



EDUCACIÓN
SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA



TECNOLÓGICO
NACIONAL DE MÉXICO®



TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO

Instituto Tecnológico de Veracruz

**Estudio del aprovechamiento integral del cultivo de
cebada (*Hordeum vulgare* L.) para la producción de
etanol**

T E S I S

Que para obtener el grado de:
Doctora en Ciencias en Alimentos

Presenta:

M.B. Nayeli Ibarra Díaz

Directora:

Dra. María Guadalupe Aguilar Uscanga

Co-directores:

Dra. Patricia Guillermina Mendoza García

Dr. Juan Francisco Castañón Rodríguez

H. Veracruz Ver.

Septiembre, 2020

FORMATO DE IMPRESIÓN

OFICIO DE JURADO

TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO
Instituto Tecnológico de Veracruz

**Estudio del aprovechamiento integral del cultivo de cebada
(*Hordeum vulgare* L.) para la producción de etanol**

T E S I S

Que para obtener el grado de:
Doctora en Ciencias en Alimentos

Presenta:

M.B. Nayeli Ibarra Díaz

Directora:

Dra. María Guadalupe Aguilar Uscanga

Co-directores:

Dra. Patricia Guillermina Mendoza García

Dr. Juan Francisco Castañón Rodríguez

H. Veracruz Ver.

Septiembre 2020

RECONOCIMIENTOS

Al Instituto tecnológico Nacional de México / Instituto tecnológico de Veracruz y a la **Unidad de Investigación y Desarrollo en Alimentos** por darme la oportunidad de formar parte del selecto grupo de alumnos e investigadores y por permitirme crecer profesionalmente.

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)** por la beca otorgada a lo largo de los cuatro años del programa, así como incentivos de promoción recibidos para realizar estancias en el extranjero.

A la **Dra. María Guadalupe Aguilar Uscanga** por su gran labor como investigadora, por compartir sus amplios conocimientos y experiencia, por el apoyo, la confianza y el cariño que me brindó, y por motivarme a seguir creciendo en todos los aspectos de mi vida.

A la **Dra. Sandra Del Moral Ventura, Dra. Rosa María Oliart Ros, Dra. Beatriz Torrestiana Sánchez, Dra. Mirna Suárez Quiroz, Dra. Patricia Mendoza García, Dra. Madeleine Hidalgo Morales, Dr. Juan Francisco Castañón Rodríguez** por su valiosa contribución en el presente trabajo a través de sus conocimientos y experiencia como investigadores.

A la **Maestra Dulce María Barradas Dermitz** por el constante e invaluable apoyo académico y moral que recibí de su parte a lo largo del trabajo de investigación.

A la **Dra. Elia Tomás Pejó** por darme la oportunidad de realizar una estancia de investigación en el Instituto Madrileño de Estudios Avanzados en Energía, así como por su apoyo y compartir sus amplios conocimientos y experiencia.

RESUMEN

Ibarra Díaz, Nayeli, M.B. Doctorado en Ciencias en Alimentos. Tecnológico Nacional de México / Instituto Tecnológico de Veracruz. Septiembre, 2020. **Estudio del aprovechamiento integral del cultivo de cebada (*Hordeum vulgare* L.) para la producción de etanol.** Directora: Dra. María Guadalupe Aguilar Uscanga. Co-directores: Dra. Patricia Guillermina Mendoza García y Dr. Juan Francisco Castañón Rodríguez.

En México, la cebada es el quinto cereal más producido anualmente con un millón de toneladas de grano y 515 mil toneladas de paja. Dicho cultivo es rico en materiales amiláceo y lignocelulósico. El grano de buena calidad está destinado principalmente a la industria maltera, sin embargo, aquel que no cumple con los estándares de calidad así como la paja son considerados forraje o desechos agrícolas de poco valor. Por lo que el objetivo de este trabajo es proponer una alternativa de uso para dicho cultivo, aprovechando su composición rica en polisacáridos para desarrollar un proceso integral para la producción de etanol de primera y segunda generación. Para llevar a cabo este objetivo se establecieron las mejores condiciones del proceso a partir del grano y paja de cebada, mediante diseños de optimización con el uso de enzimas comerciales Amilex 4T, Diazyme SSF, Cellic CTec 3, Cellic HTec 3 y levaduras autóctonas *Saccharomyces cerevisiae* ITV-01 y *Kluyveromyces marxianus* CECT 10875, utilizando dos variedades de cebada. Los resultados obtenidos mostraron que la variedad “Doña Josefa” fue la mejor debido a su composición rica en holocelulosa (70 %) y almidón (66 %). Para la hidrólisis enzimática de harina de cebada obtenida del grano las condiciones óptimas fueron 0.004 % de amilasa, 0.030 % de glucosidasa y 30 % de harina obteniendo un 82 % de conversión y 160 g/L de glucosa. En la paja, con la optimización del pretratamiento peróxido-alcálico se logró una deslignificación del 60 % utilizando un 6 % de H₂O₂, RLS 12:1 y 24 horas de reacción, y en la hidrólisis enzimática de la misma se alcanzó una conversión del 85 % y se obtuvieron 70 g/L de azúcares fermentables utilizando 6 % de celulasas, 3 % de xilanasas y 20 horas de reacción a 50°C. En las fermentaciones por lote con la levadura *S. cerevisiae* se obtuvieron concentraciones de etanol de 17 y 66 g/L para los hidrolizados de paja y harina respectivamente, obteniendo rendimientos de 0.44 g/g y eficiencias del 80 %; mientras que con la levadura *K. marxianus* en proceso de Sacarificación y Fermentación Simultánea (SFS) se incrementó la concentración de etanol a 47 g/L en hidrolizado de paja de cebada. Los resultados obtenidos demuestran que el cultivo de cebada representa una opción viable para la producción de etanol de 1G y 2G.

ABSTRACT

Ibarra Díaz, Nayeli, M.B., PhD in Food Sciences. National Technological Institute of Mexico / Technological Institute of Veracruz. September, 2020. **Study of integral use of barley crop (*Hordeum vulgare* L.) for ethanol production.** Advisor: Dr. María Guadalupe Aguilar Uscanga, Co-advisors: Dr. Patricia Guillermina Mendoza García, Dr. Juan Francisco Castañón Rodríguez.

In Mexico, barley is the fifth most produced cereal annually with one million tons of grain and 515 thousand tons of straw. Said culture is rich in starchy and lignocellulosic materials, respectively. Good quality grain is mainly destined for the malting industry, however, those that do not meet quality standards as well as straw are considered forage or agricultural waste of little value. Therefore, the objective of this work is to propose an alternative of use for this crop, taking advantage of its composition rich in polysaccharides, which makes it suitable for developing a comprehensive process for obtaining first and second generation ethanol. The best process conditions were established from the barley grain and straw, with the use of commercial enzymes Amilex 4T, Diazyme SSF, Cellic CTec 3 and Cellic HTec 3 and autochthonous yeasts *Saccharomyces cerevisiae* ITV-01 and *Kluyveromyces marxianus* CECT 10875. The results showed that the variety "Doña Josefa" was the best due to its composition rich in holocellulose (70 %) and starch (66 %). For the enzymatic hydrolysis of barley flour, the optimal conditions were 0.004 % amylase, 0.030 % glucosidase and 30 % flour, obtaining 82 % conversion and 160 g/L of glucose. In straw, with the optimization of the peroxide-alkaline pretreatment, a delignification of 60 % was achieved using 6 % H₂O₂, LSR 12:1 and 24 hours of reaction, and in its hydrolysis a conversion of 85 % was achieved and 70 g/L of fermentable sugars using 6 % cellulases, 3 % xylanases and 20 hours of reaction. In batch fermentations with *S. cerevisiae* yeast ethanol concentrations of 17 and 66 g/L were obtained for straw and flour hydrolysates respectively, with yields of 0.44 g/g and efficiencies of 80 %; while with the yeast *K. marxianus* in the process of saccharification and simultaneous fermentation (SSF), the ethanol concentration was increased to 47 g/L in barley straw. Therefore, it is shown that the cultivation of barley represents a viable option for the 1st and 2nd generation ethanol production.

CONTENIDO

RESUMEN	iii
ABSTRACT.....	V
LISTA DE TABLAS	VII
LISTA DE FIGURAS	IX
LISTA DE NOMENCLATURA	XI
INTRODUCCIÓN.....	1
1. Antecedentes.....	3
1.1 Bioetanol.....	3
1.2 Cebada.....	5
1.2.1 Morfología de <i>Hordeum vulgare</i>	7
1.2.2 Panorama internacional y nacional	9
1.2.3 Usos y comercialización del cultivo de cebada	11
1.3 Material amiláceo presente en grano de cebada.....	13
1.3.1 Almidón.....	13
1.3.2 Amilosa	14
1.3.3 Amilopectina.....	16
1.3.4 Producción de etanol a partir de materias primas que contienen almidón.....	17
1.3.4.1 α -amilasa	18
1.3.4.2 α -glucosidasa.....	21
1.4 Material lignocelulósico de paja de cebada	22
1.5 Pretratamientos del material lignocelulósico	25
1.5.1 Pretratamiento peróxido-alcálico.....	27
1.6 Hidrólisis enzimática	28
1.6.1 Celulasas	30
1.6.2 Xilanasas	31
1.6.3 Efecto de los surfactantes no-iónicos en la hidrólisis enzimática	31
1.7 Fermentación alcohólica y <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	33
1.7.1 Sacarificación y Fermentación Simultánea (SFS)	35
2. JUSTIFICACIÓN	39

3. OBJETIVOS	40
3.1 Objetivo general	40
3.2 Objetivos específicos	40
4. MATERIALES Y MÉTODOS	41
4.1 Materia prima y material biológico	42
4.2. Obtención de harina a partir del grano de cebada	43
4.3 Caracterización de la harina de cebada	44
4.3.1 Determinación de almidón	44
4.3.2 Determinación de proteína total	45
4.3.3 Porcentaje de humedad	45
4.3.4 Cenizas	45
4.4. Paja de cebada	46
4.4.1 Caracterización del material lignocelulósico de la paja de cebada	46
4.5 Estudio preliminar enzimático de enzimas amilolíticas	47
4.5.1 Efecto de la temperatura sobre la actividad de las enzimas amilolíticas	47
4.6 Hidrólisis enzimática de la harina de cebada	49
4.6.1 Optimización de la hidrólisis enzimática de harina de cebada	50
4.7 Pretratamiento peróxido-alcálico de la paja de cebada	51
4.7.1 Optimización del pretratamiento alcalino de la paja de cebada	52
4.8 Hidrólisis enzimática de la paja de cebada pretratada	52
4.8.1 Optimización de la hidrólisis enzimática de la paja de cebada pretratada	54
4.8.2 Efecto de la adición de surfactantes en la hidrólisis enzimática de la paja de cebada pretratada	55
4.9 Caracterización macro y microscópica de la paja de cebada	56
4.9.1 Microscopía electrónica de Barrido (MEB) de paja de cebada	56
4.9.2 Espectroscopía infrarroja (FTIR) de paja de cebada	56
4.10 Fermentaciones con hidrolizados	57
4.10.1 Material biológico y medio de conservación	57
4.10.2 Precultivo y preinóculo	57
4.10.3 Fermentación por lote con hidrolizado de harina de cebada	58
4.10.4 Fermentación por lote con hidrolizado de paja de cebada y <i>S. cerevisiae</i> ...	59
4.10.5 Fermentación por lote de hidrolizado de paja y <i>K. marxianus</i> CECT 10875 .	59

4.11 Sacarificación y Fermentación Simultánea (SFS) en lote con <i>K. marxianus</i> CECT10875.....	64
4.11.1 Sacarificación y Fermentación Simultánea en lote alimentado	65
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	66
5.1 Caracterización del material lignocelulósico de paja de cebada	66
5.2 Caracterización de la harina de cebada.....	67
5.2 Estudio preliminar enzimático de enzimas amilolíticas	69
5.3.1 Efecto de la temperatura sobre la actividad de las enzimas amilolíticas	69
5.4 Hidrólisis enzimática de harina de cebada.....	74
5.4.1 Optimización de la hidrólisis enzimática de harina de cebada.....	77
5.5 Pretratamiento peróxido-alcálico de paja de cebada	82
5.5.1 Optimización del pretratamiento peróxido-alcálico de paja de cebada	84
5.6 Hidrólisis enzimática de paja de cebada pretratada	91
5.6.1 Optimización de la hidrólisis enzimática de paja de cebada pretratada	93
5.6.2 Efecto de la adición de surfactantes en la hidrólisis enzimática de paja de cebada pretratada	99
5.7 Caracterización macro y microscópica de la paja de cebada	101
5.7.1 Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)	104
5.8.1 Fermentación por lote con hidrolizado de harina y <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ITV-01	106
5.9 Sacarificación y Fermentación Simultánea (SFS) por lote con <i>K. marxianus</i> CECT 10875.....	111
5.9.1 SFS con <i>Kluyveromyces marxianus</i> CECT 10875 por lote alimentado	115
6. CONCLUSIONES.....	120
7. PERSPECTIVAS	121
8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	122
9. ANEXO.....	133

LISTA DE TABLAS

		Pag
Tabla 1.1	Clasificación taxonómica de <i>Hordeum vulgare</i>	6
Tabla 1.2	Contenido lignocelulósico presente en paja de cebada y otros residuos agroindustriales.....	24
Tabla 1.3	Métodos de pretratamientos para residuos lignocelulósicos y sus principales ventajas y desventajas.....	26
Tabla 4.1	Niveles de las variables estudiadas en el diseño experimental para la hidrólisis de harina de cebada.....	49
Tabla 4.2	Diseño Box-Behnken de la hidrólisis enzimática de harina de cebada	50
Tabla 4.3	Niveles de las variables estudiadas en el diseño experimental para el pretratamiento peróxido-alcálico de paja de cebada.....	51
Tabla 4.4	Diseño Box-Behnken del pretratamiento peróxido-alcálico de paja de cebada.....	52
Tabla 4.5	Niveles de las variables estudiadas en el diseño experimental para la hidrólisis enzimática de paja de cebada pretratada	53
Tabla 4.6	Diseño Box-Behnken de la hidrólisis enzimática de la paja de cebada pretratada.....	54
Tabla 4.7	Composición de los medios de conservación de <i>S. cerevisiae</i> ITV-01 y <i>K. marxianus</i> CECT 10875.....	57
Tabla 4.8	Composición del medio sintético de activación para <i>S. cerevisiae</i>	58
Tabla 4.9	Medio de enriquecimiento para hidrolizado enzimático de paja de cebada..	60
Tabla 5.1	Contenido de almidón presente en diferentes variedades de cebada.....	69
Tabla 5.2	Concentración de glucosa obtenida mediante el diseño Box-Behnken de la hidrólisis de harina de cebada.....	76
Tabla 5.3	Análisis de varianza (ANOVA) para la liberación de glucosa en la hidrólisis enzimática de harina de cebada	78
Tabla 5.4	Porcentaje de remoción de lignina obtenido en cada pretratamiento del diseño Box-Behnken.....	83
Tabla 5.5	Análisis de varianza (ANOVA) para la remoción de lignina en el pretratamiento peróxido-alcálico.....	85
Tabla 5.6	Porcentaje de conversión y contenido de azúcares fermentables obtenidos	92

	en la hidrólisis enzimática mediante el diseño Box-Behnken.....	
Tabla 5.7	Análisis de varianza (ANOVA) para la hidrólisis enzimática de la paja de cebada pretratada	94
Tabla 5.8	Síntesis de resultados de fermentaciones con hidrolizados de harina y paja de cebada en fermentación por lote.....	111
Tabla 5.9	Síntesis de resultados de fermentaciones con hidrolizado de paja de cebada en Sacarificación y Fermentación Simultánea por lote y lote alimentado.....	118

LISTA DE FIGURAS

		Pag
Figura 1.1	Estructura de (a) la planta de cebada y (b) estructura interna del grano de cebada (Knudsen, 2014).....	7
Figura 1.2	Panorama (a) mundial y (b) nacional de la producción de cebada para el año 2016.....	10
Figura 1.3	Estructura química de la (a) amilosa y (b) amilopectina.....	15
Figura 1.4	Mecanismo de acción de las amilasas sobre la estructura del almidón.....	19
Figura 1.5	Composición y organización del material lignocelulósico.....	22
Figura 1.6	Ruta metabólica de los principales metabolitos producidos por <i>Sacharomyces cerevisiae</i>	34
Figura 4.1	Metodología general propuesta para la producción de etanol de 1G y 2G a partir del cultivo de cebada.....	41
Figura 4.2	(a) Grano de cebada y (b) paja de cebada.....	42
Figura 4.3	Harina integral de cebada.....	44
Figura 4.4	Esquema de los cuadrantes presentes en la cámara de Thoma para el conteo celular.....	61
Figura 5.1	Composición química en base seca de la paja de cebada	66
Figura 5.2	Efecto de la temperatura sobre la actividad de la enzima α -amilasa.....	70
Figura 5.3	Efecto de la temperatura sobre la actividad de la enzima α -glucosidasa.....	71
Figura 5.4	Termoestabilidad de la enzima α -amilasa.....	73
Figura 5.5	Termoestabilidad de la enzima α -glucosidas.....	73
Figura 5.6	Evaluación del tiempo de hidrólisis enzimática en harina de cebada con un diseño Box-Behnken.....	75
Figura 5.7	Gráfico de superficie de respuesta de las interacciones de las variables evaluadas en el proceso de hidrólisis enzimática de harina de cebada: (a) Harina vs amilasa, (b) Harina vs glucosidasa y (c) glucosidasa vs amilasa.....	80
Figura 5.8	Tratamientos de designificación obtenidos mediante el diseño Box-Behnken	84

Figura 5.9	Gráfico de superficie de respuesta de las interacciones de las variables evaluadas en el proceso de deslignificación de paja de cebada: (a) H ₂ O ₂ vs tiempo, (b) Tiempo vs relación líquido-sólido (RLS) y (c) H ₂ O ₂ vs relación líquido-sólido (RLS).	88
Figura 5.10	Hidrólisis enzimática de la paja de cebada pretratada	93
Figura 5.11	Gráfico de superficie de respuesta de las interacciones de las variables evaluadas en el proceso de hidrólisis enzimática de paja de cebada pretratada: (a) [CTec3] vs [HTec3], (b) [CTec3] vs Tiempo y (c) [CTec3] vs Tiempo.	97
Figura 5.12	Efecto de la adición de surfactantes en la concentración de glucosa y xilosa durante la hidrólisis enzimática de la paja de cebada pretratada	101
Figura 5.13	Imágenes y MEB de paja de cebada. (a) paja de cebada sin pretratamiento, (b) paja de cebada con pretratamiento alcalino y (c) paja de cebada con pretratamiento alcalino e hidrólisis enzimática (agotado enzimático)	103
Figura 5.14	Espectro IR de la paja de cebada con diferentes tratamientos. Paja sin pretratamiento —, paja con pretratamiento alcalino y paja con pretratamiento alcalino e hidrólisis enzimática (agotado enzimático)	105
Figura 5.15	Fermentación con hidrolizado de harina de cebada y <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ITV01.....	107
Figura 5.16	Fermentación con hidrolizado de paja de cebada pretratada y <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ITV01.....	109
Figura 5.17	Fermentación con hidrolizado de paja de cebada pretratada y <i>Kluyveromyces marxianus</i> CECT 10875.....	110
Figura 5.18	Sacarificación y Fermentación Simultánea por lote con a) 4 h de prehidrólisis y b) sin prehidrólisis.....	113
Figura 5.19	Sacarificación y Fermentación Simultánea por lote alimentado con a) 1 g de inóculo inicial b) 2 g de inóculo inicial y c) alimentación de 1 g de inóculo a las 24 h.....	116

LISTA DE NOMENCLATURA

ANOVA	Análisis de Varianza
ATP	Adenosin trifosfato
CMC	Carboximetilcelulosa
FPU	Unidades de papel filtro
FTIR	Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier
GEI	Gases de efecto invernadero
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
M	Molaridad
MmL	Miles de millones de litros
N	Normalidad
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido reducido
NADP	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NAD ⁺	Nicotinamida adenina oxidada
NREL	Laboratorio nacional de energías renovables
PEG	Polietilenglicol
PVP	Polivinilpirrolidona
SEM	Microscopía electrónica de barrido
SHF	Hidrólisis y fermentación por separado
SFS	Sacarificación y Fermentación Simultánea
1G	Primera generación
2G	Segunda generación

Símbolos y unidades

atm	Atmósferas	
bar	Bar	
°Brix	Grados Brix	
psi	libra sobre pulgada cuadrada	
rpm	revoluciones por minuto	
v/v	volumen/volumen	
p/v	peso/volumen	
p/p	peso/peso	
%V	Porcentaje de viabilidad	
P	Producto	gL ⁻¹
P ₀	Producto inicial	gL ⁻¹
P _f	Producto final	gL ⁻¹
Q _p	Productividad de producto	gL ⁻¹ h ⁻¹
S	Sustrato	gL ⁻¹
S ₀	Sustrato inicial	gL ⁻¹
S _f	Sustrato final	gL ⁻¹
Y _{x/s}	Rendimiento de biomasa	gg ⁻¹
Y _{p/s}	Rendimiento de producto	gg ⁻¹
E	Eficiencia	%

INTRODUCCIÓN

Con el rápido crecimiento y desarrollo de nuestra sociedad también se hacen presentes y van en aumento las preocupaciones ambientales, económicas y sociales con respecto a la energía sostenible. Es por ello que es esencial el desarrollo de un sistema de energía limpio, bajo en carbono, seguro, renovable y eficiente que al mismo al tiempo permita resolver los problemas de contaminación ambiental (Mahmood *et al.*, 2019; Wang *et al.*, 2019).

El uso de biocombustibles puede contribuir en gran medida a lograr la sostenibilidad energética y del mismo modo reducir las emisiones de gases de efecto invernadero. En la actualidad la producción y uso de bioetanol como biocombustible es de suma importancia, ya que se espera en los próximos años un incremento consecutivo de demanda y producción, para el 2022 se espera alcanzar la cifra de 60.5 billones de litros (Ziolkowska *et al.*, 2020), en Estados Unidos se predice que para el año 2025 el 30 % del combustible utilizado provenga de biocombustibles lignocelulósicos y para el año 2035 la producción de biocombustibles se triplique (Sarsaiya *et al.*, 2019). Los residuos agrícolas y los desechos agroindustriales son una fuente potencial de materia prima para la producción de bioteanol, ya que poseen ciertas ventajas como: bajo costo y abundante disponibilidad ya que al año se producen entre 3.7 a 5 billones de toneladas métricas de residuos lignocelulósicos de los cuales cerca de 8.9 millones de toneladas métricas son de residuos de cereales como trigo, arroz y cebada (Mahmood *et al.*, 2019; Sarsaiya *et al.*, 2019; Wang *et al.*, 2019).

En México, se generan más de 64 millones de toneladas de residuos agroindustriales entre los cuales se encuentran bagazo de agave, bagazo de caña de azúcar, rastrojo de maíz, paja de trigo y paja de cebada (SAGARPA, 2016), esta última es el quinto cereal más producido en el país (SIAP, 2019) con promedio de un millón de toneladas de grano y 490 mil toneladas de paja, los cuales son ricos en material amiláceo y lignocelulósico respectivamente; sin embargo ha sido de los menos estudiados a nivel nacional para su aprovechamiento en bioenergéticos.

El uso integral de la cebada representa una nueva alternativa para desarrollar tecnologías que promuevan la diversificación del cultivo para la producción de etanol de 1G y 2G, ya que existe una gran disponibilidad de esta materia prima nacional y su mercado está restringido a los monopolios de la industria maltera.

Dado lo anterior, la propuesta de este trabajo es la generación y el desarrollo de nuevas tecnologías para la producción de bioetanol que sean factibles y sostenibles, como: pretratamientos simples, la aplicación de enzimas de última generación para lograr una conversión más eficiente de la materia prima, la optimización de dichos procesos, así como el uso de levaduras autóctonas y diferentes configuraciones de fermentación que mejoren los rendimientos de producción de bioetanol. Para ello el presente trabajo consistió en la caracterización de la composición de almidón en harina de grano y lignocelulósicos en paja de cebada para dos variedades cultivada en el estado de Hidalgo, posteriormente se desarrollaron diseños de optimización de los procesos de hidrólisis enzimática del grano y la paja de cebada, y finalmente se evaluó el uso de los hidrolizados del grano y paja sobre la producción de etanol utilizando las levaduras *Saccharomyces cerevisiae* ITV-01 y *Kluyveromyces marxianus* CECT 10875 en dos sistemas de fermentación en lote y lote alimentado.

1. Antecedentes

1.1 Bioetanol

El etanol es utilizado en grandes cantidades industrialmente, una proporción importante en la producción de etanol se realiza de manera química, es decir, a partir de la conversión catalítica del etileno. En las últimas décadas se ha hecho énfasis en la producción de etanol a partir de recursos renovables como es la biomasa (Ogbonna *et al.*, 2001). Después de la crisis energética de la década de los 70's, varios países generaron estrategias para sustituir gradualmente el consumo de combustibles fósiles, Brasil se convirtió en líder en este aspecto ya que a partir de esa década empezó a producir etanol a partir de biomasa el cual fue utilizado como sustituto parcial o total de combustibles de autos (Worley *et al.*, 1992). La utilización de combustibles obtenidos a partir de fuentes renovables presenta varias ventajas al compararlos con el uso de combustibles de origen fósil (Szulczyk *et al.*, 2010).

La producción de etanol se incrementa día a día en el mundo, de una producción de aproximadamente de 105 mil millones de litros (MmL) en 2010, 114 MmL en 2014 a cerca de 134.5 MmL para 2024 (OCDE/FAO, 2015). El aumento en la demanda de bioetanol está influenciada por varios factores entre ellos los altos precios en la gasolina y petróleo y a políticas públicas enfocadas a disminuir las emisiones de gases invernadero (GEI), con lo cual también se contribuye a los escenarios futuros deseables en cuanto a cambio climático y el desarrollo sostenible propuestos en el Acuerdo de Paris (Organización de las Naciones Unidas ONU-Convención Marco sobre el Cambio Climático, 2015). Los principales objetivos a cumplir con el tratado son 3 principalmente:

- Garantizar el acceso a una energía asequible, segura, sostenible y moderna para todos.
- Promover el crecimiento económico sostenido, inclusivo y sostenible, el empleo pleno y productivo y el trabajo decente para todos.
- Construir infraestructuras resilientes, promover la industrialización inclusiva y sostenible y fomentar la innovación.

El bioetanol ha demostrado ser una alternativa como combustible frente a fuentes fósiles. Sin embargo, en la medida en que el bioetanol provenga de materias primas que no sean cultivos básicos para la alimentación denominado, bioetanol de 1ª generación y particularmente que su origen se encuentre en fuentes de residuos agrícolas lignocelulósicos, esto es, bioetanol de 2ª generación. La clasificación de los biocombustibles de acuerdo a la materia prima de procedencia es la siguiente:

- Biocombustibles de primera generación (1G): Son combustibles de fácil procesamiento, emiten bajas concentraciones de gases de efecto invernadero dando un balance positivo ante dichas emisiones, sin embargo, la mayor desventaja es que desvía los recursos alimenticios hacia la producción de energéticos. Dichos combustibles se generan a partir de una tecnología convencional de fermentación de material rico en almidones, principalmente de cereales como el maíz y trigo, de azúcares simples contenidos en el jugo de caña de azúcar, jugo de remolacha o betabel (Salinas y Gasca, 2009). Países como Estados Unidos y Brasil, que son líderes mundiales en producción de bioetanol, utilizan respectivamente maíz y caña de azúcar como fuente de azúcares fermentables para producir bioetanol vía fermentación alcohólica (Rosillo-Calle y Cortez, 1998). Es importante mencionar que el uso de sustratos utilizados como alimento para humanos o animales para la producción de etanol está restringido en muchos países incluido el nuestro (Mielenz, 2001). Dada esta problemática, en los últimos años se ha optado por la producción de etanol a partir de cultivos que no sean fuente principal de alimentación humana, principalmente cereales secundarios como grano de sorgo, mijo y cebada.
- Biocombustibles de segunda generación 2G: La producción de estos bioenergéticos tienen un nivel de complejidad más elevado con respecto a los de primera generación, sin embargo, la principal ventaja en la producción es la inexistencia de desviaciones de alimentos provenientes de la agricultura, ya que los insumos son únicamente residuos agrícolas y forestales compuestos

principalmente por celulosa, denominados residuos lignocelulósicos. Ejemplo de ellos son el rastrojo de maíz (tallos, hojas y olote), bagazos de caña de azúcar, bagazos de agave, pajas de diferentes cereales, desechos forestales, aserrín, papel, entre otros (Medina *et al.*, 2011). En México esta tecnología tiene un futuro promisorio debido a la gran cantidad de residuos generados. Borja *et al.* (2013), realizaron una estimación del promedio anual de la producción de rastrojos de cuatro cultivos: maíz, sorgo, trigo y cebada, alcanzando 37.5 millones de toneladas, lo que representa el 83.4 % de residuos de cosecha (rastrojos) en el país.

- Biocombustibles de tercera generación: También son conocidos como biocarburantes avanzados proviene de biomasa obtenida de especies no comestibles o desechos, incluyendo en esta categoría a las microalgas. La principal diferencia entre estos y los de segunda generación en la biotecnología utilizada, como técnicas de biología molecular y mejoramientos genéticos para la facilitar la transformación de la biomasa en biocarburantes.

En México, para que el uso de biocombustibles sea benéfico para la sociedad y para el medio ambiente, es necesario garantizar que: contribuya al bienestar económico regional y nacional. Que no impacte indebidamente a la calidad del aire, suelo y agua y finalmente que reduzca la emisión neta de gases efecto invernadero. Por lo cual se sigue trabajando en mejorar la producción de biocombustibles.

1.2 Cebada

La cebada de nombre científico *Hordeum vulgare*, es un cereal perteneciente a la familia de las gramíneas, la cual tiene sus principales centros de diversidad en el centro y suroeste de Asia, al oeste de Norteamérica, al sur de Suramérica y finalmente en el mediterráneo (FAO, 2009). La clasificación taxonómica de la cebada se muestra en la Tabla 1.1.

TABLA 1.1 Clasificación taxonómica de *Hordeum vulgare*

Reino	<i>Plantae</i>
División	<i>Magnoliophyta</i>
Clase	<i>Liliopsida</i>
Orden	<i>Poales</i>
Familia	<i>Poaceae</i> <i>Pooideae</i>
Tribu	<i>Triticeae</i>
Género	<i>Hordeum</i>
Especie	<i>H. vulgare</i>

Fuente: Taxonomy of the genus *Hordeum* and barley (*Hordeum vulgare*) (Blattner, 2018)

Esta planta posee facilidad de adaptación y pocas exigencias en cuanto al clima, por lo que su cultivo se encuentra muy extendido, sin embargo, su desarrollo es óptimo en climas frescos y moderadamente secos, esto le confiere la capacidad de crecer en regiones con altas latitudes y altitudes, ya que es entre los cereales el mejor se adapta a estas condiciones (SAGARPA, 2004).

En cuanto a la temperatura, la cebada tolera muy bien las bajas temperaturas y es capaz de desarrollarse entre los 6° y 20° C, aunque existen variedades invernales las cuales son capaces de tolerar temperaturas de hasta -10°C.

Las condiciones de suelo que requiere la cebada para su desarrollo también son mínimas, su desarrollo es óptimo en suelos fértiles, ligeramente húmedos, que sean poco compactos y con un bajo contenido de nitrógeno, se adapta fácilmente a suelos poco profundos y pedregosos, además posee alta tolerancia a suelos con exceso de salinidad sin que se vea afectado el rendimiento ya que la cebada es el cereal que presenta mayor tolerancia a la salinidad, de igual manera la cebada puede desarrollarse en suelos calizos ya que tiene un amplio margen en cuanto a

valores de pH y necesita que el contenido de potasa y cal sea elevado (SAGARPA, 2004).

1.2.1 Morfología de *Hordeum vulgare*

Morfológicamente hablando la cebada es similar al trigo, sin embargo, presentan algunas diferencias como el color, ya que la cebada presenta un color verde ligeramente más claro que el trigo, a continuación se describe la morfología típica de esta gramínea y se observa en la Figura 1.1.

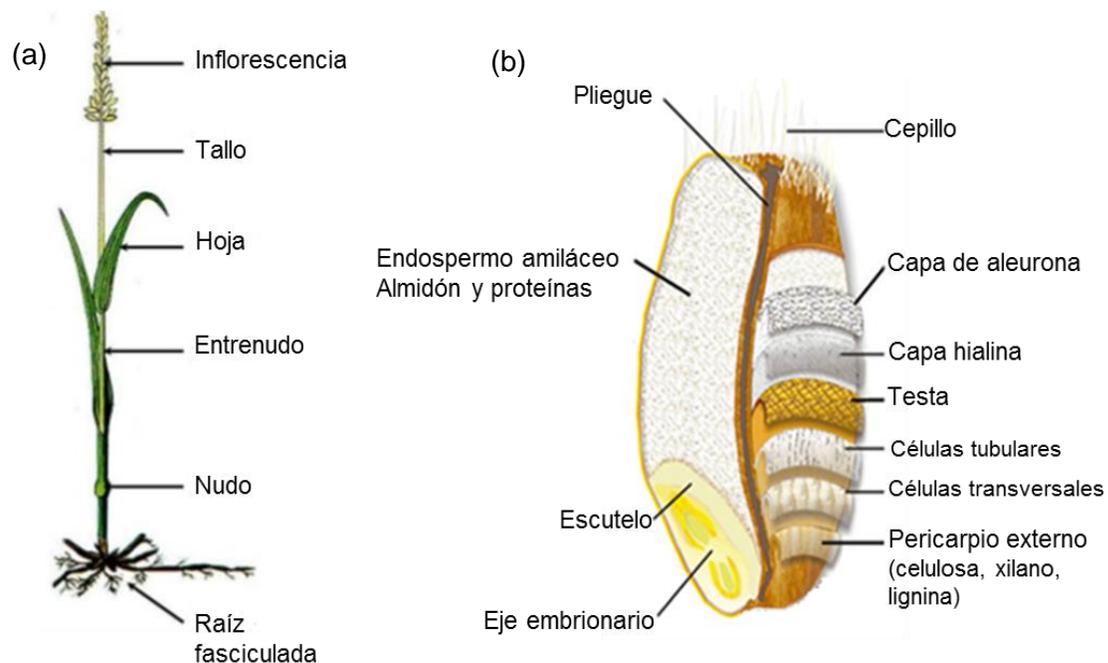


FIGURA 1.1 (a) Estructura de la planta de cebada y (b) estructura interna del grano de cebada (Knudsen, 2014).

- **Espiguillas:** Las cebadas cultivadas se distinguen por el número de espiguillas que quedan en cada diente del raquis. tendremos la cebada de dos

carreras (*Hordeum distichum*); si aborta la espiguilla central, quedando las dos espiguillas laterales, tendremos la cebada de cuatro carreras (*Hordeum tetrastichum*); si se desarrollan las tres espiguillas tendremos la cebada de seis carreras (*Hordeum hexastichum*).

- **Hojas:** la cebada es una planta de hojas estrechas y color verde claro. La planta de cebada suele tener un color verde más claro que el del trigo y en los primeros estadios de su desarrollo la planta de trigo suele ser más erguida.
- **Raíces:** el sistema radicular es fasciculado, fibroso y alcanza poca profundidad en comparación con el de otros cereales. Se estima que un 60% del peso de las raíces se encuentra en los primeros 25 cm del suelo y que las raíces apenas alcanzan 1.20 m. de profundidad.
- **Tallo:** el tallo es erecto, grueso, formado por unos seis u ocho entrenudos, los cuales son más anchos en la parte central que en los extremos junto a los nudos. La altura de los tallos depende de las variedades del suelo y las condiciones climáticas, regularmente la longitud del tallo oscila entre 0.5 y un metro.
- **Flores:** las flores tienen tres estambres y un pistilo de dos estigmas. Es autógena. Las flores abren después de haberse realizado la fecundación, lo que tiene importancia para la conservación de los caracteres de una variedad determinada.
- **Granos:** Este presenta una forma oval y alargada, el tamaño depende de las condiciones ambientales, la longitud que presentan los granos va desde los 6 hasta los 9.5 mm; ancho desde 2.5 hasta 3 mm y finalmente un peso específico aproximado de 67 Kg/m³ (el peso de mil granos varía de 45 a 55 g). En cuanto a la composición interna del grano, este está conformado por dos compartimientos especiales: el endospermo y el embrión como se aprecia en la Figura 1.1 (ambos compartimientos se encuentran rodeados por capas externas, testa y pericarpio) (Callejo, 2002). El endospermo es la sección del grano donde se almacena principalmente almidón y en menor cantidad nitrógeno, el cual se encuentra en forma de enzimas y proteínas de reserva, a

su vez el endospermo está cubierto por una capa llamada aleurona, y ambos se encuentran cubiertos por carbohidratos no amiláceos como arabinosanos, β -glucanos y pocas unidades de celulosa (MacGregor y Batty, 1996). Finalmente el embrión se desarrolla durante la germinación y requiere de nutrientes como el almidón y algunas proteínas, dentro del embrión se forman las enzimas necesarias para degradar los compuestos necesarios y de esta manera ser aprovechados (Homsey, 1999).

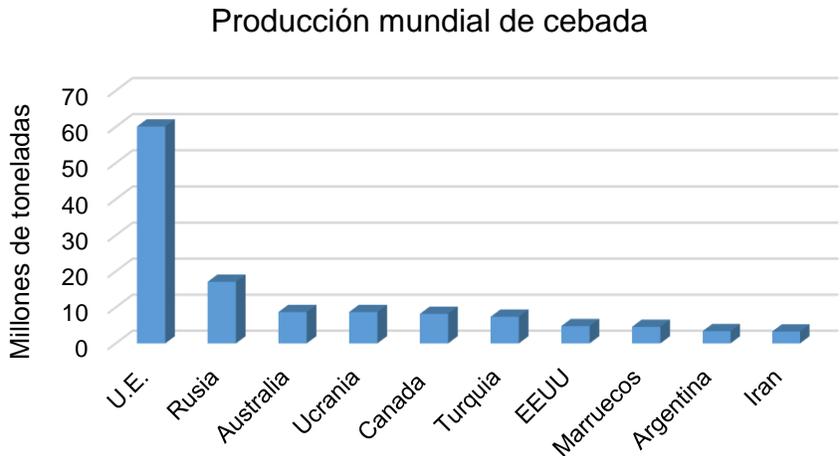
1.2.2 Panorama internacional y nacional

La cebada es el cuarto cereal más producido a nivel mundial solo después del maíz, trigo y arroz. Hasta el año 2016 se tuvo una producción mundial de este cereal que asciende a 145.8 millones de toneladas, siendo la unión europea la que lidera el ranking de producción ya que genera cerca de 60 millones de toneladas anuales, lo que se traduce al 42 % de la producción global abarcando así el 32 % de las exportaciones mundiales, seguida por Rusia, Australia, Canadá, Estados Unidos y Argentina, como se muestra en la Figura 1.2a. Por otro lado las importaciones de cebada están lideradas por Arabia Saudita quien hasta el 2016 reportó la importación de 8 millones de toneladas, seguida por China, Irán y Japón (DEE, 2016).

En cuanto al mercado nacional también es el cuarto cereal más producido, hasta el 2016 de acuerdo a los reportes del Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP) de la SAGARPA, en el país se produjeron cerca de 965 mil toneladas de cebada grano, dicha producción se realiza en 16 entidades del país, sin embargo, la mayor producción se concentra en tres zonas destacadas como se muestra en la Figura 1.2b, Zacatecas y Durango en el centro-norte, el Bajío, que comprende los estados de Guanajuato, Michoacán, Querétaro y finalmente en el altiplano central donde se encuentran los estados de México, Puebla, Tlaxcala e Hidalgo, siendo este último el que registra casi el 30 % de la producción nacional total. En la zona del altiplano Hidalguense, que abarca los municipios Apan, Tepeapulco, Almoloya, Cuautepec de Hinojosa, Emiliano Zapata y Tlanalapa se

genera un cuarto de la producción nacional de cebada maltera lo que se traduce en 290 mil toneladas de dicho grano (SIAP, 2015).

(a)



(b)

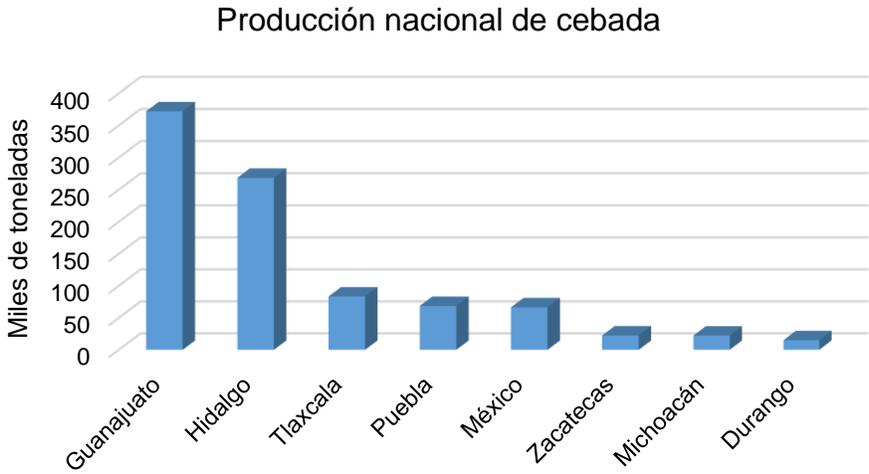


FIGURA 1.2 Panorama (a) mundial y (b) nacional de la producción de cebada para el año 2016 (DEE, 2016; SIAP, 2015).

1.2.3 Usos y comercialización del cultivo de cebada

El cultivo de cebada tiene dos usos principales: el primero es como alimento para ganado o forraje y el segundo es para la producción de malta y alimentación humana.

Forraje: A nivel mundial, el 85 % de la cebada producida es utilizada como forraje para animales, principalmente ovinos, porcinos y aves (Akar *et al.*, 2004; OECD, 2004). En la mayoría de los casos el grano de cebada es convertido en hojuelas, harinas o convertida en pienso con la finalidad de mejorar la digestibilidad de esta (OECD, 2004). Sin embargo, se considera que la cebada 2013 posee un valor nutritivo más bajo que el trigo, esto debido a su alto contenido en fibra lo que hace que la energía de los hidratos de carbono no este fácilmente disponible. Aunque la cebada presenta un mayor contenido de proteína que el maíz, la dieta de los animales usualmente necesita ser suplementada con otras fuentes de proteína debido a la cantidad y calidad de las proteínas del grano de cebada (OECD, 2004). En México la paja de cebada también es utilizada como forraje o pastura para ganado, pero al igual que en ejemplo anterior esta debe ser suplementada ya que por sí sola posee un escaso o nulo valor nutricional, debido a esta desventaja la paja es destinada únicamente para formar echaderos o camas para cualquier tipo de ganado (SAGARPA, 2013).

Alimentación humana: El segundo uso más importante de la cebada es la fabricación de malta, la cual es usada principalmente para la elaboración de cerveza aunque también es usada para otros licores como el Whisky. Cuando la cebada es utilizada para malta, regularmente se prefiere usar las variedades de dos carreras ya que estas muestran una mayor uniformidad en la germinación, necesitan menos remojo y contienen una menor cantidad de proteína, aunque en la actualidad ha incrementado el uso de malta proveniente de cebada de seis carreras, principalmente en algunas variedades de cerveza americana.

Para la elaboración de malta de cualquier tipo de cebada, los granos son remojados en agua, bajo condiciones controladas, después de cierto periodo de tiempo el grano germina y sometido a un proceso de secado en horno, limpieza y molienda, después de esto la malta formada puede ser usada o almacenada por algún tiempo. La malta requiere de procesos más complejos como la fermentación y destilación para convertirse en productos deseables de alto valor agregado como la cerveza y el whisky. Cabe destacar que los residuos de cebada malteada y malta fermentada producidos en las industrias del ramo son destinados a la dieta animal (Akar *et al.*, 2004).

