



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ



FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

POSGRADO EN CIENCIAS EN BIOPROCESOS

**CONVERSIÓN DE RESIDUOS AGRÍCOLAS A AZÚCARES FERMENTABLES
ÚTILES PARA LA PRODUCCIÓN DE BIOETANOL**

TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRÍA EN CIENCIAS EN BIOPROCESOS

PRESENTA

LÓPEZ BANDA ANDRÉS EDUARDO

DIRECTOR DE TESIS

DRA. LUZ MARÍA TERESITA PAZ MALDONADO



REPOSITORIO INSTITUCIONAL



UASLP-Sistema de Bibliotecas

Repositorio Institucional Tesis Digitales Restricciones de Uso

DERECHOS RESERVADOS PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL.

Todo el material contenido en este Trabajo Terminal está protegido por la Ley Federal de Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos. El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde se obtuvo, mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto o con fines de lucro, reproducción, edición o modificación será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



Conversión de residuos agrícolas a azúcares fermentables útiles para la producción de bioetanol © 2023 by López Banda Andrés Eduardo is licensed under Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International

Este proyecto se realizó en el Laboratorio de Ingeniería de Biorreactores, adscrito a la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí, en el periodo comprendido entre agosto de 2021 y agosto de 2023 bajo la dirección de la Dra. Luz María Teresita Paz Maldonado y fue apoyado por el Proyecto CONACYT 257616.

El programa de Maestría en Ciencias en Bioprocesos de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí pertenece al Sistema Nacional de Posgrados de Calidad (SNP) del CONAHCYT, registro 000588. Número de la beca otorgada por CONAHCYT: 76999 Número de CVU 1077922.

Los datos del trabajo titulado Conversión de Residuos Agrícolas a Azúcares Fermentables Útiles Para la Producción de Bioetanol se encuentran bajo el resguardo de la Facultad de Ciencias Químicas y pertenecen a la Universidad Autónoma de San Luis Potosí.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ
Facultad de Ciencias Químicas
Centro de Investigación y Estudios de Posgrado
Posgrado en Ciencias en Bioprocesos
Programa de Maestría

Formato M15

Solicitud de Registro de Tesis Maestría

San Luis Potosí SLP a mes/ día /año

Comité Académico

En atención a: Coordinador/a del Posgrado

Por este conducto solicito a Usted se lleve a cabo el registro de tema de tesis de Maestría, el cual quedo definido de la siguiente manera: Conversión de Residuos Agrícolas a Azúcares Fermentables Útiles Para la Producción de Bioetanol que desarrollará el/la estudiante: Andrés Eduardo López Banda bajo la dirección y/o Co-dirección de: Dra. Luz María Teresita Paz Maldonado.

Asimismo, le comunico que el proyecto en el cual trabajará el alumno involucrará el manejo de animales de experimentación, estudios con seres humanos o muestras derivadas de los mismos, el manejo y/o generación de organismos genéticamente modificados y requiere de aval de Comité de Ética e investigación de la FCQ.

(Complete la opción que aplique en su caso):

() Sí debido a que: _____

(x) No

() No Aplica

Sin otro particular, quedo de Usted.

A T E N T A M E N T E

Andrés Eduardo López Banda

Nombre y firma del estudiante

Dra. Luz María Teresita Paz Maldonado

Nombre y firma del/la Director/a de Tesis



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ



FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

PROGRAMA DE POSGRADO EN CIENCIAS EN BIOPROCESOS

**CONVERSIÓN DE RESIDUOS AGRÍCOLAS A AZÚCARES FERMENTABLES
ÚTILES PARA LA PRODUCCIÓN DE BIOETANOL**

TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRÍA EN CIENCIAS EN BIOPROCESOS

**PRESENTA
LÓPEZ BANDA ANDRÉS EDUARDO**

**DIRECTOR DE TESIS
DRA. LUZ MARÍA TERESITA PAZ MALDONADO**

SINODALES

PRESIDENTE:

**DRA. MARGARITA RODRÍGUEZ Y DOMÍNGUEZ
KESSLER**

SECRETARIO:

DRA. LUZ MARÍA TERESITA PAZ MALDONADO

VOCALES:

DRA. ALICIA GRAJALES LAGUNES

DR. VÍCTOR EMMANUEL BALDERAS HERNÁNDEZ

SAN LUIS POTOSÍ, S.L.P

NOVIEMBRE 2024

INTEGRANTES DEL COMITÉ TUTORIAL ACADÉMICO

Dra. Luz María Teresita Paz Maldonado: Director de Tesis. Adscrito al Posgrado en Ciencias en Bioprocesos de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí, San Luis Potosí, S.L.P.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ
Facultad de Ciencias Químicas
Centro de Investigación y Estudios de Posgrado
Posgrado en Ciencias en Bioprocesos
Programa de Maestría

Formato M5

Carta Cesión de Derechos

San Luis Potosí SLP a octubre/ 11/2024

En la ciudad de San Luis Potosí el día 11 del mes de octubre del año 2024, el que suscribe Andrés Eduardo López Banda del programa de posgrado de Ciencias en Bioprocesos adscrito a la Facultad de Ciencias Químicas manifiesta que es autor(a) intelectual del presente trabajo terminal, realizado bajo la dirección de: Dra. Luz María Teresita Paz Maldonado y cede los derechos del trabajo titulado Conversión de Residuos Agrícolas a Azúcares Fermentables Útiles Para la Producción de Bioetanol a la **Universidad Autónoma de San Luis Potosí**, para su difusión con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir de forma total o parcial texto, gráficas, imágenes o cualquier contenido del trabajo si el permiso expreso del o los autores. Éste, puede ser obtenido directamente con el autor o autores escribiendo a la siguiente dirección aeduar.lopez@gmail.com. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

Andrés Eduardo López Banda

Nombre y firma del alumno



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ
Facultad de Ciencias Químicas
Centro de Investigación y Estudios de Posgrado
Posgrado en Ciencias en Bioprocesos
Programa de Maestría

Formato M28

Carta de Análisis de Similitud

San Luis Potosí SLP a
Octubre/28/2024

L.B. María Zita Acosta Nava
Biblioteca de Posgrado FCQ

Asunto: Reporte de porcentaje de similitud de tesis de grado
Por este medio me permito informarle el porcentaje de similitud obtenido mediante Ithenticate para la tesis titulada Conversión de Residuos Agrícolas a Azúcares Fermentables Útiles Para la Producción de Etanol presentada por el autor Andrés Eduardo López Banda. La tesis es requisito para obtener el grado de Maestría en el Posgrado en Ciencias en Bioprocesos. El análisis reveló un porcentaje de similitud de Porcentaje de Similitud% excluyendo referencias y metodología.

Agradezco sinceramente su valioso tiempo y dedicación para llevar a cabo una exhaustiva revisión de la tesis. Quedo a su disposición para cualquier consulta o inquietud que pueda surgir en el proceso.

Sin más por el momento, le envío un cordial saludo.

A T E N T A M E N T E

Dr. Jaime David Pérez Martínez

Coordinador Académico del Posgrado en Ciencias en Bioprocesos

RESUMEN

La biomasa lignocelulósica es considerada como la principal fuente renovable de materia orgánica. Entre las distintas fuentes de biomasa, la lignocelulósica procedente de cultivos agrícolas, tiene un lugar importante en México, esto debido a la gran extensión del territorio mexicano destinado al cultivo de productos agrícolas como maíz, frijol, trigo, sorgo y cebada. El maíz es la especie más cultivada en el país y su cosecha genera anualmente más de 25 millones de toneladas de residuos, de los cuales, la hoja de maíz destaca por la alta cantidad de celulosa, su estructura y su baja cantidad de lignina en comparación con otros residuos de la planta. El aprovechamiento de este residuo mediante el concepto de biorrefinería, es una alternativa para la producción de energía, productos químicos y combustible.

En este trabajo se plantea el aprovechamiento de la hoja de maíz, sometiéndola a un proceso de criofracción como pretratamiento previo a su hidrólisis enzimática en el que se emplearon enzimas producidas por 3 microorganismos a partir de un sistema de inmersión temporal (*Pleurotus*) y un sistema de cultivo sumergido (*A. niger*, *Penicillium spp.*). Finalmente se realizó fermentación empleando *Zymomonas mobilis*.

Los extractos enzimáticos obtenidos presentaron actividad de CMCasa (0.2255 U mg^{-1}), xilanasas (4.3479 U mg^{-1}) y lacasa (2.986 U L^{-1}). La temperatura y la concentración de sólidos resultaron ser factores significativos en el proceso de hidrólisis, siendo este favorecido a $45 \text{ }^\circ\text{C}$ usando una concentración de sólidos de 10 %. La hidrólisis de las hojas de maíz produjo una concentración de azúcares reductores de 8 g L^{-1} . Al suplementar el hidrolizado con dextrosa y xilosa, se obtuvo mediante fermentación con *Zymomonas mobilis* una producción de 9 g L^{-1} de etanol.

Palabras clave: biomasa lignocelulósica, etanol, hidrólisis enzimática, hoja de maíz, *Zymomonas mobilis*.

ABSTRACT

Lignocellulosic biomass is considered the primary renewable source of organic material. Among various sources of biomass, lignocellulosic biomass from agricultural crops holds a significant position in Mexico, owing to the vast expanse of Mexican land dedicated to cultivating agricultural products such as corn, beans, wheat, sorghum, and barley. Maize, the most cultivated species in the country, generates over 25 million tons of waste annually, with corn husk standing out due to their high cellulose content, distinct structure, and relatively low lignin content compared to other maize plant residues. The utilization of this residue through the concept of biorefinery offers an alternative for energy, chemical, and fuel production.

This study presents the utilization of corn husk, subjecting them to a cryofraction process as a pre-treatment prior to enzymatic hydrolysis, wherein lignocellulolytic enzymes produced by three microorganisms were employed. These enzymes were obtained through a temporary immersion system (*Pleurotus*) and a submerged culture system (*A. niger*, *Penicillium spp.*). Subsequently, fermentation was conducted using *Zymomonas mobilis*.

The enzymatic extracts obtained exhibited CMCase activity (0.2255 U mg^{-1}), xylanase activity (4.3479 U mg^{-1}), and laccase activity (2.986 U L^{-1}). Temperature and solid concentration emerged as significant factors in the hydrolysis process, favoring conditions at $45 \text{ }^{\circ}\text{C}$ with a solid concentration of 10 %. The hydrolysis of corn husk yielded a concentration of reducing sugars of 8 g L^{-1} . Through the supplementation of the hydrolysate with dextrose and xylose, a production of 9 g L^{-1} of ethanol was achieved via fermentation with *Zymomonas mobilis*.

Keywords: corn husk, enzymatic hydrolysis, ethanol, lignocellulosic biomass, *Zymomonas mobilis*.

CONTENIDO

I INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Residuos agrícolas y su aprovechamiento.....	1
1.2 El concepto de biorrefinería.....	2
1.3 Etanol como combustible líquido y plataforma química.....	4
1.3.1 Etanol como combustible líquido.....	4
1.3.2 Etanol como plataforma química.....	7
II ANTECEDENTES.....	9
2.1 Composición de la biomasa lignocelulósica.....	9
2.2 Estrategias de pretratamiento.....	11
2.3 Hidrólisis de biomasa lignocelulósica.....	13
2.3.1 Producción de enzimas lignocelulolíticas.....	15
2.4 Fermentación.....	17
2.4.1 Microorganismos utilizados en la fermentación de azúcares para producción de bioetanol.....	18
III. JUSTIFICACIÓN.....	19
IV. HIPÓTESIS.....	19
V. OBJETIVOS.....	19
5.1 Objetivo general.....	19
5.2 Objetivos específicos.....	19
VI. MATERIAL Y MÉTODOS.....	20
6.1 Medios de cultivo y cepas.....	20
6.2 Primera etapa: producción inicial de extractos enzimáticos.....	20
6.2.1 Fermentación de <i>P. ostreatus</i> en medio WPDA.....	20
6.2.2 Fermentación de <i>A. niger</i> y <i>Penicillium spp.</i> en medio Czapek-Dox.....	21
6.2.3 Concentración de extractos fúngicos.....	22
6.2.4 Cuantificación de proteínas presentes en los extractos.....	22
6.2.5 Ensayo de actividad enzimática de celulasa.....	23
6.2.6 Determinación de actividad específica de celulasa.....	23
6.2.7 Ensayo de actividad enzimática de lacasa.....	24
6.3 Segunda etapa: producción de nuevos extractos enzimáticos.....	24
6.3.1 Producción de nuevos lotes de extractos fúngicos.....	25

6.3.2	Diseño de Plackett-Burman para la hidrólisis de hoja de maíz.	25
6.3.3	Determinación de actividad enzimática de celulasa y xilanasa.	26
6.4	Tercera etapa: producción de extractos enzimáticos sin dextrosa, hidrolisis y fermentación... ..	26
6.4.1	Producción en lotes de extractos enzimáticos sin dextrosa.	27
6.4.2	Pre-tratamiento de biomasa mediante criofracción.....	27
6.4.3	Hidrólisis de hoja de maíz pretratada mediante criofracción.....	27
6.4.4	Producción de bioetanol mediante fermentación con <i>Z. mobilis</i>	28
6.4.5	Cuantificación de etanol producido.	28
6.5	Análisis estadístico.	28
VII.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	29
7.1	Resultados de la primera etapa.	29
7.1.1	Los extractos fúngicos generaron de 182 a 502 mg L ⁻¹ de proteína total.....	29
7.1.2	Los extractos fúngicos hidrolizaron carboximetilcelulosa generando azúcares reductores.	30
7.1.3	Los extractos fúngicos presentaron actividad de CMCasa.....	33
7.1.4	El extracto producido por <i>P. ostreatus</i> presentó actividad de lacasa.....	35
7.2	Resultados de la segunda etapa.....	37
7.2.1	La concentración de sólidos de 10 % y la temperatura de 50 °C mejoran la hidrólisis de hoja de maíz.	37
7.2.2	La actividad enzimática de CMCasa de los extractos fúngicos producidos por <i>P. ostreatus</i> se ve afectada por la presencia de lacasas.	39
7.3	Resultados de la tercera etapa.....	42
7.3.1	La eliminación de sacarosa durante la producción de extractos enzimáticos favorece el incremento de actividad específica de hemicelulasa.....	42
7.3.2	La hidrólisis de hoja de maíz genera azúcares útiles para la producción de bioetanol.	43
7.3.3	La fermentación con <i>Z. mobilis</i> genera 3.2 % v/v de etanol.	44
VIII.	CONCLUSIONES	46
IX.	PERSPECTIVAS	48
X.	REFERENCIAS	49
XI.	ANEXOS	62
11.1	Cuantificación de proteínas.	62
11.2	Preparación de DNS.	63
11.3	Cuantificación de azúcares reductores.	63
11.4	Preparación de acetato 50 mM pH 5.5	63
11.5	Preparación de CMC al 1 % en búfer de acetato 50 mM pH 5.5.....	64

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Principales fuentes de biomasa residual en México.	1
Figura 2. El concepto de Biorrefinería.	3
Figura 3. Reacciones involucradas en la conversión de biomasa.	4
Figura 4. Fuentes de energía en BTU (unidad térmica británica) ordenadas por tipo.	5
Figura 5. Consumo en BTU (unidad térmica británica) de combustibles líquidos por sector.	5
Figura 6. Proyección de los biocombustibles como la mayor fuente de energía para el año 2030.	6
Figura 7. RON (por sus siglas en inglés: Research Octane Number) del etanol puro y en mezcla con gasolinas.	6
Figura 8. Estructura química del etanol y su grupo hidroxilo en color rojo.	7
Figura 9. Conversión de etanol a diferentes intermediarios y productos mediante reacciones de deshidratación, deshidrogenación y oxigenación.	8
Figura 10. Estructura de la biomasa lignocelulósica. Los polímeros celulosa, hemicelulosa y lignina forman una estructura heterogénea.	9
Figura 11. Estructura del polímero de celulosa.	10
Figura 12. Estructura de la hemicelulosa.	10
Figura 13. Estructura de la lignina y monómeros que la componen: p-cumarílico, alcohol coniferílico y alcohol sinapílico.	11
Figura 14. Pretratamiento por criofracción mediante nitrógeno líquido. La rigidez de la biomasa incrementa en contacto con nitrógeno líquido favoreciendo su disrupción mediante aplastamiento mecánico.	12
Figura 15. Despolimerización de lignina por la acción de lacasas. Las moléculas aromáticas que componen a la lignina son despolimerizadas mediante reacciones de oxido-reducción.	15
Figura 16. Sistema de fermentación en estado sólido (SSF) y fermentación sumergida (SmF). Sistema de fermentación sumergida (arriba) de tanque agitado. Sistema de fermentación en estado sólido (abajo).	17
Figura 17. Azúcares reductores obtenidos en el ensayo de CMCasa a 37 °C, utilizando el extracto de <i>P. ostreatus</i> proveniente del sistema de fermentación en estado sólido (SSF) con medio WPDA.	30

Figura 18. Concentración de azúcares reductores obtenidos en el ensayo de CMCasa a 37 °C con el extracto de <i>P. ostreatus</i> proveniente del sistema RITA sin trigo (izquierda) y con trigo (derecha) en medio WPDA.	31
Figura 19. Azúcares reductores obtenidos mediante hidrólisis de CMC a 37 °C con extracto concentrado de <i>A. niger</i> (izquierda) y <i>Penicillium spp.</i> (derecha) producido en sistema RITA con medio Czapek-Dox.	32
Figura 20. Concentración de azúcares reductores obtenidos mediante hidrólisis de CMC a 37 °C con el extracto de <i>A. niger</i> (barras azules, izquierda) y <i>Penicillium spp.</i> (barras rosas, derecha) producido en el sistema SmF con medio Czapek-Dox.	33
Figura 21. Actividad específica de CMCasa obtenida mediante hidrólisis de CMC a 37 °C. De izquierda a derecha: Extractos provenientes de: SSF de <i>P. ostreatus</i> en medio WPDB, RITA de <i>P. ostreatus</i> en medio PDB, RITA de <i>A. niger</i> en medio Czapek-Dox, RITA de <i>Penicillium spp.</i> en medio Czapek-Dox, SmF de <i>A. niger</i> en medio Czapek-Dox y SmF de <i>Penicillium spp.</i> en medio Czapek-Dox.	34
Figura 22. Actividad de lacasa mediante el incremento significativo de la absorbancia a 415 nm después de 10 min de incubación a 40 °C en presencia de ABTS del extracto de <i>P. ostreatus</i> producido en SSF medio WPDB a 37 °C.	35
Figura 23. Diagrama de Pareto generado con los datos obtenidos del diseño de Plackett-Burman que muestra la contribución de cada factor evaluado sobre la liberación de azúcares reductores en la hidrólisis de hoja de maíz.	38
Figura 24. Gráficas de contorno generada con los datos obtenidos del diseño de Plackett-Burman que muestran el efecto de la temperatura y la concentración de sólidos de hoja de maíz sobre la liberación de azúcares reductores en la hidrólisis de hoja de maíz a pH 4.5 (izquierda) y pH 5.5 (derecha).	38
Figura 25. Azúcares reductores (equivalentes de dextrosa) generados después de la incubación a 45 °C en presencia de carboximetilcelulosa al 1 %, de los extractos fúngicos obtenidos en los lotes 2 y 3.	39
Figura 26. Mecanismo de represión catabólica sobre la expresión de celulasas y xilanasas, generado por la presencia de glucosa y xilosa.	40
Figura 27. Azúcares reductores (equivalentes de xilosa) generados después de la incubación a 45 °C de los extractos fúngicos obtenidos en los lotes 2 y 3, en presencia de xilano al 2 %.	41
Figura 28. Azúcares generados medidos como equivalentes de dextrosa o xilosa durante los ensayos de actividad de celulasa (izquierda) y xilanasas (derecha) usando extractos enzimáticos producidos sin dextrosa.	43

Figura 29. Concentración de etanol en g L⁻¹ generado por la fermentación con *Z. mobilis* de hidrolizado sin suplementar (barras blancas) e hidrolizado suplementado con dextrosa y xilosa (barras grises), a las 0, 48 y 120 h de incubación. **45**

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Composición de la hoja de maíz.	2
Tabla 2. Propiedades fisicoquímicas del etanol.	4
Tabla 3. Valor comercial promedio de productos obtenidos por conversión del etanol	8
Tabla 4. Pretratamientos y rendimientos de azúcares obtenidos mediante distintos pretratamientos y posterior hidrólisis enzimática.	13
Tabla 5. Ventajas de distintos organismos usados para la producción de etanol.	18
Tabla 6. Parámetros cinéticos de fermentación de <i>Z. mobilis</i> en cultivo anaerobio.	18
Tabla 7. Diseño de Plackett-Burman generado para la evaluación del efecto de la concentración de sólidos de hoja de maíz, temperatura y pH sobre la generación de azúcares reductores en la hidrólisis de hoja de maíz.	26
Tabla 8. Concentración de proteína en los extractos producidos por <i>P. ostreatus</i> , <i>A. niger</i> y <i>Penicillium spp.</i>	29
Tabla 9. Incremento de azúcares reductores, actividad de CMCasa específica, actividad de lacasa de los extractos producidos por <i>P. ostreatus</i> , <i>A. niger</i> y <i>Penicillium spp.</i>	36
Tabla 10. Actividad de CMCasa y actividad de lacasa de los extractos producidos por <i>P. ostreatus</i> , <i>A. niger</i> y <i>Penicillium spp.</i> en los lotes 2 y 3.	42

I INTRODUCCIÓN

1.1 Residuos agrícolas y su aprovechamiento.

La biomasa lignocelulósica es considerada como la mayor fuente renovable de materia orgánica [1]. Entre las principales fuentes de biomasa lignocelulósica, se encuentran los residuos agroindustriales, los residuos agrícolas y los residuos forestales [2]. En México, la mayor parte de la biomasa lignocelulósica es generada por los residuos forestales procedentes de bosques nativos y de eucalipto, precedida por los cultivos energéticos y por los residuos agrícolas (Figura 1).

