

UNIVERSIDAD IBEROAMERICANA

Estudios con Reconocimiento de Validez Oficial por Decreto Presidencial del 3 de Abril
de 1981



“PRODUCCIÓN DE ETANOL CELULÓSICO A PARTIR DE OLOTE DE MAÍZ, CON
UNA CEPA TERMOTOLERANTE DE *KLUYVEROMYCES MARXIANUS* (KM24)”

TESIS

Que para obtener el grado de

MAESTRA EN CIENCIAS DE LA INGENIERÍA QUÍMICA

Presenta

KARINA GABRIELA MALDONADO RUIZ ESPARZA

Directora de tesis: M. B. Lorena Pedraza Segura

Co-directora (Lector): Dra. Sylvie Le Borgne

Lector: Dr. Juan Carlos Sigala Alanis

Agradecimientos

A la M. B. Lorena Pedraza y a la Dra. Sylvie Le Borgne, por brindarme su sincero cariño y amistad durante todos estos años, sin su guía nada de esto habría sido posible. Al patronato de la Universidad Iberoamericana, por darme la oportunidad de crecer profesional y humanamente al interior de sus aulas. Al Dr. Héctor Toribio por su ayuda, apoyo y paciencia durante los dos años de mi maestría, al Dr. Juan Carlos Sigala por ser lector de este trabajo. Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por la beca otorgada y por financiar el trabajo experimental de esta tesis a través del proyecto 000000000156451 "ESTUDIOS BÁSICOS SOBRE LA TOLERANCIA Y ADAPTACIÓN DE LEVADURAS A INHIBIDORES DE FERMENTACIÓN ENCONTRADOS EN HIDROLIZADOS DE BIOMASA LIGNOCELULÓSICA" en la Universidad Autónoma Metropolitana - Unidad Cuajimalpa y al proyecto FICSAC "F132010 ESCALAMIENTO DE LOS PROCESOS DE UNA BIORREFINERÍA" en la Universidad Iberoamericana.

A mis padres sin ellos nada de esto hubiera sido posible.

Resumen

El consumo de energía se ha incrementado conforme la población ha crecido y el mundo se ha vuelto cada vez más industrializado. Los combustibles fósiles, en especial el petróleo, son la fuente principal de energía utilizada en la actualidad. Sin embargo, estas reservas se están agotando; aunado a esta situación, es innegable el impacto ambiental negativo de la producción y uso de los combustibles fósiles. Un claro ejemplo se encuentra en el rubro del transporte, donde la sustitución parcial o total de los combustibles de transportación de origen fósil, como la gasolina, por bioetanol representaría una alternativa atractiva para limitar las emisiones atmosféricas. La producción de bioetanol de primera generación a partir de cultivos alimenticios como maíz y caña de azúcar entra en conflicto con la producción de alimentos por lo que es necesario dar espacio a las tecnologías de segunda generación para la producción de bioetanol a partir de residuos de biomasa.

En el presente trabajo se llevó a cabo la sacarificación y fermentación simultáneas (SSF) de residuos de olote de maíz usando la levadura *Kluyveromyces marxianus* (Km24) termotolerante, aislada de agave de henequén en la UAM-Cuajimalpa, para producir bioetanol de segunda generación. El olote fue previamente sometido a pretratamiento termoquímico de acuerdo a un método desarrollado en la Universidad Iberoamericana y la enzima utilizada fue la mezcla comercial Cellic® Ctec2 de Novozymes. La SSF es una opción de proceso para la producción de bioetanol a partir de residuos de biomasa lignocelulósica en la cual la hidrólisis enzimática se lleva a cabo al mismo tiempo que la fermentación y no como una etapa separada entre el pretratamiento y la fermentación, teniendo como ventajas principales una menor inhibición por producto y una reducción en los costos de inversión.

El trabajo se dividió en cinco etapas, las primeras tres fueron caracterizaciones, tanto de la levadura como del olote y de la enzima con el sustrato, las últimas dos fueron el proceso SSF realizado en matraz y posteriormente en biorreactor.

La caracterización de la levadura se realizó mediante la observación de la morfología colonial y técnicas de biología molecular, por amplificación y secuenciación de las regiones intergénicas ITS1-ITS2 y de la región D1/D2 del gen ribosomal 26S, confirmando la especie de la levadura, así mismo, se hicieron estudios de tolerancia de la cepa a diferentes inhibidores de la fermentación mediante pruebas en cajas Petri encontrándose que la levadura se inhibía más a 42°C en presencia todos los compuestos. Finalmente, se realizaron pruebas en medio líquido con diferentes concentraciones de ácido acético, el cual fue el inhibidor menos tolerado por la levadura. Se encontró que la cepa Km24 es más sensible al ácido acético a 42 que a 30°C.

El olote se caracterizó por técnicas espectrofotométricas y gravimétricas para determinar el contenido fenólico, hemicelulosa (A y B), celulosa, lignina y agua, se observó que tiene un 2.73 % de fenoles, 60% de agua, 47% de celulosa, 20% de lignina y 31 % de hemicelulosa.

El proceso de SSF se llevó a cabo en matraz, con olote molido y sin moler, para observar las diferencias en ambos procesos, obteniéndose mejores resultados en el olote molido teniendo una productividad de 0.21 g/L*h y 0.17 g/L*h.

En cuanto al proceso en el biorreactor se obtuvo una productividad de 0.22 g/L*h, pero al mismo tiempo se observó la generación de subproductos como lo es el glicerol.

Tabla de contenido

I.- Antecedentes	10
I.1.- Biocombustibles.....	10
I.2.- Bioetanol.....	11
I.3.- Materiales lignocelulósicos	13
I.4.- Proceso de Sacarificación y Fermentación Simultáneas	15
I.5.- Levaduras termotolerantes	16
I.6.- <i>Kluyveromyces marxianus</i>	17
I.7.- Caracterización de levaduras	18
I.8.- Escalamiento en un fermentador	20
II.- Justificación.....	23
III.- Motivación.....	25
IV.- Objetivos y metas del trabajo.....	25
V.- Materiales y métodos.....	26
V.1.- Microorganismos, enzimas y materias primas	26
V.2.- Medios de cultivo	26
V.3.- Caracterización de la levadura.....	29
V.3.1 Caracterización morfológica.....	29
V.3.2 Caracterización molecular de <i>K. marxianus</i>	29
V.4.- Caracterización del olote	36
V.5.- Pruebas de tolerancia a inhibidores en medio sólido.....	40
V.6.- Prueba de tolerancia a inhibidores en cultivo líquido	42
V.7.- Proceso de Sacarificación y Fermentación Simultáneo	43
V.7.1 Proceso de Sacarificación y Fermentación Simultáneo en matraz	43
V.7.2 Proceso de Sacarificación y Fermentación Simultáneo en biorreactor	44
VI.- Resultados y Análisis.....	46
VI.1.- Caracterización de la levadura.....	46
VI.1.1 Caracterización morfológica	46
VI.1.2 Caracterización molecular de <i>Kluyveromyces marxianus</i>	47
VI.2.- Caracterización del olote	52
VI.3.- Caracterización del olote pretratado	52

VI.4.- Pruebas de tolerancia en medio sólido	54
VI.5.- Pruebas de tolerancia a ácido acético en medio líquido	56
VI.6.- Pruebas iniciales de fermentación en olote a 42°C	65
VI.7.- Pruebas preliminares de hidrólisis enzimática	68
VI.8.- Proceso de Sacarificación y Fermentación Simultáneos en matraz	70
VI.9.- Proceso de Sacarificación y Fermentación Simultáneo en biorreactor	72
VI.10.- Infrarrojos de lignina y celulosa	75
VII.- Conclusiones y comentarios	82
VIII.- Bibliografía	84
IX.- Anexos.....	88
IX.1.- Anexo A	88
IX.1.1 Protocolo del kit de extracción de ADN.....	88
IX.2.- Anexo B	90
IX.2.1 Método DNS	90
IX.3.- Anexo C	90
IX.3.1 Curvas de calibración de fenoles, DNS y de HPLC	90
IX.4.- Anexo D	92
IX.4.1 Secuencias de ITS y D1/D2.....	92
	I 92
IX.5.- Anexo E	93
IX.5.1 Pruebas de tolerancia en caja.....	93
IX.6.- Anexo F	107
IX.6.1 Hoja técnica de la enzima	107

Índice de tablas

Tabla 1) Pretratamiento de los materiales lignocelulósicos	15
Tabla 2) Resultados de la morfología de las colonias	47
Tabla 3) Contenido fenólico del olote	52
Tabla 4) Composición del olote pretratado	53
Tabla 5) Resultados de pruebas de inhibición en caja	55
Tabla 6) Velocidades de crecimiento en ácido acético	57
Tabla 7) pH del medio de fermentación.....	61
Tabla 8) Rendimiento y productividad de etanol de los experimentos de tolerancia a ácido acético.....	62
Tabla 9) Producción de etanol en olote y medio de fermentación	65
Tabla 10) Rendimiento y productividad de etanol en las pruebas preliminares de SSF sin enzima	67
Tabla 11) pH inicial y final de las pruebas preliminares de SSF sin enzima.....	68
Tabla 12) Resultados de celulosa y glucosa liberada, obtenidos por técnicas gravimétricas	72
Tabla 13) Resultados de la viscosidad del olote en diferentes tiempos, mostrados en centistokes.....	73
Tabla 14) Valores para calcular el número de Reynolds	73
Tabla 16) Glucosa y lignina en el residuo de olote después de la SSF	75
Tabla 17) Grupos funcionales del bagazo de caña, maíz y del olote final para lignina .	78
Tabla 18) Grupos funcionales del bagazo de caña, maíz y del olote final para celulosa	81

Índice de figuras

Figura 1) Esquema del proceso para la obtención de bioetanol.....	13
Figura 2) Estructura de los materiales lignocelulósicos y su organización en la pared vegetal.....	14
Figura 3) Fases del crecimiento de un microorganismo	19
Figura 4) Esquema del dominio D1/D2 y de la región ITS1 e ITS2	20
Figura 5) Tipos de impulsores.	21
Figura 6) Proceso simplificado de producción de bioetanol, a partir de materiales de desecho.....	24
Figura 7) Ciclo de PCR.....	30
Figura 8) Esquema de una cámara de electroforesis horizontal en gel de agarosa	30
Figura 9) Esquema del funcionamiento de un espectrofotómetro Nanodrop.....	31
Figura 10) Esquema del funcionamiento del blast.....	35
Figura 11) Ejemplo del funcionamiento del Dot-plot.....	36
Figura 12) Extracción de celulosa y de lignina. El sólido obtenido después del secado es la celulosa y el sólido obtenido al decantar es la lignina.....	38
Figura 13) Extracción de hemicelulosa A y B	39
Figura 14) Procedimiento para la determinación del tamaño de partícula del olote pretratado	39
Figura 15) Procedimiento para las pruebas de tolerancia en caja petri.....	41
Figura 16) Procedimiento el SSF en matraz.....	44
Figura 17) Esquema de un viscosímetro capilar de Cannon Fenske	45
Figura 18) Procedimiento para la sacarificación y fermentación simultáneas en biorreactor	46
Figura 19) Electroforesis en gel de agarosa de la región ITS1-ITS2 de <i>Kluyveromyces marxianus</i> Km24.....	48
Figura 20) Resultados del Blastn y Dot-plot de la región ITS1-ITS2 de <i>K. marxianus</i> Km24	49
Figura 21) Electroforesis en gel de agarosa de los dominios D1/D2	50

Figura 22) Resultados del Blastn y Dot-plot del dominio D1/D2 de la subunidad ribosomal grande de <i>Kluyveromyces marxianus</i> KM24.....	51
Figura 23) Distribución de tamaño de partículas del olote.....	53
Figura 24) Gráfica de crecimiento de la levadura a 30°C con ácido acético con ajuste de pH a 4.8 y sin ajuste	58
Figura 25) Gráfica de crecimiento de la levadura con y sin ajuste de pH a 42°C	58
Figura 26) Gráfica de crecimiento de la levadura a 30°C y 42°C con y sin ajuste de pH	59
Figura 27) Gráfica de crecimiento de la levadura con 3 g/L de ácido acético a 30°C y 42°C con y sin ajuste de pH	59
Figura 28) Gráfica de crecimiento de la levadura con 6 g/L de ácido acético a 30°C y 42°C con y sin ajuste de pH	60
Figura 29) Curva de titulación del ácido acético	61
Figura 30) Relación del pH y el estado de la molécula de ácido acético.....	62
Figura 31) Análisis de metabolitos HPLC, consumo de glucosa y producción de etanol a 30°C y 42°C, en presencia y ausencia de ácido acético	64
Figura 32) Resultados de las pruebas preliminares para la SSF.....	66
Figura 33) Crecimiento de la levadura en los matraces con buffer y sin buffer	68
Figura 34) Resultados de las pruebas preliminares de hidrólisis enzimática	69
Figura 35) Gráfica de rendimiento vs temperatura de la enzima Cellic® Ctec2	69
Figura 36) Cinética de SSF en matraz con olote molido y sin moler	71
Figura 37) Cinética de SSF en un biorreactor de 2.5 L	74
Figura 38) Infrarrojos de lignina residual	77
Figura 39) Infrarrojos de celulosa residual.....	80
Figura 40) Curva de calibración de fenoles	90
Figura 41) Curva de calibración de DNS	91
Figura 42) Curva de calibración de glucosa	91
Figura 43) curva de calibración de ácido acético.....	91
Figura 44) Curva de calibración de etanol.....	91

I.- Antecedentes

I.1.- Biocombustibles

El consumo de energía se ha incrementado en los últimos años conforme la población ha crecido y el mundo se ha vuelto cada vez más industrializado. Los combustibles fósiles, especialmente el petróleo, son la fuente principal de energía utilizada en la actualidad, sin embargo, estas reservas no son permanentes y serán menores al paso de los años debido a la velocidad de consumo de éstas.

Ya que la economía mundial depende de la energía y los recursos energéticos, se han buscado fuentes alternativas para la producción de energía, como lo son el maíz, la caña de azúcar, materiales de desecho, entre otros, para la obtención de biocombustibles.

Los biocombustibles se pueden clasificar por generaciones. Los de primera generación son aquellos que provienen de partes comestibles de plantas (cultivos alimenticios), por lo que generan conflictos a nivel ético, debido a que se utilizan alimentos para la generación de energía, algunos ejemplos de cultivos utilizados son el maíz, caña y la palma aceitera, con los cuales se genera bioetanol, biogás y biodiesel; en el 2010 se producían 50 billones de litros de biocombustibles de origen alimenticio ^[1].

Los de segunda generación son aquellos que usan como materia prima los materiales lignocelulósicos, estos son materiales residuales, como el bagazo de la caña, hojas, tallos del maíz, etc. Estos materiales se pueden quemar para obtener electricidad y calor o bien procesarse para obtener bioetanol, bioaceites, butanol y otros alcoholes, la ventaja de este tipo de materiales es que no involucran partes comestibles de la planta, no son caros y son de fácil de acceso, sin embargo, requieren de un tratamiento para la obtención de azúcares fermentables.

La tercera generación de biocombustibles es aquella que utiliza como materia prima vegetales de grado no alimenticio que tengan un crecimiento rápido, sean ricos en densidad energética y su demanda energética sea mínima, también se utilizan microorganismos con modificaciones genéticas, para obtener mejores rendimientos.

Algunos ejemplos de las materias primas son el pasto y algas y se puede producir biodiesel, biohidrógeno, bioetanol entre otros a partir de estas.

La cuarta de generación es la más nueva y la que se considera más sustentable ya que en esta se pretende que no exista una huella de CO₂, utilizando bacterias o algas modificadas genéticamente que consuman de manera directa el CO₂ (que los microorganismos sean fábricas celulares). Los productos que se pueden obtener son biodiesel, bioetanol, butanol etc.

Esta generación de biocombustibles aún no se encuentra en escala comercial, sin embargo, ya se tienen algunos resultados; una limitante de este proceso es la citotoxicidad que los biocombustibles pueden generar a los microorganismos [2].

I.2.- Bioetanol

El etanol es un compuesto que se ha visto como un sustituto a la gasolina. Sin embargo, cuenta con algunos inconvenientes como la combustión interna que se realiza dentro de las máquinas de los automóviles la cual se encarga de quemar los combustibles para generar energía y el etanol en comparación con los combustibles fósiles, se encuentra más oxigenado y debido a esto genera menos energía durante la combustión interna realizada en las maquinas.

En 1905 el etanol surgió como fuente alternativa de combustible para automóviles impulsado por el miedo a la escasez de combustibles fósiles y los aumentos al precio de la gasolina.

Henry Ford planeó su uso en el automóvil modelo T, pero al final optó por utilizar gasolina, que representaba una alternativa más económica en aquella época.

Entre los años 1920 y 1930, algunos países como Australia, Cuba, Argentina, Japón, entre otros, utilizaron etanol en mezcla con la gasolina, mientras que los automóviles alimentados por alcohol fueron utilizados en Alemania durante la segunda guerra mundial, pero estas alternativas fueron de contingencia y una vez que terminó la crisis de combustibles en estos países la mayoría de los proyectos se abandonaron.

El bioetanol es uno de los alcoholes más simples que se ha utilizado y consumido por el hombre a lo largo de la historia, este puede ser producido por la fermentación de azúcares simples y recibir diversos nombres dependiendo de su origen; si proviene de granos de maíz, sorgo etc. se le denomina etanol de grano, si proviene de biomasa celulósica su nombre es etanol celulósico.

Estos tipos de etanol se producen de manera bioquímica, pero también existe el etanol químico, el cual se sintetiza sin involucrar ningún paso de fermentación.

La producción de etanol a partir de cultivos dedicados a este fin o residuos de la agricultura, es una de las formas de obtener energía renovable; en Estados Unidos ya existe un mercado bien definido, cerca de 6.5 billones de galones de etanol se produjeron en el 2007 de acuerdo a la asociación de combustibles renovables [3].

En Estados Unidos y Brasil el bioetanol es utilizado como un aditivo para mejorar las emisiones y aumentar el octanaje de los combustibles de transportación.

Algunos beneficios de los biocombustibles producidos por biomasa son los siguientes:

- Independencia energética
- Disminución de los gases de efecto invernadero

El proceso de producción de bioetanol depende en gran medida de la materia prima. En la figura 1) se muestra una breve descripción de las unidades del proceso, cabe mencionar que si el material utilizado es un azúcar, como por ejemplo, algún jugo, no se requiere un pretratamiento [4].

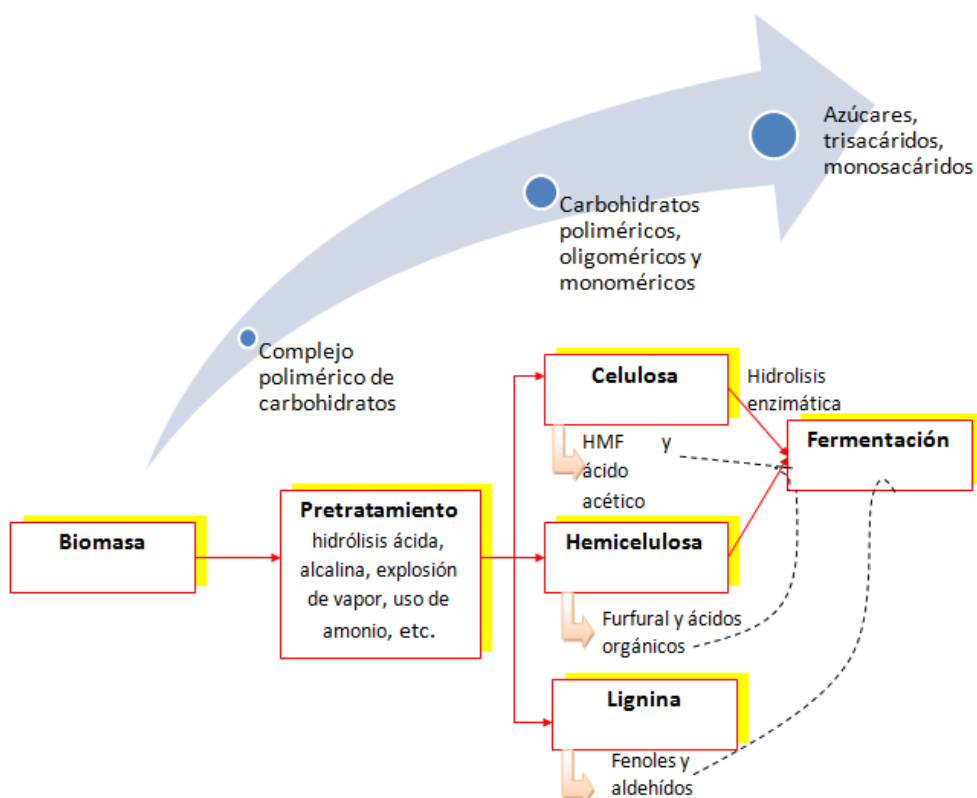


Figura 1) Esquema del proceso para la obtención de bioetanol

I.3.- Materiales lignocelulósicos

Los materiales lignocelulósicos representan un buen sustrato potencial para los microorganismos productores de biocombustibles. Sin embargo, cuentan con algunos inconvenientes para su uso directo, como lo son la necesidad de pretratamientos y enzimas para liberar los azúcares monoméricos de la celulosa y hemicelulosa, la presencia de lignina y de azúcares hexosas y pentosas en la fermentación.

Estos pretratamientos tienen desventajas porque pueden generar inhibidores para los microorganismos, algunos de los cuales pueden ser ácidos fuertes, débiles, compuestos fenólicos, furfural, entre otros [5].

En la mayoría de estos, la hemicelulosa de la biomasa es convertida a monómeros entre los cuales dominan los de cinco carbonos, denominados como pentosas, de los cuales la mayor parte es xilosa, pero de manera natural muchos microorganismos no la convierten en etanol, por lo que se han introducido diversos genes a algunos microorganismos, como por ejemplo, los genes de xilosa isomerasa,

xilosa reductasa y xilosa deshidrogenasa a *Saccharomyces cerevisiae*, así como la introducción de los genes alcohol deshidrogenasa de *Zymomona mobilis* a *Escherichia coli* y *Klebsiella oxytoca*^[4].

La biomasa es resistente a la acción de las celulasas debido a su cristalinidad, la presencia de lignina y hemicelulosa (figura 2) ^[6], por lo que antes de tratarse con enzimas se debe realizar un pretratamiento para separar estos polímeros. Existen diversas formas de clasificar los pretratamientos, algunas de ellas se muestran a continuación:

- Por su forma de tratamiento: físico, químico, biológico y la combinación de los anteriores (Tabla 1).
- Por las corrientes del producto (celulosa, lignina y hemicelulosa):
- Por los componentes principales en una corriente de producto.

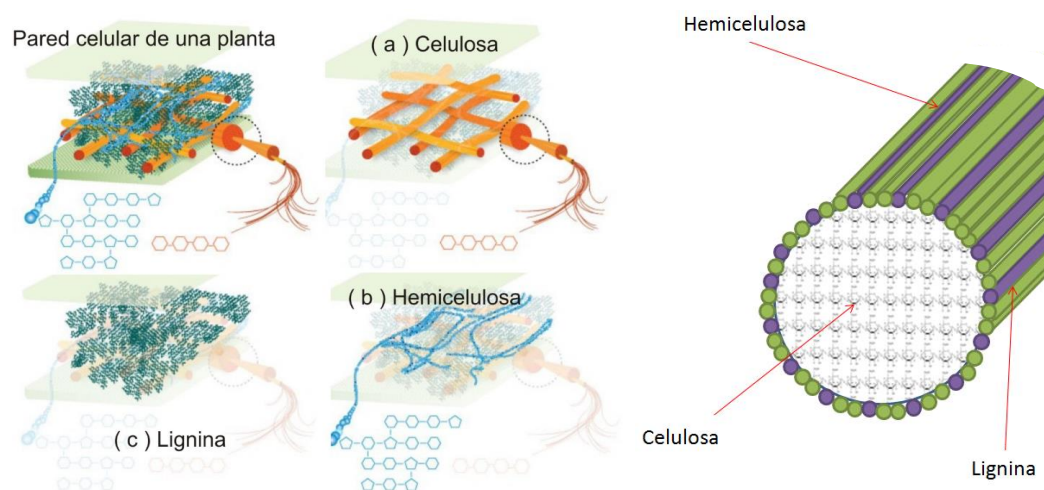


Figura 2) Estructura de los materiales lignocelulósicos y su organización en la pared vegetal

Tabla 1) Pretratamiento de los materiales lignocelulósicos

Pretratamiento	Acciones	Inhibidores	Referencia
Alcalino	Es un proceso de delignificación en el cual la hemicelulosa se solubiliza	Diversos ácidos orgánicos	[4]
Ácido	Hidrólisis de la hemicelulosa	Furfural, ácido acético, fenoles, hidroximetilfurfural (HMF)	[4]
Con ácido diluido (H ₂ SO ₄)	Hidrólisis de hemicelulosa y remoción de lignina	Aldehídos (furfural e HMF)	[7], [8]
Hidróxido de calcio	Desacetilación de hemicelulosa y remoción de lignina	Ácidos orgánicos	[9], [10]
Agua caliente	Hidrólisis de celulosa y depolimerización parcial de lignina	Ácido acético	[7]
Vapor	Desacetilación de hemicelulosa, degradación e hidrólisis de lignina	Aldehídos (furfural e HMF), ácido acético, fórmico y levulínico	[7]
Biológicos (enzimas como lacasas y peroxidases)	Depolimerización de la lignina		[11], [12]

Las maneras de actuar de los inhibidores son diversas, pero generalmente se miden en parámetros como la inhibición en el crecimiento, productividad y rendimiento de etanol [13]; estas sustancias pueden interactuar y reaccionar con componentes de la pared celular microbiana, ácidos nucleicos, enzimas y proteínas, reduciendo la viabilidad celular.