Finalmente y en menos cantidad la malta de cebada también es utilizada como aditivo en algunos alimentos como galletas, panes, pasteles y postres.

Como último uso de la cebada y menos frecuente se encuentra la elaboración de alimentos como papillas y algunos panes que son ampliamente consumidos en el norte de África y algunas partes de Asia, los alimentos a base de cebada son consumidos principalmente en regiones donde otros cereales son difíciles de cultivar ya sea por la altitud de la región o la salinidad del suelo (FAO, 2002). En la actualidad este cereal ha incursionado en la industria alimentaria aunque en menor medida que el trigo y el arroz, se tienen algunos productos como alimento para bebés, alimentos de dieta y espesantes, complementos en las pastas de harina, aglutinantes y endulzantes (principalmente el almidón), también se elaboran harinas y hojuelas a base de grano perlado (grano sin cascarilla) (OECD, 2004).

La cebada en México tiene dos principales destinos: la industria pecuaria nacional como grano forrajero y la industria cervecera, la cual demanda variedades con calidad maltera y alto rendimiento industrial pues de no ser así el grano es rechazado y se convierte en grano forrajero (Vázquez, 2013).

En la industria cervecera nacional se identifican dos grandes grupos: la Cervecería Modelo y la cervecería Cuauhtémoc Moctezuma. Las cuales integran un fuerte duopolio. Ambas empresas crearon a una entidad denominada Impulsora Agrícola para asegurar un abasto nacional de cebada de alta calidad, siendo este organismo

el que fija los precios de compra y venta. La Impulsora Agrícola establece contratos con productores en varias zonas del país donde se establecen las condiciones de abasto tanto en volumen como calidad. La cebada producida fuera de contrato con la Impulsora Agrícola o que no cumple la calidad que demanda la industria cervecera termina como grano forrajero para el sector pecuario. Actualmente el precio que fijo Impulsora Agrícola por tonelada de cebada para el 2017 es de \$ 4,900, sin embargo, cuando el grano es rechazado los productores se ven en la necesidad de almacenarlo o comercializarlo con acaparadores y bodegueros que ofrecen un precio máximo que oscila entre los \$ 4,200 y \$ 4,500 por tonelada y luego estos lo revenden a un mejor precio.

Aunado a esto, la empresa Impulsora Agrícola S.A de C.V. se encarga de procesar el grano hasta obtener la malta que estará destinada para la producción nacional de cerveza o para exportación, los precios en los que la empresa oferta la malta van desde los \$ 7,000 (Impulsora Agrícola Apan, 2016) hasta los \$ 17,500 (Gpo. Modelo, 2016) por tonelada dependiendo de la calidad de la misma, dándole un margen de ganancia a la empresa de un 100 a un 400 %, mientras que los productores tienen un margen pequeño de ganancia.

1.3 Material amiláceo presente en grano de cebada

1.3.1 Almidón

El almidón es el polímero de reserva más abundante en la naturaleza después de la celulosa, este es sintetizado por plantas superiores y constituye su principal fuente de energía, aunque no la única. Aunque el contenido de almidón varía según la fuente de obtención, la más importante son los cereales como el maíz, trigo, arroz y cebada con un contenido aproximado de 30-80 %, seguido de las leguminosas como frijol, haba y chicharos con un 25-50 % y finalmente los tubérculos como papa, tapioca y yuca en los cuales el almidón representa el 60-90 % de la materia seca (Bernal y Martínez, 2006).

En cuanto a su composición química, el almidón es un polisacárido cristalino formado por D-gluopiranosas unidas entre sí por enlaces glucosídicos. Las glucopiranosas están ordenadas en dos principales polímeros de diferentes estructuras: amilosa y amilopectina, estos se diferencian por las uniones que se presentan dentro del gránulo de almidón y representa entre el 98-99 % del peso seco. La proporción de estos polímeros dentro del almidón varía según la fuente botánica confiriéndole propiedades fisicoquímicas y funcionales únicas. A pesar de que el almidón presenta una química simple, las moléculas que lo conforman son variables y complejas como se describen a continuación (Cowieson, 2005; Tester *et al.*, 2004).

1.3.2 Amilosa

Es un polímero de cadena lineal insoluble en agua que en la mayoría de los almidones se encuentra en una proporción de entre el 20 y 30 %, formado por un número indeterminado de D-glucosa unidas por enlaces $\alpha(1-4)$ glucosídico (Figura 1.3) que representan un 99 % de su estructura ya que en también se han encontrado en mucho menor proporción algunas ramificaciones unidas por enlaces $\alpha(1-6)$, estas ramificaciones se encuentran de manera espaciada y no son frecuentes (Buléon *et al.* 1998).

Posee una masa molar de 10^5 - 10^6 kDa, un grado de polimerización (unidades de glucosa que se encuentran unidas en una cadena) de 324-4920 cuenta con alrededor de 9 a 20 puntos de ramificación lo que equivale a 3-11 cadenas por molécula (Tester *et al.*, 2004).

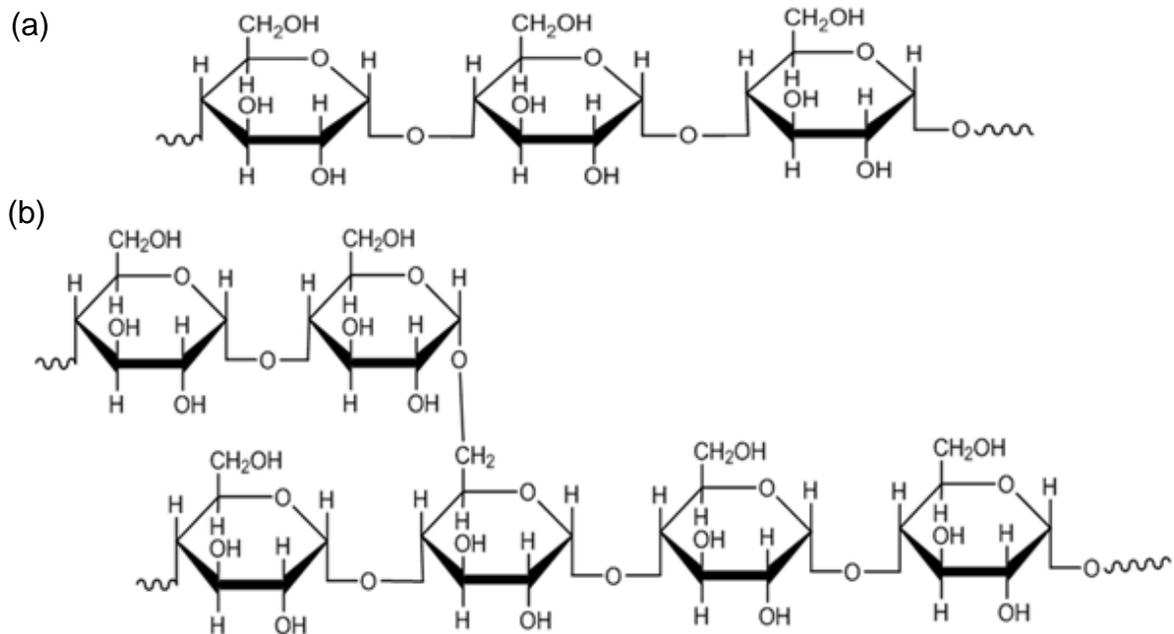


FIGURA 1.3 Estructura química de la (a) amilosa y (b) amilopectina (Amaya-Pinos, 2019)

Debido a la gran longitud de la cadena de amilosa así como su flexibilidad y linealidad, dicha cadena puede enrollarse formando una estructura helicoidal con seis unidades de D-glucopiranososa por giro y dichos giros se presentan de entre 10 a 15 veces por región, dentro de la estructura helicoidal formada se presenta un entorno hidrofóbico capaz de formar complejos con yodo, alcoholes o algunos ácidos orgánicos.

De acuerdo al contenido de amilosa, los almidones se pueden clasificar en tres principales grupos: el primero es el de los almidones cerosos o waxy los cuales poseen muy poca amilosa, alrededor de 1-2 %; los almidones normales que contienen entre 17-24 % de amilosa y finalmente los altos en amilosa que contienen 70 % o más de este polímero (Eastman y Moore, 1984).

1.3.3 Amilopectina

La amilopectina al contrario que la amilosa es un polímero semicristalino y altamente ramificado y ligeramente soluble en agua, formado aproximadamente por 595,238 de D-glucopiranosas las cuales se encuentran unidas mediante enlaces $\alpha(1-4)$ que representan un 92-96 %, los puntos de ramificación se encuentran unidos mediante enlaces $\alpha(1-6)$ representando un 5-6 % de la estructura como se aprecia en la figura 1.3. Las ramificaciones se hayan aproximadamente cada 15 o 25 unidades de D-glucopiranosas (Tang *et al.*, 2002).

El peso molecular de la amilopectina es mucho mayor que el de la amilosa, este oscila entre 10^7-10^9 kDa (Thomson, 2000). Este polisacárido está compuesto por tres tipos de cadenas, cadenas A o cadenas cortas con un grado de polimerización de 15 a 20, cadenas B o cadenas largas con un grado de polimerización entre 40-50 y finalmente una cadena C o grupo reductor (Tester *et al.*, 2004).

La amilopectina generalmente es el principal componente en la mayoría de los almidones ya que representa entre el 70-80 %, esta composición llega a variar de acuerdo al origen botánico del almidón, en ocasiones la amilopectina se encuentra en una proporción del 98-99 % como en los almidones tipo cerosos o waxy (Eerlingen y Delcour, 1995).

Una vez que se conoce la estructura del almidón y debido a las características que estas le confieren, el almidón ha sido ampliamente utilizado en la industria, en la actualidad se tienen cuatro usos principales (Delville *et al.*, 2002; Bernal y Martínez, 2006).

- Conferir características organolépticas a los alimentos como textura y consistencia (espesante), la cual es conferida por sus componentes de alto peso molecular anteriormente descritos.
- Es utilizado en la alimentación humana y animal, ya que es la fuente de energía más importante, representando el 80 % de la ingesta calórica mundial. También es utilizado en la elaboración de edulcorantes de alta intensidad y

sustitutos de grasas ya que estos productos son utilizados en la elaboración de alimentos bajos en calorías.

- En la industria el almidón se ha utilizado para la fabricación de pegamentos, pinturas, espesantes y texturizantes en la industria papelera y textil. De igual manera se ha utilizado para la fabricación de plásticos biodegradables y material encapsulante.
- Y por último pero no menos importante y quizá uno de las aplicaciones más relevantes en los últimos años el almidón se ha utilizado para la elaboración de bioenergéticos, específicamente, bioteanol de primera generación, el cual es el objetivo del presente trabajo.

1.3.4 Producción de etanol a partir de materias primas que contienen almidón.

El almidón se puede transformar en glucosa fermentable por dos vías la hidrólisis ácida y la hidrólisis enzimática, sin embargo, la hidrólisis enzimática posee ventajas sobre la hidrólisis ácida, ya que en la enzimática no hay formación de subproductos y se reduce la demanda energética del proceso ya que no se requiere el uso de grandes presiones y elevadas temperaturas (Castaño y Mejía, 2008).

El proceso enzimático consta de dos etapas consecutivas, denominadas licuefacción y sacarificación. En la primera etapa se lleva a cabo una primera hidrólisis incompleta del almidón y como resultado se obtienen oligosacáridos, en la segunda etapa los oligosacáridos obtenidos en la primera etapa son hidrolizados completamente y como resultado se obtienen unidades de glucosa, dichas etapas se llevan a cabo por las enzimas: amilasas y glucosidasas respectivamente, las cuales se describen a continuación (Castaño y Mejía, 2008).

1.3.4.1 α -amilasa

Las α -amilasas, específicamente las endoamilasas (EC 3.2.1.1) son las enzimas encargadas de catalizar la hidrólisis de los enlaces glucosídicos α -1-4 presentes en los polisacáridos de alto peso molecular como el almidón o el glucógeno (Figura 1.4). A la acción de esta enzima también se le conoce como licuefacción ya que disminuye la viscosidad del almidón rompiendo de manera aleatoria los enlaces glucosídicos y liberando oligosacáridos de menor peso molecular denominados dextrinas (amilodextrinas y maltodextrinas) y en menor cantidad se libera maltosa (Pandey *et al.*, 2016).

Las α -amilasas se encuentran ampliamente distribuidas en plantas animales y microorganismos, sin embargo, las enzimas provenientes de fuentes microbianas como bacterias y hongos son las que poseen mayor aplicación en procesos a nivel industrial (Sivaramakrishnan *et al.*, 2007). Debido al corto periodo de crecimiento de los microorganismos, su diversidad bioquímica y fácil extracción y manipulación. Los géneros más representativos de microorganismos productores de α -amilasas son: bacterianos como *Bacillus subtilis*, *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus licheniformis*, *Clostridium sp*, entre otras y fúngicos como *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus oryzae*, entre otros (Jeon *et al.*, 2014).

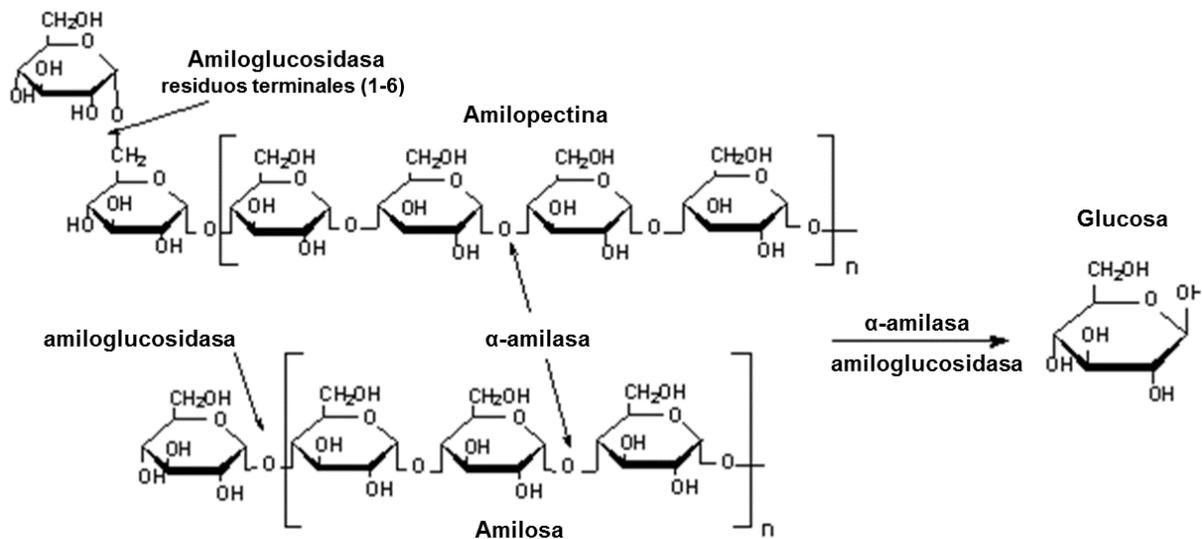


FIGURA 1.4 Mecanismo de acción de las amilasas sobre la estructura del almidón (Adaptado de <https://starchhydrolysis.weebly.com/amylase-function.html>)

Aunque la fuente de las amilasas puede ser variada, existen factores comunes que influyen en la actividad de dichas enzimas, los más importantes son los siguientes:

- **Temperatura:** Esta está directamente relacionada con la fuente de obtención de la enzima y posee un amplio rango de temperaturas que va desde los 25 hasta los 90 °C, sin embargo, se ha encontrado que la temperatura óptima de estas enzimas se encuentra entre los 55 y 65 °C además a esta temperatura se tiene una mayor estabilidad y el tiempo de vida media es mucho mayor que el que se tiene a 80 o 90 °C (Acourene *et al.*, 2013).
- **pH:** las amilasas trabajan en un rango de pH que va desde 5.5 hasta 7, el control de pH mediante el uso de soluciones reguladoras es un punto clave en la hidrólisis (Eratt *et al.*, 1984).
- **Iones metálicos:** La mayoría de las α-amilasas son metalodependientes las cuales requieren iones como Mg²⁺, Mn²⁺, Zn²⁺ y principalmente Ca²⁺ el cual

juega un papel importante para su actividad, integridad estructural y estabilidad (Wu *et al.*, 1999).

- Surfactantes: La adición de estos confiere una mayor estabilidad y por ende mejora la actividad enzimática, algunos de los surfactantes mayormente utilizados con las amilasas son el Tween 40, Tween 80 y Triton X-100 (Pandey *et al.*, 20016).

Debido a las características y funcionalidad de las amilasas poseen un amplio rango de aplicaciones biotecnológicas, entre las que destacan la fabricación de detergentes, el uso para el desencolado textil, aplicaciones en medicina y química clínica, en la industria papelera, en la licuefacción y sacarificación de almidones, fabricación de pan, pastas y harinas, por último y más relevante en las últimas décadas la producción de alcohol (Kuddus *et al.*, 2010; Pandey *et al.*, 2016).

Dentro de este último rubro se han reportado algunos trabajos utilizando enzimas amilasas para la sacarificación de sustratos ricos en almidón como harina de cebada con la finalidad de maximizar la concentración de glucosa y poder ser fermentados a etanol, por ejemplo Nghiem *et al.*, (2010) llevaron a cabo una sacarificación del 99% de harina de cebada utilizando 4 enzimas comerciales durante 4 horas a 90 °C, la α -amilasas SPEZYME XTRA, la glucoamilasa FERMENZYME L-400 y dos β -glucanasas OPTIMASH BG, OPTIMASH TBG, posteriormente se llevó a cabo la fermentación de los azúcares obteniendo 0.4 L/kg de etanol con una efectividad del 91 %. Espitia *et al.* (2010) realizaron la sacarificación de cebada no malteada para la producción de cerveza con dos amilasas comerciales α -amilasa Multifect AA 21L y β -amilasa Multifect AA 23L durante 8 h a 95 y 70 °C respectivamente, logrando un rendimiento de hidrólisis del 89 %, después de llevar a cabo la fermentación se obtuvo una mejora del 25 % en la producción de etanol utilizando estas enzimas. Divate *et al.* (2013) reportaron una buena producción de etanol (46 g/g⁻¹) utilizando únicamente el β -glucano del grano de cebada hidrolizado con β -glucanasas y una celulasa Accellerase 1000, sin embargo, recomiendan usar el grano completo y amilasas para aumentar la producción de etanol.

1.3.4.2 α -glucosidasa

Basadas en el mecanismo empleado para la hidrólisis del almidón las amilasas se clasifican en tres tipos: α -amilasas (descritas en la sección anterior), β -amilasa que remueve dos moléculas de glucosa a la vez generando maltosa y finalmente las amiloglucosidasas las cuales actúan sobre los extremos no reductores de las cadenas liberando unidades de glucosa (Pandey *et al.*, 2016).

Las α -glucosidasas (EC3.2.1.20) son un típico grupo de carbohidrasas, las cuales tienen como principal función hidrolizar los enlaces α -glucosídicos de los extremos no reductores de los oligosacáridos y polisacáridos formados durante la licuefacción y la liberación inmediata de glucosa como se muestra en la Figura 1.4 (Kato *et al.*, 2001). Estas enzimas a su vez se clasifican en tres tipos: Tipo I las cuales hidrolizan aril glucósidos como el *p*-nitrofenil- α -D-glucopiranosido más rápido que los malto-oligosacáridos. Las tipo II que son enzimas más activas en maltosa y poseen baja actividad en aril-glucosídicos y finalmente las enzimas Tipo III que son parecidas a las Tipo II pero hidrolizan oligosacáridos y almidón de manera similar (da Silva *et al.*, 2009).

Las glucosidasas al igual que las amilasas son producidas por un gran número de microorganismos, principalmente bacterias y hongos entre los que destacan los *Aspergillus niger* y *Bacillus stearothermophilus* (Marín *et al.*, 2006).

Como en la mayoría de las enzimas, el pH y temperatura son factores importantes que influyen en la actividad enzimática, en el caso de las α -glucosidasas el rango de temperatura va de los 40 a los 65 °C, siendo la temperatura óptima de 55 a 60 °C ya que en algunos casos la estabilidad y la vida media de la enzima disminuyen de manera considerable a los 65 °C. En cuanto al pH, se ha reportado que el pH óptimo es de 5.5, sin embargo, la enzima retiene un 75 % de actividad en un rango de pH que va desde 4.5 a 6. Con respecto a los iones, da Silva reporto que los iones de Ca^{+2} , Ba^{+2} , Na , Mn^{+2} , Mg^{+2} , Cu^{+2} , Zn^{+2} y K no tienen ningún efecto en la actividad, en cambio la enzima se ve inhibida en presencia de iones como Ag^{+2} y Fe^{+2} (da Silva *et al.*, 2009).

1.4 Material lignocelulósico de paja de cebada

Al año se producen cerca de 490 mil toneladas de paja de cebada, considerada como desecho agrícola y pobremente aprovechada, la paja como toda biomasa vegetal está compuesta por tres principales polímeros básicos: 33 % de celulosa, 20.3 % de hemicelulosa y 16 % de lignina.

Desde las plantas más complejas hasta las más simples poseen en su estructura estos tres componentes como se muestra en la Figura 1.5. Aunque también existen otros compuestos que están en menor proporción como son proteínas, pectinas y almidones, regularmente estos compuestos están entremezclados con los tres principales componentes mencionados y descritos a continuación (Wyman *et al.*, 2005).

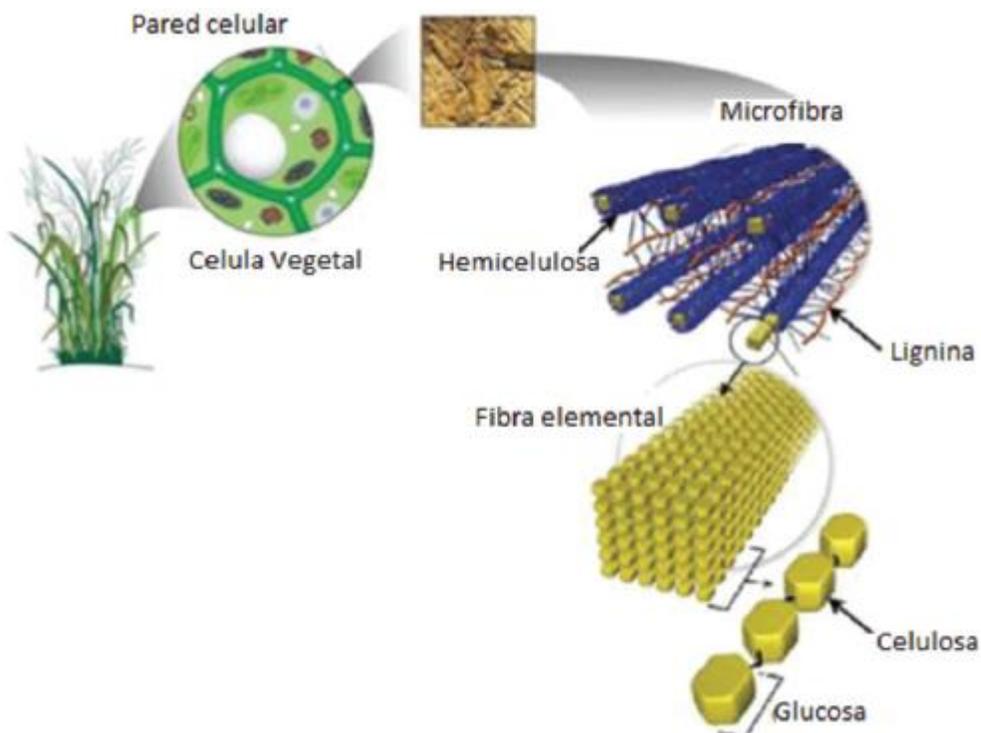


FIGURA 1.5 Composición y organización del material lignocelulósico (Bayona-Ayala, 2012)

La celulosa es el compuesto orgánico más abundante en el planeta, es el homopolímero lineal más importante de las plantas, ya que conforma entre el 40-50 % de su pared celular (Wainwright, 1995). Estructuralmente una molécula de celulosa llega a medir 5.000 nm y está formada aproximadamente por 10,000 unidades o monómeros de glucosa unidos por enlaces β 1-4 con regiones altamente cristalinas y regiones amorfas (no cristalinas) lo que le confiere gran resistencia y la hace insoluble en agua (Castro-Martínez *et al.*, 2009).

La hemicelulosa también se encuentra presente en la pared celular de las plantas y en ellas forma un gel acuoso en el cual están embebidas las microfibrillas de celulosa (Cunningham, 1994). La hemicelulosa es un heteropolisacárido formado por pentosas principalmente la D-xilosa y L-arabinosa y de hexosas como D-glucosa, D-manosa y D-galactosa. A diferencia de la celulosa, la cual tiene siempre la misma estructura y composición, las hemicelulosas pueden variar entre especies de plantas. Las cadenas poliméricas individuales no son lineales como en la celulosa, son cortas, poseen ramificaciones y contienen entre 50 y 100 unidades monoméricas de azúcares, debido a esto no tienen estructura regular y es fácilmente hidrolizada. De los tres principales componentes de las paredes celulares, la hemicelulosa es la de más fácil degradación ya sea por métodos químicos o biológicos (Cunningham, 1994).

Por último pero no menos importante tenemos la lignina, que después de la celulosa, es el mayor componente de la materia vegetal y la forma más abundante de material aromático en la biósfera. La madera y otros tejidos vasculares contienen alrededor del 20-30 % de lignina (Dávila y Vázquez, 2001). La mayor parte de ésta se encuentra dentro de las paredes celulares, entremezclada con las hemicelulosas y formando una matriz que rodea las ordenadas microfibrillas de celulosa (Figura 1.5). Este compuesto provee de rigidez a las plantas superiores ya que actúa como pegamento entre las fibras de celulosa (Kirk y Farrell, 1987). Además, protege a los carbohidratos fácilmente degradables (celulosa y hemicelulosa) de la hidrólisis enzimática microbiana (Dávila y Vázquez, 2001). Químicamente este polímero es heterogéneo, amorfo y altamente ramificado. formado por subunidades de

compuestos aromáticos insolubles en agua como alcohol p-cumarílico, alcohol coniferílico, alcohol sinapílico, coniferaldehído, alcohol dihidroconiferílico, alcohol coniferil-9-acetato, alcohol 5-hidroxiconiferílico (Gellerstedt y Henrinksson, 2008).

En la Tabla 1.2 se muestran algunos ejemplos de trabajos en los que se ha caracterizado la composición lignocelulósica de la paja de cebada y otros residuos agroindustriales de interés en la producción de etanol de segunda generación. En todos ellos se destaca su rica composición en celulosa y hemicelulosa la cual alcanza un total de entre 60 y 80 % de carbohidratos hidrolizables y fermentables.

Tabla 1.2 Contenido lignocelulósico presente en paja de cebada y otros residuos agroindustriales

Referencia	Sustrato	Celulosa (%)	Hemicelulosa (%)	Lignina (%)
Sun <i>et al.</i> 2011	Paja de cebada	37.5	37.1	15.8
Panagiotopoulos <i>et al.</i> 2012	Paja de cebada	34.2	13.2	15.9
Han <i>et al.</i> 2013	Paja de cebada	35.6	16.8	23.1
Salapa <i>et al.</i> 2018	Paja de cebada	34.8	19.4	19.2
Zhao <i>et al.</i> 2018	Maíz	39	25	18
Moreira <i>et al.</i> 2018	Caña	33-48	30-35	11-20
Tomás – Pejó <i>et al.</i> 2017	Trigo	40	26	18

Así también se puede observar la variabilidad de la composición lignocelulósica de estos materiales, aún siendo de la misma variedad como se puede apreciar en el caso de la paja de cebada, valores reportados por diversos autores.

1.5 Pretratamientos del material lignocelulósico

Para aprovechar por completo los carbohidratos presentes en la biomasa y obtener cualquier producto de interés como el bioetanol, es necesario transformarlos de compuestos complejos hasta compuestos muy simples como son los monosacáridos, por eso es necesario someter la biomasa a algún pretratamiento efectivo que se capaz de disminuir el tamaño de partícula, remover la lignina, hidrolizar la hemicelulosa y reducir la cristalinidad de la celulosa, mejorando la liberación de azúcares y evitando la pérdida de estos, la generación de compuestos inhibitorios o tóxicos que podrían afectar futuros procesos como una fermentación por ejemplo. Para dicho fin se han diseñado diversos procesos (Sun y Cheng, 2002). Existen cuatro métodos principales para el pretratamiento del material lignocelulósicos; métodos físicos, métodos químicos, métodos fisicoquímicos y métodos biológicos, en la Tabla 1.2 se describen las ventajas y desventajas de los principales pretratamientos. (Carreón *et al.*, 2009). Estos cuatro métodos poseen diversos tratamientos que se describen brevemente en la Tabla 1.2.

Una opción para mejorar los rendimientos de azúcares es la de diseñar procesos combinados de hidrólisis de residuos lignocelulósicos utilizando hidrólisis química y biológica con esto se puede llegar a evitar la formación de compuestos inhibitorios de la fermentación y de la actividad enzimática mejorando considerablemente la liberación de azúcares fermentables.

TABLA 1.3 Métodos de pretratamientos para residuos lignocelulósicos y sus principales ventajas y desventajas.

Método de Pretratamiento	Proceso de Pretratamiento	Ventajas	Limitaciones y desventajas
Pretratamientos físicos	Trituración mecánica	Reduce la cristalinidad de la celulosa e incrementa el área de superficie	Requiere energía por lo general superior a la inherente de la biomasa
	Pirólisis	Genera gas y productos líquidos	Altas temperaturas; producción de ceniza
Pretratamientos químicos	Ozonólisis	Reduce el contenido de lignina; no se producen sustancias tóxicas	Alto costo; se requiere ozono en grandes cantidades
	Ácido diluido	Hidroliza la hemicelulosa a xilosa y otros azúcares, altera la estructura de la lignina	Alto costo; corrosión de equipos; formación de inhibidores
	Hidrólisis alcalina	Remueve la lignina, incrementa el área de superficie de la biomasa	Largos tiempos de residencia; no se recuperan las sales formadas y se mezclan con la biomasa; no es efectivo en maderas blandas
	Peróxido alcalino	Solubiliza la lignina y no produce inhibidores	El peróxido de hidrógeno se descompone a altas temperaturas, causando un decremento en la solubilización de la lignina y hemicelulosa
Pretratamientos físico-químicos	Organosolventes	Degrada la hemicelulosa y transforma la lignina, tiempo corto de residencia y costo efectivo	Alto costo; los solventes necesitan ser recuperados y reciclados
	Explosión con vapor	Aumenta la superficie de la biomasa; elimina hemicelulosa y lignina; no se forman inhibidores	Descompone una porción de la fracción del xilano; incompleta destrucción de la lignina; formación de compuestos tóxicos
	AFEX	Degrada hemicelulosa y lignina; se requiere poca energía	No es efectivo para biomasa con alto contenido de lignina; el amoníaco es caro y venenoso
Pretratamientos biológicos	Deslignificación fúngica y/o enzimática	Es altamente específica, degrada hemicelulosa y lignina, no se forman inhibidores	Velocidad de reacción lenta; pérdida de celulosa

Fuente: Etanol Carburante (Carreón *et al.*, 2009).

De los métodos anteriormente mencionados, generalmente, es más utilizada la hidrólisis química donde es común el uso de soluciones diluidas de ácido sulfúrico las cuales presentan ventajas y desventajas. Dentro de las ventajas se pueden mencionar los bajos costos de hidrólisis y los cortos tiempos de hidrólisis. Dentro de las desventajas están la generación de productos inhibidores de la fermentación y los bajos rendimientos de azúcares. Schneider *et al.*, (2016) evaluaron 10 ácidos diferentes, tiempos y temperatura de hidrólisis para lograr la despolimerización de paja de cebada. Teniendo como resultado que el ácido sulfúrico durante 60 min a 130 °C ofrece el mejor resultado, obteniendo 45 % de azúcares reductores, sin embargo, también existe la formación de compuestos inhibitorios como el furfural e hidroximetilfurfural. Aguilar y Canizales (2004) optimizaron la hidrólisis ácida de cascarilla de cebada encontrando que las mejores condiciones son utilizar ácido sulfúrico al 1 % durante 210 minutos a una temperatura de 110 °C obteniendo un porcentaje de conversión de 70 %. Yang *et al.*, (2015) propusieron el mejoramiento de la producción de azúcares de paja de cebada utilizando ácido sulfúrico al 2 % durante 1 h a 121 °C y una posterior hidrólisis enzimática obteniendo 60 % de glucosa y 70.2 % de xilosa.

1.5.1 Pretratamiento peróxido-alcálico

Los pretratamientos alcalinos son altamente efectivos en la deslignificación del material lignocelulósico (Chen, 2008). La principal función del pretratamiento alcalino consiste en reducir la cristalinidad de la celulosa, disociar el complejo celulosa-lignina, aumentar el área superficial y finalmente disminuir la presencia de compuestos que interfieren en la hidrólisis enzimática y fermentación (Pernalet *et al.*, 2008).

El reactivo más utilizado en esta etapa ha sido el hidróxido de sodio ya que tiene el efecto particular de incrementar el área superficial debido al hinchamiento del material y la disolución de la lignina, además este tratamiento no requiere de condiciones extremas de operación como temperaturas y presiones elevadas.

Una variante del método alcalino ha sido combinar este con sustancias oxidativas como el peróxido de hidrógeno. El pretratamiento con peróxido de hidrógeno en un ambiente alcalino o combinado con un pretratamiento alcalino es un tratamiento efectivo para la lignocelulosa. En un ambiente alcalino débil, el peróxido de hidrógeno solo actúa selectivamente en los compuestos fenólicos originados por la incisión parcial de la lignina, causando su degradación sin afectar la fracción celulósica, solo se ve afectada la fracción de lignina y en menor proporción la hemicelulosa.

Como se mencionó anteriormente el pretratamiento alcalino posee ciertas ventajas, como el no necesitar condiciones extremas de operación ni generar compuestos inhibitorios y facilitar futuras hidrólisis enzimáticas y fermentaciones, sin la necesidad de someter el material lignocelulósico a un previo tratamiento ácido. Han *et al.*, (2013) propusieron la producción de etanol a partir de paja de cebada utilizando únicamente un pretratamiento alcalino con NaOH 0.58 M a 86 °C durante 15 min para posteriormente pasar a una etapa de sacarificación con enzimas comerciales y fermentación, obteniendo una concentración máxima de 46 g/L de etanol.

1.6 Hidrólisis enzimática

Como segunda etapa dentro de la producción de etanol de segunda generación se tiene la hidrólisis enzimática, la cual es punto clave en el proceso, ya que a partir de esta etapa a partir de la hemicelulosa y celulosa se obtienen azúcares monoméricos potencialmente fermentables. La hidrólisis enzimática se presenta como la mejor alternativa de sacarificación ya que a diferencia de la hidrólisis ácida no conlleva problemas de corrosión, no exige procesos de recuperación y neutralización, no exige el uso de elevadas temperaturas y presiones por lo tanto se evita la degradación de los azúcares y la generación de compuesto tóxicos o inhibitorios (Tomás-Pejó, 2009). Mientras que en el proceso de hidrólisis enzimática las condiciones de operación son más suaves y se encuentran en un rango de temperatura de 45-50 °C y un pH de 4-6.

En los últimos años la empresa Novozymes, líder mundial en la producción y comercialización de enzimas, ha desarrollado tecnología de última generación para la producción de enzimas principalmente xilanasas y celulasas destinadas específicamente para la producción de etanol de segunda generación (Novozymes, 2012). Entre las ventajas de las enzimas de última generación se encuentran las siguientes:

- Se tiene gran versatilidad del proceso y de sustratos.
- Incremento de la conversión de biomasa a azúcares
- Disminución de la cantidad de enzima utilizada en el proceso
- Incremento en la carga de sólidos totales
- Reducción del tiempo de hidrólisis
- Condiciones de operación suaves
- Reducción significativa en el costo total de la producción de etanol

Las enzimas de última generación diseñadas por Novozymes son Cellic® CTec3 el cual es un complejo enzimático de celulasas con un 5 % de xilanasas y Cellic® HTec3 capaz de hidrolizar la hemicelulosa ya que es un extracto rico en enzimas xilanasas. Saini *et al.*, (2015) reportaron que las enzimas han incrementado su actividad con respecto a presentaciones anteriores y de esta manera se reduce el costo de producción en un 30 %. Cellic® CTec3 y Cellic® HTec3 son enzimas de última generación que permiten la conversión más económica de los materiales lignocelulósicos pretratados a azúcares fermentables en comparación con cualquier otra celulasa o complejo enzimático disponibles en el mercado de producción de etanol celulósico.

Han *et al.*, (2013) realizaron una hidrólisis enzimática con Cellic® CTec II y Cellic® HTec II sobre paja de cebada pretratada con NaOH 0.58 M, utilizando una carga enzimática de 30 FPU/g celulosa de Cellic® CTec II y 15 % del peso de Cellic® CTec II de Cellic® HTec II, obteniendo 110 g/L de azúcares con una carga de biomasa del 20 %. Guarneros *et al.* (2016) realizaron la hidrólisis de bagazo de sorgo dulce pretratado (designificado), utilizando 5 % p/p de enzima Cellic®CTec III, tiempo de

reacción de 51 h, y una relación líquido-sólido de 5:1, obteniendo valores superiores a los 120 g/L de glucosa. Concluyendo que después de los pretratamientos y el uso de enzimas de última generación se obtiene una mejora del 27.6 % en la concentración de glucosa obtenida.

Para comprender mejor la acción que tiene las enzimas sobre los sustratos, el mecanismo de acción de las enzimas antes mencionadas se describe a continuación.

1.6.1 Celulasas

Las celulasas involucran un complejo de, por lo menos, tres actividades diferentes, las que a su vez existen en una multiplicidad de formas para llevar a cabo la hidrólisis total de la celulosa. De esta manera las endo β -1,4-glucanasas (E.C. 3.2.1.4) rompen al azar los enlaces internos de la molécula en las regiones amorfas, producen un rápido decremento en la longitud de la cadena y un lento incremento de los grupos reductores libres. Las exo- β -1,4-glucanasas (E.C. 3.2.1.91) remueven unidades de glucosa o celobiosa a partir del extremo libre no reductor de la cadena de celulosa, dando como resultado un incremento rápido en los azúcares o grupos reductores y poco cambio en el tamaño del polímero. Finalmente la β -glucosidasa (E.C. 3.2.1.21) hidroliza la celobiosa producida por las actividades anteriores, dando como producto final la glucosa (Noyola y Pérez, 2002).

Las enzimas celulasas no solo se limitan a la producción de etanol ya que debido a sus características poseen diversos usos y aplicaciones en diferentes industrias en las que destacan la industria textil en la cual estas enzimas juegan un papel muy importante en el desteñido de mezclilla y en los detergentes quitapelusas. Dentro de la industria alimentaria, las celulasas se usan para favorecer la extracción y filtración de jugos de frutas o verduras, filtración de mostos, extracción de aceites comestibles, etc. Asimismo se usan en la hidrólisis parcial de materiales lignocelulósicos para mejorar la digestión de rumiantes (Noyola y Pérez, 2002).

1.6.2 Xilanasas

El xilano es un heteropolisacárido y su degradación total para producir xilosa y/o arabinosa es llevada a cabo, como en la celulosa, por un grupo de enzimas que participan sinérgicamente. Las más conocidas son las endo- β -D-xilanasas (E.C. 3.2.1.8), las cuales rompen al azar los enlaces glucosídicos de la cadena principal de la molécula. La arabinofuranosidasa (E.C. 3.2.1.55) hidroliza las cadenas laterales de arabinosa, mientras que las acetil xilan esterasas (E.C. 3.1.1.72) liberan grupos acetatos. La glucoronidasa (E.C. 3.2.1.139) remueve las cadenas laterales de ácido glucorónico a partir de unidades de xilosa. Las β -xilosidasas (E.C. 3.2.1.37) son enzimas activas sobre oligosacáridos cortos, llevando a cabo la hidrólisis de los enlaces β -1,4-aril-xilopiranosido produciendo xilosa (Noyola y Pérez, 2002).

Una de las aplicaciones más importantes de las xilanasas es en la industria de la pulpa y del papel. Las xilanasas como las celulasas, también se usan en la industria alimentaria en la clarificación de jugos y vinos, licuefacción de mucílago de café; extracción de saborizantes y pigmentos, aceites de plantas y semillas; maceración de materia vegetal; acondicionamiento de piensos para aves y cerdos y en la industria de la panificación, entre otras (Noyola y Pérez, 2002).

1.6.3 Efecto de los surfactantes no-iónicos en la hidrólisis enzimática

Debido al precio de las enzimas y a las altas dosis requeridas, la hidrólisis enzimática es el paso más costoso en la producción de bioetanol a partir de materiales lignocelulósicos, ya que representa el 60 % del costo total del proceso. Por lo tanto es deseable que la dosis enzimática utilizada en el proceso sea la más baja posible y al mismo tiempo presentar un buen rendimiento de conversión.

Se ha demostrado que ciertos aditivos, como los surfactantes, que son compuestos anfifílicos (poseen una cabeza hidrofílica y una cola hidrofóbica), capaces de formar micelas y adsorberse en superficies, pueden incrementar los rendimientos en las

hidrólisis ya que estos son adsorbidos al sustrato (Alkasrawi *et al.*, 2003; Kim *et al.*, 2007). Los mecanismos de acción de los surfactantes han sido los siguientes: 1) altera la estructura del sustrato y lo hace más accesible para la enzima, 2) estabilizan las enzimas y previenen su desnaturalización, 3) incrementa las interacciones entre el sustrato y la enzima y 4) reducen la adsorción no productiva de las enzimas con el sustrato (Eriksson y Börjesson, 2002; Qing y Bing, 2010).

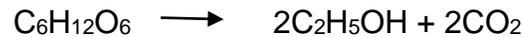
De los aditivos, quizás el más estudiado ha sido el Tween 80, el cual ha mejorado la eficiencia de las enzimas involucradas en la hidrólisis de residuos agroindustriales. Para esto se han propuesto algunos mecanismos de acción los cuales se dividen en tres categorías principales:

- a) El surfactante altera la ultraestructura del sustrato, haciendo más accesible la celulosa al ataque enzimático.
- b) El surfactante incrementa la estabilidad enzimática al reducir el proceso de desnaturalización.
- c) Los surfactantes reducen la adsorción improductiva de
- d) las celulasas sobre la lignina.

La acción del Tween 80 se ha demostrado en trabajos como el reportado por Nochebuena (2013), quien al adicionar Tween 80 a la hidrólisis enzimática de bagazo de caña llevada a cabo por celulasas y β -glucosidasas, obtuvo un incremento del 41.6 % en la concentración de glucosa. Domínguez (2012), realizó una hidrólisis enzimática de olote de maíz, en la cual adicionando Tween 80 logró un incremento del 19 % en la concentración de glucosa. Yang *et al.*, en 2015 reportaron el uso de otro surfactante, el Polietilenglicol (PEG), utilizado en la hidrólisis enzimática de paja de cebada pretratada, mejorando 60 % la concentración de glucosa y 90 % la concentración de xilosa.

1.7 Fermentación alcohólica y *Saccharomyces cerevisiae*

La fermentación alcohólica es considerada una bioreacción que permite transformar azúcares simples en alcohol y dióxido de carbono. La conversión se representa mediante la ecuación:



Los microorganismos responsables de esta transformación son las levaduras, de las cuales tal vez el género más representativo sea *Saccharomyces cerevisiae* aunque también existen estudios para producir alcohol con otros hongos y bacterias, como la *Zymomonas mobilis*, pero la explotación a nivel industrial es mínima (Vázquez y Dacosta, 2007).

Saccharomyces cerevisiae es quizá la levadura más importante para la humanidad desde tiempos inmemoriales, ya sea por su utilización en la producción de pan, vino u otras bebidas alcohólicas hace miles de años y en consecuencia ha sido de los más estudiados a nivel celular y molecular y a la fecha es uno de los microorganismos eucarióticos modelo.