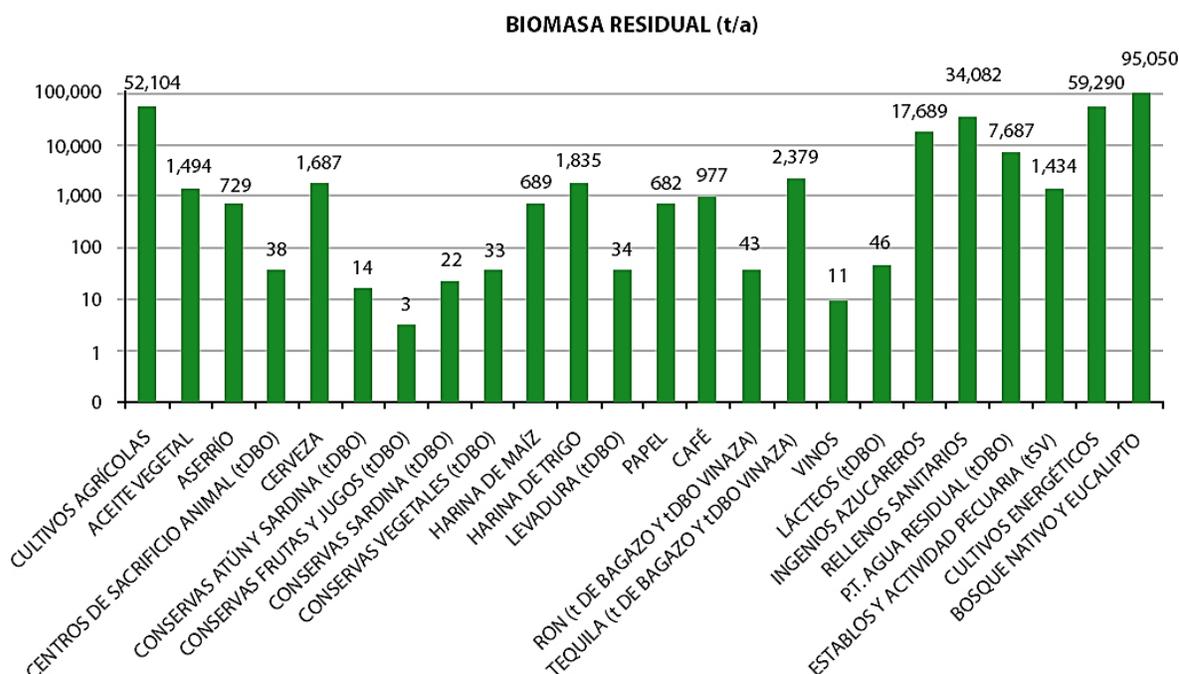


Figura 1. Principales fuentes de biomasa residual en México [3].

El sector productivo agrícola de México se desarrolla sobre un estimado de 21 millones de hectáreas de superficie, produciendo cerca de 200 productos agrícolas siendo los de mayor producción maíz, frijol, trigo, arroz y sorgo. Tras la cosecha de los productos agrícolas se genera una gran cantidad de residuos denominados “residuos agrícolas” que incluyen partes de la planta que son descartadas y desechadas en el campo tras

ser cosechadas. El maíz es el producto agrícola de mayor producción en México y en 2016 generó 28,251,000 toneladas de residuos agrícolas [4].

Entre los residuos agrícolas generados por la cosecha de maíz se encuentra la hoja de maíz, que representa aproximadamente 96 Kg por hectárea cosechada [5]. La cantidad de hectáreas cosechadas de maíz en 2019 en México fue de 6,690,449.47 hectáreas, generando cerca de 642,283.104 ton de hoja de maíz [6]. La hoja de maíz tiene en su composición alrededor de 827 g de azúcares por Kg (Tabla 1) siendo así un residuo agrícola atractivo como fuente de carbono.

Tabla 1. Composición de la hoja de maíz. Modificada de Barl, 1991 [7].

Constituyente	Residuo			
	Paja	Mazorca	Tallo	Hojas
Celulosa	382 ± 4	391 ± 2	354 ± 5	302 ± 4
Hemicelulosa	445 ± 7	421 ± 5	252 ± 4	292 ± 8
Lignina Klason	66± 3	91 ± 3	112 ± 4	134 ± 3
Proteína	19 ± 2	17 ± 2	36 ± 3	82 ± 4
Ceniza	28 ± 1	12 ± 1	46 ± 2	109

La economía circular tiene como principal objetivo aprovechar desechos y disminuir la contaminación. Esto es lo contrario a la economía lineal, donde el esquema de producción se basa en tomar, producir y desechar. De este modo, se puede implementar una economía circular dentro del sector agrícola, aprovechando así todos los desechos producidos por la cosecha de insumos como el maíz [8].

1.2 El concepto de biorrefinería.

Uno de los retos más importantes para el sector industrial es encontrar alternativas para la producción de combustibles, químicos y materiales que no dependan de los recursos fósiles. El uso de biomasa como materia prima, es una alternativa adecuada debido a su abundancia y carácter renovable. La obtención de combustibles, químicos, materiales y energía mediante procesos de conversión de biomasa se conoce como

biorrefinería (Figura 2) [9], derivando de ésta tres etapas tecnológicas: Biorrefinerías de 1ª generación, que utilizan biomasa procedente de granos, que son molidos en seco para producir etanol. Biorrefinerías de 2ª generación, utilizan biomasa procedente de granos que son molidos en presencia de humedad, lo cual permite la obtención de diversos productos a partir del grano como almidón, jarabe, aceites y etanol. Finalmente, Biorrefinería de 3ª generación: son la versión más avanzada, utilizan biomasa procedente de cultivos agrícolas y de bosques para la producción de químicos, energía y materiales (Figura 2) [10].

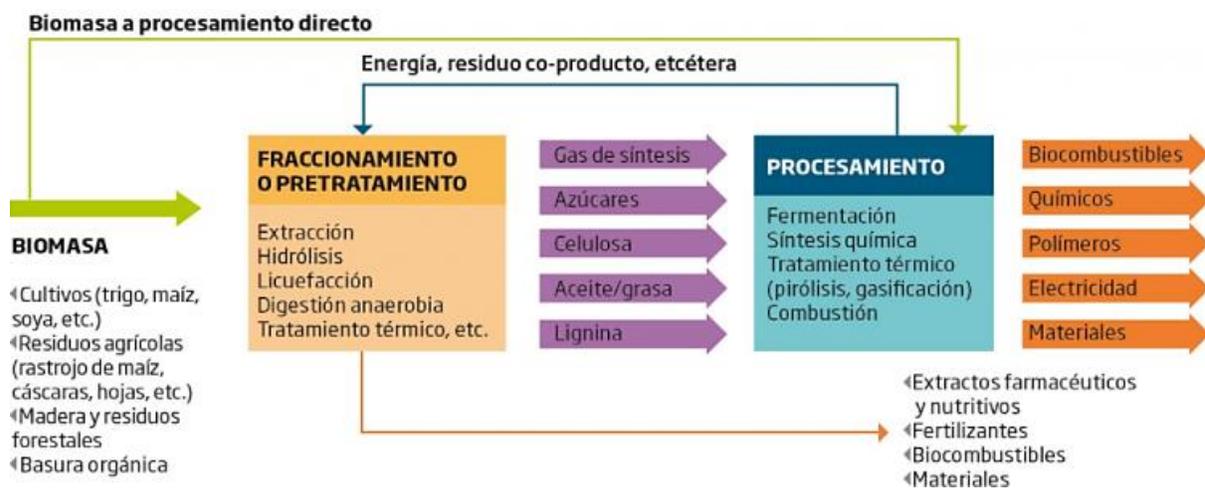


Figura 2. El concepto de biorrefinería [9].

Dentro de las biorrefinerías de 3ª generación se encuentra la biorrefinería basada en lignocelulosa, que como indica su nombre, utiliza biomasa lignocelulósica como materia prima para producir intermediarios mediante una serie de reacciones (Figura 3). Posteriormente estos intermediarios pueden ser convertidos en una gran variedad de productos químicos mediante síntesis química y tratamiento térmico, o utilizando microorganismos mediante un proceso de fermentación [11].

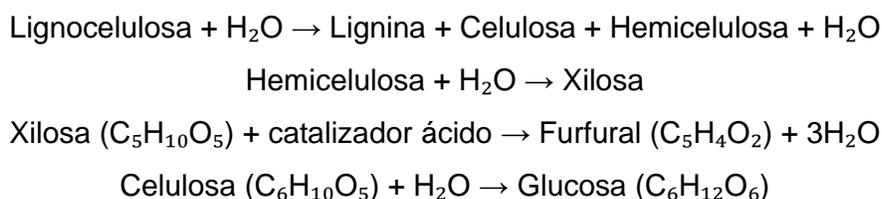


Figura 3. Reacciones involucradas en la conversión de biomasa. Los polímeros que componen la estructura de la biomasa lignocelulósica son convertidos a azúcares y compuestos fenólicos procedentes de la lignina [11].

1.3 Etanol como combustible líquido y plataforma química.

El alcohol etílico o etanol es un líquido inflamable e incoloro con características bien definidas (Tabla 2), con composición química $\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$ y cuyo descubrimiento fue en la edad media, en donde se consumía en bebidas fermentadas, pero fue hasta el año 1800 cuando sus propiedades como combustible fueron utilizadas para sustituir el aceite de ballena utilizado en lámparas de iluminación [12].

Tabla 2. Propiedades fisicoquímicas del etanol.

Fórmula Química	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$
Peso Molecular	46.069 g/mol
Densidad	0.789 g/mL
Punto de ebullición	78.2 °C

Actualmente el etanol es utilizado mayormente como aditivo oxigenante con el fin de incrementar el octanaje en gasolinas, sustituyendo al Metil Terbutil Éter (MTBE) ya que éste último es tóxico [13].

1.3.1 Etanol como combustible líquido.

A nivel global, los combustibles líquidos son la mayor fuente de energía (Figura 4), siendo la industria del transporte quien hace mayor uso de estos (Figura 5). En las décadas siguientes, se espera un aumento en la demanda de combustibles líquidos. Para el año 2030 se alcanzará un valor de aproximadamente 5000×10^6 toneladas equivalentes de petróleo (tep) por día [14].

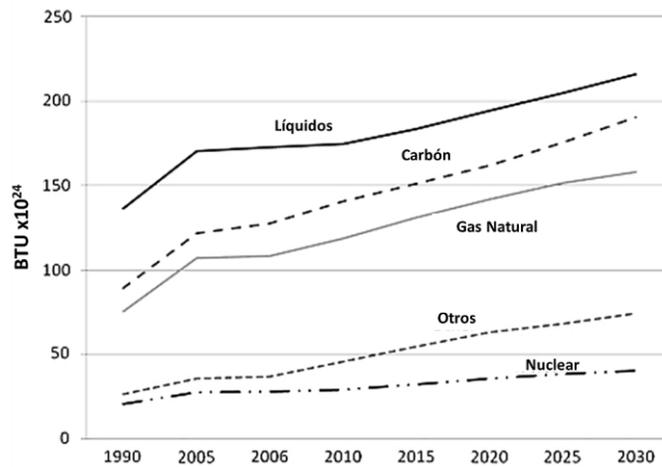


Figura 4. Fuentes de energía en BTU (unidad térmica británica) ordenadas por tipo [15].

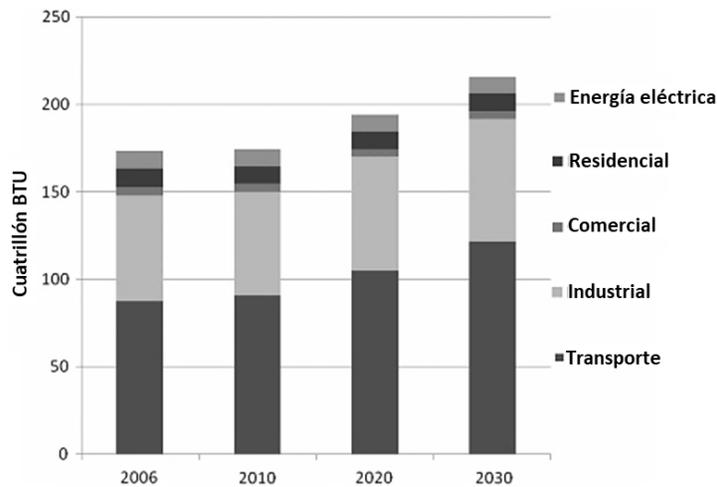


Figura 5. Consumo en BTU (unidad térmica británica) de combustibles líquidos por sector [15].

Debido a esto las reservas de petróleo han sido llevadas a márgenes de producción muy estrechos, provocando que se afecte su precio a medida que la demanda incrementa. Por lo que es importante cubrir dicha demanda, sin embargo, esto representa un reto global en donde los biocombustibles como el etanol y el biodiesel son las alternativas de fuente de energía del petróleo, con un fuerte crecimiento que se estima alcanzará 133×10^6 tep (toneladas equivalentes de petróleo) al día en el 2030, año en el que se convertirán en la mayor fuente no convencional de energía (Figura 6) [15].

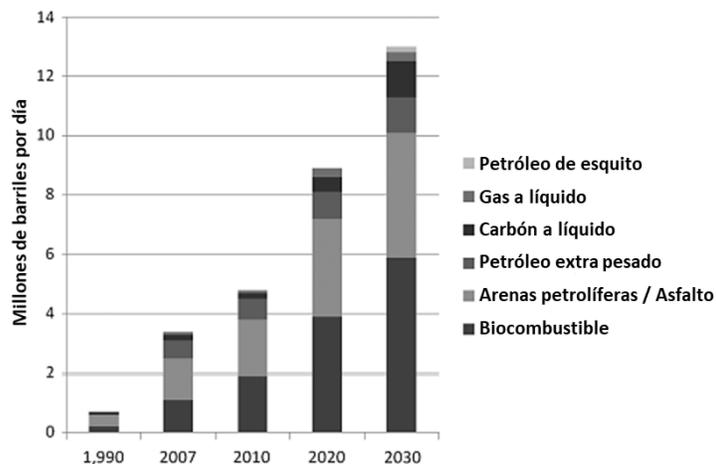


Figura 6. Proyección de los biocombustibles como la mayor fuente de energía para el año 2030 [15].

Como combustible, las propiedades del etanol resultan ser mejores que las de la gasolina, por su octanaje, que es una medida del desempeño de un combustible, el etanol posee un número de octanos (RON, por sus siglas en inglés: Research Octane Number) más alto que la gasolina (Figura 7), por ello es considerado un combustible competitivo [16].

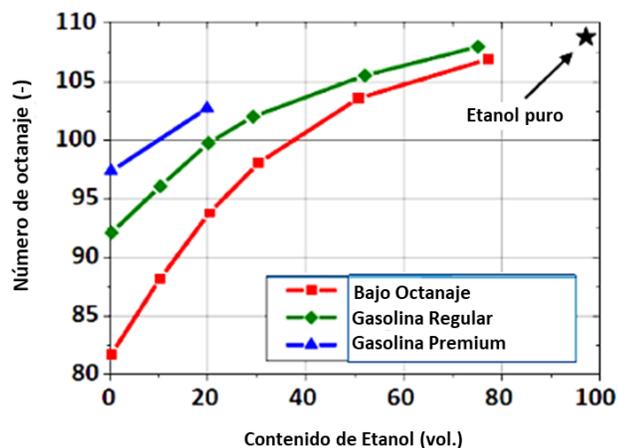


Figura 7. RON (por sus siglas en inglés: Research Octane Number) del etanol puro y en mezcla con gasolinas [16].

A la par, la producción global de biocombustibles se encuentra en expansión y se estima que continuará con un crecimiento sostenido gracias a nuevas regulaciones y

mayor inversión, llegando a alcanzar en 2030 un valor energético equivalente de 2.7 millones de equivalentes de barril de petróleo al día [15].

No obstante, a las proyecciones del uso de biocombustibles, factores como la necesidad de mejorar la eficiencia de producción del etanol y la llamada “barrera de mezcla” de etanol permitida en combustibles, establecen la necesidad de explorar el potencial del etanol no solamente como combustible sino como plataforma química [17].

1.3.2 Etanol como plataforma química.

El etanol es producido comúnmente en grandes cantidades a bajo costo y se puede convertir en diversos productos petroquímicos básicos y de especialidad por su estructura química. El grupo hidroxilo presente en la estructura del etanol (Figura 8) permite su conversión en intermediarios y otros productos mediante reacciones de deshidrogenación, deshidratación, condensación, oxidación y esterificación (Figura 9) [17].

Además, tomando en cuenta el valor comercial del etanol como combustible (0.5 dólares/kg), estos productos e intermediarios pueden tener un mayor valor agregado (Tabla 3).

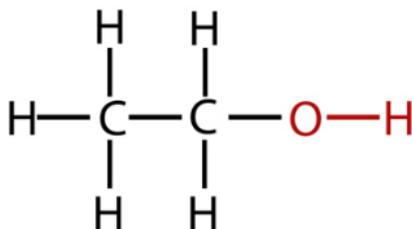


Figura 8. Estructura química del etanol y su grupo hidroxilo señalado en color rojo.

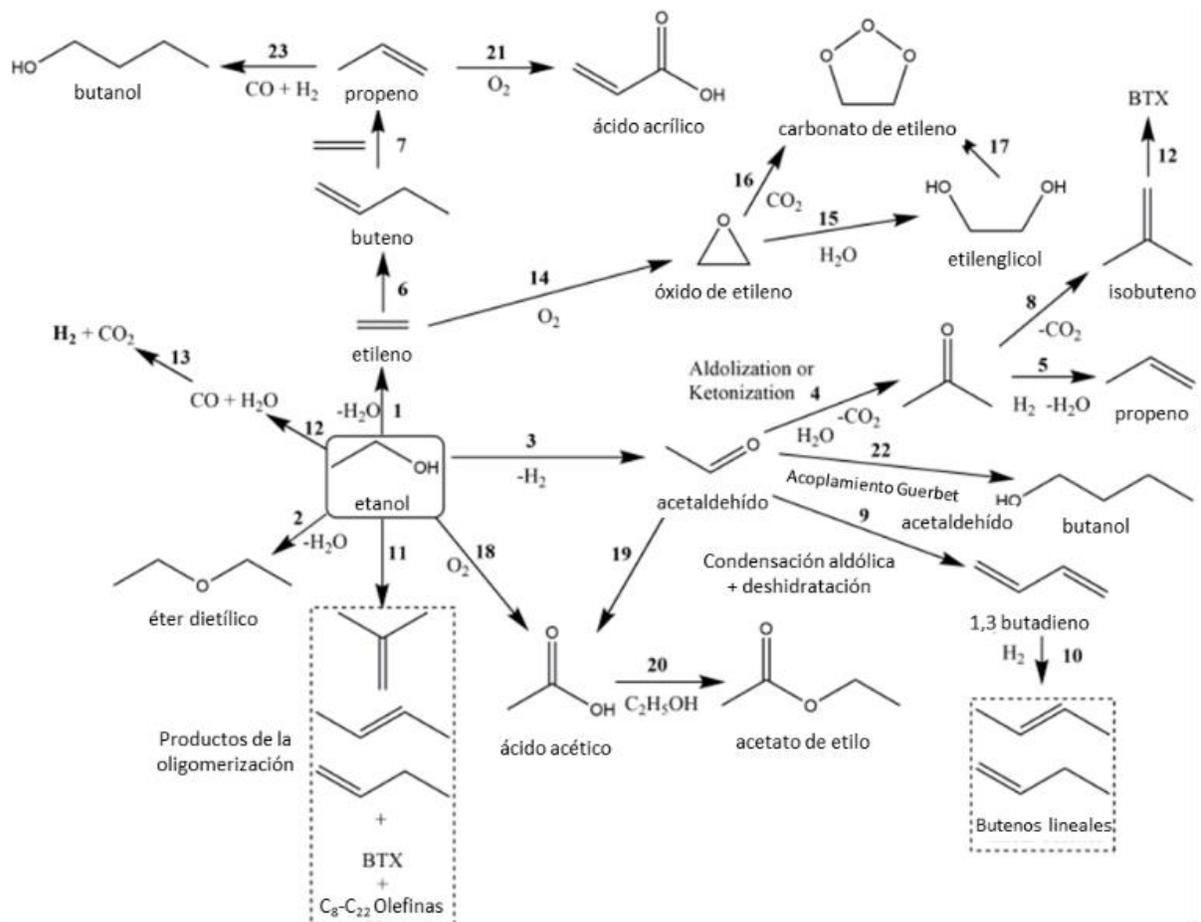


Figura 9. Conversión de etanol a diferentes intermediarios y productos mediante reacciones de deshidratación, deshidrogenación y oxigenación [17].