I.4.- Proceso de Sacarificación y Fermentación Simultáneas

Durante la producción de bioetanol, para lograr la liberación de azúcares monoméricos, a partir de cadenas poliméricas de la celulosa, existen diversos procesos tanto químicos como biológicos, estos últimos no requieren grandes cantidades de reactivos para romper las cadenas y para neutralizar antes de la fermentación. Para sacarificar los materiales celulósicos pretratados y convertirlos en azúcares

monoméricos fermentables se utilizan enzimas de distintos tipos (celulasas, xilanasas, lacasas, pectinasas) y funcionan a diferentes temperaturas, una vez realizada la hidrólisis enzimática se continúa con la fermentación.

La sacarificación y fermentación simultánea (SSF) ha sido estudiada por ser un método prometedor para la transformación de materiales lignocelulósicos a etanol, se ha reportado que puede mejorar los rendimientos de la hidrólisis porque reduce la inhibición de la enzima por producto, además de que requiere menos enzima en el proceso y de un equipo menos caro para el caso de lotes alimentados [14].

Para que el proceso sea funcional, se requiere que las condiciones de la enzima y el microorganismo sean compatibles, por ejemplo: el pH y la temperatura deben de ser similares en ambos casos, ya que un microorganismo cuya temperatura óptima sea 30°C y una enzima cuya temperatura sea de 48°C no serán compatibles en el proceso, lo que representa una gran limitante.

I.5.- Levaduras termotolerantes

Las levaduras son las mayores generadoras de productos biotecnológicos excediendo la producción en capacidad e ingresos económicos, más que cualquier otro grupo de microorganismos a nivel industrial [15].

No obstante su uso está limitado a factores externos como las altas temperaturas que constituyen un factor de estrés, el cual afecta a los microorganismos y a las enzimas causando daños a los enlaces no covalentes que mantienen la estructura nativa de las proteínas, dando como resultado la pérdida de su estructura secundaria y terciaria.

Además de las proteínas, las temperaturas elevadas afectan también la estabilidad del ADN y ARN [16], por lo que los microorganismos termotolerantes cuentan con una enzima girasa reversa, que induce el súper-enrollamiento del ADN y son capaces de proteger el ARN_m de una posible hidrólisis ya que se sabe que la vida media del ARN disminuye con la temperatura.

En los últimos años se han buscado nuevas alternativas de levaduras para la obtención de etanol celulósico, ya sea en la diversidad natural o en la artificial, dentro de la biodiversidad natural, *Kluyveromyces marxianus* ha destacado por ser termotolerante y crecer en temperaturas de entre 37°C y 52°C ^[17] y producir etanol en estos rangos de temperatura, cuenta con un tiempo de duplicación rápido y es considerada como segura, un microorganismo seguro (GRAS) ^[18]. La característica de termotolerancia permite disminuir costos en el proceso SSF, dado que su temperatura óptima está entre 10°C y 20°C más alta que la de *Saccharomyces cerevisiae*, la cual es la levadura más utilizada, pero al no crecer en altas temperaturas no puede utilizarse en el proceso simultáneo.

1.6.- Kluyveromyces marxianus

K. marxianus es una levadura que ha sido aislada de una gran variedad de hábitats, es hemiascomiceto homotálica, lo que quiere decir que no cuenta con un micelio o es de escaso desarrollo y es autofértil ^[19], aerobia con capacidad de producir energía mediante respiración y fermentación, cuenta con un metabolismo respiro-fermentativo.

Está clasificada como una levadura con un fuerte carácter Crabtree negativo, por lo que es importante mencionar que la formación de etanol no está ligada a la presencia de oxígeno, así mismo, posee diversas características de interés como su termotolerancia, producción de inulina, producción de etanol y velocidad de crecimiento^[20].

Se ha descrito que es capaz de producir etanol de celulosa en un proceso de sacarificación y fermentación simultáneo a 42°C con buenos rendimientos ($Y_{ps_{max}}=0.4$) ^[16]. También se ha reportado que 10g/L de ácido acético produce un 50% de inhibición en la producción de biomasa. Se cree que el ácido acético es disociado como consecuencia del pH intracelular de la levadura, el decremento en el pH intracelular es compensado por ATP_{asa} de la membrana plasmática, la cual bombea los protones fuera de la célula, hidrolizando ATP, mientras los protones son expulsados, provocando una baja en el ATP para la producción de biomasa^[21].

I.7.- Caracterización de levaduras

Caracterización morfológica

Desde que se lograron cultivar los microorganismos en cultivos sólidos, la apariencia de las colonias ha sido de gran importancia para la caracterización microbiológica.

Una colonia se deriva de una célula y si está lo suficientemente alejada de otras, se puede observar que tiene una forma, elevación y bordes definidos, este tipo de caracterización sirve para identificar entre cepas de la misma especie, incluso las mutaciones que sufren al adaptarse un medio o si hay estrés del medio de cultivo.

Caracterización cinética

Las cinéticas de crecimiento celular se basan en ecuaciones matemáticas que modelan el comportamiento celular, estas constan de las siguientes etapas:

La primera etapa es conocida como la fase lag o fase de adaptación, consiste en la adaptación del microorganismo a las condiciones del cultivo tanto físicas, químicas y bioquímicas (temperatura, pH, fuente de carbono, entre otras), la duración su duración es variable para cada condición.

La segunda etapa es la fase exponencial o logarítmica, como su nombre lo indica es cuando los microorganismos están en un crecimiento constante, alcanzan una actividad máxima y su tiempo de regeneración es mínimo, esta etapa es utilizada a nivel industrial para la obtención de metabolitos primarios [22].

La tercera etapa es conocida como fase estacionaria, en este momento el microorganismo llega a su número máximo de células, el crecimiento que tiene sólo compensa las muertes, llegando a un estado estable, en este punto se generan los metabolitos secundarios (metabolitos no esenciales para la vida del microorganismo)^[23], se puede llegar a esta fase una vez que se agotan o disminuyen notablemente los nutrientes, así como por la acumulación de productos metabólicos.

La última etapa es la fase de decaimiento o muerte, en esta la muerte es mayor al crecimiento por lo que hay un decremento en la población (figura 3).

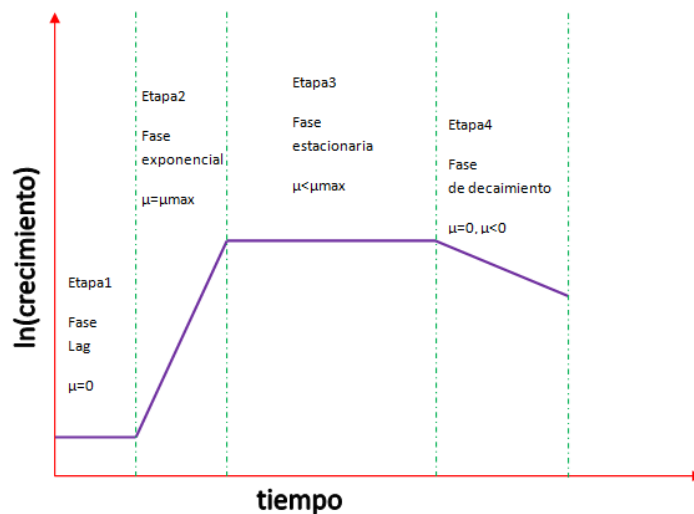


Figura 3) Fases del crecimiento de un microorganismo

Caracterización genética

La caracterización a nivel genotípico de levaduras es de gran importancia industrial, médica, ambiental, microbiológica, ecológica y taxonómica. La tipificación molecular de levaduras tiene diversas aplicaciones como el monitoreo de cultivos, estudio de origen, evolución y a protección de propiedad intelectual para levaduras con aplicaciones industriales potenciales.

Comparado con las pruebas fenotípicas, los métodos moleculares se basan en el análisis del ADN, ya sea completo (genomas) o de ciertos segmentos (marcadores moleculares); se consideran mejores debido a que son cultivo dependiente, esto quiere decir que las características del medio de cultivo, como lo son: el pH, temperatura y la composición del medio no afectan los resultados.

En la década de 1990 se estudió el poder de resolución de los genes que codifican para el ARN ribosomal, como método de identificación y taxonomía de las especies, en la actualidad existen un gran número de métodos basados en este gen y otros que permiten la autenticación e identificación de cepas [24].

Actualmente la forma más detallada de tipificación es secuenciar el genoma entero, las listas de los genomas pueden ser consultadas en bases de datos públicas como lo es <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> lo cual hace más sencillo este proceso, ya que las bases de datos son amigables y la información encontrada es amplia.

Durante los últimos años se han utilizado los estudios genéticos para determinar las especies de los microorganismos y en algunos casos hasta el nivel de cepas; en levaduras, el dominio D2 del gen de la subunidad ribosomal pequeña, se ha utilizado para encontrar diferencias entre especies de levaduras relacionadas [25].

La región intergénica ITS1 e ITS2 se encuentra localizada entre los genes 18S y 28S de la subunidad ribosomal pequeña, la región ITS 1 separa la región 18S del ARN y 5.8S, mientras que el ITS2 separa la región 5.8S de la región 28S. El dominio D1/D2, es una región variable en el ADN ribosomal 28S [26], como se muestra en la figura 4.

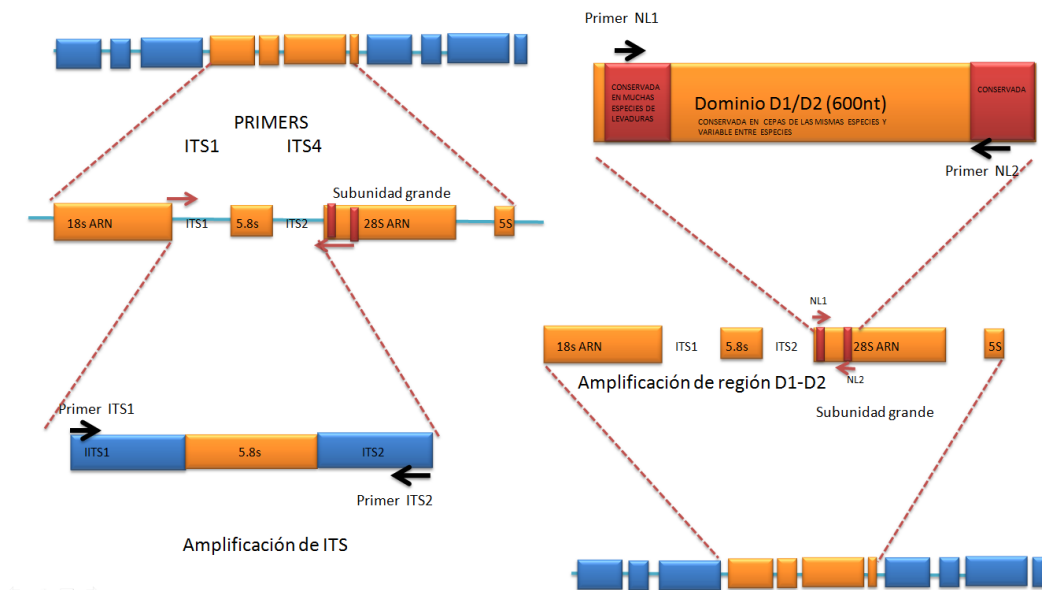


Figura 4) Esquema del dominio D1/D2 y de la región ITS1 e ITS2

I.8.- Escalamiento en un fermentador

El escalamiento es un problema central en la biotecnología y se observó por primera vez en 1940 cuando se realizó a escala industrial la producción de penicilina[27], este proceso consiste en pasar de un tamaño pequeño a uno más grande, como de un

matraz a un fermentador, de escala laboratorio a planta piloto y a escala industrial, consiste en tomar como base la información obtenida de escalas pequeñas para obtener las condiciones de operación y realizar este proceso en volúmenes mayores.

El problema del escalamiento consiste en que al pasar a tamaños mayores, esto cambia el contenedor, sus dimensiones y las variables. En el caso de los fermentadores de tanque agitado, estos son contenedores cilíndricos y tienen una relación de altura-diámetro del tanque que va en un rango de 1:1 a 3:1 [28,29] y generalmente son torriesféricos de la parte baja, para evitar zonas estancadas y distribuir la presión ejercida por la columna del líquido [30]. En cuanto a los impulsores utilizados para el mezclado existen diferentes tipos como se muestra en la figura 5, estos generan sus propias corrientes de circulación y la distancia entre cada uno debe de ser de 1 a 1.5 diámetros [31], en la figura 5 se muestran algunos ejemplos a) turbina b) turbina de paletas c) propela marina d) correlaciones de potencia para 4 baffles donde W es el ancho del impulsor y D es el diámetro [32].

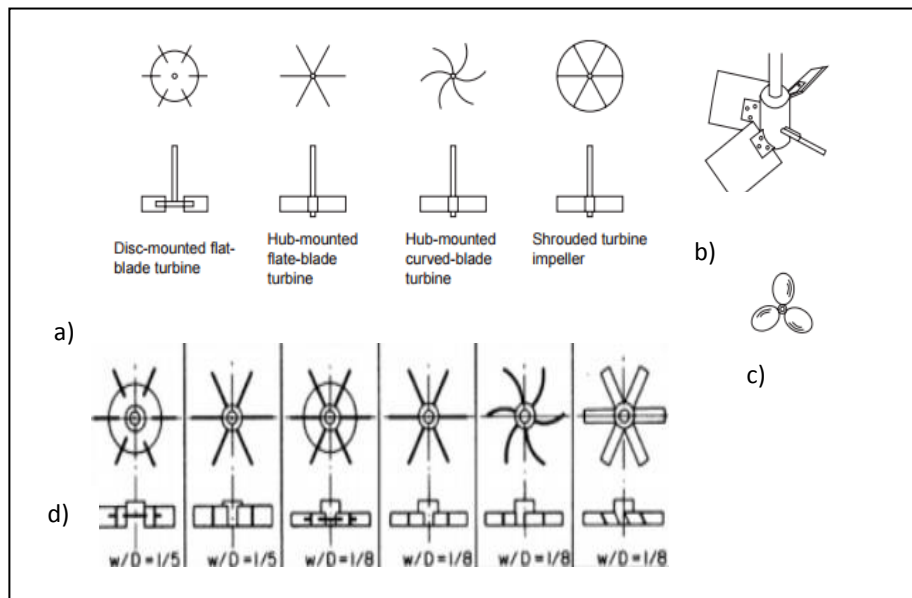


Figura 5) Tipos de impulsores.

Para el escalamiento de un fermentador se puede suponer una similitud geométrica donde los siguientes parámetros deben de ser iguales para ambos tanques [33].

$$D_r/D_i = \text{Diámetro del fermentador} / \text{Diámetro del impulsor}$$

$$L/D_i = \text{Altura del medio} / \text{Diámetro del impulsor}$$

$$I/D_i = \text{Altura del impulsor desde el fondo} / \text{Diámetro del impulsor}$$

Si se supone una similitud dinámica, es decir que los fluidos son idénticos en ambos casos se puede escalar con el número de Reynolds.

$$Re_{fermentador1} = \frac{n_1 \cdot d_1^2 \cdot \rho_1}{\eta_1} = Re_{fermentador2} = \frac{n_2 \cdot d_2^2 \cdot \rho_2}{\eta_2} \dots [34]$$

Si se tratara de un escalamiento de un proceso aerobio, una de las principales limitaciones se asocian a la transferencia de oxígeno al medio de cultivo, la concentración de oxígeno disuelto depende de la transferencia de la fase gaseosa al líquido, de la velocidad de transporte de oxígeno de los microorganismos y de la tasa de consumo de este (OUR).

El coeficiente de transferencia de oxígeno K_{La} , se puede ver afectado por las condiciones del biorreactor, de operación, agitación, viscosidad y temperatura y puede ser calculado mediante correlaciones, una de las más comunes para tanques agitados son la de Van't Riet (1979), puede ser utilizada para varios volúmenes de fermentadores y tipos de turbinas y es para la relación aire, agua y iones.

$$k_{La} = 2 \times 10^{-3} \left(\frac{P_g}{V} \right)^{0.7} v_s^{0.2}$$

Donde

P_g/V es la potencia volumétrica gaseada

V_s es la velocidad superficial del gas

II.- Justificación

El creciente consumo de energía, la contaminación ambiental asociada al uso de combustibles fósiles y la disminución en las reservas de los mismos, han generado un gran interés en la búsqueda de fuentes alternas de energía como lo son los biocombustibles, en especial aquellos de segunda generación para evitar el conflicto con la producción de alimentos.

El proceso para la producción de bioetanol consta de varias etapas, que van desde la recolección de la materia prima (materiales de desecho), pasando por la molienda, hidrólisis, sacarificación, fermentación y purificación, como se muestra en la figura 6.

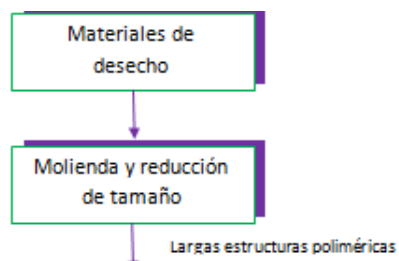


Figura 6) Proceso simplificado de producción de bioetanol, a partir de materiales de desecho

Los principales beneficios de realizar la hidrólisis enzimática junto con la fermentación (SSF), es que la inhibición de la enzima por su producto se ve reducida, por lo tanto los costos de inversión son menores, el proceso requiere menos tiempo ya que ambos procesos son simultáneos y a temperaturas más bajas, lo que también reduce los costos.

Sin embargo, debido a las temperaturas que se manejan en la hidrólisis enzimática que van de 40 a 50°C, para llevar a cabo este proceso se requiere de un microorganismo que sea capaz de realizar la fermentación de azúcares a altas temperaturas.

En este proceso se tienen que considerar aspectos importantes en cuanto a la compatibilidad de la enzima y del microorganismo ya que ambos requieren condiciones favorables en cuanto a pH y temperatura, para cumplir con estos requerimientos en la mayoría de las ocasiones se utiliza como temperatura para trabajar 37°C. Sin embargo en este trabajo se realizará el proceso a temperaturas de 42°C.

III.- Motivación

La tendencia mundial en la producción de biocombustibles, en especial la producción de bioetanol a partir de residuos lignocelulósicos, ha llevado a la búsqueda de nuevas alternativas al proceso entre las cuales está el uso de levaduras termotolerantes como *K. marxianus* en procesos de SSF, que permitirían tener las ventajas anteriormente mencionadas en el proceso.

IV.- Objetivos y metas del trabajo

Objetivo general

- Producción de etanol celulósico en un proceso SSF a partir de olote de maíz utilizando *K. marxianus*.

Objetivos particulares

- Identificar y tipificar la levadura termotolerante.
- Estudiar la tolerancia de la levadura a inhibidores generados en el pretratamiento.
- Realizar el proceso de SSF con olote de maíz.

Metas

- Llevar a cabo el proceso SSF en matraz y en biorreactor.
- Determinar el crecimiento de la levadura y producción de etanol en el proceso SSF.

V.- Materiales y métodos

V.1.- Microorganismos, enzimas y materias primas

- *Kluyveromyces marxianus* cepa (Km24) obtenida del agave de henequén (*Agave fourcroydes* “Ki”) cocido.
- *Saccharomyces cerevisiae* #3 obtenida de la colección American Type Culture Collection (ATCC 96581).
- Cellic® CTec2 donada por Novozymes, la cual es una mezcla de Celulasas agresivas y β - glucosidasas.
- Fracción solida de olote de maíz pretratado mediante pretratamiento termoquímico con ácido sulfúrico.

V.2.- Medios de cultivo

- Medio YPD (extracto de levadura, peptona y dextrosa)

Es un medio complejo utilizado para el mantenimiento y la propagación de levaduras en general. Se utilizó para descripción morfológica conservación de las levaduras en agar, así como para experimentos de tolerancia.

YPD (g/L)	
Extracto de levadura	10
Peptona	20
Dextrosa	20
*Agar	15

*El agar sólo se añade para obtener medio YPD sólido.

- Medio YPD-X que contiene xilosa en vez de glucosa

YPD-X (g/L)	
Extracto de levadura	10
Peptona	20
Xilosa	20
Agar	15

*El agar sólo se añade para obtener medio YPD-X sólido.

- Agar malta

Es un medio complejo utilizado para la conservación, aislamiento y conteo de levaduras y mohos.

Agar malta (g/L)	
Extracto de malta	30
Peptona de harina de soya	3
Agar	15

- Agar WL nutritivo

Es un medio complejo utilizado para la conservación, aislamiento e identificación de levaduras por su morfología y color que presentan al crecer en este medio, el cual cuenta con un antibiótico (cloranfenicol), que inhibe el crecimiento bacteriano y verde de bromocresol, que es un indicador de pH y va de un rango de 3.8 a 5.4 tomando coloraciones amarillas en el pH más bajo y azul verdosas a pH más elevados.

Agar WL nutritivo (g/L)	
Extracto de levadura	4
Glucosa	50
Triptona	5
CaCl ₂	0.125
KCl	0.425
KH ₂ PO ₄	0.55
FeCl ₂	0.0025
MnSO ₄	0.0025
Verde bromocresol	0.022
Cloranfenicol (mg)	150
Agar	20

- Medio de fermentación

Es un medio mínimo el cual esta suplementado con glucosa como fuente de carbono para la fermentación, el pH de este medio es de 5, tiene los requerimientos mínimos para que la levadura pueda crecer. Es un medio indefinido debido a que cuenta con extracto de levadura en su composición.

Medio de fermentación (g/L)	
Extracto de levadura	1
Glucosa	50
(NH ₄) ₂ SO ₄	1.6
NaCl	0.5
KH ₂ PO ₄	1.4

V.3.- Caracterización de la levadura

V.3.1 Caracterización morfológica

Para la caracterización morfológica de la levadura, se utilizaron tres medios sólidos diferentes, agar WL nutritivo, agar YPD y agar malta, siguiendo este procedimiento:

- Sembrar los tres medios por estríado a partir de una misma colonia.
- Dejar en incubación por 2 días (agar YPD) o 7 días (agar malta y agar WL).
- Observar las características físicas de las colonias obtenidas.

V.3.2 Caracterización molecular de *K. marxianus*

Existen diversos métodos de caracterización molecular, tanto para determinar diferencias a nivel de especie como a nivel de cepa. A continuación, se muestran las técnicas empleadas y los procedimientos utilizados para la caracterización molecular de la levadura a nivel de especie mediante a) análisis de las secuencias de los espacios transcritos internos ITS1-ITS2; b) del dominio D1/D2 de la subunidad grande del ARN ribosomal (ARNr 28S). El ITS y el dominio D1/D2 fueron obtenidos por la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

La PCR consiste en la amplificación de una secuencia de ADN *in vitro*. Para que se lleve a cabo la amplificación, se requiere de ciertos elementos como los iniciadores o *primers* (*reverse R* y *forward F*) que son secuencias conocidas que sirven para delimitar la región en la cual será replicado el ADN, un templado el cual es la secuencia de ADN molde a amplificar, un buffer, desoxirribonucleótidos (dNTPs), la enzima (Taq DNA polimerasa), así como, iones de Mg⁺² y KCl.

El proceso consiste en un ciclo de 3 etapas, la etapa 1 llamada desnaturalización que, como su nombre lo indica se basa en la desnaturalización del ADN templado a una temperatura de 95°C, seguido por la etapa 2 llamada hibridación, que consta de una baja de temperatura a 50°C para permitir que el *primer* se una al templado, la etapa 3 o elongación que consiste en la duplicación de la secuencia con la enzima Taq DNA polimerasa a 72°C. En la figura 7, se muestra un ciclo del proceso, en el cual se muestra la etapa (1) desnaturalización, (2) hibridación y (3) elongación.

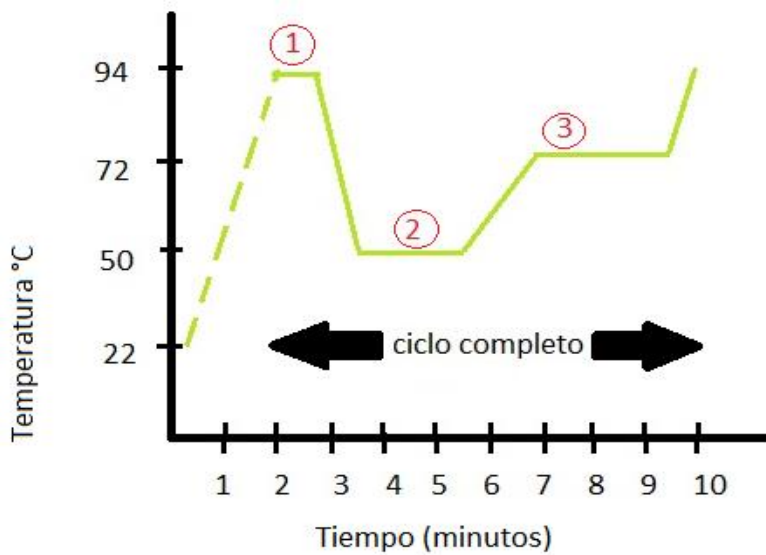


Figura 7) Ciclo de PCR

La electroforesis horizontal en geles de agarosa es una técnica que permite separar y visualizar los fragmentos de ADN obtenidos por PCR de acuerdo a su tamaño en un campo eléctrico dentro de un gel poroso de agarosa (figura 8).