Saccharomyces cerevisiae es la levadura de mayor importancia industrial ya que es utilizada por excelencia para la obtención de etanol a nivel industrial (Figura 1.6), esto se debe a que es un organismo de fácil manipulación y recuperación, no es exigente en cuanto a su cultivo, no presenta alto costo, tolera altas concentraciones de etanol, en la fermentación produce bajas concentraciones de subproductos, es osmotolerante, no presenta inhibición por sustrato ya que es capaz de tolerar altas concentraciones de azúcares, presenta alta viabilidad celular para el reciclaje y características de floculación y sedimentación para el procesamiento “downstream” (Fajardo y Sarmientos, 2007).

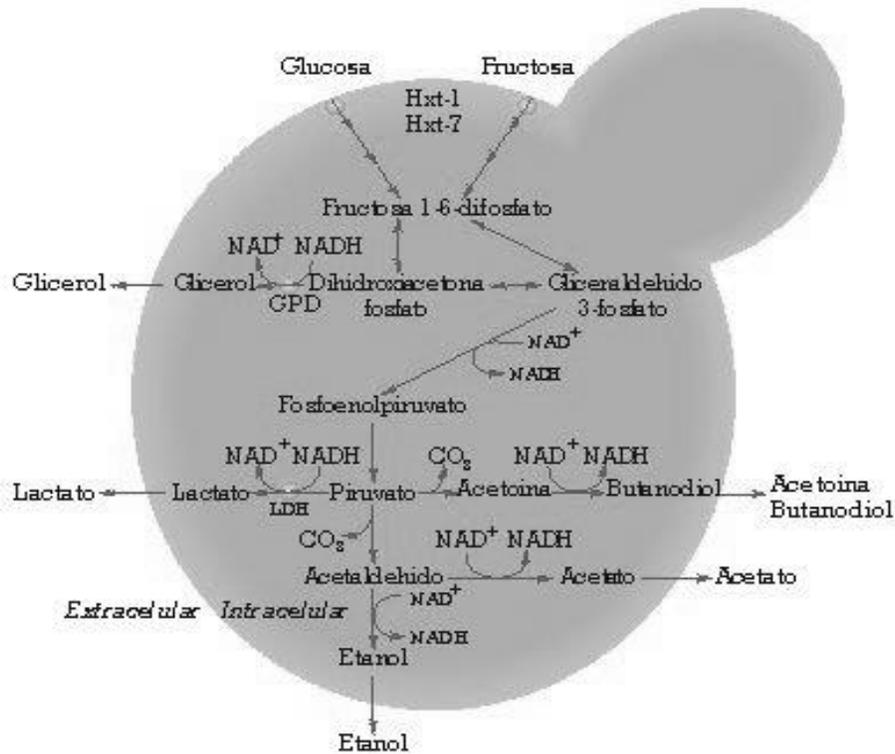


FIGURA 1.6 Ruta metabólica de los principales metabolitos producidos por *Sacharomyces cerevisiae* (Otero, 2007).

Los requerimientos nutrimentales para que *S. cerevisiae* tenga un buen desarrollo y rendimiento son principalmente dos:

Carbono, el cual es su principal fuente de energía, esta fuente es obtenida de azúcares simples principalmente hexosas como la glucosa, la manosa, fructosa, entre otras (Gamazo *et al.*, 2005),

Nitrógeno, este elemento muy importante para el desarrollo de la célula y además representa el 10 % del peso de la misma, la levadura es capaz de utilizar este elemento en forma de ión amonio y este ión lo puede obtener de dos maneras ya sea en forma de sales como el cloruro de amonio, nitrato de amonio, fosfato de amonio y

el sulfato de amonio o utilizando aminoácido, dipéptidos, tripéptidos y la urea (Carballo, 2000).

Aunado a estos elementos se encuentran otros que aunque siempre están presentes en cantidades minúsculas son igual de importantes que las anteriores tal es el caso del fósforo, azufre, potasio y magnesio (Carballo, 2000) y algunos micronutrientes que van del orden de 0.1 a 100 μM como son Co, B, Cd, Cr, Cu, I, Mo, Ni y Va. (Gamazo *et al.*, 2005).

Una vez que el sustrato a utilizar esta perfectamente tratado y listo para su fermentación y el microorganismos tiene cubiertas sus necesidades nutrimentales es necesario proveerles un sistema adecuado así como las condiciones adecuadas de operación para esto es necesario tomar en cuenta y controlar los factores físicos que influyen en dicho proceso (Doran, 1998). Las variables que posiblemente tengan mayor influencia son: temperatura, la cual es óptima entre 30 y 35 °C para *S. cerevisiae*, pH que para levaduras el óptimo se encuentra entre 4 y 6, grados Brix (°Brix) que nos indica la cantidad de azúcar (1 g de sacarosa por cada 100 g de líquido), aireación (agitación), entre otras (Fajardo y Sarmientos, 2007).

Vázquez y Dacosta (2007) refieren que al tener las mejores condiciones de fermentación, el rendimiento máximo teórico para la transformación de glucosa a etanol es de 0.511 g de etanol y 0.489 g de dióxido de carbono (CO_2) por cada gramo de glucosa consumida. Sin embargo, estos valores son difíciles de lograr de manera experimental ya que la levadura también utiliza la glucosa para la producción de otros metabolitos y la producción de biomasa. El rendimiento experimental varía entre el 90 y 95 % del rendimiento teórico, es decir, de 0.469 a 0.485 g/g y los rendimientos en la industria son aún más bajos, alrededor de 87-93 % debido a que es más difícil controlar el proceso.

1.7.1 Sacarificación y Fermentación Simultánea (SFS)

Uno de los avances más destacables en cuanto al proceso de producción de etanol de segunda generación a partir de biomasa lignocelulósica ha sido la implementación

y desarrollo del proceso denominado como Sacarificación y Fermentación Simultánea (SFS), el cual es un proceso en el cual la hidrólisis enzimática y la fermentación se llevan a cabo de manera simultánea en un mismo reactor sin separar la biomasa del hidrolizado que contiene los azúcares (Hans *et al.*, 2019)

El proceso de SFS nos proporciona grandes ventajas, ya que durante el mismo, la glucosa liberada por acción de las enzimas celulolíticas es inmediatamente consumida por las levaduras y metabolizada a etanol; esta continua eliminación de la glucosa representa una excelente estrategia para evitar o disminuir la inhibición por producto de las enzimas (Sakimoto *et al.*, 2017), lo que se traduce en rendimientos de hidrólisis más altos, menores dosis de enzimas, productividades de etanol más elevadas, reducción del tiempo total de proceso y por consecuencia, se logran disminuir los costos del proceso en comparación con la hidrólisis y fermentación separadas (Tomás-Pejó, 2010)

El proceso de SFS se considera como un método eficiente y flexible para la producción de etanol, tanto de primera como de segunda generación (Pietrzak y Kawa, 2015) ya que puede ser empleado en una gran variedad de materias primas así como con diferentes tecnologías de pretratamientos. Aun considerando las grandes ventajas que este método ofrece, es necesario desvelar los inconvenientes que este presenta; los principales son aquellos relacionados con las condiciones óptimas de pH y temperatura, ya que para la etapa de hidrólisis enzimática y fermentación alcohólica son diferentes por lo que se debe determinar una combinación óptima entre ambos parámetros.

El pH óptimo en la hidrólisis enzimática se encuentra en un rango de 4.5 a 4.8. Mientras que el pH para el proceso de fermentación suele estar entre 5 y 5.5, dependiendo del microorganismo (Azhar *et al.*, 2017). En cuanto a temperatura se refiere, también existe inconveniente ya que prevalece una gran diferencia entre ambos procesos pues mientras la temperatura óptima para la hidrólisis enzimática oscila entre los 45 y 50 °C, la temperatura en la fermentación fluctúa entre 30 y 37 °C, considerando al productor por excelencia de etanol, *Saccharomyces cerevisiae*.

Bajo esta premisa, es necesario el uso de levaduras termotolerantes como *Kluyveromyces marxianus* las cuales son capaces de crecer y fermentar la glucosa a etanol a temperaturas de 40 °C o más (Suzuki *et al.*, 2019), cercanas a la temperatura óptima de la hidrólisis enzimática, además teniendo un gran rendimiento y productividad volumétrica (de Asis-Castro *et al.*, 2015)

K. marxianus posee un elevado potencial para su empleo en diversas aplicaciones biotecnológicas (Fonseca *et al.*, 2008); ha sido principalmente estudiada para la producción de etanol en proceso de SFS a partir de diferentes materiales lignocelulósicos, principalmente de cereales como: pajas de trigo, paja de cebada, paja y cascarilla de arroz, rastrojo de maíz (Linde *et al.*, 2007; de Asis-Castro *et al.*, 2015; Pietrzak y Kawa, 2015; Moreno *et al.*, 2013; Villanueva y García, 2016), así como en residuos de caña y manzana (Jugwanth *et al.*, 2020; de Barros *et al.*, 2017). Además el uso de levaduras termotolerantes tiene asociadas otras ventajas, ya que al realizarse la SFS a temperaturas elevadas, además de conseguirse mejores rendimiento en la hidrólisis enzimática, se disminuye el riesgo de contaminación por otros microorganismos durante la fermentación (Limtong *et al.*, 2007).

Otro factor importante a considerar durante el proceso de SFS, es la concentración de sólidos, ya que esta debe ser lo más elevada posible para asegurar altas concentraciones de azúcares que a su vez permitan obtener elevadas concentraciones de etanol en el medio. Cuanto mayor es la carga de sustrato durante la SFS, mayor concentración de etanol puede obtenerse, y por consecuencia el gasto energético disminuye en los procesos subsecuentes de destilación y evaporación. Algunos estudios han demostrado que un proceso de SFS con una carga de sólidos del 8 % (p/v) disminuye los costes hasta en un 19 % comparado con una carga de solo 5 % (Wingren *et al.*, 2003), sin embargo, una desventaja de aumentar la carga de sólidos en el medio es el aumento en la viscosidad del mismo por lo que la carga de sólidos en un proceso convencional de SFS se ha limitado a solo el 10 % (Rosgaard *et al.*, 2007).

Existen alternativas para lidiar con el inconveniente de la viscosidad en el medio debido a la concentración de sólidos. La viscosidad del medio disminuye gracias a la acción de las enzimas ya que al descomponer la ultraestructura de la lignocelulosa se pierde la capacidad de retención de agua de la misma (Rosgaard *et al.*, 2007); debido a este hecho, una etapa de prehidrólisis puede ser la alternativa, en esta configuración de SFS, las enzimas hidrolizan el material antes de que las levaduras sean inoculadas, lo que hace al medio más fácil de manejar, hay mejor agitación del mismo, mejor distribución de las enzimas y eventualmente de los nutrientes y los microorganismos. La prehidrólisis muestra otra ventaja, ya que al realizarse a temperatura más elevada debido a la ausencia de levaduras, se mejora la licuefacción del medio y se mejora la tasa de hidrólisis (Jørgensen *et al.*, 2007).

Una segunda alternativa para incrementar la concentración de los sólidos sin que se afecte la viscosidad del medio, es mediante la implementación del proceso por lote alimentado (del inglés fed-batch) (Rudolf *et al.*, 2005). En este caso, la adición del sustrato en pequeñas dosis implica una hidrólisis continua del material y al adicionar las enzimas junto con el sustrato, se provoca una disminución en la viscosidad del medio así como la homogenización del mismo. Además mediante esta configuración se mejora la eficiencia del proceso, permitiendo obtener concentraciones más altas de etanol y mejores rendimientos (Rudolf *et al.*, 2005).

Por lo que es evidente que encontrar los mejores parámetros y condiciones de este proceso es vital para mejorar la Sacarificación y Fermentación Simultánea, así como la concentración de etanol. Por lo diversos autores, se han dado a la tarea de evaluar dichos parámetros como es el caso de Sewsynker-Sukai y Kana (2018) que estudiaron el impacto de la carga de sólidos, concentración de la enzima, así como la carga enzimática en la concentración de etanol con olote de maíz; Wang *et al.*, (2013) evaluaron el efecto de la concentración de levadura, la carga enzimática, la carga de sólidos y la temperatura en SFS utilizando bagazo de sorgo dulce; mientras que Zhao *et al.*, (2015) investigaron el efecto de la concentración de levadura y la carga de sólidos en la producción de etanol a partir de lenteja de agua pretratada.

2. JUSTIFICACIÓN

En México se producen en promedio un millón de toneladas de grano de cebada y 490 mil toneladas de paja, los cuales son ricos en material amiláceo y lignocelulósico respectivamente.

El uso integral de la cebada representa una nueva alternativa para desarrollar tecnologías que promuevan la diversificación del cultivo para la producción de etanol de 1G y 2G, ya que existe una gran disponibilidad de esta materia prima nacional y su mercado está restringido a los monopolios de la industria maltera.

Por ello es necesario la generación y el desarrollo de nuevas tecnologías que sean factibles, como: el desarrollo de pretratamientos más simples y eficientes, la aplicación de enzimas de última generación para lograr una conversión más eficiente de la materia prima, la optimización de dichos procesos para disminuir el costo energético y de materia prima, así como como el uso de levaduras autóctonas y diferentes configuraciones de fermentación que mejoren los rendimientos y productividades del proceso de producción de bioetanol de primera y segunda generación.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

Establecer las mejores condiciones del proceso de producción de etanol a partir del grano y paja de cebada, con el uso de enzimas comerciales (Amilex 4T, Diazyme SSF, Cellic CTec 3 y Cellic Htec 3) y levaduras autóctonas (*Saccharomyces cerevisiae* ITV-01 y *Kluyveromyces marxianus* CECT 10875)

3.2 Objetivos específicos

- Caracterizar la composición de almidón en harina de grano y lignocelulósicos en paja de cebada cultivada en el estado de Hidalgo, para dos variedades: Esmeralda y Doña Josefa.
- Optimizar el proceso de hidrólisis enzimática del grano de cebada.
- Optimizar el proceso de pretratamiento e hidrólisis enzimática de la paja de cebada.
- Evaluar el uso de los hidrolizados del grano y paja sobre la producción de etanol utilizando las levaduras *Saccharomyces cerevisiae* ITV-01 y *Kluyveromyces marxianus* CECT 10875.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

Para llevar a cabo el estudio del proceso de producción de etanol de primera y segunda generación a partir del cultivo de cebada, es necesario establecer las mejores condiciones de obtención de azúcares fermentables tanto del grano como del material lignocelulósico de la paja, para lo cual se planteó una metodología general que se divide en cuatro etapas principales como se muestra en la Figura 4.1, cada una de las etapas corresponde a los objetivos específicos planteados en la sección anterior.

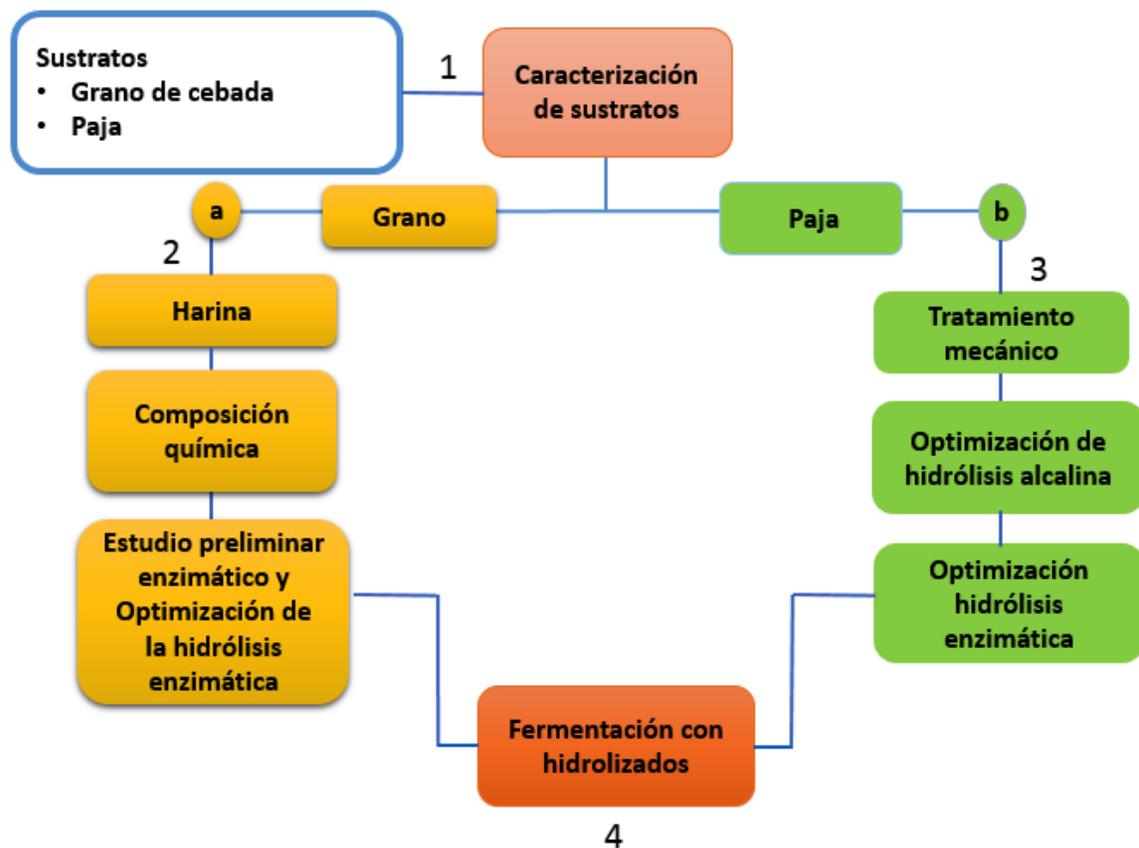


Figura 4.1 Metodología general propuesta para la producción de etanol de 1G y 2G a partir del cultivo de cebada.

4.1 Materia prima y material biológico

Cebada:

Para realizar el presente estudio se colectaron paja y grano (Figura 4.2) de dos variedades de cebada (*Hordeum vulgare* L.), “Doña Josefa” y “Esmeralda”; estas se colectaron durante la cosecha de otoño de 2016 en el altiplano central, en la localidad de Bella Vista en el estado de Hidalgo (19° 52' 46.6" N 98° 34' 10.6" W). Una vez recolectada, la materia prima se almacenó en sacos de rafia en un lugar fresco y seco hasta su uso.



FIGURA 4.2 (a) Grano de cebada y (b) paja de cebada

Enzimas:

- Enzimas amilolíticas: Para la hidrólisis del almidón presente en el grano de cebada se utilizaron dos enzimas amilolíticas comerciales de Danisco: una α -

amilasa, Amylex 4T y una α -glucosidasa, Diazyme SSF. Ambas enzimas fueron proporcionadas por la empresa “Grupo Báltico”.

- Enzimas celulolíticas: Para realizar la hidrólisis del material celulósico presente en la paja de cebada, se utilizaron dos enzimas de última generación proporcionadas por Novozymes, especialmente diseñadas para la producción de bioetanol; la enzima Cellic® CTec III (celulasas) y la enzima Cellic® HTec III (xilanasas).

Levaduras:

- Para realizar las fermentaciones de los hidrolizados provenientes de la paja y grano de cebada, se utilizaron dos levaduras autóctonas: la cepa *Saccharomyces cerevisiae* ITV-01, perteneciente a la colección del laboratorio de Bioingeniería y la cepa termotolerante *Kluyveromyces marxianus* CECT 10875, perteneciente y facilitada por la Unidad de Procesos Biotecnológicos para la Producción de Energía, del Instituto Madrileño de Estudios avanzados en Energía.

4.2. Obtención de harina a partir del grano de cebada

Para la obtención de la harina, primero se llevó a cabo una limpieza superficial de los granos retirando piedras, insectos, restos de maleza y paja. Posteriormente se llevó a cabo una molienda seca (dry milling) en un molino de rodillos, donde se consiguió una harina integral, constituida por una mezcla de harina y salvado de cereal, con un tamaño de partícula aproximadamente de 0.6 mm (Figura 4.3). La harina obtenida de ambas variedades se almacena en sacos de manta de 4 kg aproximadamente, en

refrigeración hasta su uso, con la finalidad de evitar contaminación y/o daño causado por ácaros.

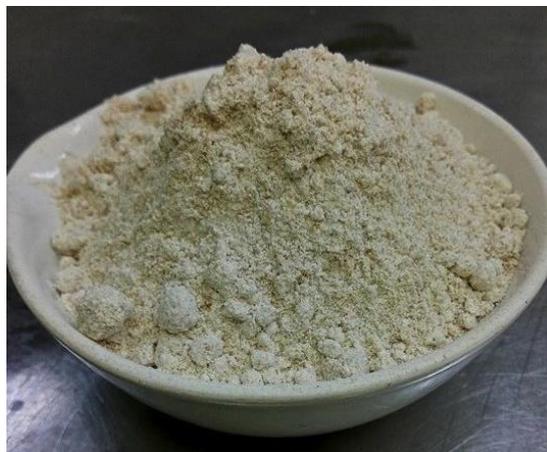


FIGURA 4.3 Harina integral de cebada

4.3 Caracterización de la harina de cebada

Para la cuantificación de almidón y proteína presentes en la harina se realizó una suspensión de cada harina a una concentración de 1 g/L en agua destilada, se homogenizó con un agitador magnético y una parrilla eléctrica durante 10 min, posteriormente las soluciones se gelatinizaron en autoclave a 115 °C y 1 atm de presión durante 15 minutos. Una vez que las soluciones estuvieron a temperatura ambiente se analizó la concentración de almidón y proteína total.

4.3.1 Determinación de almidón

La cuantificación de almidón se llevó a cabo por el método yodométrico. La reacción consistió en la mezcla de 1 mL de solución de harina de cebada (1 g/L) más 0.5 mL de HCl 0.1 N y 0.1 mL de lugol, finalmente la mezcla se afora a 10 mL, la reacción se dejó reposar 10 minutos a temperatura ambiente y se leyó la absorbancia

espectrofotométricamente a 620 nm. La curva estándar se realizó con almidón gelatinizado (1 g/L).

4.3.2 Determinación de proteína total

La reacción consistió en la mezcla de 800 µL de la muestra y 200 µL de reactivo de Bradford (Bradford, 1976) a temperatura ambiente durante 10 min y se leyó la absorbancia espectrofotométricamente a 595 nm. La cantidad de proteína total fue expresada como mg/L. La curva estándar se realizó con albúmina sérica bovina (16 mg/L).

4.3.3 Porcentaje de humedad

El porcentaje de humedad se realizó utilizando el método oficial AOCS Ab 2-499. Se tomó 1 g de la harina y se colocó en una termo-balanza Precisa XM 50, la cual realizó una cinética de secado por un periodo de 30 minutos, pasados los 30 minutos, el dispositivo arroja directamente el porcentaje de humedad o bien este puede ser calculado por diferencia de peso presente en la muestra inicial mediante la ecuación (4.1):

$$\% \text{ de humedad} = \frac{\text{Peso inicial (g)} - \text{peso final(g)}}{\text{peso inicial (g)}} * 100 \quad (4.1)$$

4.3.4 Cenizas

Para la cuantificación de cenizas se empleó el método oficial AOCS Ba 5a-49. Se pesaron 2 gramos de muestra dentro de una capsula de porcelana previamente calentada y tarada, se colocó en una mufla Thermocientific Thermoline, modelo FB1310M-33 a 550 °C manteniendo la temperatura durante 2 horas. Pasado ese

tiempo se transfirió la capsula de porcelana a un desecador, donde se dejó enfriar hasta alcanzar la temperatura ambiente (alrededor de 30 min.) y se pesó inmediatamente. El cálculo del porcentaje de cenizas se llevó a cabo utilizando la ecuación (4.2):

$$\% \text{ de cenizas} = \frac{\text{peso de las cenizas (g)}}{\text{peso inicial de la muestra (g)}} * 100 \quad (4.2)$$

4.4. Paja de cebada

Las muestras de paja se tomaron de pacas comprimidas de 25 kg, para cada variedad. Las muestras se limpiaron superficialmente retirando piedras, insectos y/o restos de malezas. Una vez limpias, se disminuyó el tamaño de partícula utilizando un procesador de alimentos casero (Classic Osterizer, Newell Brands de México S.A. de C.V), posteriormente las muestras fueron tamizadas para recuperar material con un tamaño de partícula homogéneo de aproximadamente 1-2 cm. El material seleccionado se almacenó en sacos de manta hasta su uso bajo condiciones de baja humedad y temperatura para evitar contaminaciones y/o podredumbre.

4.4.1 Caracterización del material lignocelulósico de la paja de cebada

La composición de la materia prima se determinó usando el procedimiento analítico estándar para análisis de biomasa proporcionado por el Laboratorio Nacional de Energías Renovables (NREL), el cual consiste en someter el material lignocelulósico a una doble hidrólisis ácida. La primera hidrólisis se realizó en un baño de agua termostático eléctrico con H₂SO₄ al 72 % durante 60 minutos, 30 °C, agitando

suavemente cada 10 min. La segunda hidrólisis se llevó a cabo con H₂SO₄ al 4 % en autoclave (AESA, CV-250, México) a 121 °C, 1.1 atm durante 60 minutos.

La glucosa, xilosa y arabinosa contenidas en el sobrenadante se analizaron mediante HPLC (Waters 600 TSP Spectra System, Waters, Milford, MA) utilizando una columna Shodex SH1011 8Å - 300 mm (H203153, Japan), a 50 °C, con ácido sulfúrico 5 mM como fase móvil con un flujo de 0.6 mL/min y un detector de índice de refracción (Waters 2414, TSP Refracto Monitor V, Waters, Milford, MA, USA). La lignina soluble en ácido se analizó en un espectrofotómetro UV-Vis (Agilent Cary 8454, Agilent Technologies). La humedad de la lignina insoluble se determinó de acuerdo a la metodología AOCS (Ab 2 – 49) utilizando una estufa de vacío (Thermo Scientific Lab-Line, 3608-1CE), finalmente la determinación de cenizas se realizó mediante la metodología AOCS (Ba 5^a-49) en una mufla (Thermocientific Thermoline, modelo FB1310M-33).

4.5 Estudio preliminar enzimático de enzimas amilolíticas

Las enzimas necesarias para realizar la hidrólisis enzimática de la harina de cebada son dos, la primera enzima es una α-amilasa, Amylex-4T de DANISCO, encargada de llevar a cabo la licuefacción de la molécula de almidón y la segunda enzima es una α-glucosidasa, DIAZYME-SSF, también de DANISCO (Figura 4.6), la cual lleva a cabo la liberación de unidades de glucosa. Ambas enzimas fueron proporcionadas por la empresa “Grupo Báltico”, empresa líder en la producción de bioenergéticos.

Con la finalidad de conocer mejor el funcionamiento de cada enzima y encontrar las mejores condiciones de operación, se realizó un estudio preliminar enzimático que incluía los siguientes puntos.

4.5.1 Efecto de la temperatura sobre la actividad de las enzimas amilolíticas

Para la evaluación del efecto de la temperatura en las enzimas amilolíticas se utilizó una solución de almidón de 15 g/L, el cual fue gelatinizado a 121 °C durante 15

minutos y se utilizó la concentración mínima sugerida de enzima 0.010 % α -glucosidasa y 0.004 % α -amilasa. Una vez fijados estos parámetros se evaluó la actividad enzimática a 40, 50, 60, 70, 80 y 90 °C para cada una de las enzimas. En un tubo eppendorf se colocaron 2 mL de la enzima al 0.010 % y el otro tubo se colocaron 1980 μ L de solución de almidón (15 g/L) ambos se incubaron en baño María durante 5 minutos a cada una de las temperaturas a evaluar, pasado este tiempo se adicionaron 20 μ L de la enzima al tubo con almidón, se siguió la cinética de hidrólisis durante 10 minutos para la amilasa y durante 15 minutos para la glucosidasa, tomando 100 μ L de muestra cada 2 minutos para la α -amilasa y cada 3 minutos para la α -glucosidasa. Una vez obtenidas las muestras de cada ensayo se cuantificaron los azúcares reductores liberados mediante HPLC y se determinó la actividad enzimática para cada temperatura.

4.5.2 Evaluación de la termoestabilidad de las enzimas amilolíticas

El ensayo de termoestabilidad se realizó para las temperaturas en las que las enzimas presentaron mayor actividad. Para α -amilasa se llevó a cabo 50, 60, 70, 80 y 90 °C y para la α -glucosidasa se llevó a cabo a 50, 55, 60 °C. En este ensayo se tomaron 2 mL de enzima al 0.010 % y 0.004 % respectivamente y se incubaron a las temperaturas antes mencionadas, durante 500 minutos, cada 60 minutos se tomaron 20 μ L de la enzima y se adicionaron a un tubo eppendorf con almidón gelatinizado previamente temperado a 50 °C y se realizaron las cinéticas de hidrólisis durante 10 y 15 minutos respectivamente como en los apartados anteriores. A las muestras recuperadas se les cuantificó la cantidad de azúcares reductores liberados y finalmente se calculó el porcentaje de la actividad residual de acuerdo a la ecuación (4.3).

$$\% \text{ de actividad residual} = \frac{\text{Actividad final}}{\text{Actividad inicial}} * 10 \quad (4.3)$$

4.6 Hidrólisis enzimática de la harina de cebada

Una vez establecidos los rangos de operación de las enzimas en el estudio preliminar y con la finalidad de maximizar la concentración de glucosa obtenida, se realizó la optimización de la hidrólisis enzimática de la harina. Para lo cual se utilizó un diseño Box-Benhken de tres variables y tres niveles; las variables evaluadas fueron: la concentración de la enzima Amylex 4T (amilasa) (X_1), la concentración de la enzima Diazyme SSF (glucosidasa) (X_2) y la concentración de harina (X_3) como se muestra en la Tabla 4.1; teniendo como variable de respuesta la concentración de glucosa liberada, teniendo así un total de 15 experimentos, la matriz empleada en la hidrólisis enzimática de la harina se muestra en la Tabla 4.2 Los experimentos se realizaron en matraces Erlenmeyer de 250 mL, en cada matraz se colocó la cantidad de harina correspondiente, se adicionó la solución amortiguadora de acetatos 50 mM, se homogenizó la suspensión y se gelatinizó a 121 °C durante 15 minutos; una vez que la temperatura de los matraces estuvo en 50 °C se adicionaron las enzimas según las combinaciones del diseño, los matraces se incubaron a 50 °C y 250 rpm durante 15 horas. Se tomaron muestras a las 1, 5, 7, 9, 11 y 15 horas, las muestras fueron centrifugadas a 10,000 rpm durante 10 min, el sobrenadante se recuperó, congeló y almacenó para su análisis mediante HPLC (de acuerdo al método descrito en el apartado 4.3) para la cuantificación de glucosa liberada en cada tratamiento.

TABLA 4.1 Niveles de las variables estudiadas en el diseño experimental para la hidrólisis de harina de cebada

	Factores		Niveles	
Variable (Unidades)	X	(- 1)	(0)	(+ 1)
[Amylex 4T] (% v/v)	X_1	0.004	0.008	0.012
[Diazyme SSF] (% v/v)	X_2	0.010	0.020	0.030
Harina (p/v)	X_3	15	20	30

TABLA 4.2 Diseño Box-Behnken de la hidrólisis enzimática de harina de cebada

Tratamiento	[Amylex 4T] (%)	[Diazyme SSF] (%)	Harina (%)
1	0.004	0.010	20
2	0.012	0.010	20
3	0.004	0.030	20
4	0.012	0.030	20
5	0.004	0.020	15
6	0.012	0.020	15
7	0.004	0.020	30
8	0.012	0.020	30
9	0.008	0.010	15
10	0.008	0.030	15
11	0.008	0.010	30
12	0.008	0.030	30
13	0.008	0.020	20
14	0.008	0.020	20
15	0.008	0.020	20

4.6.1 Optimización de la hidrólisis enzimática de harina de cebada

Una vez que se realizaron los 15 experimentos del diseño Box-Behnken, y se cuantificó la cantidad de glucosa liberada, los resultados se ingresaron en el software de análisis estadístico Statgraphics Centurion XVI con la finalidad de conocer las condiciones óptimas que permitieran obtener una mayor concentración de glucosa derivada del almidón presente en la harina y realizar la validación experimental del resultado. De igual manera, mediante el software estadístico se obtuvo el modelo matemático que describe el comportamiento de los datos obtenidos así como el Análisis de Varianza (ANOVA).

4.7 Pretratamiento peróxido-alcálico de la paja de cebada

Para realizar este estudio se utilizó la paja de cebada recolectada y procesada como se describió en el apartado 4.1.2. Para la optimización de la remoción de lignina con el pretratamiento peróxido-alcálico, se utilizó un diseño Box-Benhken de tres variables con tres niveles. Las variables evaluadas fueron: concentración de H_2O_2 (X_1), tiempo de reacción (X_2) y la relación líquido sólido (X_3) como se muestra en la Tabla 4.3; teniendo como variable de respuesta el porcentaje de lignina removida, obtenido a través de doce combinaciones con tres puntos centrales con un total de 15 experimentos. La matriz estudiada para el pretratamiento se muestra en la Tabla 4.4 Para realizar los experimentos se colocó un gramo de paja en matraces Erlenmeyer de 50 mL y se puso en suspensión con la respectiva solución de H_2O_2 , posteriormente se ajustó el pH a 11.5 utilizando una solución de hidróxido de sodio 10 M. El pH debe ser ajustado inmediatamente ya que de esta manera se evita la descomposición y pérdida de los radicales hidroxilo y superóxidos que son los encargados de llevar a cabo la oxidación de lignina presente en el material. Los matraces permanecieron a temperatura ambiente durante el tiempo indicado, agitando regularmente. Pasado el tiempo de pretratamiento las muestras fueron lavadas con agua corriente hasta conseguir un pH cercano a la neutralidad, se secaron a temperatura ambiente y se determinó el contenido lignocelulósico con la finalidad de cuantificar la cantidad de lignina residual mediante el método descrito en la sesión 4.3.

TABLA 4.3 Niveles de las variables estudiadas en el diseño experimental para el pretratamiento peróxido-alcálico de paja de cebada

	Factores		Niveles	
Variable (Unidades)	X	(- 1)	(0)	(+ 1)
$[H_2O_2]$ (% v/v)	X_1	2	4	6
t(h)	X_2	15	30	45
RLS (mL:g)	X_3	8:1	12:1	16:1

* RLS: Relación líquido-sólido

TABLA 4.4 Diseño Box Behnken del pretratamiento peróxido-alcálico de paja de cebada

Tratamiento	[H ₂ O ₂] (% v/v)	Tiempo (h)	RLS (mL/g)
1	2	15	12:1
2	6	15	12:1
3	2	45	12:1
4	6	45	12:1
5	2	30	8:1
6	6	30	8:1
7	2	30	16:1
8	6	30	16:1
9	4	15	8:1
10	4	45	8:1
11	4	15	16:1
12	4	45	16:1
13	4	30	12:1
14	4	30	12:1
15	4	30	12:1

* RLS: Relación Líquido-sólido

4.7.1 Optimización del pretratamiento alcalino de la paja de cebada

Una vez que se realizaron los experimentos del diseño Box-Benhken, y se cuantificó la cantidad de lignina residual, los resultados se ingresaron en el software de análisis estadístico Statgraphics Centurion XVI con la finalidad de obtener las condiciones óptimas para lograr el mayor porcentaje de deslignificación de la materia prima y realizar la validación del resultado. De igual manera, mediante el uso del software estadístico se obtuvo el modelo matemático que describe el comportamiento de los datos obtenidos así como el Análisis de Varianza (ANOVA).

4.8 Hidrólisis enzimática de la paja de cebada pretratada

Esta sección de la metodología se realizó utilizando la paja pretratada bajo las mejores condiciones obtenidas en el apartado anterior. Con el objetivo de generar un

tratamiento en el cual se maximizara la obtención de azúcares fermentables, al igual que en el pretratamiento peróxido-alkalino, la optimización de la sacarificación enzimática se realizó siguiendo un diseño Box-Benhken de tres variables con tres niveles, las variables evaluadas fueron: la concentración de la enzima Cellic® CTec III (celulasas) (X_1), la concentración de la enzima Cellic® HTec III (xilanasas) (X_2) y el tiempo de reacción (X_3) como se muestra en la Tabla 4.5; teniendo como variable de respuesta la conversión de celulosa a glucosa, obtenida a través de doce combinaciones con tres puntos centrales con un total de 15 experimentos. La matriz estudiada para la sacarificación enzimática se muestra en la Tabla 4.6. Los experimentos se realizaron con 1 g de paja deslignificada (bajo las condiciones óptimas obtenidas) y 10 mL de una solución reguladora de acetatos 50 mM, pH 5 en matraces Erlenmeyer de 50 mL. Los matraces se mantuvieron en una incubadora con agitación orbital (INO 650H-11 Prendo) a 50 °C y 250 rpm durante el tiempo establecido en el diseño. Una vez transcurrido el tiempo de sacarificación, las muestras se inactivaron en un baño María en ebullición durante 15 min, después se centrifugaron a 5000 rpm, 20 °C, durante 20 minutos en una centrifuga refrigerada (ependorf Centrifuge 5804R). El sobrenadante se analizó mediante HPLC para cuantificar la cantidad de glucosa y xilosa liberadas en cada uno de los tratamientos.

TABLA 4.5 Niveles de las variables estudiadas en el diseño experimental para la hidrólisis enzimática de paja de cebada pretratada

Variable (Unidades)	Factores	Niveles		
	X	(- 1)	(0)	(+ 1)
[Cellic CTec III] (% p/p)	X_1	2	4	6
[Cellic HTec III] (% p/p)	X_2	2	4	6
t (h)	X_3	20	35	50

TABLA 4.6 Diseño Box-Behnken de la hidrólisis enzimática de la paja de cebada pretratada

Tratamiento	[CTec III] (%)	[HTec III] (%)	Tiempo (h)
1	2	2	35
2	6	2	35
3	2	6	35
4	6	6	35
5	2	4	20
6	6	4	20
7	2	4	50
8	6	4	50
9	4	2	20
10	4	6	20
11	4	2	50
12	4	6	50
13	4	4	35
14	4	4	35
15	4	4	35

4.8.1 Optimización de la hidrólisis enzimática de la paja de cebada pretratada

Una vez que se realizaron los experimentos del diseño Box-Behnken, y se cuantificó la cantidad de azúcares liberados, los resultados se ingresaron en el software de análisis estadístico Statgraphics Centurion XVI con la finalidad de obtener las condiciones óptimas para lograr el mayor porcentaje de conversión de celulosa a glucosa y de hemicelulosa a xilosa en la materia prima de acuerdo a las ecuaciones 4.4 y 4.5 y realizar la validación del resultado. Al igual que en los apartados anteriores, mediante el software estadístico se obtuvo el modelo matemático que describe el comportamiento de los datos obtenidos experimentalmente así como el Análisis de Varianza (ANOVA).

$$\text{Conversión de celulosa} = \frac{\text{g/L de glucosa experimental}}{\text{g/L de glucosa teórica}} \times 100 \quad (4.4)$$

g/L de glucosa teórica

$$= (\text{g/L de sólidos totales} \times \% \text{ de celulosa en paja pretratada}) \times 1.11$$

(4.5)

4.8.2 Efecto de la adición de surfactantes en la hidrólisis enzimática de la paja de cebada pretratada

Después de obtener las condiciones óptimas de hidrólisis enzimática, se evaluó el uso de surfactantes con la finalidad de mejorar la eficiencia de la conversión enzimática. Para dicho propósito, fueron evaluados dos surfactantes previamente reportados para este objetivo; Polivinilpirrolidona (SIGMA ALDRICH 50 G) con 2 concentraciones 1 y 2 g/L y Tween 80 también con 2 concentraciones 2 y 20 g/L. Los experimentos se realizaron en matraces Erlenmeyer de 50 mL, donde se colocaron 10 mL de solución amortiguadora de acetatos (previamente descrita), se adicionaron las concentraciones de surfactantes respectivamente y se agitaron con una varilla de vidrio hasta disolver completamente, posteriormente se añadió 1 g de la paja pretratada, se homogenizó y se incubó durante 1 hora a 25 °C y 200 rpm para asegurar la adsorción de los surfactantes en las fibras de la paja, pasado este tiempo se adicionaron las enzimas celulasas y xilanasas (concentraciones óptimas obtenidas), de igual manera se colocaron matraces que no contenían surfactantes a manera de testigos y se incubaron a 50 °C, 200 rpm, durante 20 h; una vez transcurrido el tiempo de hidrólisis, se extrajo el sobrenadante para cuantificar los azúcares fermentables de acuerdo a la metodología previamente descrita.

4.9 Caracterización macro y microscópica de la paja de cebada

Con la finalidad de observar los cambios sufridos en la materia prima después de los tratamientos efectuados, se realizó una caracterización macro y microscópica para observar las alteraciones presentes en las fibras de la paja de cebada así como estructura química de la misma. Los análisis realizados se realizaron mediante microscopia electrónica de barrido (MEB) y espectroscopia infrarroja (FTIR). Para el análisis, las muestras se pulverizaron en un molino pulverizador de navajas (Herb & Spice Grinder 100 g GRT02A) y posteriormente fueron secadas durante 24 h a 60 °C en una estufa de vacío (Thermo Scientific Lab-Line, 3608-1CE USA). Finalmente, las muestras fueron enviadas para su análisis a la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo (UAEH); las técnicas utilizadas para el estudio se describen de manera subsecuente.

4.9.1 Microscopia electrónica de Barrido (MEB) de paja de cebada

Las superficies de las muestras provenientes de cada tratamiento se estudiaron mediante microscopia electrónica de barrido (JSM-6010LA InTouchScope).

Las muestras se fijaron en soportes de aluminio con cinta adhesiva de carbono de doble cara y se cubrieron con oro. Las imágenes MEB se obtuvieron a 0, x550 y x1000, a 15kV.

4.9.2 Espectroscopia infrarroja (FTIR) de paja de cebada

Las muestras se analizaron mediante espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) (Perkin Elmer Spectrum GX) utilizando el método de pastillas de KBr en un rango entre 400 y 4000 cm^{-1} .

4.10 Fermentaciones con hidrolizados

4.10.1 Material biológico y medio de conservación

Para la fermentación de ambos hidrolizados se utilizaron dos levaduras:

- La cepa *Saccharomyces cerevisiae* ITV-01, perteneciente al laboratorio de Bioingeniería y que fue aislada de melazas de caña de azúcar (Ortiz, 2006).
- La cepa termotolerante *Kluyveromyces marxianus* CECT 10875, perteneciente a la Unidad de Procesos Biotecnológicos para la Producción de Energía, del Instituto Madrileño de Estudios avanzados en Energía.

Las cepas se conservaron en refrigeración a 4 °C, y fueron resembradas cada mes en su respectivo medio de conservación, cuyas formulaciones se describen en la Tabla 4.7.

TABLA 4.7 Composición de los medios de conservación de *S. cerevisiae* ITV-01 y *K. marxianus* CECT 10875

Componente	Concentración (g/L)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> ITV-01	
Agar-agar	20
Extracto de levadura	10
Glucosa	50
<i>Kluyveromyces marxianus</i> CECT 10875	
Agar-agar	20
Extracto de levadura	10
Peptona	20
Glucosa	20

4.10.2 Precultivo y preinóculo

Con la finalidad de tener las cepas activas, en condiciones óptimas de crecimiento y por ende obtener mejores resultados en cuanto a la fermentación, se realizó un precultivo. Para realizar el precultivo, tres asadas del cultivo que se tiene en caja

Petri fueron transferidas a un matraz Erlenmeyer de 250 mL que contenía 100 mL de medio sintético, para *K. marxianus* como se describe en la Tabla 4.7 (sin agar-agar) y para *S. cerevisiae* un medio suplementado como se describe a continuación en la Tabla 4.8, ambos medios con pH 5.5 y previamente esterilizados. Los cultivos se incubaron a 30 °C y 42 °C respectivamente a 200 rpm durante 12 horas. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se realiza un segundo pase de 3×10^6 células viables/mL, esta vez al medio de preinóculo y nuevamente se incubó por 12 horas bajo las mismas condiciones. Después de transcurrido el tiempo se inoculó con 3×10^6 células viables/mL el medio (hidrolizados enzimáticos) donde se llevó a cabo la cinética de fermentación.