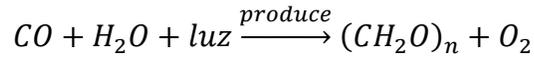
Tabla 3. Valor comercial promedio de productos obtenidos por conversión del etanol [17].

Producto	Consumo (Ton/año)	Precio Promedio (dólares/kg) (2015-2018)
Dietil éter	0.04 (2018)	3.30
1-Butanol	5.5 (2014)	3.20
Hidrógeno	85 (2018)	1.99
Isobutano	14 (2019)	1.9
Acetaldehído	0.9 (2016)	1.86
Carbonato de etileno	0.2 (2019)	1.50
Óxido de etileno	26 (2015)	1.34
Propeno	96 (2015)	1.28
Acetato de etilo	3.1 (2017)	0.97
Etilenglicol	25 (2016)	0.95

II ANTECEDENTES

2.1 Composición de la biomasa lignocelulósica.

Mediante el proceso de fotosíntesis, las plantas utilizan energía solar para convertir CO_2 y agua en carbohidratos $(\text{CH}_2\text{O})_n$:



Los carbohidratos producidos en la fotosíntesis son almacenados por las plantas en forma de polímeros conocidos como celulosa, hemicelulosa y lignina. La unión de estos polímeros en distintas proporciones conforma la biomasa lignocelulósica (Figura 10) [15].

El componente mayoritario de esta biomasa es la celulosa, un homopolímero lineal compuesto de 5000 a 10000 unidades de glucosa (D-glucopiranosas) unidas mediante enlace β -(1-4)-glicosídico (Figura 11) [18]. Las interacciones entre puentes de hidrógeno intermoleculares e intramoleculares presentes en la estructura de la celulosa generan la formación de microfibrillas rígidas insolubles en agua, que dan lugar a las fibras de celulosa [19].

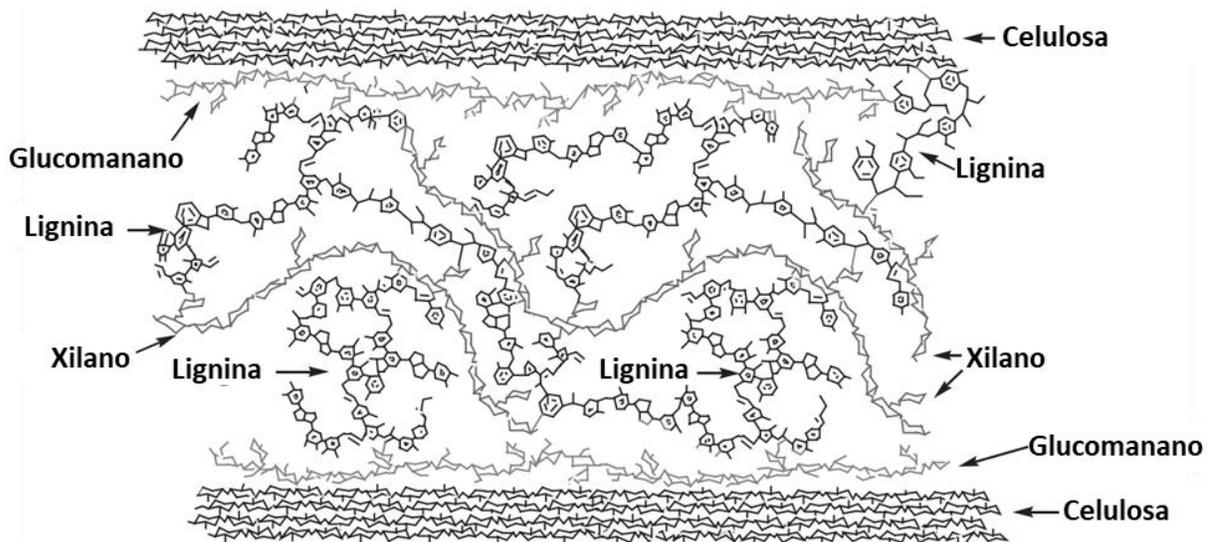


Figura 10. Estructura de la biomasa lignocelulósica. Los polímeros celulosa, hemicelulosa y lignina forman una estructura heterogénea [20].

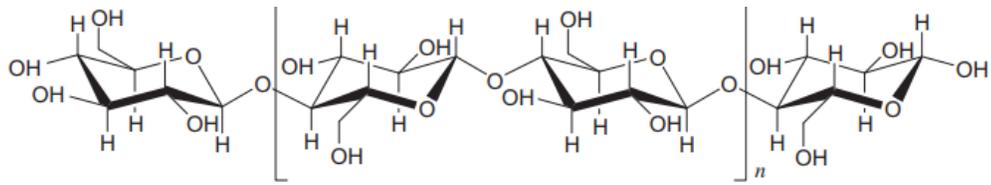


Figura 11. Estructura del polímero celulosa [15].

La hemicelulosa es el segundo componente mayoritario presente en la biomasa lignocelulósica. Es un hetero polímero (Figura 12) constituido por xilano, glucuronoxilano, arabinoxilano, glucomanano y xiloglucano [10]. A su vez, estos polímeros se conforman de hexosas (glucosa, galactosa, ramnosa y manosa) y pentosas (xilosa y arabinosa). El polímero xilano está presente de 10 a 35 % en madera dura y de 10 a 15 % en madera suave. A su vez, las cadenas que conforman la estructura de la hemicelulosa están formadas en un 90% por xilosa [18], por lo tanto, la hemicelulosa es una fuente rica de xilosa [10].

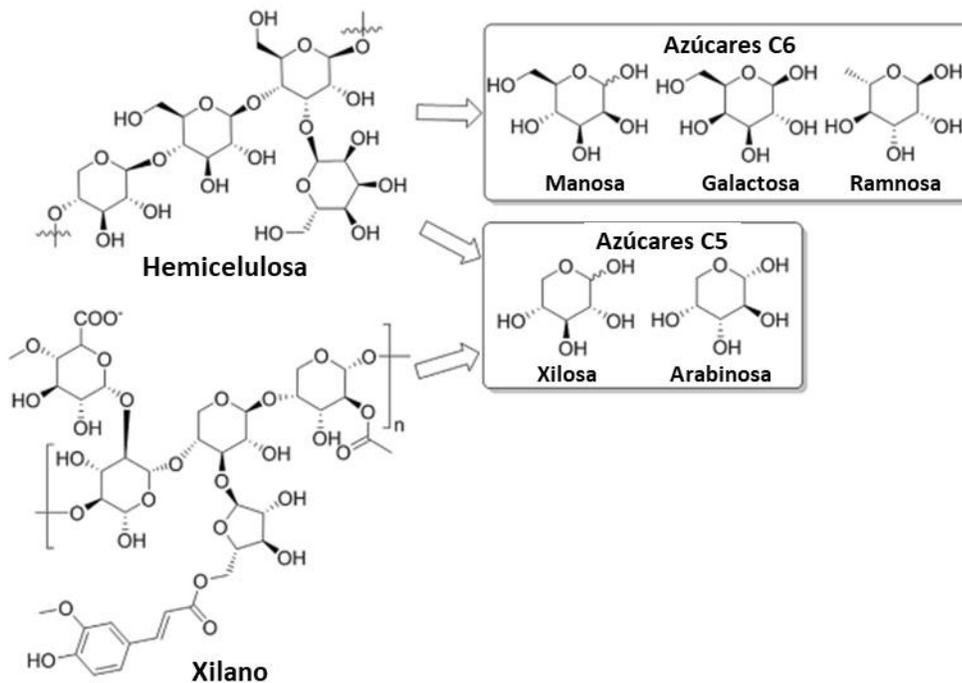


Figura 12. Estructura de la hemicelulosa [10].

Finalmente, el componente minoritario de la biomasa lignocelulósica es la lignina, polímero fenólico amorfo sin estructura definida [15] formado por unidades de alcohol

p-cumarílico (4-hidroxicinamílico), alcohol coniferílico (3-metoxi 4-hidroxicinamílico) y alcohol sinapílico (3,5-dimetoxi 4-hidroxicinamílico) (Figura 13) [10] unidos por enlaces C-C y enlaces éter [18]. La lignina se une covalentemente a la hemicelulosa y la hemicelulosa mediante enlaces éster, éter y enlace glucosídico y confiere resistencia mecánica a la pared celular [15] [18].

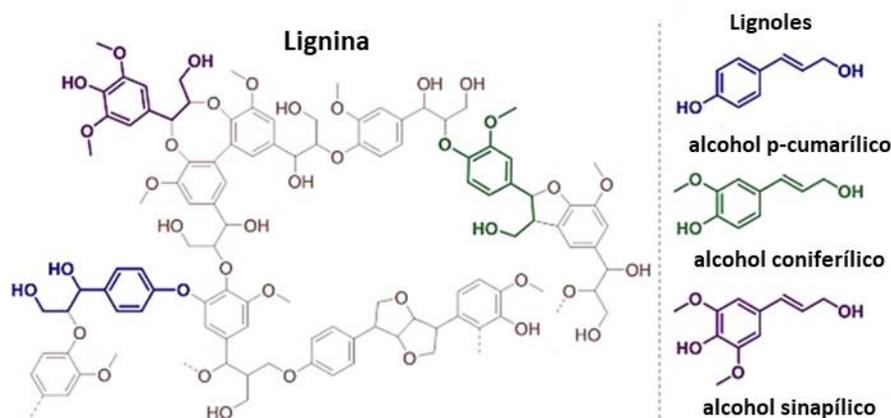


Figura 13. Estructura de la lignina y monómeros que la componen: *p*-cumarílico, alcohol coniferílico y alcohol sinapílico.

La naturaleza heterogénea de la biomasa lignocelulósica [21], la estructura fuertemente entrecruzada de la lignina, la cristalinidad de la celulosa y la baja digestibilidad de la hemicelulosa convierten a la lignocelulosa en un material recalcitrante [22], siendo así necesarias grandes cantidades de energía y químicos para su hidrólisis. Debido a lo anterior, el uso de biomasa lignocelulósica precisa de un tratamiento de hidrólisis previo [23].

2.2 Estrategias de pretratamiento.

Los métodos de pretratamiento de biomasa lignocelulósica se dividen en 4 categorías: mecánico, fisicoquímico, químico y biológico [21]. Los pretratamientos físicos no involucran adición de químicos y su principal objetivo es incrementar el área superficial [24]. En los métodos químicos, es común el uso de ácidos, bases y solventes para alterar la estructura de la lignocelulosa y facilitar el proceso de hidrólisis, sin embargo, la generación de inhibidores como el hidroximetil furfural y el furfural

aldehído son el principal problema de los métodos químicos para subsecuentes procesos. Por otra parte, se ha implementado el uso de hongos y enzimas fúngicas para la eliminación de lignina presente en la biomasa como pretratamiento biológico, generando procesos más económicos y de menor impacto ambiental [23, 24, 25].

Un enfoque innovador dentro de los pretratamientos físicos es el crio-fraccionamiento, desarrollado por Castoldi y col., 2017 (Figura 14). Esta metodología utiliza el nitrógeno líquido para congelar la biomasa y ésta pueda someterse a fuerzas de impacto, en donde los cristales formados en la congelación ejercerán presión sobre la pared celular de la biomasa causando su ruptura y por consiguiente liberando las microfibrillas de celulosa y hemicelulosa. Esta metodología, presenta ventajas significativas frente al uso de métodos químicos, ya que es una metodología simple que no requiere agua u otros químicos durante el pretratamiento de la biomasa, no genera corrosión ni compuestos inhibidores que se han observado en tratamientos químicos como son fenoles, furfurales e hidroximetil furfurales (HMF) [26].

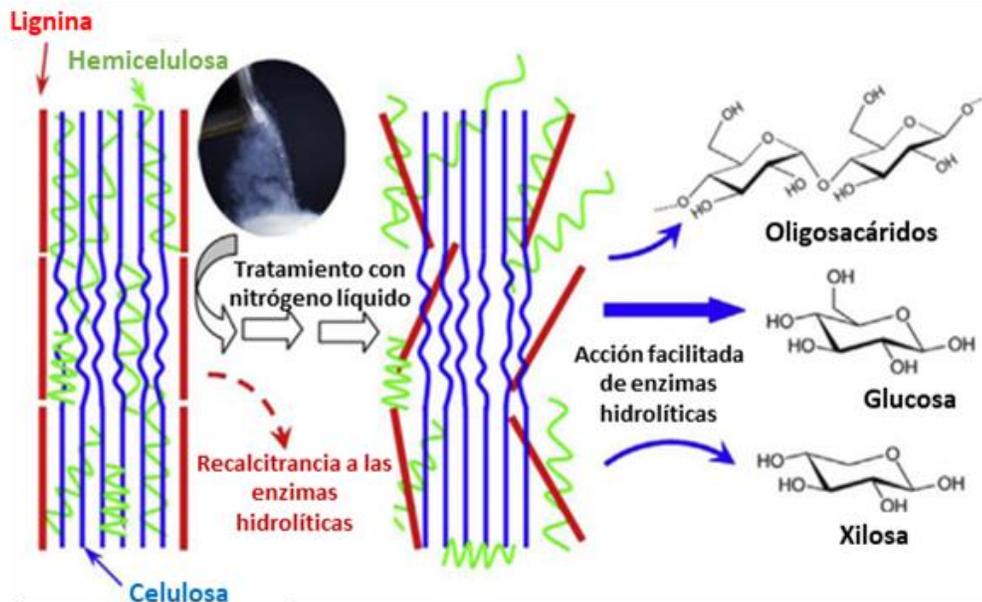


Figura 14. Pretratamiento por crio-fracciónación mediante nitrógeno líquido. La rigidez de la biomasa incrementa en contacto con nitrógeno líquido favoreciendo su disrupción mediante aplastamiento mecánico [26].

La producción eficiente de azúcares fermentables depende de la metodología de pretratamiento utilizada y la adición adecuada de enzimas para el proceso de hidrólisis. Los métodos de pretratamiento físicos como el molino de discos y el uso de microondas resultan ser simples pero efectivos para la obtención de azúcares, alcanzando hasta un 80 % y 83 % de conversión respectivamente. Por otro lado, los métodos químicos como la oxidación húmeda y la explosión de fibra en amoníaco muestran menor eficacia, con valores de 30 % y 61 % (Tabla 4) [24].

Tabla 4. Pretratamientos y rendimientos de azúcares obtenidos mediante distintos pretratamientos y posterior hidrólisis enzimática. Modificada de Haldar, 2016 [24].

Método	Biomasa	Producción de azúcares (% p/p)
Molino de disco	Paja de arroz	80
Molino de discos húmedos	Paja de arroz	73
Molino de Perlas	Bagazo de caña de azúcar	58
Extrusión	Fibra de Trigo	67
Microondas	Bagazo de caña de azúcar	83
Explosión de vapor	Tallo de girasol	44
Explosión de fibra en amoníaco	Pasto varilla	61
Oxidación húmeda	Cáscara de arroz	30

Por otra parte, las estrategias de pretratamiento biológico con base en hongos resultan de gran interés, debido a la capacidad de estos microorganismos al degradar selectivamente lignina sin generar pérdidas de celulosa, además de presentar rendimientos de azúcares similares a los obtenidos por pretratamientos químicos, con la ventaja de causar menor impacto ambiental y requerir de menos energía que los procesos tradicionales [27].

2.3 Hidrólisis de biomasa lignocelulósica.

La hidrólisis es la operación unitaria en la que los componentes de la biomasa lignocelulósica son despolimerizados para obtener azúcares que sirvan como sustrato para llevar a cabo el proceso de fermentación [28].

El proceso de hidrólisis puede realizarse mediante dos métodos: hidrólisis ácida o hidrólisis enzimática [29]. La hidrólisis ácida se divide a su vez en hidrólisis diluida o

hidrólisis concentrada. La hidrólisis diluida se realiza con concentraciones de 1–3 % y requiere de temperaturas de 200 a 240 °C y presiones de 0.1 a 0.5 MPa para despolimerizar celulosa, alcanzando un rendimiento de 60 % de azúcares en pocos min [15, 30], pero tiene la desventaja de formación de sustancias tóxicas como el HMF, además de la degradación de los azúcares generados [31]. Por otra parte, en la hidrólisis concentrada se emplean temperaturas y presiones moderadas cercanas a las condiciones estándar, llegando a rendimientos de 90 % sin obtener grandes concentraciones de inhibidores. Sin embargo, requiere gran cantidad de ácido y gastos operativos para recuperación y reutilización del ácido [32].

Por otro lado, en la hidrólisis enzimática de biomasa lignocelulósica, los componentes de la biomasa son transformados a azúcares fermentables mediante el uso de enzimas lignocelulíticas [28]. Estas enzimas lignocelulíticas se clasifican en tres grupos: 1) enzimas celulíticas o celulasas, 2) enzimas hemicelulíticas y 3) enzimas lignolíticas [33].

Las celulasas son un grupo de enzimas capaces de convertir celulosa en azúcares solubles. Las celulasas están categorizadas en tres grupos: 1) endo β -1,4-glucanasas, hidrolizan los enlaces internos β -1,4 de las cadenas de celulosa, generando extremos reductores y no reductores, 2) exo- β 1-4-glucanasa hidroliza al disacárido celobiosa en el extremo no reductor (celobiohidrolasas) o del extremo reductor (celobiosidasas) y 3) β -glucosidasas que, hidrolizan unidades de celobiosa y celodextrinas generando monómeros individuales de glucosa [18].

Por su parte, las xilanasas están conformadas por β -xilosidasas y endo 1,4- β -D-xilanohidrolasas, que actúan en conjunto para despolimerizar el xilano presente en la hemicelulosa, generando pentosas principalmente. La enzima endo 1,4- β -D-xilanohidrolasa rompe los enlaces internos β -1,4 de la cadena principal del xilano. La β -xilosidasa hidroliza xilobiosa y xilooligosacáridos de cadena corta produciendo xilosa [18].

Finalmente, el grupo de enzimas lignolíticas comprende a las peroxidasas descolorantes, las peroxidasas versátiles, las peroxidasas de manganeso y las lacasas. Estas últimas utilizan la capacidad reductora del cobre para llevar a cabo la reducción de compuestos aromáticos, iones metálicos y organometales mediante reacciones de oxidación (Figura 15) [33].

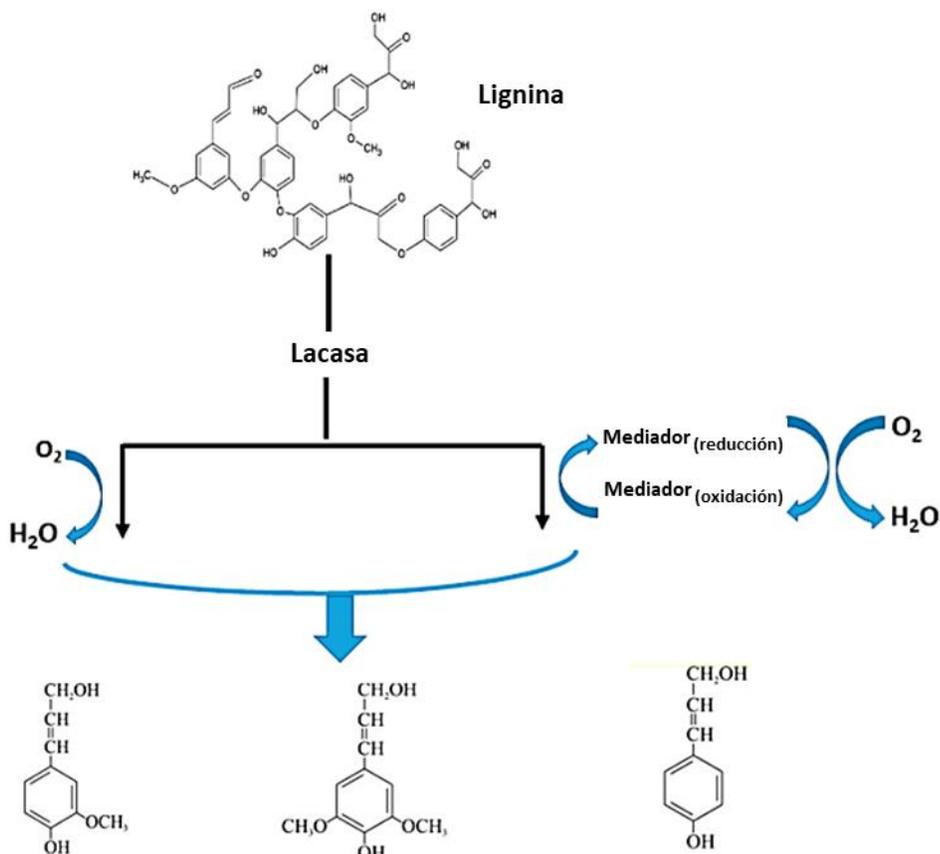


Figura 15. Despolimerización de lignina por la acción de lacasas. Las moléculas aromáticas que componen a la lignina son despolimerizadas mediante reacciones de oxido-reducción [18].