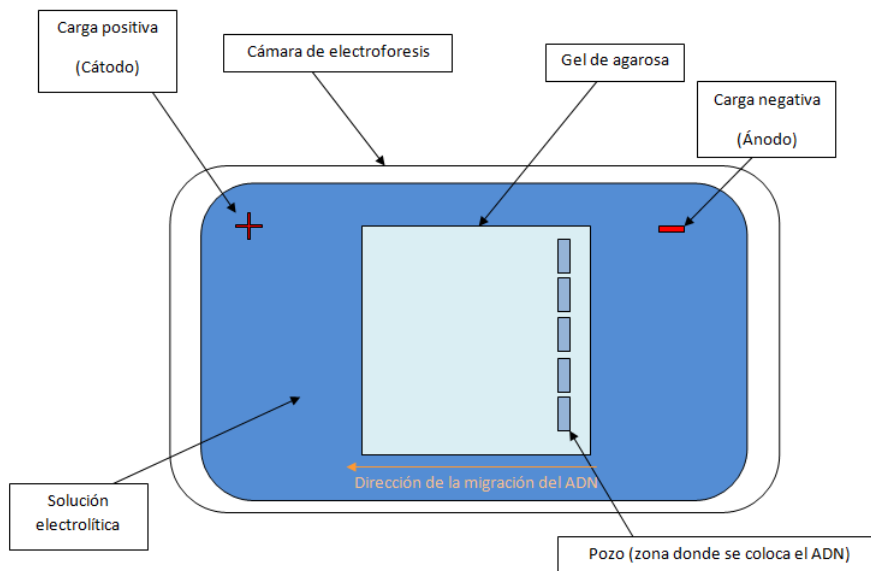


Figura 8) Esquema de una cámara de electroforesis horizontal en gel de agarosa

La primera etapa de la caracterización molecular es la extracción de ADN de la cepa, el cual se realizó con el siguiente procedimiento: Se utilizó el kit ZR Fungal/Bacterial DNA miniprep™, (Catálogo D6005 de ZymoResearch), el cual está diseñado para el aislamiento rápido de ADN, tanto de hongos como bacterias. Este kit funciona con una combinación de calor y detergentes que lisan las células de manera térmica y química junto con perlas que causan lisis mecánica; la purificación se logra a través de una minicolumna de sílice que retiene el ADN y deja pasar las impurezas como las proteínas, posteriormente se eluye el ADN con el buffer acuoso contenido en el kit y se conserva a -20°C por unos días y a -70°C por tiempos más largos.

En el anexo A, se muestran los componentes y el protocolo detallado del kit utilizado.

Para la medición del ADN obtenido por medio del kit se utilizó el espectrofotómetro Nanodrop 1000, que mide la absorbancia de 220 a 750 nm una muestra de 0.5µL a 2 µL utilizando la tensión superficial del líquido. En la figura 9 se muestra un esquema con el funcionamiento y las partes del Nanodrop 1000.

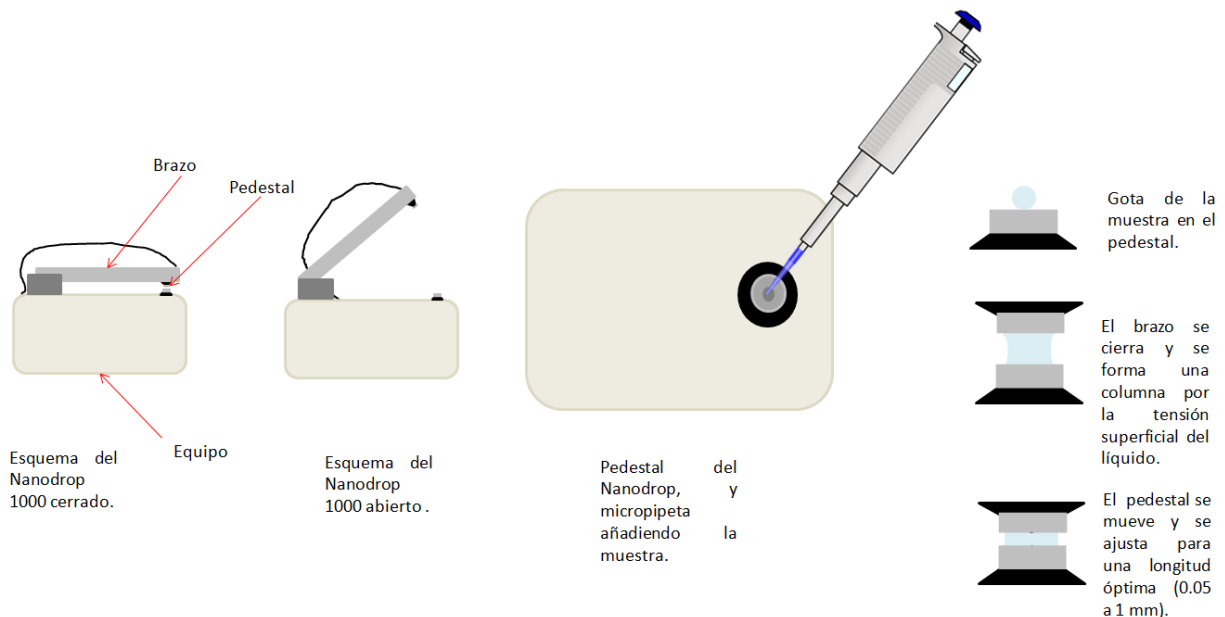


Figura 9) Esquema del funcionamiento de un espectrofotómetro Nanodrop

V.3.2.1 Identificación de *K. marxianus* Km24 mediante el análisis de las secuencias ITS1- ITS2

Esta técnica consiste en la amplificación del gen 5.8S junto con las regiones intergénicas ITS1-ITS2 que lo flanquean (Figura 4 de la introducción)

Los *primers* utilizados fueron:

Primer	Sentido	Secuencia
ITS1	F	5' TCCGTAGGTGAACCTGCGG 3'
ITS4	R	5' TCCTCCGCTTATTGATATGC3'

Condiciones de la reacción de PCR:

Se utilizaron 50 ng de ADN extraído para 50 µL de volumen de reacción, se realizó un cóctel para cinco reacciones, una reacción extra para que no falte volumen. El volumen de agua y templado fueron diferentes para cada muestra dependiendo de la concentración de ADN que se tenía en cada caso.

Reactivo	Ejemplo para 30µL	#3 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (como control +)	Km24 <i>K. marxianus</i> (K)	Km24 <i>K. marxianus</i> (F)	Control (-)	Cóctel
H ₂ O	-	37.79	41.08	40.65	42.5	-
Buffer "Standard TaqReaction Buffer New England Biolabs 10X"	3	5	5	5	5	25
dNTPs (10 mM)	0.6	1	1	1	1	5
Primer ITS1 (50 µM)	0.3	0.5	0.5	0.5	0.5	2.5
Primer ITS4 (50 µM)	0.3	0.5	0.5	0.5	0.5	2.5
Taq ADN polimerasa (5U/µL)	0.3	0.5	0.5	0.5	0.5	2.5
Templado	-	4.71	1.42	1.85	0	-
Volumen total de reacción (µL)	30	50	50	50	50	37.5

Las condiciones de amplificación fueron las siguientes:

Desnaturalización inicial:	5 min.	95°C	1 ciclo
Desnaturalización:	1 min.	94°C	35 ciclos
Annealing:	2 min.	55.5°C	
Extensión:	2 min.	72°C	
Extensión final:	10 min.	72°C	1 ciclo

V.3.2.2 Identificación de *K. marxianus* mediante el análisis de la secuencia de los dominios D1/D2.

Esta técnica consiste en la amplificación de los 600 primeros nucleótidos del gen ribosomal 26S.

Los *primers* utilizados fueron:

Primer	Sentido	Secuencia
NL1	F	5' GCA TAT CAA TAA GCG GAG GAA AAG 3'
NL4	R	5' GGT CCG TGT TTC AAG ACG G 3'

Condiciones de la reacción:

Reactivo	Ejemplo para 30 µL	Control (+) #3	(-)	KM24 (K)	KM24 (F)	Cóctel
H ₂ O	-	37.79	42.5	41.08	40.65	-
Standard TaqReaction Buffer 10X	2.5	5	5	5	5	25
dNTPs (10 mM)	0.5	1	1	1	1	5
Primer NL1 (50 µM)	0.25	0.5	0.5	0.5	0.5	2.5
Primer NL4 (50 µM)	0.25	0.5	0.5	0.5	0.5	2.5

Taq DNA polimerasa (5U/ μ L)	0.25	0.5	0.5	0.5	0.5	2.5
Templado	-	4.71	0	1.42	1.85	-
Volumen total de reacción (μ L)	30	50	50	50	50	32.5

Se utilizaron 50 ng de ADN extraído para 50 μ L de volumen de reacción, se realizó un cóctel para cinco reacciones, una reacción extra para que no falte volumen. El volumen de agua y templado fueron diferentes para cada muestra dependiendo de la concentración de ADN que se tenía en cada caso.

Las condiciones para la amplificación fueron las siguientes:

Desnaturalización inicial:	5 min.	95°C
Ciclos en 3 etapas		
Desnaturalización:	30 seg.	94°C
Annealing:	30 seg.	55°C
Extensión:	30 seg.	72°C
Número de ciclos:	30	
Extensión final:	7 min.	72°C

Una vez obtenido el ADN del PCR, se llevó a secuenciar el ADN, ya sea ITS1-ITS2 o el dominio D1/D2. A cada muestra se le realizó un Blastn y un Dot-plot, técnicas bioinformáticas para la identificación y comparación de secuencias de ADN, respectivamente. El Blastn o herramienta de búsqueda de alineación local básica de nucleótidos, es un algoritmo para comparar la información de secuencias ya sean secuencias de aminoácidos o de nucleótidos. Funciona utilizando un método heurístico, el primer paso que realiza es cortar la secuencia en 11 nucleótidos y combinar los primeros 3 como inicios; este proceso de encontrar secuencias similares se llama

“seeding”. Una vez realizado esto el BLASTn hace alineaciones locales, por ejemplo: si la secuencia contiene el siguiente conjunto de nucleótidos, AAGCA, se seleccionarían combinaciones de tres letras las cuales serían AAG, AGC, GCA. El algoritmo localiza todos los nucleótidos comunes entre la secuencia de interés y las de la base de datos [35], una vez realizado esto el Blastn busca los dos nucleótidos adyacentes, así como sus similitudes y la distancia entre estas, desechando o guardando de esta manera las secuencias con las que compara, una vez que encuentra una homología, sigue con la secuencia analizándola hacia arriba y hacia abajo, haciendo que las puntuaciones bajen o aumenten^[36] (Figura10).

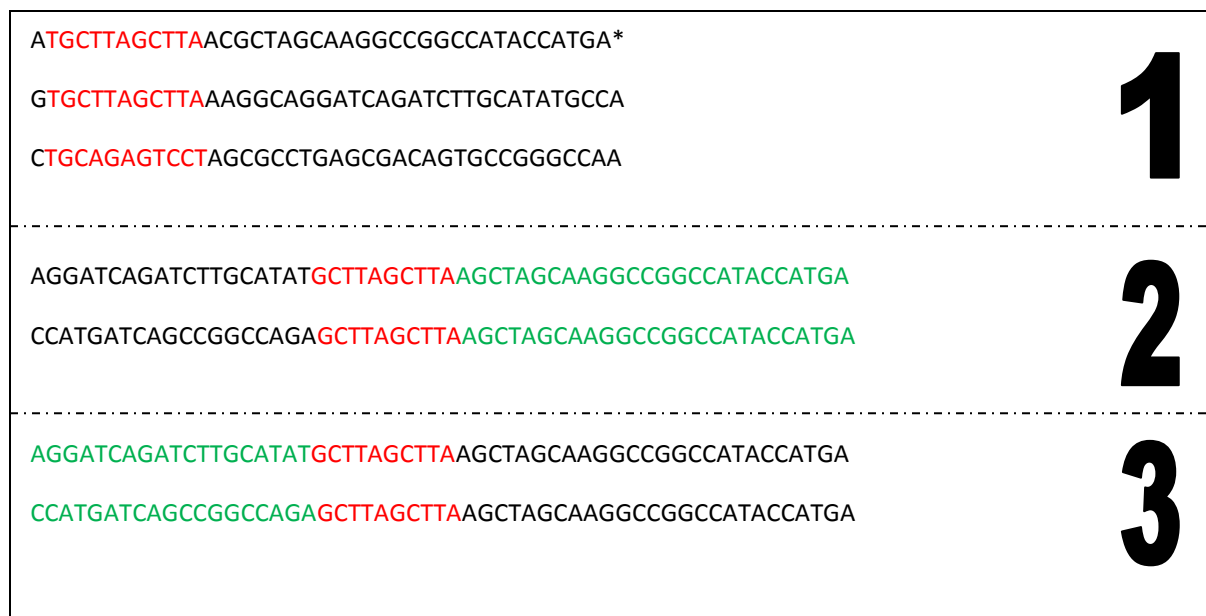


Figura 10) Esquema del funcionamiento del blast

En la parte 1 de la figura se muestra la secuencia objetivo que es la secuencia a comparar o experimental la cual se encuentra marcada con un asterisco; en esta secuencia en color rojo se muestra un segmento de 11 bases el cual se compara con otras dos secuencias obtenidas de la base de datos, que se muestran en la parte inferior, ambas secuencias cuentan igualmente con un segmento rojo y sólo uno queda con la secuencia comparada, por lo que la que no concuerda se descarta y se conserva la que tiene las mismas bases; en la parte dos muestra que del lado derecho (color verde) la secuencia coincide, por lo que sigue el paso 3, en el cual se compara la

secuencia izquierda, la cual ya no es igual, generando una penalización a esta secuencia y bajando su puntaje de similitud.

En el caso del Dot-plot se utilizó una herramienta llamada Dotlet (<http://myhits.isb-sib.ch/cgi-bin/dotlet>), se coloca la secuencia a objetivo y la secuencia a comparar, una vez realizado esto las secuencias son graficadas por el programa. El Dot-plot funciona con una matriz en la cual se coloca en el lado horizontal una secuencia y la otra en el lado vertical; la matriz compara las similitudes y genera ruido por lo que se coloca un filtro para eliminar el ruido de los resultados [37]. En la figura 11 se muestra un ejemplo del Dot-plot; en la primera imagen se observa el Dot-plot sin el filtro, se observa la secuencia principal en la parte media y el ruido en los alrededores, mientras que en la segunda imagen ya con el filtro se observa sólo la línea principal.

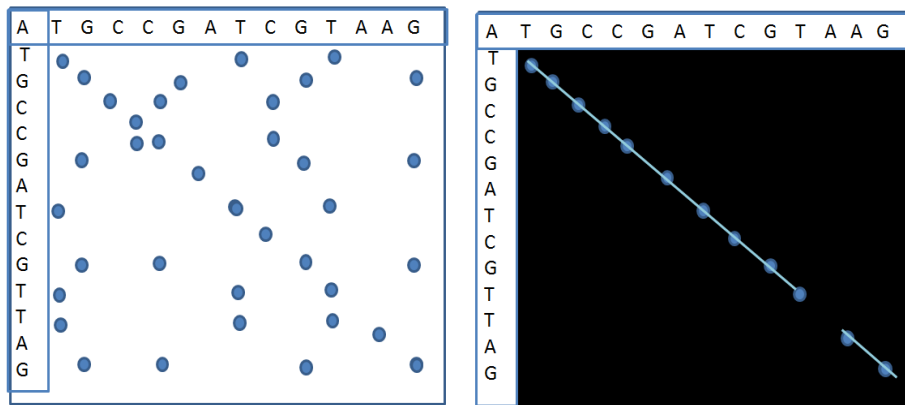


Figura 11) Ejemplo del funcionamiento del Dot-plot

V.4.- Caracterización del olote

La caracterización del olote pretratado (sólido) tiene como objetivo cuantificar los componentes de la materia prima a utilizar (celulosa, hemicelulosa, lignina y cenizas) para calcular la cantidad de la enzima a utilizar y para obtener la eficiencia de la sacarificación y fermentación, así como para saber si hay presencia de algún inhibidor.

La caracterización se realizó en 5 partes, la primera fue la determinación de humedad, la segunda cuantificación del contenido fenólico [38], la tercer parte la cuantificación de celulosa y lignina y la cuarta la cuantificación de hemicelulosa A y B[39], finalmente la medición del tamaño de partícula.

La humedad se determinó mediante peso seco, el procedimiento fue el siguiente:

- Pesar 2.5 g de olote húmedo.
- Colocarlo en el horno a 60°C durante 4 días.
- Pesar nuevamente el olote seco.

El procedimiento de la cuantificación de fenoles se describe a continuación:

- Pesar 500 mg de olote seco pretratado en 50 mL de una solución acetona/agua 1:1 (v/v) y dejar en un frasco ámbar durante 48 horas a temperatura ambiente.
- Tomar 20 µL de la muestra (líquido).
 - Añadir 200 µL del reactivo Folin-Ciocalteu 1M.
 - Sonicar durante 5 minutos.
 - Añadir 1250 µL de carbonato de sodio al 20% (p/v) y completar con agua destilada hasta obtener 2 mL como volumen final.
 - Dejar dos horas a temperatura ambiente y medir la absorbancia a 720 nm.
 - Se realizó una curva de calibración de 0 a 5 g/L de fenoles utilizando catequina Sigma 99% HPLC con acetona y agua 1:1, la ecuación obtenida fue $y=0.117x-0.009$ con una $R^2 = 0.997$, en el anexo C se muestra la curva de calibración.

El procedimiento de cuantificación de celulosa y lignina fue el siguiente:

- Pesar 2.5 gramos de olote húmedo pretratado correspondiente a 1gramo de olote seco por quintuplicado.
- Colocar en un matraz de 50 mL con 30 mL de una solución (1 M) de NaOH y (0.375 M) de peróxido de hidrógeno.
- Dejar el matraz en agitación 130 rpm durante 3 horas a 50 °C.
- Separar el sólido del líquido por filtración y lavar el sólido con agua destilada y secar el sólido a 85°C durante 24 horas, obteniendo la celulosa como el sólido.
- Para la obtención de la lignina, se ajusta el pH del sobrenadante a 4 con ácido acético 50% p/v, congelar durante una noche a -18°C.
- Descongelar y centrifugar el líquido a 2500 rpm durante 15 minutos, una vez realizado esto, decantar y poner a secar el sólido (lignina) a 85°C durante 12 horas.

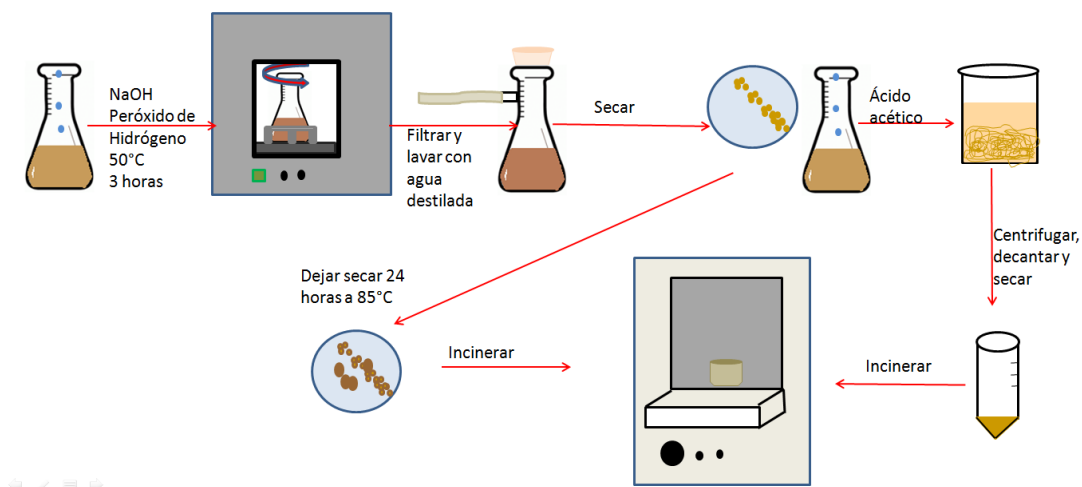


Figura 12) Extracción de celulosa y de lignina. El sólido obtenido después del secado es la celulosa y el sólido obtenido al decantar es la lignina

El procedimiento de la extracción alcalina de la hemicelulosa A y B se describe a continuación y en la figura 13:

- Pesar 2.5 gramos de olote húmedo pretratado (1 gramo de olote seco) por quintuplicado.
- Colocar en un matraz de 50 mL con 30 mL de una solución de NaOH 1M.
- Dejar el matraz en agitación a 130 rpm durante 24 horas a temperatura ambiente.
- Separar el sólido del líquido por filtración utilizando un filtro de poro medio y lavar el sólido con agua destilada, secar el sólido a 50°C durante 24 horas en una estufa.
- Para la obtención de la hemicelulosa B, ajustar el pH del sobrenadante obtenido, a 4 con ácido acético 50% p/p, congelar durante una noche a -18°C.
- Descongelar y centrifugar el líquido, una vez realizado esto, decantar y poner a secar el sólido (hemicelulosa B) a 85°C durante 12 horas.
- Al líquido agregarle metanol grado reactivo en una relación 1:3 (v/v), decantar y secar el sólido (hemicelulosa A) a 85°C durante 12 horas en una estufa.
- Al final del proceso pesar los sólidos obtenidos.

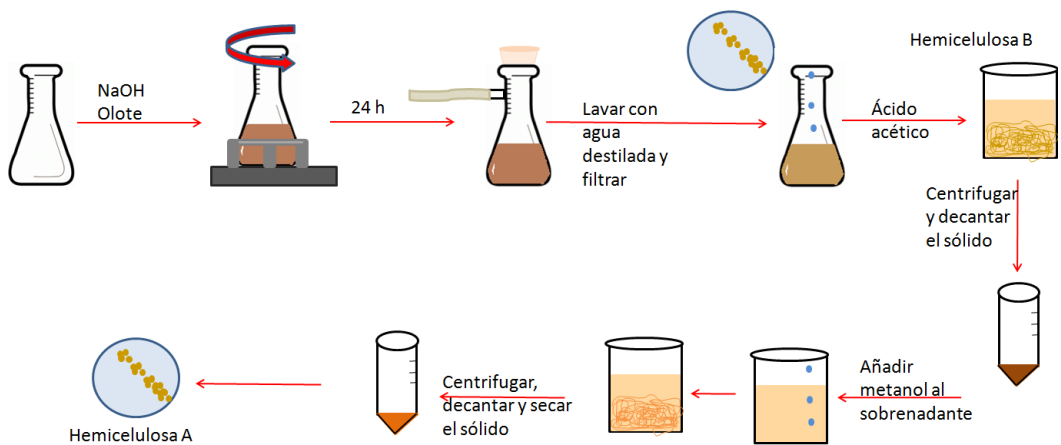


Figura 13) Extracción de hemicelulosa A y B

La medición del tamaño de partícula se realiza con el olote pretratado húmedo como se describe a continuación y en la figura 15.

- Pesar 10 g del olote húmedo pretratado y colocarlo en el tamiz de mayor tamaño de poro 1.9 mm.
- Mover para pasar al tamiz de 1.6 mm y después al de tamaño menor (1 mm).
- Separar el olote que queda en cada tamiz y pesarlo.
- Realizar el experimento por triplicado.



Figura 14) Procedimiento para la determinación del tamaño de partícula del olote pretratado

V.5.- Pruebas de tolerancia a inhibidores en medio sólido

Realizar las pruebas a inhibidores en cajas petri con medio YPD adicionando los siguientes inhibidores:

- Ácido acético
- Etanol
- NaCl
- Furfural
- 5-Hidroximetilfurfural
- Glucosa

Las cajas utilizadas fueron de 100 x 15 mm y las concentraciones a probar de los inhibidores se muestran a continuación.

Etanol % v/v	# cajas
0	4
2	4
5	4
7.5	4
10	4
12	4
14	4
Total	28 cajas

NaCl g/l	# cajas
0	4
25	4
37.5	4
50	4
75	4
100	4
150	4

HMF g/l	# cajas
0	4
0.95	4
1.9	4
2.85	4
3.8	4
5	4

Glucosa % p/v	Cajas
0	4
30	4
40	4
50	4
60	4
70	4

Acético g/l	#cajas
0	4
0.625	4
1.25	4
2.5	4
3.75	4
5	4

Furfural g/l	# cajas
0	4
0.95	4
1.9	4
2.85	4
3.8	4
5	4

El procedimiento se describe a continuación y en la figura 15:

- Preparar el inóculo colocando 3 mL de medio YPD en un tubo de cultivo y adicionando una colonia.
- Dejar los cultivos 48 horas a 30°C y 150 rpm.
- Medir densidad óptica (DO_{600nm}).
- Diluir con medio YPD para obtener una DO_{600nm} de 0.25 con medio YPD.
- Colocar una gota de 5 μ L de cada cultivo diluido, con precaución para que la gota quede uniforme y centrada.
- Dejar secar la gota.
- Incubar a 30° o 42°C por 96 horas.
- Revisar las placas cada 24 horas, tomar fotografías y medir diámetros de las colonias a las 48 y 96 horas (figura 15).

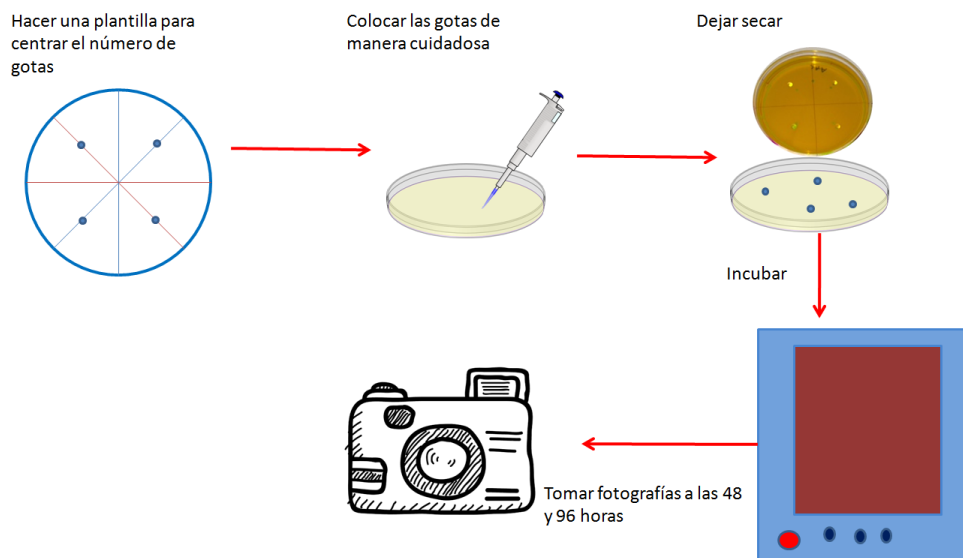


Figura 15) Procedimiento para las pruebas de tolerancia en caja petri

V.6.- Prueba de tolerancia a inhibidores en cultivo líquido

La cuantificación del inhibidor, la glucosa y etanol se realizó por cromatografía y el crecimiento se cuantificó mediante el uso del espectrofotómetro a 600 nm.

