el crecimiento de la levadura está fuertemente influenciado por la temperatura, además de la composición del medio de cultivo. Un medio con una glucosa inicial alta puede causar inhibición por sustrato, lo que reduce

sustancialmente la eficiencia de la fermentación. Por lo anterior, para que un proceso de fermentación sea eficaz la principal preocupación es la optimización de la composición de los medios y parámetros de cultivo (Ghorbani *et al.*, 2008). En especial, se debe poner atención a las concentraciones iniciales de glucosa y la temperatura de fermentación. Lo anterior porque se desea que las concentraciones de glucosa sean elevadas para asegurar concentraciones altas de etanol. Además, concentraciones bajas de glucosa, junto con elevadas temperaturas inhiben la fermentación en las levaduras.

En diferentes estudios se ha observado que hay un descenso en la viabilidad y crecimiento de las levaduras cuando las concentraciones de glucosa en el medio aumentan de 120 a 180 gL<sup>-1</sup> debido al estrés osmótico (Yamaoka *et al.*, 2014; Ivorra *et al.*, 1999; Xu *et al.*, 1996). Por lo que se recomienda adicionar las levaduras entre las 24 h y 96 h de iniciada la sacarificación.

Por otro lado, un estudio mostro la relación que tiene el estrés osmótico en el metabolismo celular de *S. cerevisiae*, en el cual se observó que la síntesis de las enzimas involucradas en la vía glucolítica es regulada por la concentración de azúcar en el medio (Liuw *et al.*, 2014).

#### **2.4. Alternativas a los procesos de sacarificación y fermentación para la producción de etanol de segunda generación**

Para aumentar la eficacia en la producción de etanol de segunda generación, se han realizado esfuerzos por implementar procesos alternativos para integrar la hidrólisis enzimática y la fermentación. Sin embargo, dichos procesos presentan puntos a mejorar (Tabla 4).

*Hidrolisis y fermentación separadas.* La hidrolisis y fermentación separadas consisten en un proceso conformado por 2 pasos u operaciones unitarias. El primero consiste en la liberación de los azucares de la biomasa lignocelulósica pretratada. Esto se lleva a cabo con enzimas lignocelulolíticas. Este paso se realiza primero porque las enzimas tienen una actividad óptima a temperaturas cercanas a los 55°C. Esta temperatura es letal para la mayoría de los microorganismos utilizados (Tabla 3), por lo que no se pueden utilizar simultáneamente para realizar la fermentación a la temperatura optima de las enzimas. Cuando el proceso de sacarificación se finalizó, la temperatura se reduce a valores tolerados por los microorganismos fermentadores. Entonces se inocula el tanque de sacarificación con los microorganismos y se inicia la etapa de fermentación para la producción de etanol (Balat, 2011).

*Sacarificación y fermentación simultánea.* En este proceso se realiza la sacarificación y la fermentación en un solo reactor, primero se lleva a cabo la sacarificación con ayuda de enzimas lignocelulolíticas con temperaturas cercanas a los 50 °C durante un tiempo determinado, posterior a esto, se inoculan los tanques con las levaduras, para esto, es necesario bajar la temperatura para mejorar el rendimiento en la producción de etanol y la viabilidad de las levaduras (Tabla 3). La clave en este proceso de producción es que tan pronto los azúcares se forman a partir de la biomasa se convierten rápidamente en etanol (Rastogi y Shrivastava, 2017). Una de las dificultades de este proceso es el ajustar las temperaturas óptimas a cada proceso, para que el rendimiento de las levaduras y las enzimas no se vea afectado. Por otro lado, realizar 2 procesos en uno disminuye el gasto energético, lo cual se refleja en una reducción de los costos.

#### *Sacarificación y Co-fermentación simultánea*

Este proceso es similar a la sacarificación y fermentación simultánea puesto que se realiza en un solo reactor. Al igual que en la SFS, la temperatura se ajusta al valor óptimo (~50 °C) para la conversión de celulosa a glucosa y posteriormente se añaden los inóculos de levaduras. Sin embargo, este proceso tiene la variante de que se integran cultivos mixtos de levaduras para la asimilación total de los azúcares obtenidos de la biomasa lignocelulósica, tanto hexosas como pentosas. En la SFS la fermentación de las pentosas ocurre de manera separada (Montfort-Gardeazabal, s.f; Rastogi y Shrivastava, 2017).

En este proceso se utilizan cepas de levaduras modificadas, las cuales son capaces de fermentar la xilosa. Sin embargo, la co-fermentación de la xilosa y glucosa en *S. cerevisiae* se ve obstaculizada como resultado de la inhibición del transporte de xilosa por la glucosa. Esto se debe a que la glucosa y la xilosa compiten por los mismos sistemas de transporte, y la afinidad de los transportadores es menor para la xilosa. Por lo tanto, un mayor consumo de glucosa generaría mayores concentraciones de etanol, y la actividad de las levaduras que fermentan pentosas se vería inhibida (Olofsson *et al.*, 2010).

#### *Bioprocesos consolidados*

Los bioprocesos consolidados han surgido en los últimos años como una alternativa eficiente para producir etanol y ácidos orgánicos.

El enfoque de este proceso se basa en la integración de los 3 procesos de producción, al igual que las dos alternativas mencionadas anteriormente, este proceso requiere del

uso de un solo tanque, la variable radica en que este proceso se realiza a temperaturas constantes de 50°C, por lo que es una limitante, ya que las levaduras toleran temperaturas máximas de 37° C.

Tabla 4. Procesos alternativos para la producción de etanol de segunda generación

<b>Proceso</b>	<b>Ventajas</b>	<b>Desventajas</b>
<b>Hidrólisis y fermentación separadas (por sus siglas, HFS)</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Capacidad de llevar cada paso por separado en condiciones óptimas.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Inhibición de las enzimas (celulasas y <math>\beta</math>-glucosidasas) por la glucosa que es liberada y se acumula en el medio durante la hidrólisis.</li> </ul>
<b>Sacarificación y Fermentación Simultánea (por sus siglas, SFS)</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Facilidad de operación</li> <li>▪ Bajo requerimiento de equipo</li> <li>▪ Menor probabilidad de contaminación del medio por la presencia de etanol</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Dificultad de optimización debido a los requerimientos de condiciones óptimas para las enzimas y las levaduras.</li> </ul>
<b>Sacarificación y Co-fermentación simultánea (por sus siglas, SCFS)</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Bajo costo de producción</li> <li>▪ Tiempos de operación cortos</li> <li>▪ Menor probabilidad de contaminación del medio</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Mayor conversión de hexosas a etanol puesto que los organismos que utilizan esta fuente de energía crecen más rápido que los que utilizan pentosas, por lo que estos últimos son inhibidos por las altas concentraciones de etanol.</li> </ul>
<b>Bioprocesos Consolidado (por sus siglas, BPC)</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Reducción de los costos de producción</li> <li>▪ Menor equipo de operación</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Tiempos de fermentación largos</li> <li>▪ Organismos modificados con problemas de tolerancia a solventes y estabilidad genética</li> <li>▪ Menos rendimientos relacionados con la producción de biocombustibles</li> </ul>

*Fuente:* RENOVABLE, 2020; Rastogi y Shrivastava, 2017; Balat, 2011; Montfort-Gardeazabal, s.f.

Por otra parte, la clave de este proceso respecto a los mencionados anteriormente radica en el uso de un solo organismo o un consorcio de organismos que sean capaces de llevar a cabo la producción de enzimas, la hidrólisis y fermentación, reduciendo significativamente los costos de producción. Esto viene dado por la reducción del uso de reactivos químicos, así como el nulo uso de enzimas (RENOVABLE, 2020; Rastogi y Shrivastava, 2017)

Las investigaciones se han centrado en el desarrollo de microorganismos modificados que sean capaces de fermentar los azúcares contenidos en la lignocelulosa y del mismo modo que tengan actividad celulolítica. No obstante, esto ha traído consigo dificultades en la expresión de los genes de interés, puesto que, uno de los efectos negativos está relacionado con la estabilidad genética, ya que se puede producir una co-expresión de múltiples genes que limiten el metabolismo fermentativo de la levadura (RENOVABLE, 2020).

#### **2.4.1. Retos y perspectivas sobre la sacarificación y fermentación simultánea**

La sacarificación y fermentación simultánea (por sus siglas, SFS) es uno de los procesos de producción de etanol lignocelulósico más estudiados, ya que mejoran la productividad y el rendimiento de etanol. Este proceso consiste en llevar a cabo la etapa de sacarificación y la etapa de fermentación en una sola etapa. Por lo que su aplicación es importante para disminuir los costos de producción y la cantidad de energía utilizada en elevar y disminuir la temperatura (Hans *et al*, 2019). Por ejemplo, industrial. La realización de dos etapas en un solo reactor evita el calentamiento y enfriamiento del proceso lo que a su vez evita la quema de combustible para generar energía para estos dos procesos por separada y por lo tanto disminuye los costos de producción y las emisiones de CO<sub>2</sub> (Kádár *et al.*, 2004; Ballesteros *et al.*, 2002). Además, el uso de un solo tanque para ambos procesos disminuye el costo de inversión en la construcción de la planta

La SFS también requiere de una menor cantidad de enzimas, ya que el rápido consumo de la glucosa por las levaduras, al ser liberada durante la hidrólisis, evita la inhibición por sustrato de las enzimas. Por lo que, también se reduce considerablemente la cantidad de enzima utilizada. Lo anterior disminuye considerablemente el costo de materias primas utilizadas en el proceso. Otra ventaja que presenta el uso de la SFS es que se precisa de menor tiempo para la fermentación, así como una menor probabilidad

de contaminación del medio debido a las altas temperaturas utilizadas en este proceso y la presencia de etanol en el medio (Ballesteros *et al.*, 2002). Menores tiempos de procesamiento resulta en mayores productividades, menor número de unidades de procesamiento y menor inversión de capital para la construcción de la planta de proceso (Caspeta y Nielsen, 2014 )

A pesar de las ventajas de la SFS, una de las principales desventajas es que las temperaturas óptimas utilizadas para la sacarificación oscilan entre 50 y 55°C, mientras que la fermentación de los azúcares por levaduras se realiza a 35 °C como máximo.

Es por lo que el uso de cepas termotolerantes de levaduras de *S. cerevisiae* son útiles para mejorar el proceso de producción etanol utilizando SFS (Caspeta y Nielsen, 2013).

En nuestro grupo de trabajo se han generado cepas termotolerantes de *S. cerevisiae* resistentes a temperaturas iguales o superiores a 40°C. Por ejemplo, la cepa TTY23 se generó a partir de la cepa parental S288C por ingeniería evolutiva. La finalidad de esta estrategia fue obtener un fenotipo de interés en la levadura expuesta a elevada temperatura por un periodo largo de tiempo. Durante este periodo, la levadura generó mutaciones en su genoma, mismas que le confirieron el fenotipo termotolerante. (Caspeta *et al.*, 2019). La cepa S288C tiene una mutación en el gene *hap1* los cuales están relacionados con el metabolismo mitocondrial, por esta razón la cepa TTY23 presenta una baja tolerancia al etanol, para corregir esta mala adaptación se agregó potasio al medio, en donde se alcanzó un pH 5-6. Con las modificaciones anteriores se consiguió mejorar la productividad de etanol con concentraciones iniciales de glucosa muy elevadas (~300 g/L) a 40°C, con una productividad de 3.87 g·L<sup>-1</sup>·hr<sup>-1</sup>, la cual es mayor a la productividad a 30 °C (3.3 g·L<sup>-1</sup>·hr<sup>-1</sup>) (Caspeta *et al.*,2019).

### 3. Justificación

El rastrojo de maíz, por su abundancia y composición rica en azúcares y reducida en lignina, representa una materia prima con alto potencial para ser utilizada en la producción de etanol carburante, el cual se espera sustituya parcialmente el uso de gasolina, con la concomitante reducción de las emisiones de gases de efecto invernadero, como el CO<sub>2</sub>. Para que esto suceda, la producción de etanol debe ser económicamente competitiva con la de las gasolinas. Además, debe reducir el uso de energía y las emisiones netas de CO<sub>2</sub>. La sacarificación y fermentación simultánea puede ayudar con estos cometidos, pero requiere de desarrollar procesos en los que las altas concentraciones de sólidos, enzimas y los microorganismos encuentren sus límites de operación cercanos a los óptimos. En este trabajo de tesis se desarrolló investigación para obtener algunos de estos límites y generar información útil para continuar la optimización del proceso en futuras investigaciones.

#### **4. Hipótesis**

El contenido reducido de lignina en el rastrojo de maíz, la eficacia de la nueva generación de enzimas celulíticas y la disponibilidad de levaduras termotolerantes permitirán el desarrollo de un proceso de SFS para la producción de etanol a partir de este residuo agroindustrial.

## **5. Objetivos**

### **5.1. Objetivo general**

Evaluar el proceso de producción de bioetanol, mediante sacarificación y fermentación simultánea, a partir de rastrojo de maíz y levaduras termotolerantes.

### **5.2. Objetivos específicos**

- 1) Evaluar procesos de sacarificación con dos cargas altas de sólidos y dos concentraciones de enzima.
- 2) Evaluar procesos de sacarificación y fermentación simultánea utilizando dos cepas de levadura, incluida una cepa termotolerante, y periodos de adición de las levaduras de 24h y 48h.
- 3) Evaluar los rendimientos de etanol en los procesos de SFS utilizando balances de masa.