2.3.1 Producción de enzimas lignocelulolíticas.

Las bacterias y hongos han desarrollado en su proceso evolutivo, la capacidad para sintetizar enzimas lignocelulíticas. Algunos géneros de hongos como *Aspergillus* y *Penicillium* son capaces de despolimerizar celulosa y hemicelulosa, pero no son capaces de degradar lignina completamente. Sin embargo, las especies de los

géneros *Pleurotus* y *Ganoderma* son capaces de degradar tanto celulosa como lignina [33].

La composición del sustrato es un factor clave en el desarrollo y productividad de los hongos, por lo que es importante seleccionar un sustrato adecuado. Los hongos del género *Pleurotus* son capaces de crecer adecuadamente en residuos con un alto ratio de carbono/nitrógeno y temperatura de 25 a 30 °C. Se recomienda suplementar también con residuos agrícolas como la paja de arroz [34]. *A. niger* se desarrolla correctamente y produce enzimas lignocelulolíticas a 30 °C y pH de 5.0 [35]. Por otro lado, los géneros *Penicillium* crecen óptimamente a 28 °C con un pH de 3 a 4 [36].

Además, los hongos son considerados como descomponedores naturales [37], por lo que son capaces de producir enzimas y excretarlas al medio extracelular, principalmente hidrolasas, las cuales les permiten adquirir nutrientes del medio [38] [39].

En la literatura se han abordado dos diseños (Figura 17) para la producción de enzimas lignocelulíticas; la fermentación en estado sólido (SSF) y la fermentación sumergida (SmF). La fermentación sumergida, es el proceso realizado en exceso de agua libre y es el más utilizado debido a la facilidad de su implementación a gran escala, además permite la instalación de instrumentación para control y monitoreo de variables como temperatura, pH y oxígeno disuelto.

La fermentación en estado sólido es un proceso diseñado para llevarse a cabo en ausencia de agua libre. Su uso permite disminuir costos de producción en la generación de enzimas de bajo valor comercial como las enzimas lignocelulíticas. La disminución en el costo de operación de este tipo de fermentación obedece al uso de reactores menos sofisticados que los utilizados en fermentación sumergida, además las enzimas producidas se obtienen en alta concentración gracias a la ausencia de agua libre [40].

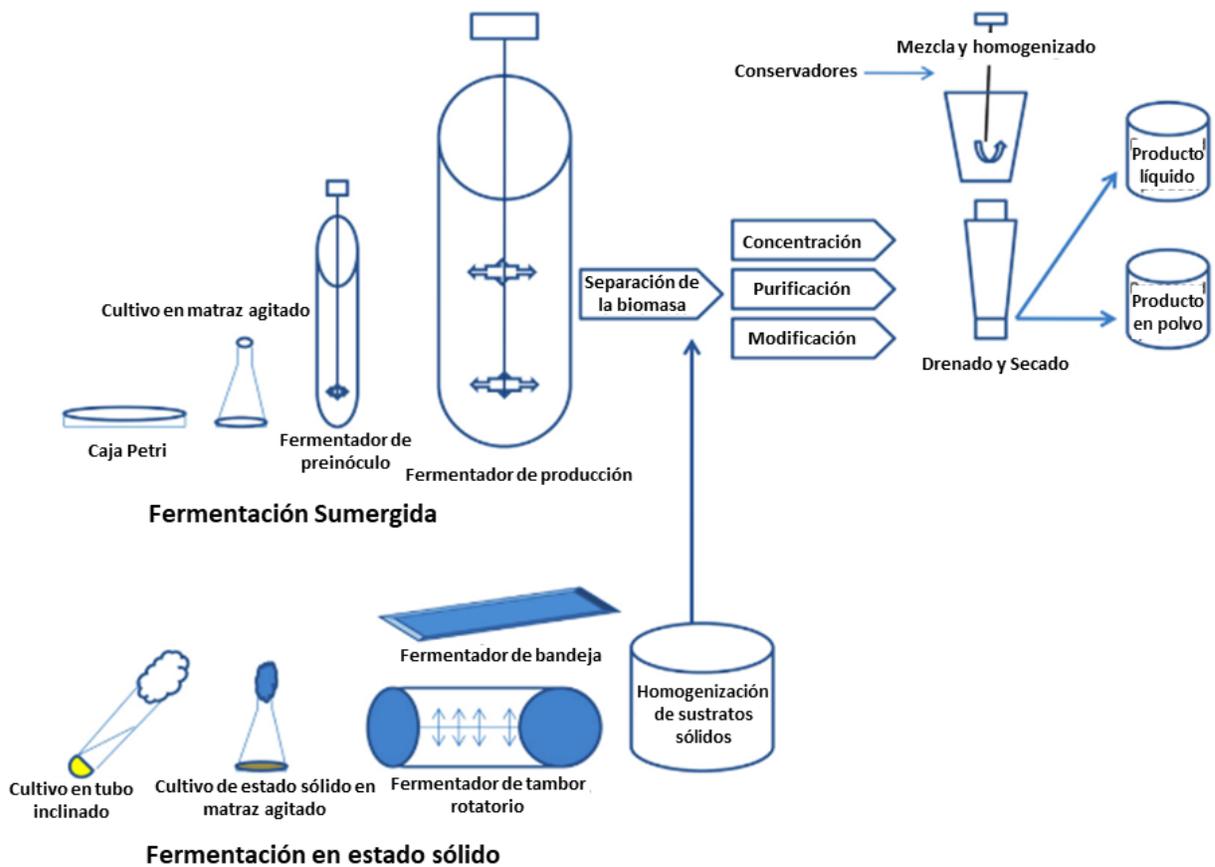


Figura 16. Sistema de fermentación en estado sólido (SSF) y fermentación sumergida (SmF). Sistema de fermentación sumergida (arriba) de tanque agitado. Sistema de fermentación en estado sólido (abajo) [41].

Después de ser producidas estas enzimas son utilizadas para la despolimerización de biomasa lignocelulósica, generando azúcares que servirán como sustrato para la etapa de fermentación.

2.4 Fermentación.

La fermentación es un proceso bioquímico complejo en el cual los azúcares obtenidos en las etapas previas son transformados en etanol y dióxido de carbono mediante la acción de un microorganismo, generalmente levaduras [42]. En condiciones anaeróbicas el proceso se lleva a cabo en el citosol de la levadura, comenzando con la glucólisis, en la cual se obtienen dos moléculas de ácido pirúvico que son convertidas finalmente en etanol y CO₂ [43].

2.4.1 Microorganismos utilizados en la fermentación de azúcares para producción de bioetanol.

Las bacterias y las levaduras son organismos capaces de producir etanol como producto principal a partir de azúcares. De los cuales, *S. cerevisiae* es el microorganismo más utilizado a nivel industrial para la producción de etanol, debido características como su capacidad para tolerar altas concentraciones de etanol, bajos niveles de pH y presencia de inhibidores. Además de glucosa puede metabolizar manosa y galactosa para producir etanol [44]. Existen también otros organismos capaces de producir etanol y que presentan diferentes ventajas, como se muestra en la Tabla 5.

Tabla 5. Ventajas de distintos organismos usados para la producción de etanol [45].

Especie	Ventajas
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Tolerancia al etanol (10 % v/v) • Rendimiento de etanol (90 %)
<i>Zymomonas mobilis</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Tolerancia al etanol (14 % v/v) • Rendimiento de etanol (97 %) • Alto nivel de productividad (5 veces más que <i>S. cerevisiae</i>)
<i>Pichia stipitis</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Rendimiento de etanol (82 %) • Metaboliza azúcares como la glucosa, galactosa y celobiosa
<i>Escherichia coli</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Metaboliza pentosas y hexosas

Otro microorganismo de interés para la producción de etanol es *Z. mobilis*, debido a su alta tasa específica de crecimiento [46]. Además *Z. mobilis* es capaz de tolerar hasta 400 g L⁻¹ de azúcares, 100 g L⁻¹ de etanol y de generar rendimiento $Y_{p/s}$ de 0.472, lo cual representa un 92 % del rendimiento teórico en la producción de etanol (Tabla 6).

Tabla 6. Parámetros cinéticos de fermentación de *Z. mobilis* en cultivo anaerobio. Modificado de Rogers, 1982 [46].

Parámetro	
Tasa específica de crecimiento (μ : h ⁻¹)	0.133
Rendimiento celular ($Y_{x/s}$)	0.019
Rendimiento de etanol ($Y_{p/s}$)	0.472
Rendimiento de etanol % teórico	92.5

III. JUSTIFICACIÓN

La producción de bioetanol a partir de biomasa representa una solución para reducir el uso de recursos energéticos tradicionales. La hoja de maíz es el residuo con mayor cantidad de carbohidratos y su producción anual es de aproximadamente 642,283.14 ton/año, lo que la convierte en una biomasa con gran potencial para ser utilizada en fermentación con *Z. mobilis*.

IV. HIPÓTESIS

El pretratamiento físico efectivo de la biomasa procedente de hojas de maíz y su hidrólisis mediante hidrolasas fúngicas, generan azúcares útiles para producir etanol.

V. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Convertir la biomasa de hojas de maíz en azúcares fermentables, utilizando criofracción y deslignificación enzimática como pretratamientos, así como hidrólisis enzimática y fermentación para generar etanol utilizando *Zymomonas mobilis* en fermentación sumergida.

5.2 Objetivos específicos

Identificar los tipos de cultivo, medios y hongos que produzcan extractos con actividad lignocelulolítica de celulasa, xilanasas y lacasa.

Establecer las condiciones que favorecen la hidrólisis enzimática de la hoja de maíz al analizar los factores pH, temperatura y concentración de sólidos mediante diseño experimental en el proceso de hidrólisis enzimática.

Obtener azúcares fermentables mediante el pretratamiento y la hidrólisis de hojas de maíz.

VI. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 Medios de cultivo y cepas.

Se utilizaron dos medios de cultivo para los diferentes sistemas de producción de extractos fúngicos. A) Medio WPDA: se maceraron 300 g de salvado de trigo a 80 °C en 1 L de agua desionizada durante una hora. Posteriormente se recuperó el líquido macerado y se le añadieron 24 g de medio PDA (20 g dextrosa y 4 g de almidón de papa) la mezcla se esterilizó a 121 °C, 15 lb/in² durante 15 min, se dejó enfriar y se almacenó a 4 °C para uso posterior. B) Medio Czapek-Dox: se disolvieron las siguientes cantidades de sales minerales en un litro de agua desionizada: 2 g de nitrato de potasio, 1 g de fosfato de potasio dibásico, 0.5 g de sulfato de magnesio, 0.5 g de cloruro de sodio y 0.01 g de sulfato ferroso. Después se añadieron 5 g de dextrosa y se esterilizó a 121 °C durante 15 min, finalmente se dejó enfriar y se almacenó a 4 °C.

Las cepas utilizadas de *P. ostreatus* y *A. niger* fueron proporcionadas por el laboratorio de Ingeniería de Biorreactores de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí. La cepa de *Penicillium spp.* fue proporcionada por el laboratorio de Microbiología Aplicada de la FCQ-UASLP.

Para la etapa de fermentación se utilizó la bacteria *Z. mobilis*. Se cultivó en un medio mínimo (g L⁻¹) conformado por: agua destilada, 20 g glucosa, 10 g de extracto de levadura y 2 g de KH₂PO₄, esterilizado en autoclave y a un pH de 6.

6.2 Primera etapa: producción inicial de extractos enzimáticos.

La primera etapa consistió en un análisis exploratorio con la producción inicial de extractos mediante fermentación utilizando *A. niger*, *P. ostreatus* y *Penicillium spp.* como microorganismos productores de enzimas lignocelulolíticas. Se evaluaron dos medios de crecimiento (WPDB y Czapek-Dox) y tres sistemas de cultivo (fermentación en estado sólido, fermentación en sistema sumergido y fermentación en sistema de inmersión temporal. Se determinó la actividad de celulasa y la actividad de lacasa.

6.2.1 Fermentación de *P. ostreatus* en medio WPDA.

Se preparó un sistema de fermentación en estado sólido que consistió en un recipiente plástico de 16 L diseñado con un sistema de aireación, utilizando mangueras de silicón

con un tamaño de poro 0.5 cm a lo largo y ancho de la manguera. El lecho fijo consistió en 2 kg de salvado de trigo previamente esterilizado y sobre este se inoculó *P. ostreatus* utilizando como soporte granos de sorgo. Después de la inoculación, se añadieron 6 L de medio WPDA.

El sistema fue sellado e incubado a temperatura ambiente con aireación constante durante 21 días. Al finalizar el tiempo de fermentación se recuperó la fase líquida del sistema usando una bomba peristáltica y se almacenó a 4 °C para posteriores ensayos. Se implementó un sistema de fermentación con inmersión temporal utilizando reactores RITA (Merck, Alemania). Para ello, 250 mL de medio WPDA fueron utilizados y 30 g de salvado de trigo se colocaron sobre la canasta superior.

Posteriormente, se esterilizó el sistema a 121 °C 15lb/in² durante 15 min. Finalizado el proceso se dejó enfriar y se inoculó con *P. ostreatus*. El mismo procedimiento fue utilizado en reactores RITA sin el soporte de salvado de trigo. Los reactores se incubaron durante quince días a temperatura ambiente activando la inmersión temporal en el medio WPDA cada 4 horas. Al finalizar el periodo de fermentación se separó la fase líquida por decantación y se almacenó a 4 °C para ensayos posteriores.

6.2.2 Fermentación de *A. niger* y *Penicillium spp.* en medio Czapek-Dox.

Se implementó un sistema de inmersión temporal en el que se vertieron 250 mL de medio Czapek-Dox (sacarosa 5 g L⁻¹, nitrato de potasio 2.0 g L⁻¹, fosfato de potasio dibásico (K₂HPO₄) 1.0 g L⁻¹, sulfato de magnesio (MgSO₄*7H₂O) 0.5 g L⁻¹, cloruro de sodio 0.5 g L⁻¹, sulfato ferroso 0.01 g L⁻¹) en el interior del reactor RITA y se colocó una cama de 30 g de salvado de trigo sobre la canasta superior.

El sistema se esterilizó a 121 °C, 15 lb/in² durante 15 min. Finalizado el proceso se dejaron enfriar los reactores para ser inoculados por separado, con una pieza de agar PDB que contenía esporas de *A. niger* y de *Penicillium spp.* los dos reactores se incubaron durante 15 días a temperatura ambiente activando la inmersión temporal en el medio Czapek-Dox cada 4 horas. Al completar el periodo de fermentación, se separó la fase líquida por decantación y se almacenó a 4 °C para uso posterior.

Adicionalmente, se implementó un sistema de fermentación sumergido utilizando medio Czapek-Dox como diluyente para preparar una mezcla de 250 mL con salvado de trigo al 5 % m/v. La mezcla de medio y salvado fue vertida en un matraz de 500 mL que posteriormente fue esterilizado a 121 °C durante 15 min, una vez que se enfriaron los matraces y el medio, cada matraz fue inoculado con agar PDB que contenía esporas de *A. niger* y *Penicillium spp.*, respectivamente. Los dos matraces fueron incubados a temperatura ambiente con agitación constante durante 15 días. Finalizado el período de fermentación se recuperó el sobrenadante por decantación y se sometió a un proceso de filtración y concentración como se describe a continuación.

6.2.3 Concentración de extractos fúngicos.

Con el objetivo de incrementar la concentración de enzimas secretadas durante la fermentación de cada hongo, la fase líquida de cada sistema de fermentación fue sometida a varias etapas de filtración. Primero se separaron los sólidos de mayor tamaño con ayuda de un colador plástico, a continuación, la fase líquida fue recuperada y vertida en tubos falcon de 50 mL donde se centrifugó en una centrífuga CENTURION (Centurion Scientific, UK) a 6000 rpm durante 20 min. La fase líquida fue recuperada por decantación y se filtró en un matraz Kitazato mediante vacío con un filtro poroso y papel filtro con tamaño de poro de 11 µm. Posteriormente el líquido filtrado se sometió a ultrafiltración utilizando un sistema AMICON (Merck KGaA, Alemania) con una membrana de corte de 10 kDa, a una temperatura de 4 °C y 140 rpm hasta retener en la celda la cuarta parte del volumen inicial. Finalmente, la fase líquida retenida en la celda fue recuperada y se almacenó a -20 °C hasta su uso posterior.

6.2.4 Cuantificación de proteínas presentes en los extractos.

La cuantificación de proteína presente en los extractos concentrados se realizó mediante la metodología de Bradford [47]. Se tomaron 100 µL de extracto concentrado y se añadieron al pozo de una placa de ELISA, después se adicionaron 100 µL de reactivo de Bradford y se incubó la placa a temperatura ambiente durante 5 min. Posteriormente, la absorbancia se determinó a 590 nm, utilizando un lector de microplaca iMarK (Bio-RAD, USA). La concentración de proteína fue determinada

interpolando los valores de absorbancia en una curva de calibración de BSA (Por su siglas en inglés: Bovine Serum Albumin) realizada previamente (Anexo 9.1). El procedimiento se realizó por triplicado para cada extracto concentrado.

6.2.5 Ensayo de actividad enzimática de celulasa.

La actividad de celulasa de cada extracto fue determinada como actividad de carboximetilcelulasa (CMCasa) con base en la metodología de Intasit y col., 2021 [39]. Se colocaron 500 μ L de extracto enzimático y se le añadieron 500 μ L de una solución de CMC al 1% disuelta en buffer de acetato 50 mM pH 5.0 (Anexo 9.4). La mezcla se homogeneizó utilizando vortex y posteriormente se incubó a 37 °C durante 2 horas, tomando muestra cada hora. El procedimiento se realizó por triplicado para cada extracto. Los azúcares reductores liberados fueron cuantificados mediante la metodología de DNS utilizando glucosa como estándar como se describe en la siguiente sección.

6.2.6 Determinación de actividad específica de celulasa.

Se cuantificaron los azúcares liberados durante los ensayos de actividad de celulasa y xilanasas como azúcares reductores equivalentes de dextrosa o xilosa respectivamente, mediante una adaptación de la metodología de Negrulescu y col., 2012 [48]. Para ello, se colocaron 100 μ L de hidrolizado diluido 1:20 con buffer de acetato en una placa de análisis y se mezclaron con 100 μ L de DNS. Posteriormente, se incubó la placa durante 10 min en un baño de agua a 90 °C. Después de finalizar el período de incubación, se enfrió la placa a 4 °C y se cuantificaron los azúcares reductores leyendo absorbancia a una longitud de onda de 540 nm. La concentración de azúcares reductores se determinó mediante interpolación de los valores obtenidos utilizando una línea de calibración previamente realizada con dextrosa o xilosa (ver Anexo 9.3).

La actividad enzimática específica de CMCasa se estimó con la cuantificación de azúcares reductores liberados en los ensayos de actividad enzimática. La actividad específica se expresó en unidades internacionales de actividad enzimática por cada mg de proteína, donde U (unidad) representa 1 μ mol de dextrosa liberado en un tiempo

de 1 min. La cantidad total de proteína se estimó como se describió previamente utilizando BSA como estándar (Anexo 9.1).

6.2.7 Ensayo de actividad enzimática de lacasa.

Para evaluar la actividad de lacasa mediante oxidación de ABTS por acción del extracto enzimático, se colocaron 50 μ L de extracto enzimático en un tubo de 1.5 mL Eppendorf y se añadieron 50 μ L de ABTS en buffer de acetato de sodio pH 4.5. La mezcla se homogeneizó y posteriormente se incubó a 40 °C durante 10 min. Finalmente se enfrió la mezcla a 4 °C para su posterior análisis.