Dentro de un cultivo líquido, una cinética tiene como base la medición del crecimiento de la levadura, por medio de técnicas espectrofotométricas y peso seco; se utiliza la espectrofotometría para determinar la turbidez del medio de cultivo por medio de la cantidad de luz que atraviesa la muestra, el resultado se obtiene en unidades de absorbancia y el método requiere una curva de calibración si se quiere saber el número de levaduras existentes o el peso de la biomasa.

La Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), es una técnica cualitativa y cuantitativa de separación, se basa en la separación de los componentes de una muestra por sus características físicas y/o químicas. Consiste en dos fases una móvil y una estacionaria, la muestra se inyecta y los componentes son arrastrados dentro de una columna (fase estacionaria) por medio de un líquido (fase móvil); los componentes son detectados a la salida de la columna por un detector que mide su cantidad, dando como resultado un cromatograma.

En el presente trabajo, la columna utilizada fue Aminex® HPX-87H, 300mm (Catálogo #125-0140), como fase móvil se utilizó H₂SO₄ 0.08 N, presión de 770 psi, 60°C y un flujo de 0.60 mL/min, el HPLC inyecta 20 µL de la muestra; para la determinación de las concentraciones se utilizaron curvas de calibración que se muestran en el anexo C.

Las cinéticas se realizaron en medio de fermentación, al cual se le adicionó ácido acético: 0 g/L, 3 g/L y 6 g/L ajustando el pH a 4.8 en la mitad de los matraces y sin ajustar el pH en los matraces restantes; el experimento se llevó a cabo con duplicados, a 30°C y 42 °C, en matraces de 125 mL con 62.5 mL de medio de fermentación.

- De las cajas petri con medio YPD, se tomó una colonia y se colocó en un matraz de 250 mL con 50 mL de medio YPD líquido, dejar 24 horas para tener el inóculo.
- Se midió el pH del medio en todos los matraces y ajustó el pH a 4.8 con HCl o KOH.

- Se midió la absorbancia del inóculo a 600 nm y se inocularon 12 matraces con una absorbancia inicial de 0.2 UDO; se tomaron muestras para medir glucosa, etanol y ácido acético en el HPLC y medir la absorbancia a las 2, 4, 6, 8, 10, 24, 48 y 72 horas, finalmente se midió el pH final de todos los matraces a las 72 horas.

V.7.- Proceso de Sacarificación y Fermentación Simultáneo

V.7.1 Proceso de Sacarificación y Fermentación Simultáneo en matraz

La hidrólisis enzimática de la celulosa se basa en el metabolismo de los microorganismos, ya que las enzimas provienen de estos. Las enzimas son 100% selectivas para llevar a cabo la reacción de hidrólisis de celulosa a glucosa, por lo que otros componentes no interfieren en el sitio activo.

La celulasa hidroliza la celulosa a 50°C en un medio con un pH de 4.8 (condiciones óptimas de la enzima) ^[19], en el caso de la SSF se llevó a cabo en el mismo recipiente y bajo las mismas condiciones, el procedimiento de la SSF se muestra a continuación y en la figura 17.

- Pesarse el olote para obtener 13.2% (p/v) de carga de sólidos para 100 mL, subir el pH del olote a 4.8 con KOH concentrada, filtrar con un filtro de poro medio y lavar dos veces con agua corriente, pesarse el olote y determinar el agua absorbida por el olote.
- En un matraz de 250 mL colocar el olote, junto con el medio de fermentación y el buffer de citratos 0.05 M con un pH de 4.8.
- Esterilizar el matraz en un autoclave durante 15 minutos a 1 Kg/cm³.
- Añadir el cóctel enzimático Cellic® CTec2 de Novozymes al 6% (p/p) (g enzima/g celulosa)
- Inocular con una DO de 0.25 de *K. marxianus* Km24.
- Completar el volumen 100 mL con agua de la llave esterilizada.
- Colocar el matraz en la incubadora a 42°C y 200 rpm.
- Tomar muestra y centrifugarla a 13000 rpm durante 10 minutos (tiempos 0h, 12h, 24h, 36h, 48h, 60h y 72h).

- Congelar el sobrenadante a -18°C para guardarlo y realizar análisis por HPLC de etanol, glucosa y ácido acético o DNS para azúcares reductores, el procedimiento se muestra en el anexo B y la curva de calibración en el anexo C.

En este caso no se mide la absorbancia ya que el olote interfiere en la medición.

Proceso de Sacarificación y Fermentación Simultáneos (matraz)

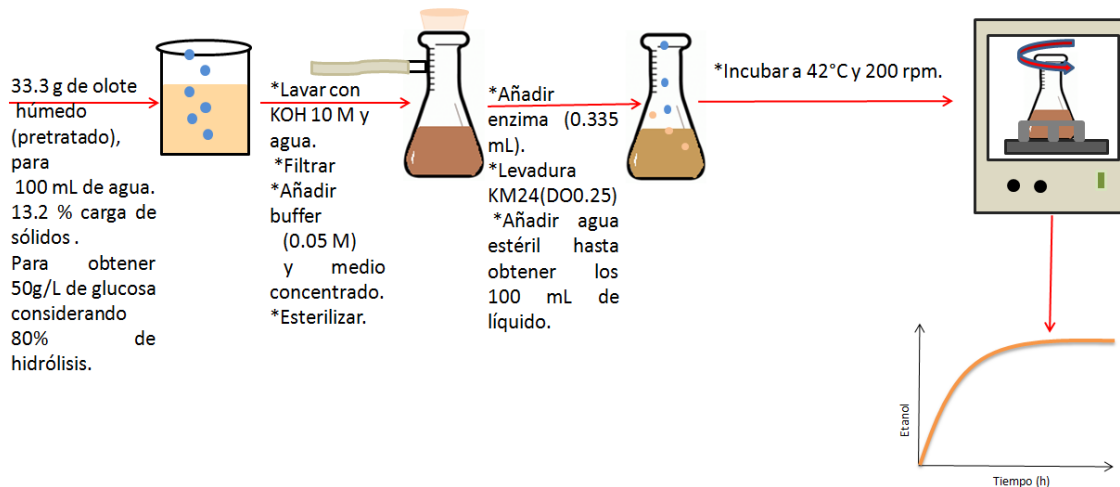


Figura 16) Procedimiento el SSF en matraz

V.7.2 Proceso de Sacarificación y Fermentación Simultáneo en biorreactor

Para el escalamiento del matraz al biorreactor, se utilizó el número de Reynolds; para calcularlo se requiere la viscosidad del líquido por lo que se utilizó un viscosímetro capilar de Cannon Fenske de 350. Se midió la viscosidad del olote molido y sin moler en los tiempos 0 horas, 36 horas y 72 horas, una vez obtenido este dato se calculó la densidad con el peso y volumen de las muestras.

Con estos datos se obtuvo el número de Reynolds y se escaló para obtener el valor de la velocidad de agitación (rpm) en el fermentador.

En la figura 17 se muestra un dibujo del viscosímetro, el número 1 es la parte inicial donde se coloca la muestra, el número 2 contiene el volumen a añadir, en el número 6 se coloca la perilla para subir el volumen a la parte 5, una vez ahí se deja caer el líquido

a la parte 4 y una vez ahí se comienza a contar el tiempo y se detiene cuando termina de pasar a la parte 3 que contiene el capilar que detiene al líquido cuando pasa.

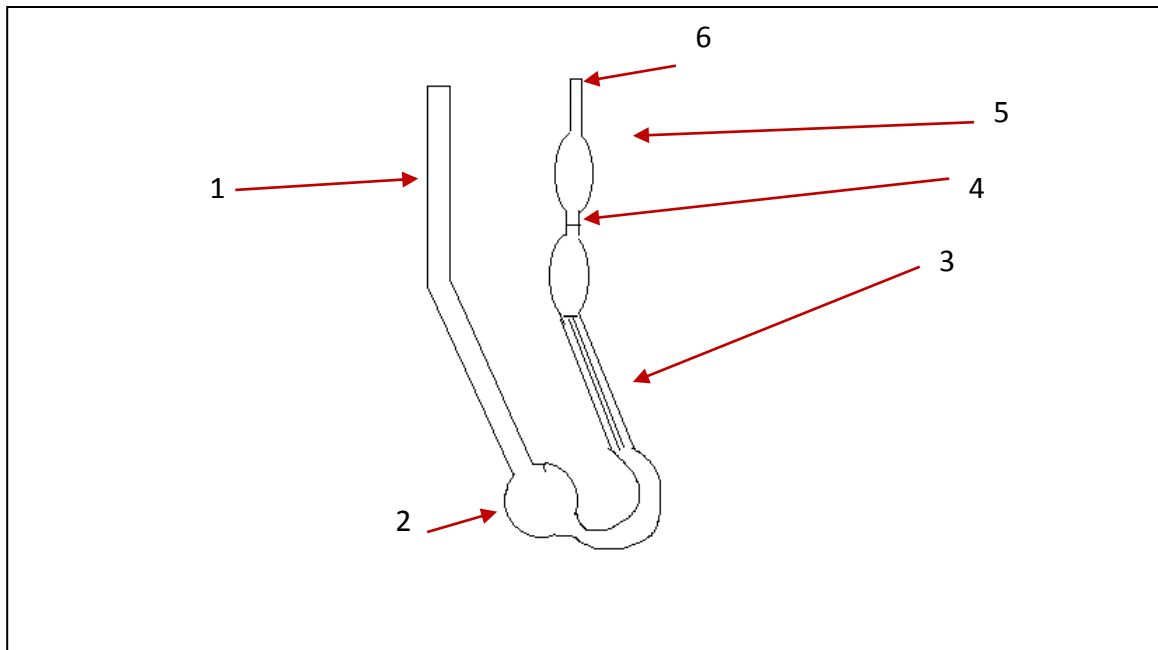


Figura 17) Esquema de un viscosímetro capilar de Cannon Fenske

El procedimiento de la SSF se muestra a continuación (figura 18).

- Pesar el olote para obtener 13.2% (p/v) de carga de sólidos para 2.5 L, subir el pH del olote a 4.8 con KOH concentrada, filtrar con un filtro de poro medio y lavar dos veces con agua corriente, pesar el olote y determinar el agua absorbida por el olote.
- Colocar el olote, junto con el medio de fermentación y el buffer de citratos 0.05 M con un pH de 4.8 en el biorreactor.
- Esterilizar el biorreactor en un autoclave a 1 Kg/cm³ durante 15 minutos.
- Añadir el cóctel enzimático Cellic® CTec2 de Novozymes 6% (p/p) (g enzima/g celulosa)
- Inocular con una DO de 0.25 de *K. marxianus* Km24.
- Completar el volumen 2.5 L con agua de la llave esterilizada.
- Programar el biorreactor a 42°C y 312 rpm.
- Tomar muestra y centrifugarla a 13000 rpm durante 10 minutos (tiempos 0h, 12h, 24h, 36h, 48h, 60h y 72h).

- Congelar el sobrenadante a -18°C para guardarlo y realizar análisis por HPLC de etanol, glucosa y ácido acético. En este caso no se mide la absorbancia ya que el olote interfiere en la medición.

SSF (reactor)

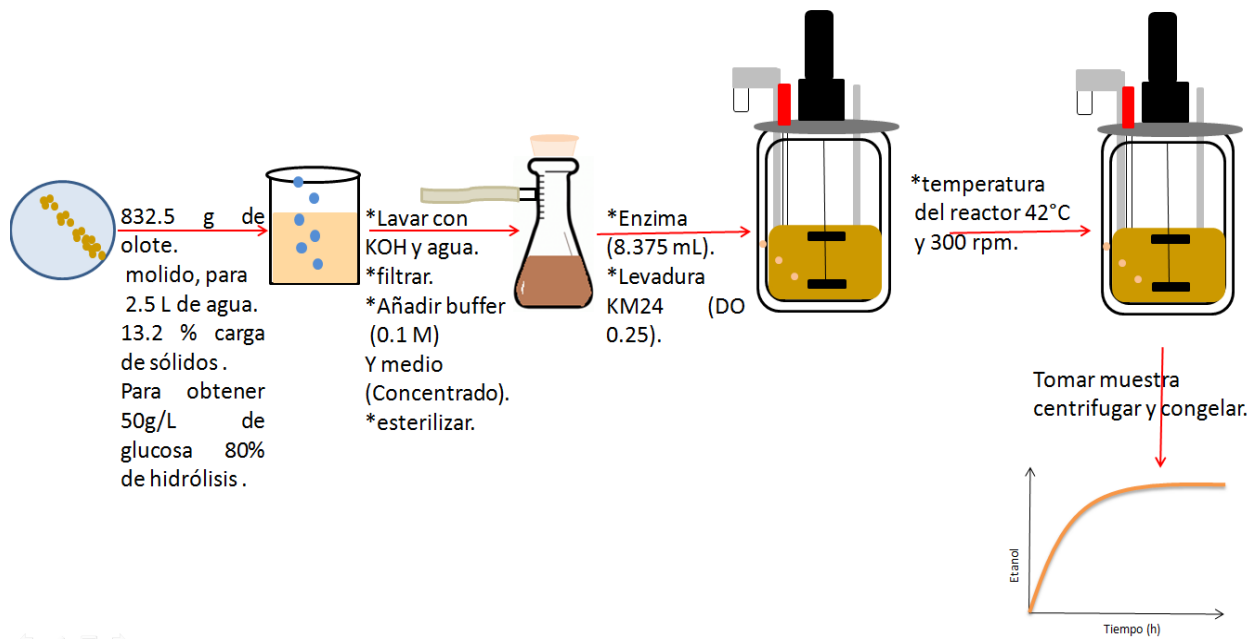


Figura 18) Procedimiento para la sacarificación y fermentación simultáneas en biorreactor

VI.- Resultados y Análisis




VI.1.- Caracterización de la levadura

VI.1.1 Caracterización morfológica

Se realizó la caracterización morfológica de la levadura para obtener las características físicas de las colonias de esta cepa.

Se puede observar en la tabla 2 que la morfología colonial de la cepa es diferente en los tres medios, ya que el tamaño de la colonia, sus bordes y forma fueron diferentes, por lo que su identificación en un futuro en estos tres medios será de ayuda.

Tabla 2) Resultados de la morfología de las colonias

Microorganismo y Medio	Forma	Elevación	Margen	Color	Brillo	Consistencia	Fotografía	Tamaño
Km24 (<i>Kluyveromyces marxianus</i>) Agar WL	Irregular	Papilada	Redondeada y lisa	Halos de color verde, verde claro y blanco	Opaca	Cremosa		Grande
Km24 (<i>Kluyveromyces marxianus</i>) Agar malta	Irregular y rizoide	Elevada y umbonada	Filamentosa	Halos de color blanco, transparente y blanco filamentoso	Brillosa	Cremosa		Mediana
Km24 (<i>Kluyveromyces marxianus</i>) Agar YPD	Irregular	Plana	Redondeada	Sin halos, color crema	Opaca	Cremosa		Grande

VI.1.2 Caracterización molecular de *Kluyveromyces marxianus*

VI.1.2.1 Extracción de ADN.

De la extracción de ADN genómico se obtuvieron 27 y 35 ng/μL de ADN ya que se realizó la extracción por duplicados.

VI.1.2.2 Identificación de *K. marxianus* mediante el análisis de la secuencia de la región ITS.

Los productos de la amplificación por PCR, fueron analizados por medio de una electroforesis en gel de agarosa como se muestra en la figura 19.

Amplificación de los ITS

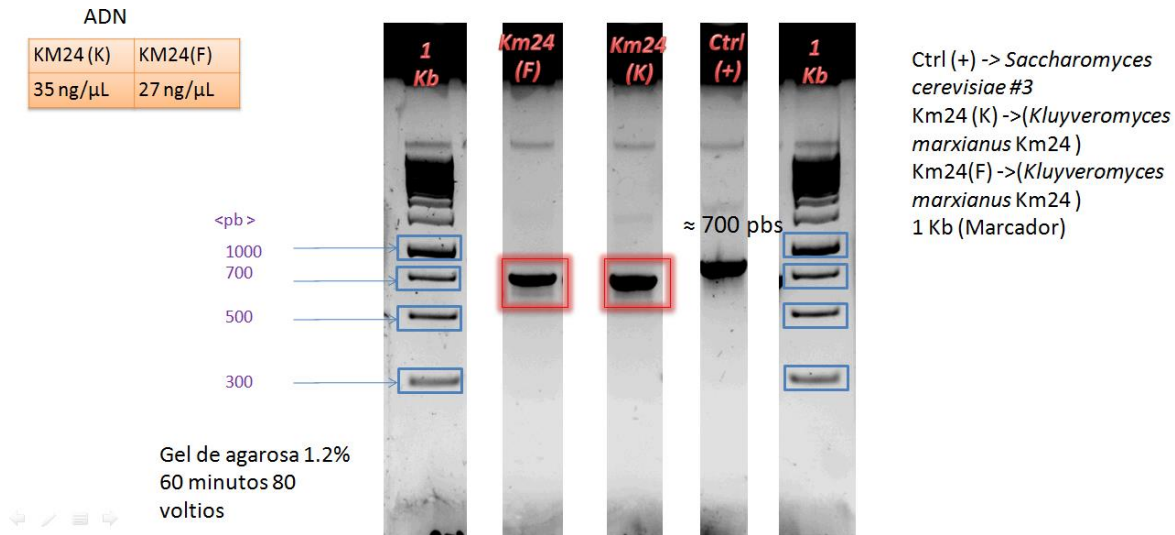


Figura 19) Electroforesis en gel de agarosa de la región ITS1-ITS2 de *Kluyveromyces marxianus* Km24

En el gel se muestra el control positivo, siendo la región ITS1-ITS2 de *S. cerevisiae*. Se puede observar claramente que la región de ITS de *K. marxianus*, es más pequeña, siendo de aproximadamente 700 pb, mientras que para *S. cerevisiae* es de 800 pb aproximadamente.

Se secuenció la región ITS1-ITS2, la secuencia completa se muestra en el anexo D.

Con esta secuencia se realizó un Blastn y un Dot-plot de la región ITS1-ITS2 de *K. marxianus* Km24, ambos arrojaron los resultados mostrados en la figura 20.

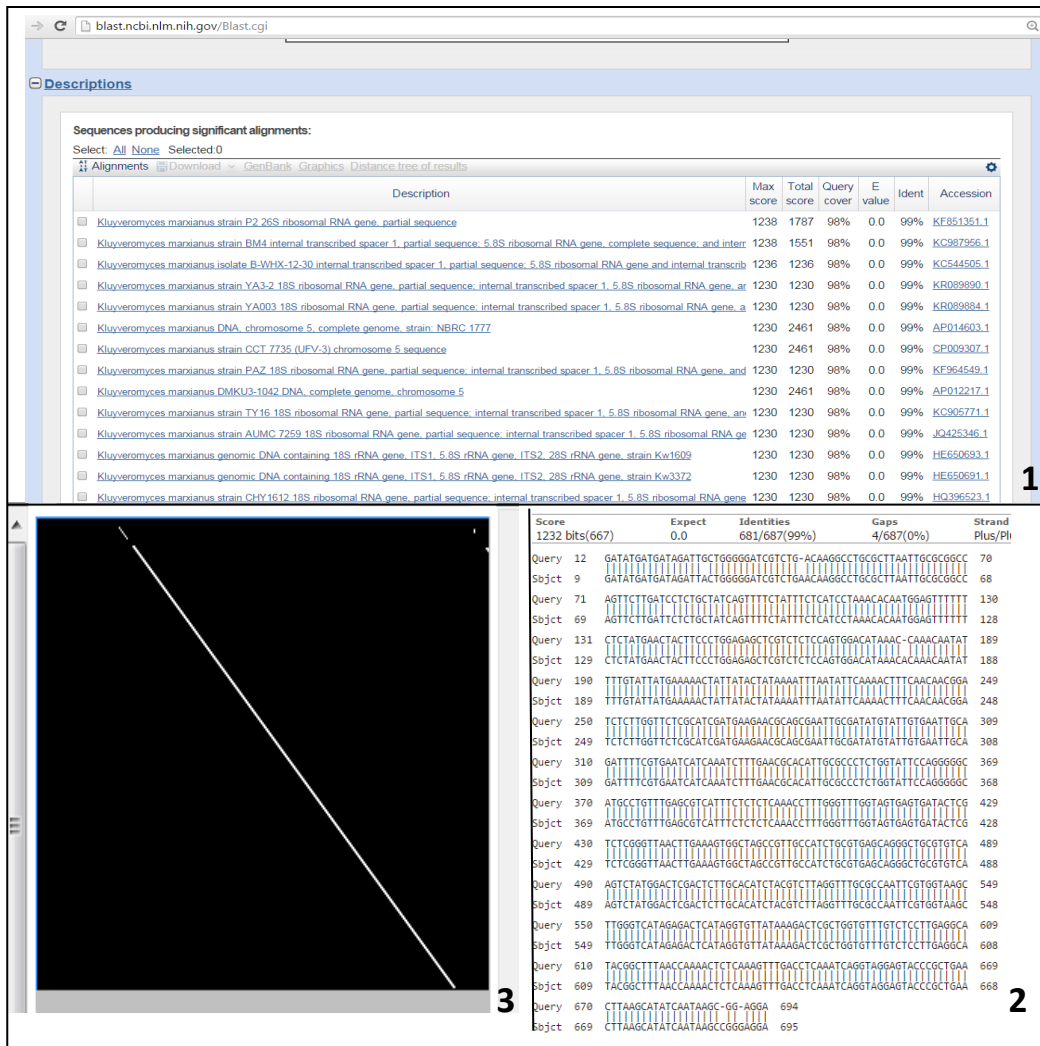


Figura 20) Resultados del Blastn y Dot-plot de la región ITS1-ITS2 de *K. marxianus* Km24

En la parte superior (imagen1), se observa el resultado obtenido del Blastn, en la imagen 2 se compararon las secuencias de Km24 y la secuencia más cercana arrojada por el Blastn (*K. marxianus* P2). En esta imagen se puede observar el alineamiento que se realizó y las bases que cambian en cada secuencia. En la imagen 3 se observa el Dot-plot, que es una comparación de las secuencias mostradas en la imagen 2 mediante una gráfica

Dentro del Blastn se observa que las secuencias arrojadas por la página del Centro Nacional para la Información Biotecnológica, (NCBI) por su nombre en inglés (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>), cubren el 98% de la secuencia arrojada y tienen un 99% de similitud teniendo 681 bases idénticas de las 687 y 4 espacios vacíos. En el Dot-plot, se puede observar que las secuencias de *K. marxianus* KM24 y la de *K. marxianus* P2

son homologas y que no se encuentran repeticiones tándem en la secuencia, ya que de contar con ellas se verían más líneas en el gráfico, así mismo se observa una zona negra que divide la línea blanca, esta es la parte en la que los nucleótidos cambian, el Dot-plot es un paso complementario al Blastn, ya que nos permite observar más cosas en la secuencia como lo son las repeticiones tándem.

VI.1.2.3 Identificación de *K. marxianus* mediante el análisis de los dominios D1-D2 del gen de la subunidad ribosomal grande.

Amplificación D1/D2

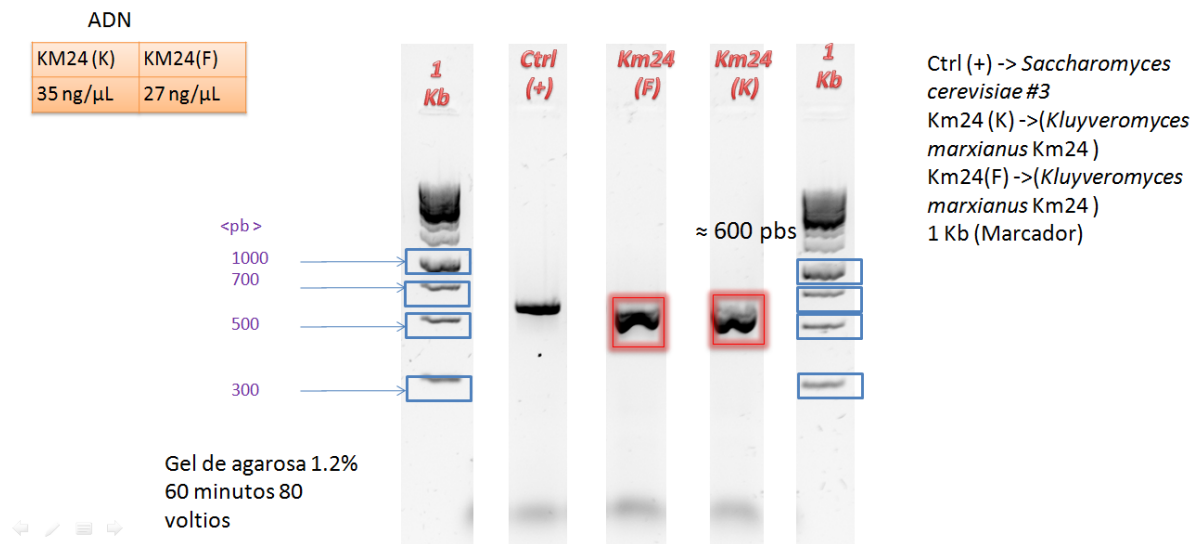


Figura 21) Electroforesis en gel de agarosa de los dominios D1/D2

En el gel de la región D1/D2 (figura 23), se observa que el fragmento obtenido es de 600 pares de bases para ambos incluyendo los duplicados, lo cual es normal debido a que contrariamente a los ITS que tienen longitudes diferentes dependiendo del género y especie el dominio D1/D2 es de tamaño invariable.

Se llevó a secuenciar al Instituto de Biotecnología de la UNAM IBT la secuencia de los dominios D1/D2 obteniendo como resultado la secuencia mostrada en el anexo D parte II.

A esta secuencia se le realizó también un Blastn y un Dot-plot para ver si se trataba de *K. marxianus* y que tan similar era la secuencia. En la figura 22. Se muestran los resultados obtenidos, en la parte superior, imagen 1 se observa el resultado

obtenido del Blastn. En la imagen 2 se compararon dos secuencias la de Km24 y la secuencia más cercana arrojada por el blastn de *K. marxianus* KMWZ; en esta imagen se puede observar el alineamiento que se realizó y las bases que cambian en cada secuencia, en la imagen 3 se observa el dot-plot, que es una comparación de las secuencias mediante una gráfica.