TABLA 4.8 Composición del medio sintético de activación para *S. cerevisiae*

Componente	Concentración (g/L)
Glucosa	20
KH ₂ PO ₄	5
(NH ₄) ₂ SO ₄	2
Extracto de levadura	1
MgSO ₄ – 7H ₂ O	0.4

4.10.3 Fermentación por lote con hidrolizado de harina de cebada

El hidrolizado rico en glucosa proveniente de la hidrólisis enzimática de la harina de cebada fue centrifugado en una centrifuga refrigerada a 3000 rpm durante 20 minutos y fue almacenado en congelador hasta su uso. Las fermentaciones se llevaron a cabo por duplicado en matraces Erlenmeyer de 500 mL conteniendo 150 mL del medio anteriormente mencionado; aunque el medio no fue esterilizado, la inoculación del mismo se realizó bajo condiciones de asepsia y en campana de flujo

laminar para disminuir el riesgo de contaminación. Los matraces se inocularon con 3×10^6 células viables/mL y se incubaron a 30 °C respectivamente a 150 rpm, durante 24 h para *S. cerevisiae* y 72 h para *K. marxianus*. Durante la fermentación se tomaron muestras cada 3 h hasta finalizar e iniciando con el tiempo cero al momento de la inoculación. A las muestras obtenidas se les realizó un conteo celular, medición de pH y análisis de sustratos y productos para posteriormente realizar cálculos de rendimientos y productividad. La metodología seguida para cada caso, se describe más adelante.

4.10.4 Fermentación por lote con hidrolizado de paja de cebada y *S. cerevisiae*

El hidrolizado rico en glucosa y xilosa proveniente de la hidrólisis enzimática de la paja, únicamente fue filtrado con un colador común para retirar las fibras de gran tamaño que no hayan sido hidrolizadas durante el proceso, posteriormente el medio fue almacenado en congelador hasta su uso. Previo a realizar la fermentación, el medio fue enriquecido con sales cuya concentración se resume en la Tabla 4.9 y el pH del medio se ajustó a 5.5. Las fermentaciones se realizaron por duplicado en matraces de 250 mL con un volumen de operación de 100 mL, al igual que el caso anterior, los medios no fueron esterilizados, sin embargo, se inocularon en condiciones de asepsia y en campana de flujo laminar. Los matraces se inocularon con 3×10^6 células viables/mL y se incubaron a 30 °C a 150 rpm, durante 24 h para *S. cerevisiae*. Durante la fermentación se tomaron muestras cada 3 h hasta finalizar e iniciando con el tiempo cero al momento de la inoculación. El análisis de las muestras fue el mismo realizado para las muestras de la fermentación con hidrolizado de harina.

4.10.5 Fermentación por lote de hidrolizado de paja y *K. marxianus* CECT 10875

La fermentación se realizó utilizando la cepa *K. marxianus* CECT 10875, perteneciente al Instituto Madrileño de Estudios Avanzados en Energía (IMDEA-Energía). Para el preinóculo se colocó una colonia de la respectiva levadura en

medio sintético YPD, el preinóculo se incubó durante la noche (12 – 14 horas) a 42 °C y 150 rpm. Pasado el tiempo de incubación el preinóculo se centrifugó a 4000 rpm por 4 minutos a 4°C, el sobrenadante se desechó, las células se pesaron y resuspendieron con agua destilada estéril para obtener un inóculo equivalente a 1 g/L de células en el matraz de fermentación. Las fermentaciones se realizaron por triplicado en matraces Erlenmeyer de 150 mL con tapones horadados de goma con un volumen de operación de 50 mL de medio hidrolizado proveniente de la hidrólisis enzimática. El hidrolizado enzimático sin centrifugar ni esterilizar fue suplementado con las sales descritas en la Tabla 4.9 e inoculado con 1 g/L de levadura, se incubó a 42 °C, a 150 rpm durante 72 horas. Se tomaron muestras a las 4, 6, 8, 24, y 48 horas, las muestras fueron centrifugadas a 10,000 rpm durante 10 min, el sobrenadante se congeló a -20 °C y se almacenó hasta su análisis mediante HPLC para la cuantificación de etanol y azúcares residuales.

TABLA 4.9 Medio de enriquecimiento para hidrolizado enzimático de paja de cebada

Componente	Concentración (g/L)
KH₂PO₄	5
(NH₄)₂SO₄	2
Extracto de levadura	1
MgSO₄ – 7H₂O	0.4

4.10.5.1 Cuenta celular

El conteo celular se realizó mediante el uso de la cámara de Thoma, antes de realizar el conteo, la muestra se diluyó con agua destilada tantas veces fuera necesario para contar como máximo 300 células, una vez hecha la dilución, se realizó una tinción de las células con azul de metileno en una relación 1:1, se dejó reposar por 5 minutos y posteriormente se cargó la cámara de Thoma con ayuda de

una pipeta Pasteur y con cuidado de no sobrecargar la cámara. El conteo de células se realizó en cinco de los cuadrantes de la cámara que a su vez están divididos en 16 cuadrantes más pequeños (Figura 4.9). El volumen a considerar para el conteo es de 20×10^{-6} mL.

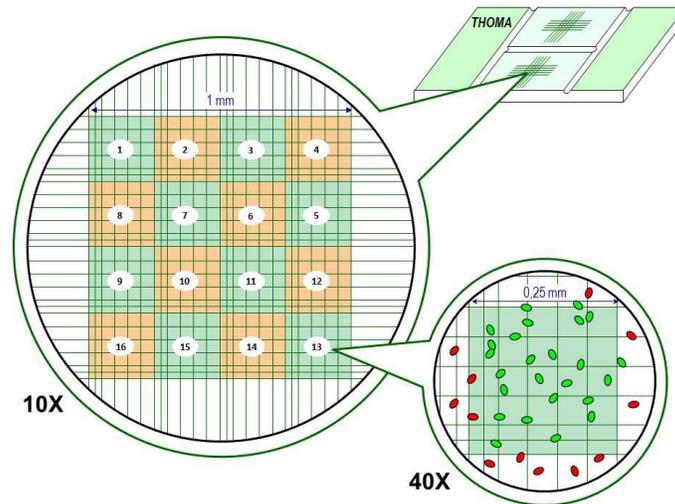


FIGURA 4.4 Esquema de los cuadrantes presentes en la cámara de Thoma para el conteo celular

La concentración de células (X) por mililitro está dada por la siguiente ecuación (4.4)

$$X = \frac{N * d}{Nc * 4} * 10^6 \quad (4.6)$$

Dónde:

N= Número de células contadas

d= Dilución empleada

Nc= Número de cuadrantes contabilizados

4.10.5.2 Viabilidad celular

Tomando como base la suspensión celular que se describió en el apartado anterior, las células vivas (viables) no presentan coloración mientras que las células muertas presentan una coloración azul. El porcentaje de viabilidad permite fijar con precisión la tasa de inoculación así como el estado fisiológico de las levaduras durante la fermentación. En la ecuación (4.5) se describe el cálculo necesario para obtener dicho porcentaje.

$$\% \text{ de viabilidad} = \frac{N_v}{N_t} * 100 \quad (4.7)$$

Donde:

N_v = Número de células vivas

N_t = Número total de células (vivas y muertas)

4.10.5.3 Análisis de sustratos y productos de la fermentación

Las muestras recolectadas a lo largo de la cinética fueron centrifugadas a 10,000 rpm durante 10 minutos, el sobrenadante se traspasó a otro tubo eppendorf y se mantuvieron congeladas hasta su análisis. Las muestras fueron analizadas por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC). Antes de ser analizadas, las muestras fueron tratadas con una solución de BaO 0.3 M y de ZnSO₄ al 5% p/v, esto con la finalidad de eliminar impurezas presentes en las muestras tales como, proteínas o almidón residual, entre otras. La relación utilizada es 8:1:1 respectivamente, dejando reposar por 10 minutos después de una agitación vigorosa de los tubos eppendorf, posteriormente las muestras fueron centrifugadas durante 10 minutos a 10,000 rpm.

La concentración del sustrato (glucosa y xilosa) y los productos-subproductos (etanol, glicerol y ácido acético) se determinaron mediante HPLC, utilizando una columna Shodex SH1011, específica para la separación de carbohidratos, ácidos

orgánicos y alcoholes. Las condiciones de operación fueron las mismas descritas en el apartado 4.3.

Los estándares utilizados fueron: Glucosa anhidra (grado alimenticio de Golden Bell Reactivos) en concentraciones de 100, 50, 16.6, 10.5, 2.5, 1.66, 1.25, 1, 0.50 y 0.33 g/L (Partida-Sedas, 2017); Glicerol anhidro (grado reactivo de Baker) en concentraciones de 10, 5, 1.66, 1, 0.5, 0.25, 0.16, 0.12, 0.10, 0.05 y 0.03 g/L; Ácido acético glacial (grado reactivo, Baker) en concentraciones de 30, 15, 5, 3, 1.5, 0.75, 0.5, 0.37, 0.3, 0.15 y 0.1 g/L, y finalmente alcohol etílico anhidro (grado HPLC de Baker) con las siguientes concentraciones 10, 5, 1.66, 1, 0.5, 0.25, 0.16, 0.12, 0.10, 0.05 y 0.03 g/L (Partida-sedas, 2017).

4.10.5.4 Rendimientos, productividad y eficiencia

Finalmente con los datos experimentales obtenidos del análisis por HPLC se calcularon el rendimiento, la productividad y la eficiencia del proceso.

Para hallar el rendimiento $Y_{x/s}$ (g de biomasa obtenida/ g de sustrato consumido) se tiene la ecuación (4.6):

$$Y_{x/s} = \frac{X_f - X_0}{S_0 - S_f} \quad (4.6)$$

Para el rendimiento $Y_{p/s}$ (g de producto obtenido / g de sustrato consumido) la ecuación (4.7):

$$Y_{p/s} = \frac{P_f - P_0}{S_0 - S_f} \quad (4.7)$$

La ecuación (4.8) fue utilizada para calcular la productividad volumétrica Q_p (g/L de etanol producido al final de la fermentación/ el tiempo final de fermentación).

$$Qp = \frac{P_f}{t_f} \quad (4.8)$$

Finalmente la ecuación 4.9 se utilizó para calcular la eficiencia del proceso

$$Eficiencia = \frac{Rendimiento\ experimental}{Rendimiento\ teórico} \times 100 \quad (4.9)$$

4.11 Sacarificación y Fermentación Simultánea (SFS) en lote con *K. marxianus* CECT10875

En este ensayo se probaron dos configuraciones de SSF para conocer cuál de ellas favorecía tanto la hidrólisis enzimática como la obtención de etanol. Los experimentos se realizaron por triplicado en matraces Erlenmeyer de 250 mL con tapones de goma horadados. El primer experimento consistió en una carga de sólidos (paja pretratada) de 10 % (p/v) en solución amortiguadora de acetatos 50 mM, pH 5, la adición de 6 % enzimas celulasas (Cellic CTec III) y 3 % de enzimas xilanasas (Cellic HTec III) y la adición (bajo condiciones de asepsia) de 1 g/L de levadura *K. marxianus*. Los matraces se colocaron en una incubadora con agitación a 42 °C y 150 rpm. El segundo experimento se llevó a cabo con las condiciones anteriormente mencionadas con la diferencia de que en este, se realizó una pre sacarificación de 4 horas a 50 °C y 250 rpm, pasado el tiempo de hidrólisis se adicionó la levadura y se incubaron a 42 °C y 150 rpm. Exceptuando el periodo de 4 h de pre hidrólisis en el segundo experimento, los ensayos se mantuvieron a 42 °C a 150 rpm durante 72 horas. Se tomaron muestras a las 4, 6, 8, 10, 24, 48 y 72 horas, se centrifugaron durante 10 min a 10,000 rpm, el sobrenadante se recuperó y almacenó a -20 °C hasta su análisis mediante HPLC para la cuantificación de azúcares (glucosa y xilosa) y etanol.

4.11.1 Sacarificación y Fermentación Simultánea en lote alimentado

Con la finalidad de aumentar las concentraciones obtenidas durante la SSF tanto de azúcares como de etanol, se realizaron SFS en lote alimentado bajo diferentes configuraciones. En este caso se probaron tres configuraciones distintas descritas a continuación. Los experimentos se realizaron por triplicado en matraces Erlenmeyer con tapón de goma horadado. El primer ensayo consistió en una carga de sólidos de 10 % (p/v) en solución amortiguadora de acetatos (50 mM y pH 5) adicionando 6 y 3 % de enzimas celulasas y xilanasas respectivamente, así como 1 g/L de levadura *K. marxianus*. A las 24 horas ambos ensayos se alimentaron con el 50 % de la carga inicial de sustrato (5 %) y la cantidad de enzimas correspondiente (3 y 1.5 %), el segundo ensayo se efectuó bajo las mismas condiciones, sin embargo, durante la alimentación a las 24 horas también se adicionó 1 g/L de levadura junto con el sustrato y las enzimas. El tercer ensayo consistió en una carga de sólidos 10 % (p/v), 6 y 3 % de enzimas y 2 g/L de levadura; pasadas 24 horas se alimentó con el 50 % de la carga inicial del sustrato y la cantidad correspondiente de enzimas. Los experimentos se realizaron a 42 °C, 150 rpm durante 144 horas. Se tomaron muestras a las 4, 6, 8, 10, 24, 32, 48, 72 y 144 horas. Las muestras se centrifugaron durante 10 min a 10,000 rpm, se recuperó el sobrenadante y se almacenó a -20 °C hasta su análisis mediante HPLC. Cabe mencionar que aunque el sustrato no fue esterilizado, tanto la inoculación como la alimentación de los lotes y la toma de muestra, se realizaron bajo condiciones de esterilidad en campana de flujo laminar.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Caracterización del material lignocelulósico de paja de cebada

La composición química de la biomasa lignocelulósica es un factor importante a considerar en la producción de etanol. En este caso se analizaron dos variedades de paja de cebada provenientes del altiplano hidalguense: Esmeralda y Josefa. El análisis reveló que la composición de las pajas en cuanto a hemicelulosa fue de un 27.5 ± 0.6 % para la variedad Esmeralda y 28.4 ± 1.4 % para la variedad Josefa, en celulosa fue de 41.2 ± 0.0 % para Esmeralda y 42.0 ± 0.0 % para Josefa, finalmente la lignina que fue de 18 % para ambas variedades como se aprecia en la Figura 5.1. En cuanto a la composición del material la celulosa y hemicelulosa son los componentes mayoritarios, por lo que el contenido total de carbohidratos estructurales que pueden ser hidrolizables y posteriormente fermentables suman un 70 %.

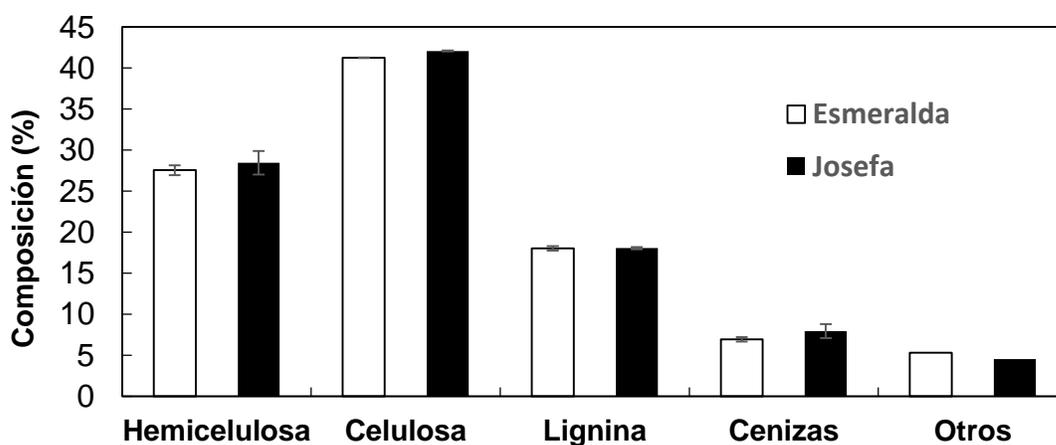


FIGURA 5.1 Composición química en base seca de la paja de cebada

Cabe destacar que la cantidad de celulosa y hemicelulosa presentes en las variedades de paja que se utilizaron en este trabajo, se encuentran por encima del promedio de lo reportado en otros trabajos realizados con paja de cebada, como los reportados por Sun *et al.*, (2011); Panagiotopoulos *et al.*, (2012); Han *et al.*, (2013) y

Salapa *et al.*, (2018) quienes reportan en promedio 35 % y 21 % de celulosa y hemicelulosa respectivamente. Sin embargo, la composición de la paja utilizada en este trabajo fue similar a la determinada en anteriores trabajos con paja de cebada procedente de la misma zona geográfica como los reportados por Olvera *et al.*, (2012) y Espino *et al.*, (2014) en los cuales la cantidad de holocelulosa (celulosa y hemicelulosa) presente en la paja varía de 60 a 70 %. Aunque la proporción de celulosa, hemicelulosa y lignina puede variar según el tipo de cebada, dicha variación puede deberse a diversos factores como lo exponen Contreras-López *et al.*, (2008), quienes encontraron que la composición del cultivo de cebada se ve afectada por factores como: el lugar de siembra, el tipo de suelo, las condiciones climatológicas e incluso el tipo de labranza que se haya realizado en el cultivo.

El alto contenido en carbohidratos hace de la paja de cebada un sustrato apropiado para la producción de etanol ya que es comparable con otros subproductos más ampliamente estudiados para este fin, como los reportados por Zhao *et al.*, (2018) quienes afirman un contenido de holocelulosa de 64 %, mientras que Moreira *et al.*, (2018) encontraron un contenido de 73 % de holocelulosa en bagazo de caña y Tomás-Pejó *et al.*, (2017) reportaron un porcentaje de 66 % de holocelulosa en paja de trigo.

5.2 Caracterización de la harina de cebada

Antes de obtener la harina integral de cebada, se caracterizó la cascarilla del grano, se tomaron 10 g de granos de ambas variedades y descascarillaron de manera manual, y se pudo constatar que la cascarilla representa el 10 % del peso del grano. Como parte final de la caracterización de los sustratos, se tiene la harina integral de cada una de las variedades. La variedad “Esmeralda” posee un 43 % de almidón y 1.5 % de proteína, mientras que la variedad “Doña Josefa” presentó un 28 % más de almidón ya que está constituida por 66 % de almidón y posee 1.6 % de proteínas. Por lo que la variedad “Doña Josefa” cae dentro de la media, ya que las harinas provenientes de cebada, poseen entre 65 y 75 % de almidón como se muestra en la

Tabla 5.2 donde también se incluyen otras variedades cultivadas en el altiplano hidalguense. La variedad Esmeralda cae por debajo de la media reportada, lo cual puede deberse a que las muestras analizadas en este trabajo fueron seleccionadas del material que fue por no cumplir con los estándares de calidad en la industria maltera, principalmente con el peso hectolitro requerido para el grano. La causa de la disminución en el peso del grano y por ende del almidón contenido en el mismo, así como la diferencia entre una variedad y otra, puede tener dos causas principales; la primera es que de acuerdo a lo reportado por la empresa Impulsora Agrícola de Apan S.A. de C.V, dentro de una misma superficie sembrada-cocechada (parcela) se tienen diferentes tipos de suelo lo cual junto con las condiciones climáticas influye en el desarrollo temprano de la planta de cebada y se pueden presentar variaciones de una planta a otra en una misma superficie sembrada. Como segunda causa probable en la disminución del peso del grano (Pereyra y Stewart, 2004) se encuentran las infecciones denominadas Roya y Escaldadura respectivamente, las cuales son infecciones foliares típicas de los cereales, causadas por hongos basidiomicetos que de no ser atendidas a tiempo (fumigación con agentes químicos) traen como consecuencia un menor número de granos en la planta así como una disminución en el peso de los mismos (disminución en la cantidad de almidón). No obstante, la variedad “Esmeralda” podría ser utilizada para la producción de bioetanol, aunque se esperaría que los rendimientos tanto de hidrólisis enzimática como de etanol no sean favorables. Debido a los resultados obtenidos durante la caracterización de los sustratos, se eligió la variedad “Doña Josefa” como la mejor para continuar con el trabajo, ya que aunque en la paja no existe diferencia significativa en la cantidad de holocelulosa, en el almidón del grano sí existe una notable diferencia; y esta se verá reflejada en futuros tratamientos como hidrólisis y fermentaciones. Aunado a esto, de acuerdo a lo reportado por la empresa “Impulsora Agrícola del Altiplano” la variedad “Doña Josefa” presenta mayores rendimientos por hectárea que la variedad “Esmeralda” por lo que se tiene una mayor disponibilidad anual de la materia prima.

TABLA 5.1 Contenido de almidón presente en diferentes variedades de cebada

Referencia	Variedad	Almidón (%)
Källman <i>et al.</i> , 2015	Chilenas	50 - 80
López <i>et al.</i> , 2007	M16, Forrajera	60 - 70
Adapa <i>et al.</i> , 2009	Esperanza, Pastor Ortiz	65 - 75
Este trabajo	Doña Josefa	66 ± 1.5
Este trabajo	Esmeralda	43.3 ± 2.5

5.2 Estudio preliminar enzimático de enzimas amilolíticas

Con la finalidad de evaluar si era posible realizar un proceso simultáneo de licuefacción y sacarificación de la harina de cebada para mitigar los costes del proceso, así como el tiempo y el gasto energético; se realizó de manera breve el análisis de los principales parámetros involucrados en la hidrólisis enzimática, pH y temperatura. Ya que ambas enzimas de acuerdo a sus especificaciones poseen características distintas, pues mientras la α -amilasa presenta una temperatura óptima de 90 °C, la α -glucosidasa presenta una de 70 °C; por tal motivo se realizaron algunos ensayos como: un perfil de temperatura y termoestabilidad, los cuales se describen a continuación.

5.3.1 Efecto de la temperatura sobre la actividad de las enzimas amilolíticas

Para realizar este ensayo se partió de la información proporcionada en la ficha técnica de DANISCO, en la cual especifica que la temperatura óptima de la enzima α -amilasa es de 90 °C, por lo cual se realizó un perfil de temperatura a partir de 40

°C y hasta 90 °C con la finalidad de confirmar la información de la ficha e indagar si era posible disminuir la temperatura y aligerar el gasto energético. Como resultado se obtuvo que la temperatura óptima de la enzima es de 70 °C donde presenta cerca de 172,000 U y no de 90 °C donde sólo presenta 144,000 U, conforme disminuye la temperatura se pierde actividad hasta obtener 5,000 U de actividad a los 40 °C como se aprecia en la Figura 5.2 A pesar de las indicaciones del fabricante, los resultados concuerdan con los encontrados en la bibliografía, Pandey *et al.*, (2016) como parte de un artículo de revisión acerca de la producción de amilasas, describieron que las temperaturas óptimas oscilan entre los 60 y 70 °C, dependiendo del microorganismo de origen, y solo existen algunas α -amilasas hipertermófilas cuya temperatura óptima es de 80 °C; también con lo reportado por Burhanoglu *et al.*, (2020) quienes evaluaron una amilasa con aplicación industrial utilizando almidón comercial como sustrato encontrando que el rango de temperatura oscila entre 40 °C y 90 °C, sin embargo, la temperatura óptima fue de 60 °C, similar a lo reportado por Avwioroko *et al.*, (2019) quienes estudiaron dos amilasas con potencial industrial utilizando diversos sustratos como almidón de yuca, harina de yuca, harina de trigo, harina de camote blanco y harina de maíz, reportaron un rango de temperatura óptimo de entre 60 y 70 °C.

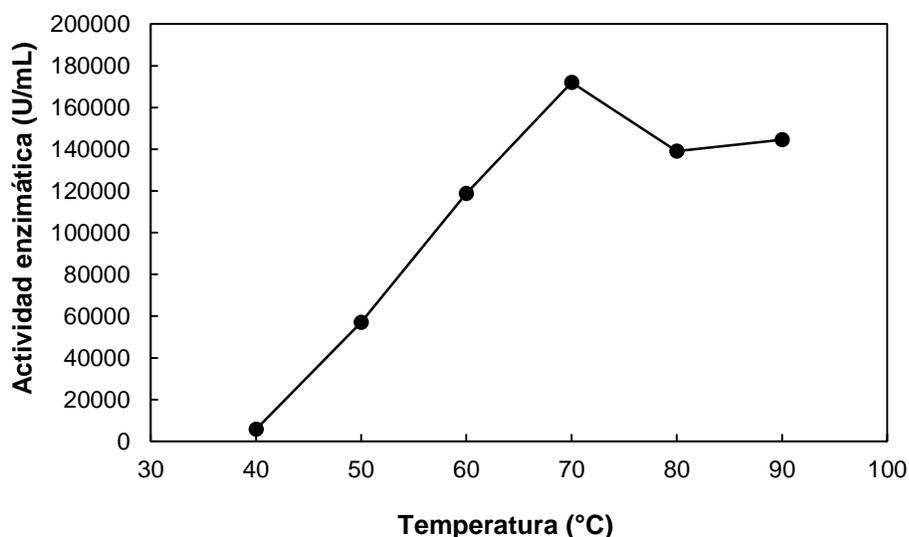


FIGURA 5.2 Efecto de la temperatura sobre la actividad de la enzima α -amilasa

En cuanto al perfil de temperatura de la enzima α -glucosidasa se realizó desde 40 °C hasta 90 °C. De acuerdo a la ficha técnica de DANISCO, la temperatura óptima para esta enzima es de 70 °C, una vez que se realizó el ensayo se encontró que la temperatura óptima es de 55 °C teniendo 46,000 U, y puede mantenerse hasta 60 °C ya que se obtienen 44, 000 U, sin embargo, una vez pasando los 60 °C la actividad decae notablemente, como se aprecia en la Figura 5.3 ya que al llegar a 70 °C la enzima pierde cerca del 86 % de su actividad, sucede lo mismo cuando la temperatura se fija por debajo de los 55 °C donde pierde cerca del 36 % de su actividad. Los resultados obtenidos en este ensayo pueden ser comparados con diversos autores como da Silva *et al.*, (2009) quienes evaluaron una α -glucosidasa de *Aspergillus niveus* utilizando almidón comercial como sustrato; Chen *et al.*, (2010) quienes evaluaron la misma enzima proveniente *Aspergillus niger* utilizando pNPG como sustrato y Pandey *et al.*, (2016) quienes realizaron una investigación acerca de las principales características de las α -glucosidasas, concluyendo así que, la temperatura óptima de estas enzimas oscila entre los 50 y 60 °C y que además pueden ser estables por debajo de los 50 °C, esto dependiendo del microorganismo del cual provenga la enzima.

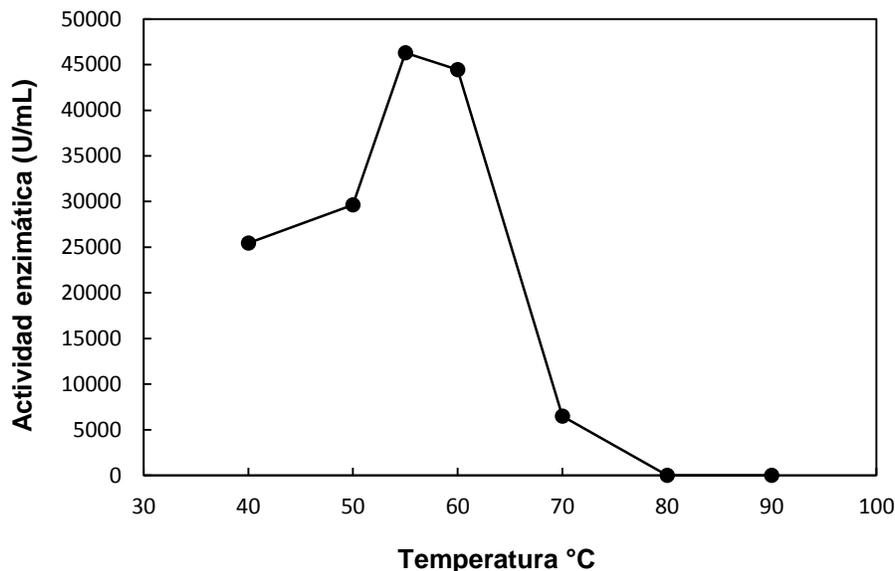


FIGURA 5.3 Efecto de la temperatura sobre la actividad de la enzima α -glucosidasa

5.3.2 Evaluación de la termoestabilidad de las enzimas amilolíticas

Una vez que se encontró la temperatura óptima para cada enzima como se describió en el apartado anterior, se realizó un ensayo de termoestabilidad a partir de las temperaturas en las cuales las enzimas habían presentado actividad enzimática. Para la α -amilasa se realizó el ensayo a 50, 60, 70, 80 y 90 °C, mientras que para la α -glucosidasa se realizó a 50, 55 y 60 °C.

Se encontró que aunque la actividad óptima de la α -amilasa fue de 70 °C solo es estable alrededor de 120 minutos, después de los cuales comienza a disminuir su vida media y en 500 minutos la actividad se pierde completamente, sin embargo, a 50 °C la enzima es estable hasta por 10 días (datos no mostrados) y conserva el 100 % de su actividad a esta temperatura, como se muestra en la Figura 5.4 similar a lo reportado por Burhanoglu *et al.*, (2020) quienes reportaron que la actividad de su α -amilasa decae un 50 % después de 40 minutos a 60 °C y solo se retuvo el 20 % de su actividad cuando se expuso a los 85 °C durante 16 h.

Para la α -glucosidasa la estabilidad coincidió con la temperatura óptima encontrada ya que a 55 °C la enzima permanece estable alrededor de 120 minutos y a los 240 minutos solo retiene el 50 % de su actividad; a 60 °C la actividad decae un 50 % después de 40 minutos y finalmente a 50 °C conserva un 90 % de su actividad durante 120 minutos, y conserva el 60 % de su actividad hasta 300 minutos como se observa en la Figura 5.5. Debido a los resultados encontrados en este ensayo, se concluyó que es posible realizar una licuefacción y sacarificación simultáneas de la harina de cebada utilizando ambas enzimas a 50 °C, con lo cual puede reducirse el consumo energético y el tiempo de hidrólisis e incluso podría ser ventajoso en procesos subsecuentes y poder realizar un proceso de sacarificación y fermentación simultánea.

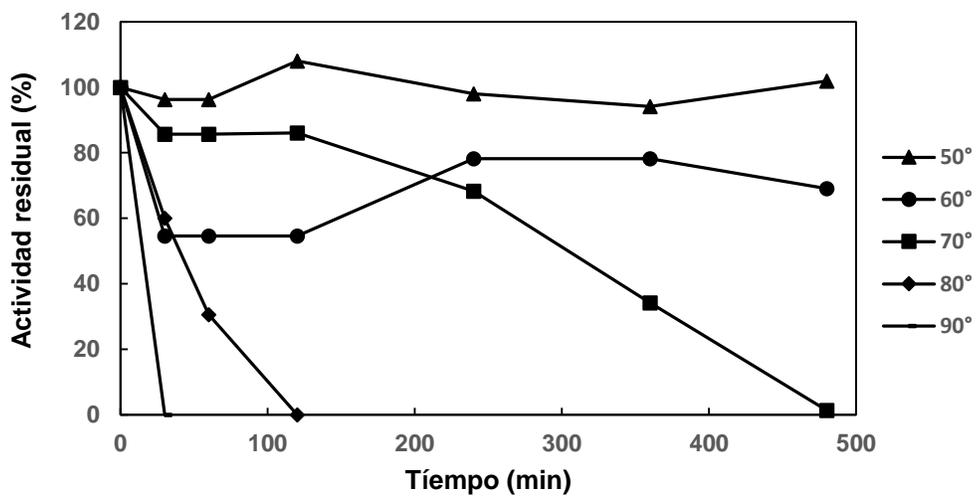


FIGURA 5.4 Termoestabilidad de la enzima α -amilasa

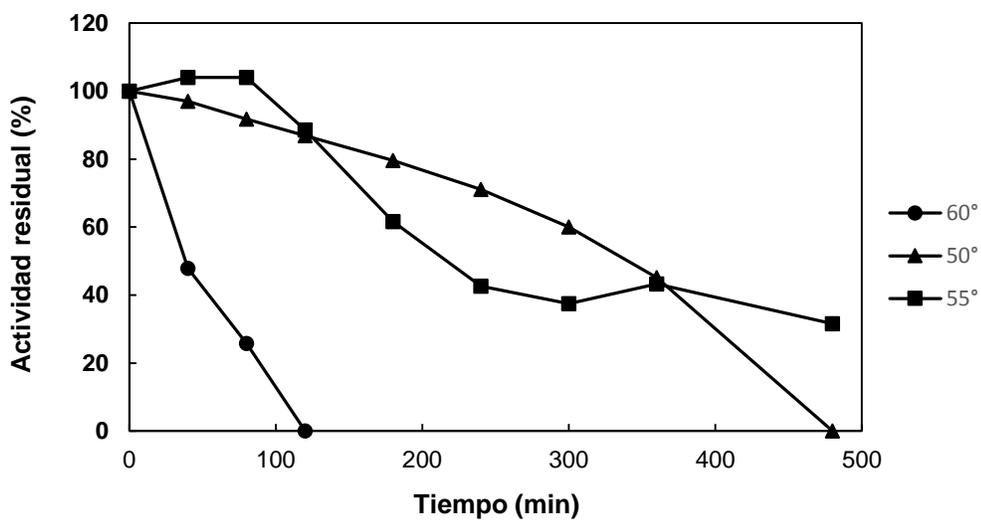


FIGURA 5.5 Termoestabilidad de la enzima α -glucosidas

5.4 Hidrólisis enzimática de harina de cebada

Durante el proceso de sacarificación enzimática de la harina de cebada se busca obtener la mayor concentración de azúcar fermentable (glucosa) derivada del almidón presente en la materia prima mediante el uso de enzimas altamente específicas (α -amilasa y α -glucosidasa) capaces de lisar los enlaces glucosídicos presentes en el polisacárido y liberar maltodextrinas y glucosa, respectivamente. Una vez que se determinó la temperatura óptima en la cual las enzimas amilolíticas son capaces de realizar una licuefacción y sacarificación simultáneas (como se describió en los dos apartados anteriores) se realizó la hidrólisis de la harina de cebada siguiendo el diseño Box-Behnken descrito en la sección de metodología en la Tabla 4.2.

De la cinética realizada a las 15 experimentos con la finalidad de encontrar el mejor tiempo de hidrólisis, se observó que durante las primeras 5 horas evaluadas no se llevó a cabo una gran liberación de glucosa, incluso, este fenómeno fue perceptible a simple vista, ya que la mayoría de los ensayos tenía una consistencia grumosa-pastosa que, incluso, dificultaba la toma de muestra, sin embargo, a partir de las 7 horas de hidrólisis la liberación de glucosa fue más elevada y alcanzo el punto máximo a las 11 horas y se mantuvo, como se muestra en la Figura 5.6; en este punto, el contenido de los 15 matraces estaba completamente licuado y poseían una consistencia totalmente líquida sin presencia de grumos y/o restos sólidos de ningún tipo.

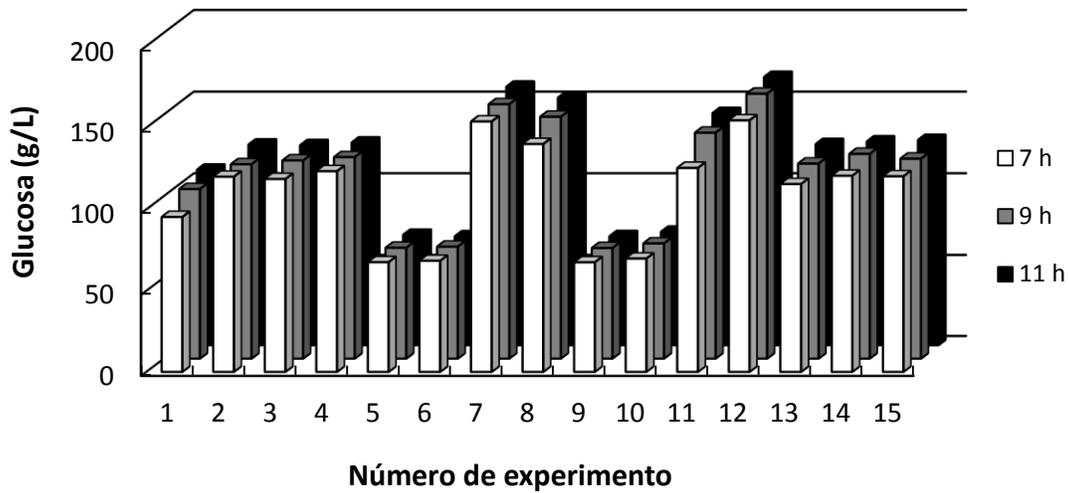


FIGURA 5.6 Evaluación del tiempo de hidrólisis enzimática en harina de cebada con un diseño Box-Behnken.

Una vez fijado el tiempo de hidrólisis, se realizaron de nuevo los ensayos del diseño, esta vez enfocados únicamente en maximizar la concentración de azúcares. En la Tabla 5.3 se muestran los resultados obtenidos de los 15 experimentos del diseño Box-Behnken, previamente descritos en la sección de metodología en la Tabla 4.2.

TABLA 5.2 Concentración de glucosa obtenida mediante el diseño Box-Behnken de la hidrólisis de harina de cebada

Número de experimentos	Valor de las variables			Resultados
	Amilasa (%)	Glucosidasa (%)	Harina (%)	Glucosa (g/L)
1	0.004	0.01	20	95.3 ± 0.17
1	0.012	0.01	20	120 ± 0.02
1	0.004	0.03	20	118.6 ± 0.35
1	0.012	0.03	20	123.4 ± 0.62
1	0.004	0.02	10	67.6 ± 0.16
1	0.012	0.02	10	68.5 ± 0.49
1	0.004	0.02	30	153.8 ± 0.03
1	0.012	0.02	30	140.1 ± 0.2
1	0.008	0.01	10	67.6 ± 0.13
1	0.008	0.03	10	69.9 ± 0.06
1	0.008	0.01	30	125.4 ± 0.08
1	0.008	0.03	30	154.5 ± 0.7
3	0.008	0.02	20	120.4 ± 1
Total		15		

En donde podemos encontrar que la concentración de glucosa más baja fue de 67.6 g/L obtenida en la corrida cinco con 0.004 % de amilasa, 0.02 % de glucosidasa y 10

% de harina y la concentración más elevada fue obtenida en el ensayo 12 con 154.5 g/L utilizando 0.008 % de amilasa, 0.03 de glucosidasa y 30 % de harina.

5.4.1 Optimización de la hidrólisis enzimática de harina de cebada

Una vez obtenidos los resultados de los 15 tratamientos propuestos en el diseño Box-Behnken, los valores se ingresaron para su análisis en el software estadístico Statgraphics Centurión XVI con la finalidad de hallar las condiciones óptimas para lograr obtener la mayor concentración de glucosa usando un valor de significancia de $p < 0.05$. Un modelo cuadrático fue el que mostró mejor ajuste a los datos experimentales obtenidos para maximizar la concentración de glucosa proveniente del almidón presente en harina de cebada.

En el análisis de varianza (ANOVA) se observa que de los efectos principales, los que poseen mayor influencia en el proceso son: la concentración de glucosidasa y mucho más aun la concentración de harina. Las interacciones entre los efectos principales no mostraron significancia, y solamente el efecto cuadrático de la concentración de harina fue significativo como se muestra en la Tabla 5.4. En este caso tres de los efectos poseen un valor-p menor que 0.05 lo que indica que son significativamente diferentes con un nivel de confianza del 95 %.

TABLA 5.3 Análisis de varianza (ANOVA) para la liberación de glucosa en la hidrólisis enzimática de harina de cebada

Fuente	Suma de Cuadrados	GI	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A:Concentración de amilasa	34.0725	1	34.0725	0.63	0.4648
B:Concentración de glucosidasa	421.951	1	421.951	7.75	0.0387
C:Concentración de harina	11267.3	1	11267.3	206.87	0.0000
AA	1.57755	1	1.57755	0.03	0.8715
AB	99.1767	1	99.1767	1.82	0.2351
AC	53.6007	1	53.6007	0.98	0.3667
BB	53.5598	1	53.5598	0.98	0.3669
BC	179.527	1	179.527	3.30	0.1292
CC	417.211	1	417.211	7.66	0.0395
Error total	272.329	5	54.4658		
Total (corr.)	12778.9	14			

La ecuación 5.1 es la que describe el modelo propuesto donde la concentración de la enzima amilasa se expresa en % (v/v), la concentración de la enzima glucosidasa se expresa en % (v/v) y la concentración de la harina está dada en % (p/v), en la ecuación se aprecia la relación entre los tres factores estudiados, sus interacciones y la concentración de la glucosa liberada.

$$\text{Concentración de glucosa (g/L)} = -43.0021 + (5489.58 \times [\text{amilasa}]) + (1905.71 \times [\text{glucosidasa}]) + (7.39708 \times [\text{harina}]) - (40852.9 \times [\text{amilasa}]^2) - (124484 \times [\text{amilasa}] \times [\text{glucosidasa}]) - (91.5156 \times [\text{amilasa}] \times [\text{harina}] - 38086.5 \times [\text{glucosidasa}]^2) + 66.9937 \times [\text{glucosidasa}] \times [\text{harina}] - 0.106299 \times [\text{harina}]^2 \dots\dots\dots \text{Ec. 5.1}$$

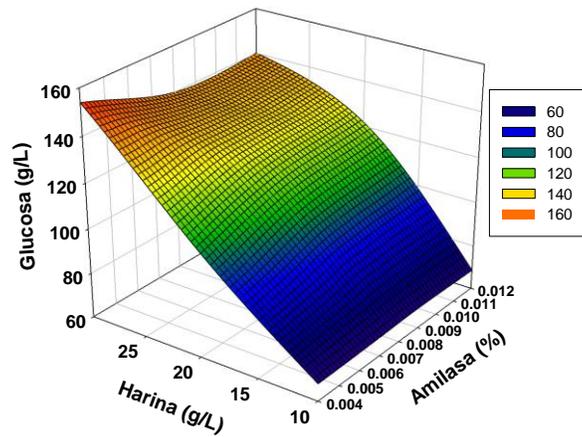
En la Figura 5.7 correspondiente a los gráficos de superficie de respuesta se pueden observar las relaciones entre las variables evaluadas y la respuesta generada. En la Figura 5.7 (a) se encuentra el efecto de la concentración de harina y la concentración

de amilasa sobre la liberación de glucosa, se aprecia que la concentración de amilasa no afecta el proceso por lo que podría ser utilizada en mínima cantidad, mientras que al aumentar la concentración de harina, la reacción se ve ampliamente favorecida.

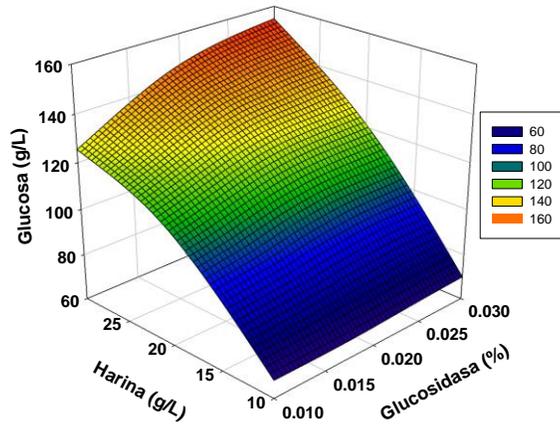
En la Figura 5.7(b) se muestra la interacción entre la concentración de harina y la concentración de glucosidasa, al igual que en la anterior, la concentración de la enzima podría no afectar la reacción, por lo que podría dejarse en los niveles más bajas, no obstante, la concentración de harina juega un papel importante y entre más elevada sea la concentración de la misma, la concentración de la enzima también debe ir en aumento ya que es la responsable de la liberación de los monosacáridos de glucosa. Por lo tanto cuando la concentración de harina sea elevada, la concentración de enzima debe ser superior al 0.020 %.