## 6. Estrategia experimental

### Estrategia experimental

Para evaluar la producción de etanol a partir de hidrolizados de residuos agroindustriales de *Zea Mays* se planteó un diseño experimental que consistió en tres etapas: i) evaluar los procesos de sacarificación con dos cargas altas de sólidos y dos concentraciones de enzima.; ii) evaluar procesos de sacarificación y fermentación simultánea utilizando dos cepas de levadura, incluida una cepa termo tolerante, y periodos de adición de las levaduras de 24h y 48h.; y iii) evaluar los rendimientos de etanol en los procesos de SFS utilizando balances de masa.

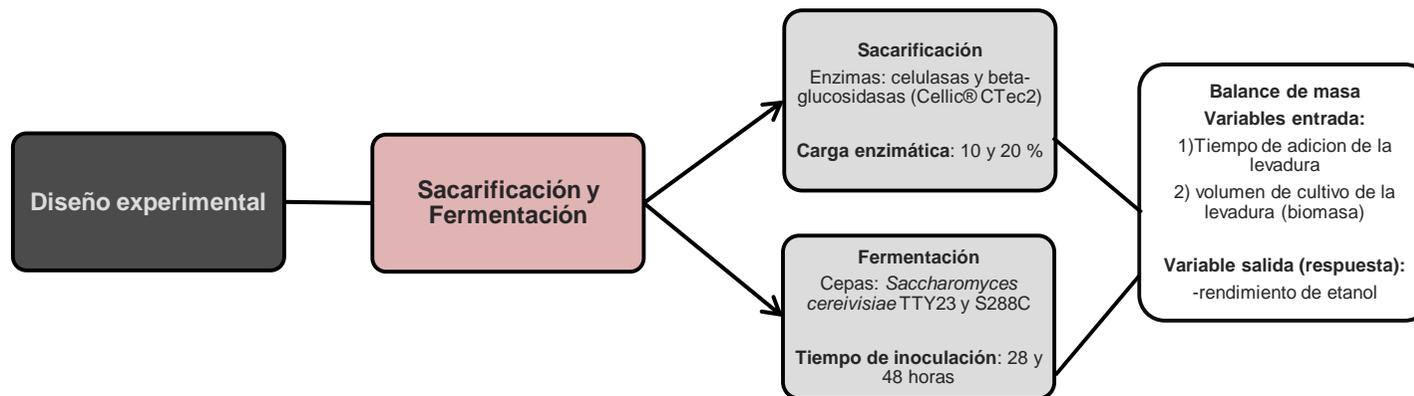


Figura 3. Diseño experimental basado en el desarrollo de un proceso de sacarificación y fermentación simultánea

## 7. Materiales y métodos

### 7.1. Cepas de *Saccharomyces cerevisiae*

Las cepas de *Saccharomyces cerevisiae* que se emplearon en el estudio son: la cepa termo tolerante TTY23 y la cepa S288C (cepa silvestre). La cepa termotolerante fue obtenida por evolución adaptativa en laboratorio. El proceso de evolución consistió en realizar pases de cultivos de poblaciones de levadura a medio fresco cada 24 h. Estos cultivos se transfirieron cada 24 horas por un año manteniendo una temperatura constante de 39 °C. El proceso de evolución finalizó cuando se detectó un mayor crecimiento de las poblaciones de levaduras en evolución. La cepa silvestre de levadura S288c, es una cepa de laboratorio con fenotipo *MAT $\alpha$  SUC2 gal2 mal2 mel flo1 flo8-1 hap1 ho bio1 bio6*.

#### 7.1.1. Preservación de las cepas

Las cepas se preservaron en crioviales con medio YPD conteniendo glucosa al 2% y glicerol al 40% a -80°C (criogenia). La composición del medio de cultivo YPD con glucosa al 2% se muestra en la Tabla 3.

### 7.2. Medios de cultivo y buffers para la sacarificación y fermentación

#### *Medio sólido para propagar las células*

Para la primera etapa se realizaron medios de cultivo YPD , como sus siglas en inglés lo indica, este medio contiene extracto de levadura (5 g/L), peptona de caseína (10 g/L) y dextrosa (20 g/L) (yeast extract Peptone Dextrose).

Para la propagación y conservación de las cepas de *S. cerevisiae* se utilizó un medio sólido YPD por lo que se añadió agar (tabla 5). Para la preparación de las cajas de Petri se utilizaron 40 mL de medio sólido YPD con glucosa al 2%, por lo que el medio contenía: 5 g/L de extracto de levadura y 10 g/L de peptona de caseína, glucosa y agar.

#### *Medio líquido para la preparación de inóculos*

Los inóculos para los cultivos principales de las cepas de *S. cerevisiae* TTY23 y S288C se prepararon en 50 mL de medio líquido YPD, el cual contenía 0.5 g de extracto de levadura, 1 g de peptona de caseína y 20 g/L de glucosa (Tabla 5).

Tabla 5. Composición del medio YPD sólido con glucosa al 2% (concentraciones para 1 L)

<b>Reactivos</b>	<b>Concentración en g/L</b>
<i>Extracto de levadura</i>	10 g
<i>Peptona de caseína</i>	20 g
<i>Glucosa</i>	20 g
<i>*Agar</i>	20 g

#### *Buffer de fosfatos para la sacarificación*

Para la sacarificación en los mini fermentadores se preparó una solución buffer de citrato a pH 5, la cual contenía 1.3 g/L de citrato de sodio, 0.65 g/L de ácido cítrico y 98 mL de agua destilada.

### **7.3. Preparación del inóculo**

#### **7.3.1. Pre-inóculo**

Las cepas TTY23 y S288C de *Saccharomyces cerevisiae* provenientes de crioviales se reactivaron en cajas de Petri con medio YPD sólido con glucosa al 2% a 30°C durante 72 horas. Para esto, se tomó una azada del cultivo líquido de los crioviales y se estrió sobre la superficie de las cajas de Petri.

#### **7.3.2. Inóculo**

Los inóculos de las levaduras utilizados para los procesos de SFS se prepararon de la siguiente manera. Con una aza de metal se tomó una colonia de las cajas de Petri y se transfirió en un tubo de cultivo que contenía medio YPD con 2% de glucosa. El tubo se incubó por 24 horas a 30 °C en una incubadora con agitación orbital. Después de este periodo, el cultivo del tubo se transfirió a matraces de 100 mL conteniendo 50 mL de medio de cultivo YPD líquido con glucosa al 2%. Los matraces se incubaron a 30°C y 300 rpm por periodos de 18 a 24 horas. El inóculo se utilizó cuando alcanzo una densidad óptica de 0.7 determinada a 660 nm. La biomasa resultante se separó por centrifugación, se lavó y se suspendió en 2 mL de agua destilada. La suspensión celular

se utilizó para inocular los hidrolizados en los mini biorreactores de hidrólisis (Caspeta *et al.*, 2014).

#### **7.4. Sacarificación y fermentación en mini-bioreactores**

##### **7.4.1. Pretratamiento del Rastrojo de *Zea Mays***

El rastrojo de maíz empleado en este trabajo se secó en el campo y se trituró en un molino antes de ser analizado y pretratado. El material triturado se separó en 3 diferentes tamaños utilizando tamices con números de malla de 20 y 80. El material que quedó retenido entre estas mallas fue el que se utilizó para un posterior pretratamiento termoquímico.

Para el pretratamiento termoquímico se utilizó H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 2% con una carga sólida de 15% (w/w). La digestión ácida se realizó a 130 °C durante 30 minutos en frascos bien sellados. A continuación, se esperó a que la temperatura en la autoclave descendiera a 85 °C (20-25 minutos) y los frascos se enfriaran a temperatura ambiente. Se tomaron alícuotas del líquido de la hidrólisis ácida para la cuantificación de xilosa, glucosa, arabinosa, ácido acético e hidroximetilfurfural (Vargas-Tah *et al.*, 2015).

##### **7.5. Sacarificación y fermentación simultánea**

La fracción sólida de los hidrolizados de rastrojo de maíz se utilizó en los procesos de sacarificación y SFS. Los procesos de sacarificación se realizaron en mini fermentadores equipados con puertos de muestreo y agitadores tipo peg-mixer construidos en nuestro laboratorio (Figura 4). El equipo completo consiste de 6 mini biorreactores de 300 mL de volumen nominal, con un volumen de trabajo de 100 mL. Cada unidad se agita con un caframo independiente, el cual está conectado a una banda de rotación movida por un motor. La velocidad de agitación se controla mediante un interruptor en el cual se fijan las rpm requeridas. Para los procesos de sacarificación se agregaron 80 mL de buffer a cada fermentador, los cuales contenían 20 g de rastrojo. Posteriormente se colocaron tapones de silicón con ejes metálicos, a los que se les adaptaron impulsores de plástico para mezclar las mezclas semisólidas. Para los procesos de SFS se agregaron 50 mL medio líquido YPD con glucosa. El pH se mantuvo constante en 5 adicionando 50 mL de una solución buffer de citrato. Posteriormente se agregaron los hidrolizados y la carga de enzimas (Cellic® CTec3-Novozymes). El inóculo de *S. cerevisiae* para realizar la fermentación se adiciono después de 24 horas. La temperatura se mantuvo a 45 °C a las RPMs en 150 rpm.

Durante todo el proceso de Sacarificación y Fermentación se tomó 1  $\mu\text{L}$ , cada 12 h, de cada fermentador, dichas muestras se centrifugaron a 4000 rpm y se tomo la fracción líquida, la cual se utilizó para hacer una dilución 1:10 para su posterior análisis en un analizador bioquímico YSI-2300 (glucosa/lactato), en el cual se cuantificó la glucosa.

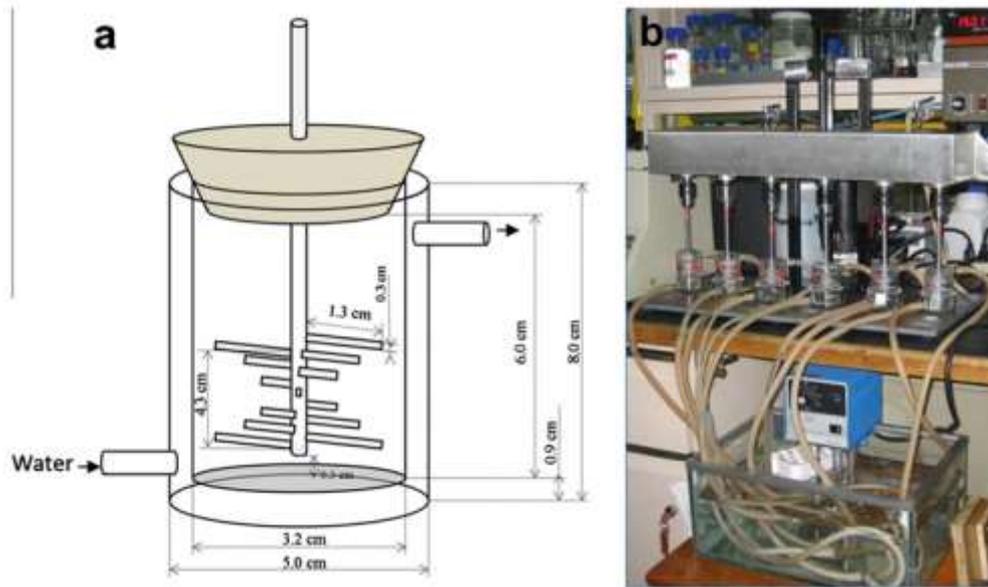


Figura 4. Equipo de fermentación con 6 mini reactores o fermentadores en serie acoplados a una banda de rotación con caframos independientes y puertos de muestreo

#### 7.6. Preparación de las muestras de sólidos remanentes de los procesos de sacarificación y SFS

Para medir los azúcares fermentables que no se liberaron durante los procesos de sacarificación, primero se trataron los sólidos remanentes con las metodologías reportadas por el Laboratorio Nacional de Energías Renovables localizado en los Estados Unidos de América (EUA). En resumen, se tomaron 0.3 g de los sólidos remanentes previamente secados de la SFS, estos contienen las fracciones de celulosa que no pudieron ser hidrolizadas. Posteriormente se colocaron en tubos de ensayo y se sometieron a hidrólisis con tratamiento ácido de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  al 72 % durante 60 minutos a 300 rpm. Al finalizar la primera hidrólisis se llevó a cabo una segunda hidrólisis ácida con  $\text{H}_2\text{SO}_4$  al 4% durante 1 hora a 121°C. Las muestras se centrifugaron para separar los sólidos de la fracción líquida, la cual contenía los carbohidratos que no fueron liberados durante la hidrólisis enzimática o consumidos durante la fermentación. Para cuantificar los carbohidratos se neutralizaron las muestras con hidróxido de sodio en un

rango de pH 5-6. Los carbohidratos y compuestos solubles se cuantificaron en HPLC con estándares de glucosa y xilosa.

## 7.7 Métodos analíticos

### *Cuantificación de glucosa en YSI*

La concentración de glucosa durante el proceso de sacarificación y fermentación se midió en periodos de 12 horas en un equipo de análisis bioquímico de glucosa y lactato YSI-2300 (STAT PLUS) con una membrana de glucosa YSI 2365. Para el equipo se utilizó un buffer interno con un estándar de 2.5 g/L de glucosa. Este último se preparó como una solución 10x, se añadió una parte de solución buffer interno por cada 9 partes de agua. Asimismo, se preparó un estándar con una concentración 10 g/L de glucosa para calibrar el equipo.