Dentro del Blastn se observa que las secuencias arrojadas por la página del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI) por su nombre en inglés (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) cubren el 100% de la secuencia arrojada lo que quiere decir que no tiene bases extras o menos y tienen un 100% de similitud teniendo 531 bases idénticas y sin espacios vacíos; el Dot-plot no nos muestra espacios vacíos en la continuidad de la línea, esto se debe a que las secuencias no tienen nucleótidos diferentes, de igual manera no se observan secuencias tándem en la comparación.

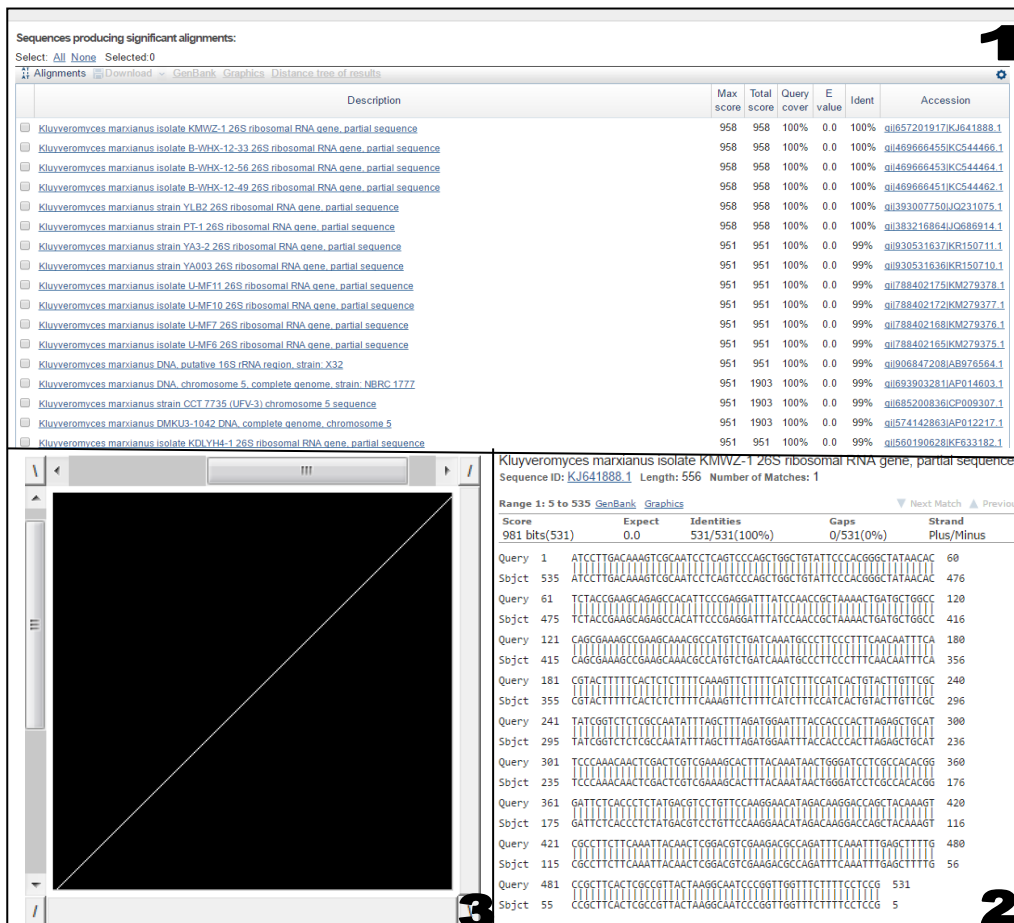


Figura 22) Resultados del Blastn y Dot-plot del dominio D1/D2 de la subunidad ribosomal grande de *Kluyveromyces marxianus* KM24

VI.2.- Caracterización del olote

VI.3.- Caracterización del olote pretratado

La caracterización del olote pretratado se realizó por técnicas gravimétricas para determinar celulosa, hemicelulosa, cenizas, humedad y lignina y por espectrofotometría para contenido de fenoles.

El contenido de humedad del olote fue de un 60%. Para el caso de fenoles, en la tabla 3 se muestran los resultados.

Tabla 3) Contenido fenólico del olote

Absorbancia final (720 nm)	mg de fenoles (200 mL) 1:5	[C] mg/L	mg de fenólicos en el olote (500 mg)	% (p/p) de fenólicos en el olote seco
2.61	22.316	111.583	5.579	2.789
2.55	21.803	109.019	5.450	2.725
2.47	21.120	105.600	5.280	2.640
2.495	21.333	106.668	5.333	2.666
2.66	22.744	113.720	5.686	2.843

Se obtuvo un promedio de fenoles del $2.73\% \pm 0.202$, que es un valor bajo, por ejemplo, el eucalipto (*Eucalyptus globulus*) tiene un 6.4 % de fenoles [40], el maple 15 % [41] y el roble 16 % [42]. El hecho de que el olote tenga un bajo contenido de fenoles es bueno para el proceso de fermentación, ya que se ha reportado que los fenoles pueden causar daño a los microorganismos generando alteraciones en las membranas por la disminución de lípidos y proteínas en estas [43].

En cuanto al tamaño de partícula se obtuvieron los siguientes datos mostrados en la figura 23.

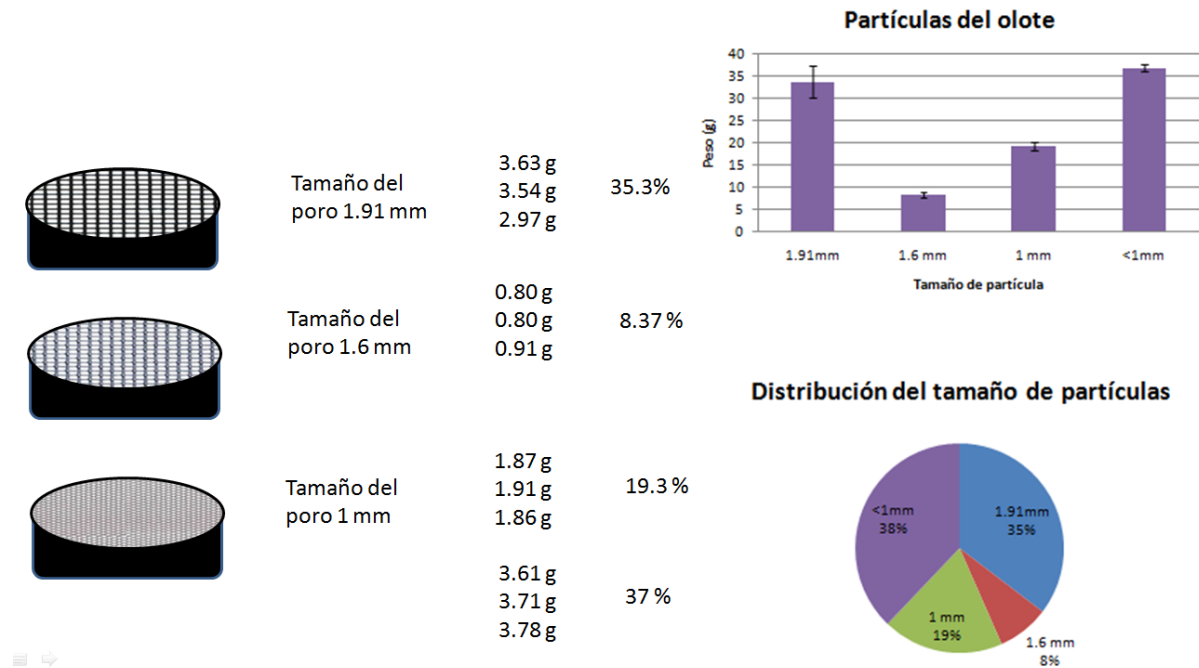


Figura 23) Distribución de tamaño de partículas del olote

Se puede observar que la mayor parte de las partículas del olote se encuentra en tamaños menores a 1 mm y mayores a 1.91mm, teniendo casi la misma cantidad en peso de partículas de tamaño grande y pequeño.

En cuanto al contenido de hemicelulosa, lignina, celulosa y cenizas se obtuvieron los valores mostrados en la tabla 4.

Tabla 4) Composición del olote pretratado

Componente	Porcentaje (p/p)
Celulosa	47.17± 2.82
Lignina	20.32± 3.81
Hemicelulosa	31.9± 1.28
Cenizas	0.6± 0.05

El contenido de celulosa fue alto, lo que permite que la carga de sólidos no deba ser tan alta para obtener grandes cantidades de glucosa. Los porcentajes de celulosa de algunos materias lignocelulósicas van de un 20 % a un 50 %, por ejemplo: para paja de trigo con pretratamiento de explosión de vapor se han reportado valores del 40.5 %

al 57% de celulosa ^[44], para residuos de fruta un 38% ^[45] de celulosa y en el caso de la yuca un 30% ^[46], con estos datos se pudieron realizar los cálculos para de carga de sólidos para obtener 50g/L de glucosa en el proceso de SSF.

Para el proceso se consideró un 80% de eficiencia de hidrólisis enzimática y se realizaron los siguientes cálculos para la determinación de la cantidad de lote pretratado que se requería para el proceso de SSF.

$$\text{Porcentaje de celulosa} * (\text{eficiencia de la hidrólisis}) = 47.17 * (0.8) = 37.73 \%$$

$$\frac{100 \text{ g de lote pretratado seco} * 50 \text{ g de celulosa}}{37.73 \text{ g de celulosa}} = 132.48 \text{ g de lote pretratado seco}$$

Obteniéndose como porcentaje de sólidos

$$13.248 \% \text{ de sólidos}$$

Todo esto considerando que la celulosa está constituida por unidades repetitivas de glucosa.

Con esto se obtiene que para un experimento de 100 mL se requieren 13.2 g de lote seco pretratado, lo cual corresponde a 33 g de lote húmedo.

VI.4.- Pruebas de tolerancia en medio sólido

Dentro de las pruebas se obtuvieron los siguientes resultados (tabla 5), los resultados con fotografías se incluyen en el anexo E. Estas pruebas permiten probar una variedad de condiciones e inhibidores y de esta manera determinar el crecimiento de la levadura en estas condiciones.

Tabla 5) Resultados de pruebas de inhibición en caja

(% p/p	Etanol				(% p/p	Glucosa				g/L	NaCl				g/L	Ácido acético				g/L	HMF				g/L	Furfural			
	30°C		42°C			30°C		42°C			30°C		42°C			30°C		42°C			30°C		42°C			30°C		42°C	
	24 h	96 h	24 h	96 h		24 h	96 h	24 h	96 h		24 h	96 h	24 h	96 h		24 h	96 h	24 h	96 h		24 h	96 h	24 h	96 h		24 h	96 h	24 h	96 h
0	+	+ -	+ -	++	0	+	+ -	+ -	++	0	+	+ -	+ -	++	0	+	+ -	+ -	++	0	+	+ -	+ -	++	0	+	+ -	+ -	++
2	+ -	++	+	+ -	30	+ -	+ -	+ -	++	25	+	+ -	+	+ -	0.625	+	+ -	+	+	0.95	+ -	++	+ -	+ -	0.95	+ -	+	+ -	+
5	+ -	++	- +	- +	40	+	+ -	+ -	++	37.5	-	- +	+	+ -	1.25	+	+ -	+	+	1.9	+	+ -	--	--	1.9	-	+	+ -	+
7.5	+	++	--	--	50	+ -	+ -	+ -	++	50	-	- +	- +	+	2.5	+	+ -	- +	+	2.85	+	+ -	--	--	2.85	--	+	--	--
10	--	- +	--	--	60	+	+ -	+ -	+ -	75	--	- +	--	--	3.75	--	+	--	--	3.8	- +	+	--	--	3.8	--	--	--	--
12	--	- +	--	--	70	+	+ -	+ -	+ -	100	--	--	--	--	5	--	+	--	--	5	--	- +	--	--	-	-	-	-	-
13	--	--	--	--	-	-	-	-	-	125	--	--	--	--	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
14	--	--	--	--	-	-	-	-	-	150	--	--	--	--	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

++ Diámetro de colonia de 1.5 a 2 cm

+ - Diámetro de colonia de 1.1 a 1.4 cm

+ Diámetro de colonia de 0.9 a 1 cm

- + Diámetro de colonia de 0.1 a 0.8 cm

-- Sin colonia

Dentro de estas pruebas se puede observar que *K. marxianus* KM24, tolera altas concentraciones de glucosa y que el tamaño de las colonias es mayor a 42°C en glucosa. También se puede apreciar que su comportamiento en etanol es mejor a 30°C que a 42°C, ya que en la primera crece hasta 7.5% mientras que en la segunda llega al 5%. En el caso de NaCl pasa lo mismo a 30°C la cepa logra crecer en 75 g/L y en 42°C sólo llega a 50 g/L.

Para el caso de ácido acético e HMF, se observa que la temperatura le afecta de una manera significativa: en el caso del ácido pasa de crecer en las 5 concentraciones en 30°C a sólo crecer en 4 a 42°C, para el HMF crece en 4 concentraciones a 30°C y sólo en 3 a 42°C, mientras que por último en el furfural crece en las mismas concentraciones, sin embargo, el tamaño de las colonias es mucho menor en 42°C.

Para el caso del furfural se ha demostrado que este compuesto aumenta la fase lag y es convertido por *K. marxianus* a furfural alcohol ^[47], logrando de esta manera que el compuesto no dañe el ADN, ARN y las proteínas celulares, lo que se muestra con el crecimiento de las colonias una vez que transcurrieron las 96 horas; en el HMF sucede lo mismo sólo que se convierte a furano 2, 5 dimetanol ^[48], en ambos casos la transformación del grupo aldehído es una solución metabólica para contrarrestar el efecto inhibitorio de los compuestos.

En todos los casos se observa que la tolerancia disminuye en la temperatura más alta, esto podría deberse a que valores elevados de temperatura pueden causar daños a la membrana y causar la desnaturalización de las proteínas, disminuyendo la viabilidad del cultivo ^[49].

VI.5.- Pruebas de tolerancia a ácido acético en medio líquido

Las pruebas de tolerancia al ácido acético se realizaron al ver que éste era de los que más inhibía la levadura en cajas y es el más abundante en el olote pretratado ya que cuenta con 5 g/L de ácido acético, por lo que se realizaron cinéticas en medio líquido para tener una idea más clara de la inhibición de la levadura, se utilizaron las temperaturas de 30°C y de 42°C que es la temperatura de crecimiento de las levaduras

mesófilas y 42°C que es la temperatura a la cual se llevará a cabo el proceso de SSF, el pH al cual se ajustó es 4.8 porque es el pH óptimo de la enzima.

Como resultados se tienen dos gráficas en las cuales se muestra el crecimiento de la levadura en dos temperaturas distintas (figura 24 y 25).

En la figura 24 se observa que el crecimiento de la levadura es mejor en los experimentos sin ajuste de pH. Sin embargo, en el caso de 3 y 6 g/L sin ajuste de pH, se muestra el efecto inhibitorio, en conjunto del pH bajo y del ácido acético ya que la baja en el crecimiento es notoria; en el caso de 3 y 6 g/L de ácido con ajuste de pH se observa un decremento en la velocidad de crecimiento como se muestra en la tabla 6, esto demuestra que el acetato inhibe el crecimiento de una manera pH dependiente, hasta que la mayoría de la población es resistente a estas concentraciones de acetato y llega a valores cercanos a los de los matraces sin ácido acético y acetato.

En la figura 25, que es a 42°C se observa que el comportamiento es semejante, la levadura crece de manera similar tanto en el pH ajustado a 4.8 como en el de 5.3, pero su velocidad de crecimiento es menor si se compara con la correspondiente a 30°C (tabla 6). Además la inhibición de la levadura es mayor, ya que con el pH ajustado sólo crece en 0 g/L y 3g/L y de igual manera el efecto inhibitorio pH dependiente del acetato se observa en la disminución de la velocidad de crecimiento, en la figura se muestra graficado $\ln(x)$ que es el logaritmo natural del crecimiento vs el tiempo medido en horas, como corresponde al modelo logístico de crecimiento.

Tabla 6) Velocidades de crecimiento en ácido acético

Velocidad de crecimiento (μ)		
	42°C	30°C
0 g/L sin neutralizar	0.24	0.35
0 g/L neutralizado	0.23	0.35
3 g/L neutralizado	0.22	0.24
6 g/L neutralizado	0.18	0.22

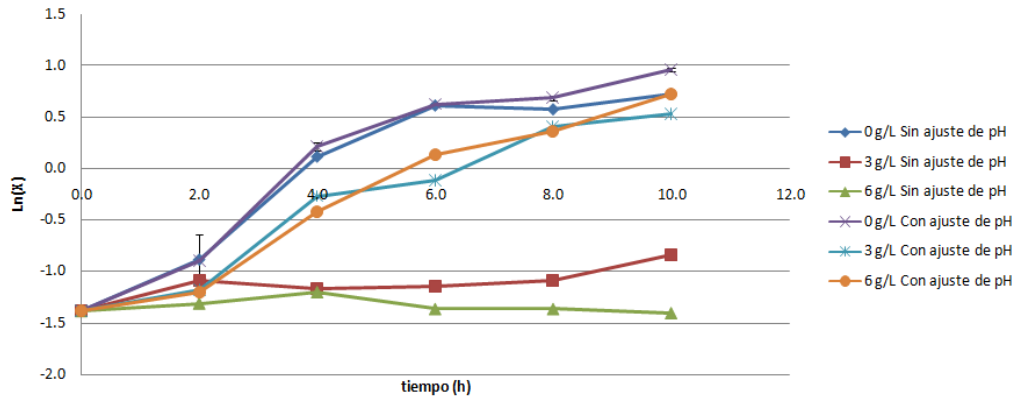


Figura 24) Gráfica de crecimiento de la levadura a 30°C con ácido acético con ajuste de pH a 4.8 y sin ajuste

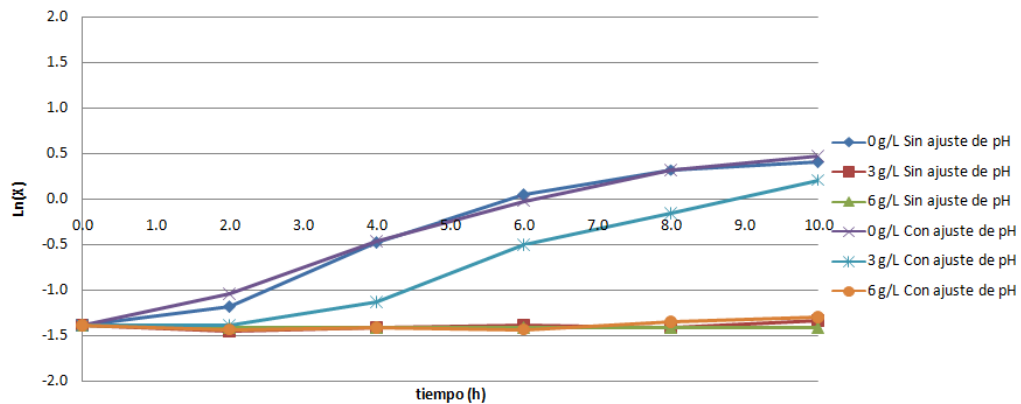


Figura 25) Gráfica de crecimiento de la levadura con y sin ajuste de pH a 42°C

Al comparar el desempeño de la levadura en cada concentración de ácido acético en las diferentes temperaturas se obtienen las siguientes gráficas.

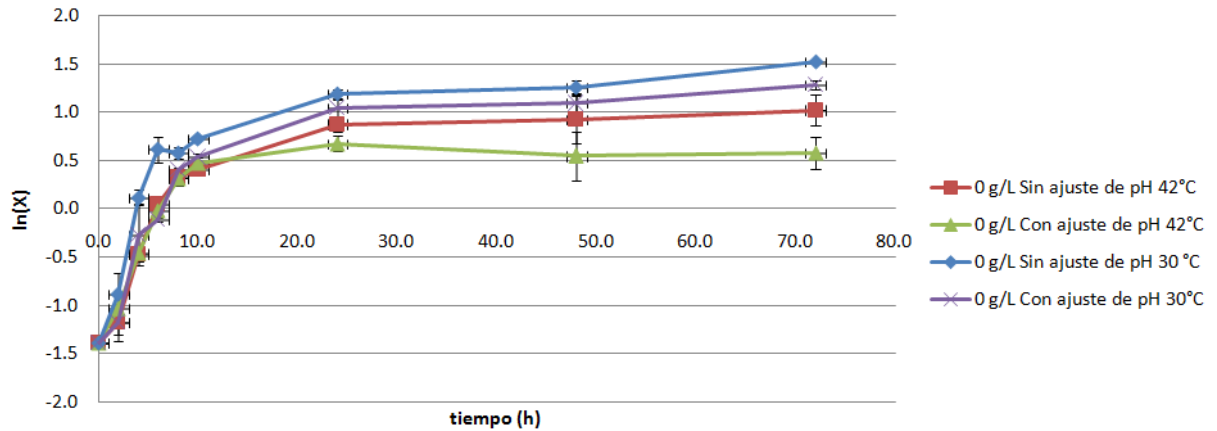


Figura 26) Gráfica de crecimiento de la levadura a 30°C y 42°C con y sin ajuste de pH

En la figura 26, puede observarse que el crecimiento de la levadura es mejor en el pH del medio de cultivo sin ajustar que es 5.3, mientras que con el ajuste a 4.8 su crecimiento es más lento, no llega a la misma absorbancia y su velocidad de crecimiento es menor, en cuanto a las temperaturas se observa que el crecimiento es mejor a la temperatura de 30°C en ambos casos, lo cual se puede deber a que el óptimo de la levadura está en temperaturas más bajas a 42°C.

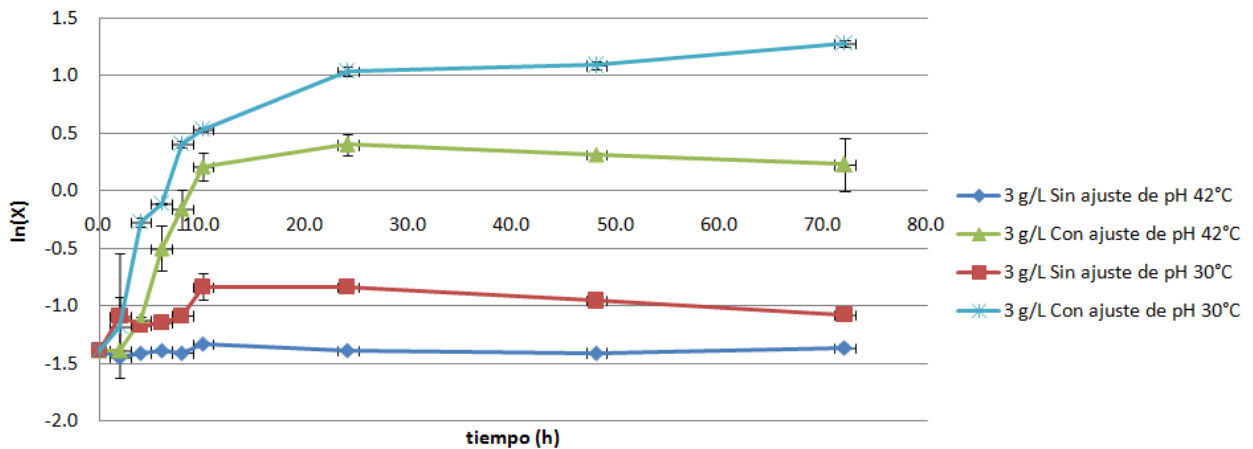


Figura 27) Gráfica de crecimiento de la levadura con 3 g/L de ácido acético a 30°C y 42°C con y sin ajuste de pH

Para el caso de 3 g/L de ácido acético (figura 27) se observa una mayor inhibición a 42°C que a 30°C y que la levadura sólo es capaz de crecer con el pH ajustado, mostrando la influencia del pH en la carga de la molécula y la influencia de la temperatura en el crecimiento de la levadura, al combinar ambos factores, la velocidad de crecimiento disminuye de 0.24 a 0.22 y no alcanzan la misma cantidad de biomasa final.

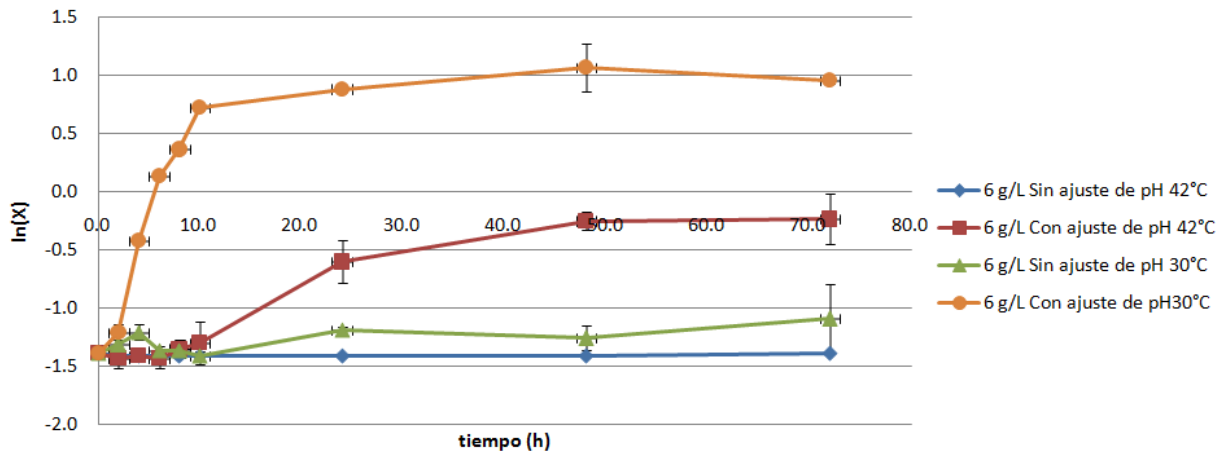


Figura 28) Gráfica de crecimiento de la levadura con 6 g/L de ácido acético a 30°C y 42°C con y sin ajuste de pH

En 6g/L de ácido acético (figura 28) con ajuste de pH se observa notablemente el efecto de la temperatura combinado con el efecto de inhibición del acetato puesto que la velocidad de crecimiento cambia de 0.22 a 0.18 y la cantidad final de biomasa es menor, en este caso se observa una fase lag de 10 horas (figura 25), hasta que las levaduras resistentes al acetato comienzan a crecer a partir de la hora 10.