Por ultimo en la Figura 5.7(c) se representa la interacción entre las concentraciones de ambas enzimas, y se puede observar que cuando ambas están en los niveles más bajos el impacto es notablemente negativo, por lo que la glucosidasa debe permanecer en valores por encima del 0.020 % mientras que la amilasa puede permanecer en un rango de entre 0.004 hasta 0.010, siempre y cuando la concentración de harina sea elevada, ya que como se describió en el ANOVA, es la variable con más peso en el proceso.

(a)



(b)



(c)

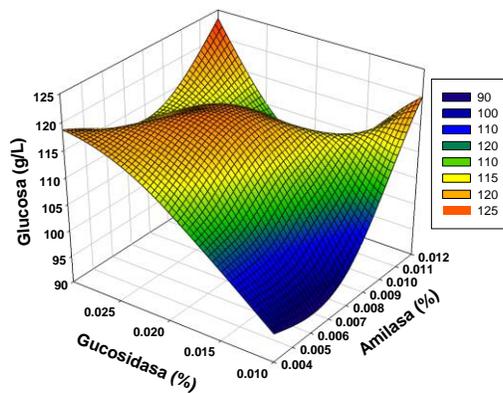


FIGURA 5.7 Gráfico de superficie de respuesta de las interacciones de las variables evaluadas en el proceso de hidrólisis enzimática de harina de cebada: (a) Harina vs amilasa, (b) Harina vs glucosidasa y (c) glucosidasa vs amilasa.

Las condiciones óptimas para obtener la máxima concentración de glucosa arrojadas por el software una vez que se analizaron los datos fueron las siguientes: una concentración de α -amilasa de 0.004 % (v/v), una concentración de α -glucosidasa de 0.020 % y una 30 % para la concentración de harina. El valor del coeficiente de determinación o comúnmente denominado R^2 fue de 0.94, este valor es de suma importancia ya que indica el grado de ajuste de los datos experimentales con el modelo obtenido y este debe ser lo más cercano posible a 1.0.

Bajo las condiciones o soluciones óptimas encontradas por el modelo, se encontró un valor máximo teórico de liberación de glucosa de 161.8 g/L, al realizar la validación experimental con las condiciones mencionadas, el resultado fue una concentración de 160 g/L lo cual representa un 98.8 % del valor teórico predicho. La concentración de glucosa obtenida representa una conversión del 82 % del almidón presente en la harina de cebada.

En trabajos anteriores como el de Nghiem *et al.*, (2010) reportaron una sacarificación del 99 % realizando la hidrólisis utilizando 4 enzimas amilolíticas (α -amilasas, β -glucosidasas, glucoamilasas y proteasas) y temperaturas de 70 y 90 °C; Ndubisi *et al.*, (2015) reportaron datos similares utilizando almidón de sorgo ya que al emplear 5 enzimas (α -amilasas, β -glucanasas, amiloglucosidasas, proteasas y xilanasas) a 65 °C tuvieron una mejora de entre el 66 y 90 % en la sacarificación y la mejora fue únicamente de entre el 5 y 12 % cuando la hidrólisis se realizó a 85 °C; Naguleswaran *et al.*, (2013) reportaron una conversión de 89.4 % en almidón de cebada utilizando un coctel enzimático de dos enzimas, α -amilasa y glucoamilasa a 30 °C durante 72 h; por otro lado, Lu *et al.*, (2020) lograron una conversión de 95.3 % en almidón de cebada utilizando el mismo coctel de α -amilasas y glucoamilasas que el autor anterior, sin embargo, sugiere que la mejora en su proceso se dio debido a la adición de enzimas proteasas en un proceso de prehidrólisis, las cuales son capaces de romper la matriz de proteína y facilitar el acceso a los gránulos de almidón a las enzimas amilolíticas. Debido a lo anterior y a las características de la harina integral obtenida, podría considerarse el uso de enzimas complementarias como xilanasas y

proteasas durante la hidrólisis para este trabajo así como evaluar el efecto de la temperatura y su influencia en el tiempo de hidrólisis ya que en la bibliografía se encuentra en rangos que van desde 5 a 72 h.

5.5 Pretratamiento peróxido-alcálico de paja de cebada

El principal objetivo de lograr un buen pretratamiento alcálico es remover la mayor cantidad de lignina presente en la biomasa, ya que puede generar interacciones improductivas entre las enzimas, impidiendo el acceso de estas a las cadenas principales de celulosa y hemicelulosa y evita su degradación a monosacáridos. En la Tabla 5.5 se muestran los resultados obtenidos después de realizar los 15 experimentos del diseño Box-Behnken descritos previamente en la sección de metodología en la Tabla 4.4.

TABLA 5.4 Porcentaje de remoción de lignina obtenido en cada pretratamiento del diseño Box-Behnken.

Número de experimentos	Valor de las variables			Resultados
	H ₂ O ₂ (%)	T (h)	RLS (mL/g)	Remoción (%)
1	2	15	12	16.4 ± 0.07
1	6	15	12	58.6 ± 0.19
1	2	45	12	35.9 ± 0.44
1	6	45	12	57.5 ± 0.89
1	2	30	8	35.7 ± 0.21
1	6	30	8	58 ± 0.03
1	2	30	16	36.1 ± 0.86
1	6	30	16	55.5 ± 0.89
1	4	15	8	42.8 ± 0.02
1	4	45	8	54.7 ± 0.01
1	4	15	16	49.4 ± 0.05
1	4	45	16	56.2 ± 0.45
3	4	30	12	55.7 ± 0.32
Total			15	

* RLS: Relación líquido-sólido

En la Figura 5.8 se aprecian de manera visual los 15 tratamientos realizados a la paja, en los cuales se observa a simple vista el cambio de coloración y textura de la paja; aquellos tratamientos que resultaron más eficientes son los que contenían la mayor concentración de H₂O₂ utilizado (6 %) y tuvieron mayor tiempo de reacción por lo que presentaron mayor decoloración en el material y un cambio más notorio en cuanto a textura y tamaño de partícula se refiere.



FIGURA 5.8 Tratamientos de deslignificación obtenidos mediante el diseño Box-Behnken.

Se obtuvieron porcentajes de deslignificación que oscilaron desde el 16 % el mínimo (tratamiento 1) utilizando una concentración H_2O_2 del 2 %, una RLS de 12:1 mL/g y un tiempo de 15 horas y el porcentaje más elevado fue de 58.6 % (tratamiento 2) que corresponde a una concentración de H_2O_2 del 6 %, una RLS de 12:1 mL/g con un tiempo de reacción de 15 horas.

5.5.1 Optimización del pretratamiento peróxido-alcálico de paja de cebada

Después de obtener los resultados de los 15 tratamientos, los valores se ingresaron en el software estadístico Statgraphics Centurión XVI con la finalidad de encontrar las condiciones con las cuales se lograra la mayor remoción de lignina usando un valor de significancia de $p < 0.05$. Se obtuvo que un modelo cuadrático es el que mejor se ajustó a los datos experimentales para maximizar el porcentaje de deslignificación en la paja de cebada.

El análisis de varianza (ANOVA) muestra que los factores con mayor influencia durante el proceso para los efectos principales son: la concentración de H₂O₂ y el tiempo de reacción; y ya que se trata de un modelo cuadrático, las interacción que resultó ser significativa es la interacción entre la concentración de H₂O₂ y el tiempo de reacción, como se muestra en la Tabla 5.6.

TABLA 5.5 Análisis de varianza (ANOVA) para la remoción de lignina en el pretratamiento peróxido-alcalino

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A:H₂O₂	444.478	1	444.478	26.54	0.0036
B:TIEMPO	145.802	1	145.802	8.71	0.0319
C:RLS	0.551349	1	0.551349	0.03	0.8631
AA	239.206	1	239.206	14.28	0.0129
AB	117.455	1	117.455	7.01	0.0455
AC	2.09332	1	2.09332	0.12	0.7381
BB	48.0875	1	48.0875	2.87	0.1509
BC	6.26021	1	6.26021	0.37	0.5677
CC	0.470283	1	0.470283	0.03	0.8735
Error total	83.7337	5	16.7467		
Total (corr.)	2075.15	14			

En este caso 4 efectos tienen un valor-p menor que 0.05, indicando que son significativamente diferentes con un nivel de confianza del 95 %.

La ecuación 5.2 es la que se obtuvo para describir el modelo, donde el H₂O₂ se expresa en % v/v, la RLS en mL/g y el tiempo en horas (h) y se puede observar la relación entre los tres factores estudiados, sus interacciones y el porcentaje de remoción de lignina. También se observa que el porcentaje de remoción se ve ampliamente favorecido cuando la concentración de peróxido es más elevada, así como el tiempo de reacción, aunque en menor medida; ya que la eficiencia del pretratamiento peróxido-alcalino depende en gran medida de los potentes radicales derivados del H₂O₂, el radical hidroxilo, el anión hidroperoxil y el radical anión superóxido, respectivamente (Ho *et al.*, 2019).

% de remoción lignina: $-60.797 + (29.2668 \times [\text{H}_2\text{O}_2]) + (2.23496 \times \text{Tiempo}) + (0.639691 \times \text{RLS}) - (2.01223 \times [\text{H}_2\text{O}_2]^2) - (0.180628 \times [\text{H}_2\text{O}_2] \times \text{Tiempo}) - (0.0904269 \times [\text{H}_2\text{O}_2] \times \text{RLS}) - (0.0160393 \times \text{Tiempo}^2) - (0.0208503 \times \text{Tiempo} \times \text{RLS}) + (0.0223054 \times \text{RLS}^2)$ **Ec. 5.2**

La relación entre la respuesta y las variables evaluadas se observa en la Figura 5.9 con los gráficos de superficie de respuesta donde puede apreciarse el efecto de la concentración de H_2O_2 y el tiempo de reacción sobre la remoción de lignina (Figura 5.9 a ya que a mayor concentración de H_2O_2 y mayor tiempo de reacción la remoción de lignina incrementa como se había comentado anteriormente, y, si ambas son disminuidas también lo hace el porcentaje de remoción, sin embargo, también se observa que mientras el porcentaje de H_2O_2 se mantenga elevado, el tiempo puede mantenerse en un rango de entre 20 y 35 horas sin mostrar cambios drásticos en la deslignificación.

La interacción de la RLS y la concentración de H_2O_2 también posee influencia en la deslignificación, ya que a mayor concentración de H_2O_2 y una RLS elevada, la remoción es mejor, sin embargo, la RLS puede mantenerse en un rango de entre 12:1 y 16:1 y la remoción de lignina no se ve afectada en gran medida, siempre y cuando la concentración de H_2O_2 sea elevada, de lo contrario si ambas se llevaran sus niveles mínimos, impactaría de manera negativa en el pretratamiento, como se muestra en la Figura 5.9 b.

Finalmente el efecto generado por la interacción de la RLS y el tiempo de reacción es la que presentó la menor influencia en la deslignificación, ya que como se observó en el ANOVA y la ecuación, la RLS es la que posee menor influencia en el proceso, sin embargo, sí ambos son disminuidos a sus niveles más bajos, comienza a visualizarse un efecto negativo en la deslignificación (Figura 5.9 c).

Las condiciones óptimas obtenidas por el software para la máxima remoción de lignina a partir de la optimización realizada fueron: Concentración 6 % (v/v) de H₂O₂, RLS 16:1 mL/g y 24 horas de reacción. No obstante, tomando como referencia los gráficos de superficie de respuesta, se probó una RLS menor, 12:1 mL/g, se sustituyó el valor en la ecuación y no se registró cambio alguno en el resultado esperado, por lo que se fijó dicha RLS.

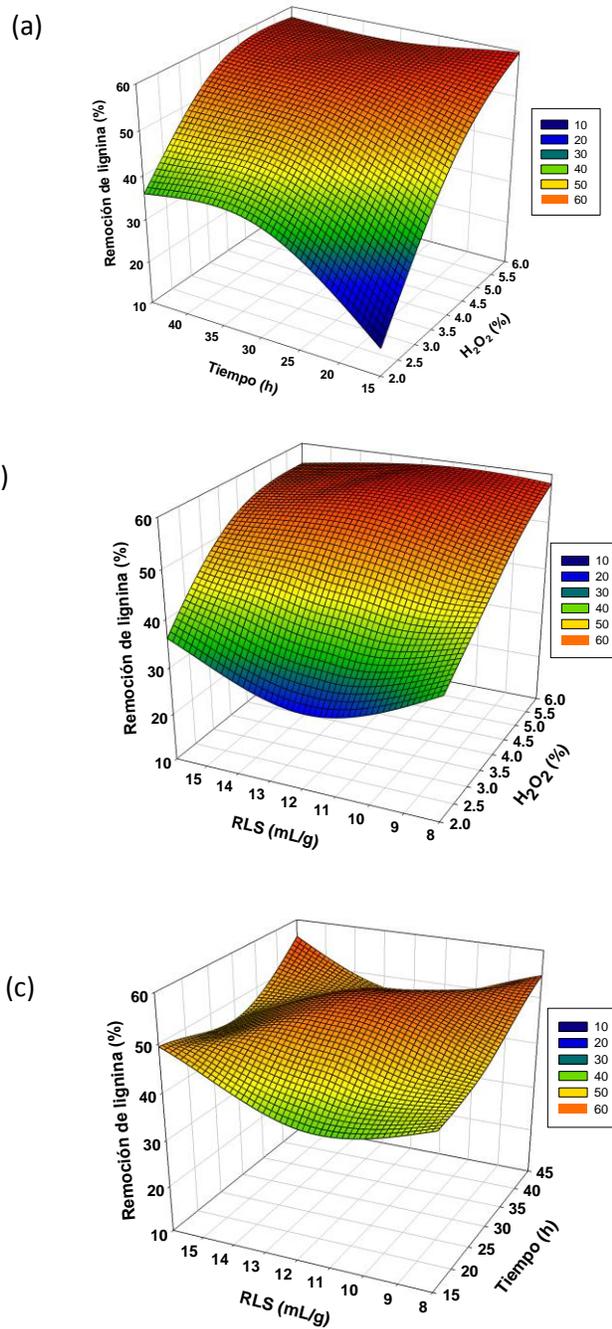


FIGURA 5.9 Gráfico de superficie de respuesta de las interacciones de las variables evaluadas en el proceso de deslignificación de paja de cebada: (a) H_2O_2 vs tiempo, (b) Tiempo vs relación líquido-sólido (RLS) y (c) H_2O_2 vs relación líquido-sólido (RLS).

El valor del coeficiente de determinación (R^2) el cual es una medida del grado de ajuste del modelo obtenido, fue de 0.959 lo cual es satisfactorio ya que un buen ajuste debe tener por lo menos una R^2 de 0.8 (Qiu *et al.*, 2014). Bajo las condiciones óptimas arrojadas por el modelo, se encontró un valor máximo teórico de remoción del 60.19 %, al realizar la validación experimental se logró remover un 59.96 % de lignina lo cual representa un 99.6 % del valor teórico predicho. De esta manera se logró reducir el contenido de lignina inicial presente en la paja de cebada, pasando de un 18 % de lignina en la paja cruda a 7.6 % al final del pretratamiento alcalino.

El porcentaje de deslignificación alcanzado está dentro de los valores máximos reportados para el método peróxido-alcalino bajo condiciones similares de operación, ya que se han reportado remociones máximas de entre 60 y 62 % (Duque *et al.*, 2014; Chang *et al.*, 2018). Así, el porcentaje de deslignificación obtenido es bastante significativo, tomando en cuenta que se realizó en condiciones no extremas de operación como altas temperaturas o presiones y sin pretratamiento previos como hidrólisis ácidas, pre-extracciones, o algún otro; ya que en otros trabajos como el de Yuan *et al.*, (2018) quienes reportaron una buena producción de etanol con paja de trigo utilizando una pre-extracción con NaOH a 30 °C durante 6 horas, seguido del pretratamiento peróxido-alcalino a 50 °C durante 15 h; Mittal *et al.*, (2017) con rastrojo de maíz, lograron una deslignificación del 80 % después de 3 h de pretratamiento a 50 °C, Morone *et al.*, (2017) quienes alcanzaron un 77.29 % de remoción en paja de arroz con 190 °C, 6 bar y 0.5 % de peróxido, Díaz *et al.*, (2014) con cascarilla de arroz logró un 98.5 % de sacarificación después de utilizar el pretratamiento peróxido-alcalino a 90 °C, 30 bar, 3 % de H_2O_2 durante 30 minutos.

De acuerdo a los trabajos anteriores se infiere que la temperatura del proceso influye en el tiempo de reacción, ya que a mayor temperatura menor es el tiempo de reacción, si bien representa una ventaja, también representa un riesgo importante, porque una vez que se incrementa la temperatura y presión comienzan a degradarse

los azúcares presentes en la celulosa y hemicelulosa, como lo reportado por Álvarez-Vasco y Zhang (2013) quienes mejoraron su proceso de deslignificación peróxido-alcalino en un 22 % aumentando la temperatura a 180 °C, sin embargo, removieron 78 % de los glucomanos presentes en la hemicelulosa y así como un 30 % de celulosa, lo que repercute en los procesos subsecuentes de hidrólisis enzimática y fermentaciones alcohólicas.

Durante el proceso de pretratamiento peróxido-alcalino propuesto en este trabajo no se detectaron compuestos inhibitorios como ácido acético que se forma principalmente a altas temperaturas derivado de los grupos acetilo presentes en la hemicelulosa, autores como Li *et al.*, (2016) y Morone *et al.*, (2017) reportaron las concentraciones máximas de ácido acético obtenidas utilizando este pretratamiento oscilan entre 1.15 y 1.2 g/L.

La concentración máxima de glucosa encontrada en el líquido proveniente del pretratamiento fue de 0.8 g/L, mientras que xilosa, furfural y 5-hidroximetilfurfural no fueron detectados, lo que sugiere que durante el pretratamiento no hay degradación de azúcares o esta es muy mínima, por lo que no es necesaria una etapa de detoxificación con este pretratamiento, caso contrario a lo que sucede con otros pretratamientos como la hidrólisis ácida (Delfín *et al.*, 2019).

Por lo anterior, la utilización del pretratamiento peróxido-alcalino en paja de cebada para la producción de etanol de segunda generación representa una opción prometedora y viable para el proceso.

5.6 Hidrólisis enzimática de paja de cebada pretratada

Una vez que se te pretrató la paja de cebada utilizando las mejores condiciones halladas en el apartado anterior, se realizó la hidrólisis enzimática del material ya que en la etapa de pretratamiento fue removida la mayor cantidad posible de lignina, quedando únicamente disponible en el material celulosa y hemicelulosa.

En el proceso de hidrólisis enzimática o sacarificación enzimática de residuos agroindustriales (lignocelulósicos) se aprovecha la bioespecificidad característica de las enzimas celulolíticas sobre un enlace químico particular para generar productos de interés. En este caso las celulasas, celobiasas y xilanasas se encargan de lisar el enlace glucosídico de la celulosa para generar glucosa y del xilano (componente principal de la hemicelulosa) para obtener xilosa.

En este estudio, una vez que la paja de cebada previamente tratada fue sometida a hidrólisis enzimática siguiendo un diseño experimental Box-Behnken. En la Tabla 5.7 se concentran los resultados obtenidos después de realizar los 15 tratamientos descritos en la sección de metodología en la Tabla 4.6, en la siguiente tabla se observan tanto la concentración de azúcares fermentables totales obtenidos así como la conversión de la celulosa alcanzada.

TABLA 5.6 Porcentaje de conversión y contenido de azúcares fermentables obtenidos en la hidrólisis enzimática mediante el diseño Box-Behnken

Número de experimentos	Valor de las variables			Resultados	
	Ctec (%)	Htec (%)	T (h)	Conversión (%)	Azúcares fermentables (g/L)
1	2	2	30	66.2 ± 0.4	59.6 ± 0.3
1	6	2	30	77.8 ± 0.6	70.6 ± 0.4
1	2	6	30	78.6 ± 0.1	68.6 ± 0.1
1	6	6	30	69.0 ± 0.1	60.9 ± 0.1
1	2	4	15	70.0 ± 0.3	64.3 ± 0.2
1	6	4	15	82 ± 0.5	77.9 ± 0.4
1	2	4	45	74.2 ± 1.5	68.2 ± 1.0
1	6	4	45	77.8 ± 0.7	69.7 ± 0.5
1	4	2	15	71.1 ± 0.7	65.6 ± 0.5
1	4	6	15	76.1 ± 0.4	70.6 ± 0.3
1	4	2	45	77.5 ± 1.0	69.1 ± 0.7
1	4	6	45	79.1 ± 0.2	69.7 ± 0.1
3	4	4	30	80.6 ± 0.0	73.5 ± 0.0
Total		15			

Se obtuvieron concentraciones que oscilaron desde los 40 y 17 g/L de glucosa y xilosa respectivamente, hasta los 53 y 24 g/L de glucosa y xilosa, con porcentajes de conversión desde el 66 % (tratamiento 1) utilizando una concentración de celulasas (CTec III) de 2 %, una concentración de xilanasas (HTec III) de 2 % y 30 horas de reacción, mientras que la más alta conversión fue del 82 % (tratamiento 6) con una

concentración de celulasas de 6 %, una concentración de xilanasas de 4 % y 20 horas.

En la Figura 5.10 se observan las muestras obtenidas después de ser sometidas a la hidrólisis enzimática, si bien a simple vista no se logra apreciar diferencia alguna en cuanto a la concentración de los azúcares, es necesario remarcar que en los 15 experimentos se logró una licuefacción completa del material, ya que no se apreciaban fibras de gran tamaño, ni aglomerados de ningún tipo dentro de los matraces e incluso al ser filtrados con un colador convencional de malla fina, todo el líquido se filtró y no se recuperó sedimento alguno.



FIGURA 5.10 Hidrólisis enzimática de la paja de cebada pretratada

5.6.1 Optimización de la hidrólisis enzimática de paja de cebada pretratada

Al igual que en el apartado anterior, después de obtener los resultados de los 15 tratamientos, los valores se introdujeron en el software Statgraphics Centurión XVI con la finalidad de encontrar las condiciones bajo las cuales la celulosa y

hemicelulosa contenidas en la paja de cebada pretratada lograran la máxima conversión a glucosa y xilosa, respectivamente. Usando un valor de significancia de $\rho < 0.05$. Se obtuvo que un modelo cuadrático es el que mejor se ajustó a los datos experimentales para maximizar el porcentaje de conversión de polisacáridos presentes en la paja de cebada pretratada.

El análisis de ANOVA realizado para esta etapa nos muestra que ninguno de los efectos principales fue significativo, mientras que la interacción entre las celulasas y las xilanasas resultó ser significativa como se muestra en la Tabla 5.8 En este caso la interacción de ambas enzimas tiene un valor p menor que 0.05, lo que indica que es significativamente diferente con un nivel de confianza del 95 %.

TABLA 5.7 Análisis de varianza (ANOVA) para la hidrólisis enzimática de la paja de cebada pretratada

Fuente	Suma de Cuadrados	GI	Cuadrado Medio	Razón -F	Valor-P
A:CTec 3	52.5312	1	52.5312	4.86	0.0787
B:HTec	13.005	1	13.005	1.20	0.3228
C:Tiempo	5.28125	1	5.28125	0.49	0.5158
AA	44.2667	1	44.2667	4.09	0.0990
AB	112.36	1	112.36	10.39	0.0234
AC	31.9225	1	31.9225	2.95	0.1464
BB	66.3006	1	66.3006	6.13	0.0561
BC	2.89	1	2.89	0.27	0.6272
CC	0.628269	1	0.628269	0.06	0.8191
Error total	54.0675	5	10.8135		
Total (corr.)	374.969	14			

En este caso también se eligió un modelo cuadrático para ajustar los datos experimentales y maximizar el porcentaje de conversión de celulosa a glucosa en la paja de cebada. Se obtuvo una ecuación para el modelo (Ecuación 3.2), donde la concentración de celulasas y xilanasas se expresa en % (p/p) y el tiempo de reacción esta dado en horas (h) y se puede observar la relación entre los tres factores, sus interacciones y el porcentaje de conversión. También se observa que el porcentaje de conversión se ve favorecido con el aumento en la concentración de enzimas celulasas, seguido de la concentración de xilanasas y la interacción entre ambas.

$$\% \text{ Conversión} = -2.9373 + (17.4725 \times \text{CTec } 3) + (15.9585 \times \text{HTec } 3) + (0.747202 \times \text{Tiempo}) - (0.93696 \times \text{CTec } 3^2) - (1.33872 \times \text{CTec } 3 \times \text{HTec}3) - (0.095212 \times \text{CTec } 3 \times \text{Tiempo}) - (1.12137 \times \text{HTec}3^2) - (0.0281599 \times \text{HTec}3 \times \text{Tiempo}) - (0.00285457 \times \text{Tiempo}^2) \dots \dots \dots \text{ Ec. 3.2}$$

En los gráficos de superficie de respuesta de la Figura 5.11 se observa la relación entre las variables estudiadas y la variable de respuesta. En la Figura 5.11a se observa la interacción entre las enzimas celulasas y xilanasas, la cual, es la interacción que posee mayor influencia durante el proceso como se expuso antes en el ANOVA debido a que la composición de la paja deslignificada posee cerca del 90 % de holocelulosa (celulosa y hemicelulosa) y ambas enzimas son responsables de la hidrólisis de dichos polisacáridos; también se observa que es necesaria una concentración superior al 4 % de celulasas para mejorar la hidrólisis, mientras que para las xilanasas se puede conservar una concentración media de entre 3 y 4 %.

En la Figura 5.11b se tiene el efecto del tiempo y la concentración de celulasas, donde es evidente que no es necesario un largo tiempo de hidrólisis siempre y cuando la concentración de celulasas se mantenga elevada. Si la concentración de celulasas se disminuye es necesario aumentar notablemente el tiempo de reacción, y, si ambas variables se mantienen en sus niveles más bajos el proceso se ve afectado negativamente.

Finalmente en la Figura 5.11c se muestra la interacción entre el tiempo de reacción y la concentración de las xilanasas, donde se observa un comportamiento similar al anterior puesto que no es necesario un tiempo prolongado de hidrólisis, sin embargo, pareciera que la concentración de las xilanasas debe aumentarse para mejorar los rendimientos, no obstante, este sería el caso sí la reacción solo dependiera de esta interacción pero como se explicó en la Figura 5.11a, la interacción más importante está dada por ambas enzimas.

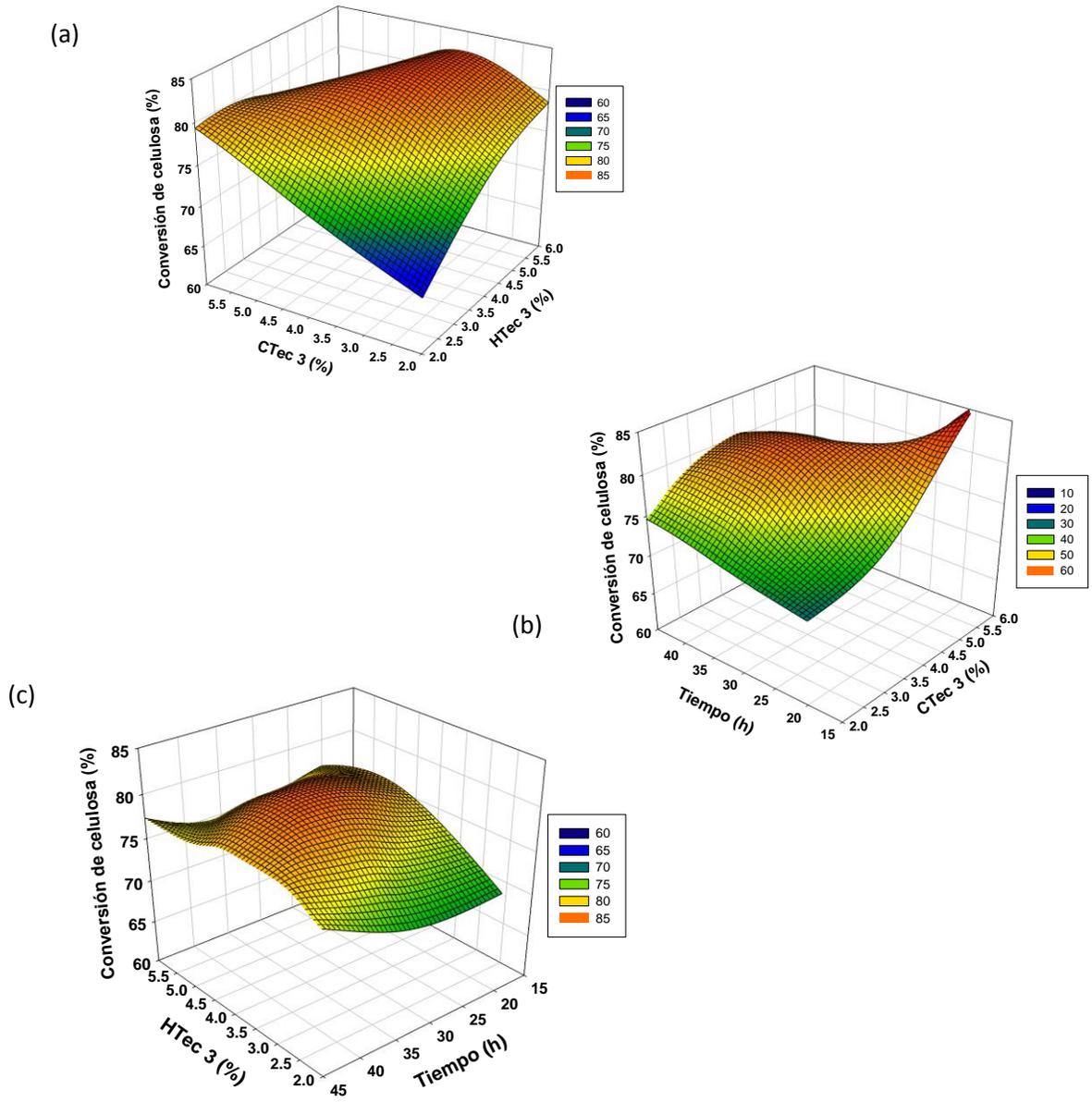


FIGURA 5.11 Gráfico de superficie de respuesta de las interacciones de las variables evaluadas en el proceso de hidrólisis enzimática de paja de cebada pretratada: (a) [CTec3] vs [HTec3], (b) [CTec3] vs Tiempo y (c) [CTec3] vs Tiempo.

Las condiciones óptimas encontradas por el software para la máxima conversión de celulosa a partir de la optimización realizada son: Concentración de celulasas (Cellic CTec III) 6 %, concentración de xilanasas (Cellic HTec III) de 3 % y 20 horas de reacción. El coeficiente de correlación (R^2) obtenido fue de 0.86, lo que representa un buen ajuste. Bajo las condiciones óptimas arrojadas por el modelo, se encontró un valor máximo teórico de 82 %, al realizar la validación experimental se logró alcanzar una conversión de celulosa de 81.89 % lo que representa un 99.8 % del valor teórico predicho.

Cabe resaltar que las condiciones óptimas de hidrólisis enzimática obtenidas en este trabajo son favorables ya que el tiempo de reacción fue únicamente de 20 horas comparado con trabajos donde se realiza un proceso similar con paja de cebada u otro material lignocelulósico y los tiempos de hidrólisis oscilan entre 48, 72 o 120 horas (Guarneros-Flores *et al.*, 2016; Vargas *et al.*, 2015) de igual manera se logró disminuir tanto la cantidad de enzimas utilizadas ya que se ha reportado el uso de hasta tres enzimas distintas así como la adición surfactante para mejorar la conversión y concentración de glucosa y xilosa obtenidos en paja de cebada (Yang *et al.*, 2015); así como la dosis enzimática ya que en algunos trabajos se han utilizado concentraciones de 6 a 9% de las mismas enzimas (Cellic CTec III y HTec III respectivamente) logrando una conversión del 80 % en bagazo de agave y caña de azúcar (Velázquez-Valadez *et al.*, 2016; Guarneros-Flores *et al.*, 2016). De igual manera es importante mencionar que durante la hidrólisis no se detectaron compuestos inhibitorios secundarios como el ácido acético, furfural o 5-hidroximetilfurfural; este hecho resulta ventajoso con respecto a la hidrólisis efectuada con ácidos como el ácido sulfúrico que debido a las características del proceso como altas temperaturas y exposición prolongada, las hexosas y pentosas presentes se degradan furfural y 5- hidroximetilfurfural, compuestos que podrían acarrear desventajas a procesos subsecuentes como la fermentación (Delfín-Ruíz *et al.*, 2019).

5.6.2 Efecto de la adición de surfactantes en la hidrólisis enzimática de paja de cebada pretratada

Una vez obtenidas las condiciones óptimas de hidrólisis enzimática y haber validado de manera experimental el resultado obtenido, se probaron dos surfactantes con la finalidad de evaluar el efecto en la mejora de los rendimientos de hidrólisis, dichos surfactantes fueron: Polivinilpirrolidona (PVP) y Tween 20 con 6 % de celulasas, 3 % de xilanasas y 20 horas de hidrólisis a 50 °C (mismas condiciones óptimas establecidas en el apartado anterior).

El contenido de azúcares fermentables de las muestras evaluadas fue el siguiente: en la prueba que contenía 2 g/L de Tween se obtuvo un total de 58.3 g/L de glucosa y 22.3 g/L de xilosa; en la prueba con 20 g/L de Tween el contenido de glucosa fue de 55.4, mientras que de xilosa fue de 20.6 g/L; mientras que en la pruebas realizadas con PVP a 1 g/L el resultado fue de 55.4 g/L de glucosa y 21.4 g/L de xilosa; y para PVP 2 g/L fue de 57.3 g/L de glucosa y 22.5 g/L de xilosa. Mientras la prueba control de mantuvo en 57.5 g/L de glucosa y 22.13 g/L de xilosa como se muestra en la Figura 5.12 donde también se puede apreciar que la concentración de ambos azúcares en todas las pruebas permanece prácticamente constante, no se apreció aumento o disminución en las concentraciones, por lo que podría decirse que no existe algún efecto en la adición de surfactantes durante la hidrólisis enzimática de la paja de cebada pretratada. Solo el ensayo realizado con 2 g/L de Tween registró un ligero incremento con respecto al control, dicho incremento corresponde a una mejora en la concentración de glucosa equivalente a 1.3 %. Caso contrario a lo reportado por otros autores como Yang *et al.*, (2015) quienes reportaron una mejora de 50 y 90 % en el rendimiento de glucosa y xilosa, respectivamente utilizando polietilenglicol (PEG) como surfactante con Celluclast y Novozyme 188; Rocha-Martín *et al.*, (2017) reportaron un incremento de en la hidrólisis enzimática de rastrojo de maíz pretratado, bagazo de caña y celulosa microcristalina de 10, 7.5 y 32 % respectivamente, utilizando un cóctel enzimático de *M. thermophila* y polietilenglicol 4000 como surfactante; Menegol *et al.*, (2014) reportaron una mejora del 39 % en la concentración de glucosa utilizando Tween con un extracto enzimático

de *P. echinulatum* en hierba de elefante pretratada; Cai *et al.*, (2017) lograron incrementar 2.5 veces más la digestibilidad en madera de pino y eucalipto pasando de 28.9 a 73.4 % utilizando la enzima Cellic CTec 2 y PVP como surfactante; finalmente Chen *et al.*, (2018) trabajaron con paja de trigo pretratada, la enzima Cellic CTec 2 y Tween 20 teniendo como resultado una mejora del 23 % durante la hidrólisis enzimática, sin embargo, este último autor también explica que el tipo de pretratamiento empleado en el material lignocelulósico influye en el efecto de surfactantes durante la hidrólisis enzimática; ya que los surfactantes muestran una mejora significativa en sustratos pretratados con ácidos que en aquellos con pretratamientos oxidativos, lo cual puede explicar el escaso o nulo efecto de los surfactantes durante la hidrólisis enzimática de este trabajo. Aunado a lo anterior, el efecto nulo de los surfactantes en este trabajo también podría ser explicado por el tipo de enzimas utilizadas, ya que las enzimas de última generación Cellic CTec III y Cellic HTec III fueron especialmente diseñadas para la producción de etanol de segunda generación y de acuerdo a la información proporcionada por la empresa Novozymes, la formulación de las enzimas contiene estabilizantes (no especificados) que garantizan la integridad de las enzimas, caso contrario a lo que sucede con cocteles enzimáticos puros, o enzimas comerciales no específicas para la producción de etanol 2G las cuales pueden verse afectadas debido a las características del proceso como el esfuerzo cortante, la temperatura de proceso, el tiempo alargado de hidrólisis o la naturaleza y compleja estructura de los sustratos (Al-Azkawi *et al.*, 2020).

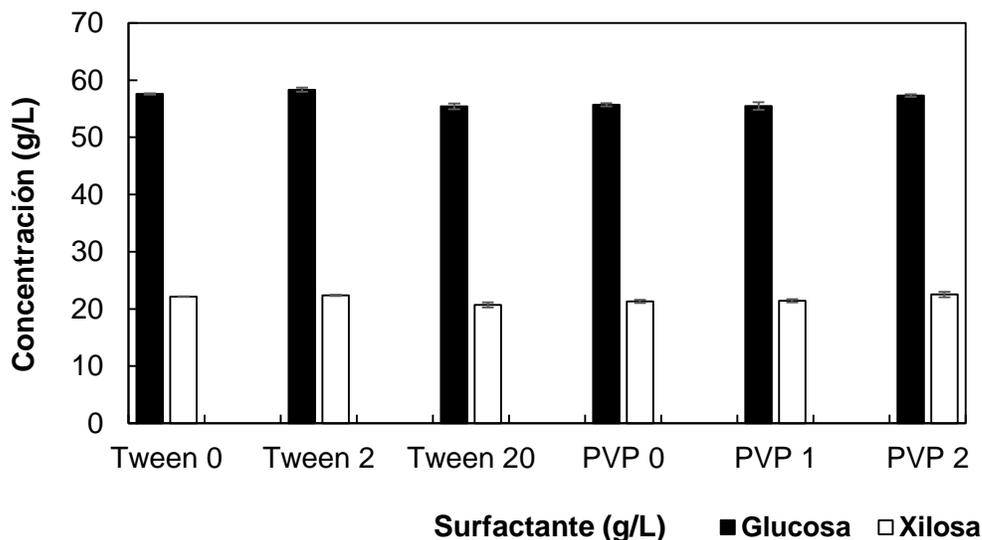


FIGURA 5.12 Efecto de la adición de surfactantes en la concentración de glucosa y xilosa durante la hidrólisis enzimática de la paja de cebada pretratada.

5.7 Caracterización macro y microscópica de la paja de cebada

Mediante la técnica de microscopía electrónica de barrido se logró apreciar los cambios evidentes sufridos en la morfología de la paja de cebada después de cada etapa del proceso. En la Figura 5.13a en una fotografía convencional del lado izquierdo, se observa la paja de cebada sin ningún pretratamiento con el color y morfología características de la paja; en la micrografía (lado derecho) se observa la estructura organizada y característica del material lignocelulósico con las fibras de celulosa alargadas, estructuradas y bien definidas envueltas por un entramado formado por hemicelulosa y lignina cuya estructura se asemeja al de una red, ya que estos polímeros son altamente ramificados y carecen de una estructura definida (Hatakeyama *et al.*, 2009). En la Figura 5.13b (lado izquierdo) se aprecia la paja de

cebada una vez que ha pasado por la etapa de tratamiento alcalino; macroscópicamente se aprecia un notable cambio de color en el material y una reducción en el tamaño de partícula, así como un cambio en la textura de las fibras que tienen una apariencia algodonosa con fibras más expuestas y suaves, hecho que concuerda con lo reportado por Li *et al.*, (2016) ya que demostraron que las fibras de rastrojo de maíz después del pretratamiento peróxido-alcalino presentan una coloración transparente o incolora así como una notoria reducción en el tamaño de partícula. En la micrografía correspondiente al pretratamiento alcalino se observan fibras de celulosa con una estructura más laxa, menos rígida y más porosa, este hecho se atribuye al efecto del pretratamiento peróxido-alcalino que contribuyó al colapso de la estructura supramolecular de la biomasa con finalidad es disociar el complejo celulosa-lignina así como reducir la cristalinidad de la celulosa favoreciendo así el acceso de las enzimas al interior de la fibra durante la hidrólisis enzimática (Chang *et al.*, 2018, Qi *et al.*, 2019). Finalmente en la Figura 5.13c (izquierda) se puede observar el residuo proveniente de la hidrólisis enzimática, en este ya no se aprecia alguna estructura definida solo material granulado y amorfo. En la imagen MEB se aprecia también un material sin estructura definida, únicamente gránulos aislados, dicho material se atribuye a restos de celulosa cristalina que no fue hidrolizada así como a la lignina residual.

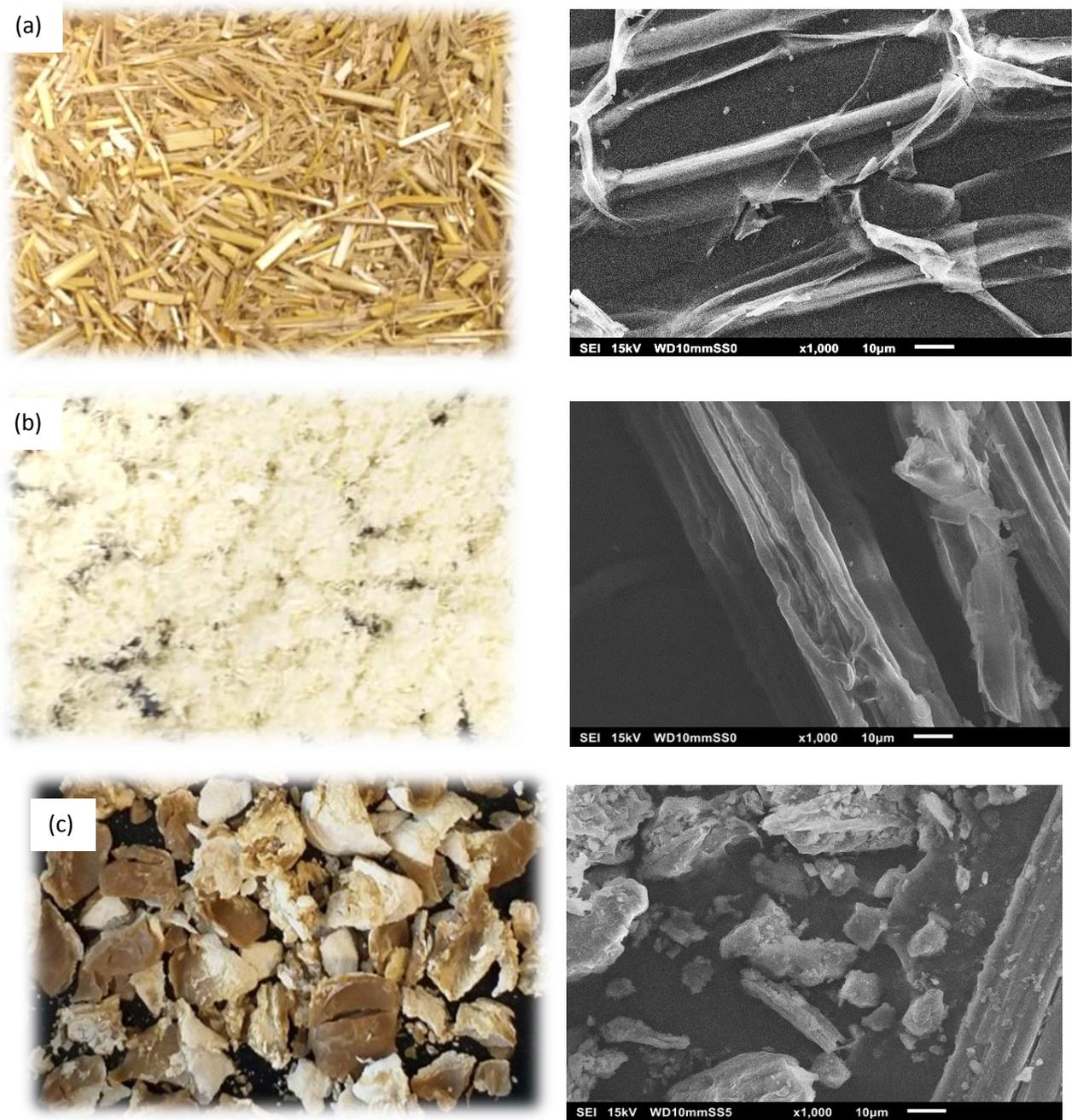


FIGURA 5.13 Imágenes y MEB de paja de cebada. (a) paja de cebada sin pretratamiento, (b) paja de cebada con pretratamiento alcalino y (c) paja de cebada con pretratamiento alcalino e hidrólisis enzimática (agotado enzimático).