### *Cuantificación de carbohidratos y compuestos solubles en HPLC*

Los carbohidratos liberados durante la sacarificación se analizaron en HPLC, asimismo se cuantifico el etanol presente en los mini-biorreactores durante el proceso de fermentación. El HPLC se equipó con una columna de exclusión de iones Aminex HPX-87H (Bio-Rad), fase móvil de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> con un volumen de inyección de 20 µL (Sluiter *et al*, 2008) y estándares de glucosa, xilosa, glicerol y etanol.

### *Cuantificación de carbohidratos en sólidos remanentes*

Al finalizar la SFS se separaron los sólidos remanentes mediante una centrifuga Sorvall ST 16 / 16R (Thermo Scientific) a 8000 rpm y 23°C. Dicha fracción se hidrolizó para liberar la xilosa y le glucosa remanentes y medir su concentración en HPLC a las condiciones ya mencionadas.

## 8. Resultados y discusión

### 8.1. Sacarificación de rastrojo de maíz pretratado

El primer objetivo del trabajo experimental para esta tesis fue evaluar la cantidad de glucosa que se puede obtener por sacarificación de la fracción sólida del rastrojo de maíz pretratado por el método del ácido sulfúrico. En la figura 5 se muestran las cinéticas de sacarificación realizadas con 10 % y 20 % en peso seco (PS) de sólidos, y 1% y 2% en peso seco de carga de enzimas. Estos procesos de sacarificación se realizaron a 50 °C durante todo el tiempo. Con la utilización de la temperatura óptima de las enzimas de sacarificación se deseaba saber si era posible hidrolizar toda la celulosa disponible en estos sólidos pretratados. Las cinéticas se realizaron por duplicado a una velocidad de agitación de 150 rpm durante las primeras 24 horas, posteriormente se disminuyó la velocidad a 120 rpm para evitar pérdidas del material en las paredes de los mini fermentadores, estas condiciones se mantuvieron durante 70 horas para cargas de 1 % PS de enzima y 168 horas para cargas de 2 % PS de enzimas.

La sacarificación con 10 % y 20 % PS de sólidos de rastrojo de maíz pretratado muestra una velocidad máxima de liberación de glucosa durante las primeras 6 horas (Figura 5-a). Al término de este periodo se obtuvieron cerca de 15 g/L de glucosa a una velocidad de 2.5 g/L/h. Esta velocidad inicial disminuyó paulatinamente, en especial en los procesos realizados con 1 % PS seco de enzimas. Con esta carga, el contenido de glucosa al final de las 70 horas fue de 33.5 g/L. Esta concentración es menor a los 49.6 g/L obtenidos con 2% de carga de enzimas. Los resultados de estos experimentos sugieren que existe inhibición de las enzimas por la glucosa liberada. Dicha inhibición se reduce con la adición de una carga extra de enzimas. En este caso, el doble de la carga (1 % a 2 %). Este resultado correlaciona bien con lo reportado por Novozymes en su hoja de datos del coctel de enzimas. En este documento, se notifica que la carga óptima de enzimas es de 2 % a 3 % PS (Novozymes, 2017). Es de destacar que en nuestros procesos de sacarificación utilizamos el menor porcentaje del coctel enzimático reportado como óptimo.

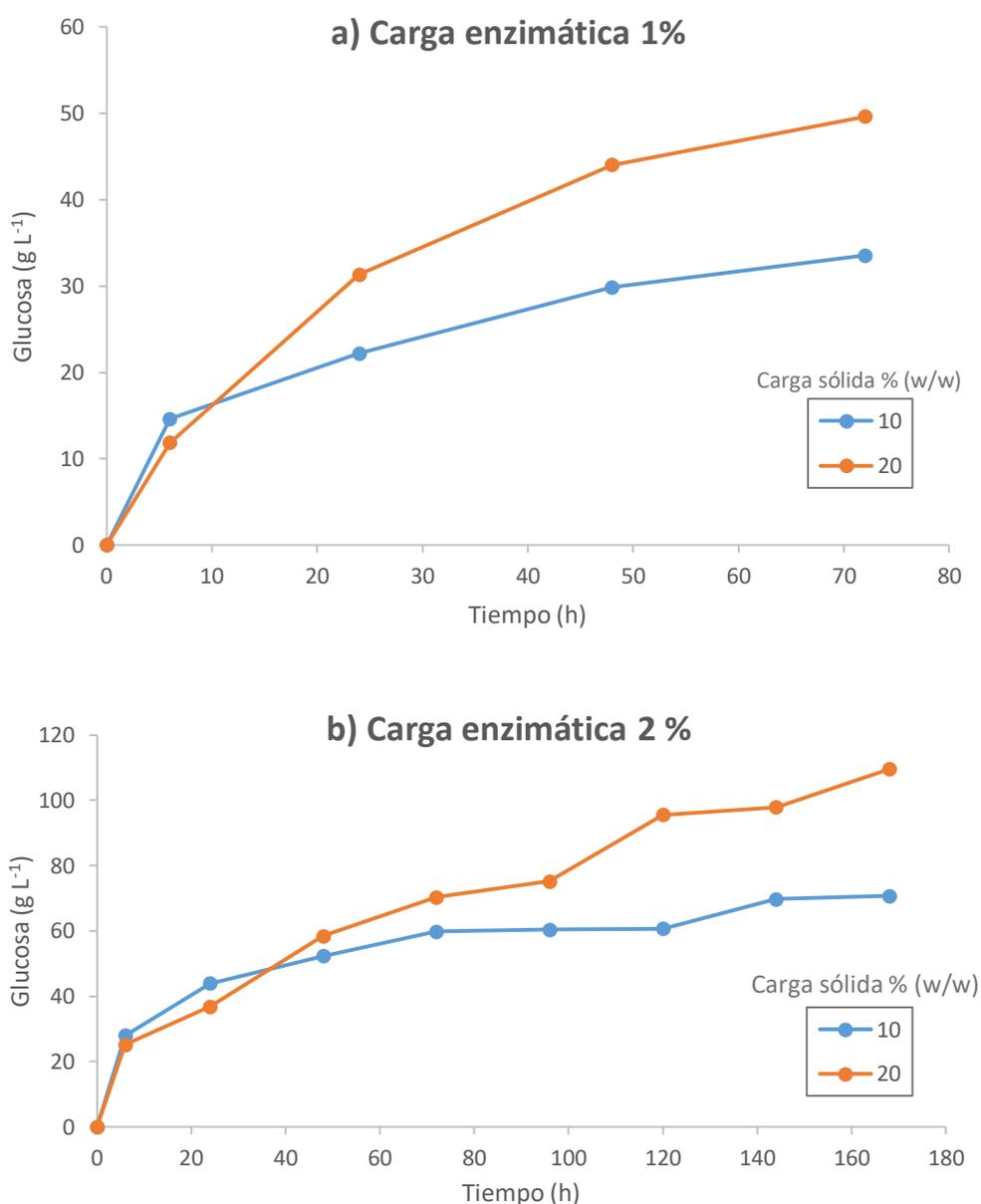


Figura 5. Sacarificación de rastrojo de maíz pretratado con ácido sulfúrico diluido. Concentración de glucosa liberada en 10 y 20 % de rastrojo de maíz con carga enzimática de a) 1 % y b) 2 %.

Se realizaron experimentos con el doble de la carga de sólidos para identificar la posibilidad de usar las mismas cargas de enzimas en procesos que liberaran una mayor cantidad de glucosa. Estos experimentos con 20 % PS de sólidos y 1 % y 2 % PS carga de enzimas se reportan en la figura 5-b. En éstos, el tiempo de sacarificación se extendió por 168 horas para evaluar si era posible hidrolizar toda la celulosa contenida en el rastrojo pretratado. Al igual que con 10 % PS de sólidos (Figura 5-a), en 20 % PS de sólidos la velocidad inicial durante las primeras 6 horas fue mayor que en el resto de la cinética. Para 1 % y 2 % PS de enzimas esta velocidad fue de 4.16 g/L/h de glucosa

liberada, la cual es cerca del doble a la obtenida con 10 % PS de sólidos. Al igual que con 10 % PS de sólidos, con 20 % la velocidad de sacarificación disminuyó paulatinamente en el tiempo. Al final de las 168 horas, se obtuvieron 70.7 y 109.6 g/L de glucosa en los experimentos con 1 % y 2 % PS de enzimas, respectivamente.

Como se esperaba, los experimentos de sacarificación con 20 % PS de sólidos rindieron una mayor concentración de glucosa que los procesos con 10 % PS. Aún a las 70 horas cuando los primeros acumularon 70.3 g/L, comparado con 49.6 g/L. Cabe destacar que, con 20 % PS de sólidos y 2 % PS de enzimas, los experimentos de sacarificación alcanzaron una concentración de glucosa de casi 110 g/L, la cual representa un porcentaje de liberación de 95 % del total contenida en la celulosa disponible en el rastrojo pretratado (esto se discute más adelante con los resultados del balance de masa).

Cabe destacar que la fermentación de los hidrolizados con 109.6 g/L de glucosa podrían producir hasta 55.8 g/L de etanol. De acuerdo con los análisis reportados por Caspeta y Nielsen (2014) y Abdel-Banat y colaboradores (2010), con esta concentración de etanol se podrían reducir los costos de destilación en un 20 % con respecto a 40 g/L de etanol, disminuyendo las emisiones de CO<sub>2</sub> en un 10 % con la reducción en el uso de combustible usado para la destilación.

En los experimentos de sacarificación con 20 % PS de rastrojo pretratado y 2 % PS de enzimas se lograron rendimientos cercanos al máximo (~95 %). Esto es de destacarse ya que en la ficha técnica del coctel enzimático de Novozymes se sugieren dosis de 1.5-3 % P/P de carga enzimática, para obtener rendimientos de sacarificación de aproximadamente 50-80% en sacarificaciones con 10% sólidos después de 5 días (Novozymes, 2017). El mayor rendimiento reportado en esta tesis se puede deber al pretratamiento ácido y la carga sólida aplicada a los experimentos mencionados en la hoja de datos. Por lo que se deduce que el mayor rendimiento se debe principalmente a la carga sólida reportada en los experimentos de Novozymes 18 % PS de rastrojo de maíz pretratado comparada con 20 % PS del presente proyecto.

En un estudio realizado en el laboratorio de Ingeniería de Vías Metabólicas del Instituto de Biotecnología, se observó que, con una carga de 15% de rastrojo de maíz previamente tratada con el mismo método reportado en esta tesis, se obtenían concentraciones de 62 gL<sup>-1</sup> de glucosa utilizando una enzima no comercial. Dado que el contenido de celulosa en este material es de 55% (Molina, 2018), se esperaría que, con 15% P/P de sólidos, la concentración máxima de glucosa liberada fuera de 82.5 g/L, lo

cual sugiere que el porcentaje liberado en el trabajo previo es de 75 %. Tomando la misma base de cálculo, se esperaría que en los ensayos realizados en esta investigación (20% PP de sólidos) se obtuvieran aproximadamente  $110 \text{ gL}^{-1}$  de glucosa. Esta es exactamente la concentración observada. Sin embargo, debido a la evaporación del medio y la concomitante concentración de la glucosa, el rendimiento es de alrededor de 95% como se verá más adelante.

## **8.2. Sacarificación y Fermentación Simultánea**

De los experimentos descritos en el apartado anterior inmediato se concluyó que la carga enzimática del 2 % P/P y la cantidad de sólidos del 20 % P/P eran adecuados para continuar con la investigación. Así que se usaron estos parámetros para evaluar el efecto del tiempo de inoculación y la cepa de levadura utilizada en la cantidad de azúcares liberados y el etanol producido en procesos de SFS. Los tiempos de inoculación de la cepa parental (silvestre) y termotolerante fueron 24 y 48 horas. Los experimentos se realizaron en mini-fermentadores equipados con agitadores tipo Peg-Mixer y control de temperatura y agitación. Esta última se mantuvo en 150 rpm durante las primeras 24 horas y 120 rpm durante el resto del proceso. La temperatura se mantuvo en  $50 \text{ }^\circ\text{C} \pm 0.2 \text{ }^\circ\text{C}$  hasta el tiempo de inoculación, cuando se disminuyó a  $45 \text{ }^\circ\text{C} \pm 0.1 \text{ }^\circ\text{C}$ . Esta última temperatura se mantuvo así por el resto del proceso. Las  $\text{DO}_{600\text{nm}}$  medidas en los inóculos para ambas cepas fueron de 0.77 (biomasa centrifugada de 40 mL equivalente a 0.103 g). Con esta biomasa se aseguraron concentraciones de células de levaduras de 1.03 g/L. Durante los procesos de SFS se tomaron muestras cada 12 horas para determinar las concentraciones de glucosa, xilosa, etanol y glicerol.

### **8.2.1. SFS con tiempo de inoculación de 24 horas**

Al concluirse el primer día, cuando sólo se efectuaba la sacarificación del rastrojo de maíz, se observó una producción de 40 g/L de glucosa promedio en ambos experimentos (Figura 6). Esta concentración es muy semejante a la reportada para la sacarificación mostrada en la Figura 5, lo cual sugiere la reproducibilidad del sistema de experimentación utilizado para SFS. A la adición de las dos cepas de levadura, la termotolerante y la silvestre, y después de un día, la glucosa dejó de acumularse en la SFS con la cepa tolerante y se acumuló ligeramente en el de la cepa silvestre. Al mismo tiempo, el etanol se acumuló en 10.76 g/L y 10.97 g/L, respectivamente.