Tabla 7) pH del medio de fermentación

	30°C						42°C					
Tiempo (horas)	0	3	6	0N	3N	6N	0	3	6	0N	3N	6N
0	5.3	3	2.8		4.8		5.3	3	2.8		4.8	
72	2.8	3	2.8	4.8	4.6	2.6	2.9	3	2.8	4.7	4.4	3.9

Los cambios en los resultados de los experimentos de 3 g/L y 6g/L con ajuste de pH y sin ajuste de pH se deben al pKa del ácido acético (figura 28) se muestra una gráfica con el valor de pKa del ácido acético que es 4.76, este es el pH al que hay tanta sustancia ionizada como sin ionizar, en el valor del pKa la mitad de las moléculas están en forma de ácido acético [50].

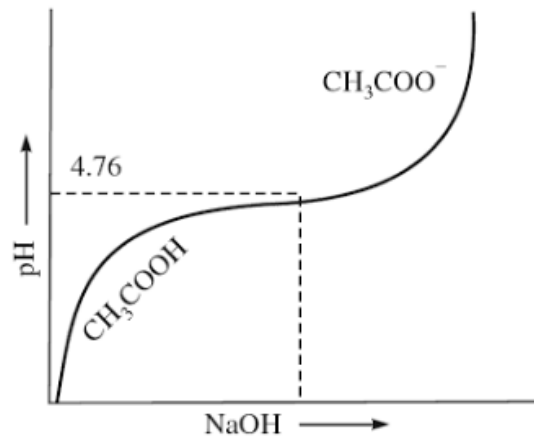


Figura 29) Curva de titulación del ácido acético

En la figura 31 se observa que en valores menores a 4 cerca del 90% existe como moléculas de ácido acético, mientras que al llegar a 4.76 (el valor del pKa) la mitad de las moléculas se encuentran en forma de ácido acético y la mitad en forma de acetato, conforme aumenta el pH aumentan el número de moléculas de acetato. El ácido acético es más dañino para las levaduras, por la permeabilidad que tiene en la membrana, permitiendo que entre al citosol sin problemas, convirtiéndose dentro de este en acetato, quedando atrapado dentro de las células y dañando los sistemas celulares [13].

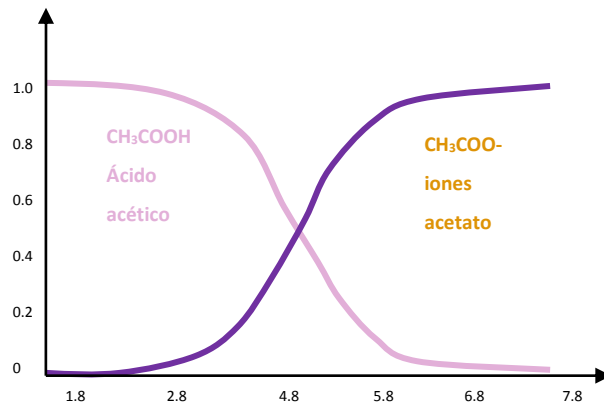


Figura 30) Relación del pH y el estado de la molécula de ácido acético

Se analizaron los metabolitos, mediante HPLC, obteniendo los resultados mostrados en la figura 32.

En la tabla 7, se muestran los rendimientos de producto sustrato ($Y_{p/s_{max}}$) y la productividad en g/L*h del etanol.

Tabla 8) Rendimiento y productividad de etanol de los experimentos de tolerancia a ácido acético

Temperatura	Experimento	$Y_{(p/s)_{max}}$	Productividad [g/L*h]
42°C	0 g/L sin ajuste de pH	0.50	0.7
	0 g/L con ajuste de pH	0.31	0.5
	3 g/L con ajuste	0.31	0.3
	6 g/L con ajuste de pH	0.41	0.4
30°C	0 g/L sin ajuste de pH	0.48	0.5
	0 g/L con ajuste de pH	0.38	0.4
	3 g/L con ajuste	0.40	0.4
	6 g/L con ajuste de pH	0.45	1.1

En 3 g/L y 6 g/L sin ajuste de pH a 30°C y a 42°C no se obtuvo etanol (figura 31), por lo que no se colocó en la tabla, se puede observar que la productividad más alta fue en 6 g/L de ácido acético con ajuste de pH a 30°C ya que produjo 25 gramos de etanol en 24 horas, mientras que la segunda mejor productividad fue en 0 g/L sin ajuste de pH a 42°C con 17.9 g/L de etanol en 24 horas, seguido por 0 g/L con ajuste de pH a 42°C con una producción de 25 g/L en 48 horas, se obtiene una mejor productividad debido a la velocidad de crecimiento de la levadura que es mayor a las obtenidas en 42°C.

En cuanto a rendimiento producto sustrato, la más alta es la de 0 g/L sin ajuste de pH a 42°C seguida de 0 g/L sin ajuste de pH a 30°C, obteniéndose un $Y_{ps_{max}}$ de 0.5 y 0.48 respectivamente ambas con un pH inicial de 5.3, lo cual muestra que el pH más alto mejora la producción de etanol a 42°C en el caso de esta cepa, en cuanto a los resultados más bajos se encuentran 0 y 3 g/L de ácido a 42°C, mostrando el efecto inhibitorio en conjunto del pH y la temperatura.

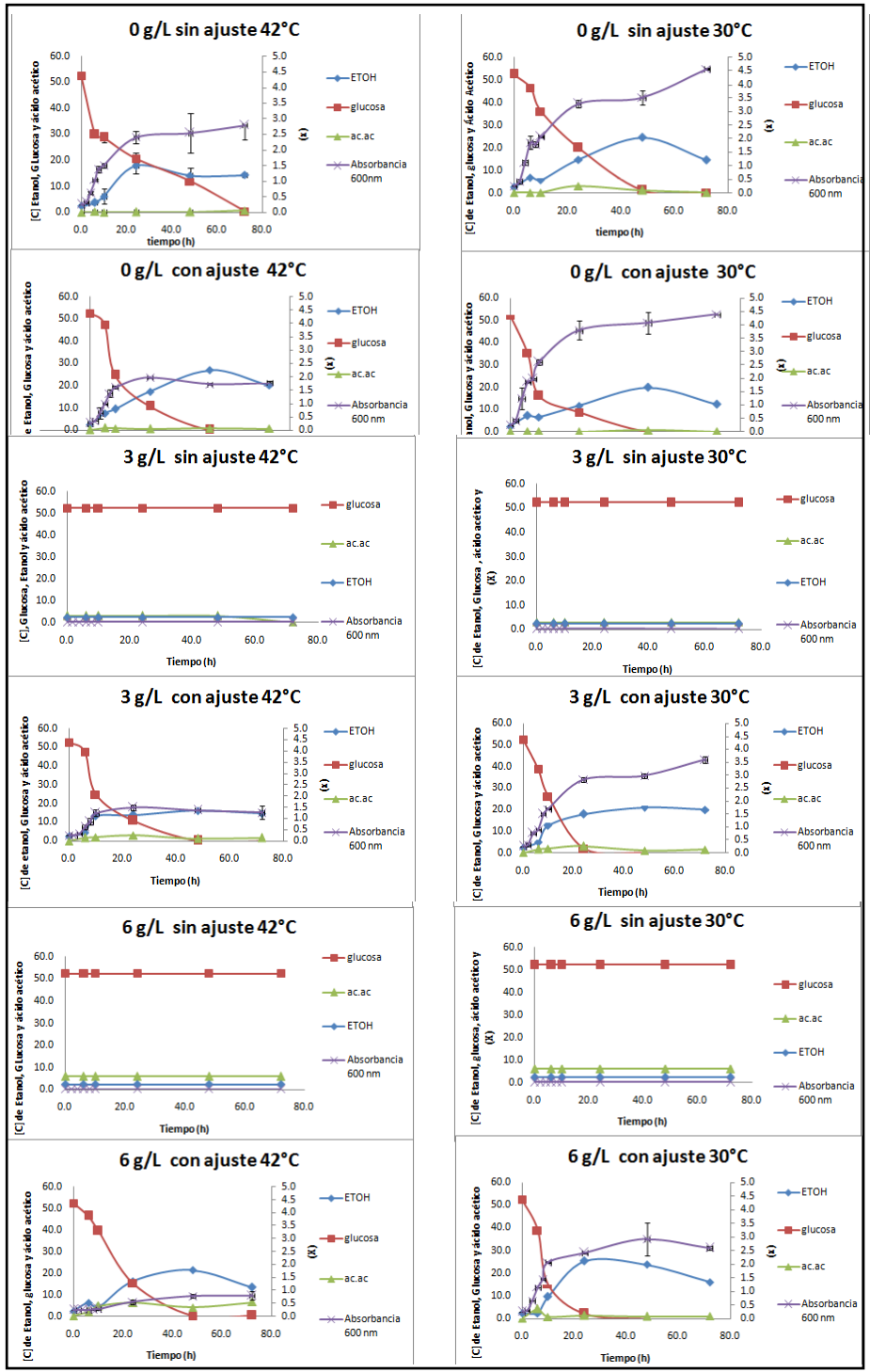


Figura 31) Análisis de metabolitos HPLC, consumo de glucosa y producción de etanol a 30°C y 42°C, en presencia y ausencia de ácido acético

VI.6.- Pruebas iniciales de fermentación en olote a 42°C

Se realizaron pruebas preliminares fermentación del olote, con y sin buffer de citratos para observar si se generaba algún efecto de inhibición de la levadura por algún componente del olote o del buffer. El experimento fue similar al proceso de SSF, pero sin la enzima y añadiendo 50 g/L de glucosa inicial, colocándose como un control la levadura sólo con medio, sin el olote; los resultados se muestran en la figura 33.

En la tabla 9 se muestra la producción de etanol a las 48 horas, se puede observar que en el olote con buffer la producción de etanol es mayor, seguido por el medio y con y sin buffer, la producción en el olote se puede deber a la complejidad del olote, ya que cuenta con vitaminas y minerales adicionales al medio de fermentación, siendo este un medio más complejo y completo para la levadura

En la figura 32 se observa el comportamiento a lo largo de 72 horas, tiempo propuesto para el proceso de SSF, los experimentos con olote no cuentan con medición de biomasa por densidad óptica ya que el olote interfiere en esta medición.

Tabla 9) Producción de etanol en olote y medio de fermentación

	Etanol [g/L]	Tiempo [horas]
Olote con buffer	15	48
Olote sin buffer	8	48
Medio sin olote y sin buffer	13	48
Medio sin olote y con buffer	12	48

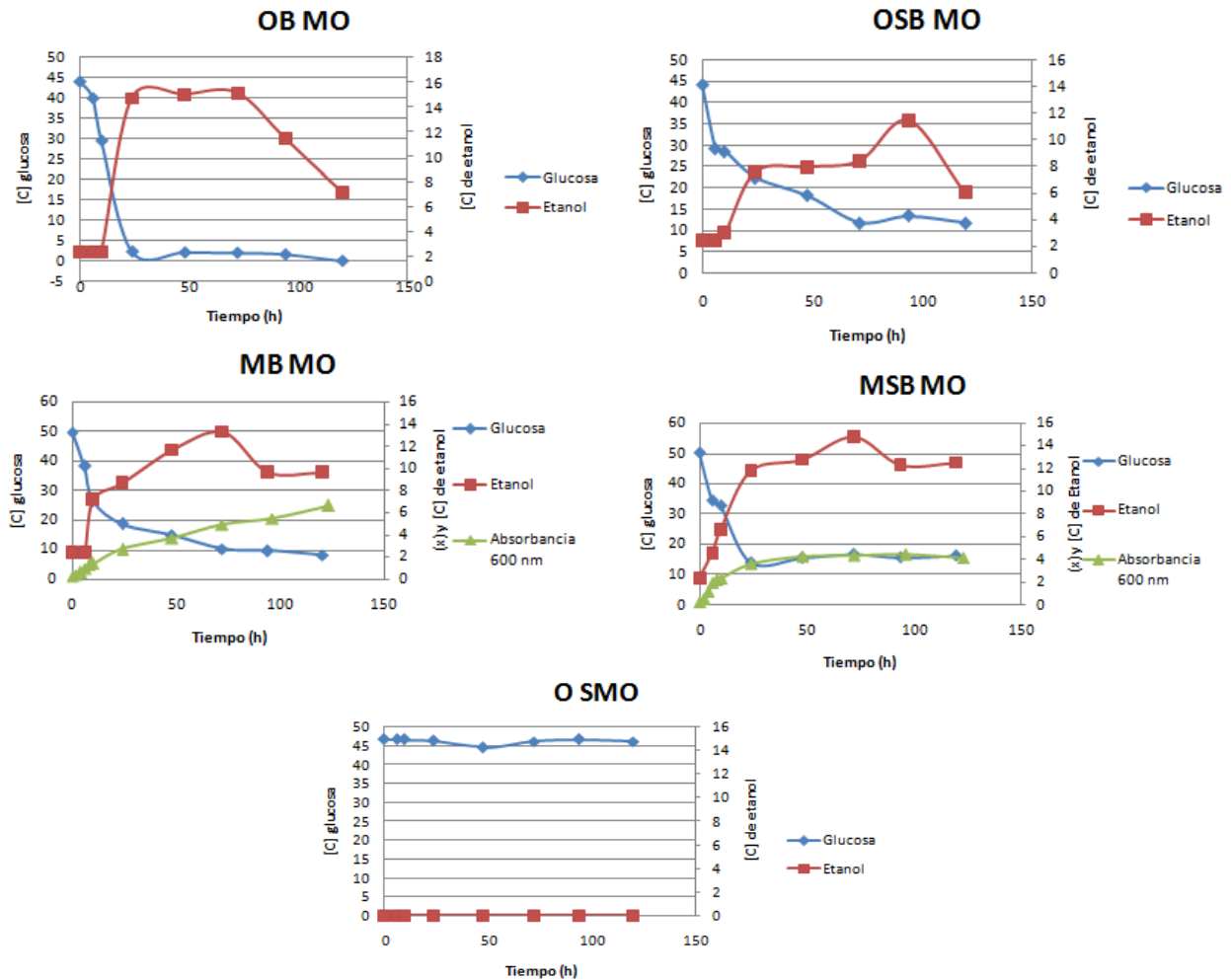


Figura 32) Resultados de las pruebas preliminares para la SSF

OB MO, es el olote con buffer y microorganismo, OSB MO es olote sin buffer y con microorganismo, MB MO es medio de fermentación con buffer y microorganismo, MSB MO es medio de fermentación sin buffer y con microorganismo, O SMO es olote sin microorganismo y sin buffer, OB MO es el olote con buffer con microorganismo.

En la tabla 10 se muestran los rendimientos y productividad de etanol en los 5 casos, se puede observar que el mejor rendimiento lo tiene el medio sin buffer con microorganismo. Sin embargo, la mejor productividad está dada por el olote con buffer y microorganismo, ya que produce 15 gramos de etanol en 48 horas y aún le quedan 2 gramos de glucosa, mientras que el olote sin buffer y microorganismo produce 14.7 gramos de etanol en 72 horas, pero con 16.8 gramos de glucosa hasta ese momento.

Tabla 10) Rendimiento y productividad de etanol en las pruebas preliminares de SSF sin enzima

	$Y_{(p/s)max}$	Productividad (g/(L*h))
MSB MO	0.44	0.20
OSB MO	0.31	0.12
MB MO	0.33	0.18
OB MO	0.31	0.31
O SMO	-	-

En la figura 33, se muestran algunas imágenes del experimento, donde se observan cambios físicos en el olote, debido a variaciones en el pH, así como la diferencia en la turbidez en los matraces. Del lado derecho de la figura se muestra el medio sin levadura, con levadura y buffer y con levadura sin buffer, del lado izquierdo se muestra lo mismo, pero con olote y en la tabla 8 se muestra el pH inicial y final de los matraces.

El color del olote con y sin buffer es diferente, el primero es ligeramente naranja y el segundo es negro, debido a los efectos del pH en el olote, entre más básico es el pH el olote se hace más café y entre más ácido se hace más rojo. Para el caso del medio con buffer y sin buffer durante las primeras 48 horas el experimento sin buffer tenía una mayor densidad óptica, incluso llegó a duplicar al que tenía buffer, pero al transcurrir el tiempo y llegar a las 72 horas el que no contaba con buffer disminuyó su crecimiento, esto posiblemente por el efecto del pH del medio en la levadura ya que sin un buffer no se cuenta con un control para evitar que baje de manera drástica.

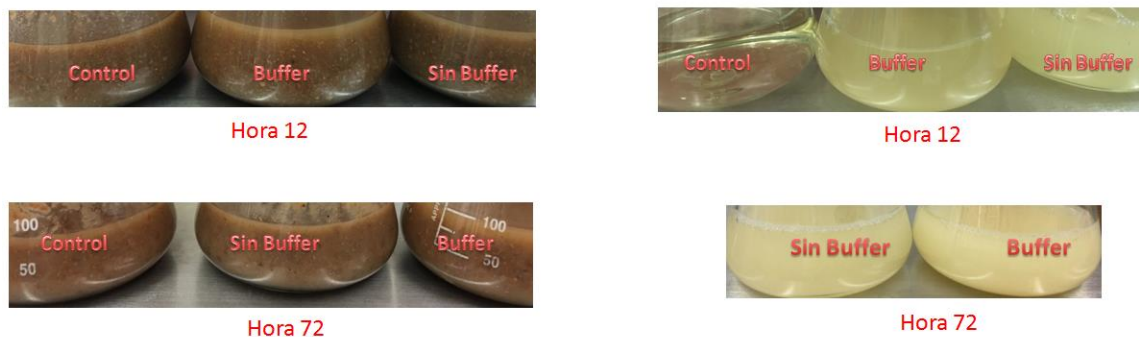


Figura 33) Crecimiento de la levadura en los matraces con buffer y sin buffer

En la tabla 11, se muestran los valores de pHs iniciales y finales de las pruebas. Se puede observar que sin buffer el cambio en el pH es mayor ya que baja casi 3 unidades, mientras que con el buffer.

Tabla 11) pH inicial y final de las pruebas preliminares de SSF sin enzima

Tiempo	Olote			Medio de Fermentación		
	Control	Buffer	Sin Buffer	Control	Buffer	Sin Buffer
0 horas	4.8	4.8	5.3	4.8	4.8	5.3
72 horas	4.8	4.3	3	4.8	4.3	2.8

VI.7.- Pruebas preliminares de hidrólisis enzimática

Estas pruebas se llevaron a cabo para determinar la actividad de la enzima con el sustrato, el medio de cultivo y buffer, para probar si los componentes de estos no bajaban su actividad, así como para probarla a una temperatura más baja de su óptimo y determinar cuánto bajaba la eficiencia de hidrólisis, los resultados se muestran en la figura 34.

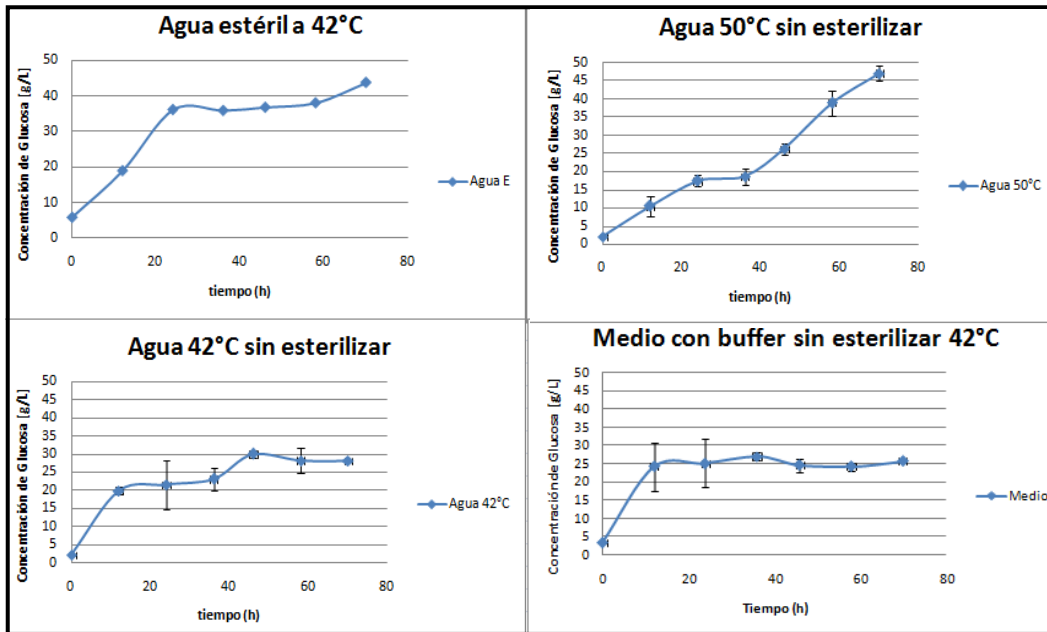


Figura 34) Resultados de las pruebas preliminares de hidrólisis enzimática

En las gráficas se puede observar que el rendimiento de la enzima es mejor en el agua a 50°C llegando a 47 g/L de glucosa esto debido a que es la temperatura óptima reportada. En la figura 35 se muestra la gráfica de rendimiento de acuerdo a la temperatura proporcionada por Novozymes; así mismo, se puede observar que al esterilizar el olote y llevar a cabo la hidrólisis enzimática a 42°C el rendimiento es mejor teniendo 28 y 44 g/L de glucosa (gráfica agua estéril a 42°C), esto se debe que las temperaturas altas siguen degradando la estructura del olote y liberan azúcares, facilitando el trabajo a la enzima.

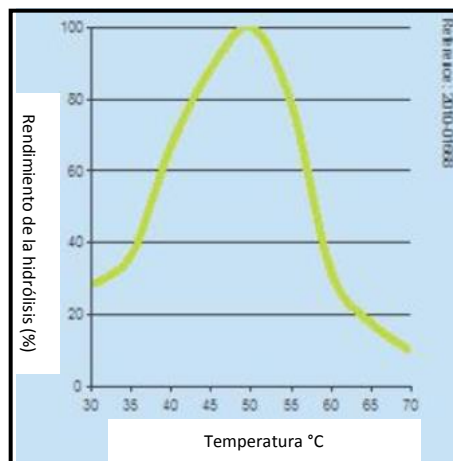


Figura 35) Gráfica de rendimiento vs temperatura de la enzima Cellic® Ctec2

En cuanto al olote en el medio de fermentación sin esterilizar (figura 34) se puede observar que sólo llega al 50% de la hidrólisis teórica obteniendo 25 g/L de los 50 g/L calculados.

Estos resultados se complementaron con la caracterización del olote sobrante, se secó a 60°C durante 48 horas y mediante las técnicas gravimétricas anteriormente descritas se obtuvieron las concentraciones de celulosa mostradas en la tabla 12.

VI.8.- Proceso de Sacarificación y Fermentación Simultáneos en matraz

Se realizó el experimento de SSF en matraz con olote molido y sin moler a 42°C para observar los cambios que se tenían en cada uno de los casos.

En la figura 36, se observa el comportamiento en ambos casos mediante el análisis cuantitativo de glucosa y etanol durante las 72 horas.

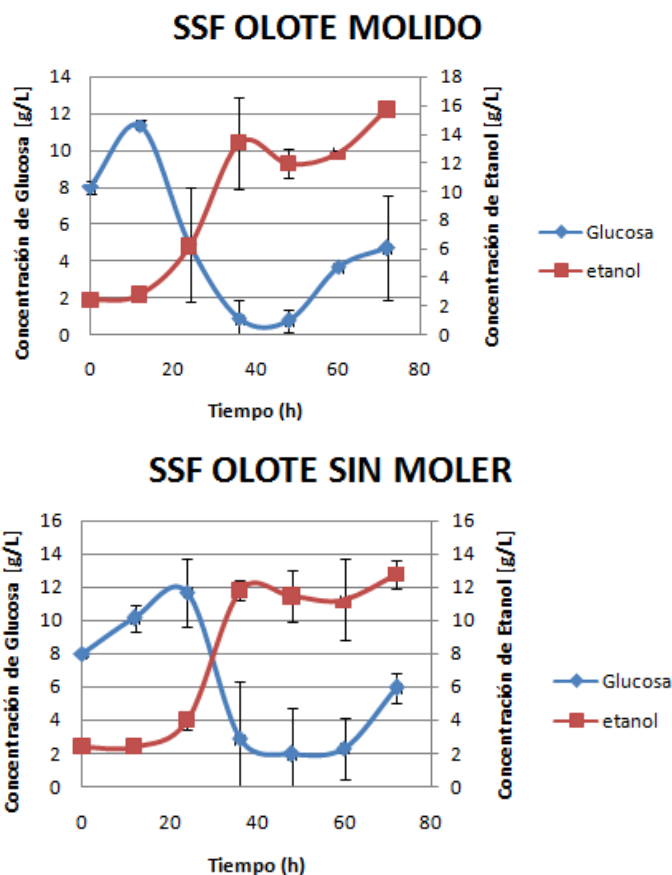


Figura 36) Cinética de SSF en matraz con olote molido y sin moler

El comportamiento en ambos casos fue similar. Sin embargo, en el caso del olote molido se llega a una concentración de 16g/L de etanol mientras con olote sin moler se llegó a 13 g/L; también se puede observar que el olote molido la concentración de etanol fue notoriamente mayor desde las primeras 24 horas, esto se debe al tamaño de las partículas, al ser más pequeñas es más fácil que la enzima pueda realizar la hidrólisis enzimática de la celulosa, debido a que se disminuye la complejidad de las estructuras al cambiar su tamaño.

El etanol obtenido con el olote molido fue de 15.66 g/L en 72 horas, con una productividad de 0.21 g/(L*h), mientras que para el olote sin moler fue de 12.79 g/L de etanol en 72 horas y 0.17 g/(L*h), teniendo mejores resultados en el experimento con olote molido.