5.7.1 Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)

Con la técnica de espectroscopia infrarroja se logró identificar los grupos funcionales presentes en la materia prima después de las etapas de proceso. En este caso enfocado a la estructura de los grupos funcionales correspondientes a la lignina

En la Figura 5.14 se observa es espectro de la materia prima en cada una de las etapas del proceso, mostrando el comportamiento típico y característico del material lignocelulósico. En el espectro se pueden apreciar los cambios sufridos en la estructura de la lignina principalmente y se distinguen algunas regiones importantes donde se encuentran las señales más intensas como se describe a continuación.

La primera región comprendida en un ancho de banda de 3415 cm^{-1} atribuida a los grupos hidróxilo (estiramiento de los enlaces O-H) en las estructuras alifáticas y fenólicas. En el rango de 2859 a 3000 cm^{-1} las señales corresponden al estiramiento de los de los enlaces C-H presentes en grupos metoxilo y metileno (Espinosa *et al.*, 2017). En este caso el pico correspondiente al residuo de la hidrólisis enzimática presenta mayor intensidad así como una deformación del mismo comparado con los dos materiales restantes, debido al hecho de que en el residuo ya no se tiene una composición específica definida y se encuentran fragmentos de lignina y celulosa cristalina.

La señales comprendidas de 1653 a 1720 cm^{-1} corresponden a los estiramiento de los grupos carbonilos presentes en los ácidos hidroxicinámicos y anillos aromáticos característicos de la lignina, principalmente el ácido *p*-cumárico y el alcohol coniferílico. En las regiones comprendidas entre 1429 y 1512 cm^{-1} también se encuentran vibraciones correspondientes al esqueleto aromático de lignina (Oliva-Taravilla *et al.*, 2015; Borrego-López *et al.*, 2019).

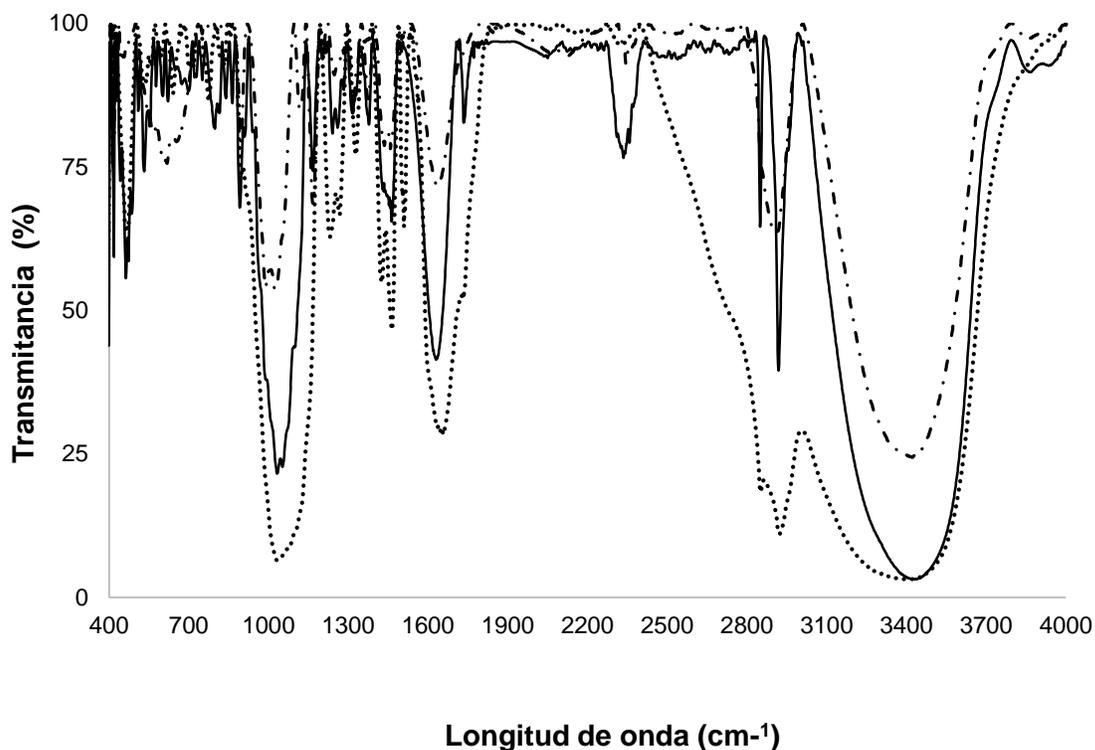


FIGURA 5.14 Espectro IR de la paja de cebada con diferentes tratamientos. Paja sin pretratamiento —, paja con pretratamiento alcalino - - - y paja con pretratamiento alcalino e hidrólisis enzimática (agotado enzimático).

También se encuentran señales relacionadas a las vibraciones de anillos aromáticos y grupos carboxilo como el éster ρ -cumárico en la región de $1035 - 1165 \text{ cm}^{-1}$. Por último tenemos la región de $1024 - 1089 \text{ cm}^{-1}$ donde se pueden identificar estructuras de aril éter y fenoxi atribuidos a alcoholes primarios del tipo guayacil y siringuil (Sun *et al.*, 2011; Borrego-López *et al.*, 2019).

En los casos anteriormente mencionados es preciso destacar que el material con pretratamiento peróxido-alcalino es el que mostró menor intensidad en los picos lo que se atribuye a la considerable disminución en la cantidad de lignina presente en el material; ya que dicho polímero se ve fuertemente afectado debido a los oxidantes producidos por el peróxido a un pH elevado. Por si solo el peróxido es capaz de oxidar la parte alifática de la lignina, y una vez que el peróxido se disocia en un pH

elevado se produce el anión hidroperoxil (HOO^-), responsable de la oxidación de los grupos carbonilo y etileno en la lignina. De igual manera, derivados del peróxido se tienen el radical hidroxilo (HO^\bullet) y el anión radical superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$) los cuales son potentes oxidantes que actúan sobre estructuras importantes de la lignina como anillos aromáticos y compuestos fenólicos (Ho *et al.*, 2019). Por último el material que mostró una mayor cantidad de dicho componente fue el residuo proveniente de la hidrólisis enzimática, el cual está compuesto en su mayoría por lignina y/o residuos de la misma así como restos de celulosa cristalina que no fue hidrolizada. Por lo anterior se puede concluir que el pretratamiento aplicado a la paja de cebada tuvo el efecto deseado, disminuir la cantidad de lignina así como dejar de manera más expuesta las fibras de celulosa para la acción enzimática, de igual manera las condiciones de la hidrólisis enzimática fueron favorables ya que las fibras de celulosa y hemicelulosa fueron completamente reducidas dejando únicamente fragmentos aislados de material no soluble (lignina o celulosa cristalina).

5.8 Fermentaciones

5.8.1 Fermentación por lote con hidrolizado de harina y *Saccharomyces cerevisiae* ITV-01

El hidrolizado enzimático proveniente de la harina de cebada fue inoculado con la levadura *S. cerevisiae* ITV01 como se describió en la sección de metodología y fue monitoreado durante 24 horas. En la Figura 5.15 se muestran los perfiles de concentración de glucosa y etanol a lo largo de la cinética de fermentación del hidrolizado. En la imagen se aprecia el consumo de glucosa, que comienza en 160 g/L y cerca de las 12 horas de proceso se consumió el 50 % de dicha concentración, finalmente a las 24 horas únicamente se detectaron 2.2 g/L por lo que se consumió un poco más del 98 % de la glucosa presente en el medio. En cuanto al etanol, su producción comenzó a partir de las 9 horas aproximadamente, alcanzando su concentración máxima a las 21 horas de proceso y permaneció constante hasta el final del proceso. La concentración máxima de etanol obtenida fue de 65.76 g/L, lo

que corresponde a un rendimiento de 0.41 g/g, con una eficiencia del 80 % y una productividad de 3.1 g/L·h, por lo que cumple fácilmente con la concentración mínima de etanol (4 % v/v) requerida para la factibilidad del proceso.

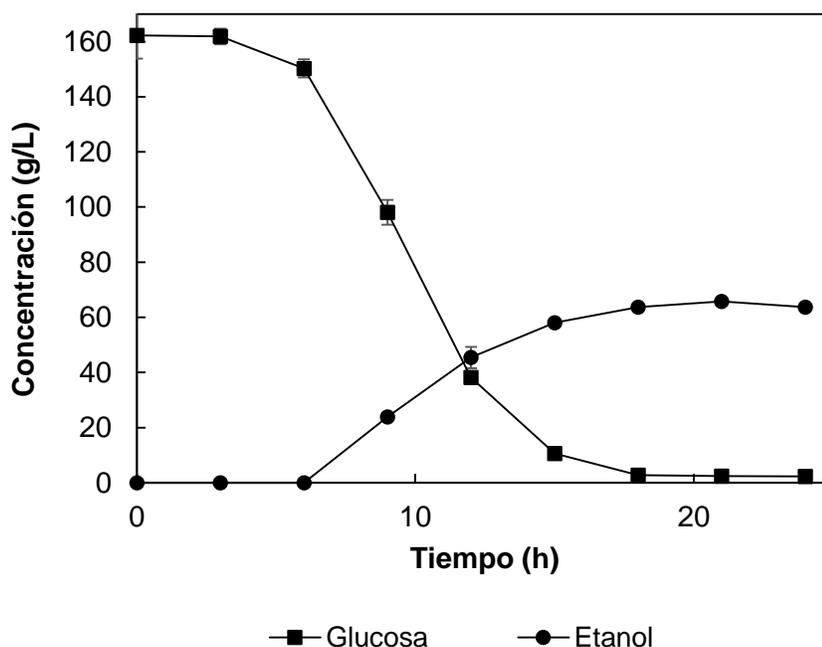


FIGURA 5.15 Fermentación con hidrolizado de harina de cebada y *S. cerevisiae* ITV01

En trabajos previos realizados con β -glucano de harina de cebada como el de Divate *et al.*, (2014) se han reportado rendimientos de fermentación con una variedad de *S. cerevisiae* termotolerante de 0.46 y 0.48 g/g con diferentes cargas de sólidos (50 y 100 g/L) y productividades volumétricas de 0.63 g/L·h, pesar de que el rendimiento es bueno la productividad es 5 veces mejor en este ensayo. No obstante, Nghiem *et al.*, (2010) reportaron una concentración de etanol de 150 g/L proveniente de un hidrolizado de cebada de invierno, valor que es tres veces mejor que el reportado en este trabajo por lo que podrían evaluarse diferentes configuraciones de fermentación como la SFS o SFS en lote alimentado, con la finalidad de incrementar la

concentración de etanol y de igual manera podrían implementarse mejoras durante la hidrólisis enzimática.

5.8.2 Fermentación por lote con hidrolizado de paja de cebada

El hidrolizado proveniente de la paja de cebada pretratada fue enriquecido con nutrientes como lo sugiere Partida-Sedas (2017) y se realizaron dos ensayos, el primero utilizando la levadura autóctona *S. cerevisiae* ITV01 y el segundo con la levadura termotolerante *K. marxianus* CECT 10875.

Los resultados del primer ensayo realizado con *S. cerevisiae* se aprecian en la Figura 5.16, se puede ver un rápido consumo de los azúcares, empezando la fermentación con un hidrolizado que contenía 42.6 g/L de glucosa que para las 12 h de proceso se había consumido el 50 % de dicho azúcar y a las 18 h solo se registró una concentración cercana a los 0.9 g/L. Por lo anterior, la producción de etanol se inició pasando las 10 h y su máxima concentración fue de 16.8 g/L a las 18 h de esta manera se logró un rendimiento de fermentación ($Y_{P/S}$) de 0.41 g/g, esto representa un 80 % de eficiencia con respecto al valor teórico; mientras que la productividad fue de 0.94 g/L·h. Autores como Álvarez *et al.*, (2018) reportaron un comportamiento similar en la fermentación por lote (también llamada Sacarificación y Fermentación Separada) de hidrolizado de paja de cebada obteniendo concentraciones de etanol de 46 a 51 g/L, con rendimientos de 0.36 y 0.39 g/g respectivamente 5 y 12 % por debajo de lo conseguido en este ensayo, mientras que las productividades volumétricas fueron de 0.44 y 0.49 g/L·h, 52-53 % por debajo de este trabajo; Mohammad *et al.*, (2020) reportaron, bajo el método de fermentación por lote una concentración de etanol de 20 g/L con un rendimiento máximo de 0.42 g/g y una eficiencia del 81 %, similar a este trabajo; sin embargo, autores como Stenberg *et al.*, (2008) y Xiao *et al.*, (2004) afirman que la principal limitante con en este método se debe a la acumulación de glucosa y celobiosa en la etapa de hidrólisis que inhibe a

las enzimas involucradas, lo que se traduce en bajos rendimientos de etanol por lo que es recomendable utilizar métodos alternativos como la SFS.

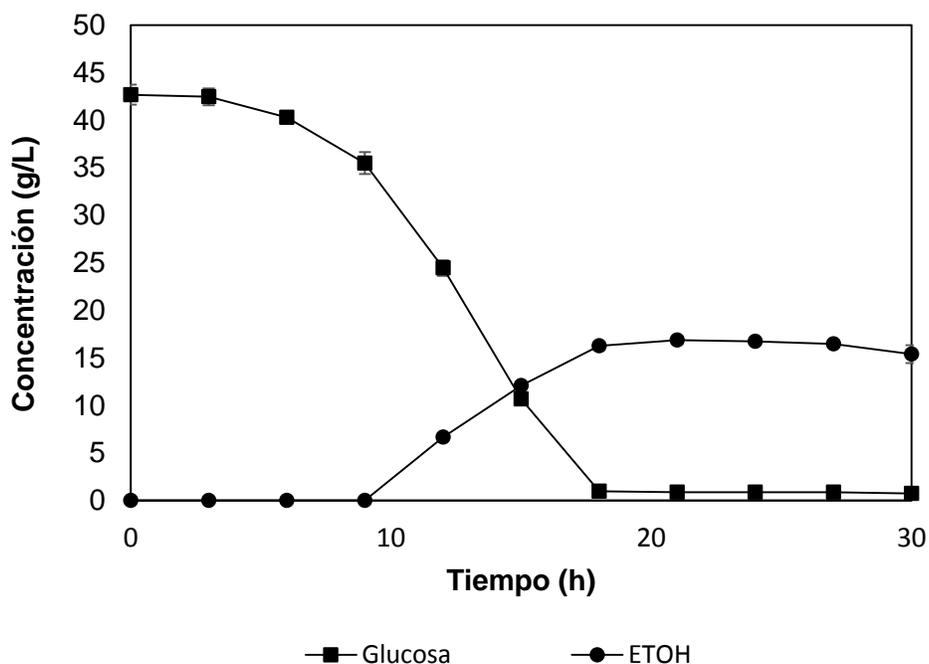


FIGURA 5.16 Fermentación con hidrolizado de paja de cebada pretratada y *S. cerevisiae* ITV01

En la Figura 5.17 se observan los resultados de la fermentación realizada con la levadura termotolerante *K. marxianus*. Se partió de un hidrolizado con 28.1 g/L de glucosa y 17 g/L de xilosa. Cerca de las 15 h del proceso se había consumido solo el 50 % de la glucosa y después de 48 h existía una concentración residual de 3.5 g/L de dicho azúcar por lo que podemos concluir que *S. cerevisiae* asimila de mejor manera la fuente de carbono ya que a las 18 h había consumido el 98 % de glucosa mientras que *K. marxianus* a las 48 h consumió solo el 87.5 %.

En cuanto a la producción de etanol, esta comenzó a las 4 h, 6 horas antes que en caso de *S. cerevisiae*, sin embargo, la máxima concentración del alcohol se tuvo a

las 48 h con 12.6 g/L, 30 h más tarde con respecto a la levadura autóctona; pese a ello, el rendimiento ($Y_{P/S}$) obtenido fue un 7 % mejor con 0.44 g/g, lo que se traduce en una eficiencia del 86 % con respecto al teórico, 6 % arriba del caso anterior, no obstante, la productividad se vio afectada, esta fue de 0.26 g/L·h, 3.6 veces menor que con *S. cerevisiae* debido al tiempo tan prolongado de fermentación el cual fue del doble. Debido a los datos obtenidos, podemos concluir que la levadura *S. cerevisiae* es más eficiente en cuanto a la producción de etanol por lote se refiere. En la Tabla 5.9 se muestran los parámetros cinéticos obtenidos con los hidrolizados y con cada microorganismo, en fermentación por lote.

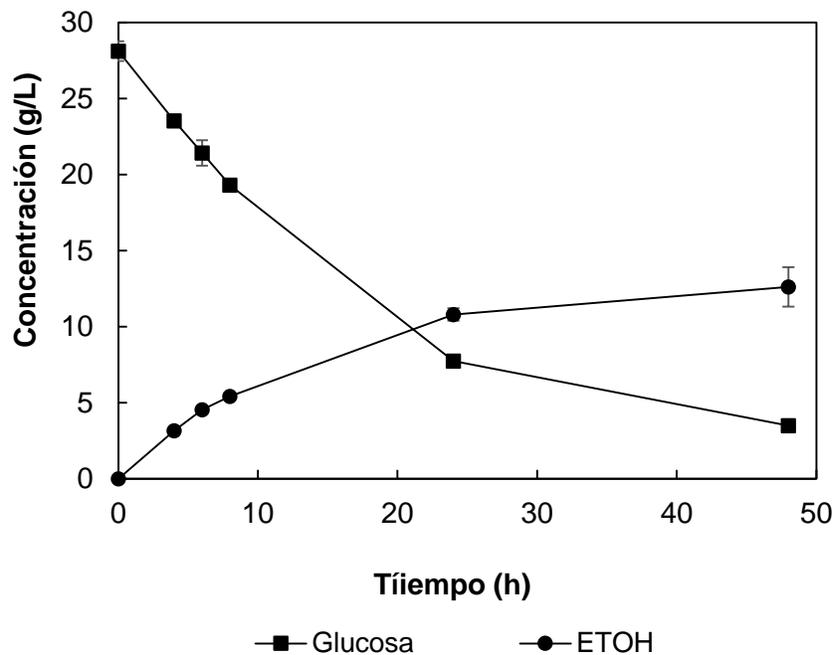


FIGURA 5.17 Fermentación con hidrolizado de paja de cebada pretratada y *K. marxianus* CECT 10875.

TABLA 5.8 Síntesis de resultados de fermentaciones con hidrolizados de harina y paja de cebada en fermentación por lote.

Levadura	Sustrato	Modo de operación	Etanol (g/L)	$Y_{P/S}$ (g/g)	Q_p (g/L·h)	E (%)
<i>S. cerevisiae</i>	Harina	lote	66 ± 0.2	0.41	3.1	80
<i>S. cerevisiae</i>	Paja	lote	17 ± 0.4	0.41	0.94	80
<i>K. marxianus</i>	Paja	lote	12.6 ± 1.3	0.44	0.26	86

5.9 Sacarificación y Fermentación Simultánea (SFS) por lote con *K. marxianus* CECT 10875

Con la finalidad de incrementar los rendimientos de la hidrólisis enzimática así como de reducir el tiempo del proceso en general, se llevó a cabo un proceso de sacarificación y fermentación simultáneas. Se realizaron dos experimentos utilizando dos configuraciones distintas de SFS, en el primer experimento se realizó una prehidrólisis enzimática a 50 °C y 250 rpm durante 4 h, esto con la finalidad de reducir la viscosidad del medio y que este fuera más apto para las levaduras durante la fermentación, así como de tener azúcares fermentables disponibles en el medio.

Los resultados de esta primera configuración se aprecian en la Figura 5.18 (a) donde se observa la acumulación de glucosa en las primeras horas debido a la acción de las enzimas; pasadas las 4 horas de hidrólisis se adicionó la levadura y se ajustó la temperatura a 42 °C. En el gráfico se aprecia como a las 8 horas de proceso comienza a disminuir la cantidad de glucosa disponible mientras que la concentración de etanol comienza a incrementarse, también se observa que la concentración de glucosa y xilosa a las 24 h aumenta alcanzando su máximo con 23.5 g/L y 15.3 g/L respectivamente. Dicho comportamiento puede deberse a una posible inhibición por producto en las enzimas durante las primeras horas del proceso (Sakimoto *et al.*, 2017) y una vez que la levadura comenzó a consumir los

azúcares las enzimas continuaron con la conversión de la celulosa restante en el medio. El proceso terminó a las 72 h, obteniendo una concentración final de 24 g/L de etanol, con una productividad de 0.33 g/L·h, 4.3 g/L de glucosa residual y la concentración de xilosa permaneció constante con 12.8 g/L.

En el segundo experimento la configuración de la SSF se llevó a cabo sin una pre hidrólisis, es decir, tanto las enzimas como las levaduras se adicionaron al sustrato al inicio del proceso, por lo que este proceso se llevó a cabo a 42 °C y 150 rpm durante las 72 horas. En la Figura 5.18 (b) se muestra como durante las primeras 8 horas se alcanza la máxima concentración de glucosa y xilosa siendo estas de 28 g/L y 16.7 g/L respectivamente, en cuanto al etanol, sigue el mismo perfil ascendente que los azúcares lo que sugiere que la levadura no se vio afectada por la viscosidad del medio debido a los sólidos suspendidos en este, y, además fue capaz de consumir la glucosa al mismo tiempo que era liberada por la enzima lo cual favorece el proceso, ya que de esta manera se ve diezmado el fenómeno de inhibición por producto en la sacarificación, caso contrario a lo sucedido en la configuración anterior. La mayor concentración de etanol se obtuvo a las 72 h de proceso, alcanzando 27 g/L con una productividad de 0.37 g/L·h lo cual representa una mejora del 12 % comparado con la configuración anterior, además, se obtuvo una concentración más baja de glucosa residual de tan sólo 1.7 g/L, mientras que la concentración de xilosa disminuyó levemente al final del proceso quedando en 12.7 g/L, esto debido a que la levadura *K. marxianus* CECT 10875 es capaz de asimilar concentraciones bajas de dicho monosacárido.

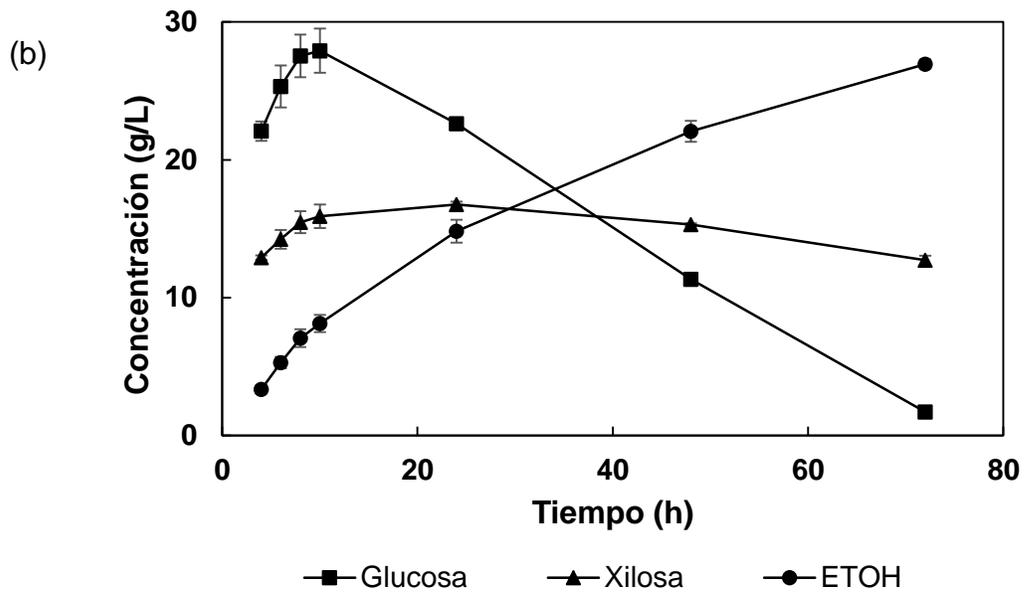
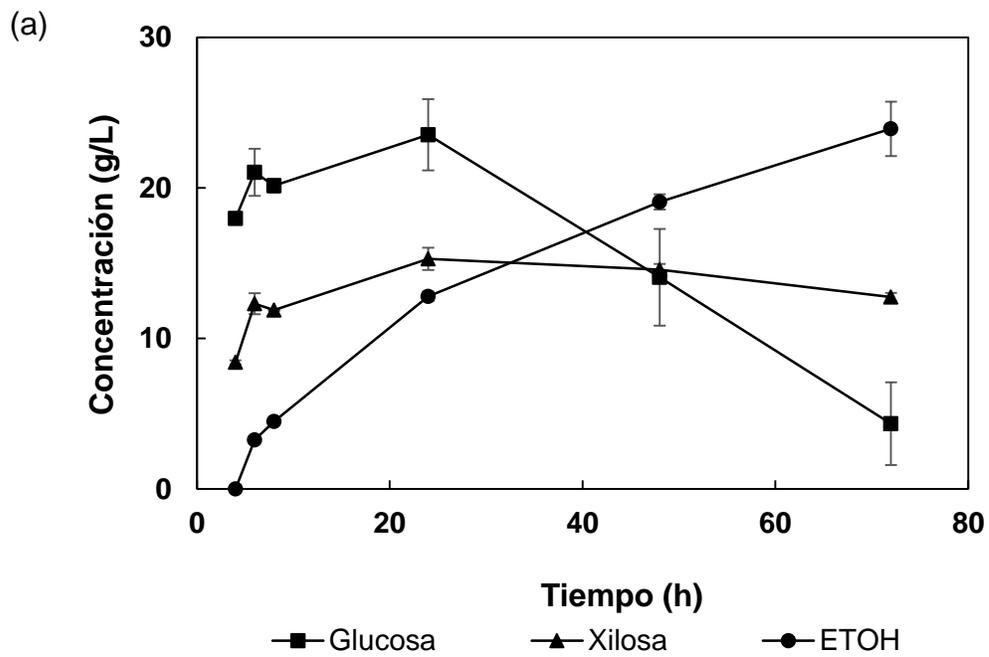


FIGURA 5.18 Sacarificación y Fermentación Simultánea por lote con a) 4 h de prehidrólisis y b) sin prehidrólisis

Debido a los resultados obtenidos en esta etapa, se eligió la segunda configuración como la mejor opción para continuar evaluando el proceso de SFS por lote alimentado, los resultados obtenidos concuerdan con los reportados por de Assis y Roberto (2015) con paja de arroz, quienes sugieren que la configuración de SFS sin prehidrólisis arroja mejores resultados que con una con prehidrólisis, mejorando la productividad del proceso, sin embargo la mayor dependencia de la misma es debido a la conversión enzimática.

Los resultados obtenidos en estos ensayos son favorables, ya que en algunos reportes de trabajos similares como el caso de de Assis y Roberto (2015) quienes con paja de arroz con pretratamiento ácido y *K. marxianus* (NRRL Y-6860) obtuvieron una productividad volumétrica elevada de 1.4 g/L·h, sin embargo, la concentración de etanol fue de solo 10 g/L con una carga de sólidos de apenas el 8 %; lo reportado por Jungwanth *et al.*, (2020) quienes con bagazo de caña pretratado alcalino y *S. cerevisiae* obtuvieron 4.88 g/L de etanol, aproximadamente 5 veces menor que en el presente estudio, con una productividad de 0.29 g/L·h utilizando 10 % de carga de sólidos, los autores también remarcan que el tipo de pretratamiento que se le da al material es un factor de peso sobre la SFS. Otro trabajo que nos ofrece un buen punto de comparación en dos aspectos importantes del proceso es el de Moreno *et al.*, (2013), quienes utilizando paja de trigo con pretratamiento ácido y la levadura termotolerante utilizada en este ensayo, evaluaron el uso con y sin prehidrólisis antes de la SFS, obteniendo como resultado que el proceso sin prehidrólisis es mejor, como se concluyó en este trabajo, según su reporte esto puede deberse a una posible inhibición de la levadura por la cantidad de azúcares presentes en el medio. Como segundo aspecto y quizás el más relevante es que con una carga de sólidos del 10 % lograron obtener una concentración de etanol de 12.3 g/L, sin embargo, como el material había pasado por un pretratamiento ácido únicamente, decidieron agregar lacasas al medio de SFS con la finalidad de detoxificar el medio y reducir los compuestos fenólicos presentes, lo cual les permitió aumentar la carga de sólidos a 12 %, alcanzando una concentración más elevada de etanol de 16.7 g/L, 11 g por debajo de lo reportado en este trabajo. Por lo que

podemos decir que el tipo de pretratamiento influye de manera considerable durante el proceso de SFS, y en este trabajo, tanto el pretratamiento propuesto como el proceso de SFS ofrecen favorables ventajas.

5.9.1 SFS con *Kluyveromyces marxianus* CECT 10875 por lote alimentado

El uso de la configuración de SFS por lote alimentado es una alternativa para incrementar la concentración tanto de azúcares como de etanol, ya que en esta configuración el sustrato es constantemente hidrolizado, también puede reducir la inhibición por producto debido a la glucosa acumulada en el medio y de esta forma mejorar los rendimientos de sacarificación. Tomando como base los resultados del apartado anterior, durante este ensayo se realizaron tres configuraciones diferentes en las cuales se adicionó el 50 % de la carga inicial de sólidos y de enzima después de las 24 h de proceso, teniendo una carga final de sustrato del 15 %, no obstante, la variación en cada uno de los ensayos consistió en la cantidad de inóculo así como tiempo de inoculación de la levadura.

El primer ensayo se realizó bajo las condiciones anteriormente descritas y utilizando únicamente 1 g/L de levadura como inóculo. Los resultados del primer experimento se observan la Figura 5.19a donde la mayor concentración de glucosa inicial se tuvo a las 10 h, alcanzando 31 g/L, después de 24 disminuyó a 24 g/L y una vez que se realizó la alimentación del sustrato se incrementó de nuevo hasta alcanzar 45.2 g/L a las 32 horas de proceso. La producción de etanol comenzó a incrementar a partir de las 10 h alcanzando su máximo a las 144 h con una concentración de 42.12 g/L con una productividad de 0.29 g/L·h. La concentración de xilosa se mantuvo casi constante, únicamente se aprecian las diferencias en las concentraciones debido a la alimentación pasando de 17 g/L a las 24 h a 26 g/L a las 48 h y disminuyendo ligeramente a 22 g/L a las 144 h lo cual se asocia al consumo de dicho azúcar por la levadura.

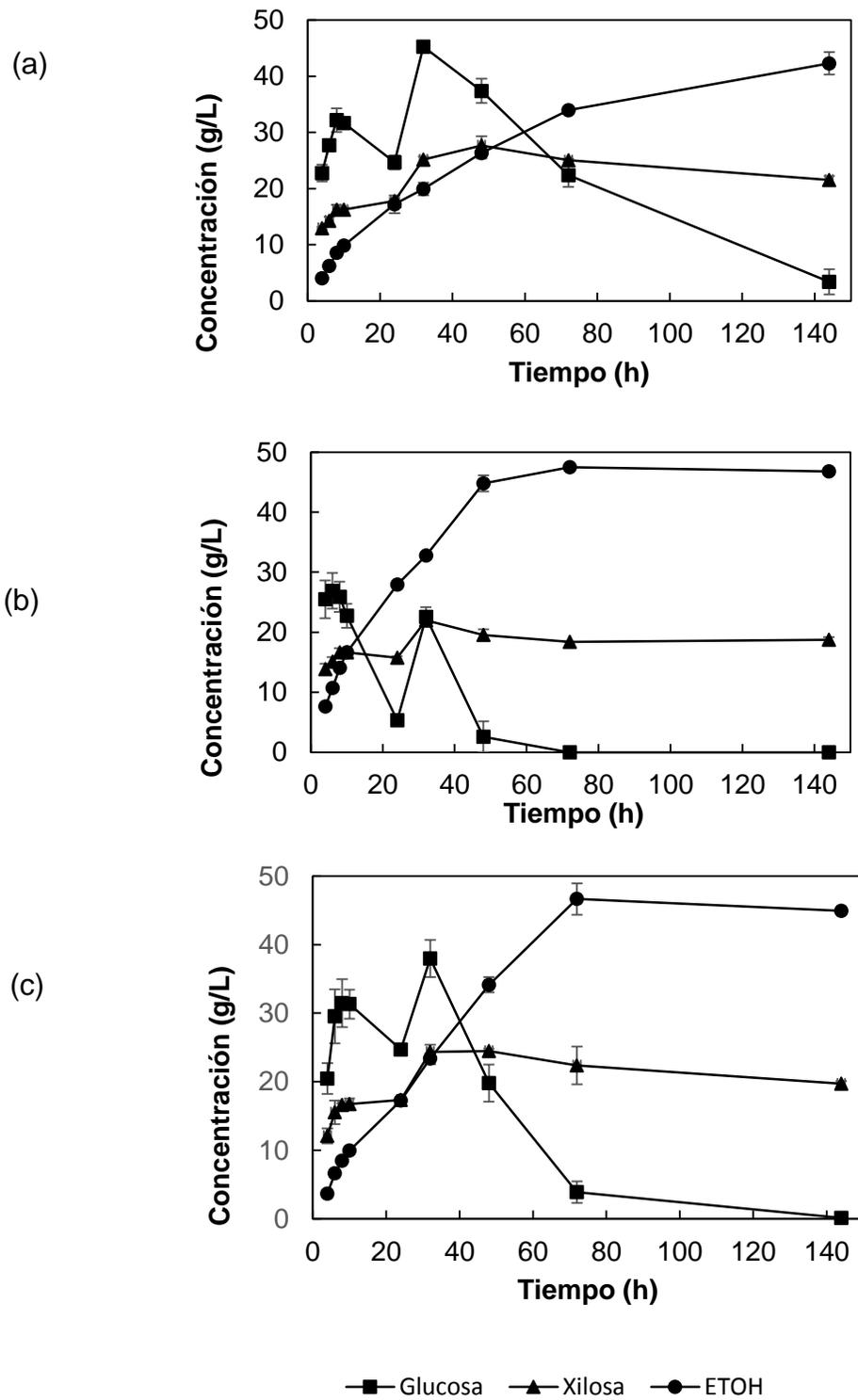


FIGURA 5.19 Sacarificación y Fermentación Simultánea por lote alimentado con a) 1 g de inóculo inicial b) 2 g de inóculo inicial y c) alimentación de 1 g de inóculo a las 24 h.

El segundo ensayo consistió en la adición de sustrato y enzimas como en el caso anterior a las 24 h con la diferencia de que en este ensayo también se adicionó un 1 g/L de levadura en la alimentación. Los resultados de este experimento se aprecian en la Figura 5.19b donde podemos observar que durante las primeras 10 h de proceso se sigue un comportamiento similar al anterior, teniendo una concentración de glucosa hasta ese momento de 31 g/L, después de 24 h la concentración disminuyó a 24 g/L igual que en el anterior, sin embargo, la diferencia comienza a notarse después de la alimentación a las 24 h. En este caso la concentración máxima de glucosa obtenida fue de 38 g/L a las 32 h, cifra menor a la obtenida en el diseño anterior. La diferencia está dada por la cantidad de células inoculadas durante la alimentación, en el gráfico también se aprecia que el consumo casi total de la glucosa se tuvo alrededor de las 72 h. En cuanto a la producción de etanol, esta comenzó durante las primeras horas de proceso incrementándose desde las 10 h de proceso, en cambio, la máxima concentración de etanol en este ensayo se logró a las 72 h alcanzando 46.6 g/L con una productividad de 0.64 g/L·h, lo cual representa un 10 % más que en la configuración anterior y en menor tiempo. Finalmente la concentración de xilosa tuvo un comportamiento similar al caso anterior manteniéndose casi constante a lo largo del proceso, alcanzando una concentración máxima de 24.4 g/L a las 48 h y disminuyendo levemente a 22.3 g/L a las 72 h.

Por último, el tercer ensayo se realizó bajo las mismas condiciones de sustrato y enzimas iniciales con la variación de que en este, se inocularon 2 g/L de levadura desde el inicio y a las 24 h solo se alimentó el lote con sustrato y enzimas. En la Figura 5.19c se observa el comportamiento del ensayo, la concentración máxima de glucosa antes de la alimentación fue de 25 g/L a las 8 h, a las 24 h tenía una concentración de 5.3 g/L, el consumo de dicho azúcar fue más rápido debido a la concentración de células en el medio. Después de la alimentación, la concentración de glucosa aumentó nuevamente y a las 32 h se tenía una concentración de 22 g/L, y después de 72 h de proceso el azúcar se agotó completamente. En cuanto a la concentración de etanol comenzó a incrementar notablemente después de las 10 h, antes de la alimentación la concentración fue de 28 g/L y la máxima se tuvo a las 72

h con 47 g/L y una productividad de 0.65 g/L·h, La concentración de xilosa se vio favorecida después de la alimentación ya que a las 32 h se obtuvieron 22 g/L y al final de la SFS disminuyó levemente a 19 g/L como en los experimentos anteriores. Esta última configuración se eligió como la mejor para la producción de etanol comparada con las dos anteriores, puesto que con esta se alcanzó una concentración de 47 g/L y con una buena productividad y de acuerdo a lo reportado por (Sudiyani *et al.*, 2019) una concentración mínima de 40 g/L de etanol es necesaria para que el proceso de etanol 2G sea factible y se obtengan resultados favorable en los procesos de destilación y evaporación. En la Tabla 5.10 se muestran de manera resumida algunos de los parámetros cinéticos obtenidos a partir de la evaluación de las diferentes configuraciones evaluadas.

TABLA 5.9 Síntesis de resultados de fermentaciones con hidrolizado de paja de cebada en Sacarificación y Fermentación Simultánea por lote y lote alimentado.

Levadura	Sustrato	Modo de operación	Etanol (g/L)	$Y_{P/S}$ (g/g)	Qp (g/L·h)	E (%)
<i>K. marxianus</i>	Paja	SSF	27 ± 0.3	----	0.37	----
<i>K. marxianus</i>	Paja	SSF prehidrólisis	24 ± 0.8	----	0.33	----
<i>K. marxianus</i>	Paja	SSF con alimentación de sustrato y enzimas, 1 g/L de inóculo	42.12 ± 1	----	0.29	----
<i>K. marxianus</i>	Paja	SSF con alimentación de sustrato y enzimas, 2 g/L de inóculo	47.2 ± 0.09	----	0.65	----
<i>K. marxianus</i>	Paja	SSF con alimentación de sustrato y enzimas y 1 g/L de inóculo	46.6 ± 2.3	----	0.64	----

Tomás-Pejó *et al.*, (2017) quienes trabajaron con paja de trigo con pretratamiento ácido sin lavar, con la misma levadura termotolerante, reporta que con 10 % de sólidos y una concentración de inóculo de 1 g/L las levaduras se vieron inhibidas totalmente, en este caso posiblemente debido a los compuestos tóxicos inhibitorios

como el ácido acético presente en el medio, fenómeno que no se presentó en este trabajo, lo que demuestra una vez más que el pretratamiento de la biomasa tiene gran influencia en la SFS. Una vez aumentado el tamaño de inóculo a 3 g/L obtuvieron una concentración máxima de 4.2 g/L. También probaron lavando el material obteniendo mejores resultados, ya que alcanzaron 18.8 y 21 g/L de etanol utilizando 1 y 3 g/L de levadura, respectivamente, aún por debajo de lo obtenido en este trabajo, aunque la productividad fue mejor, 0.73 g/L·h debido al inóculo de 3 g/L. García-Aparicio *et al.*, (2011) describieron en su trabajo con paja de cebada con pretratamiento ácido la obtención de 29.4 g/L de etanol utilizando una carga de sólidos de 15 % (p/v) similar a la de este trabajo, sin embargo, la concentración de etanol está muy por debajo de lo actualmente reportado, cerca de 18 g/L menos de etanol; aunque su productividad volumétrica es mejor, de 0.77 g/L·h atribuida a la adición de xilanasas al medio de SFS. De igual manera Tomás-Pejó *et al.*, (2008) reportaron con paja de trigo pretratada la obtención de 36.2 g/L de etanol utilizando el método de lote alimentado con una carga de sólidos final de 14 % con una productividad volumétrica de 0.50 g/L·h, por lo que concluyen que el proceso debe ser mejorado para alcanzar un 4 % (p/v) de etanol. Por otro lado, en estudios más recientes como el de de Barros *et al.*, (2017) quienes trabajaron con bagazo de nuez de la india, lograron obtener hasta 67 g/L de etanol con una carga total de sólidos del 20 %, realizando pequeñas alimentaciones cada 4 h durante 48 h. Caso similar a lo reportado por Qiu *et al.*, (2018), quienes utilizaron paja de trigo pretratada y realizaron la optimización de la SFS evaluando la carga de sólidos así como la concentración de enzimas e inóculo. De esta manera lograron obtener 69.9 g/L de etanol con una productividad del 0.58 g/L·h. Pese a lo anterior, se obtuvieron buenos resultados tanto de sacarificación, como de producción de etanol y xilosa; aunque esta última no se aprovechó directamente en este proceso, se puede utilizar en un proceso subsecuente para la producción de algún otro producto de interés como el xilitol, ácido láctico e incluso etanol en un proceso de sacarificación y co-fermentación simultáneas. Por lo que a futuro derivado de este trabajo podría realizarse la mejora y optimización del proceso de SFS para la paja de cebada.

6. CONCLUSIONES

- De las dos variedades de cebada evaluadas, la variedad “Doña Josefa” presentó mejores características en cuanto al contenido de almidón y material lignocelulósico con respecto a la variedad “Esmeralda”.
- En la hidrólisis enzimática de harina de cebada con el diseño propuesto las condiciones óptimas de hidrólisis fueron 0.004 % de amilasa, 0.030 % de glucosidasa y 30 % de harina obteniendo un 82 % de conversión del almidón a glucosa alcanzando concentraciones de hasta 160 g/L.
- Con el diseño Box-Behnken propuesto se logró una optimización del pretratamiento peróxido-alcalino para maximizar el porcentaje de remoción de lignina de la paja de cebada obteniendo 60% de deslignificación utilizando un 6 % de H₂O₂, RLS 12:1 y 15 horas de reacción.
- En la hidrólisis enzimática fue posible maximizar la conversión de celulosa y hemicelulosa presentes en la paja pretratada en glucosa y xilosa, respectivamente, alcanzando una conversión del 85 % con una concentración de 70 g/L de azúcares fermentables utilizando 6 % de celulasas, 3 % de xilanasas y 20 horas de reacción.
- La efectividad en las etapas de deslignificación e hidrólisis enzimática también fue evidente de manera macro y microscópica, ya que, tanto la estructura como la morfología de la materia prima experimentó cambios significativos a lo largo del proceso.
- La levadura *Saccharomyces cerevisiae* ITV-01 resultó ser la mejor opción para realizar fermentaciones por lote obteniendo concentraciones de etanol de 17 y 66 g/L para los hidrolizados de paja y harina respectivamente, con rendimientos de 0.44 g/g y eficiencias de 80 %.
- La levadura *Kluyveromyces marxianus* CECT 10875 es la mejor opción para realizar Sacarificación y Fermentación Simultánea (SSF) con la paja de cebada ya que se logra incrementar la concentración de etanol hasta 47 g/L en paja de cebada.
- Como conclusión general podemos decir que con las condiciones del proceso establecidas en el presente estudio para las etapas de: pretratamiento, hidrólisis enzimática y fermentación, fue posible obtener etanol de 1G y 2G a partir de grano y paja de cebada, con conversiones de glucosa y eficiencias de etanol por arriba del 80%, lo que hace este proceso una alternativa de interés para el aprovechamiento integral del cultivo de cebada en México en la producción de bioetanol.