Cuando concluyo el tercer día, las concentraciones de glucosa y etanol en la SFS con la levadura termotolerante eran de 25.7 g/L y 6.7 g/L respectivamente, mientras que con la silvestre de 51 g/L y 4.076 g/L respectivamente.

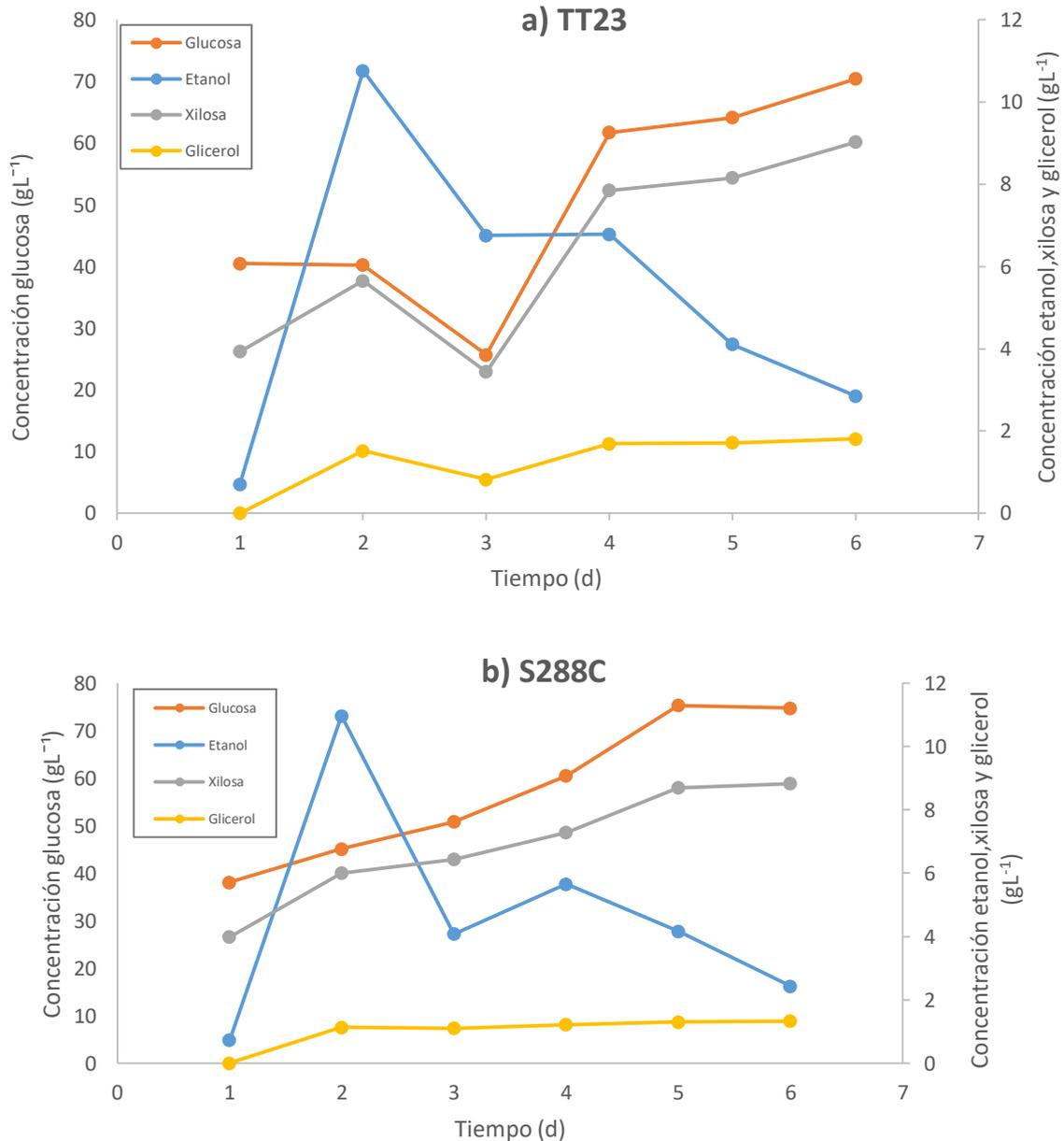


Figura 6. Cinéticas de SFS con las cepas de *S. cerevisiae* a) TT23 y b) S288C. Los inóculos se añadieron 24 h después de iniciar la hidrólisis enzimática. Al inicio de cargaron 20 % de sólidos y 2 % del coctel de enzimas.

Los resultados anteriores sugieren lo siguiente. La producción de etanol es ligeramente mayor con la cepa termotolerante que con la silvestre. Al primer y tercer día de SFS, las

concentraciones de glucosa con las cepas termotolerante y silvestre fueron de 40 g/L y 25.7 g/L, y de 38 g/L y 51 g/L respectivamente. En la sacarificación con 20 % sólidos y 2 % enzima se acumularon cerca de 70 g/L de glucosa al tercer día. Considerando esta cantidad como base, los experimentos con las cepas tolerante y silvestre podrían haber acumulado 22 g/L y 11 g/L de etanol al tercer día. Esto es, las cepas tolerante y silvestre habrían consumido  $70 \text{ g/L} - 25.7 \text{ g/L} = 44.3 \text{ g/L}$  y  $70 \text{ g/L} - 51 \text{ g/L} = 19 \text{ g/L}$  de glucosa al terminar el tercer día. Si toda esta glucosa consumida se transformó en etanol con 0.5 % de eficiencia, entonces se genera el etanol calculado (22 g/L y 11 g/L).

Al finalizar el 6to día de SFS, las concentraciones de glucosa y etanol para los procesos con las cepas termotolerante y silvestre fueron de 70.5 g/L y 2.9 g/L y de 74.7 g/L y 2.8 g/L, respectivamente. Las diferencias en estas concentraciones, aunque menores comparadas con los días 2 y 3, también sugieren un mayor consumo de glucosa y una mayor producción de etanol en la SFS con la cepa termotolerante.

Aun cuando no se monitoreó la cantidad de etanol evaporado, estas evidencias sugieren que es mayor la cantidad de etanol producido en la SFS con la cepa termotolerante. En experimentos de SFS con 2 % celulosa comercial y 5 % de enzima reportados por el ex-estudiante de nuestro grupo de investigación, el Lic. Libni A. Mass Hernández, se observó que la concentración y la productividad de etanol eran 1.3 y 2.3 veces mayor en los procesos con la cepa termotolerante comparado con los realizados con la silvestre realizados por 30 horas (Datos no publicados).

#### *Balances de masa de las SFS con las cepas TT23 y S288C.*

Las fracciones sólidas remanentes de los procesos de SFS se sometieron a procesos de hidrólisis y análisis gravimétrico para determinar la cantidad de azúcares que no se lograron sacarificar. Esta información sirvió para realizar balances de masa y valorar detalladamente los rendimientos de la SFS con las cepas termotolerante y silvestre de levadura inoculadas a las 24 horas.

#### *Balance de masa con la Cepa TT23.*

El balance de masa general para la SFS con la cepa termotolerante se planteó de la siguiente manera:

$$\text{Entrada} = \text{acumulación} + \text{salida}$$

En este balance, la Entrada es la cantidad de glucosa contenida en el rastrojo de maíz pretratado (celulosa) - *GRP*. La Acumulación se definió como la glucosa hidrolizada de la celulosa y contenida en el hidrolizado (fracción líquida), así como la glucosa en sólidos no sacarificados (*GH* + *GSNS*). Por último, la Salida se consideró como la glucosa transformada en productos de fermentación (*GTPF*). Se esta manera, el balance queda como sigue:

$$GRP = GH + GSNS + GTPF$$

Dado que se contaba con información de la *GRP*, la *GH* y la *GTPF* (Apartado anterior inmediato), lo único que faltaba era la información de la *GSNS*. Esta información se obtuvo del análisis cuantitativo de los sólidos remanentes de la SFS.

En la tabla 6 se muestra el resultado del análisis gravimétrico de sólidos remanentes. Para el ensayo se utilizaron 0.3 g de sólidos, los cuales fueron lavados para eliminar la glucosa hidrolizada. Como se puede observar, la cantidad de glucosa remanente es de 0.11 g. Esto indica que el porcentaje de glucosa en sólidos remanentes fue de 36 %. Al final del proceso de SFS habían 10.3 g de sólidos no hidrolizados. Por lo que la cantidad de *GSNS* para este experimento fue de:  $10.3 \text{ g} \times 0.36 = 3.7 \text{ g}$ .

Tabla 6. Carbohidratos identificados por análisis gravimétrico de sólidos remanentes después de 144 h de SFS con la cepa TT23.

<b>Carbohidratos en sólidos remanentes (0.3 g)</b>		
	Concentración (g/L)	Peso (g)
<b>Glucosa</b>	1.286	0.11
<b>Xilosa</b>	0.186	0.016
<b>Total</b>	1.472	0.126

Para obtener la *GTPF*, las concentraciones de etanol y glicerol se multiplicaron por los rendimientos de conversión, 0.55 g/g para la conversión de glucosa a etanol y 0.74 g/g para la conversión de glucosa a glicerol. Así, para la producción valorada de etanol se tiene que *GTPF* para etanol es  $22 \text{ g/L} / 0.55 \text{ g/g} = 40 \text{ g/L}$  de glucosa. Para el glicerol  $1.8 \text{ g/L} / 0.74 = 2.43 \text{ g/L}$ . Al final del proceso de SFS se obtuvieron 72.7 mL de hidrolizado

en promedio. Multiplicando este volumen por las cantidades de glucosa que se transformaron en etanol y glicerol se obtiene la  $GTPF - \left[ \left( 40 \frac{g}{L} \right) (72.7 mL) \left( \frac{1}{1000} \right) \right] + \left[ \left( 2.43 \frac{g}{L} \right) (72.7 mL) \left( \frac{1}{1000} \right) \right] = 3.08$ . La GH se calcula  $\left[ \left( 70.46 \frac{g}{L} \right) (72.7 mL) \left( \frac{1}{1000} \right) \right] = 5.12 g$ .

Sumando los resultados anteriores se obtiene que  $GH + GSNS + GTPF = 5.12 + 3.7 + 3.08 = 11.9 g$ . Esta cantidad es la glucosa contenida en el rastrojo pretratado. Sabemos que el porcentaje de celulosa contenida en rastrojo de maíz pretratado es de 0.55 g de celulosa por g de rastrojo. Si se utilizaron 20 g de este material, entonces podemos calcular la cantidad de glucosa contenida como 1.11 (factor de conversión de celulosa a glucosa) x 20 g x 0.55 g/g = 12.21 g.

Del cálculo anterior se desprende que el balance de masa realizado para la SFS con la cepa termo tolerante cubre el 97 % de la glucosa que se encuentra en el rastrojo de maíz pretratado, esto es  $11.9 g / 12.21 g \times 100$ .

*Balance de masa con la cepa S288C.* Como se puede observar, la cantidad de glucosa remanente para este experimento fue de 0.11 g (Tabla 7). Esto indica que el porcentaje de glucosa en sólidos remanentes fue de 0.36%. Al final del proceso de SFS habían 9.96 g de sólidos no hidrolizados. Por lo que la cantidad de GSNS para este experimento fue de  $9.96 g \times 0.36 = 3.58 g$ .

Tabla 7. Carbohidratos identificados por análisis gravimétrico de sólidos remanentes después de 144 h de SFS con la cepa S288C

<b>Carbohidratos en sólidos remanentes (0.3 g)</b>		
	Concentración (g/L)	Peso (g)
<b>Glucosa</b>	1.28	0.11
<b>Xilosa</b>	0.183	0.015
<b>Total</b>	1.463	0.125

Como mencionaba anteriormente, para el cálculo de la  $GTPF$ , las concentraciones de etanol y glicerol se multiplicaron por los rendimientos de conversión, 0.55 g/g para la conversión de glucosa a etanol y 0.74 g/g para la conversión de glucosa a glicerol. Así,

para la producción valorada de etanol se tiene que *GTPF* para etanol es  $11 \text{ g/L} / 0.55 \text{ g/g} = 20 \text{ g/L}$  de glucosa. Para el glicerol  $1.3 \text{ g/L} / 0.74 = 1.75 \text{ g/L}$ . Al final del proceso de SFS se obtuvieron 72.7 mL de hidrolizado en promedio. Multiplicando este volumen por las cantidades de glucosa que se transformaron en etanol y glicerol se obtiene la *GTPF* –  $\left[ \left( \left( 20 \frac{\text{g}}{\text{L}} \right) (72.7 \text{ mL}) \left( \frac{1}{1000} \right) \right) + \left( \left( 1.75 \frac{\text{g}}{\text{L}} \right) (72.7 \text{ mL}) \left( \frac{1}{1000} \right) \right) \right] = 1.58 \text{ g}$  de *GTPF*. La *GH* se calcula  $\left[ (74.7 \text{ g/L}) (72.7 \text{ mL}) \left( \frac{1}{1000} \right) \right] = 5 \text{ g}$ .