La actividad específica de lacasa fue determinada mediante el cambio en la absorbancia de 10 min a 415 nm de la muestra y usando la siguiente ecuación basada en la ley de Beer-Lambert que permite conocer la concentración de una sustancia al absorber luz en una longitud de onda específica [49].

$$U/L = \frac{\Delta Abs}{\varepsilon * V_m * t_{rx}} * \frac{1}{fd} * 1000000$$

Donde:

ΔAbs = cambio en la absorbancia

ε = coeficiente de extinción molar del ABTS a 415 nm

V_m = volumen de muestra (L)

t_{rx} = tiempo de reacción (min)

fd = factor de dilución

6.3 Segunda etapa: producción de nuevos extractos enzimáticos.

Se produjeron nuevos extractos enzimáticos de *P. ostreatus*, *A. niger* y *Penicillium spp.* en sistema sumergido y en sistema de inmersión temporal en medio Czapek-Dox. Se evaluó actividad de celulasa y de xilanasa. Se realizó un diseño experimental de Plackett-Burmann.

6.3.1 Producción de nuevos lotes de extractos fúngicos.

Se generaron nuevos extractos enzimáticos producidos en sistema de fermentación sumergida con *A. niger* y *Penicillium spp.* (Lote 2). El procedimiento se realizó tal y como se describió en la sección 6.2.2 para cultivo sumergido.

A su vez, se realizó un extracto de *P. ostreatus* mediante fermentación con inmersión temporal sustituyendo el medio PDB utilizando anteriormente por medio Czapek-Dox (Lote 3). Para ello, se vertieron 250 mL de medio Czapek-Dox en el depósito interior del sistema RITA y se colocaron 30 g de salvado de sobre la canasta superior. A continuación, se esterilizó el sistema a 121 °C, 15lb/in² durante 15 min. Al finalizar la esterilización se enfrió el sistema a temperatura ambiente y se inoculó con *P. ostreatus*. Posteriormente se incubó el sistema durante quince días a temperatura ambiente activando la inmersión temporal en el medio Czapek-Dox cada 4 horas. Al finalizar el periodo de fermentación se separó la fase líquida por decantación y se almacenó a 4 °C para su posterior análisis.

Una vez que se generaron los extractos, se concentró la cantidad de proteína presente en cada uno mediante ultrafiltración. Este procedimiento se realizó de acuerdo con lo descrito previamente en la sección 6.3. Finalmente se determinó la actividad enzimática específica de celulasa y xilanasa como se describió en la sección 6.5 y 6.6.

6.3.2 Diseño de Plackett-Burman para la hidrólisis de hoja de maíz.

Los extractos fúngicos concentrados producidos por los lotes 2 y 3 fueron mezclados en la misma proporción para obtener un solo extracto con el cuál se realizó la hidrólisis de hojas de maíz utilizando un diseño de Plackett-Burman. Los factores utilizados en el diseño fueron: temperatura, pH y concentración de sólidos utilizando dos niveles, 35-45 °C, 4.5-5.5 y 10-14%, respectivamente. Para ello, se prepararon en tubos eppendorf de 1.5 mL mezclas de 10 % o 14 % de sólidos de hoja de maíz en acetato de sodio 50 mM pH 4.5 o 5.5 y se añadió la mezcla de extractos fúngicos hasta obtener la concentración deseada de acuerdo con las condiciones de cada experimento (Tabla 7).

Posteriormente se sellaron los tubos y se incubaron a 35 °C o 45 °C durante 24 h. Al finalizar el tiempo de incubación se centrifugaron los tubos a 13000 rpm durante 5 min y se cuantificaron los azúcares reductores mediante un ensayo de DNS siguiendo el procedimiento descrito en la sección 6.8.

Tabla 7. Diseño de Plackett-Burman generado para la evaluación del efecto de la concentración de sólidos de hoja de maíz, temperatura y pH sobre la generación de azúcares reductores en la hidrólisis de hoja de maíz.

Experimento	Sólidos de hoja de maíz (% m/v)	Temperatura de hidrólisis (°C)	pH
1	10	35	5.5
2	14	45	5.5
3	10	35	4.5
4	14	35	5.5
5	14	35	4.5
6	10	35	5.5
7	10	45	5.5
8	14	35	4.5
9	14	45	4.5
10	14	45	5.5
11	10	45	4.5
12	10	45	4.5

6.3.3 Determinación de actividad enzimática de celulasa y xilanasas.

La actividad de celulasa fue determinada como actividad específica de CMCasa como se describió previamente en la sección 6.2.6. La actividad de hemicelulasa de los extractos fúngicos producidos fue determinada como actividad de β -1,4 endoxilanasas con base en la metodología de Intasit y col., 2021 [39]. Para ello, se mezclaron en tubos eppendorf 500 μ L de extracto con 500 μ L de xilano al 2 % (m/v) disuelto en amortiguador de acetato de sodio 50 mM pH 5.5. La mezcla se llevó a incubación durante 30 min a 50 °C y al finalizar se enfrió inmediatamente para su análisis. Los azúcares reductores liberados se cuantificaron mediante la metodología de DNS utilizando xilosa como estándar como se describe en la sección 6.8.

6.4 Tercera etapa: producción de extractos enzimáticos sin dextrosa, hidrólisis y fermentación.

Con los resultados obtenidos durante la primera y segunda etapa se realizó la producción de extractos fúngicos sin dextrosa, así como el tratamiento mediante

criofracción de las hojas de maíz, la hidrólisis enzimática de las mismas y la producción de etanol con *Z. mobilis* con los azúcares liberados en el proceso de hidrólisis.

6.4.1 Producción en lotes de extractos enzimáticos sin dextrosa.

Con base en los resultados encontrados se generaron nuevos lotes de extracto de *A. niger* y *Penicillium spp.* con el objetivo de aumentar la actividad enzimática específica de celulasa y hemicelulasa, tal y como se observó en ensayos previos (ver sección 6.11 y 6.12). Para su producción, se empleó la metodología descrita en las secciones 6.8 y 6.9 pero eliminando la adición de dextrosa en el medio Czapek-Dox. A continuación, se evaluó la actividad enzimática de celulasa y hemicelulasa de los lotes obtenidos mediante la metodología descrita anteriormente (ver sección 6.11 y 6.12).

6.4.2 Pre-tratamiento de biomasa mediante criofracción.

Se utilizaron 5 g de hojas de maíz pulverizadas y se les añadieron 50 mL de nitrógeno líquido. Inmediatamente se trituró vigorosamente la biomasa en un mortero hasta evaporar el nitrógeno líquido. Una vez finalizado el proceso se almacenó la biomasa tratada en tubos falcon de 50 mL a temperatura ambiente.

6.4.3 Hidrólisis de hoja de maíz pretratada mediante criofracción.

Se colocaron 1.5 g de hojas de maíz pretratadas mediante criofracción dentro de un tubo Falcon de 50 mL y se añadió buffer de acetato de sodio 50 mM pH 4.5 hasta alcanzar un volumen de 7.5 mL. A continuación, se completó el contenido hasta 15 mL con extracto enzimático de *P. ostreatus*, se homogeneizó en vortex y se llevó a incubación durante 24 horas a 50 °C y 200 rpm.

Una vez finalizado el periodo de incubación y con la finalidad de evitar la inhibición enzimática en la actividad de celulasa y hemicelulasa causada por la presencia de lacasas, se incubó el contenido a 100 °C durante 1 h y después se centrifugó en un equipo CENTURION durante 1 h a 6000 rpm. Al finalizar, se descartó el sobrenadante y se conservaron únicamente los sólidos de hoja de maíz criofraccionada.

A continuación, los sólidos se aforaron a un volumen de 7.5 mL utilizando buffer de acetato de sodio 50 mM pH 4.5 y una vez más se completó hasta un volumen de 15 mL utilizando una mezcla 1:1 de extracto enzimático de *A. niger* y *Penicillium spp.* La

mezcla obtenida se homogeneizó en vortex y se llevó a incubación durante 24 h a 50 °C y 200 rpm. La cantidad de azúcares reductores presentes en el hidrolizado se cuantificó mediante el método de DNS utilizando las diluciones como se describió previamente (ver sección 6.6). Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

6.4.4 Producción de bioetanol mediante fermentación con *Z. mobilis*.

El hidrolizado obtenido se utilizó para llevar a cabo una fermentación sumergida utilizando *Zymomonas mobilis* como microorganismo productor. Previamente, el hidrolizado fue esterilizado a 121 °C durante 15 min y 15 atm de presión, y luego enfriado a temperatura ambiente. A continuación, se inoculó con 0.2 g de biomasa de *Z. mobilis* previamente cultivada en medio mínimo y se incubó a 36 °C durante 96 h.

Además, se realizó un procedimiento similar, pero suplementando el hidrolizado con una mezcla de dextrosa y xilosa en proporción 1:1, hasta alcanzar una concentración inicial de azúcares de 80 g L⁻¹. Tras la incubación, se almacenó el fermentado a 4 °C para su posterior análisis. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

6.4.5 Cuantificación de etanol producido.

Para cuantificar la cantidad de etanol producido por la fermentación de hidrolizado de hoja de maíz, se utilizó un refractómetro digital. El fermentado fue centrifugado en un equipo CENTURION a 6000 rpm durante 20 min, y se recuperó el sobrenadante que fue centrifugado a 13000 rpm durante 5 min. Luego se tomaron 2 mL de sobrenadante y se colocaron en el refractómetro para realizar la lectura. La cantidad de etanol se leyó en porcentaje v/v. Adicionalmente, se realizó la cuantificación de etanol en el Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica (IPICYT), mediante HPLC en un equipo Agilent Technologies.

6.5 Análisis estadístico.

Se utilizó un análisis de varianza utilizando el software STATISTICA versión 10.0 (STATSOFT, USA) con el fin de determinar las diferencias significativas, para ello se utilizó la prueba de Fisher con un nivel de confianza del 95 %. El diseño de Plackett-Burman se analizó en el software Minitab v.16, mediante la prueba F con un nivel de confianza del 95%.

VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 Resultados de la primera etapa.

7.1.1 Los extractos fúngicos generaron de 182 a 502 mg L⁻¹ de proteína total.

Con el fin de identificar hongos con actividad hidrolítica se seleccionaron tres especies *P. ostreatus*, *A. niger* y *Penicillium spp.*, para ello se cultivaron en cultivo sumergido, inmersión o en cultivo sólido.

El extracto con mayor concentración de proteínas totales (502 mg L⁻¹) corresponde al producido en el sistema de fermentación sumergida utilizando medio Czapek-Dox y el hongo *Penicillium spp.* (Tabla 8). Mientras que la concentración de proteínas del extracto extracelular generado en el sistema de fermentación de cultivo sumergido con *A. niger* fue de 182 mg L⁻¹. Para *P. ostreatus*, se obtuvo una concentración mayor de proteínas en el extracto producido en el sistema de fermentación de estado sólido. La concentración de las proteínas alcanzadas en este último caso fue cuatro veces mayor en comparación a lo reportado por Santa-Rosa y col., 2018, quienes alcanzaron una concentración máxima de proteínas de 43 mg L⁻¹ durante la producción de enzimas lignocelulolíticas.

Tabla 8. Concentración de proteína en los extractos producidos por *P. ostreatus*, *A. niger* y *Penicillium spp.*

Sistema de Fermentación	Organismo	Concentración de Proteína [mg L ⁻¹]
SSF	<i>P. ostreatus</i>	471.6
RITA	<i>P. ostreatus</i>	309
	<i>A. niger</i>	495.1
	<i>Penicillium spp.</i>	498.2
SmF	<i>A. niger</i>	182
	<i>Penicillium spp.</i>	502

SSF: fermentación en estado sólido, RITA: fermentación en sistema de inmersión temporal, SmF: fermentación sumergida.

La mayoría de los hongos precisa de elementos químicos como fósforo, azufre, potasio, magnesio, hierro, zinc, manganeso y cobre, para desarrollarse de forma adecuada [50]. En este contexto, el medio Czapek-Dox fue conveniente para el crecimiento de los hongos utilizados y para la excreción de proteínas al medio

extracelular, ya que contiene varios minerales formados por los elementos necesarios para el desarrollo adecuado de los hongos. Durante su crecimiento, los hongos secretan una gran cantidad de proteínas que en conjunto, se conocen como secretoma. El secretoma incluye a su vez varias enzimas con actividad lignocelulolítica que se encargan de despolimerizar la biomasa lignocelulósica y favorecen la producción de azúcares fermentables [51].

7.1.2 Los extractos fúngicos hidrolizaron carboximetilcelulosa generando azúcares reductores.

Todos los extractos presentaron actividad de CMCasa después de 60 min de hidrólisis a 37 °C, y esta actividad permanece constante hasta los 120 min, debido a que no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los 60 a los 120 min, y por ello se mantiene constante la concentración de los azúcares solubles. Con base en este resultado y con fines de establecer el tiempo de hidrólisis se recomienda para posteriores ensayos utilizar únicamente 1 h de tratamiento. Para el sistema SSF inoculado con *P. ostreatus* en medio WPDB se observó un incremento de 25 % de azúcares reductores a los 60 min a 37 °C, este aumento es estadísticamente significativo ($p=0.05$) con respecto de los de azúcares reductores presentes en la muestra blanco (Figura 17).

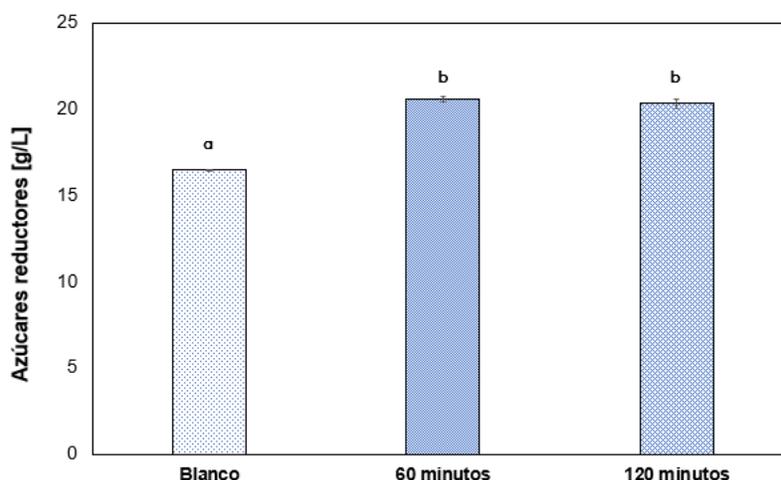


Figura 17. Azúcares reductores obtenidos en el ensayo de CMCasa a 37 °C, utilizando el extracto de *P. ostreatus* proveniente del sistema de fermentación en estado sólido (SSF) con medio WPDA. Las letras diferentes “a” y “b” representan diferencia estadísticamente significativa con un valor $p \leq 0.05$ con respecto del control.

Para evaluar el efecto de la adición de salvado de trigo en la fermentación de *P. ostreatus* en el sistema RITA, se utilizó un cultivo en ausencia de salvado de trigo, que no presentó diferencia significativa en la acumulación de azúcares con respecto del control, mientras que en el sistema de lecho fijo utilizando salvado de trigo se obtuvo un incremento significativo de 43 % de azúcares reductores a partir de 60 min de hidrólisis (Figura 18). Esto se debe a la presencia de trigo durante el crecimiento y desarrollo del hongo. Se ha reportado que el trigo, por su composición, induce la expresión de genes que codifican para proteínas con actividad lignocelulolítica, con el objetivo de utilizar al trigo como fuente de azúcares para el desarrollo del hongo [52].

De manera reproducible en el sistema SSF se mantiene la hidrólisis de forma constante al evaluar un tiempo mayor de tratamiento (120 min); fortaleciendo así la propuesta de utilizar 1 h como tiempo suficiente para la hidrólisis de biomasa para generar los azúcares fermentables, utilizando los extractos de *P. ostreatus*.

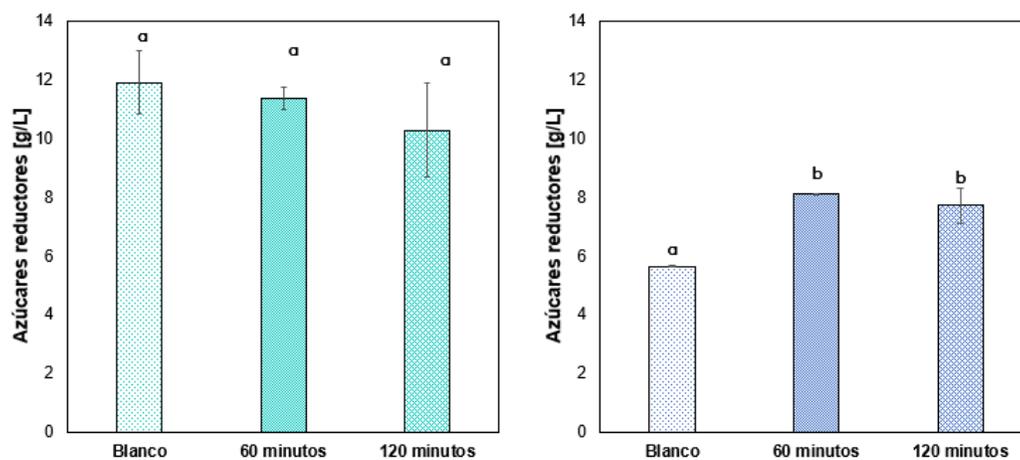


Figura 18. Concentración de azúcares reductores obtenidos en el ensayo de CMCasa a 37 °C con el extracto de *P. ostreatus* proveniente del sistema RITA sin trigo (panel izquierdo) y con trigo (panel derecho) en medio WPDA. Las letras diferentes “a” y “b” representan diferencia estadísticamente significativa con un valor $p \leq 0.05$.

El sistema RITA se implementó también para la producción de extractos fúngicos de *A. niger* y *Penicillium spp.* utilizando medio Czapek-Dox (Figura 19). La hidrólisis de CMC mediante los extractos producidos por estos hongos generó un incremento significativo en la concentración de azúcares reductores a partir de 60 min de hidrólisis. Este incremento fue de 41 % y 47 % respecto al blanco para los extractos de *A. niger*

y *Penicillium spp.* respectivamente. Posterior a los 60 min, la concentración de azúcares reductores permaneció constante, siendo el tiempo de hidrólisis consistente con los resultados obtenidos con el tiempo de hidrólisis utilizando los extractos de *P. ostreatus*.

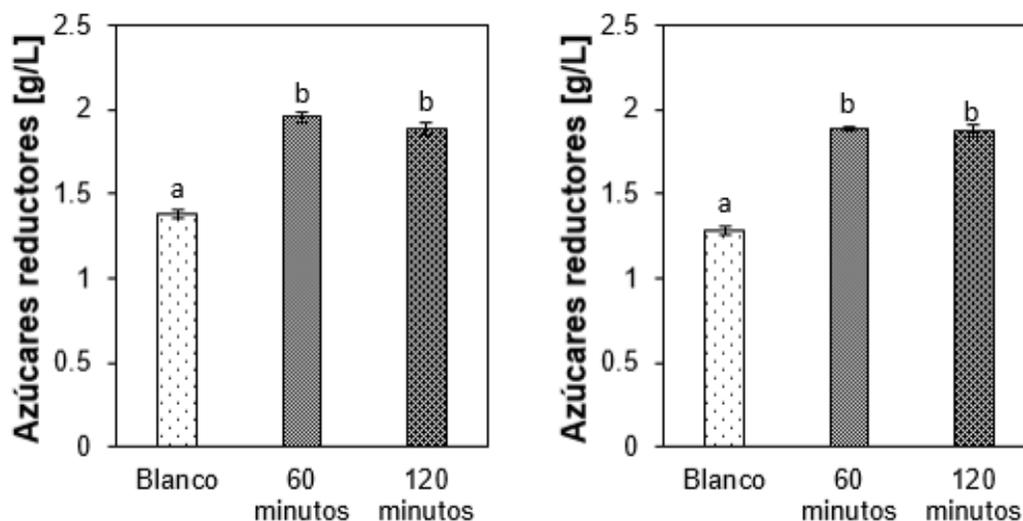


Figura 19. Azúcares reductores obtenidos mediante hidrólisis de CMC a 37 °C con extracto concentrado de *A. niger* (izquierda) y *Penicillium spp.* (derecha) producido en sistema RITA con medio Czapek-Dox. Las letras diferentes “a” y “b” representan diferencia estadísticamente significativa con un valor $p \leq 0.05$.

Finalmente, se evaluó la producción de extractos fúngicos de *A. niger* y *Penicillium spp.* en un sistema de fermentación sumergida utilizando medio mineral. En ambos cultivos, se observó un incremento significativo en la concentración de azúcares reductores a partir de 60 min de hidrólisis de CMC por acción de los extractos fúngicos (Figura 20). El incremento observado fue significativamente mayor en la hidrólisis con el extracto de *Penicillium spp.* con un 125 % de aumento respecto al blanco. Y para el extracto de *A. niger* se observó un incremento significativo de 85 % respecto al blanco.