7. PERSPECTIVAS

- Probar la configuración de Sacarificación y Fermentación Simultánea (SSF) para la obtención de etanol a partir de harina de cebada.
- Optimizar el proceso de Sacarificación y Fermentación Simultánea (SFS) por lote alimentado.
- Evaluar el uso de otros microorganismos en co-cultivo como *Scheffersomyces stipitis* y *Saccharomyces cerevisiae* ITV-01 para la producción de etanol a partir de xilosa.
- Evaluar el uso de microorganismos fermentadores de xilosa como *Candida tropicalis*, *Pichia sp*, *Bacillus coagulans* o *Lactobacillus pentosus* para la obtención de otros productos de valor agregado como xilitol y ácido láctico.
- Realizar un estudio técnico-económico de los procesos establecidos en este trabajo para la producción de etanol de primera y segunda generación a partir del cultivo de cebada.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acourene, S., Amourache, L., Benchabane, A. Djaafri, K. (2013). Utilization of date wastes as substrate for the production of α -amylase. *International Food Research Journal*. 20: 1367- 1372.
- Adapa, P., Tabil, L., Schoenau, G. (2009). Compaction characteristics of barley, canola, oat and wheat straw. *Biosystems engineering*, 104(3): 335-344.
- Aguilar Rivera, N., y Canizales Leal, M. J. (2004). Cinética de la hidrólisis ácida de la cascarrilla de cebada. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*. 3(3).
- Akar, T. Avci, M., Dusunceli, F. (2004). Barley: Post-harvest operations. <http://www.fao.org/in-action/inpho/en/>. Consultado en octubre 2017.
- Alkasrawi, M., Eriksson, T., Börjesson, J., Wingren, A., Galbe, M., Tjerneld, F., Zacchi, G. (2003). The effect of Tween 20 on simultaneous saccharification and fermentation of softwood to etanol. *Enzyme and Microbial Technology* 33: 71-78.
- Al-Azkawi A., Al-Battashi H., Sivakumar N. (2020) Nonionic surfactants for enhancement of Ignocellulose enzymatic hydrolysis. *Recent Developments in Bioenergy Research* pp. 225-236. Elsevier
- Álvarez, C., Sáez, F., González, A., Ballesteros, I., Oliva, J. M. Negro, M. J. (2018). Production of xylooligosaccharides and cellulosic ethanol from steam-exploded barley straw. *Holzforschung*, 73(1): 35-44.
- Álvarez-Vasco, C., Zhang, X. (2013). Alkaline hydrogen peroxide pretreatment of softwood: hemicellulose degradation pathways. *Bioresource technology*, 150: 321-327.
- Amylase Important for starch hydrolysis (2020). Recuperado de: <https://starchhydrolysis.weebly.com/amylase-function.html>. (Consultado 17 de septiembre 2020).
- Amaya-Pinos, J. B. (2019). Estudio de la dosificación del almidón extraído del banano en un polímero de tipo termoplástico. *Revista Colombiana de Química*, 48(1):43-51.
- Awwioroko, O. J., Anigboro, A. A., Ejoh, A. S., Atanu, F. O., Okeke, M. A., Tonukari, N. J. (2019). Characterization of α -amylases isolated from *Cyperus esculentus* seeds (tigernut): Biochemical features, kinetics and thermal inactivation thermodynamics. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 21: 101298.
- Azhar, S. H. M., Abdulla, R., Jambo, S. A., Marbawi, H., Gansau, J. A., Faik, A. A. M., Rodrigues, K. F. (2017). Yeasts in sustainable bioethanol production: A review. *Biochemistry and Biophysics Reports*, 10: 52-61.
- Bayona-Ayala, O. L. (2012). Avaliação de pré-tratamentos para a hidrólise enzimática de palha de cana-de-açúcar considerando a produção de etanol.
- Bernal, L. y Martínez, B. E. (2006). Una visión de la degradación del almidón. *Revista del centro de investigación Universidad La Salle*. 7 (25):77-90.
- Blattner, F. R. (2018). Taxonomy of the genus *Hordeum* and barley (*Hordeum vulgare*). In *The Barley Genome* (pp. 11-23). Springer, Cham.

- Borja-Bravo, M., Muro-Reyes, L., Espinosa-García, J.A., Vélez-Izquierdo, A. (2013). Rastrojos: manejo, uso y mercado en el centro y sur de México. Capítulo 1 Producción y consumo de rastrojos en México.
- Borrero-López, A. M., Blánquez, A., Valencia, C., Hernández, M., Arias, M. E., Franco, J. M. (2019). Influence of solid-state fermentation with *Streptomyces* on the ability of wheat and barley straws to thicken castor oil for lubricating purposes. *Industrial Crops and Products*, 140: 111625.
- Buléon, A., Colonna, P., Planchot, V., Ball, S. (1998). Starch granules: structure and biosynthesis. [International Journal of Biological Macromolecules](#). 23: 85-112.
- Burhanoğlu, T., Sürmeli, Y., Şanlı-Mohamed, G. (2020). Identification and characterization of novel thermostable α -amylase from *Geobacillus* sp. GS33. *International Journal of Biological Macromolecules*.
- Cai, C., Qiu, X., Zeng, M., Lin, M., Lin, X., Lou, H., Xie, L. (2017). Using polyvinylpyrrolidone to enhance the enzymatic hydrolysis of lignocelluloses by reducing the cellulase non-productive adsorption on lignin. *Bioresource technology*, 227: 74-81.
- Castaño, H. I., y Mejía, C. E. (2008). Producción de etanol a partir de almidón de yuca utilizando la estrategia de proceso sacarificación-fermentación simultánea (SSF). *Vitae*, 15(2).
- Castro-Martínez, C., Valverde González, M. A. y Paredes-López, O., (2009). Biocombustibles: biomasa lignocelulósica y procesos de producción. *Ide@s CONCYTEG*. 54 (4): 1246-1270. ISBN: 978-607-95030-5-5.
- Callejo, Gonzáles M. J. (2002). *Industria de cereales y derivados*, colección tecnología de alimentos. AMV Ediciones. 1ª edición. Zaragoza España. Pp. 169-185.
- Carballo, F. (2000). *Microbiología Industrial*. Madrid, España. Editorial Arcribia. PDF
- Carreón, O. E., Ramos, A. S., Centeno, S., Leal, L. J., Martínez, A. y Fernández, M. T. (2009). Etanol Carburante. *BioTecnología*, Vol. 13 No. 3.
- Cunningham, R., López, G., (1994). *Etanol de Lignocelulósicos: tecnología y perspectivas*. Universidad de Santiago de Compostela Argentina.
- Chang, S., Li, W., Zhang, Y. (2018). Impact of double alkaline peroxide pretreatment on enzymatic hydrolysis of palm fibre. *Carbon Resources Conversion*, 1(2): 147-152.
- Chen, D. L., Tong, X., Chen, S. W., Chen, S., Wu, D., Fang, S. G., Chen, J. (2010). Heterologous expression and biochemical characterization of α -glucosidase from *Aspergillus niger* by *Pichia pastoris*. *Journal of agricultural and food chemistry*. 58(8): 4819-4824.
- Chen, Y., Sharma-Shivappa, R., Keshwani D., Chen, C. (2008). Potential of agricultural residues and hay for bioethanol production. *Applied Biochemistry and Biotechnology Part A: Enzyme engineering and biotechnology*. 142: 276-290.
- Chen, Y. A., Zhou, Y., Qin, Y., Liu, D., Zhao, X. (2018). Evaluation of the action of Tween 20 non-ionic surfactant during enzymatic hydrolysis of lignocellulose: Pretreatment, hydrolysis conditions and lignin structure. *Bioresource technology*, 269: 329-338.
- Contreras-López, E., Jaimez-Ordaz, J., Hernández-Madrigal, T., Añorve-Morga, J., y Beltrán-Hernández, R. (2008). Composición química de cebadas cultivadas bajo diferentes

condiciones de labranza en tres localidades del estado de Hidalgo, México. *Bioagro*, 20:(3).

- Cowieson, A. J. (2005). Factors that affect the nutritional value of maize for broilers. *Animal feed Science and Technology*. 119: 293-305.
- Da Silva., T. M., Michelin, M., de Lima, A. R., Maller, A., Ruller, R., Ward, R. J., de Moraes, M. (2009). Purification and biochemical characterization of a novel α -glucosidase from *Aspergillus niveus*. *Antoine van Leeuwenhoek*, 96:569-578.
- Dávila, G. y Vázquez-Duhalt, R., (2001). Enzimas ligninolíticas fúngicas para fines ambientales. *Mensaje Bioquímico*, Vol XXX.
- de Assis Castro, R. C., Roberto, I. C. (2015). Effect of nutrient supplementation on ethanol production in different strategies of saccharification and fermentation from acid pretreated rice straw. *Biomass and Bioenergy*, 78: 156-163.
- de Barros, E. M., Carvalho, V. M., Rodrigues, T. H. S., Rocha, M. V. P., Gonçalves, L. R. B. (2017). Comparison of strategies for the simultaneous saccharification and fermentation of cashew apple bagasse using a thermotolerant *Kluyveromyces marxianus* to enhance cellulosic ethanol production. *Chemical Engineering Journal*, 307: 939-947.
- Delfín-Ruíz, M. E., Calderón-Santoyo, M., Ragazzo-Sánchez, J. A., Gómez-Rodríguez, J., López-Zamora, L., Aguilar-Uscanga, M. G. (2019). Acid pretreatment optimization for xylose production from *Agave tequilana* Weber var. azul, *Agave americana* var. oaxacensis, *Agave karwinskii*, and *Agave potatorum* bagasses using a Box-Behnken design. *Biomass Conversion and Biorefinery*, 1-10.
- Delville, J., Joly, C., Dole, P., Bliard, C. (2002). Solid state photocrosslinked starch bases films: a new of family of homogeneous modified starches. *Carbohydrate Polymers*. 49: 71-81.
- Díaz, A. B., Blandino, A., Belleli, C., Caro, I. (2014). An effective process for pretreating rice husk to enhance enzyme hydrolysis. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 53(27): 10870-10875.
- Divate, R., Menon, V., Rao, M. (2013). Approach towards biocatalytic valorisation of barley β -glucan for bioethanol production using 1, 3-1, 4 β -glucanase and thermotolerant yeast. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 82: 81-86.
- Domínguez, G. C. (2012). Optimización del pretratamiento (ácido/alcalino) y determinación de la influencia del Tween 80 en la hidrólisis enzimática del olote. Tesis de Maestría en Ingeniería Química. Instituto Tecnológico de Orizaba, México.
- Duque, A., Manzanares, P., Ballesteros, I., Negro, M. J., Oliva, J. M., Saez, F., Ballesteros, M. (2014). Study of process configuration and catalyst concentration in integrated alkaline extrusion of barley straw for bioethanol production. *Fuel*, 134: 448-454.
- Eastman, J. E., y Moore, C. O. (1984). *U.S. Patent No. 4,465,702*. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.
- Eratt, J.A., Douglas, P.E., Moranelli, F., Seligy, V.L. (1984). The induction of α -amylase by starch in *Aspergillus oryzae*: evidence for controlled mRNA expression. *Canadian Journal of Biochemistry and Cell Biology*. 62: 678-690.

- Eriksson, T., Börjesson, J., Tjerneld, F. (2002). Mechanism of surfactant effect in enzymatic hydrolysis of lignocellulose. *Enzyme and microbial technology*, 31(3): 353-364.
- Erlingen, R. C. & Delcour J.A. (1995). Formation, analysis, structure y properties of type III enzyme resistant starch. *Journal of Cereal Science*. 21: 1-8.
- Espinosa, E., Sánchez, R., Otero, R., Domínguez-Robles, J., Rodríguez, A. (2017). A comparative study of the suitability of different cereal straws for lignocellulose nanofibers isolation. *International journal of biological macromolecules*, 103: 990-999.
- Espino, E., Cakir, M., Domenek, S., Román-Gutiérrez, A. D., Belgacem, N., Bras, J. (2014). Isolation and characterization of cellulose nanocrystals from industrial by-products of Agave tequilana and barley. *Industrial Crops and Products*, 62: 552-559.
- Espitia-Rocha, C., Gutierrez-Rojas, I., Espitia-Rivera, H. (2009). Ethanol production from hydrolyzed unmalted barley using commercial α - and β -amylase. *Universitas Scientiarum*, 14(2): 164-172.
- Fajardo, E. Sarmiento, S. (2007). Evaluación de la melaza de caña como sustrato para la producción de *Saccharomyces cerevisiae*. Trabajo de grado para la obtención del título de Microbióloga Industrial. Pontificia Universidad Javeriana. Microbiología Industrial.
- FAO (2009). Barley, Malt and Beer. Agribusiness handbook.
- Fonseca G.G., Heinzle E., Wittmann C., Gombert A.K. (2008). The yeast *Kluyveromyces marxianus* and its biotechnological potential. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 79: 339-354.
- Gamazo, C., López-Goñi, I., Díaz, R. (2005). Manual práctico de Microbiología (No. 579 G186m). Elsevier,
- García-Aparicio, M. P., Oliva, J. M., Manzanares, P., Ballesteros, M., Ballesteros, I., González, A., Negro, M. J. (2011). Second-generation ethanol production from steam exploded barley straw by *Kluyveromyces marxianus* CECT 10875. *Fuel*, 90(4): 1624-1630.
- Gellerstedt, G. y Henriksson, G. (2008). Lignins: Major sources, structure and properties. Monomers, Polymers and Composites. *Renewable Resources*. 201- 224.
- Grupo Modelo. 2016. Insumos e Ingredientes para Elaborar Cerveza. Recuperado de: <http://brewmasters.com.mx/shop/tonelada-de-malta-6h-calidad-1-grupo-modelo-2/> (Consultado 30 de septiembre 2017)
- Guarneros-Flores, J., Lopez-Zamora, L. y Aguilar-Uscanga, M. (2016). Optimización del proceso de hidrólisis enzimática a partir de bagazo de sorgo dulce pre tratado. *Revista de Investigación y Desarrollo*. 2(6): 75-81.
- Han, M., Kang, K. E., Kim, Y., Choi, G. W. (2013). High efficiency bioethanol production from barley straw using a continuous pretreatment reactor. *Process Biochemistry*, 48(3): 488-495.
- Hans, M., Kumar, S., Chandel, A. K., y Polikarpov, I. (2019). A review on bioprocessing of paddy straw to ethanol using simultaneous saccharification and fermentation. *Process Biochemistry*, 85:125-134.
- Hatakeyama, H., & Hatakeyama, T. (2009). Lignin structure, properties, and applications. In *Biopolymers* (pp. 1-63). Springer, Berlin, Heidelberg.

- Ho, M. C., Ong, V. Z., Wu, T. Y. (2019). Potential use of alkaline hydrogen peroxide in lignocellulosic biomass pretreatment and valorization—A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 112: 75-86.
- Homsey, S. Ian. (1999). *Elaboración de cerveza (Microbiología, Bioquímica y tecnología)*. Editorial Acibia S.A. Zaragoza España. Pp. 15-29.
- Jørgensen, H., Kristensen, J. B., Felby, C. (2007). Enzymatic conversion of lignocellulose into fermentable sugars: challenges and opportunities. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 1(2): 119-134.
- Jugwanth, Y., Sewsynker-Sukai, Y., Kana, E. G. (2020). Valorization of sugarcane bagasse for bioethanol production through simultaneous saccharification and fermentation: Optimization and kinetic studies. *Fuel*, 262: 116552.
- Källman, A., Vamadevan, V., Bertoft, E., Koch, K., Seetharaman, K., Åman, P., Andersson, R. (2015). Thermal properties of barley starch and its relation to starch characteristics. *International journal of biological macromolecules*, 81: 692-700.
- Kato, N., Suyama, S., Shirokane, M., Kato, M., Kobayashi, T., Tsukagoshi, N. (2002). Novel α -glucosidase from *Aspergillus nidulans* with strong transglycosylation activity. *Applied and environmental microbiology*, 68(3): 1250-1256.
- Kirk, T. K. & Farrell, R. L., (1987). Enzymatic “combustion”: the microbial degradation of lignin. *Annual Review of Microbiology*. 41(1):465-505.
- Kim, H. J., Kim, S. B., Kim, C. J. (2007). The effects of Nonionic Surfactants on the pretreatment and enzymatic hydrolysis of recycled newspaper. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*. 12: 147-151.
- Kuddus M. (2010). Microbial cold-active α -amylases: from fundamentals to recent developments. *Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*. 1265-1276.
- Knudsen, K. E. B. (2014). Fiber and nonstarch polysaccharide content and variation in common crops used in broiler diets. *Poultry science*, 93(9), 2380-2393.
- Li, M., Wang, J., Yang, Y., Xie, G. (2016). Alkali-based pretreatments distinctively extract lignin and pectin for enhancing biomass saccharification by altering cellulose features in sugar-rich *Jerusalem artichoke* stem. *Bioresource technology*, 208: 31-41.
- Limtong S., Sringiew C., Yongmanitchai W. (2007). Production of fuel ethanol at high temperature from sugar cane juice by a newly isolated *Kluyveromyces marxianus*. *Bioresource Technology* 98: 3367-3374.
- Linde, M., Galbe, M., Zacchi, G. (2007). Simultaneous saccharification and fermentation of steam-pretreated barley straw at low enzyme loadings and low yeast concentration. *Enzyme and microbial technology*, 40(5): 1100-1107.
- López, P., Prieto, F., Gaytán, M., Román, A. D. (2007). Caracterización fisicoquímica de diferentes variedades de cebada cultivadas en la región centro de México. *Revista chilena de nutrición*, 34(1): 71-77.
- Lu, Y., Chae, M., Vasanthan, T., Bressler, D. C. (2020). The potential of fiber-depleted starch concentrate produced through air currents assisted particle separation of barley flour in bio-ethanol production. *Bioresource Technology*, 303: 122942.

- MacGregor, A. W. & Batty, Rattan S. (1996). Barley. Chemistry and Technology. American Association of Cereal Chemist, Inc. St. Paul, Minnesota, USA.
- Marín, D., Linde, D., & Lobato, M. F. (2006). Purification and biochemical characterization of an α -glucosidase from *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Yeast*, 23: 117-125.
- Medina, M. M., Fernández, L. L., Aguilar, L. C. y De la Garza, H. (2011). Aprovechamiento de materiales lignocelulósicos para la producción de etanol como carburante. *Revista científica de la Universidad Autónoma de Coahuila*. 3(6): 35-41.
- Menegol, D., Scholl, A. L., Fontana, R. C., Dillon, A. J. P., Camassola, M. (2014). Increased release of fermentable sugars from elephant grass by enzymatic hydrolysis in the presence of surfactants. *Energy conversion and management*, 88: 1252-1256.
- Mielenz, J. (2001). Ethanol production from biomass: technology and commercialization status. *Current Opinion in Microbiology*. 4(3):324-329.
- Mittal, A., Katahira, R., Donohoe, B. S., Black, B. A., Pattathil, S., Stringer, J. M., Beckham, G. T. (2017). Alkaline peroxide delignification of corn stover. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 5(7): 6310-6321.
- Mohammad, S., Awg-Adeni, D. S., Bujang, K. B., Vincent, M., Baidurah, S. (2020). Potentials of sago fibre hydrolysate (SFH) as a sole fermentation media for bioethanol production. In *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering* (Vol. 716, No. 1, p. 012001). IOP Publishing.
- Moreira, P. H. S. S., de Oliveira Freitas, J. C., Braga, R. M., Araújo, R. M., de Souza, M. A. F. (2018). Production of carboxymethyl lignin from sugar cane bagasse: A cement retarder additive for oilwell application. *Industrial Crops and Products*, 116: 144-149.
- Moreno, A. D., Ibarra, D., Ballesteros, I., González, A., Ballesteros, M. (2013). Comparing cell viability and ethanol fermentation of the thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus* and *Saccharomyces cerevisiae* on steam-exploded biomass treated with laccase. *Bioresource technology*, 135: 239-245.
- Moreno, A. D., Ibarra, D., Ballesteros, I., Fernández, J. L., Ballesteros, M. (2013). Ethanol from laccase-detoxified lignocellulose by the thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus*—effects of steam pretreatment conditions, process configurations and substrate loadings. *Biochemical engineering journal*, 79: 94-103.
- Morone, A., Chakrabarti, T., Pandey, R. A. (2017). Assessment of alkaline peroxide-assisted wet air oxidation pretreatment for rice straw and its effect on enzymatic hydrolysis. *Cellulose*, 24(11): 4885-4898.
- Naguleswaran, S., Vasanthan, T., Hoover, R., Bressler, D. (2013). The susceptibility of large and small granules of waxy, normal and high-amylose genotypes of barley and corn starches toward amyolysis at sub-gelatinization temperatures. *Food Research International*, 51(2): 771-782.
- Ndubisi, C. F., Okafor, E. T., Amadi, O. C., Nwagu, T. N., Okolo, B. N., Moneke, A. N., Agu, R. C. (2016). Effect of malting time, mashing temperature and added commercial enzymes on extract recovery from a Nigerian malted yellow sorghum variety. *Journal of the Institute of Brewing*, 122(1): 156-161.
- Nghiem, N.P., Hicks K. B., Johnston, D.B., Senske, G., Kurant, M., Li, M., Shetty, J. Konieczny, G. (2010). Production of ethanol from winter barley by the EDGE (enhanced dry grind enzymatic) process. *Biotechnology for Biofuels*, 3:8.

- Nochebuena Morando, L.E. 2013. Estudio del efecto del tratamiento oxidativo y del Tween 80 sobre la hidrólisis enzimática del bagazo de caña de azúcar. Tesis de Maestría. Instituto Tecnológico de Orizaba. Veracruz. México.
- Noyola, T. P., y Avalos, O. P. (2002). Celulasas y xilanasas en la industria. Avance y perspectiva, 21: 273-277.
- OECD, Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos. (2004). Consensus document on compositional considerations for new varieties of barley (*Hordeum vulgare* L.): Key food and feed nutrients and anti-nutrients. Report No. 12.
- Ogbonna, J.C., Mashima, H., Tanaka, H. (2001). Scale up of fuel ethanol production from sugar beet juice using loofa sponge immobilized bioreactor. Bioresource Technology. 76: 1-8.
- Oliva-Taravilla, A., Moreno, A. D., Demuez, M., Ibarra, D., Tomás-Pejó, E., González-Fernández, C., Ballesteros, M. (2015). Unraveling the effects of laccase treatment on enzymatic hydrolysis of steam-exploded wheat straw. Bioresource technology, 175: 209-215.
- Olvera, C. F., Rodríguez-Sanoja, R., Prieto, G. F., Román, G. A. D. (2012). Caracterización física y química proximal de paja, grano y almidón de cebada de la variedad esmeralda. Bio/Technol, 16: 9-20.
- Otero, R. C. (2007). Revisión bibliográfica de las levaduras genéticamente modificadas para reducir el alcohol en vinos. ACE: Revista de enología, (85): 1.
- Panagiotopoulos, I. A., Lignos, G. D., Bakker, R. R., Koukios, E. G. (2012). Effect of low severity dilute-acid pretreatment of barley straw and decreased enzyme loading hydrolysis on the production of fermentable substrates and the release of inhibitory compounds. Journal of Cleaner Production, 32: 45-51.
- Pandey, A., Negi, S., & Soccol, C. R. (Eds.). (2016). Current Developments in Biotechnology and Bioengineering: Production, Isolation and Purification of Industrial Products. Elsevier.
- Partida-Sedas, G. (2017). "Producción de etanol a partir de jugo y bagazo de sorgo dulce (*Sorghum bicolor* L. Moench) mejorado genéticamente". Tesis Doctoral. UNIDA-Instituto Tecnológico de Veracruz, México.
- Pereyra, S., y Stewart, S. (2004). Manejo de enfermedades en cebada. IN: Jornada Técnica Cultivos de Invierno, 1-11.
- Pernalete, Z., Piña, F., Suárez, M., Ferrer, A., Aiello, C. 2008. Fraccionamiento del bagazo de caña de azúcar mediante tratamiento amoniacal: efecto de la humedad del bagazo y la carga de amoníaco. Bioagro. 20 (1): 3-10.
- Pietrzak, W., Kawa-Rygielska, J. (2015). Simultaneous saccharification and ethanol fermentation of waste wheat-rye bread at very high solids loading: Effect of enzymatic liquefaction conditions. Fuel, 147: 236-242.
- Qing, Q. y Bing, Y. (2010). Impact of surfactants on pretreatments of corn stover. Bioresource Technology. 101: 5941-5951.
- Qi, G., Xiong, L., Li, H., Huang, Q., Luo, M., Tian, L., Chen, X. (2019). Hydrotropic pretreatment on wheat straw for efficient biobutanol production. Biomass and Bioenergy, 122: 76-83.

- Qiu, J., Tian, D., Shen, F., Hu, J., Zeng, Y., Yang, G., Zhang, J. (2018). Bioethanol production from wheat straw by phosphoric acid plus hydrogen peroxide (PHP) pretreatment via simultaneous saccharification and fermentation (SSF) at high solid loadings. *Bioresource technology*, 268: 355-362.
- Rocha-Martín, J., Martínez-Bernal, C., Pérez-Cobas, Y., Reyes-Sosa, F. M., García, B. D. (2017). Additives enhancing enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass. *Bioresource technology*, 244: 48-56.
- Rosillo-Calle, F., Cortéz, L. (1998). Towards proalcohol II: a review of the Brazilian bioethanol programme. *Biomass Bioenergy*. 14: 115-124.
- Rosgaard, L., Andric, P., Dam-Johansen, K., Pedersen, S., Meyer, A. S. (2007). Effects of substrate loading on enzymatic hydrolysis and viscosity of pretreated barley straw. *Applied biochemistry and biotechnology*, 143(1): 27-40.
- Rudolf, A., Alkasrawi, M., Zacchi, G., Lidén, G. (2005). A comparison between batch and fed-batch simultaneous saccharification and fermentation of steam pretreated spruce. *Enzyme and Microbial Technology*, 37(2): 195-204.
- SAGARPA (2011). Estudio de gran visión y factibilidad económica y financiera para el desarrollo de infraestructura de almacenamiento y distribución de granos y oleaginosas para el mediano y largo plazo a nivel nacional. Disponible en: https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/184923/Evaluacion_Ambiental_Proyecto_Almacenamiento_de_Granos_y_Servicios_de_Informacion_para_el_Desarrollo_Agricola.pdf
- SAGARPA, (2016). Atlas agroalimentario 2016. Disponible en: https://nube.siap.gob.mx/gobmx_publicaciones_siap/pag/2016/Atlas-Agroalimentario-2016.
- Saini, J. K., Saini, R., Tewari, L. (2015). Lignocellulosic agriculture wastes as biomass feedstocks for second-generation bioethanol production: concepts and recent developments. *3 Biotech*. 5(4): 337-353.
- Sakimoto, K., Kanna, M., Matsumura, Y. (2017). Kinetic model of cellulose degradation using simultaneous saccharification and fermentation. *Biomass and Bioenergy*, 99: 116-121.
- Salapa, I., Topakas, E., y Sidiras, D. (2018). Simulation and optimization of barley straw organosolv pretreatment. *Industrial crops and products*, 113: 80-88.
- Salinas, C. E. y Gasca, Q. V. (2009). Los biocombustibles. Universidad Autónoma Metropolitana. Distrito Federal, México. (25) 157: 75-82.
- Sarsaiya, S., Jain, A., Awasthi, S. K., Duan, Y., Awasthi, M. K., & Shi, J. (2019). Microbial dynamics for lignocellulosic waste bioconversion and its importance with modern circular economy, challenges and future perspectives. *Bioresource technology*, 121905.
- Schneider, L., Dong, Y., Haverinen, J., Jaakkola, M., Lassi, U. (2016). Efficiency of acetic acid and formic acid as a catalyst in catalytical and mechanocatalytical pretreatment of barley straw. *Biomass and Bioenergy*, 91: 134-142.
- Schneider, L., Haverinen, J., Jaakkola, M., Lassi, U. (2016). Solid acid-catalyzed depolymerization of barley straw driven by ball milling. *Bioresource technology*, 206: 204-210.

- Sewsynker-Sukai, Y., Kana, E. G. (2018). Simultaneous saccharification and bioethanol production from corn cobs: Process optimization and kinetic studies. *Bioresource technology*, 262: 32-41.
- SIAP. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. Cierre de la producción agrícola por cultivo – Cebada. 2015. Recuperado de: <http://www.siap.gob.mx/cierre-de-la-produccion-agricola-por-cultivo/>.
- SIAP Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP). (2019). Consultado 09-11-2019 en <http://www.siap.sagarpa.gob.mx/>
- Sivaramakrishnan, S, Gangadharan, D, Nampoothiri, K.M, Soccol, C.R, Pandey, A. (2007). Alpha amylase production by *Aspergillus oryzae* employing solid state fermentation. *Journal of Scientific and Industrial Research*. 66: 621-626.
- Stenberg, K., Bollók, M., Réczey, K., Galbe, M., Zacchi, G. (2008). Effect of substrate and cellulase concentration on simultaneous saccharification and fermentation of steam-pretreated softwood for ethanol production. *Biotechnology and bioengineering*, 68(2): 204-210.
- Sudiyani, Y., Dahnum, D., Burhani, D., Putri, A. M. H. (2019). Evaluation and comparison between simultaneous saccharification and fermentation and separated hydrolysis and fermentation process. In *Second and Third Generation of Feedstocks* (pp. 273-290). Elsevier.
- Sun, Y. y Cheng, J. (2002). Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresource Technology*. 83: 1-11.
- Sun, X. F., Jing, Z., Fowler, P., Wu, Y., Rajaratnam, M. (2011). Structural characterization and isolation of lignin and hemicelluloses from barley straw. *Industrial Crops and Products*, 33(3): 588-598.
- Suzuki, T., Hoshino, T., Matsushika, A. (2019). High-temperature ethanol production by a series of recombinant xylose-fermenting *Kluyveromyces marxianus* strains. *Enzyme and microbial technology*, 129: 109359.
- Szulczyk, K. R., McCarl, B.A., Cornforth, G. (2010). Market penetration of ethanol. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 14: 394-403.
- Tang, H., Watanabe K., Mitsunga, T. (2002). Characterization of storage starches from quinoa, barley and adzuki sedes. *Carbohydrate Polymers*. 49:13-22.
- Tester, R. F., Karkalas, I., Qi, X. (2004). Starch-composition, fine structure and architecture. *Journal of Cereal Science*. 39: 151-165.
- Thompson, D. B. (2000). On the non.random nature of amylopectin branching. *Carbohydrate Polymers*. 43: 223-239.
- Tomás-Pejó, E., Oliva, J. M., González, A., Ballesteros, I., Ballesteros, M. (2009). Bioethanol production from wheat straw by the thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus* CECT 10875 in a simultaneous saccharification and fermentation fed-batch process. *Fuel*, 88(11): 2142-2147.
- Tomás -Pejó, M., E. (2010). Bioetanol de paja de trigo: estrategias de integración de las etapas de proceso. Tesis de la Universidad Complutense de Madrid, Facultad de Ciencias Biológicas, Departamento de Microbiología III.

- Tomás-Pejó, E., Feroso, J., Herrador, E., Hernando, H., Jiménez-Sánchez, S., Ballesteros, M., Serrano, D. P. (2017). Valorization of steam-exploded wheat straw through a biorefinery approach: bioethanol and bio-oil co-production. *Fuel*, 199: 403-412.
- Vargas, F., Domínguez, E., Vila, C., Rodríguez, A., Garrote, G. (2015). Agricultural residue valorization using a hydrothermal process for second generation bioethanol and oligosaccharides production. *Bioresource Technology*, 191: 263-270.
- Vázquez, H. J., y Dacosta, O. (2007). Fermentación alcohólica: Una opción para la producción de energía renovable a partir de desechos agrícolas. *Ingeniería, investigación y tecnología*, 8(4): 249-259.
- Vázquez, M. 2013. *Identificación de la logística del mercado de la cebada (Hordeum vulgare) en los estados de Hidalgo y Tlaxcala, México*. Tesis de Maestría, Colegio de Postgraduados, Texcoco, México. Recuperado de: http://www.biblio.colpos.mx:8080/xmlui/bitstream/10521/1966/1/Vazquez_Alfaro_M_M_C_Economia_2013.pdf.
- Velázquez-Valadez, U., Farías-Sánchez, J. C., Vargas-Santillán, A., Castro-Montoya, A. J. (2016). Tequilana weber agave bagasse enzymatic hydrolysis for the production of fermentable sugars: oxidative-alkaline pretreatment and kinetic modeling. *BioEnergy Research*, 9(4): 998-1004.
- Villanueva, P. G., García, Y. G. (2016). Sacarificación y fermentación simultánea de olote pretratado/Simultaneous Saccharification and Fermentation process of pre-treated corn cob. *CIBA Revista Iberoamericana de las Ciencias Biológicas y Agropecuarias*, 5(9): 53-67.
- Wainwright, M. (1995). Introducción a la biotecnología de hogos. Zaragoza, España, Ed. Acriba p. 228.
- Wang, L., Luo, Z., Shahbazi, A. (2013). Optimization of simultaneous saccharification and fermentation for the production of ethanol from sweet sorghum (*Sorghum bicolor*) bagasse using response surface methodology. *Industrial crops and products*, 42: 280-291.
- Wang, Z., Lei, T., Yan, X., Chen, G., Xin, X., Yang, M., Gupta, A. K. (2019). Common characteristics of feedstock stage in life cycle assessments of agricultural residue-based biofuels. *Fuel*, 253: 1256-1263.
- Wingren, A., Galbe, M., Zacchi, G. (2003). Techno-economic evaluation of producing ethanol from softwood: Comparison of SSF and SHF and identification of bottlenecks. *Biotechnology progress*, 19(4): 1109-1117.
- Worley, J.W., Vaughan, H.M., Cundiff, J.S. (1992). Energy analysis of ethanol production from Sweet sorghum. *Bioresource Technology*. 40: 263-273.
- Wu, W.X, Mabinadji, J., Betrand, T.F, Wu, W.X. (1999). Effect of culture conditions on the production of an extracellular thermostable alpha-amylase from an isolate of *Bacillus* sp. *Journal of Zhejiang University of Agricultural Life Science*. 25:404-408.
- Wyman, C. E., Decker, S. R., Himmel, M. E., Brady, J. W., Skopec, C. E., Viikari, L. (2005). Hydrolysis of cellulose and hemicellulose. *Polysaccharides: Structural diversity and functional versatility*, 1: 1023-1062.
- Xiao, Z., Zhang, X., Gregg, D. J., Saddler, J. N. (2004). Effects of sugar inhibition on cellulases and β -glucosidase during enzymatic hydrolysis of softwood substrates. In

Proceedings of the Twenty-Fifth Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals Held May 4–7, 2003, in Breckenridge, CO (pp. 1115-1126). Humana Press, Totowa, NJ.

- Yang, M., Zhang, J., Kuittinen, S., Vepsäläinen, J., Soininen, P., Keinänen, M., Pappinen, A. (2015). Enhanced sugar production from pretreated barley straw by additive xylanase and surfactants in enzymatic hydrolysis for acetone-butanol–ethanol fermentation. *Bioresource technology*, 189: 131-137.
- Yuan, Z., Wen, Y., Li, G. (2018). Production of bioethanol and value added compounds from wheat straw through combined alkaline/alkaline-peroxide pretreatment. *Bioresource technology*, 259: 228-236.
- Zhao, X., Moates, G. K., Elliston, A., Wilson, D. R., Coleman, M. J., Waldron, K. W. (2015). Simultaneous saccharification and fermentation of steam exploded duckweed: improvement of the ethanol yield by increasing yeast titre. *Bioresource technology*, 194: 263-269.
- Ziolkowska, J. R. (2020). Biofuels technologies: An overview of feedstocks, processes, and technologies. In *Biofuels for a More Sustainable Future* (pp. 1-19). Elsevier.

9. ANEXO

Artículo publicado:

Optimization of peroxide-alkaline pretreatment and enzymatic hydrolysis of barley straw (*Hordeum vulgare* L.) to produce fermentable sugars using a Box–Behnken desing.

Año de publicación: 2020

Revista: Biomass Conversion and Biorefinery

Factor de impacto: 2.602 (2019)

IISN: 21906815, 21906823



Optimization of peroxide-alkaline pretreatment and enzymatic hydrolysis of barley straw (*Hordeum vulgare* L.) to produce fermentable sugars using a Box–Behnken design

N. Ibarra-Díaz¹ · J. F. Castañón-Rodríguez² · J. Gómez-Rodríguez¹ · M. G. Aguilar-Uscanga¹

Received: 26 February 2020 / Revised: 18 June 2020 / Accepted: 1 July 2020
© Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2020

Abstract

In recent years, interest has increased in the use of agro-industrial wastes for use as raw materials in the production of second-generation biofuels and other products of industrial interest. A pretreatment is necessary, followed by an enzymatic hydrolysis to obtain high yields of fermentable sugars. In the present study, the best conditions were established both for peroxide-alkaline pretreatment and for enzymatic hydrolysis of the Mexican barley straw (*Hordeum vulgare* L.) variety Doña Josefa in order to maximize lignin removal and improve enzyme conversion. Response surface methodology based on a Box–Behnken experimental design was used to optimize pretreatment conditions (concentration of hydrogen peroxide [H₂O₂], reaction time, and liquid–solid ratio (LSR)), and enzymatic hydrolysis (cellulase and xylanase concentrations and reaction time). Samples obtained from residual bagasse at each process stage were analyzed by means of scanning electron microscopy (SEM) and infrared spectrometry (FTIR) to evaluate the changes in the structure of the material after treatments. In pretreatment optimization, it was possible to obtain 60% delignification at a 6% peroxide concentration and a 12:1 LSR in 24 h. In saccharification, a maximum 82% conversion of cellulose to glucose using 6% cellulase (Cellic® CTec III), and 4% xylanase (Cellic® HTec III) in 20 h of hydrolysis, was used in obtaining a maximum sugar concentration of 70 g/L. Peroxide-alkaline pretreatment together with state-of-the-art enzyme saccharification makes barley straw an excellent alternative for fermentable sugar production that can be used for various biotech industries.

Keywords Barley straw · Lignin removal · Cellulase · Xylanase · Biomass conversion · Glucose

1 Introduction

Agricultural and agroindustrial wastes are a potential source of raw material for fermentable sugar production. They have certain advantages such as low cost, not being dependent on

the food chain, and high availability, with there being in the world between 3.7 and 5 billion metric tons of lignocellulosic waste, about 8.9 million from cereal wastes such as wheat, rice, and barley [1–3]. In Mexico, more than 100 million tons of lignocellulosic wastes is generated, agave bagasse, sugar-cane bagasse, corn stubble, wheat straw, and barley straw among others [4]. Barley is the fifth most produced cereal in Mexico (1 million tons per year) [5] and only 30% of its straw waste is used, with the other 70% being stored and/or simply discarded.

To take advantage of the sugars present in lignocellulosic biomass and to obtain a product of industrial interest, it is necessary to subject them to an effective pretreatment that is capable of reducing particle size, removing lignin, and hydrolyzing hemicellulose and cellulose. In this way, a reduction in cellulose crystallinity, an improvement in sugar release in the enzymatic hydrolysis stage, and a generation of the least amount of inhibitory or toxic compounds that could affect the next stage of transformation of these sugars to products

Electronic supplementary material The online version of this article (<https://doi.org/10.1007/s13399-020-00853-4>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ M. G. Aguilar-Uscanga
gaguilar@itver.edu.mx; maria.au@veracruz.tecnm.mx

¹ Tecnológico Nacional de México/I. T. Veracruz- Depto. Ing. Química y Bioquímica-UNIDA, Calz. M.A. de Quevedo No. 2779, Col. Formando Hogar, 91897 Veracruz, Veracruz, Mexico

² Unidad Académica de Trabajo Social y Ciencias para el Desarrollo Humano, Universidad Autónoma de Tamaulipas, Mariano Matamoros s/n, Zona Centro, 87000 Cd. Victoria, Tamaulipas, Mexico

of interest through a fermentation process are achieved [6]. There are four main methods for pretreatment of lignocellulosic material (physical, chemical, physicochemical, and biological methods) [7] and the combination of these has also been extensively studied to improve process yields [8–10]; however, pretreatment selection depends on raw material composition and process conditions.

In recent years, the most used pretreatment with the best results has been alkaline pretreatment, which is highly effective in lignocellulosic material delignification [11]. The main function of alkaline pretreatment is to reduce the cellulose crystallinity, to dissociate the cellulose-lignin complex, to increase surface area, and finally to decrease the presence of compounds that interfere with enzymatic hydrolysis and fermentation [12]. Alkaline pretreatment has certain advantages: it does not need extreme operating conditions, does not generate inhibitory compounds, and facilitates future enzymatic hydrolysis and fermentation without the need to subject the lignocellulosic material to a previous acid treatment. As for enzymatic hydrolysis, it is presented as the best saccharification alternative, since unlike acid hydrolysis it does not cause corrosion problems, does not require recovery and neutralization processes, and does not require the use of high temperatures and pressures, therefore preventing the degradation of sugars and the generation of toxic or inhibitory compounds [13]. It has been shown that the fundamental stages in bioenergetic production are pretreatment and saccharification (enzymatic hydrolysis) although these two steps can increase the production cost. Therefore, it is necessary to have processes that are fast, economical, and efficient. The optimization of these two process stages, alkaline pretreatment and saccharification through enzymatic hydrolysis for the production of fermentable sugars, is a main factor in order to reduce life cycle greenhouse gas emissions (GHG) of second-generation bioethanol processes [14, 15].

For the optimization of the variables within a process, statistical response surface models such as the Box–Behnken design are commonly used. These models are a good tool to evaluate different parameters using the least possible number of experiments. This experimental design analyzes the effects of the factors as well as their interactions in the response variable in order to determine the optimized response [16–19]. Therefore, the objective of this study was to evaluate the use of barley straw as a raw material to obtain fermentable sugars, so that this residue, of great importance in Mexican agriculture, can have a new added value. An alkaline pretreatment optimization for maximum removal of the lignin present in barley straw was carried out, as well as testing the latest generation of Cellic® CTec III and Cellic® HTec III enzymes, specifically designed for biofuel production. At this stage, the enzymatic hydrolysis process was optimized in order to obtain the highest yield of fermentable sugars which can

subsequently be transformed into ethanol or other products of commercial value.

2 Materials and methods

2.1 Raw material

Barley straw (*Hordeum vulgare* L.) varieties “Doña Josefa” and “Esmeralda” were obtained from Bella Vista, Hidalgo (19° 52' 46.6" N, 98° 34' 10.6" W). The straw was cleaned, particle size subsequently reduced, and then screened to recover 1–2-cm pieces. Particle size was reduced using a conventional brand blender (Classic Osterizer, Newell Brands de Mexico S.A. de C.V), then the material was sieved using 9.5-, 6.35-, 3.35-, 0.84-, 0.14-, 0.105-, and 0.062-mm meshes. The material recovered from the 0.84-mm mesh was stored. The selected material was stored at room temperature (between 22 and 25 °C) in plastic bags.