Sumando los resultados anteriores se obtiene que  $GH + GSNS + GTPF = 5.0 \text{ g} + 3.58 \text{ g} + 1.58 \text{ g} = 10.16 \text{ g}$ . Esta cantidad es la glucosa contenida en el rastrojo pretratado. Sabemos que el porcentaje de celulosa contenida en rastrojo de maíz pretratado es de 0.55 g de celulosa por g de rastrojo. Si se utilizaron 20 g de este material, entonces podemos calcular la cantidad de glucosa contenida como 1.11 (factor de conversión de celulosa a glucosa)  $\times 20 \text{ g} \times 0.55 = 12.21 \text{ g}$ .

Del cálculo anterior se desprende que el balance de masa realizado para la SFS con la cepa silvestre cubre el 83 % de la glucosa que se encuentra en el rastrojo de maíz pretratado, esto es  $10.16 \text{ g} / 12.21 \text{ g} \times 100$ .

#### *Interpretación de los balances de masa.*

El balance de masa global para las dos cepas se presenta en la Tabla 8. De los resultados obtenidos de dicho análisis se encontró que para la cepa termotolerante y silvestre la cantidad de glucosa en sólidos remanentes fue muy similar (0.36 %). Sin embargo, en concordancia con los cálculos presentados en el balance de masa, encontramos que la SFS con la cepa silvestre tuvo una conversión de celulosa a glucosa del 84 %, comparado con el de la cepa termotolerante que fue de 97 %. Lo anterior se explica por la mayor producción de etanol y glicerol con la cepa termotolerante. Por otro lado, es interesante señalar que en el biorreactor que contenía a la cepa termotolerante se observó una producción de glicerol 2 veces mayor que en el biorreactor con la cepa silvestre.

#### **8.1.1. SFS con tiempo de inoculación de 48 horas**

Las cinéticas de conversión de celulosa a glucosa y producción de etanol y glicerol con las cepas termotolerante y silvestre adicionadas a la SFS hasta las 48 h de sacarificación se muestran en la Figura 7. Cuando concluyó el cuarto día, las

concentraciones de glucosa y etanol en la SFS con la levadura tolerante eran de 49.5 g/L y 3.4 g/L respectivamente, mientras que con la silvestre de 58.3 g/L y 8.06 g/L respectivamente.

Tabla 8. Balance de masa global con respecto a la glucosa contenida en 20 g de sólidos añadidos a la SFS con las cepas TT23 Y S288C de *S. cerevisiae*. Los inóculos fueron adicionados a las 24 h de hidrólisis enzimática en mini-fermentadores operados a 150 rpm y 100 ml de volumen de trabajo.

	TTT23			S288C		
	Carbohidratos en hidrolizado (g)	Carbohidratos en sólidos no hidrolizados (g)	Carbohidratos totales en rastrojo pretratado (g)	Carbohidratos en hidrolizado (g)	Carbohidratos en sólidos no hidrolizados (g)	Carbohidratos totales en rastrojo pretratado (g)
<b>Glucosa</b>	51.2	0.36	51.5	54.3	0.36	54.66
<b>Glucosa a etanol</b>	22	0	22	11	0	11
<b>Glucosa a glicerol</b>	1.8	0	1.8	1.75	0	1.75
<b>Total glucosa</b>	75	0.36	75.3	67.05	0.36	67.41
<b>Total Xilosa</b>	6.5	0.05	6.55	2.3	0.053	2.3
<b>Total</b>	81.5	0.41	81.8	69.35	0.413	69.7
<b>Total/Total</b>		81.8	81.8		69.7	69.7

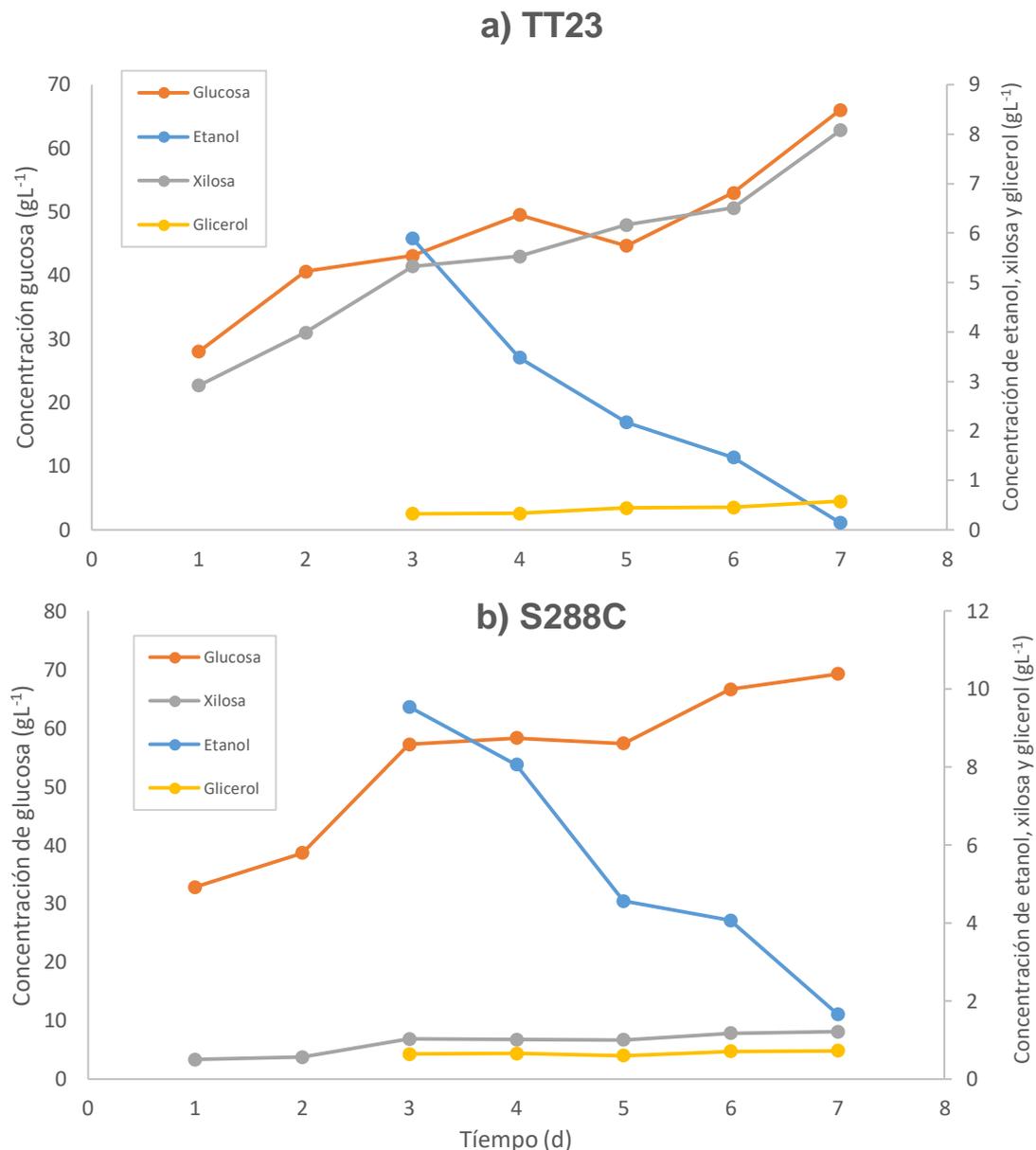


Figura 7. Cinéticas de SFS con las cepas de *S. cerevisiae* a) TT23 y b) S288C. Los inóculos se añadieron 24 h después de iniciar la hidrólisis enzimática. Al inicio de cargaron 20 % de sólidos y 2 % del coctel de enzimas.

Los resultados anteriores sugieren lo siguiente. La producción de etanol es mayor con la cepa silvestre. Al segundo y cuarto día de SFS, las concentraciones de glucosa con las cepas termotolerante y silvestre fueron de 40.6 g/L y 49.5 g/L, y de 38.6 g/L y 58.3 g/L respectivamente. En la sacarificación con 20 % sólidos y 2 % enzima se acumularon cerca de 75 g/L de glucosa al cuarto día. Considerando esta cantidad como base, los experimentos con las cepas tolerante y silvestre podrían haber acumulado 13 g/L y 8 g/L de etanol al cuarto día. Esto es, las cepas tolerante y silvestre habrían reducido  $75 \text{ g/L} - 49.54 \text{ g/L} = 25.5 \text{ g/L}$  y  $75 \text{ g/L} - 58.3 \text{ g/L} = 16.7 \text{ g/L}$  de glucosa al terminar el cuarto

día. Si toda esta glucosa consumida se transformó en etanol con 0.5 % de eficiencia, entonces se genera el etanol calculado (13 g/L y 8 g/L para la termotolerante y silvestre respectivamente).

Al finalizar el séptimo día de SFS, las concentraciones de glucosa y etanol para los procesos con la cepas termo-tolerante y silvestre fueron de 66.05 g/L y 0.14 g/L y de 69.20 g/L y 1.6 g/L, respectivamente (Figura 7). Las diferencias en estas concentraciones, aunque menores comparadas con los días 3 y 4, sugieren un ligero incremento en el consumo de glucosa y producción de etanol en la SFS con la cepa silvestre.

#### *Balances de masa de las SFS con las cepas TT23 y S288C.*

Como se comentó en la sección anterior las fracciones sólidas remanentes de los procesos de SFS se sometieron a procesos de hidrólisis y análisis gravimétrico con el objetivo de determinar la cantidad de azúcares que no se lograron sacarificar. Con dicha información se realizaron los siguientes balances de masa para valorar detalladamente los rendimientos de la SFS con las cepas termo tolerante y silvestre de levadura inoculadas a las 48 horas.

#### *Balance de masa con la cepa TT23.*

En la Tabla 9 se muestra el resultado del análisis. Para el ensayo se utilizaron 0.3 g de solidos remanentes lavados (para eliminar la glucosa hidrolizada) y secados. Como se puede observar la cantidad de glucosa remante es de 0.10 g. Esto indica que el porcentaje de glucosa en solidos remanentes fue de 0.33%. Al final del proceso de SFS mostrado en la figura 7 habían 10.3 g de solidos no hidrolizados. Por lo que la cantidad de GSNS para este experimento fue de:  $10.3 \times .33 = 3.4$  g.

Tabla 9. Carbohidratos identificados por análisis gravimétrico de solidos remanentes después de 144 h de SFS con la cepa TT23.

<b>Carbohidratos en sólidos remanentes (0.3 g)</b>		
	Concentración (g/L)	Peso (g)
<b>Glucosa</b>	1.261	0.109
<b>Xilosa</b>	0.217	0.018
<b>Total</b>	1.478	0.127

Para obtener la *GTPF*, las concentraciones de etanol y glicerol se multiplicaron por los rendimientos de conversión, 0.55 g/g para la conversión de glucosa a etanol y 0.74 g/g para la conversión de glucosa a glicerol. Así, para la producción valorada de etanol se tiene que *GTPF* para etanol es  $13 \text{ g/L} / 0.55 \text{ g/g} = 24 \text{ g/L}$  de glucosa. Para el glicerol  $0.57 \text{ g/L} / 0.74 \text{ g/g} = 0.77 \text{ g/L}$ . Al final del proceso de SFS se obtuvieron 72.7 mL de hidrolizado en promedio. Multiplicando este volumen por las cantidades de glucosa que se transformaron en etanol y glicerol se obtiene la *GTPF* -  $\left[ \left( 24 \frac{\text{g}}{\text{L}} \right) (72.7 \text{ mL}) \left( \frac{1}{1000} \right) \right] + \left[ \left( 0.77 \frac{\text{g}}{\text{L}} \right) (72.7 \text{ mL}) \left( \frac{1}{1000} \right) \right] = 1.8$ . La *GH* se calcula  $\left[ \left( 66.05 \frac{\text{g}}{\text{L}} \right) (72.7 \text{ mL}) \left( \frac{1}{1000} \right) \right] = 4.8 \text{ g}$ .

Sumando los resultados anteriores se obtiene que  $GH + GSNS + GTPF = 4.8 + 3.4 + 1.8 = 10.0 \text{ g}$ . Esta cantidad es la glucosa contenida en el rastrojo pretratado. Sabemos que el porcentaje de celulosa contenida en rastrojo de maíz pretratado es de 0.55 g de celulosa por g de rastrojo. Si se utilizaron 20 g de este material, entonces podemos calcular la cantidad de glucosa contenida como 1.11 (factor de conversión de celulosa a glucosa)  $\times 20 \text{ g} \times 0.55 = 12.21 \text{ g}$ . Del cálculo anterior se desprende que el balance de masa realizado para la SFS con la cepa termo tolerante cubre el 81% de la glucosa que se encuentra en el rastrojo de maíz pretratado, esto es  $10 \text{ g} / 12.21 \text{ g} \times 100$ .

#### *Balance de masa con la cepa S288C.*

Como se puede observar en la tabla 10, la cantidad de glucosa remanente es de 0.10 g. Esto indica que el porcentaje de glucosa en sólidos remanentes fue de 0.33%. Al final del proceso de SFS mostrado en la figura 7 habían 10.3 g de sólidos no hidrolizados. Por lo que la cantidad de *GSNS* para este experimento fue de:  $10.3 \times .33 = 3.4 \text{ g}$ .

Tabla 10. Carbohidratos identificados por análisis gravimétrico de sólidos remanentes después de 144 h de SFS con la cepa S288C.