La cantidad de azúcares generada por los extractos obtenidos en los sistemas fermentación de inmersión temporal y fermentación sumergida es mayor respecto a los resultados obtenidos por Irfan y col., 2013 [43], donde la producción de extractos fúngicos de *A. niger* usando trigo como sustrato generó una concentración de azúcares reductores de 0.15 g L⁻¹.

Esta mayor cantidad de azúcares puede explicarse por el tipo de cultivo utilizado. Se ha observado en estudios recientes que la implementación de sistemas de inmersión temporal tiene un efecto significativo en el crecimiento celular. Este tipo de sistemas proporcionan un entorno adecuado para el desarrollo óptimo del microorganismo, mejorando tanto su desempeño fisiológico como morfológico. Esto se logra a través de una combinación de aireación y alimentación óptimas e intermitentes durante el proceso de inmersión temporal [53].

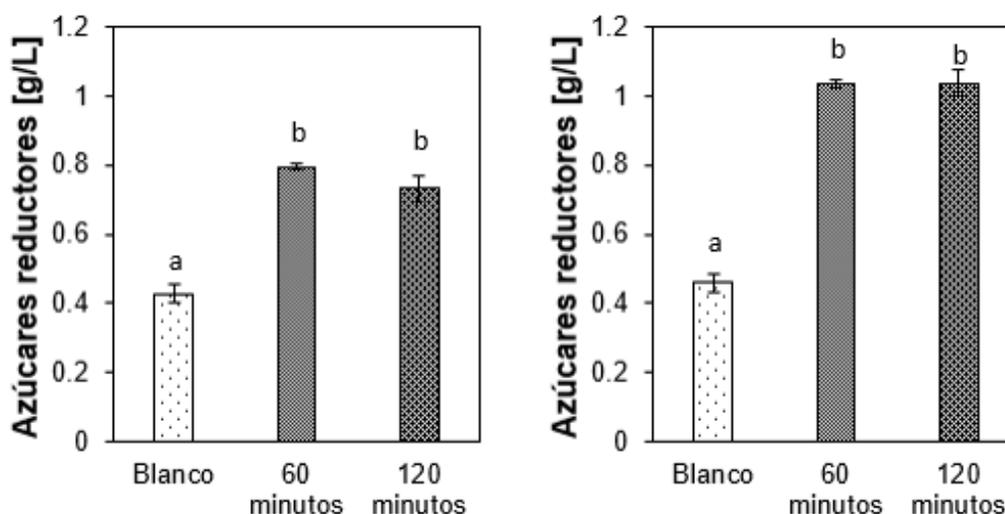


Figura 20. Concentración de azúcares reductores obtenidos mediante hidrólisis de CMC a 37 °C con el extracto de *A. niger* (izquierda) y *Penicillium spp.* (derecha) producido en el sistema SmF con medio Czapek-Dox. Las letras diferentes “a” y “b” representan diferencia estadísticamente significativa con un valor $p \leq 0.05$.

7.1.3 Los extractos fúngicos presentaron actividad de CMCasa.

Se observó que los extractos concentrados de *P. ostreatus* producidos tanto en sistema SSF como en sistema RITA presentaron una actividad específica de CMCasa ocho veces mayor respecto a los demás extractos (Figura 21).

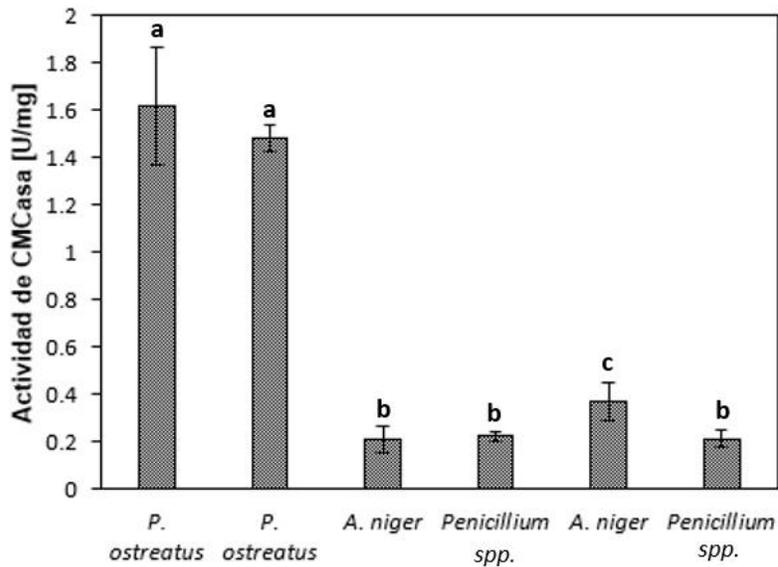


Figura 21. Actividad específica de CMCase obtenida mediante hidrólisis de CMC a 37 °C. De izquierda a derecha: Extractos provenientes de: SSF de *P. ostreatus* en medio WPDB, RITA de *P. ostreatus* en medio PDB, RITA de *A. niger* en medio Czapek-Dox, RITA de *Penicillium spp.* en medio Czapek, SmF de *A. niger* en medio Czapek-Dox y SmF de *Penicillium spp.* en medio Czapek-Dox. Las letras diferentes “a”, “b” y “c” representan diferencia estadísticamente significativa con un valor $p \leq 0.05$.

Con base en los trabajos realizados por Irfan y col., 2013 [43], Santa-Rosa y col., 2018 [54] y Cardoso y col., 2018 [55]; la actividad de CMCase de los extractos producidos por *P. ostreatus* fue 10 veces mayor; en contraste, la actividad enzimática de los extractos producidos por *A. niger* y *Penicillium spp.* fue 10 y 100 veces menor respectivamente. Se han identificado múltiples factores que pueden influir en la baja actividad enzimática observada en los ensayos realizados.

Entre estos factores se encuentran la temperatura, el pH, la cantidad de sustrato, la cantidad de enzima añadida y la presencia de inhibidores. Estos elementos desempeñan un papel importante en la eficiencia de la reacción enzimática. En particular, la cantidad de extracto utilizado en los ensayos y, por consiguiente, la cantidad de proteína empleada puede haber contribuido significativamente a la baja actividad observada, ya que el nivel adecuado de enzima es esencial para garantizar una reacción óptima y una mayor eficiencia catalítica [56].

7.1.4 El extracto producido por *P. ostreatus* presentó actividad de lacasa.

Únicamente el extracto concentrado correspondiente a la SSF de *P. ostreatus* en medio WPDB presentó un incremento significativo del doble de absorbancia respecto al blanco (Figura 22), con actividad de lacasa de 2.986 U L⁻¹. Este valor se encuentra por debajo de lo reportado por Rosário y col., 2012 [57], quienes reportaron actividad de lacasa con valor máximo de 147 U L⁻¹ en un extracto producido por *P. ostreatus* utilizando residuos de tomate como sustrato. Sin embargo, esta diferencia en la actividad enzimática cuantificada puede deberse al grado de purificación del extracto.

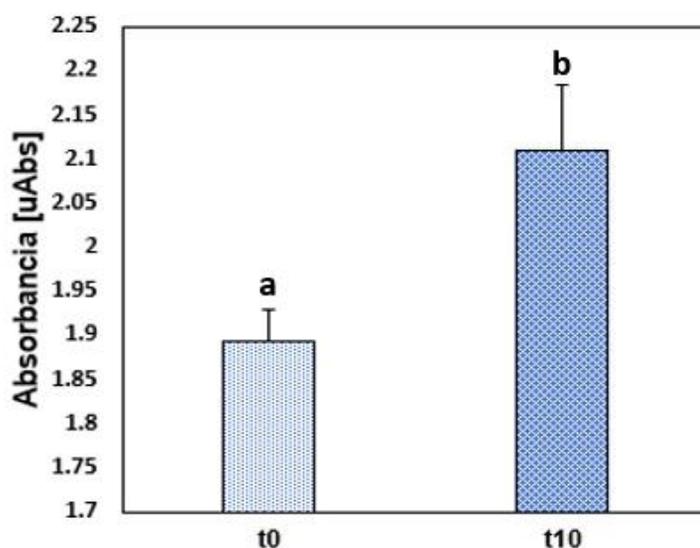


Figura 22. Actividad de lacasa mediante el incremento significativo de la absorbancia a 415 nm después de 10 min de incubación a 40 °C en presencia de ABTS del extracto de *P. ostreatus* producido en RITA en medio WPDB a 37 °C. Las letras diferentes “a” y “b” representan diferencia estadísticamente significativa con un valor $p \leq 0.05$.

La purificación de enzimas suele ser un proceso complejo, implica la eliminación de otras proteínas y contaminantes presentes en la muestra. Por lo general, se aplican varios métodos en secuencia para lograr niveles de pureza suficientemente altos. Esto conduce a una mayor concentración de la enzima de interés. Una mayor concentración de la enzima puede aumentar su actividad catalítica, ya que más moléculas enzimáticas están disponibles para llevar a cabo la reacción [58].

La confirmación de actividad de lacasa únicamente de *P. ostreatus* en el sistema de fermentación en estado sólido puede explicarse por la naturaleza lignolítica del mismo. Las especies de hongos denominados “White-Rot”, esto es de pudrición blanca, entre los cuales se encuentra *P. ostreatus*, son la familia que degrada con mayor eficiencia la lignina presente en la estructura de la biomasa lignocelulósica [59]. Por otra parte, la familia de hongos filamentosos que incluye a los géneros *Aspergillus* y *Penicillium* son capaces de degradar celulosa y hemicelulosa, pero solo pueden degradar parcialmente a la lignina [31].

En la Tabla 9 se muestra un resumen de los resultados obtenidos para los extractos producidos anteriormente y con base en el tipo de cultivo utilizado para la obtención de los extractos fúngicos. Con ello podemos concluir que es posible obtener extractos con actividad lignocelulolítica utilizando diferentes sistemas de cultivo, por lo observado se recomienda utilizar cultivos sumergidos para producir celulasas a partir de los extractos de *A. niger* y *Penicillium spp.* mientras que para la obtención de lacasas se recomienda cultivo en fase sólida.

Tabla 9. Incremento de azúcares reductores, actividad de CMCasa específica, actividad de lacasa de los extractos producidos por *P. ostreatus*, *A. niger* y *Penicillium spp.*

Sistema	Microorganismo	Medio	% azúcares respecto al blanco t=60 min de hidrólisis	Actividad CMCasa específica (U mg ⁻¹)	Actividad lacasa (U L ⁻¹)
SSF	<i>P. ostreatus</i>	WPDB	25	1.6158	0
	<i>P. ostreatus</i>	WPDB	43	1.4814	2.986
RITA	<i>A. niger</i>	Czapek	41	0.2134	0
	<i>Penicillium spp.</i>	Czapek	47	0.2246	0
SmF	<i>A. niger</i>	Czapek	85	0.3730	0
	<i>Penicillium spp.</i>	Czapek	125	0.2122	0

7.2 Resultados de la segunda etapa.

7.2.1 La concentración de sólidos de 10 % y la temperatura de 50 °C mejoran la hidrólisis de hoja de maíz.

Con el fin de establecer las condiciones que permitan obtener una mayor concentración de azúcares, se evaluó la hidrólisis enzimática de hoja de maíz utilizando una mezcla de los extractos fúngicos y un diseño experimental Plackett-Burman que consistió en 12 experimentos descritos anteriormente (Tabla 7). Se observó que la concentración de sólidos en la mezcla contribuyó significativamente (Figura 23) en la generación de azúcares reductores.

La concentración de azúcares reductores fue mayor ($6.059 \pm 0.233 \text{ g L}^{-1}$) utilizando una mezcla de sólidos del 10 % (m/v), mientras que en la mezcla de sólidos al 14 % (m/v) la concentración de azúcares reductores fue de $3.2418 \pm 0.9448 \text{ g L}^{-1}$. Esto sugiere que la cantidad de sólidos utilizados y los azúcares reductores generados durante la hidrólisis de hoja de maíz son inversamente proporcionales, y coincide con lo reportado por Shankar y col., 2019 [60]. Dicha relación implica que la alta cantidad de sólidos genera complejos enzima-sustrato improductivos, debido a la alta viscosidad de la mezcla y que a su vez, dificulta el mezclado homogéneo y la transferencia de masa durante el proceso de hidrólisis [60].

Las condiciones que de manera significativa favorecen la hidrólisis de la hoja del maíz, y permiten la generación de azúcares reductores fueron la concentración de sólidos y la temperatura (Figura 23). Se observó que la temperatura y la concentración de sólidos al 10 % (Figura 24) contribuyen significativamente en la generación de azúcares reductores, alcanzando una concentración de 5-6 g L^{-1} , cuando se realizó la hidrólisis a 45 °C.

Por otra parte, como se observa en las Figuras 23 y 24, se encontró que el pH, a diferencia de la temperatura y la cantidad de sólidos en la mezcla, no afectó significativamente el proceso de hidrólisis. Se ha reportado que las enzimas con actividad lignocelulolítica, pueden desempeñarse óptimamente en un rango amplio de pH (4-11) y debido a que el rango de pH evaluado en el diseño experimental de

Plackett-Burmann fue muy corto, no se observó contribución en el aumento o disminución durante la hidrólisis de la hoja de maíz [61].

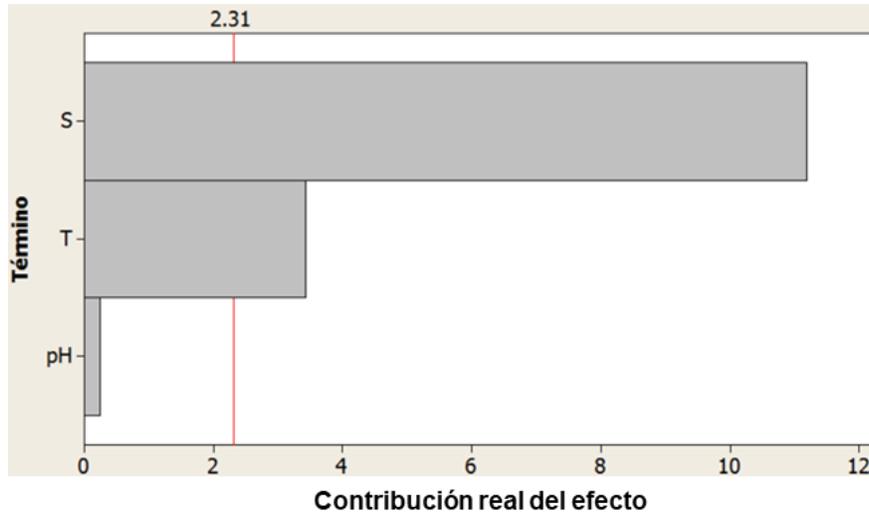


Figura 23. Diagrama de Pareto generado con los datos obtenidos del diseño de Plackett-Burman, se visualiza el efecto de cada factor, pH temperatura (T) y cantidad de sólidos (S) evaluados, sobre la generación de azúcares reductores en la hidrólisis de hoja de maíz, siendo la concentración de sólidos y la temperatura los factores que permiten de manera significativa la generación de azúcares reductores. El eje horizontal indica la contribución real del efecto.

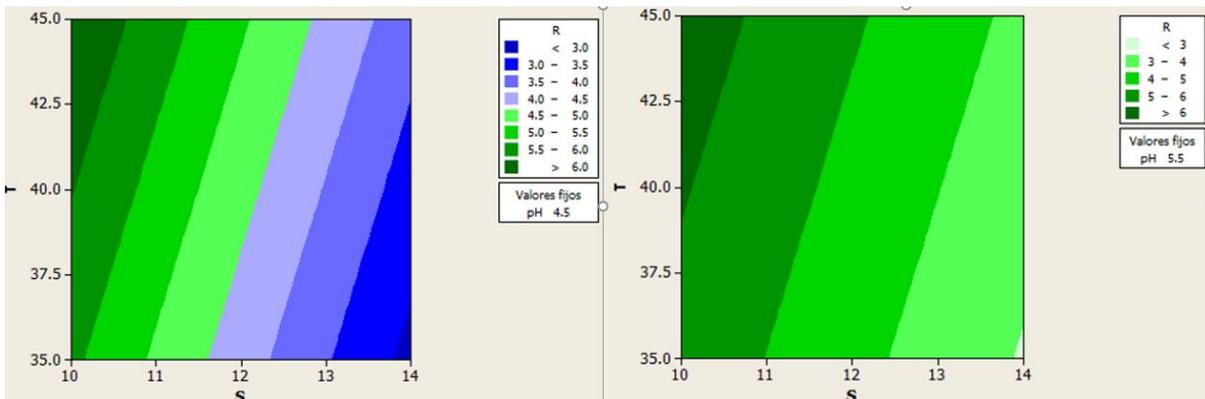


Figura 24. Gráficas de contorno generadas con los datos obtenidos del diseño de Plackett-Burman que muestra el efecto de la temperatura (T) y la concentración de sólidos de hoja de maíz (S) sobre la liberación de azúcares reductores en la hidrólisis de hoja de maíz a pH 4.5 (izquierda) y pH 5.5 (derecha).

7.2.2 La actividad enzimática de CMCasa de los extractos fúngicos producidos por *P. ostreatus* se ve afectada por la presencia de lacasas.

Se evaluó la actividad específica de CMCasa y xilanasa de los extractos fúngicos obtenidos y de la mezcla de estos mediante la cuantificación de los azúcares reductores liberados en cada ensayo. Se observó que la mezcla de los extractos obtenidos (MZ22), así como el extracto individual de *P. ostreatus* (PL22), generan azúcares reductores a partir de 30 min de tratamiento a 45 °C en presencia del sustrato CMC al 1%, mientras que los extractos individuales de *A. niger* (AN22) y *Penicillium spp.* (E22) sí produjeron incremento significativo (Figura 25).

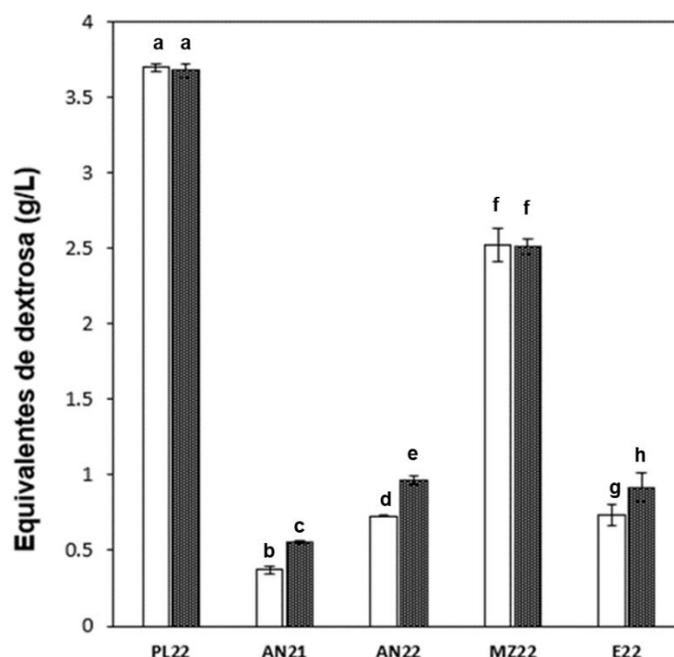


Figura 25. Azúcares reductores (equivalentes de dextrosa) generados después de la incubación a 45 °C en presencia de carboximetilcelulosa al 1 %, de los extractos fúngicos obtenidos en los lotes 2 y 3. (PL22, extracto de *P. ostreatus*, AN21, extracto de *A. niger*, MZ22, mezcla de extractos de *P. ostreatus*, *A. niger* y *Penicillium spp.*, E22, extracto de *Penicillium spp.*) Las barras sin relleno pertenecen al blanco de cada ensayo. Las letras diferentes “a”, “b”, “c”, “d”, “e”, “f”, “g” y “h” representan diferencia estadísticamente significativa con un valor $p \leq 0.05$.

Esto sugiere que la mezcla de extractos y el extracto de *P. ostreatus* presentaron inhibición de la actividad de CMCasa. Estos resultados concuerdan con lo descrito previamente por Wang y col., 2013 [40] y Giacobbe y col., 2018 [42], quienes reportaron la inhibición de hasta 80 % en la actividad de celulasa en extractos comerciales cuando hay presencia de lacasas. Sin embargo, la baja actividad de

celulasa observada en los extractos producidos por *A. niger* y *Penicillium spp.* en el lote 2, no puede ser explicada por la presencia de lacasas, ya que previamente se confirmó en este trabajo que los extractos generados por dichos hongos no presentan actividad enzimática de lacasa (Ver 7.4).