2.2 Lignocellulosic composition

Lignocellulosic composition was carried out in duplicate using the standard analytical procedure for biomass analysis provided by the National Renewable Energy Laboratory (NREL) [20], which consisted of a double acid hydrolysis. The first hydrolysis was carried out in a stainless steel electric thermostatic water bath with 72% H₂SO₄ for 60 min, at 30 °C, under stirring for 10 min. The second hydrolysis was carried out with 4% H₂SO₄ in an autoclave (AESAs, CV-250, Mexico) at 121 °C, and 1.1 atm for 60 min. The glucose, xylose, and arabinose contained in the supernatant were analyzed by HPLC (Waters 600 TSP Spectra System, Waters, Milford, MA) using a Shodex SH1011 8 Å-300 mm column (H203153, Japan), at 50 °C, with sulfuric acid 5 mM as mobile phase with a flow of 0.6 mL/min and a refractive index detector (Waters 2414, TSP Refracto Monitor V, Waters, Milford, MA, USA). Acid-soluble lignin was analyzed using a UV-Vis spectrophotometer (Agilent Cary 8454, Agilent Technologies). Insoluble lignin moisture was determined according to AOCS methodology (Ab 2-49) using a vacuum oven (Thermo Scientific Lab-Line, 3608-1CE), and finally ash determination was performed in a flask (Thermo Scientific Thermoline, model FB1310M-33) using AOCS methodology (Ba 5a-49).

2.3 Peroxide-alkaline pretreatment

For the optimization of lignin removal with alkaline pretreatment, a three-variable Box–Behnken design each with three levels was used; twelve combinations with three central points yielded a total of 15 experiments. The variables evaluated were H₂O₂ concentration (X₁), reaction time (X₂), and

solid–liquid ratio (X_3) as shown in Table 1; the response variable was the percentage of lignin removed. The matrix studied for pretreatment is shown in [Supplementary Materials](#). To carry out the experiments, 1 g of straw was placed in each Erlenmeyer flask, suspended with the respective H_2O_2 solution, and the pH was subsequently adjusted to 11.5 using a sodium hydroxide (NaOH) solution of 10 M. The flasks were incubated at room temperature. After the pretreatment time, the samples were washed with water until a pH close to neutrality was achieved. Each sample was placed in a container, and with the help of a fine-meshed household strainer, they were washed with running water (approximately 4 washes) until reaching a pH close to neutrality. Subsequently, the excess water was removed by pressing the sample against the mesh. Finally, the samples were placed in aluminum trays and left to dry in the sun at room temperature. They were dried and lignocellulosic content was determined in order to quantify the amount of residual lignin by the method previously described.

2.3.1 Alkaline pretreatment optimization

Once the experiments of the Box–Behnken design were performed and the amount of residual lignin quantified, the results were entered into the Statgraphics Centurion XVI.I statistical analysis software in order to obtain the optimal conditions to achieve the highest percentage of delignification of the raw material and to validate the result.

2.4 Enzymatic hydrolysis

Enzymatic saccharification optimization was carried out using a three-variable Box–Behnken design each with three levels; twelve combinations with three central points yielded a total of 15 experiments. The variables to be studied were cellulase (Cellic® CTec III) concentration (X_1), xylanase (Cellic® HTec III (xylanases)) concentration (X_2), and reaction time (X_3) as shown in Table 2; the response variable was the conversion of cellulose to glucose. The matrix studied for enzymatic saccharification is shown in [Supplementary Materials](#). The experiments were performed with 1 g delignified straw (obtained under optimal conditions) and 10 mL 50 mM acetate regulatory solution, pH 5 in 50-mL Erlenmeyer flasks.

Table 1 Levels of variables studied in the experimental design

Variable (unit)	Factor	Level		
		X	(−1)	(0)
H_2O_2 (% v/v)	X_1	2	4	6
Time (h)	X_2	15	30	45
LSR (mL solution:g straw)	X_3	8:1	12:1	16:1

Table 2 Levels of study in the Box–Behnken design

Variable (unit)	Factor	Level		
		X	(−1)	(0)
Cellic CTec III (% w/w)*	X_1	2	4	6
Cellic HTec III (% w/w)*	X_2	2	4	6
Time (h)	X_3	20	35	50

*g enzyme/100 g pretreated barley straw

The flasks were kept in an incubator with orbital shaking (INO 650H-11 Prendo) at 50 °C and 250 rpm for the time established in the design. After saccharification time, the samples were inactivated in a boiling water bath for 15 min, then centrifuged at 5000 rpm, 20 °C, for 20 min in a refrigerated centrifuge (Eppendorf Centrifuge 5804R). The supernatant was analyzed in duplicate by HPLC to quantify the amount of glucose released in each treatment.

2.4.1 Enzymatic hydrolysis optimization

Once Box–Behnken design experiments were performed and the amount of glucose released was quantified, the results were entered into the Statgraphics Centurion XVI.I statistical analysis software in order to obtain the optimal conditions to achieve the highest conversion rate of glucose, cellulose, and hemicellulose to xylose in the raw material and to validate the results.

2.5 Infrared spectroscopy (FTIR)

Infrared spectrum samples were obtained using a FTIR (Perkin Elmer Spectrum GX) spectrometer and analyzed by infrared spectroscopy using the KBr pellet method in a range between 400 and 4000 cm^{-1} .

2.6 Scanning electron microscopy (SEM)

The surfaces of the samples from each treatment were studied by scanning electron microscopy (JSM-6010LA InTouchScope). The samples were fixed on aluminum brackets with double-sided carbon adhesive tape and gold sputtered. The SEM images were obtained at 0, $\times 550$, and $\times 1000$, at 15 kV.

3 Results and discussion

3.1 Characterization of raw materials

Regarding the composition of straw lignocellulosic material, the “Esmeralda” variety has 41% cellulose, 28%

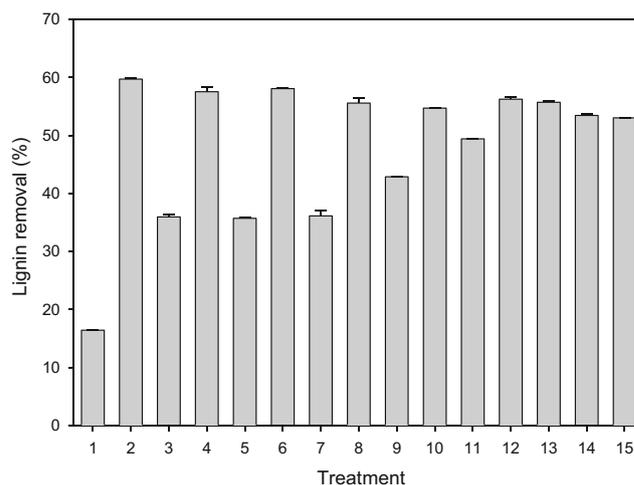
Table 3 Dry chemical composition of barley straw reported by different authors and in this work

	Cellulose (%)	Hemicellulose (%)	Lignin (%)
Reference			
[24]	37.5	37.1	15.8
[25]	34.2	13.2	15.9
[26]	35.6	16.8	23.1
[27]	34.8	19.4	19.2
This work			
“Doña Josefa” variety	42.0 ± 0.0	28.4 ± 1.4	18.0 ± 0.1
“Esmeralda” variety	41.2 ± 0.0	27.5 ± 0.6	18.0 ± 0.2

hemicellulose, and 18% lignin, while the “Doña Josefa” variety presented 42% cellulose, 28% hemicellulose, and also 18% lignin, as shown in Table 3. These results are consistent with those reported in the literature [21–23], obtaining between 70 and 80% holocellulose, consisting of 40–50% cellulose and 20–30% hemicellulose. It should be noted that the amounts of cellulose and hemicellulose present in the varieties of straw that were used in this work are above the average (35% and 21%, respectively) of what is reported in other works [24–27], as shown in Table 3. Variation may be due to various factors as stated by Contreras-López [28], who found that the composition of the barley crop is affected by planting site, soil type, weather conditions, and even the type of tillage carried out on the crop. As there were no significant differences regarding straw lignocellulosic composition, the “Doña Josefa” variety was chosen to perform the experiments because it is the most widely cultivated variety in the Hidalgo central highlands, affording greater availability of raw material.

3.2 Peroxide-alkaline pretreatment

The main objective of achieving a good alkaline pretreatment is to remove the greatest amount of lignin present in the biomass, since it can generate unproductive interactions between

**Fig. 1** Lignin removal percentage in barley straw by alkaline peroxide pretreatment using a Box–Behnken design

enzymes, hindering their access to the main cellulose and hemicellulose chains and preventing their degradation to monosaccharides.

The results obtained after carrying out the 15 experiments of the Box–Behnken design are shown in Fig. 1. The delignification percentages obtained ranged from the minimum 16% (treatment 1) using a 2% H₂O₂ concentration, an LSR of 12:1 mL solution per g straw, and a reaction time of 15 h, to the highest percentage of 59% (treatment 2) corresponding to a 6% H₂O₂ concentration, an LSR of 12:1 mL solution per g straw with a reaction time of 15 h.

The results show that there is an effect between H₂O₂ concentration and reaction time. After obtaining the results of the 15 treatments, the values were entered into the Statgraphics Centurion XVI statistical software in order to find the conditions under which the highest lignin removal was achieved. A quadratic model was chosen to adjust experimental data and maximize the percentage of delignification in barley straw. An equation was obtained for the model (Eq. 1), where H₂O₂ is expressed in % (v/v), LSR in mL solution per g straw, and time in hours (h); the relationship between the three factors was studied and their relationship with the percentage of lignin removed can be observed.

$$\begin{aligned} \text{\%removal} : & -60.797 + (29.2668 \times [\text{H}_2\text{O}_2]) + (2.23496 \times \text{time}) \\ & + (0.639691 \times \text{LSR}) - (2.01223 \times [\text{H}_2\text{O}_2]^2) - (0.180628 \times [\text{H}_2\text{O}_2] \times \text{time}) - (0.0904269 \times [\text{H}_2\text{O}_2] \times \text{LSR}) \\ & - (0.0160393 \times \text{time}^2) - (0.0208503 \times \text{time} \times \text{LSR}) + (0.0223054 \times \text{LSR}^2) \end{aligned} \quad (1)$$

The optimal conditions obtained for the maximum removal of lignin from the optimization performed were 6% (v/v) concentration of H₂O₂, an LSR of 12:1 mL solution per g straw, and 24 h of reaction time. The value

of the coefficient of determination (R^2), a measure of the degree of fit of the model obtained, was 0.959 which is satisfactory, since a good fit must have at least an R^2 of 0.8 [29].

The relationship between the response and the variables evaluated is shown in Fig. 2 with the corresponding graphs, where the effect of H_2O_2 concentration and the reaction time on lignin removal can be seen (Fig. 2a). A higher concentration of H_2O_2 and a longer reaction time increase lignin removal and vice versa. The effect of LSR and H_2O_2 concentration also has an influence on delignification, since at a higher H_2O_2 concentration with a high LSR, removal is better; however, the LSR can be maintained at a ratio between 12:1 and 16:1, and lignin removal is not greatly affected as long as the H_2O_2 concentration

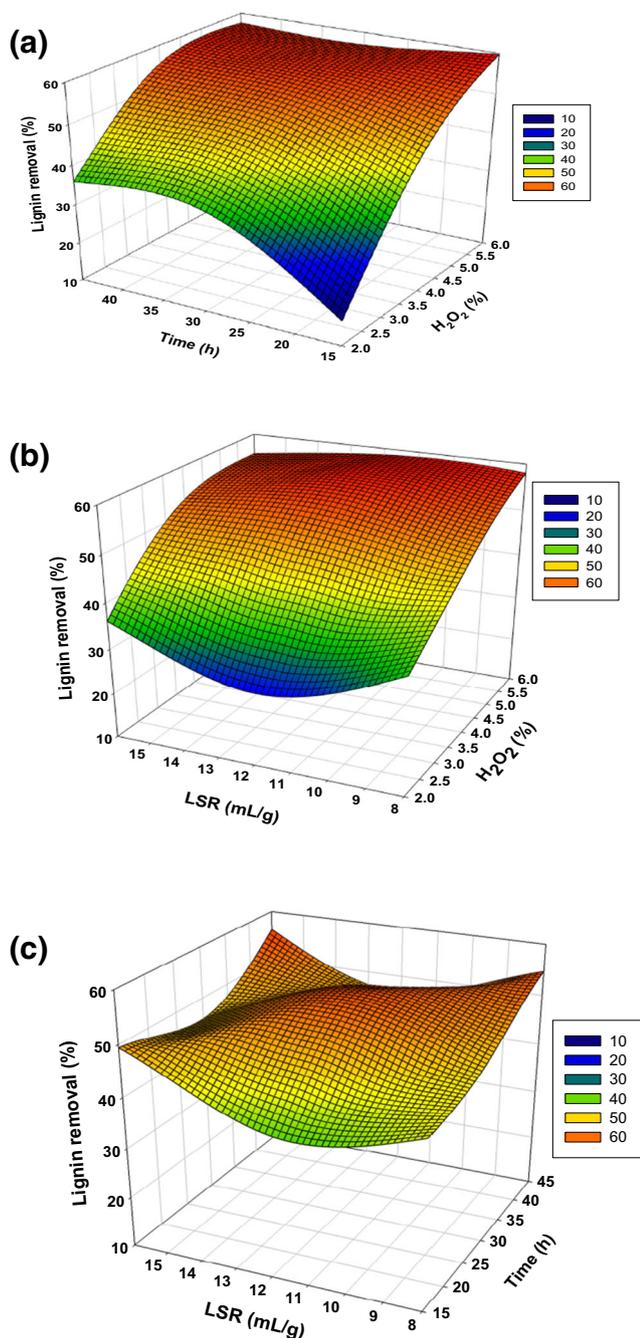


Fig. 2 Response surface plot of the percentage of lignin removed as a function of **a** H_2O_2 vs. time, **b** time vs. LSR, and **c** H_2O_2 vs. LSR

is high, as shown in Fig. 2b. Finally, the effect generated by SLR and reaction time is the one with the least influence on delignification; however, if both are reduced, a negative effect on delignification begins to be observed (Fig. 2c).

Under the optimal conditions indicated by the model, a maximum theoretical removal value of 60.19% was found; when performing the experimental validation, it was possible to remove 59.96% lignin, 99.6% of the predicted theoretical value. Therefore, it was possible to reduce the initial lignin content present in barley straw from 18% in raw straw to 7.6% at the end of the alkaline pretreatment. The cellulose and hemicellulose compositions were also affected after peroxide-alkaline pretreatment; cellulose content increased from 42 to 58.3% and hemicellulose increased from 28.4 to 30.3%. In addition to the above, the results obtained in this process stage are beneficial since a high percentage of delignification was achieved in the barley straw with a single pretreatment and under moderate operating conditions such as pressure or temperature, compared with other studies where the raw material was subjected to prolonged alkaline pretreatment times, high temperatures and pressure during pretreatment, and even the delignification stage had been preceded by an acid hydrolysis stage [30–33].

3.3 Enzymatic hydrolysis optimization

In the process of enzymatic hydrolysis or enzymatic saccharification of agroindustrial (lignocellulosic) wastes, the characteristic biospecificity of cellulolytic enzymes on a particular chemical bond is used to generate products of interest. In this case, cellulases, cellobiases, and xylanases are responsible for lysing the cellulose glycosidic bond to generate glucose and the glycosidic bond of xylan (the main component of hemicellulose) to obtain xylose.

In this study, the previously treated barley straw was subjected to enzymatic hydrolysis following an experimental Box–Behnken design. The results obtained after the 15 treatments are observed in Table 4; concentrations ranging from 40 to 53 g/L glucose and 17 to 24 g/L xylose were obtained, with percentages of conversion from 66% (treatment 1) using a 2% cellulase (CTec III) concentration, a 2% xylanase (HTec III) concentration, and 35 h of reaction time to the highest conversion of 82% (treatment 6) with a 6% (29.8 FPU/100 g pretreated barley straw) cellulase concentration, a 4% (420.42 U/100 g pretreated barley straw) xylanase concentration, and 20 h of reaction time. The conversion rate was the highest when there was an interaction of cellulase and xylanase concentrations.

As in the previous section, after obtaining the results of the 15 treatments, the values were entered into the Statgraphics Centurion XVI software in order to find the conditions under which the cellulose and hemicellulose contained in the

pretreated barley straw will achieve maximum conversion to glucose and xylose, respectively.

In this case also, a quadratic model was also chosen to adjust the experimental data and maximize the percentage of conversion of cellulose to glucose in barley straw. An equation was

$$\begin{aligned} \% \text{Conversion} = & -2.9373 + (17.4725 \times \text{CTec } 3) + (15.9585 \times \text{HTec } 3) + (0.747202 \times \text{time}) - (0.93696 \times \text{CTec } 3^2) \\ & - (1.33872 \times \text{CTec } 3 \times \text{HTec } 3) - (0.095212 \times \text{CTec } 3 \times \text{time}) - (1.12137 \times \text{HTec } 3^2) \\ & - (0.0281599 \times \text{HTec } 3 \times \text{Time}) - (0.00285457 \times \text{Time}^2) \end{aligned} \quad (2)$$

The optimal conditions found for maximum cellulose conversion from the optimization performed are 6% cellulase (Cellic CTec III) concentration, 3% xylanase (HTec III) concentration, and 20 h of reaction time. The correlation coefficient (R^2) obtained was 0.86.

In the response surface graphs (Fig. 3), the relationship between the studied variables and the response variable is observed. In Fig. 3a, the interaction between cellulase and xylanase enzymes is observed; this interaction has the greatest influence during the process because the delignified straw has about 90% holocellulose (cellulose and hemicellulose) and both enzymes are responsible for the hydrolysis of these polysaccharides. A concentration greater than 4% cellulases is also observed to be necessary to improve hydrolysis, while for the xylanases, only an average concentration of 3–4% is necessary. Figure 3b shows the effect of time and cellulase concentration, where it is evident that a long hydrolysis is not necessary provided that

obtained for the model (Eq. 2), where the cellulase and xylanase concentrations are expressed in % (w/w) and the reaction time is given in hours (h); the relationship between the three factors, their interactions, and conversion rate can be observed.

cellulose concentration is high. Finally, in Fig. 3c, there is an effect between reaction time and xylanase concentration, where a behavior similar to cellulases is observed, since a prolonged hydrolysis time is not necessary.

It seems that xylanase concentration should be increased to improve yields, although this would be the case if the reaction only depended on this, but as explained in Fig. 3a, the most important effect occurs with the interaction of both enzymes.

It should be noted that during hydrolysis, no secondary inhibitory compounds such as acetic acid, furfural, or 5-hydroxymethylfurfural were detected. This is advantageous with respect to the hydrolysis carried out with acids such as sulfuric acid that due to the process characteristics such as high temperatures and prolonged exposure, the hexoses and pentoses present (furfural and 5-hydroxymethylfurfural) are degraded, which could lead to disadvantages to subsequent processes such as fermentation [34]. Furthermore, it should be noted that the optimal enzymatic hydrolysis conditions obtained in this work are favorable since the reaction time was only 20 h, compared with works where a similar process is carried out with barley straw or other lignocellulosic material and the hydrolysis times range from 48, 72, and up to 120 h [35, 36]. Additionally, it was possible to decrease the amount of enzymes used (the use of up to three different enzymes has been reported [37]), as well as the addition of surfactants to improve the conversion and concentrations of glucose and xylose obtained from barley straw [37]. The enzymatic dose was also reduced, since in some works, higher concentrations of 6–9% of the same enzymes (Cellic CTec III and HTec III, respectively) have been used to achieve an 80% conversion in agave bagasse [38].

Table 4 Enzymatic conversion and concentration of fermentable sugars (glucose and xylose) obtained in enzymatic hydrolysis

Treatment	Enzymatic conversion (%)	Glucose (g/L)	Xylose (g/L)
1	66.2 ± 0.4	41.9 ± 0.3	17.7 ± 0.2
2	77.8 ± 0.6	49.2 ± 0.4	21.3 ± 0.2
3	78.6 ± 0.1	49.8 ± 0.1	18.9 ± 0.1
4	69.0 ± 0.1	43.7 ± 0.1	17.2 ± 0.1
5	70.0 ± 0.3	44.3 ± 0.2	20.0 ± 0.2
6	84.9 ± 0.5	53.7 ± 0.4	24.1 ± 0.2
7	74.2 ± 1.5	47.0 ± 0.5	21.3 ± 0.6
8	77.8 ± 0.7	49.2 ± 0.5	20.5 ± 0.2
9	71.1 ± 0.7	45.0 ± 0.5	20.6 ± 0.3
10	76.1 ± 0.4	48.2 ± 0.3	22.4 ± 0.4
11	77.5 ± 1.0	49.0 ± 0.7	20.0 ± 0.9
12	79.1 ± 0.2	50.1 ± 0.1	19.6 ± 0.1
13	80.6 ± 0.0	51.0 ± 0.0	22.5 ± 0.4
14	81.1 ± 0.0	48.5 ± 0.4	21.6 ± 0.0
15	81.4 ± 0.0	50.3 ± 0.3	21.9 ± 0.0

3.4 Morphological characterization of pretreated barley bagasse

3.4.1 Scanning electron microscopy

Using the scanning electron microscopy technique, the obvious changes in barley straw morphology were

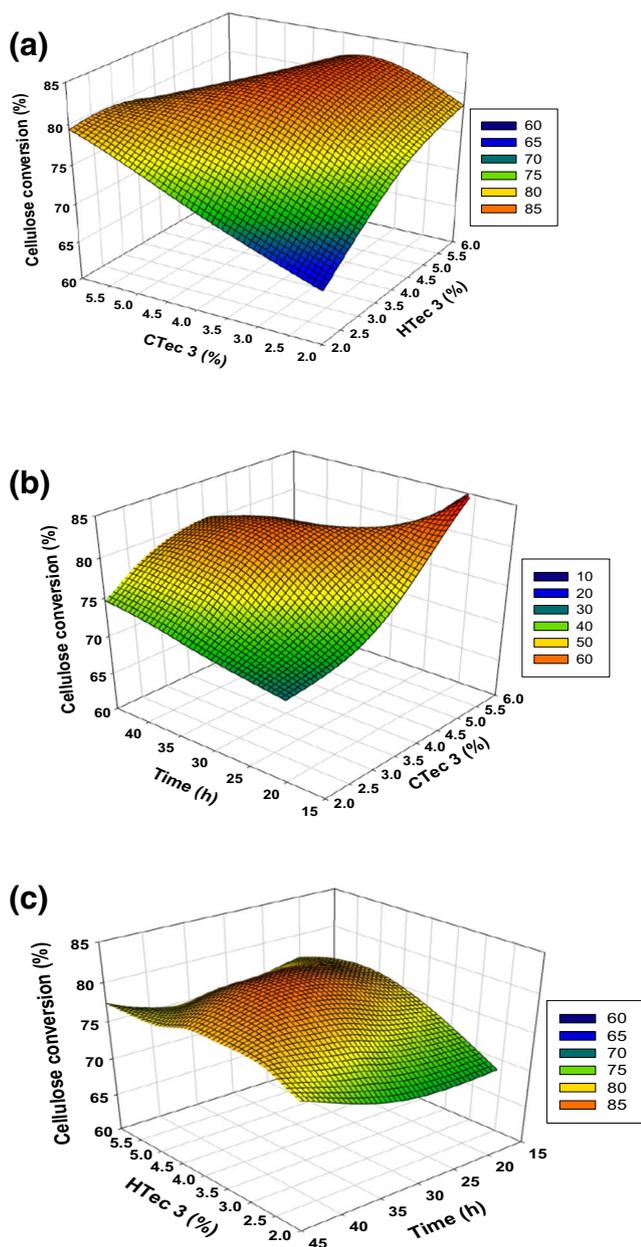


Fig. 3 Response surface of cellulose conversion percentage as a function of **a** cellulases (CTec III) vs. xylanases (HTec III), **b** time vs. cellulases (CTec III), and **c** time vs. xylanases (HTec III)

observed after each stage of the process. In Fig. 4a, barley straw is observed without any pretreatment with characteristic color and morphology. The micrograph shows the organized and characteristic structure of the lignocellulosic material with elongated, structured, and well-defined cellulose fibers surrounded by a framework formed by hemicellulose and lignin whose structure resembles that of a network since these polymers are highly branched and lack a defined structure [39]. Figure 4b shows barley straw once it has gone through the alkaline treatment stage. Macroscopically, the color change of the material can be seen, as well as the fiber texture that has a cottony

appearance with more exposed soft fibers. In the micrograph corresponding to the alkaline pretreatment, cellulose fibers with a looser, less rigid, and more porous structure are observed, attributable to the effect of alkaline pretreatment whose purpose is to dissociate the cellulose-lignin complex as well as to reduce cellulose crystallinity thus favoring the access of enzymes to the fiber interior during enzymatic hydrolysis [40, 41]. Finally, in Fig. 4c, the residue from enzymatic hydrolysis can be observed, where in this no longer defined structure, only granulated material can be seen. In the SEM image, there is also a material without defined structure, that of only isolated granules; this is associated with crystalline cellulose residues that were not hydrolyzed as well as with residual lignin.

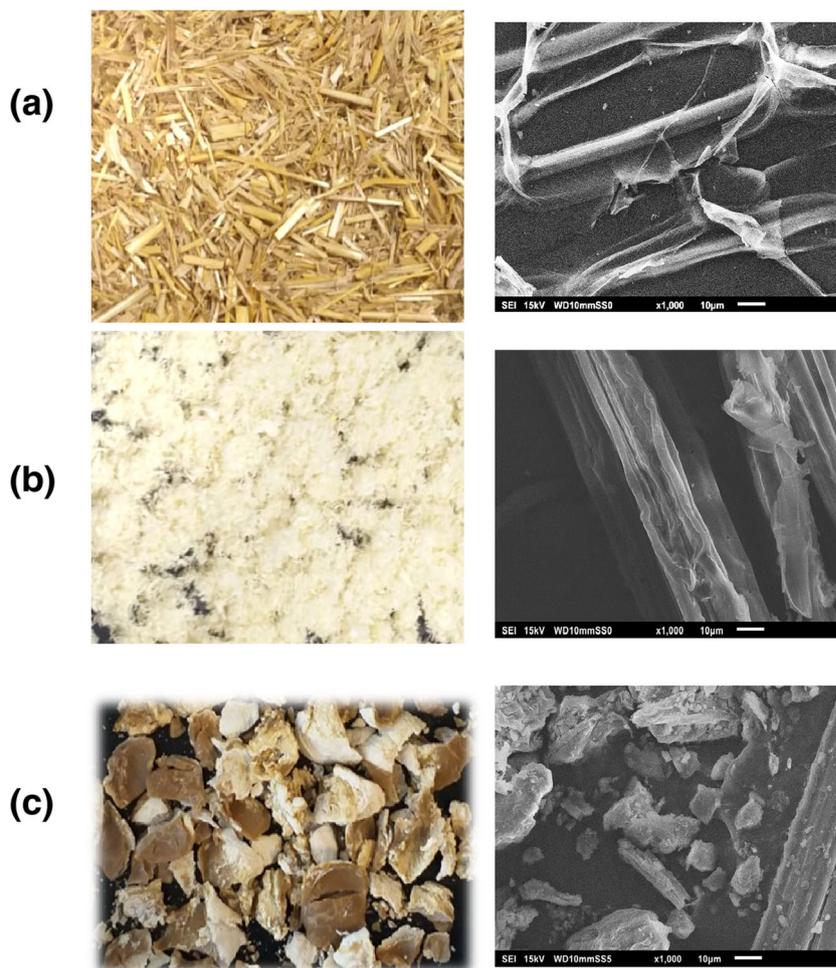
3.4.2 Fourier-transformed infrared spectroscopy

FT infrared spectroscopy was applied to identify the functional groups present in the original raw material and after the treatments involved. The functional groups corresponding to lignin particularly stand out with this methodology. In Fig. 5, these spectra are observed, showing the characteristic behavior of lignocellulosic material. The changes in lignin structure can be mainly seen and some important regions, where the strongest signals are found, stand out. For example, the first one is a broad band at 3415 cm^{-1} attributed to the hydroxyl groups (O–H bond stretching) in the phenolic and aliphatic structures. In the range of $2859\text{--}3000\text{ cm}^{-1}$, the signals correspond to C–H bond stretching present in methoxy and methylene groups [42, 43]. In this case, the peak corresponding to the enzyme hydrolysis residue presents greater intensity as well as a deformation compared with the two remaining material spectra, due to the fact that in the residue there is already a specifically defined composition with fragments of lignin and crystalline cellulose. The signals at $1653\text{--}1720\text{ cm}^{-1}$ correspond to carbonyl groups stretching found in hydroxycinnamic acids and aromatic rings characteristic of lignin, mainly ρ -cumaric acid and coniferyl alcohol. In the region between 1429 and 1512 cm^{-1} , there are vibrations corresponding to the lignin aromatic skeleton [44, 45]. There are also signals related to the aromatic ring and carboxyl group vibrations such as the ρ -cumaric ester in the region of $1035\text{--}1165\text{ cm}^{-1}$.

Finally, there are signals in the region of $1024\text{--}1089\text{ cm}^{-1}$ where aryl ether and phenoxy structures attributed to primary alcohols of the guayacil and syringuil type can be identified [24, 45].

In the aforementioned cases, it is necessary to highlight that the material with alkaline pretreatment showed the lowest peak intensity, attributed to the decrease in lignin present in the material. The residue after enzymatic hydrolysis exhibited a greater amount of lignin; this residue is mostly composed of

Fig. 4 Images of barley straw obtained by conventional photography (left) and by SEM (right). **a** Barley straw without pretreatment, **b** barley straw with peroxide-alkaline pretreatment, and **c** barley straw with alkaline pretreatment and enzymatic hydrolysis (enzymatic depletion)



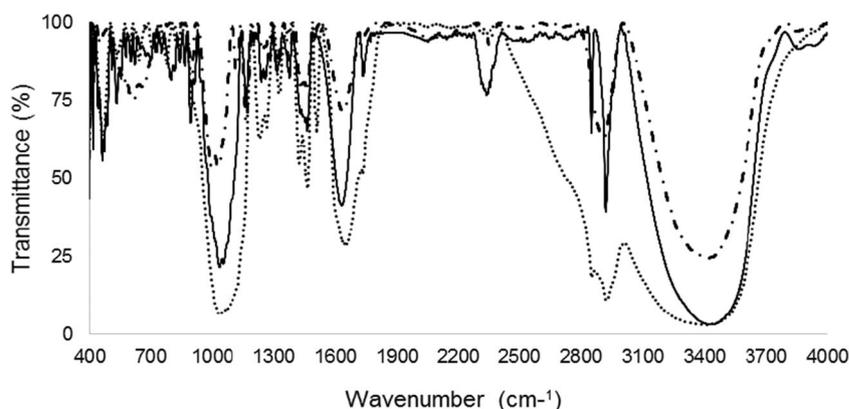
lignin and/or residues thereof, as well as crystalline cellulose residues that were not hydrolyzed.

4 Conclusions

The Box–Behnken design proposed in this work achieved an optimization of the alkaline pretreatment of barley straw to

maximize the percentage of lignin removal. Also during enzymatic hydrolysis, it was possible to maximize the conversion of cellulose and hemicellulose present in the delignified straw into glucose and xylose, respectively. These sugars play an important role in biofuel, and other value-added production. An efficient removal of lignin is a key element in achieving effective conversions during enzymatic hydrolysis and in obtaining good fermentable sugar yields. In this study, with an

Fig. 5 IR spectrum of barley straw with different treatments. Straw without pretreatment—straw with alkaline pretreatment—and enzymatic hydrolysis



alkaline pretreatment, it was possible to remove 60% of the lignin present in barley straw and to obtain a conversion to 82% fermentable sugars during enzymatic hydrolysis. The effectiveness of the delignification and enzymatic hydrolysis stages was also evident in a macro- and microscopic way, since both the structure and morphology of the raw material underwent significant changes throughout the process.

Acknowledgments The authors acknowledge the critical reading of Patricia Margaret Hayward-Jones, M Sc, and Dulce María Barradas-Dermitz, M Sc, and also to Carlos Alexander Lucho Constantino, PhD, from Autonomous University of Hidalgo for his collaboration in SEM and FTIR methodologies.

Funding information The authors received economic support from the Sectorial Fund for Research in Agricultural, Livestock, Aquaculture, Agro biotechnology and Plant Genetic Resources and the National Council of Science and Technology, Mexico (SAGARPA-CONACYT, Project 291143).

Compliance with ethical standards

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

References

- Mahmood H, Moniruzzaman M, Iqbal T, Khan MJ (2019) Recent advances in the pretreatment of lignocellulosic biomass for biofuels and value-added products. *Curr Opin Green Sustain Chem* 20:18–24. <https://doi.org/10.1016/j.cogsc.2019.08.001>
- Sarsaiya S, Jain A, Awasthi SK, Duan Y, Awasthi MK, Shi J (2019) Microbial dynamics for lignocellulosic waste bioconversion and its importance with modern circular economy, challenges and future perspectives. *Bioresour Technol* 121905:121905. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.121905>
- Wang Z, Lei T, Yan X, Chen G, Xin X, Yang M, Gupta AK (2019) Common characteristics of feedstock stage in life cycle assessments of agricultural residue-based biofuels. *Fuel* 253:1256–1263. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2019.05.105>
- Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (2018) Atlas agroalimentario 2018. https://nubesiapgobmx/gobmx_publicaciones_siap/pag/2018/Atlas-Agroalimentario-2018 Accessed 15 February 2019
- Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (2019). <http://www.siap.sagarpa.gob.mx/> Accessed 09 November 2019
- Sun Y, Cheng J (2002) Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresour Technol* 83:1–11. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(01\)00212-7](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(01)00212-7)
- Carreón OE, Ramos AS, Centeno S, Leal LJ, Martínez A, Fernández MT (2009) Etanol carburante. *BioTecnología* 13(3)
- Dahunsi SO, Olayanju TMA, Adesulu-Dahunsi AT (2019) Data on optimization of bioconversion of fruit rind of *Telfairia occidentalis* (fluted pumpkin) and poultry manure for biogas generation. *Chem Data Collect* 20:100192. <https://doi.org/10.1016/j.cdc.2019.100192>
- Dahunsi SO (2019) Mechanical pretreatment of lignocelluloses for enhanced biogas production: methane yield prediction from biomass structural components. *Bioresour Technol* 280:18–26. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.02.006>
- Dahunsi SO, Oranusi S, Efeovbokhan VE, Olayanju A, Zahedi S, Ojediran JO, Aladegboye OJ (2018) Anaerobic conversion of *Chromolaena odorata* (Siam weed) to biogas. *Energy Rep* 4:691–700. <https://doi.org/10.1016/j.egy.2018.10.006>
- Chen Y, Sharma-Shivappa R, Keshwani D, Chen C (2008) Potential of agricultural residues and hay for bioethanol production. *Appl Biochem Biotechnol* 142:276–290. <https://doi.org/10.1007/s12010-007-0026-3>
- Pernalet Z, Piña F, Suárez M, Ferrer A, Aiello C (2008) Fraccionamiento del bagazo de caña de azúcar mediante tratamiento amoniacal: efecto de la humedad del bagazo y la carga de amoníaco. *Bioagro*. 20(1):3–10
- Tomás-Pejó E, Oliva JM, González A, Ballesteros I, Ballesteros M (2009) Bioethanol production from wheat straw by the thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus* CECT 10875 in a simultaneous saccharification and fermentation fed-batch process. *Fuel* 88(11):2142–2147. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2009.01.014>
- Carrillo-Nieves D, Alanís MJR, de la Cruz QR, Ruiz HA, Iqbal HM, Parra-Saldivar R (2019) Current status and future trends of bioethanol production from agro-industrial wastes in Mexico. *Renew Sustain Energy Rev* 102:63–74. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2018.11.031>
- Parsons S, McManus MC, Taylor CM (2018) Second-generation ethanol from lignocellulose. In: Greenhouse gas balances of bioenergy systems. Academic Press, pp 193–206. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-101036-5.00013-6>
- Oladipo B, Betiku E (2019) Process optimization of solvent extraction of seed oil from *Moringa oleifera*: an appraisal of quantitative and qualitative process variables on oil quality using D-optimal design. *Biocatal Agric Biotechnol* 20:101187. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.101187>
- Sluiter A, Hames B, Ruiz R, Scarlata C, Sluiter J, Templeton D, Crocker D (2008) Determination of structural carbohydrates and lignin in biomass. *Lab Anal Proced* 1617:1–16
- Dong CH, Xie XQ, Wang XL, Zhan Y, Yao YJ (2009) Application of Box-Behnken design in optimisation for polysaccharide extraction from cultured mycelium of *Cordyceps sinensis*. *Food Bioprod Process* 87(2):139–144. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2008.06.004>
- Polat S, Sayan P (2019) Application of response surface methodology with a Box–Behnken design for struvite precipitation. *Adv Powder Technol* 30(10):2396–2407. <https://doi.org/10.1016/j.apt.2019.07.022>
- Rai P, Pandey A, Pandey A (2019) Optimization of sugar release from banana peel powder waste (BPPW) using Box-Behnken design (BBD): BPPW to biohydrogen conversion. *Int J Hydrog Energy* 44(47):25505–25513. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2019.07.168>
- García-Aparicio MP, Oliva JM, Manzanera P, Ballesteros M, Ballesteros I, González A, Negro MJ (2011) Second-generation ethanol production from steam exploded barley straw by *Kluyveromyces marxianus* CECT 10875. *Fuel* 90(4):1624–1630. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2010.10.052>
- Espino E, Cakir M, Domenek S, Román-Gutiérrez AD, Belgacem N, Bras J (2014) Isolation and characterization of cellulose nanocrystals from industrial by-products of *Agave tequilana* and barley. *Ind Crop Prod* 62:552–559. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.09.017>
- Schneider L, Dong Y, Haverinen J, Jaakkola M, Lassi U (2016) Efficiency of acetic acid and formic acid as a catalyst in catalytic and mechanocatalytic pretreatment of barley straw. *Biomass Bioenergy* 91:134–142. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2016.05.015>
- Sun XF, Jing Z, Fowler P, Wu Y, Rajaratnam M (2011) Structural characterization and isolation of lignin and hemicelluloses from barley straw. *Ind Crop Prod* 33(3):588–598. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2010.12.005>

25. Panagiotopoulos IA, Lignos GD, Bakker RR, Koukios EG (2012) Effect of low severity dilute-acid pretreatment of barley straw and decreased enzyme loading hydrolysis on the production of fermentable substrates and the release of inhibitory compounds. *J Clean Prod* 32:45–51. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2012.03.019>
26. Han M, Kang KE, Kim Y, Choi GW (2013) High efficiency bioethanol production from barley straw using a continuous pretreatment reactor. *Process Biochem* 48(3):488–495. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2013.01.007>
27. Salapa I, Topakas E, Sidiras D (2018) Simulation and optimization of barley straw organosolv pretreatment. *Ind Crop Prod* 113:80–88. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.01.018>
28. Contreras-López E, Jaimez-Ordaz J, Hernández-Madrigal T, Añorve-Morga J, Beltrán-Hernández R (2008) Composición química de cebadas cultivadas bajo diferentes condiciones de labranza en tres localidades del estado de Hidalgo, México. *Bioagro* 20(3)
29. Qiu P, Cui M, Kang K, Park B, Son Y, Khim E, Jang M, Khim J (2014) Application of Box-Behnken design with response surface methodology for modeling and optimizing ultrasonic oxidation of arsenite with H₂O₂. *Open Chem* 12(2):164–172. <https://doi.org/10.2478/s11532-013-0360-y>
30. Maryana R, Ma'rifatun D, Wheni AI, Satriyo KW, Rizal WA (2014) Alkaline pretreatment on sugarcane bagasse for bioethanol production. *Energy Procedia* 47:250–254. <https://doi.org/10.1016/j.egypro.2014.01.221>
31. Singh J, Suhag M, Dhaka A (2015) Augmented digestion of lignocellulose by steam explosion, acid and alkaline pretreatment methods: a review. *Carbohydr Polym* 117:624–631. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.10.012>
32. Linde M, Galbe M, Zacchi G (2007) Simultaneous saccharification and fermentation of steam-pretreated barley straw at low enzyme loadings and low yeast concentration. *Enzym Microb Technol* 40(5):1100–1107. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2006.08.014>
33. Partida-Sedas G, Montes-García N, Carvajal-Zarrabal O, López-Zamora L, Gómez-Rodríguez J, Aguilar-Uscanga MG (2017) Optimization of hydrolysis process to obtain fermentable sugars from sweet sorghum bagasse using a Box–Behnken design. *Sugar Tech* 19(3):317–325. <https://doi.org/10.1007/s12355-016-0461-y>
34. Delfín-Ruiz ME, Calderón-Santoyo M, Ragazzo-Sánchez JA, Gómez-Rodríguez J, López-Zamora L, Aguilar-Uscanga MG (2019) Acid pretreatment optimization for xylose production from Agave tequilana Weber var. azul, *Agave americana* var. oaxacensis, *Agave karwinskii*, and *Agave potatorum* bagasses using a Box-Behnken design. *Biomass Convers Biore*:1–10. <https://doi.org/10.1007/s13399-019-00497-z>
35. Guarneros-Flores J, Lopez-Zamora L, Aguilar-Uscanga G (2016) Optimización del proceso de hidrólisis enzimática a partir de bagazo de sorgo dulce pretratado. *Rev Investig Desarro* 2(6):75–81
36. Vargas F, Domínguez E, Vila C, Rodríguez A, Garrote G (2015) Agricultural residue valorization using a hydrothermal process for second generation bioethanol and oligosaccharides production. *Bioresour Technol* 191:263–270. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.05.035>
37. Yang M, Zhang J, Kuittinen S, Vepsäläinen J, Soininen P, Keinänen M, Pappinen A (2015) Enhanced sugar production from pretreated barley straw by additive xylanase and surfactants in enzymatic hydrolysis for acetone–butanol–ethanol fermentation. *Bioresour Technol* 189:131–137. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.04.008>
38. Velázquez-Valadez U, Fariás-Sánchez JC, Vargas-Santillán A, Castro-Montoya AJ (2016) *Tequilana weber* agave bagasse enzymatic hydrolysis for the production of fermentable sugars: oxidative-alkaline pretreatment and kinetic modeling. *BioEnergy Res* 9(4):998–1004. <https://doi.org/10.1007/s12155-016-9757-8>
39. Hatakeyama H, Hatakeyama T (2009) Lignin structure, properties and applications. In: *Biopolymers*. Springer, Berlin, pp 1–63. https://doi.org/10.1007/12_2009_12
40. Chang S, Li W, Zhang Y (2018) Impact of double alkaline peroxide pretreatment on enzymatic hydrolysis of palm fibre. *Carbon Resour Convers* 1(2):147–152. <https://doi.org/10.1016/j.crcon.2018.06.005>
41. Qi G, Xiong L, Li H, Huang Q, Luo M, Tian L, Chen X (2019) Hydrotropic pretreatment on wheat straw for efficient biobutanol production. *Biomass Bioenergy* 122:76–83. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2019.01.039>
42. Espinosa E, Sánchez R, Otero R, Domínguez-Robles J, Rodríguez A (2017) A comparative study of the suitability of different cereal straws for lignocellulose nanofibers isolation. *Int J Biol Macromol* 103:990–999. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.05.156>
43. Boeriu CG, Bravo D, Gosselink RJ, van Dam JE (2004) Characterisation of structure-dependent functional properties of lignin with infrared spectroscopy. *Ind Crop Prod* 20(2):205–218. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2004.04.022>
44. Oliva-Taravilla A, Moreno AD, Demuez M, Ibarra D, Tomás-Pejó E, González-Fernández C, Ballesteros M (2015) Unraveling the effects of laccase treatment on enzymatic hydrolysis of steam-exploded wheat straw. *Bioresour Technol* 175:209–215. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.10.086>
45. Borrero-López AM, Blánquez A, Valencia C, Hernández M, Arias ME, Franco JM (2019) Influence of solid-state fermentation with *Streptomyces* on the ability of wheat and barley straws to thicken castor oil for lubricating purposes. *Ind Crop Prod* 140:111625. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.111625>

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.