<b>Carbohidratos en sólidos remanentes (0.3 g)</b>		
	Concentración (g/L)	Peso (g)
<b>Glucosa</b>	1.23	0.107
<b>Xilosa</b>	0.17	0.014
<b>Total</b>	1.4	0.114

Para obtener la *GTPF*, las concentraciones de etanol y glicerol se multiplicaron por los rendimientos de conversión, 0.55 g/g para la conversión de glucosa a etanol y 0.74 g/g para la conversión de glucosa a glicerol. Así, para la producción valorada de etanol se tiene que *GTPF* para etanol es  $8 \text{ g/L} / 0.55 \text{ g/g} = 14.5 \text{ g/L}$  de glucosa. Para el glicerol  $0.72 \text{ g/L} / 0.74 = 0.97 \text{ g/L}$ . Al final del proceso de SFS se obtuvieron 72.7 mL de hidrolizado en promedio. Multiplicando este volumen por las cantidades de glucosa que se transformaron en etanol y glicerol se obtiene la *GTPF* -

$$\left[ \left( \left( 14.5 \frac{\text{g}}{\text{L}} \right) (72.7 \text{ mL}) \left( \frac{1}{1000} \right) \right) + \left( \left( 0.97 \frac{\text{g}}{\text{L}} \right) (72.7 \text{ mL}) \left( \frac{1}{1000} \right) \right) \right] = 1.12.$$

La *GH* se calcula

$$\left[ \left( 69.2 \frac{\text{g}}{\text{L}} \right) (72.7 \text{ mL}) \left( \frac{1}{1000} \right) \right] = 4.9 \text{ g (Tabla 11)}.$$

Sumando los resultados anteriores se obtiene que  $GH + GSNS + GTPF = 4.9 + 3.4 + 1.12 = 9.4 \text{ g}$ . Esta cantidad es la glucosa contenida en el rastrojo pretratado. Sabemos que el porcentaje de celulosa contenida en rastrojo de maíz pretratado es de 0.55 g de celulosa por g de rastrojo. Si se utilizaron 20 g de este material, entonces podemos calcular la cantidad de glucosa contenida como 1.11 (factor de conversión de celulosa a glucosa) x 20 g x 0.55 g/g = 12.21 g. Del cálculo anterior se desprende que el balance de masa realizado para la SFS con la cepa termo tolerante cubre el 77% de la glucosa que se encuentra en el rastrojo de maíz pretratado, esto es  $9.4 \text{ g} / 12.21 \text{ g} \times 100$ .

*Interpretación del balance de biomasa.* Los resultados de los balances globales de masa medidos como glucosa se muestran en la Tabla 11. La conversión de celulosa a glucosa en la SFS con adición de las cepas de *S. cerevisiae* a las 48 h de sacarificación fue menos eficiente que cuando se adicionaron a las 24 h (Tabla 8). Esto es porque en la SFS con adición de la levadura a las 24 h la conversión de celulosa a glucosa fue de 77 % para la cepa silvestre y de 81% para la cepa termotolerante. De acuerdo con los resultados que se obtuvieron en los cálculos de balance de materia la cepa silvestre presentó un rendimiento ligeramente menor en cuanto a producción de etanol y consumo de glucosa.

Tabla 11. Productos obtenidos de la SFS con inóculos de las cepas TT23 Y S288C de *S.cerevisiae* adicionados a las 48 h de hidrolisis enzimática en mini-fermentadores.

	TT23			S288C		
	Carbohidratos en hidrolizado (g)	Carbohidratos en solidos no hidrolizados (g)	Carbohidratos totales en rastrojo pretratado (g)	Carbohidratos en hidrolizado (g)	Carbohidratos en solidos no hidrolizados (g)	Carbohidratos totales en rastrojo pretratado (g)
<b>Glucosa</b>	48.01	0.33	48.3	50.3	0.10	50.4
<b>Glucosa a etanol</b>	25.5	0	25.5	16.7	0	16.7
<b>Glucosa a glicerol</b>	0.57	0	0.57	0.72	0	0.72
<b>Total glucosa</b>	74.08	0.33	74.4	67.7	0.10	67.82
<b>Total Xilosa</b>	5.8	0.06	5.9	5.8	0.051	5.85
<b>Total</b>	79.8	0.42	80.3	73.2	0.401	73.6
<b>Total/Total</b>		80.3	80.3		73.6	73.6

## 9. Conclusiones

- La carga de sólidos, así como la cantidad de enzima utilizada influye significativamente en la sacarificación del rastrojo de maíz pretratado con ácido sulfúrico. Siendo el 2 % de enzimas y el 20 % de sólidos la condición que más favorece la productividad de glucosa y rendimiento de conversión de celulosa a glucosa.
- Los rendimientos de conversión de celulosa a glucosa y de glucosa a etanol fueron mayores para las SFS inoculadas 24 h después de iniciar la sacarificación comparadas con la inoculación después de las 48 h.
- La cepa TT23 de *S. cerevisiae* presentó una mejor actividad fermentativa que la cepa S288C con ambos tiempos de inoculación (24 y 48 horas).
- La SFS es posible a 45 °C utilizando las cepas silvestre (S288C) y termotolerante (TT23) de *S. cerevisiae*, sin embargo, se alcanzaron mejores rendimientos de conversión con la TT23.

## **10. Aportaciones y perspectivas**

Las principales aportaciones de este trabajo fueron:

- Se demostró que el aumento de la carga enzimática tiene efecto importante sobre la conversión de la celulosa a glucosa en residuos lignocelulósicos.
- Se observó que los títulos de etanol aumentaron con tiempos de inoculación menores (24 h comparado con 48 h).
- Se encontró que la cepa silvestre S288C presentó mejores rendimientos de fermentación que la cepa termotolerante TT23.
- Se infirió que la temperatura de 45 °C favorece igual que la de 50 °C a la hidrólisis enzimática y es uno de los puntos clave para la sacarificación y fermentación simultánea.

### Perspectivas

- Aumentar el volumen de los inóculos para determinar si es un factor clave en la optimización de la SFS.
- Aplicar un diseño factorial  $2^4$  con una metodología de superficie de respuesta para encontrar los valores óptimos de los parámetros establecidos en la SFS (p. Ej. Temperatura, volumen de inóculo y tiempo de adición del mismo). Ver anexos.

## 11. Bibliografía

1. Abril, A., & Navarro, E. A. (2012). *Etanol a partir de biomasa lignocelulósica*. Aleta.
2. Agencia de Servicios a la Comercialización y Desarrollo de Mercados Agropecuarios-ASERCA. (2018). Maíz grano cultivo representativo de México.
3. Antizar-Ladislao, B., & Turrion-Gomez, J. L. (2008). Second-generation biofuels and local bioenergy systems. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 2(5), 455-469.
4. Olofsson, K., Palmqvist, B., & Lidén, G. (2010). Improving simultaneous saccharification and co-fermentation of pretreated wheat straw using both enzyme and substrate feeding. *Biotechnology for biofuels*, 3(1), 1-9.
5. Anwar, Z., Gulfranz, M., & Irshad, M. (2014). Agro-industrial lignocellulosic biomass a key to unlock the future bio-energy: a brief review. *Journal of radiation research and applied sciences*, 7(2), 163-173.
6. Avalos, A. M. M., Torres, J. S., & Shimada, A. S. (1985). Crecimiento de borregos Pelibuey alimentados con rastrojo de maíz tratado con amoníaco anhidro. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*, (48), 54-61.
7. Balat, M. (2011). Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: A review. *Energy Convers. Manag.* 52, 858–875. <https://doi.org/10.1016/j.enconman.2010.08.013>
8. Ballesteros, M., Oliva, J. M., Manzanares, P., Negro, M. J., & Ballesteros, I. (2002). Ethanol production from paper material using a simultaneous saccharification and fermentation system in a fed-batch basis. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 18(6), 559-561.
9. Behera, S. K., Meena, H., Chakraborty, S., & Meikap, B. C. (2018). Application of response surface methodology (RSM) for optimization of leaching parameters for ash reduction from low-grade coal. *International Journal of Mining Science and Technology*, 28(4), 621-629.
10. Bhatia, S. K., Jagtap, S. S., Bedekar, A. A., Bhatia, R. K., Patel, A. K., Pant, D., ... & Yang, Y. H. (2020). Recent developments in pretreatment technologies on

- lignocellulosic biomass: Effect of key parameters, technological improvements, and challenges. *Bioresource Technology*, 300, 122724.
11. Box, G. E., Hunter, J. S., & Hunter, W. G. (2008). *Estadística para investigadores*. Editorial Reverté.
  12. Vargas-Tah, A., Moss-Acosta, C. L., Trujillo-Martinez, B., Tiessen, A., Lozoya-Gloria, E., Orencio-Trejo, M., ... & Martinez, A. (2015). Non-severe thermochemical hydrolysis of stover from white corn and sequential enzymatic saccharification and fermentation to ethanol. *Bioresource technology*, 198, 611-618.
  13. Caspeta, L., Buijs, N. A., & Nielsen, J. (2013). The role of biofuels in the future energy supply. *Energy & Environmental Science*, 6(4), 1077-1082.
  14. Caspeta, L., Caro-Bermúdez, M. A., Ponce-Noyola, T., & Martinez, A. (2014). Enzymatic hydrolysis at high-solids loadings for the conversion of agave bagasse to fuel ethanol. *Applied Energy*, 113, 277-286.
  15. Novozymes. (2017). Novozymes Cellic® Ctec3 HS-Secure your plant's low cost.
  16. Caspeta, L., Coronel, J., Montes de Oca, A., Abarca, E., González, L., & Martínez, A. (2019). Engineering high-gravity fermentations for ethanol production at elevated temperature with *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology and bioengineering*, 116(10), 2587-2597.
  17. Cuervo, L., Folch, J. L., & Quiroz, R. E. (2009). Lignocelulosa como fuente de azúcares para la producción de etanol. *BioTecnología*, 13(3), 11-25.
  18. Demirbaş, A. (2004). Ethanol from cellulosic biomass resources. *International journal of green energy*, 1(1), 79-87.
  19. Demirbas, A. (2007). Progress and recent trends in biofuels. *Progress in energy and combustion science*, 33(1), 1-18.
  20. Demirbas, A. (2008). Biofuels sources, biofuel policy, biofuel economy and global biofuel projections. *Energy conversion and management*, 49(8), 2106-2116.
  21. Entian, K. D., & Zimmermann, F. K. (Eds.). (1997). *Yeast Sugar Metabolism: Biochemistry, Genetics, Biotechnology, and Applications*. Technomic.
  22. Estela-Escalante, W. D., Rychtera, M., Melzoch, K., Torres-Ibáñez, F., Calixto-Cotos, R., Bravo-Aranibar, N., ... & Chávez-Guzmán, Y. M. (2014). Efecto de la aireación en la producción de compuestos volátiles por cultivo mixto de *Brettanomyces intermedius* y *Saccharomyces cerevisiae* durante la fermentación de sidra. *TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 17(1), 5-14.

23. Gomez, L. D., Steele-King, C. G., & McQueen-Mason, S. J. (2008). Sustainable liquid biofuels from biomass: the writing's on the walls. *New Phytologist*, 178(3), 473-485.
24. González Velasco, J. (2009). *Energías renovables*. Barcelona: Reverté.
25. González-César, R.(2002). Sustentabilidad de la producción e introducción de alcohol como carburante para uso en automóviles en la Ciudad de México. Tesis de maestría. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla (BUAP), México.
26. Hadar, Y. (2013). Sources for lignocellulosic raw materials for the production of ethanol. In *Lignocellulose conversion* (pp. 21-38). Springer, Berlin, Heidelberg.
27. Hans, M., Kumar, S., Chandel, A. K., & Polikarpov, I. (2019). A review on bioprocessing of paddy straw to ethanol using simultaneous saccharification and fermentation. *Process Biochemistry*, 85, 125-134.
28. Hughes, E., & Benemann, J. R. (1997). Biological fossil CO2 mitigation. *Energy Conversion and Management*, 38, S467-S473.
29. Choudhary, J., Singh, S., & Nain, L. (2016). Thermotolerant fermenting yeasts for simultaneous saccharification fermentation of lignocellulosic biomass. *Electronic Journal of Biotechnology*, 21, 82-92.
30. Ivorra, C., Pérez-Ortín, J. E., & del Olmo, M. L. (1999). An inverse correlation between stress resistance and stuck fermentations in wine yeasts. A molecular study. *Biotechnology and bioengineering*, 64(6), 698-708.
31. Jeffries TW (1994) Biodegradation of lignin and hemicelluloses. In: Biochemistry of microbial degradation. Ratledge C (ed.) Kluwer, Dordrecht, pp. 233–277.
32. Kádár, Z., Szengyel, Z., & Réczey, K. (2004). Simultaneous saccharification and fermentation (SSF) of industrial wastes for the production of ethanol. *Industrial Crops and Products*, 20(1), 103-110.
33. Kaymaz, I., & McMahon, C. A. (2005). A response surface method based on weighted regression for structural reliability analysis. *Probabilistic Engineering Mechanics*, 20(1), 11-17.
34. Canilha, L., Chandel, A. K., Suzane dos Santos Milessi, T., Antunes, F. A. F., Luiz da Costa Freitas, W., das Graças Almeida Felipe, M., & da Silva, S. S. (2012). Bioconversion of sugarcane biomass into ethanol: an overview about composition, pretreatment methods, detoxification of hydrolysates, enzymatic saccharification, and ethanol fermentation. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2012.
35. Park, Y. C., & Kim, J. S. (2012). Comparison of various alkaline pretreatment methods of lignocellulosic biomass. *Energy*, 47(1), 31-35.