En este contexto la baja actividad enzimática de los extractos de *A. niger* y *Penicillium spp.* puede ser resultado del mecanismo molecular llamado represión catabólica de carbono; en donde la presencia de dextrosa libre en un medio de cultivo induce la represión de la transcripción en regiones promotoras de genes correspondientes a enzimas lignocelulolíticas, ya que el metabolismo no precisa de enzimas que degraden polisacáridos ya que tiene disponibles azúcares simples como son las hexosas. En dicho mecanismo (Figura 26), la internalización de glucosa al citoplasma del microorganismo genera la represión de genes mediante la proteína represora CreA [62].

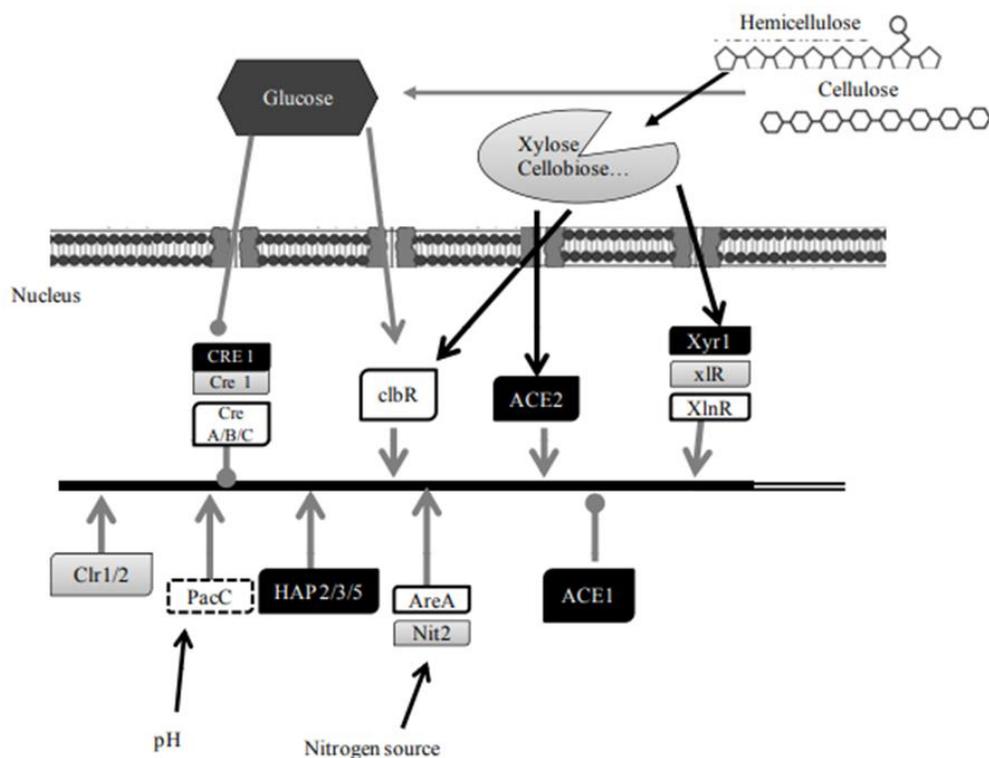


Figura 26. Mecanismo de represión catabólica sobre la expresión de celulasas y xilanasas, generado por la presencia de glucosa y xilosa [62].

Al evaluar la actividad de xilanasas de la mezcla de extractos, así como los extractos individuales, se observó que los azúcares reductores (equivalentes de xilosa) incrementaron significativamente 8 veces respecto del control después de 30 min de incubación a 45 °C en presencia de xilano al 2 % (Figura 27). Las actividades de CMCasa y xilanasas de cada extracto obtenido en los lotes 2 y 3 se muestran en la Tabla 10. Los resultados obtenidos indican que la actividad de xilanasas de la mezcla de extractos y del extracto de *P. ostreatus* no presentaron inhibición, esto sugiere que la presencia de lacasas no afecta la actividad de xilanasas.

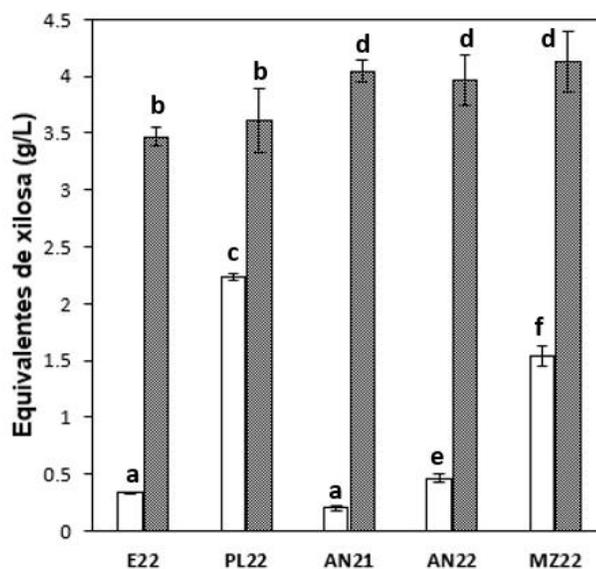


Figura 27. Azúcares reductores (equivalentes de xilosa) generados después de la incubación a 45 °C de los extractos fúngicos obtenidos en los lotes 2 y 3, en presencia de xilano al 2 %. (PL22, extracto de *P. ostreatus*, AN21, extracto de *A. niger*, MZ22, mezcla de extractos de *P. ostreatus*, *A. niger* y *Penicillium spp.*, E22, extracto de *Penicillium spp.*) Las barras sin relleno pertenecen al blanco utilizado en cada ensayo. Las letras diferentes “a”, “b”, “c”, “d”, “e” y “f” representan diferencia estadísticamente significativa con un valor $p \leq 0.05$.

Tabla 10. Actividad de CMCasa y actividad de lacasa de los extractos producidos por *P. ostreatus*, *A. niger* y *Penicillium spp.* en los lotes 2 y 3.

Sistema de fermentación	Extracto	Actividad de CMCasa (U/mg de proteína)	Actividad de xilanasa (U/mg de proteína)
SmF	<i>A. niger</i>	0.2366	2.1576
	<i>Penicillium spp.</i>	0.1821	1.6350
RITA	<i>P. ostreatus</i>	0	1.3227
-	Mezcla	0	1.06397

7.3 Resultados de la tercera etapa.

7.3.1 La eliminación de sacarosa durante la producción de extractos enzimáticos favorece el incremento de actividad específica de hemicelulasa.

Con el objetivo de aumentar la producción de enzimas lignocelulolíticas, se generaron nuevos extractos enzimáticos al eliminar completamente la sacarosa del medio Czapek-Dox. Se observó una diferencia significativa en la concentración de azúcares reductores presentes en la mezcla después de la hidrólisis enzimática utilizando los nuevos extractos (Figura 28).

La cantidad de azúcares generados indica que el extracto producido por *A. niger* posee una actividad específica de celulasa de $0.2295 \pm 0.2205 \text{ U mg}^{-1}$ y una actividad específica de xilanasa con un valor de $4.3479 \pm 0.2530 \text{ U mg}^{-1}$. Asimismo, el extracto producido por *Penicillium spp.* presenta una actividad específica de celulasa y hemicelulasa con un valor de $0.2205 \pm 0.0175 \text{ U mg}^{-1}$ y $4.1796 \pm .45849 \text{ U mg}^{-1}$, respectivamente.

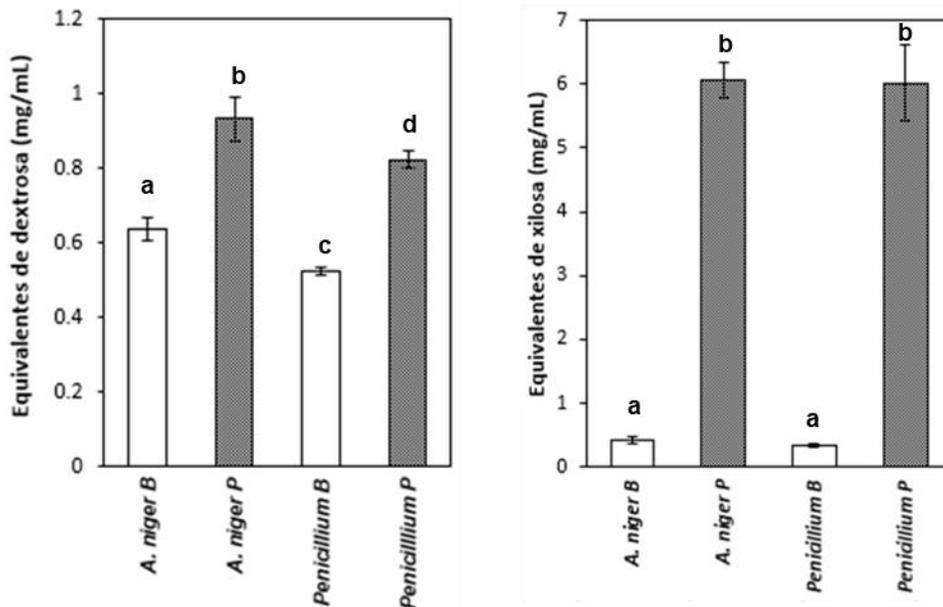


Figura 28. Azúcares generados medidos como equivalentes de dextrosa o xilosa durante los ensayos de actividad de celulasa (izquierda) y xilanasas (derecha) usando extractos enzimáticos producidos sin dextrosa. Las letras diferentes “a,” “b,” “c” y “d” representan diferencia estadísticamente significativa con un valor $p \leq 0.05$.

El incremento de azúcares reductores fue mayor en los ensayos de hidrólisis de xilano lo que sugiere que la actividad de hemicelulasa se ve favorecida por la eliminación de sacarosa en el medio Czapek-Dox. Una mayor actividad de xilanasas de *A. niger* en comparación con actividad de celulasa fue reportada también por Intasit y col., 2021 [39], esto puede deberse a que el hongo necesita secretar en primer lugar enzimas con actividad de hemicelulasa, con el objetivo de degradar la fracción externa de la biomasa lignocelulósica, que se compone mayormente por hemicelulosa, para secretar posteriormente enzimas con actividad de celulasa, para hidrolizar la fracción interna de la lignocelulosa, compuesta principalmente por celulosa [39].

7.3.2 La hidrólisis de hoja de maíz genera azúcares útiles para la producción de bioetanol.

Previamente, se realizó la hidrólisis enzimática de hojas de maíz criofraccionadas utilizando los extractos sin dextrosa producidos por *A. niger* y *Penicillium spp.*, así como el extracto de *P. ostreatus*. Se obtuvo una concentración de azúcares reductores

de 9.23 g L⁻¹. Sin embargo, esta cantidad de azúcares está por debajo del rango mínimo necesario para la producción de bioetanol reportado por Morales-Martínez y col., 2014 [63], cuyo valor mínimo es de 80 g L⁻¹ de azúcares.

Esta baja concentración de azúcares reductores puede ser explicada por la baja actividad enzimática observada en los extractos fúngicos producidos; se ha demostrado que la implementación de métodos de purificación de proteínas tales como la cromatografía, que generan un aumento en la actividad enzimática, en nuestro caso se utilizaron extractos crudos que limita la actividad de la enzimas evaluadas y por tanto impide aprovechar al máximo las hojas de maíz como fuente de azúcares reductores [64]. Debido a esto, fue necesario suplementar el hidrolizado con dextrosa y xilosa como se describe en la sección 6.16.

7.3.3 La fermentación con *Z. mobilis* genera 3.2 % v/v de etanol.

Se determinó el porcentaje de etanol presente en el fermentado mediante un análisis por difracción utilizando un refractómetro digital. Se obtuvo un 3.2 % v/v de etanol a los dos días de fermentación del hidrolizado suplementado con 80 g L⁻¹ de azúcares totales (dextrosa y xilosa 1:1). Esta cantidad se mantuvo constante a los cinco días de fermentación. Sin embargo el rendimiento alcanzado tiene un valor $Y_{p/s}=0.0048$ g etanol/ g azúcares. Dicho valor se encuentra por debajo de los valores reportados por Morales-Martínez y col., 2014 [63], quienes reportaron un valor $Y_{p/s}$ de 0.45 g etanol/g glucosa utilizando una cepa con capacidad para metabolizar xilosa y un medio enriquecido con minerales y extracto de levadura, lo cual pudo contribuir significativamente a un mayor rendimiento $Y_{p/s}$.

El bajo rendimiento se debió a la fuerte dependencia de *Z. mobilis* a la composición/concentración de los azúcares utilizados para el proceso de fermentación. De acuerdo con Zhong y col., 2020 [23] si bien *Z. mobilis* es capaz de metabolizar glucosa y xilosa para producir etanol, es necesario encontrar una proporción adecuada de dichos azúcares para alcanzar un rendimiento $Y_{p/s}$ adecuado. A su vez esto se explica por el mecanismo utilizado por *Z. mobilis* para la

internalización de xilosa, la cual está mediada por una proteína difusora que puede ser bloqueada por inhibición competitiva con la glucosa [44].

Finalmente, mediante HPLC se confirmó la producción de etanol a partir de hidólisis de hoja de maíz utilizando *Z. mobilis* (Figura 29). Se alcanzó una concentración de etanol de 27.005 ± 2.637 g L⁻¹ en el hidrolizado suplementado con dextrosa y xilosa después de 120 h de fermentación, mientras que el hidrolizado no suplementado generó una concentración de 1.7933 ± 0.4722 g L⁻¹ de etanol.

La cantidad máxima de etanol producida por el medio suplementado con dextrosa y xilosa se acerca a los resultados reportados por Li y col., 2019 [44] quienes obtuvieron una concentración de etanol de 30 g L⁻¹ utilizando *Z. mobilis* y 80 g L⁻¹ de dextrosa como fuente de carbono. Así mismo, la cantidad de etanol producida puede ser incrementada mediante la adición de nutrientes como el extracto de levadura y la triptona y mediante la variación en las proporciones de xilosa y dextrosa.

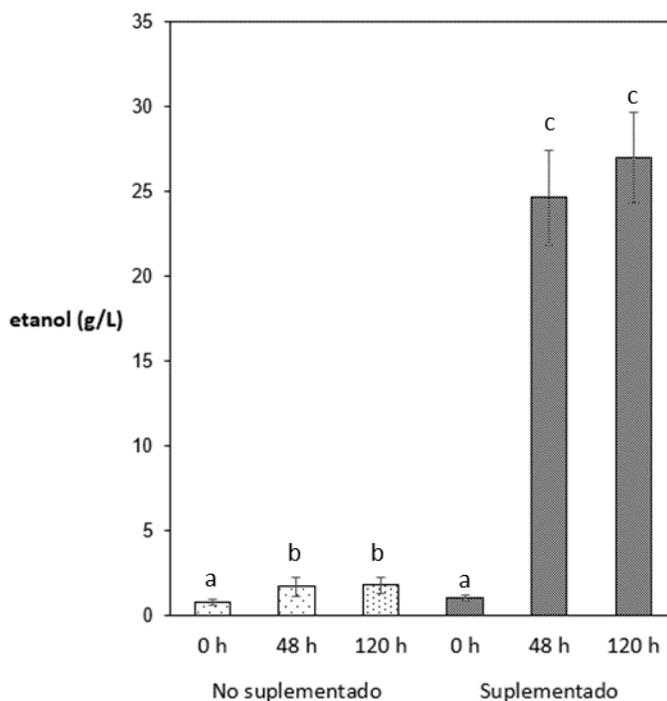


Figura 29. Concentración de etanol en g L⁻¹ generado por la fermentación con *Z. mobilis* de hidrolizado sin suplementar (barras blancas) e hidrolizado suplementado con dextrosa y xilosa (barras grises), a las 0, 48 y 120 h de incubación. Las barras de error indican la desviación estándar basada en triplicados. Letras distintas indican diferencia significativa ($p \leq 0.05$).

VIII. CONCLUSIONES

La hoja de maíz es una biomasa lignocelulósica que puede ser utilizada para la producción de bioetanol por el alto contenido de celulosa y hemicelulosa presentes en su estructura.

En este trabajo fue posible producir bioetanol utilizando *Z. mobilis* para fermentar azúcares reductores generados mediante hidrólisis de hoja de maíz con extractos fúngicos de *P. ostreatus*, *A. niger* y *Penicillium spp.* Sin embargo los rendimientos de producción de etanol alcanzados están en un orden de 1×10^{-2} . Esto debido a que los lotes enzimáticos obtenidos son extractos generados a partir del caldo de fermentación y es necesario realizar un proceso de purificación para incrementar su actividad enzimática.

El uso de salvado de trigo como sustrato induce la producción de enzimas lignocelulolíticas cuando se cultivó *P. ostreatus* en cultivo de inmersión temporal.

Los extractos generados por *P. ostreatus*, *A. niger* y *Penicillium spp.* presentan actividad de celulasa y xilanasa. Actividad de lacasa fue observada por el extracto producido por *P. ostreatus*. Se observó que la actividad de xilanasa de los extractos producidos por *A. niger* y *Penicillium spp.*, fue 20 veces mayor que la actividad de celulasa.

La eliminación de dextrosa del medio de cultivo favorece la actividad de xilanasa de los extractos de *A. niger* y *Penicillium spp.*, generando un aumento de 100 % y 200 % respectivamente, en comparación con los extractos producidos en presencia de dextrosa.

La acción en conjunto de los extractos producidos por *A. niger*, *Penicillium spp.* y *P. ostreatus* no es apropiada debido a la posible existencia mecanismos de inhibición inducidos por la presencia de lacasas. A sí mismo la presencia de productos resultado de la descomposición de lignina por acción de las lacasas secretadas por *P. ostreatus* puede generar mecanismos adicionales de inhibición sobre las celulasas de *A. niger* y *Penicillium spp.*

La proporción de dextrosa y xilosa, así como la concentración inicial son parámetros importantes para alcanzar un rendimiento $Y_{p/s}$ más cercano al valor teórico en la producción de etanol con *Z. mobilis*. La producción de extractos enzimáticos de mayor pureza ayudaría también a generar una proporción óptima de dextrosa y xilosa para la fermentación con *Z. mobilis*.

IX. PERSPECTIVAS

Implementar un proceso de tamizado para obtener un tamaño menor de partículas de hoja de maíz y facilitar el proceso de mezclado durante el proceso de hidrólisis.

Purificar los extractos mediante técnicas de cromatografía, con el objetivo de incrementar la actividad enzimática específica de CMCasa, xilanasa y lacasa.

Evaluar el uso de alta carga de sólidos durante el proceso de hidrólisis para obtener una mayor concentración de azúcares reductores durante la hidrólisis enzimática.

Evaluar el uso de otro microorganismo productor de etanol con la finalidad de comparar la eficacia de *Z. mobilis* en el proceso de fermentación.