En la figura 36, también se puede observar que el tamaño en las barras de error es grande mayor a 3 unidades en ambos casos, esto se debe a que el material no es totalmente homogéneo, lo que dificulta la toma de las muestras y el mezclado del material ya que se trata de un material heterogéneo.

Una vez terminado el experimento, se tomó todo el material restante, se dejó secar a 60°C durante 48 horas y se hizo la caracterización del material, para poder observar las variaciones en la composición final y tener un balance de materia más completo, en la tabla 12 se muestran los resultados obtenidos.

Tabla 12) Resultados de celulosa y glucosa liberada, obtenidos por técnicas gravimétricas

Muestra	% Celulosa final	Glucosa liberada (g)
Olote molido con microorganismo y enzima	31.13	46.78
Olote sin moler con microorganismo y enzima	31.88	44.60
Enzima con olote sin microorganismo	29.81	42.96
Enzima con olote molido sin microorganismo	29.28	45.08

Se puede observar que el microorganismo con la enzima mejora los rendimientos de esta a 42°C ya que aumenta dos unidades en el porcentaje de la celulosa final y en de la glucosa liberada, lo que demuestra que mejora el rendimiento de la enzima en presencia del microorganismo, siendo esta una ventaja del proceso de SSF.

VI.9.- Proceso de Sacarificación y Fermentación Simultáneo en biorreactor

Para esta parte se realizaron los cálculos para realizar el escalamiento de matraz a un biorreactor, al tratarse de una fermentación anaerobia se utilizó el número de Reynolds y no el K_{La} .

Se realizaron mediciones de viscosidad del olote a diferentes tiempos con un viscosímetro capilar de Cannon Fenske obteniendo los siguientes resultados, mostrados en la tabla 13, donde se tomaron muestras a las 0, 36 y 72 horas, para medir la viscosidad en estos 3 tiempos del proceso (inicio, parte media y final del proceso de

SSF). Para el caso de 0 horas sólo se midió la viscosidad del caldo, ya que las partículas eran demasiado grandes para pasar por el viscosímetro.

Tabla 13) Resultados de la viscosidad del olote en diferentes tiempos, mostrados en centistokes

Olote molido				Olote sin moler					
	segundos	factor de conversión	cSt	Muestra		segundos	factor de conversión	cSt	Muestra
1	2.83	0.5	1.415	tiempo 0h caldo	1	2.95	0.5	1.475	tiempo 0h caldo
2	2.88	0.5	1.44		2	2.86	0.5	1.43	
3	2.29	0.5	1.145		3	2.76	0.5	1.38	
4	2.78	0.5	1.39		4	2.84	0.5	1.42	
1	3.37	0.5	1.685	tiempo 36 h	1	3.45	0.5	1.725	tiempo 36 h
2	3.2	0.5	1.6		2	3.47	0.5	1.735	
3	3.35	0.5	1.675		3	3.44	0.5	1.72	
4	3.42	0.5	1.71		4	3.32	0.5	1.66	
1	3.83	0.5	1.915	tiempo 72 h	1	3.58	0.5	1.79	tiempo 72 h
2	3.76	0.5	1.88		2	3.62	0.5	1.81	
3	3.55	0.5	1.775		3	3.77	0.5	1.885	
4	3.69	0.5	1.845		4	3.63	0.5	1.815	

Donde OM 0 es olote molido tiempo 0 horas, OM 72 es olote molido tiempo 72 horas, OM 36 es olote molido tiempo 36 horas, O 0 es olote tiempo 0 horas, O 72 es olote tiempo 72 horas, O 36 es olote tiempo 36 horas y el factor de conversión viene con el viscosímetro.

Tabla 14) Valores para calcular el número de Reynolds

	ρ (kg/m ³) Densidad	η (cp) Viscosidad	Re Reynolds	diámetro del líquido (m)
OM 0	1020.66	1.41	13489.20	0.075
OM 72	1016	1.87	10162.60	rps
OM 36	1012.66	1.73	10964.91	3.33
O 0	1015.33	1.44	13204.22	diámetro del impulsor (m)
O 72	1018	1.68	11295.18	0.06
O 36	1018.66	1.84	10330.57	

$$Re_{matraz} = \frac{N \cdot d^2_{del\ líquido} \cdot \rho}{\eta} = Re_{reactor}$$

$$N_{reactor} = \frac{\eta \cdot Re_{matraz}}{d^2_{impulsor} \cdot \rho}$$

La viscosidad medida no fue diferente por lo tanto el valor de velocidad de agitación fue similar en todos los casos teniendo 5.20 rps o 312.5 rpm.

Los resultados de cuantificación obtenidos en el HPLC para etanol, glucosa y glicerol se muestran en la figura 37.

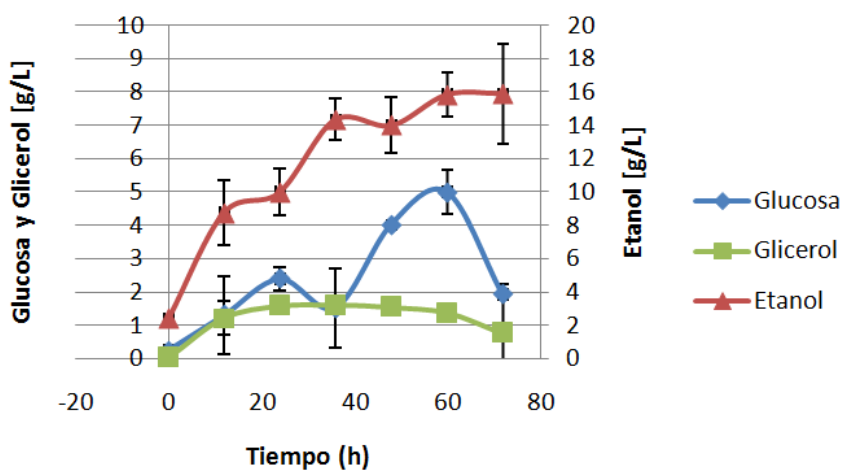


Figura 37) Cinética de SSF en un biorreactor de 2.5 L

La productividad fue de 0.22 g/(L*h) ya que se producen 16 gramos de etanol en 72 horas. En este gráfico se puede observar que la producción de etanol es más rápida que en el matraz debido a que la agitación es menos homogénea en un matraz con agitación orbital a un biorreactor con impulsores y baffles. Sin embargo, también la producción de glicerol aparece en este caso, a pesar de que no es mucho, es un subproducto no deseado en este proceso. Esto se debe al papel fisiológico del glicerol de mantener el equilibrio redox para el sistema coenzimático NAD⁺/NADH.

Componentes.

Tabla 15) Glucosa y lignina en el residuo de olote después de la SSF

	Glucosa liberada [g]	Desviación (+/-)	% de lignina final	Desviación (+/-)
biorreactor	45.4	0.1	43.5	3.8

En la tabla 15 se observa que el porcentaje de lignina aumenta, esto es debido a que se concentra más la lignina en el olote porque se degrada la celulosa y la hemicelulosa en azúcares, los cuales no son cuantificados por este método por ser solubles. También se observa que el porcentaje de celulosa baja y el valor de la glucosa liberada es cercano al que se calculó para ser liberado con un 90% de eficiencia de la hidrólisis, el cual era de 50 g/L.

VI.10.- Infrarrojos de lignina y celulosa

Los residuos de los procesos SSF e hidrólisis se analizaron con la finalidad de comprobar que se obtenía lignina y celulosa final y determinar si existían cambios en las estructuras como agua adsorbida y enlaces intramoleculares, después de cada proceso. Para de esta forma saber si existían diferencias significativas en un material molido y sin moler, porque para una escala industrial una operación unitaria significa ahorro de tiempo y energía.

El olote sobrante de la hidrólisis enzimática y del proceso SSF, se procesó por técnicas gravimétricas para la obtención de lignina y celulosa residuales en este. Una vez obtenidas la lignina y celulosa, se analizaron por espectrometría de infrarrojo para observar si existían diferencias entre cada una. Los resultados de los espectros infrarrojo de lignina se muestran en la figura 39 y los grupos funcionales asignados se muestran en la tabla 16. Las marcas A, I y Q representan el grupo hidroxilo, mientras que C, D, I y K a los grupos metilo y metileno.

Las vibraciones de los aromáticos en B, G, H, J y R. El guayaquil y siringil se observan en L, N, O y T (siringil) y M, Q y S (guayaquil), estas están interconectadas por grupos éter, mostrados en la señal P, esta lignina produce grupos carbonilo

mostrando la señal E; finalmente, la señal F es para los grupos aril cetona sustituidos en la posición 3.

En la figura 39 se pueden observar las diferencias entre cada espectro, en el caso de todos los espectros de olote sin moler se puede observar que la señal A es más grande, lo cual se debe a los enlaces intramoleculares de hidrógeno, por lo que se puede asumir que el cambio en el área de la señal se debe a que en el olote molido, se cambia la estructura de la lignina al molerla, reduciendo el número de enlaces hidrógeno, siendo esto debido a que en el olote molido la lignina se encuentra más expuesta y puede ser degradada.

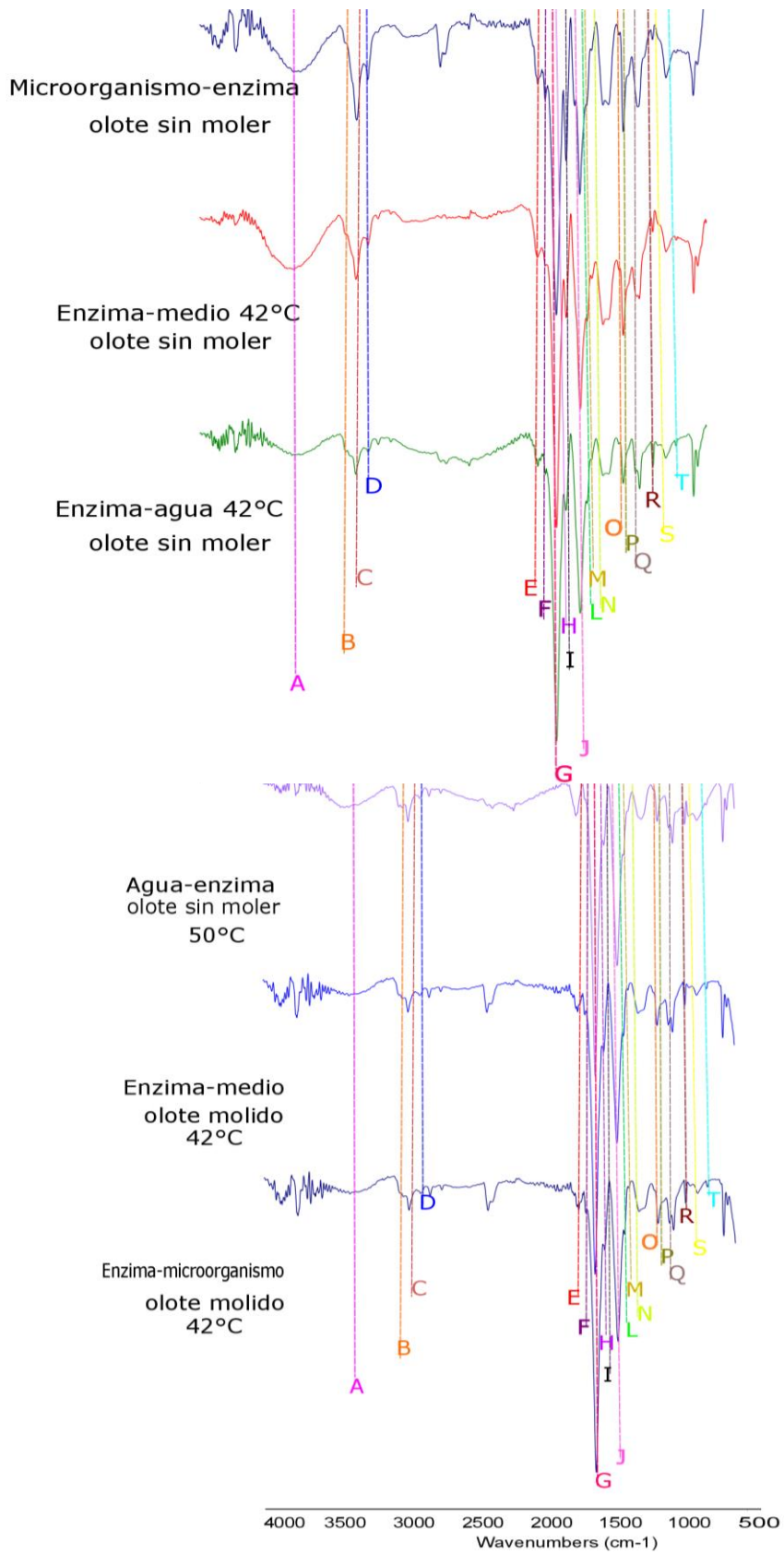


Figura 38) Infrarrojos de lignina residual

Tabla 16) Grupos funcionales del bagazo de caña, maíz y del olote final para lignina

señal	Bagazo de la caña [39]	Maíz blanco [39]	L1	L2	L3	L4	L5	L6	Asignación [39]
A	3404.44	3360.79	3363 (pequeño)	3353	3355	3363 (pequeño)	3363	3398	v-OH
B	3001.12	3080.72	3003	3006	3003	3003	3003	3003	v C-H Sistema polinuclear
C	2934.77	2933.13	2933	2931	2925	2933	2930	2933	v C-H simétrico; en CH3 y- CH2 -
D	2848.67	2879.20	2849	2850	2850	2849	2849	2850	v C-H asimétrico; en CH3 y- CH2 -
E	1702.98	1706.60	1700	1702	1700	1700	1701	1702	v - C=O ácido carboxílico
F	-	1644	1649	1650 (pequeño)	1650	1649	1650	1656 (pequeño)	v - C=O Grupos carbonilo en aril cetonas p-sustituidas conjugadas
G	1593.21	1599.14	1574	1575	1574	1573	1576	1572	Características de los anillos aromáticos debido a las vibraciones aromáticas esqueléticas
H	1511.15	1512.09	1510	1509	1508	1512	1509	1511	
I	1460.17	1458.35			1450				δ-CH2, δ-OH
J	1420.04	1420.62	1414	1414	1416	1414	1415	1413	Características de los anillos aromáticos debido a las vibraciones aromáticas esqueléticas
K	-	1371.14	1366	1368	1368	1368	1363	1366	C-H alifático en CH3
L	1330.80	1331.61	1339	1334	1331	1324	1324	1324	Anillo de siringilo breathing con v - C-O
M	1264.81	1263.49	1259	1260	1259	1261	1259	1240	Anillo guayaquil breathing con v - C-O
N	1228.56	-	1220 (pequeño)	1220 (pequeño)	1222	1220	1220	-	Anillo de siringilo breath
O	1123.66	1126.61	1123	1123	1122	1123	1122	1123	C-H aromático en deformación plana de

									tipo siringil
P	-	1086.69	-	-	1083	-	1083	-	v (C-O-C) éter
Q	1032.78	1039.78	1039	1036	1025	1041	-	1040	Siringil C-H aromático en deformación plana tipo guayaquil y deformación C-O de alcohol primario
R	929.77	-	922	924	917	922	923	924	- HC = CH - deformación del plano
S	885.89	893.84	893	893	893	893	893	893	δ C-H fuera de la vibración plana en unidades guayaquil
T	834.61	832.60	835	833	833	836	832	835	δ C-H de vibración plano en la posición 2 y 6 de las unidades de siringil

En el caso de la celulosa, los resultados se muestran en la figura 40 y los grupos funcionales asignados se muestran en la tabla 17; Las marcas A, M, N pertenecen al grupo hidroxilo de los alcoholes primarios y secundarios característicos. El grupo metileno está presente las señales B, C, G, H. Mientras que K, L y O, son pruebas de la glucosa que forma el polisacárido son las señales, D y G muestran agua en la estructura de la celulosa. Las señales en E, I y P son la presencia de lignina residual en la estructura.

En la figura 40, se pueden observar los cambios en los IR, entre los más notables es el cambio de área en la señal G, la cual tiene un área de mayor tamaño comparado con los otros IR, esta señal pertenece a δ -CH₂, δ -OH, también se puede observar que la señal D, que es el agua adsorbida, desaparece a 50°C en el olote sin moler y en los demás casos de olote sin moler es pequeña, caso contrario a los de olote molido, esto se puede deber a la estructura, ya que el olote molido tiene un empaquetamiento menos denso y permite que se acomoden más moléculas de agua.

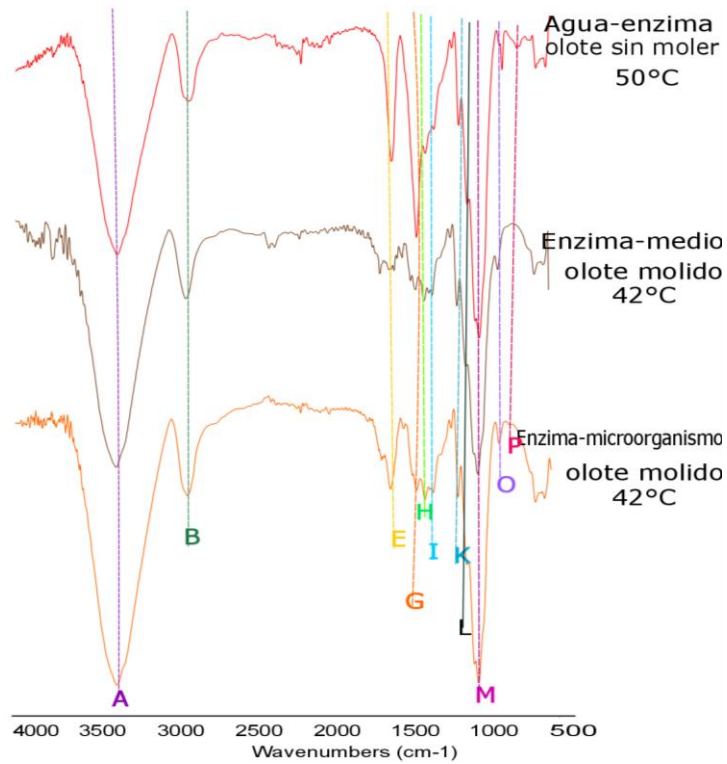
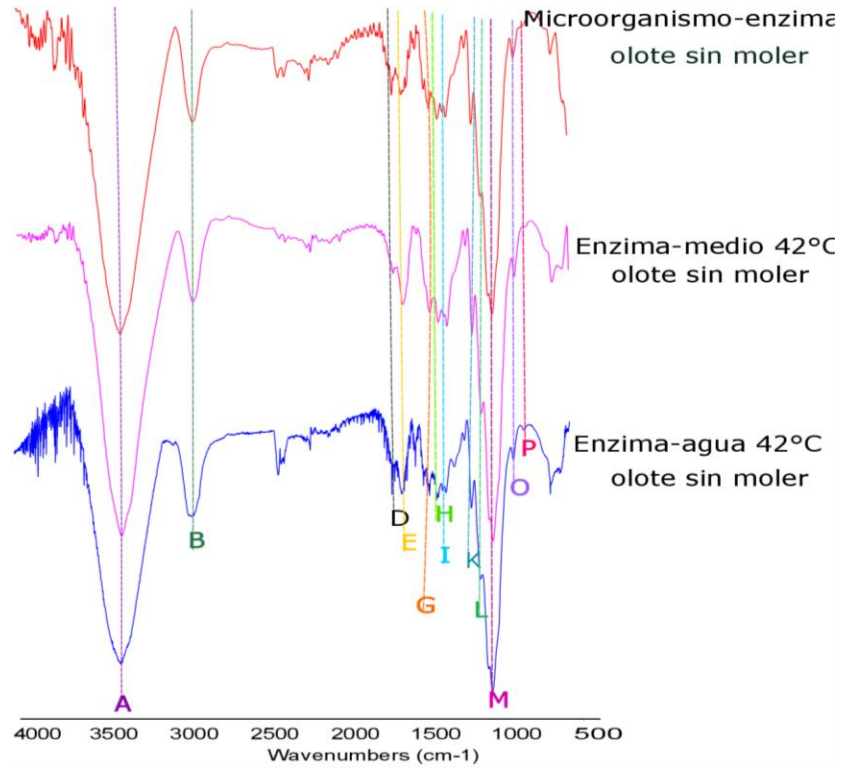


Figura 39) Infrarrojos de celulosa residual

Tabla 17) Grupos funcionales del bagazo de caña, maíz y del olote final para celulosa

Señal	Bagazo de la caña ^[39]	Maíz blanco ^[39]	C1	C2	C3	C4	C5	C6	Asignación ^[39]
A	3377.03	3411.68	3393	3333	3336	3339	3334	3342	v-OH
B	2916.72	2902.51	2914	2892	2887	2890	2892	2886	v C-H simétrico; en -CH ₂ -
C	2854.03	-	-	-	-	-	-	-	v C-H asimétrico; en -CH ₂ -
D	1637.48	1647.35	1634	1649	1649	1646	1650	-	δ-OH, agua adsorbida
E	1597.02	-	1593	1589	1590	1587	-	1587	Trazos de lignina
F	1507.93	1511	-	-	-	-	-	-	Trazos de lignina
G	1426.96	1432.21	-	1422	1421	1422	1422	-	δ-CH ₂ , δ-OH
H	1372.83	1372.81	1373	1378	1368	1369	1367	1370	C-H alifático
I	1319.83	1327.14	1318	1315	1315	1315	1316	1316	Trazos de lignina
J		1263	-	-	-	-	-	-	Trazos de lignina
K	1163.67	1163.24	1158	1159	1158	1157	1157	1157	v (C-C) ring breathing, asimétrico
L	1112.34	1112.12	1101	1102	1100	1100	1101	1101	v (C-O-C), v (C-C) de enlaces glucosídicos
M	1055.48	1058.5	1054	1049	1054	1052	1054	1051	v (C-OH) alcohol secundario
N	1036.03	-	1025	1028	1026	1026	1024	1026	Deformación del alcohol primario C-OH
O	897.91	897	897	897	898	896	897	897 (pequeño)	Anillo δ (CH)
P	831.01	-	-	-	-	-	-	-	Trazas de lignina

VII.- Conclusiones y comentarios

Mediante los análisis microbiológicos y moleculares se determinó que la levadura es *K. marxianus* y cuenta con un gran potencial en cuanto al uso en aplicaciones biotecnológicas todo esto gracias a su temperatura de crecimiento y rendimientos en cuanto a producción de etanol a altas temperaturas; al probar su posible inhibición en presencia de diferentes concentraciones de etanol, glucosa, HMF, furfural, NaCl, ácido acético a 30°C y 42°C en medio sólido se observó que la levadura es más sensible a estos compuestos en altas temperaturas, ya que aunque logra crecer a temperaturas más elevadas, posiblemente debido a que la permeabilidad de la membrana cambia y los componentes resultan ser más tóxicos.

Se observó que el ácido acético disminuye los rendimientos de etanol en un 35% y 65% dependiendo de cada caso a 42°C, mostrando que el pH afecta de manera significativa a la levadura. Por lo tanto, en caso de que se deje la levadura en un medio con ácido acético, este interferirá con el crecimiento y la producción de etanol, por lo que en un futuro sería una buena opción la adaptación de la levadura a este ácido para los procesos que contengan ácido acético en lugar de acetato.

El olote pretratado tiene un contenido alto de celulosa, 47% mejorando el proceso al añadir menos carga de sólidos, se demostró que la levadura tiene un buen rendimiento de biomasa y etanol en el olote, gracias a la complejidad de este.

En cuanto al proceso de SSF, la levadura y la enzima tienen temperaturas óptimas de operación similares y el proceso puede efectuarse de manera simultánea. La enzima no se ve inhibida por el producto, ni por el etanol, los rendimientos tanto en la hidrólisis enzimática y el proceso SSF, son similares ya que en ambos casos se llega al 92% de rendimiento en cuanto a la liberación de glucosa, pero cambiando la temperatura de 50°C a 42°C respectivamente. Sin embargo, se cuenta con la ventaja en el caso de la SSF, de que se obtiene el etanol en un solo paso a temperaturas más bajas y la enzima no se ve inhibida por la presencia de la levadura ni de sus metabolitos.

En el escalamiento al biorreactor se observó la producción de etanol en las primeras horas, sin embargo, se produjo un subproducto (glicerol) en una concentración menor a 2g/L, que muestra que podría haber un desvío en la producción de etanol,

aunque no es un valor significativo. Por lo tanto el uso de una levadura termotolerante en el proceso SSF como la de este estudio, contribuye a evitar el uso de dos pasos en el proceso de producción de etanol celulósico.

La levadura *Kluyveromyces marxianus* KM24 es un nuevo candidato para su uso en el proceso SSF a 42°C en presencia de celulasas añadidas exógenamente. Sin embargo, los rendimientos obtenidos son bajos para los procesos de producción de etanol industrial, por lo tanto es necesario tener mejoras para la obtención de mayores rendimientos de etanol superiores a 40 g/L y lograr un proceso económico viable. Por lo que un lote alimentado y adaptaciones en la levadura pueden ser prometedores para el proceso de SSF.