36. Kent, J. A. (1992). Riegel's handbook of industrial chemistry. Van Nostrand Reinhold pp. 368-370).
37. Keppel, G. (1991). *Design and analysis: A researcher's handbook*. Prentice-Hall, Inc.
38. Khuri, A. I., & Mukhopadhyay, S. (2010). Response surface methodology. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Statistics*, 2(2), 128-149.
39. Krishna, S. H., Reddy, T. J., & Chowdary, G. V. (2001). Simultaneous saccharification and fermentation of lignocellulosic wastes to ethanol using a thermotolerant yeast. *Bioresource technology*, 77(2), 193-196.
40. López oyanedel, d. P. (2019). Sacarificación y fermentación simultánea de orujo de uva tinto para producción de bioetanol de segunda generación. Tesis.
41. Montfort-Gardeazabal, J. M. Producción de bioetanol a partir de microorganismos: Una alternativa como fuente de energía renovable. *Biodiversidad, Servicios Ecosistémicos y los Objetivos del Desarrollo Sostenible en México*, 163.
42. Mukerjee, R., & Wu, C. J. (2007). *A modern theory of factorial design*. Springer Science & Business Media.
43. Nelson, D. L., & Cox, M. M. (2015). Lehninger: principios de bioquímica. Sexta edición.
44. Nigam, P. S., & Singh, A. (2011). Production of liquid biofuels from renewable resources. *Progress in energy and combustion science*, 37(1), 52-68.
45. Oberoi, H. S., Vadlani, P. V., Saida, L., Bansal, S., & Hughes, J. D. (2011). Ethanol production from banana peels using statistically optimized simultaneous saccharification and fermentation process. *Waste Management*, 31(7), 1576-1584.
46. Pérez J, Muñoz-Dorado A, De la Rubia T & Martínez, E (2002) Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview. *Int. Microbiol.* 5: 53–63.
47. Caspeta, L., Castillo, T., & Nielsen, J. (2015). Modifying yeast tolerance to inhibitory conditions of ethanol production processes. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, 3, 184.
48. Elena, S. F., and Lenski, R. E. (2003). Evolution experiments with microorganisms: the dynamics and genetic bases of adaptation. *Nature Review in Genetics* 4, 457–469.doi:10.1038/nrg1088.

49. Puri, M., Abraham, R. E., & Barrow, C. J. (2012). Biofuel production: prospects, challenges and feedstock in Australia. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 16(8), 6022-6031.
50. Ragauskas, A. J., Williams, C. K., Davison, B. H., Britovsek, G., Cairney, J., Eckert, C. A., ... & Mielenz, J. R. (2006). The path forward for biofuels and biomaterials. *Science*, 311(5760), 484-489.
51. Rastogi, M., & Shrivastava, S. (2017). Recent advances in second generation bioethanol production: an insight to pretreatment, saccharification and fermentation processes. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 80, 330-340.
52. Olguin Maciel E. (2020). Bioproceso consolidado para la producción de bioetanol a partir de harina de semillas de Ramón (*Brosimum alicastrum*), utilizando el aislado nativo *Trametes hirsuta Bm-2* (Doctoral dissertation, Centro de Investigación Científica de Yucatán).
53. Jobson, M. (2014). Energy considerations in distillation. In *Distillation* (pp. 225-270). Academic Press.
54. Reyes-Muro, L., Camacho-Villa, T. C., & Guevara-Hernández, F. (2013). Rastrojos: manejo, uso y mercado en el centro y sur de México. *Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, Pabellón de Arteaga, Aguascalientes, México*.
55. Rubin, E. M. (2008). Genomics of cellulosic biofuels. *Nature*, 454(7206), 841.
56. Ruiz, H. A., Martínez, A., & Vermerris, W. (2016). Bioenergy potential, energy crops, and biofuel production in Mexico. *BioEnergy Research*, 9(4), 981-984.
57. Secretaría de Agricultura, ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación - SAGARPA.(2015). *Plan de manejo de residuos generados en actividades agrícolas primera etapa: diagnóstico nacional*. INEGI, 211PP064.
58. Amiri, H., Karimi, K., & Zilouei, H. (2014). Organosolv pretreatment of rice straw for efficient acetone, butanol, and ethanol production. *Bioresource technology*, 152, 450-456.
59. Bergman, L. W. (2001). Growth and maintenance of yeast. In *Two-hybrid systems* (pp. 9-14). Humana Press.
60. Sheehan, J., Aden, A., Paustian, K., Killian, K., Brenner, J., Walsh, M., & Nelson, R. (2003). Energy and environmental aspects of using corn stover for fuel ethanol. *Journal of Industrial Ecology*, 7(3-4), 117-146.

61. Sifontes, M. C. (2019). La biomasa: fuente alternativa de combustibles y compuestos químicos. In *Anales de la Real Sociedad Española de Química* (No. 5, pp. 399-407).
62. Sluiter, A., Hames, B., Ruiz, R., Scarlata, C., Sluiter, J., Templeton, D., & Crocker, D. (2008). Determine of structure carbohydrates and lignin in biomass: Laboratory Analytical Procedures (LAP). *Technical Report NREL/TP-510e42618 [Internet]*.
63. Somerville, C., Youngs, H., Taylor, C., Davis, S. C., & Long, S. P. (2010). Feedstocks for lignocellulosic biofuels. *Science*, 329(5993), 790-792.
64. Sree, N. K., Sridhar, M., Suresh, K., Banat, I. M., & Rao, L. V. (2000). Isolation of thermotolerant, osmotolerant, flocculating *Saccharomyces cerevisiae* for ethanol production. *Bioresource Technology*, 72(1), 43-46.
65. Suárez-Machín, C., Garrido-Carralero, N. A., & Guevara-Rodríguez, C. A. (2016). Levadura *Saccharomyces cerevisiae* y la producción de alcohol. Revisión bibliográfica. ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar, 50(1), 20-28.
66. Supportminitab (2019). *¿Qué son los diseños de superficie de respuesta, los diseños centrales compuestos y los diseños de Box-Behnken? - Minitab*. Recuperado de: <https://support.minitab.com/es-mx/minitab/19/help-and-how-to/modeling-statistics/doe/supporting-topics/response-surface-designs/response-surface-central-composite-and-box-behnken-designs/>
67. Téllez-Mora, P., Peraza-Luna, F. A., Feria-Velasco, A., & Andrade-González, I. (2012). Optimización del proceso de fermentación para la producción de tequila, utilizando la metodología de superficie de respuesta (MSR). *Revista mexicana de ingeniería química*, 11(1), 163-176.
68. Li, C., Knierim, B., Manisseri, C., Arora, R., Scheller, H. V., Auer, M., ... & Singh, S. (2010). Comparison of dilute acid and ionic liquid pretreatment of switchgrass: biomass recalcitrance, delignification and enzymatic saccharification. *Bioresource technology*, 101(13), 4900-4906.
69. Valdez-Vazquez, I., Acevedo-Benítez, J. A., & Hernández-Santiago, C. (2010). Distribution and potential of bioenergy resources from agricultural activities in Mexico. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 14(7), 2147-2153.
70. Wang, Y. F., & Wang, C. G. (2005). The application of response surface methodology [J]. *Journal of The Central University For Nationalities (Natural Science Edition)*, 3.

71. Bribiesca, B. L. C. (2013). Enzimas xilanolíticas bacterianas y sus aplicaciones industriales. *VERTIENTES Revista especializada en ciencias de la salud*, 16(1), 19-22.
72. Olofsson, K., Palmqvist, B., & Lidén, G. (2010). Improving simultaneous saccharification and co-fermentation of pretreated wheat straw using both enzyme and substrate feeding. *Biotechnology for biofuels*, 3(1), 1-9.
73. Xu, P., Thomas, A., & Gilson, C. D. (1996). Combined use of three methods for high concentration ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology letters*, 18(12), 1439-1440.
74. Yamaoka, C., Kurita, O., & Kubo, T. (2014). Improved ethanol tolerance of *Saccharomyces cerevisiae* in mixed cultures with *Kluyveromyces lactis* on high-sugar fermentation. *Microbiological Research*, 169(12), 907-914.
75. Thompson, J. L., & Tyner, W. E. (2014). Corn stover for bioenergy production: Cost estimates and farmer supply response. *Biomass and Bioenergy*, 62, 166-173.

## 12. Anexos

### A. Determinación de Carbohidratos.

La metodología empleada en el presente proyecto para la recuperación de los carbohidratos acumulados en los sólidos remanentes ha sido la descrita por el Laboratorio Nacional de Energía Renovables ( por sus siglas en ingles, NREL) (Sluiter *et al*,2008) con algunas modificaciones y sin determinar algunos compuestos como la lignina soluble e insoluble.

- 1) Se tomaron 300 mg de las muestras de sólidos remanentes al finalizar las corridas experimentales. Las muestras se mantuvieron a peso constante con +/- 0.1 mg.
- 2) Se colocaron las muestras en tubos de ensayo marcados respectivamente para no perder el orden de los experimentos.
- 3) Se añadieron 3 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 72 % a las muestras y se agitaron durante un minuto.
- 4) Se colocaron los tubos con las muestras en una incubadora con agitador a 30 °C y 300 rpm durante 60 minutos.
- 5) Se diluyo el ácido contenido en las muestras al 4 % añadiendo 84 mL de agua destilada en matraces Erlenmeyer (el volumen final fue 87 mL).
- 6) Previamente se prepararon estándares de: xilosa, glucosa, etanol y glicerol
- 7) Se colocaron las muestras y los estándares en la autoclave a 121 °C por 60 minutos.
- 8) Se ajustó el pH de las muestras y los estándares a pH 5-6 con la finalidad de que no se perdieran carbohidratos durante la fase ácida.
- 9) Se filtraron las muestras y los estándares para medir los carbohidratos en el HPLC equipado con una columna de exclusión de iones Aminex HPX-87H (Bio-Rad).

### B. Metodología de superficie de respuesta

#### Diseños experimentales para resolver los retos de los procesos de producción.

El desarrollo de procesos de producción requiere de diseños experimentales para evaluar el efecto de una variable (por ejemplo, temperatura y cantidad de enzima) en la

cantidad de producto obtenido (por ejemplo, concentración de etanol). Estos diseños están conformados por sistemas que incluyen variables de entrada (independientes), y variable de salida, también conocidas como variables de respuesta (dependientes), las cuales representan la variable de interés en un estudio o investigación. El método tradicional de los diseños experimentales consiste en medir un efecto a la vez en la variable de respuesta, manteniendo las otras variables controladas (Box *et al.*, 2008; Keppel, 1991). Los métodos tradicionales implican realizar más experimentos de los necesarios y no muestran la interacción entre variables, por lo que representan un aumento en los costos de inversión.

### **Diseños factoriales.**

Los diseños factoriales como los  $2^k$ , donde  $k$  es el número de variables o factores que se evalúan, también conocidas como variables de control, las cuales son medidas en 2 niveles que se pueden codificar para tomar los valores de 1 (valor alto) y -1 (valor bajo). El diseño consta de todas las combinaciones posibles de los  $k$  factores a 2 niveles. Para comprender mejor lo antes enunciado tomemos como ejemplo un diseño factorial aplicado a un experimento químico, las variables de control son  $x_1$  = temperatura de la reacción medida a 250 y 300 °C,  $x_2$  = la presión a 10, 16 psi,  $x_3$  = tiempo de reacción tomado a los 4, 8 (minutos). Los ajustes codificados de los niveles vienen dados por los valores altos (300 °C, 16 psi y 8 minutos) y valores bajos (250 °C, 10 psi y 4 minutos) de cada variable de control respectivamente ( $x_1$ ,  $x_2$  y  $x_3$ ) (Khuri, y Mukhopadhyay, 2010)

Los diseños  $2^k$  juegan un papel importante en la investigación; en especial en áreas donde se requiere del manejo de múltiples variables bajo diferentes condiciones ya que permiten conocer el efecto conjunto de diferentes variables independientes en una o más variables de respuesta realizando un menor número de experimentos. Del mismo modo permite conocer el efecto que tienen las interacciones de las variables lo cual es importante en los procesos de producción que son afectados por múltiples variables como la SFS (Mukerjee y Wu, 2007).

### **Procesos de optimización aplicados a los procesos de producción.**

#### **Metodología de superficie de respuesta.**

La metodología de superficie de respuesta (por sus siglas en inglés, RSM) es una estrategia experimental que consiste en la aplicación de un grupo de técnicas matemáticas y estadísticas para buscar las condiciones óptimas de un sistema con múltiples variables. Es una metodología basada en la optimización de un proceso de

mayor eficiencia que una metodología convencional, este último mide el efecto de un factor a la vez sobre una variable de interés (Oberoi *et al.*, 2011).

Esta metodología permite comprender las interacciones entre los parámetros de estudio, lo que podría contribuir a la optimización de los procesos de producción y proporcionar modelos estadísticos (Behera *et al.*, 2018). Un diseño de superficie de respuesta es útil después de que se han determinado los factores importantes obtenidos de los procesos de producción; estos valores se ajustan a modelos tridimensionales para conocer el óptimo real puesto que en un modelo bidimensional el punto óptimo de la variable de interés suele confundirse con el punto más alto de una curva.