X. REFERENCIAS

1. Perlack, R. D., Wright, L. L., Turhollow, A. F., Graham, R. L., Stokes, B. J., & Erbach, D. C. (2005). *Biomass as feedstock for a bioenergy and bioproducts industry: The technical feasibility of a billion-ton annual supply*. (Reporte 1216415) United States Departmente of Energy. <https://www.osti.gov/biblio/1216415/> <https://doi.org/10.2172/1216415>
2. Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural. (2019, 12 de noviembre). Biomasa, creación ecológica de energía. *Sitio del Gobierno de México*. <https://www.gob.mx/agricultura/articulos/biomasa-creacion-ecologica-de-energia>
3. Secretaría de Energía. (2018, 4 de septiembre). Atlas Nacional de Biomasa. *Sitio del Gobierno de México*. <https://dgel.energia.gob.mx/anbio/>
4. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. (2015). Plan de manejo de residuos generados en actividades agrícolas. Primera etapa: Diagnóstico nacional. (Reporte 211PP064). https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/346963/Manejo_de_Residuos_Reporte_Ejecutivo.pdf
5. Andrés-Meza, P., Sierra-Macías, M., Espinosa-Calderón, A., Gómez-Montiel, N. O., Palafox-Caballero, A., Rodríguez-Montalvo, F. A., & Tadeo-Robledo, M. (2014). Hoja de maíz (*Zea mays* L.), Importante actividad en la zona Norte del Estado de Veracruz, México. *Agroproductividad*, 7(1). 32-38. <https://revista-agroproductividad.org/index.php/agroproductividad/article/view/501>

6. Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural. (2019). *SIACON* [Software]. Secretaría de Agricultura y desarrollo social. <https://www.gob.mx/siap/documentos/siacon-ng-161430>
7. Barl, B., Biliaderis, C. G., Murray, E. D., & Macgregor, A. W. (1991). Combined chemical and enzymic treatments of corn husk lignocellulosics. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 56(2). <https://doi.org/10.1002/jsfa.2740560209>
8. Ward, S. M., Holden, N. M., White, E. P., & Oldfield, T. L. (2016, 14-15 september). *The "Circular Economy" applied to the agriculture (livestock production) sector*. [Discussion paper]. Workshop on the Sustainability of the EU's Livestock Production Systems. Brussels, Belgium. https://ec.europa.eu/information_society/newsroom/image/document/2016-48/ward__circular_economy_applied_to_the_livestock_production_sector__brussels__2_40231.pdf
9. Martínez-Hernández, E. (2015). Biorrefinerías sustentables. Integración es la clave. *Ciencia y Desarrollo*. 41(277), 34-39. <https://www.cyd.conacyt.gob.mx/?p=articulo&id=31>
10. Shinde, S. H., Hengne, A., & Rode, C. V. (2020). Lignocellulose-derived platform molecules: An introduction. En Shunmugavel, S. (Ed.) *Recent Advances in Development of Platform Chemicals, A Volume in Biomass, Biofuels, Biochemicals* (pp. 1-31). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64307-0.00001-9>

11. Kamm, B., Gerhardt, M., & Leiß, S. (2010). The biorefinery concept. En Crocker, M. (Ed), *Thermochemical production of building blocks and syngas* (pp. 46-66). RSC Publishing. <https://doi.org/10.1039/9781849732260-00046>
12. Abebe, M. (2008). History of ethanol. *Journalism & Mass Communications*, 6, 24-27. <https://digitalcommons.unl.edu/journalismstudent/6>
13. Alam, M. S., & Tanveer, M. S. (2020b). Conversion of biomass into biofuel: A cutting-edge technology. En *Bioreactors: Sustainable Design and Industrial Applications in Mitigation of GHG Emissions* (pp. 55–74). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-821264-6.00005-X>
14. DOE Energy Information Administration (2009, 27 de mayo). *International Energy Outlook 2009*. (Reporte N° 0484) <https://www.eia.gov/outlooks/archive/ieo09/>
15. Crocker, M., & Andrews, R. (2010). The rationale for biofuels. En M. Crocker (Ed.), *Thermochemical conversion of biomass to liquid fuels and chemicals* (pp. 1-25). RSC Publishing. <https://doi.org/10.1039/9781849732260-00001>
16. Stein, R. A., Polovina, D., Roth, K., Foster, M., Lynskey, M., Whiting, T., Anderson, J. E., Shelby, M. H., Leone, T. G., & Vander-Griend, S. (2012). Effect of Heat of Vaporization, Chemical Octane, and Sensitivity on Knock Limit for Ethanol - Gasoline Blends. *SAE International Journal of Fuels and Lubricants*, 5(2), 823-843. <https://doi.org/10.4271/2012-01-1277>

17. Dagle, R. A., Winkelman, A. D., Ramasamy, K. K., Lebarbier Dagle, V., & Weber, R. S. (2020). Ethanol as a Renewable Building Block for Fuels and Chemicals. *Industrial and Engineering Chemistry Research*, 59(11). <https://doi.org/10.1021/acs.iecr.9b05729>
18. Shuddhodana, D. M., Ranjita B. (2016). Enzymatic hydrolysis of lignocellulosic residues. En S. Mussato. (Ed.), *Biomass Fractionation Technologies for a Lignocellulosic Feedstock Based Biorefinery*, (pp. 543-560). <https://doi.org/10.1016/C2014-0-01890-4>
19. Xu, F. (2010). Structure, ultrastructure, and chemical composition. En S. Run-Cang. (Ed.) *Cereal Straw as a Resource for Sustainable Biomaterials and Biofuels*. (p.p. 9-47). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-53234-3.00002-X>
20. Henriksson, G., Li, J., Zhang, L., & Lindström, M. E. (2010). Lignin Utilization. En M. Crocker. (Ed.) *Thermochemical Conversion of Biomass to Liquid Fuels and Chemicals* (p.p. 222-262). RSC Publishing. <https://doi.org/10.1039/9781849732260-00222>
21. Hernández-Beltrán, J. U., Hernández-De Lira, I. O., Cruz-Santos, M. M., Saucedo-Luevanos, A., Hernández-Terán, F., & Balagurusamy, N. (2019). Insight into pretreatment methods of lignocellulosic biomass to increase biogas yield: Current state, challenges, and opportunities. *Applied Sciences* 9(18). <https://doi.org/10.3390/app9183721>

22. Roy, R., Rahman, M. S., & Raynie, D. E. (2020). Recent advances of greener pretreatment technologies of lignocellulose. *Current Research in Green and Sustainable Chemistry*, 3. <https://doi.org/10.1016/j.crgsc.2020.100035>
23. Zhong, Y., Frost, H., Bustamante, M., Li, S., Liu, Y. S., & Liao, W. (2020). A mechano-biocatalytic one-pot approach to release sugars from lignocellulosic materials. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 121. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2019.109675>
24. Haldar, D., Sen, D., & Gayen, K. (2016). A review on the production of fermentable sugars from lignocellulosic biomass through conventional and enzymatic route. A comparison. *International Journal of Green Energy*, 13(12). <https://doi.org/10.1080/15435075.2016.1181075>
25. Chen, H. (2015). Lignocellulose biorefinery engineering: An overview. In H. Chen (Ed.) *Lignocellulose Biorefinery Engineering* (p.p. 1-17). Woodhead Publishing. <https://doi.org/10.1016/C2014-0-02702-5>
26. Castoldi, R., Correa, V. G., de Moraes, G. R., de Souza, C. G. M., Bracht, A., Peralta, R. A., Peralta-Muniz Moreira, R. F., & Peralta, R. M. (2017). Liquid nitrogen pretreatment of eucalyptus sawdust and rice hull for enhanced enzymatic saccharification. *Bioresource Technology*, 224, 648-655. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.11.099>

27. Wan, C., & Li, Y. (2012). Fungal pretreatment of lignocellulosic biomass. *Biotechnology Advances*, 30(6), 1447-1457. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2012.03.003>
28. Modenbach, A. A., & Nokes, S. E. (2013). Enzymatic hydrolysis of biomass at high-solids loadings - A review. *Biomass and Bioenergy*, 56, 526-544. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2013.05.031>
29. Nazhad, M. M., Ramos, L. P., Paszner, L., & Saddler, J. N. (1995). Structural constraints affecting the initial enzymatic hydrolysis of recycled paper. *Enzyme and Microbial Technology*, 17(1), 68-74. [https://doi.org/10.1016/0141-0229\(94\)00057-X](https://doi.org/10.1016/0141-0229(94)00057-X)
30. Xiang, Q., Lee, Y. Y., Petterson, P. O., & Torget, R. W. (2003). Heterogeneous aspects of acid hydrolysis of α -cellulose. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 107, 505-514. <https://doi.org/10.1385/ABAB:107:1-3:505>
31. Sun, Y., & Cheng, J. (2002). Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: A review. *Bioresource Technology*, 83(1), 1-11. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(01\)00212-7](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(01)00212-7)
32. Hamelinck, C. N., Van Hooijdonk, G., & Faaij, A. P. C. (2005). Ethanol from lignocellulosic biomass: Techno-economic performance in short-, middle- and long-term. *Biomass and Bioenergy*, 28(4), 384-410. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2004.09.002>

33. Saldarriaga-Hernández, S., Velasco-Ayala, C., Leal-Isla Flores., P., Rostro-Alanis, M., Parra-Saldivar, R., Iqbal, H. M. N., & Carrillo-Nieves, D. (2020). Biotransformation of lignocellulosic biomass into industrially relevant products with the aid of fungi-derived lignocellulolytic enzymes. *International Journal of Biological Macromolecules*, 161, 1099-1116. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.06.047>
34. da Luz, J. M. R., Nunes, M. D., Paes, S. A., Torres, D. P., da Silva, M. de C. S., & Kasuya, M. C. M. (2012). Lignocellulolytic enzyme production of *Pleurotus ostreatus* growth in agroindustrial wastes. *Brazilian Journal of Microbiology*, 43(4). <https://doi.org/10.1590/S1517-83822012000400035>
35. Bellaouchi, R., Abouloifa, H., Rokni, Y., Hasnaoui, A., Ghabbour, N., Hakkou, A., Bechchari, A., & Asehraou, A. (2021). Characterization and optimization of extracellular enzymes production by *Aspergillus niger* strains isolated from date by-products. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 19(1). <https://doi.org/10.1186/s43141-021-00145-y>
36. Liu, G., Qin, Y., Li, Z., & Qu, Y. (2013). Improving lignocellulolytic enzyme production with *Penicillium*: from strain screening to systems biology. *Biofuels*, 4(5), 523-534. <https://doi.org/10.4155/bfs.13.38>
37. El-Gendi, H., Saleh, A. K., Badierah, R., Redwan, E. M., El-Maradny, Y. A., & El-Fakharany, E. M. (2022). A Comprehensive Insight into Fungal Enzymes: Structure, Classification, and Their Role in Mankind's Challenges. *Journal of Fungi*, 8(1), 23. <https://doi.org/10.3390/jof8010023>

38. Krishnan, A., Convey, P., Gonzalez-Rocha, G., & Alias, S. A. (2016). Production of extracellular hydrolase enzymes by fungi from King George Island. *Polar Biology*, 39, 65-76. <https://doi.org/10.1007/s00300-014-1606-7>
39. Intasit, R., Cheirsilp, B., Suyotha, W., & Boonsawang, P. (2021). Synergistic production of highly active enzymatic cocktails from lignocellulosic palm wastes by sequential solid state-submerged fermentation and co-cultivation of different filamentous fungi. *Biochemical Engineering Journal*, 173. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2021.108086>
40. Wang, F. Q., Xie, H., Chen, W., Wang, E. T., Du, F. G., & Song, A. D. (2013). Biological pretreatment of corn stover with ligninolytic enzyme for high efficient enzymatic hydrolysis. *Bioresource Technology*, 144, 572-578. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.07.012>
41. Singhania, R. R., Patel, A. K., Thomas, L., Goswami, M., Giri, B. S., & Pandey, A. (2015). Industrial Enzymes. En A. Pandey, R. Höfer & M. Taherzadeh (Eds.), *Industrial Biorefineries and White Biotechnology* (pp. 473–497). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63453-5.00015-X>
42. Giacobbe, S., Pezzella, C., Lettera, V., Sannia, G., & Piscitelli, A. (2018). Laccase pretreatment for agrofood wastes valorization. *Bioresource Technology*, 265, 59-656. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.05.108>

43. Irfan, M., Nadeem, M., & Syed, Q. (2013). Production of cellulases and hemicellulases from cellulolytic fungal cultures in submerged fermentation using agricultural wastes. *Electronic Journal of Biology*, 9(3), 62–66. <https://ejbio.imedpub.com/articles/production-of-cellulases-and-hemicellulases-from-cellulolytic-fungal-cultures-in-submerged-fermentation-using-agricultural-wastes.php?aid=5977>
44. Li, Y., Zhai, R., Jiang, X., Chen, X., Yuan, X., Liu, Z., & Jin, M. (2019). Boosting ethanol productivity of *Zymomonas mobilis* 8b in enzymatic hydrolysate of dilute acid and ammonia pretreated corn stover through medium optimization, high cell density fermentation and cell recycling. *Frontiers in Microbiology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02316>
45. Limayem, A., & Ricke, S. C. (2012). Lignocellulosic biomass for bioethanol production: Current perspectives, potential issues and future prospects. *Progress in Energy and Combustion Science* 38(4), 449-467. <https://doi.org/10.1016/j.pecs.2012.03.002>
46. Rogers, P. L., Lee, K. J., Skotnicki, M. L., & Tribe, D. E. (2022). Ethanol Production by *Zymomonas mobilis*. In A. Fiechter (Ed.), *Microbial Reactions* (p.p. 37-84). De Gruyter. <https://doi.org/10.1515/9783112620748-002>
47. Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1–2), 248-254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)

48. Negrulescu, A., Patrulea, V., Mincea, M. M., Ionascu, C., Vlad-Oros, B. A., & Ostafe, V. (2012). Adapting the reducing sugars method with dinitrosalicylic acid to microtiter plates and microwave heating. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 23(12), 2176-2182. <https://doi.org/10.1590/S0103-50532013005000003>
49. Zimmermann, Y. S., Shahgaldian, P., Corvini, P. F. X., & Hommes, G. (2011). Sorption-assisted surface conjugation: A way to stabilize laccase enzyme. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 92, 169-178. <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3534-6>
50. Alexopoulos, C. J., Moore, D., & Ahmadjian, V. (2020). Fungus: Definition, characteristics, types, & facts. En *Encyclopedia Britannica*. <https://www.britannica.com/science/fungus>
51. Jun, H., Kieselbach, T., & Jönsson, L. J. (2011). Enzyme production by filamentous fungi: Analysis of the secretome of *Trichoderma reesei* grown on unconventional carbon source. *Microbial Cell Factories*, 10. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-10-68>
52. Guo, X., Li, H., Xiang, J., Xu, X., Liu, W., Gao, A., Yang, X., Wang, R., Li, X., & Li, L. (2011). Genetic variation of high molecular weight glutenin subunits in wheat accessions in China. *Crop Science*, 51(6), 2423–2429. <https://doi.org/10.2135/cropsci2010.12.0724>

53. Mirzabe, A. H., Hajiahmad, A., Fadavi, A., & Rafiee, S. (2022). Temporary immersion systems (TISs): A comprehensive review. *Journal of Biotechnology*, 357, 56-83. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2022.08.003>
54. Santa-Rosa, P. S., Souza, A. L., Roque, R. A., Andrade, E. V., Astolfi-Filho, S., Mota, A. J., & Nunes-Silva, C. G. (2018). Production of thermostable β -glucosidase and CMCase by *Penicillium* sp. LMI01 isolated from the Amazon region. *Electronic Journal of Biotechnology*, 31, 84-92. <https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2017.11.005>
55. Cardoso, W. S., Queiroz, P. V., Tavares, G. P., Santos, F. A., Soares, F. E. de F., Kasuya, M. C. M., & Queiroz, J. H. de. (2018). Multi-enzyme complex of white rot fungi in saccharification of lignocellulosic material. *Brazilian Journal of Microbiology*, 49(4), 879-884. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2018.05.006>
56. A review of lignocellulose bioconversion using enzymatic hydrolysis and synergistic cooperation between enzymes-Factors affecting enzymes, conversion and synergy. *Biotechnology Advances* 30(6), 1458-1480. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2012.03.002>
57. Rosário-Freixo, M., Karmali, A., & Arteiro, J. M. (2012). Production, purification and characterization of laccase from *Pleurotus ostreatus* grown on tomato pomace. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28, 245-254. <https://doi.org/10.1007/s11274-011-0813-4>

58. Ramos, O. L., & Malcata, F. X. (2019). Food-grade enzymes. En M. Moo-Young (Ed.), *Comprehensive Biotechnology* (p.p. 587-603). Pergamon. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809633-8.09173-1>
59. Eriksson, K. E. L. (1991). *Microbial and enzymatic degradation of wood and wood components*. Springer.
60. Shankar, K., Kulkarni, N. S., Jayalakshmi, S. K., & Sreeramulu, K. (2019). Saccharification of the pretreated husks of corn, peanut and coffee cherry by the lignocellulolytic enzymes secreted by *Spingobacterium sp. ksn* for the production of bioethanol. *Biomass and Bioenergy*, 127. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2019.105298>
61. Chukwuma, O. B., Rafatullah, M., Tajarudin, H. A., & Ismail, N. (2020). Lignocellulolytic enzymes in biotechnological and industrial processes: A review. *Sustainability*, 12(18). <https://doi.org/10.3390/su12187282>
62. Amore, A., Giacobbe, S., & Faraco, V. (2013). Regulation of Cellulase and Hemicellulase Gene Expression in Fungi. *Current Genomics*, 14(4), 230-249. <https://doi.org/10.2174/1389202911314040002>
63. Morales-Martínez, T. K., Rios-González, L. J., Aroca-Arcaya, G., & Rodríguez-de la Garza, J. A. (2014). Ethanol production by *Zymomonas mobilis* NRRL B-806 from enzymatic hydrolysates of eucalyptus globulus. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 13(3), 779-775.

https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1665-27382014000300012

64. Terrasan, C. R. F., Guisan, J. M., & Carmona, E. C. (2016). Xylanase and β -xylosidase from *Penicillium janczewskii*: Purification, characterization and hydrolysis of substrates. *Electronic Journal of Biotechnology*, 23, 54-62. <https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2016.08.001>

XI. ANEXOS

11.1 Cuantificación de proteínas.

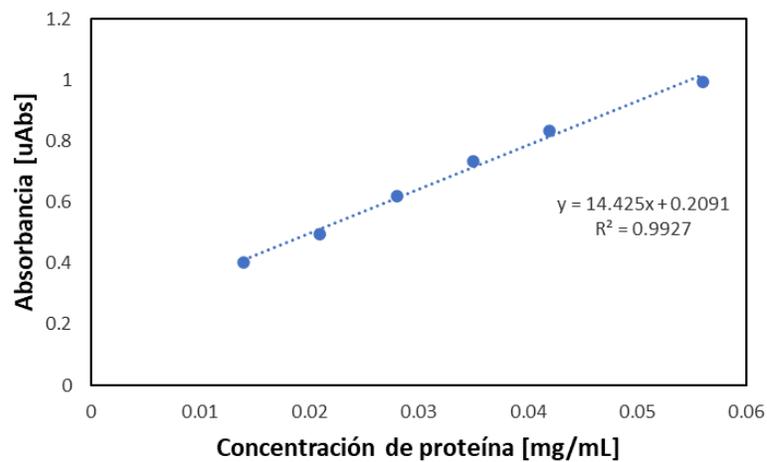
Preparación de Tris-HCl 20 mM pH 7.5.

Para 100 mL

- Tris-HCl.....0.3153 g.
- Se disuelve en 100 mL de agua destilada y se ajusta el pH a 7.5.
- Preparación de Línea patrón de BSA.
- Se prepara un patrón de BSA de 2 mg/mL utilizando la solución Tris-HCl 20 mM pH 7.5.
- Para 40 mL:
- BSA.....80 mg.
- Se disuelve el BSA pesado en el Tris-HCl y se afora a 40 mL.
- Posteriormente se prepara un nuevo patrón de 0.07 mg/mL a partir del patrón de 2 mg/mL realizando la dilución correspondiente y se construye una línea de calibración con los siguientes puntos:

BSA (μ L)	Tris (μ L)	Concentración final (mg/mL)
10	90	0.007
20	80	0.014
30	70	0.021
40	60	0.028
50	50	0.035
60	40	0.042
70	30	0.049
80	20	0.056
90	10	0.063
100	0	0.070

Se añaden 100 μ L de reactivo de Bradford a cada estándar y se lee la absorbancia a 595 nm.

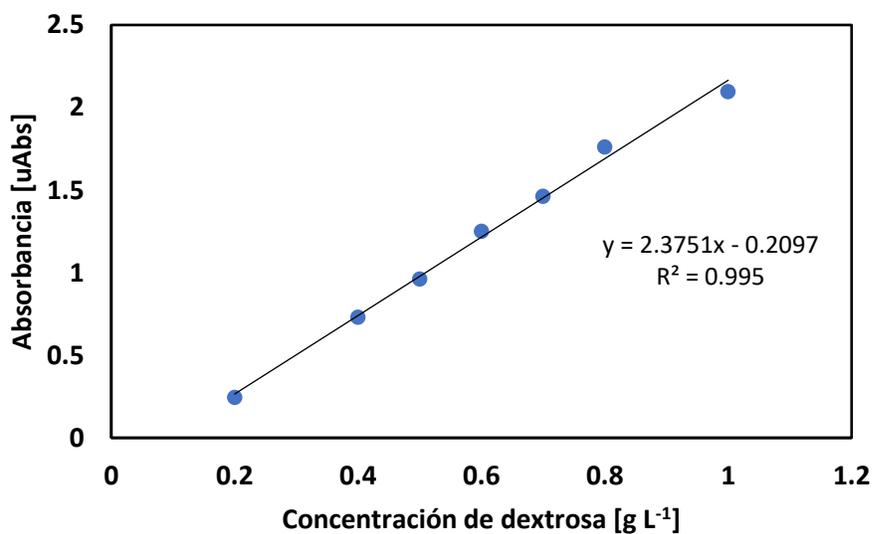


11.2 Preparación de DNS.

Para 60mL de reactivo DNS:

- NaOH.....0.60 g
- Tartrato de sodio y potasio.....12.00 g
- Metabisulfito de sodio.....0.03 g
- Fenol.....0.12 g
- Reactivo DNS0.60 g

11.3 Cuantificación de azúcares reductores.



11.4 Preparación de acetato 50 mM pH 5.5

Para 100 mL:

Acetato de sodio..... 0.41085 g

Ajustar pH con ácido acético glacial y aforar en matraz aforado.

11.5 Preparación de CMC al 1 % en búfer de acetato 50 mM pH 5.5

Para 150 mL:

CMC.....10 g

Disolver en búfer de acetato 50 mM pH 5.5 a 40 °C con agitación constante.