Figura 8. Modelo de superficie de respuesta tridimensional con curvatura (recuperado de Support.minitab.com, 2019)

Para conocer la relación entre la variable de respuesta y las variables independientes es necesario un modelo que se aproxime a la relación funcional entre la variable de respuesta y las variables independientes (Wang y Wang, 2005). Con el fin de conocer el efecto de la relación entre variables se utilizan ecuaciones en los análisis de superficie de respuesta, estas ecuaciones permiten modelar la forma en que los cambios en las variables afectan a una variable de respuesta. Las ecuaciones utilizan términos elevados al cuadrado (cuadráticos) ya que esto permite definir la curvatura en una superficie tridimensional (Téllez-Mora *et al.*, 2012; Kaymaz y McMahon, 2005).

La funcionalidad de una variable de respuesta ( $y$ ) está determinada por 2 niveles: bajo (-1) y alto (1), tal como se mencionó en los diseños  $2^k$ . Por lo que se puede decir que,  $y$  está en función de  $x$ , a esta relación se le conoce como función de respuesta, la cual se puede expresar de la siguiente forma (Téllez-Mora *et al.*, 2012):

$$\text{Función de respuesta } (y) = f(x)\beta + \epsilon$$

En donde  $x = (x_1, x_2, \dots, x_k)'$ ,  $f(x)$  representa una función vectorial que consta de  $\rho$  elementos que constan de potencias y productos cruzados de  $x_1, x_2, \dots, x_k$ ,  $\beta$  es un

vector de coeficientes constantes denominados parámetros y  $\epsilon$  es un error experimental aleatorio que se supone que tiene una media cero.

Dentro de la RSM existen 2 modelos que se utilizan comúnmente (Khuri, y Mukhopadhyay, 2010):

Los de primer grado

$$y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_{ix_i} + \epsilon$$

Y los modelos de segundo grado

$$y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_{ix_i} + \sum_{i < j} \sum \beta_{ijx_ix_j} + \sum_{i=1}^k \beta_{iix_i^2} + \epsilon$$

Los modelos antes mencionados sirven para:

1. Establecer una relación aproximada entre  $y$  y  $x_1, x_2, \dots, x_k$  que se puede utilizar para predecir los valores de la variable de respuesta ( $y$ ) para determinados ajustes de las variables de control ( $x_1, x_2, \dots, x_k$ )
2. Determinar mediante una prueba de hipótesis la significancia de los factores cuyos niveles están representados por :  $x_1, x_2, \dots, x_k$ .
3. Determinar los ajustes óptimos de  $x_1, x_2, \dots, x_k$  los cuales den como resultado la máxima (o mínima) respuesta en una determinada región de interés dentro del plano tridimensional.

Para aplicar los modelos de segundo y primer grado primero se debe llevar a cabo una serie de experimentos, en cada uno se mide (u observa) la respuesta para ajustes especificados de las variables de control. La totalidad de las respuestas causadas por diferentes ajustes en las variables de control constituye la superficie de respuesta (Khuri y Mukhopadhyay, 2010). Los modelos de primer orden más comunes son los  $2^k$ , mientras que los modelos de segundo orden requieren de diseños  $3^k$  ( $k$  factores a 3 niveles), sin embargo, estos últimos requieren de un número mayor de experimentos y combinaciones.

### **Máxima pendiente en ascenso.**

Una de las desventajas que presentan los diseños factoriales  $2^k$  es que no permiten la estimación de la significancia del error experimental. Por lo tanto, una posible solución

es aumentar las observaciones adicionando puntos centrales o axiales a una superficie de respuesta, estos puntos adicionales se obtienen de las réplicas de cada corrida o experimento en el centro por medio de réplicas (Kaymaz y McMahon, 2005). Lo anteriormente mencionado se puede visualizar de la siguiente manera en un plano bidimensional.

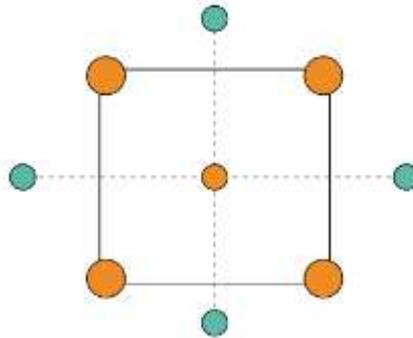


Figura 9. Representación de las réplicas en un diseño factorial 22. Los puntos azules representan las réplicas experimentales (puntos axiales) y los puntos amarillos los experimentos estándar

### Optimización del proceso.

El diseño experimental mide la eficiencia del proceso, la cual se determina siguiendo una metodología de superficie de respuesta, ya que este tipo de análisis permite maximizar los valores de una variable de respuesta obtenidos a partir del efecto que se produce cuando los factores o variables dependientes interaccionan conjuntamente.

#### *Polinomios de primer orden*

Los diseños se ajustarán a modelos cuadráticos completos, aplicando técnicas de mínimos cuadrados. El método más utilizado para la aproximación de las funciones (acercamiento al óptimo real) es por polinomios de primer orden, lo cual se puede observar en la siguiente ecuación.

$$Y = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \varepsilon$$

En donde cada elemento representa:

$Y$  = variable de interés

$\beta_0$  = coeficiente de intersección

$x_1$  y  $x_j$  = variables independientes

$\beta_i$  = coeficiente lineal

$\beta_{ii}$  = coeficiente cuadrático

$\beta_{ij}$  = coeficiente de los productos cruzados

$\varepsilon$  = error experimental aleatorio

Este modelo permite ajustar eficientemente el modelo plano y comprobar si es adecuado para encontrar el punto máximo real, esto se obtiene gracias a la estimación de error experimental (Box y Hunter, 2008).

#### *Polinomios de segundo orden*

El modelo de segundo orden se utilizará cuando se ha comprobado que la determinación en la aproximación con un modelo de segundo orden no es el adecuado. Para un polinomio de segundo orden se utilizará la siguiente ecuación:

$$Y = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \beta_{11} x_1^2 + \beta_{22} x_2^2 + \beta_{12} x_1 x_2$$

#### *Determinación de la curvatura (análisis canónico)*

Para determinar la curvatura o la forma que se toma de acuerdo a los datos en una superficie se sugiere la aplicación de la siguiente ecuación, la cual se basa en un modelo de segundo orden, ya que en estos modelos resulta más evidente la forma.

$$\hat{y} - \hat{y}_s = B_{11} x_1^2 + B_{22} x_2^2$$

En donde cada elemento representa:

$x_1$  y  $x_2$  = los ejes que se trasladaron o giros

$s$  = es el dato que se sitúa en el centro, el eje central

#### *Mínimos cuadrados.*

Para una serie de datos que no describen una línea recta se utiliza el método de mínimos cuadrados con análisis de regresión lineal, esto con el fin de obtener las mínimas distancias entre los datos obtenidos y determinar la relación entre variables dependientes e independientes. Para lo anterior se utiliza la siguiente ecuación

$$y = \left( \frac{n \cdot \sum(x \cdot y) - \sum x \cdot \sum y}{n \cdot \sum x^2 - |\sum x|^2} \right) x + \left( \frac{\sum y \cdot \sum x^2 - \sum x \cdot \sum(x \cdot y)}{n \cdot \sum x^2 - |\sum x|^2} \right)$$

En donde cada elemento representa

$x$  = variables dependientes

$y$  = valores de las variables independientes

$n$  = número de datos

Cuernavaca, Morelos a 8 de noviembre de 2022

**DRA. DULCE MARÍA ARIAS ATAIDE**  
**DIRECTORA GENERAL DE SERVICIOS ESCOLARES**  
**P R E S E N T E.**

Por este conducto, los catedráticos suscritos comunicamos a Usted, que hemos revisado el documento que presenta el Pasante de Biólogo: **BRENDA MABEL CORTES OCAMPO**, con el título del trabajo: **PRODUCCIÓN DE ETANOL POR SACARIFICACIÓN Y FERMENTACIÓN SIMULTÁNEA DE RESIDUOS PRETRATADOS DE *Zea mays***.

En calidad de miembros de la comisión revisora, consideramos que el trabajo reúne los requisitos para optar por la Modalidad de Titulación por Tesis Profesional por Etapas como lo marca el artículo 26° del Reglamento de Titulación Profesional vigente de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos.

**A T E N T A M E N T E**  
*Por una humanidad culta*

**JURADO REVISOR**

**FIRMA**

PRESIDENTE: DRA. MARIA DEL RAYO SANCHEZ CARBENETE

SECRETARIO: DRA. MARIA DEL CARMEN GUTIERREZ  
VILLAFUERTE

VOCAL: DR. LUIS CASPETA GUADARRAMA

SUPLENTE: DR. JULIO CESAR LARA MANRIQUE

SUPLENTE: DR. ALFREDO MARTINEZ JIMENEZ

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

### Sello electrónico

**JULIO CESAR LARA MANRIQUE** | Fecha:2022-11-08 11:06:49 | Firmante

EYVZMJYks1i61kWyMee+v8TnP0I8ofNPJlCBy1vuG2rDqED9ODbHxg8MzeMrV8eONCe+E7Phg4BN0tOk0m5rEwoJnrW23Yp8D66go4+N3LMOBKMbqZwUajDhLLno/qwITXOYAhJFaJk1ChnjwXGJXGp7WlqnPnPs8Emno/401ydhCQWqyaDpSoUj/lkOzILKnEOP4Q46M298gE1F4ZxJ3MXlqloW4ztGmESPGe9w8xe7TGJ9i/nuC0HbD8k0sqv+PiQMf+g/lQpGWbKk4prQJmyUDZMz4YNk8T15blE6lcUGhBPvrMKRreDuhkfXJFXVJGF8yJ1jJ0d8A==

**MARIA DEL RAYO SANCHEZ CARBENTE** | Fecha:2022-11-08 19:45:01 | Firmante

DXFP0WbxZVkyU0zjWlqRtbsKdwhXzVw5i+n20nZ57PGVQBfmHNaTDFBjtfgZY4DL4p1+aQ3mYOspixentT2TEd6FrydaeY/KYobcJemV4qNxforoYtQ5aq1S1z7Kbm+gjnDvkU7nbNpdIwALiQoBIWoiZcwa/FA22PaQihc:Z4fU0nx3suSgF4cP+ES3Mzrb7V5rjVSpysaa1BT1YIRbjq294mAu8hSQU8kgAJdEGlqPvKEaLrUoZ1cuRGvsxvJRIGEJfsA0Fjy38V6xE7MoS AjnrmUJVXaxpsjcAxQ2iQ4G8lQWxp4xBbrXqp8+dS7g/Cnghy6L6yED7uX1b4cPrRA==

**ALFREDO MARTÍNEZ JIMÉNEZ** | Fecha:2022-11-08 20:07:09 | Firmante

2vwqL5U1eVTmavGYyeX9i3Z3loL9yp5KNX0XY/CE5ZrARoB74iTvW7YJDfRar1OvMIF7lvV7pG74JBBhat7cTWNJA9ssg8GSksqNz8maKVK6LnKc0Li0CJZbiYzkB/AcAAHjrTLK NiTUPADDo1O16ISzou1/5kpo1OhB14YqwwO6MNGF7uYPrmwzs5vlw9+n3KQ/o7s4V8aM12Jmi7PaXIEKa0UDvAZub/NDBNDUOkRSi2knE7JA1E7j0VIsI3yuvvC4opGUFENwSCz1qm32MkFTdzSQCH4i73afm4NiMZtpxwyyfr3IL6KPFsHA0+Q0c9P/1+3p48bvFsich==

**LUIS CASPETA GUADARRAMA** | Fecha:2022-11-09 13:30:53 | Firmante

I1E/H1mh6Z3sudUYUtuXfk2P5ybY46xCJnJaM3qhagBF+TulCaiQP3DT82miR6o+kclm4cu6WZPoYQswRkTVSyhiJn5CN8KdghUC1mU4/m8B47AbiqqOWJ72yLDgRXzmyus1FB0xpW602ZwCniiY59QKPSItwAqBumyPsmm/twtQIN899YWeMhFz0h+kf3gd7a0rm0uYJbCdBQoArsELjRYQqdWCO9T1alfEjtsU03xqBydAWyN7rFoagvoEpSOqafMhF3WuR2e4vFf82Rr1ooUdmsNu2BMMmCASWFjRvUvXF1h4jrZC1+7URoYY1Tzk4Y3J3k2MMqEA==

**MARIA DEL CARMEN GUTIERREZ VILLAFUERTE** | Fecha:2022-11-09 14:36:46 | Firmante

0f/zcTGXm/LPcYZEEZGNG1ist3QxPueXUQeKuY8c/2N4V7XB3zbHo+WA3sItT/ZPw9Rcxad8g8qWelAYNLcvDii1RUl6G27d++V0/o8wvyU/VpSmPaV93Ydd0nlpG64/IBO7Gvakd9eInGFcaULaTdjwDwuqXVaXKls1CuvnytOaYg0rZQmmZG167ebkSYv4EY8UOrM+gwO/zJYRZXCbKCGvhrLjth5EJEScXHjC4B3onhY/ekRM3gtAA/7bvL1zn6a8/RruzrddOxsIDx71BxzpsGSJkgDwCw5E9mEylUZHnblh/vVp096QX6cHRIM38ylLXglhJvkHR60QoA==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o  
escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



orGUaeHzR

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/Mdq1oc4JRxbdyEk58zKVNKwX98zHjHQB>