VIII.- Bibliografía

- (1) Naik S, Vaibhav G, Prasant K, Ajay D. Production of first and second generation biofuels: A comprehensive review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 2010;14:578–597.
- (2) Jing L, Sheahanb C, Pengcheng F. Metabolic engineering of algae for fourth generation biofuels production. *Energy and Environment Science*. 2011;4:2451–2466.
- (3) Cheng J. *Biomass to Renewable Energy Processes*. Florida:Taylor & Francis; 2009.
- (4) Wayman C. *Hanbook on Bioethanol*. Florida:Taylor & Francis; 1996.
- (5) Nag A. *Biofuels Refining and Performance*. New York:McGraw-Hill; 2008.
- (6) Toribio H. *Experimentación, Modelado Matemático y Estimación de parámetros de la Fermentación de mezclas de azúcares mediante un co-cultivo de Pichia stipitis y Saccharomyces cerevisiae para la obtención de Bioetanol*, Tesis de maestría, Universidad Iberoamericana, México, Ciudad de México.
- (7) Alvira P, Pejo E, Ballesteros M, Negro M, Pretreatment technologies for an efficient bioetanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review. *Bioresource Technology*. 2010;13:4851–4861.
- (8) Almeida J, Runquist D, Sanchez I, Nogue V, Liden G. Stress-related challenges in pentose fermentation to ethanol by the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology Journal*. 2011;3:286–299.
- (9) Falls M, Holtzapple M, Oxidative lime pretreatment of Alamo switchgrass. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2011;165:243–259.
- (10) Sierra R, Granda C, Holtzapple T. Lime pretreatment. *Methods Moecular Biology* 2009;581:115–124.
- (11) Pérez J, Muñoz-Dorado A, De la Rubia T, Martínez E. Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview. *International Microbiology*. 2002;5:53–63.
- (12) Wei-Hao W, Wei-Chun H, Kai-Yin L, Yen-Hui C, Hou-Peng W, Kuan-Chen C. Bioethanol Production from Taro Waste Using Thermo-tolerant Yeast *Kluyveromyces marxianus* K21. *Bioresource Tecnology*. 2016;201:27-31.

- (13) Taylor M, Mulako I, Tuffin M, Cowan D. Understanding physiological responses to pre-treatment inhibitors in ethanologenic fermentations. *Biotechnology Journal*. 2012; 7: 169-1181.
- (14) Wright JD, Wyman CE, Grohmann K. Simultaneous saccharification and fermentation of lignocellulose: process evaluation. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 1998;18:75–89.
- (15) Cunha R, Castro A, Inês R. Selection of a Thermotolerant *Kluyveromyces marxianus* Strain with Potential Application For Cellulosic Ethanol Production by Simultaneous Saccharification and Fermentation. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2014; 172:1553-1564.
- (16) Stayanarayana T, Johri BN. Microbial diversity current perspectives and potential applications. New Delhi:I.K. International; 2005.
- (17) Fonseca G, Heinzle E, Wittman C, Gombert A. The yeast *Kluyveromyces* and its biotechnological potential. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2008;79: 339-354..
- (18) Groeneveld P, Stouthamer AH, Westerhoff HV. Superlife - how and why 'cell selection' leads to the fastest-growing eukaryote. *FEBS J*. 2009;276:254–270.
- (19) Sharma OP. *Textbook of Fungi*. New Delhi: McGraw-Hill; 1998.
- (20) Lane MM, Burke N, Karreman R, Wolfe KH, O'Byrne CP, Morrissey JP. Physiological and metabolic diversity in the yeast *Kluyveromyces marxianus*. *Antonie van Leeuwenhoek*. 2011;100(4):507–519.
- (21) Oliva JM, Negro M, Saéz F, Manzanares P, González A, Ballesteros M. Effects of acetic acid, furfural and catechol combination on ethanol fermentation of *Kluyveromyces marxianus*. *Process Biochemistry*. 2006; 41:1223-1228.
- (22) Tortora G, Funke B, Case C. *Introducción a la Microbiología*. Buenos Aires: Médica Panamericana; 2007.
- (23) Herbert R. The biosynthesis of secondary metabolites. New York: Chapman and Hall; 1981.
- (24) Krebs J, Goldstein E, Kilpatrick S. Lewins. *Genes X*. New York :Jones and Barlett; 2011.
- (25) Peterson S, Kurtzman C. Ribosomal RNA Sequence Divergence Among Sibling Species of Yeasts. *Systematic and Applied Microbiology*. 1991;14:124-129.

- (26) Satyanarayana T, Kunze G. *Yeast Biotechnology: Diversity and Applications*. New Delhi: Springer; 2009.
- (27) Schmidt FR. Optimization and scale up of industrial fermentation processes. *Applied Microbiology Biotechnology*. 2005; 68:425-435.
- (28) Arathoon WR, Birch JR. Large-scale cell culture in biotechnology. *Science*. 1986; 232: 1390–1395
- (29) Smith GL. Large-scale animal cell culture. In: Lydersen BK, D'Elia NA, Nelson KL, editors. *Bioprocess engineering: systems, equipment and facilities*. New York: John Wiley and sons; 1994.
- (30) Charles M, Wilson J. Fermentor design. In: Lydersen BK, D'Elia NA, Nelson KL, editors. *Bioprocess engineering: systems, equipment and facilities*. New York: John Wiley and Sons; 1994.
- (31) Doran P. *Bioprocess Engineering Principles*. San Diego: Academic Press. 1995.
- (32) Towler G, Sinnott R. *Principles, Practice and Economics of plant and Process Design*. San Diego: Elsevier; 2008.
- (33) Hochfeld W. *Producing Biomolecular Substances with Fermenters, Bioreactors, and Biomolecular Synthesizer*. Florida : Taylor & Francis; 2006.
- (34) Büchs J, Maier U, Milbradt C, Zoels B. Power Consumption in Shaking Flasks on Rotary Shaking Machines: II. Nondimensional Description of Specific Power Consumption and Flow Regimes in Unbaffled Flasks at Elevated Liquid Viscosity. *Biotechnology and Bioengineering*. 2000;42:594-601.
- (35) Currano J, Roth Dana. *Chemical Information for Chemists*. Cambridge : The Royal Society of Chemistry; 2014.
- (36) Agostino M. *Practical Bioinformatics*. New York :Garland Science; 2012.
- (37) Zvelebil M, Baum J. *Understanding Bioinformatics*. New York : Taylor & Francis; 2008.
- (38) Blainski A, Lopes GC, Palazzo de Mellos JC. Application and Analysis of the Folin Ciocalteu Method for the Determination of the Total Phenolic Content from *Limonium Brasiliense* L. *Molecules*. 2013;18:6852-6865.

- (39) Toribio H, Pedraza L, Macías S, González I, Vasquez R, Favela E. Characterization of Lignocellulosic Biomass Using Five Simple Steps. *Journal of Chemical, Biological and Physical Sciences*. 2014;5:28-47.
- (40) Pereira A, Graça M.A.S., Molles M. Leaf decomposition in relation to litter physicochemical properties, fungal biomass, arthropod colonization, and geographical origin of plant species. *Pedobiologia*.1998;42:316-327.
- (41) Graça M, Newell SY, Kneib RT. Grazing rates of organic living fungal biomass of decaying *Spartina alterniflora* by three species of salt-marsh invertebrates. *Marine Biology*.2000;136:281-289.
- (42) Suberkropp K, Godshalk G, Klug, MJ. Changes in the chemical composition of leaves during processing in a woodland stream. *Ecology*.1976;57:720-727.
- (43) Keweloh H, Weyrauch G, Rehm HJ. Phenol induced membrane changes in free and immobilized *Escherichia coli*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 1990:1:66-71.
- (44) Moreno AD, Tomás-Pejó E, Ibarra D, Ballesteros M, Olsson L, In situ laccase treatment enhances the fermentability of steam-exploded wheat straw in SSCF processes at high dry matter consistencies. *Bioresource Technology* .2013:1-12.
- (45) Dahnum D, Tasum O, Triwahyuni E, Nurdin M, Abinmany H. Comparison of SHF an SSF processes using enzyme and dry yeast for optimization of bioethanol production form empty fruit bunch. *Energy procedia*.2015;68:107-116.
- (46) Rugthaworn P, Murata Y, Machida M, Apiwatanapiwat W, Horooka A, Thanapase W, Dangjarean H, Ushiwaka S, Morimitzu K, Kosugi A, Arai T, Vaithanomsat P. Growth inhibition of thermotolerant Yeast, *Kluyveromyces marxianus*, in Hydrolysates from Cassava pulp. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2014,173:1197-1208.
- (47) Olivia J, Negro M, Saéz F, Ballesteros I, Manzanares P, González A, Ballesteros M. Effects of acetic acid, furfural and catechol combinations on ethanol fermentation of *Kluyveromyces marxianus*. *Process Biochemistry*. 2005;41:1223-1228.
- (48) Taylor M, Mulako I, Tuffin M, Cowan D. Understanding physiological responses to pre-treatment inhibitors in ethanologenic fermentations. *Journal of biotechnology*. 2012;7:1169-1181.

(49) Costa D, Souza C, Costa P, Rodrigues M, dos Santos A, Lopes M. Physiological characterization of thermotolerant yeast for cellulosic ethanol production. 2014;98:3829-3840.

(50) Sreekumar S. *Basic Physiology*. New Dehli : PHI learning; 2010.

IX.- Anexos

IX.1.- Anexo A

IX.1.1 Protocolo del kit de extracción de ADN

En este anexo se muestra el protocolo del kit de extracción de ADN de manera detallada, la información se tomó del manual del kit.

Kit ZR Fungal/Bacterial DNA miniprep™ (Catálogo D6005 de ZymoResearch)

Contenido del Kit:

tubos de lisis ZR BashingBead™

Solución de lisis

Buffer de unión

Buffer de pre-lavado

Buffer de lavado

Buffer de elución de ADN

Filtros Zymo-spin™ IV spin

Columnas Zymo-spin™ IIC

Tubos para recolectar

Los pasos previos al protocolo de extracción de ADN son:

- Colocar 3 mL de medio YPD en tubos de cultivo estériles.

- Inocular cada tubo con una colonia seleccionada de una caja petri con medio YPD.
- Dejar durante 24 horas a 150 rpm a 30°C.
- Colocar el cultivo en tubos Eppendorf de 1.5 mL y centrifugar.
- Recuperar el pellet sacando el medio con una micropipeta.

Protocolo del kit de extracción

- Añadir de 50-100mg (peso seco) de células, que estén resuspendidas en 200µL de agua o buffer isotónico (PBS) pasar al tubo de lisis ZR BasingBead™ añadir 750 µL de solución de lisis.
- Sujetar al vortex y dejar durante 5 minutos a una velocidad máxima.
- Centrifugar el tubo en una microcentrifuga a 10,000x g durante un minuto.
- Transferir 400µL del sobrenadante a un filtro Zymo-spin™ IV en un tubo recolector y centrifugar a 7,000x g por un minuto.
- Añadir 1, 200µL del buffer de unión al filtrado del tubo anterior.
- Transferir 800 µL de la mezcla del paso anterior a una columna Zymo-spin™ IIC en un tubo recolector y centrifugar a 10,000x g por un minuto.
- Descartar el flujo del tubo recolector y repetir el paso anterior.
- Añadir 200µL del buffer de pre-lavado de ADN a una columna Zymo-spin™ IIC con un nuevo tubo de recolección.
- Añadir 500µL de buffer de lavado a la columna Zymo-spin™ IIC y centrifugar.
- Transferir la columna Zymo-spin™ IIC a un tubo de microcentrifuga de 1.5 mL y añadir de 100µL a 25µL de buffer de elución directamente en la columna de la matriz, centrifugar a 10,000x g por 30 segundos para obtener el ADN.

IX.2.- Anexo B

IX.2.1 Método DNS

Este consiste en agregar 1.0 ml del reactivo de DNS a un volumen de 0.1 ml de muestra o estándar, calentar a ebullición durante 10 min, una vez terminado el tiempo de reacción enfriar durante 5 min en un baño de agua a temperatura ambiente y leer la absorbancia a 570 nm. Las mediciones se realizaron en un espectrofotómetro (Perkin Elmer Lambda 11). El reactivo de DNS se prepara disolviendo 75 g de tartrato de sodio y potasio en 100 ml de agua destilada, agregando después 50 ml de NaOH 2M y 75 ml de agua destilada caliente, entonces se adiciona lentamente 0.25 g de ácido 3,5-dinitrosalicílico hasta disolver por completo.

IX.3.- Anexo C

IX.3.1 Curvas de calibración de fenoles, DNS y de HPLC

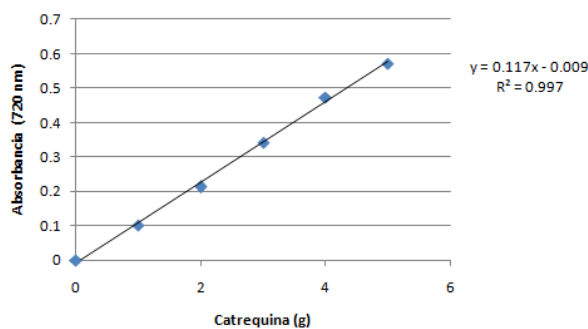


Figura 40) Curva de calibración de fenoles

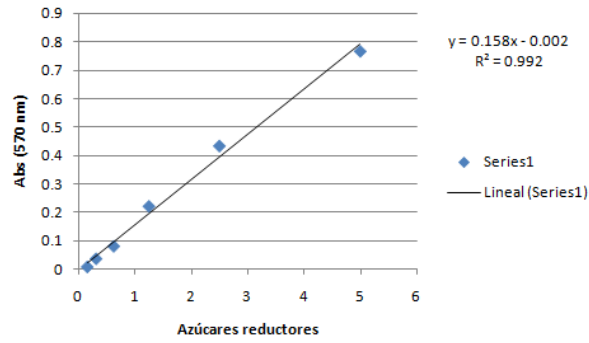


Figura 41) Curva de calibración de DNS

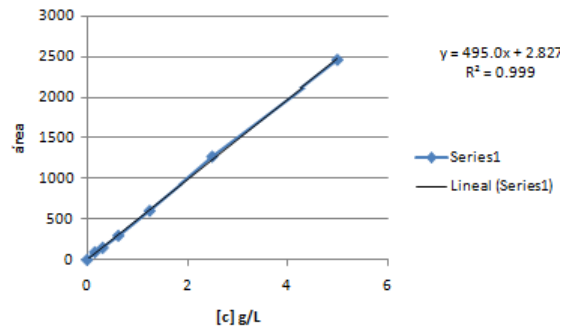


Figura 42) Curva de calibración de glucosa

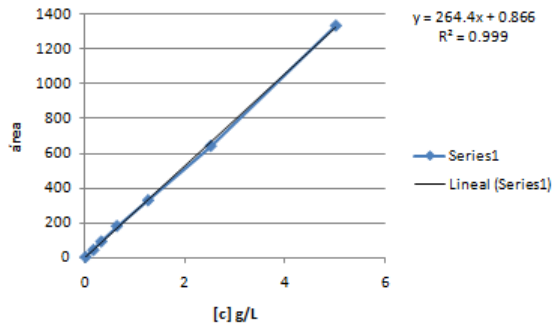


Figura 43) curva de calibración de ácido acético

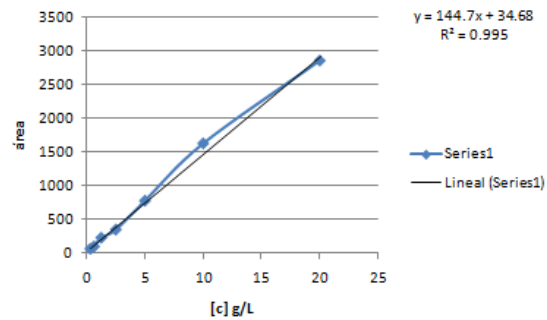


Figura 44) Curva de calibración de etanol

IX.4.- Anexo D

IX.4.1 Secuencias de ITS y D1/D2

I

```
CTGACCAAGSTGATATGATGATAGATTGCTGGGGGATCGTCTGACAAGGCCTGCGCTTAATTGCGCGGCCAGTTCCTGATCCTCTGCTATCAGTT
TTCTATTTCTCATCCTAAACACAATGGAGTTTTTCTCTATGAACTACTTCCCTGGAGAGCTCGTCTCTCCAGTGGACATAAACCAACAATATTTT
GTATTATGAAAACTATTATACTATAAAATTAATATTCAAACTTTCAACAACGGATCTTTGGTTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAATTG
CGATATGTATTGTGAATTGCAGATTTTCGTGAATCATCAAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTCTGGTATTCCAGGGGGCATGCCTGTTTGAGC
GTCATTTCTCTCAAACCTTTGGGTTTGGTAGTGAGTGATACTCGTCTCGGGTAACTTGAAAGTGGCTAGCCGTTGCCATCTGCGTGAGCAGG
GCTGCGTGTCAAGTCTATGGACTCGACTCTTGACATCTACGTCTTAGGTTTGCGCCAATTCGTGGTAAGCTTGGGTCATAGAGACTCATAGGTG
TTATAAAGACTCGCTGGTGTGTTGTCCTTGAGGCATACGGCTTAAACAAAACCTCAAAGTTTGACCTCAAATCAGGTAGGAGTACCCGCTGA
ACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGA
```

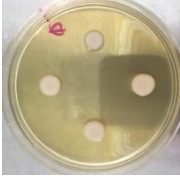

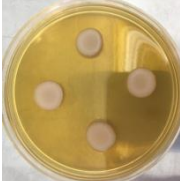





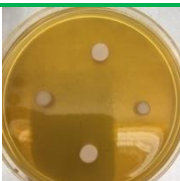



II






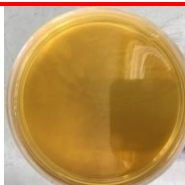

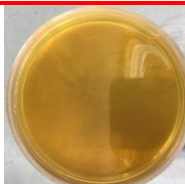

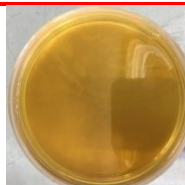

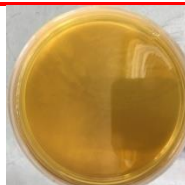
```
ATCCTTGACAAAGTCGCAATCCTCAGTCCCAGCTGGCTGTATTCCACGGGCTATAACACTCTACCGAAGCAGAGCCACATTCCTGAGGATTTAT
CCAACCGCTAAAACCTGATGCTGGCCAGCGAAAGCCGAAGCAACGCCATGTCTGATCAAATGCCCTTCCCTTTCAACAATTTACGTAATTTTTT
ACTCTCTTTTCAAAGTTCTTTTCATCTTTCCATCACTGTACTTGTTCGCTATCGGTCTCTCGCCAATATTTAGCTTTAGATGGAATTTACCACCCACTT
AGAGCTGCATTCCAAACAACCTCGACTCGTCAAAGCACTTTACAAATAACTGGGATCCTCGCCACACGGGATTCTCACCTCTATGACGTCTCTG
TTCCAAGGAACATAGACAAGGACCAGCTACAAAGTCGCCTTCTCAAATTACAACCTCGGACGTGAAGACGCCAGATTTCAAATTTGAGCTTTTG
CCGCTTCACTCGCCGTTACTAAGGCAATCCCGGTTGGTTTCTTTCTCCG
```



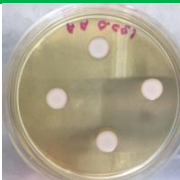

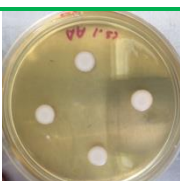

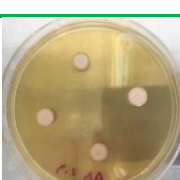



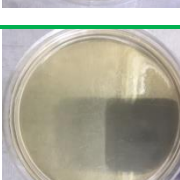

IX.5.- Anexo E



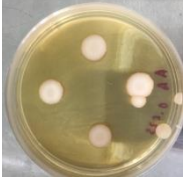
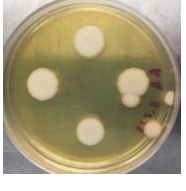





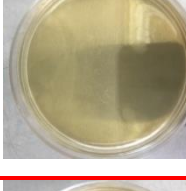
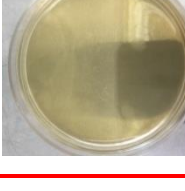
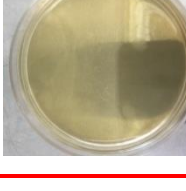
IX.5.1 Pruebas de tolerancia en caja

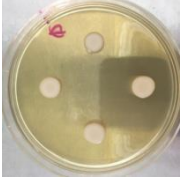

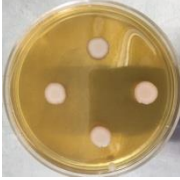

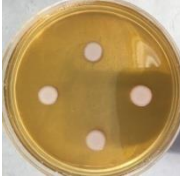
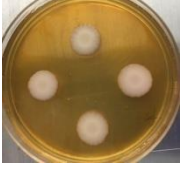
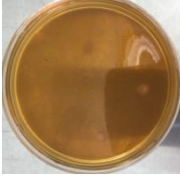
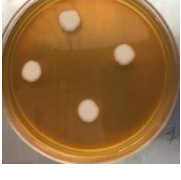
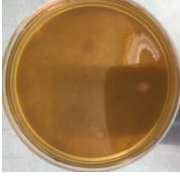
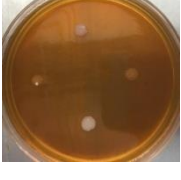
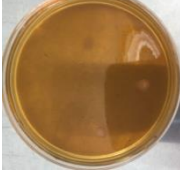
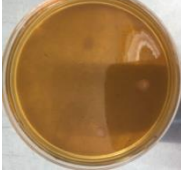
Inhibidores probados en caja de color verde se muestran las cajas a 30°C y de color rojo las cajas a 42°C.



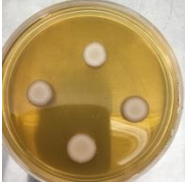
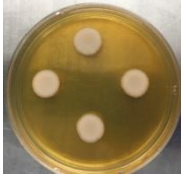

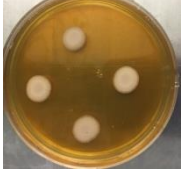
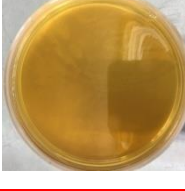
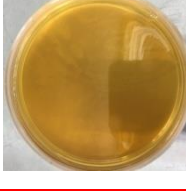




Inhibidor	Diámetro	Diámetro	Fotografía 48 horas	Diámetro	Diámetro	Fotografía 96 horas
HMF 0g/L	1 1	1 1		1.3 1.3	1.3 1.2	
HMF 0.95g/L	1.2 1.3	1.3 1.3		1.8 1.8	1.9 1.9	
HMF 1.9g/L	1.1 1.1	1.1 1.1		1.4 1.5	1.4 1.5	
HMF 2.85g/L	1 1	1 1		1.3 1.4	1.2 1.3	
HMF 3.8g/L	0.5 0.6	0.7 0.8		0.9 0.9	1 1	
HMF 5g/L	0 0	0 0		0.8 0.8	0 0	

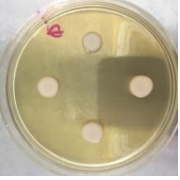

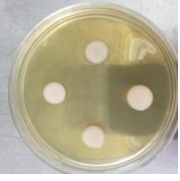



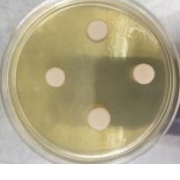
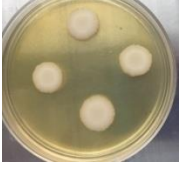
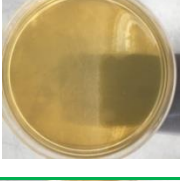
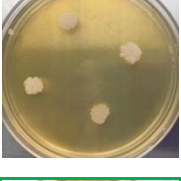

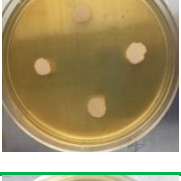
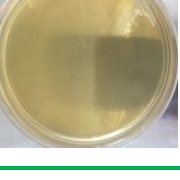
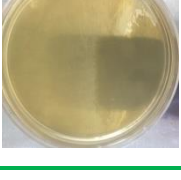
	KM24	KM14		KM24	KM14	
Inhibidor	Diámetro	Diámetro	Fotografía 48 horas	Diámetro	Diámetro	Fotografía 96 horas
HMF 0g/L	1.5 1.5	1.5 1.5		1.8 1.8	1.8 1.8	
HMF 0.95g/L	1 1	1 1.1		1.2 1.1	1.1 1.1	
HMF 1.9g/L	0 0	0 0		0 0	0 0	
HMF 2.85g/L	0 0	0 0		0 0	0 0	
HMF 3.8g/L	0 0	0 0		0 0	0 0	
HMF 5G/L	0 0	0 0		0 0	0 0	

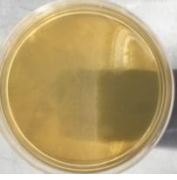
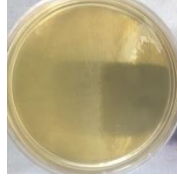
	KM24	KM14		KM24	KM14	
Inhibidor	Diámetro	Diámetro	Fotografía 48 horas	Diámetro	Diámetro	Fotografía 96 horas
Ácido acético 0g/L	1 1	1 1		1.3 1.3	1.3 1.2	
Ácido acético 0.625 g/L	1 1	1.1 1		1.3 1.3	1.4 1.3	
Ácido acético 1.25 g/L	1 1	1.1 1		1.3 1.3	1.3 1.4	
Ácido acético 2.5 g/L	0.9 0.8	0.9 0.9		1 1	1 1.1	
Ácido acético 3.75 g/L	0 0	0 0		1 1.1	1 1.1	
Ácido acético 5 g/L	0 0	0 0		0.9 0.9	0.9 0.8	

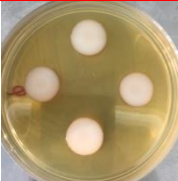
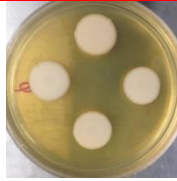


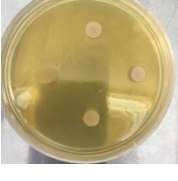
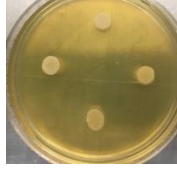
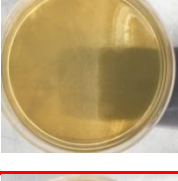

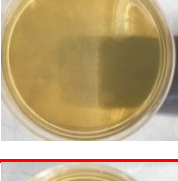
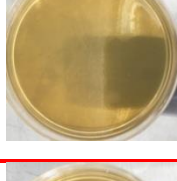


	KM24	KM14		KM24	KM14	
Inhibidor	Diámetro	Diámetro	Fotografía 24 horas	Diámetro	Diámetro	Fotografía 24 horas
Ácido acético 0g/L	1.5 1.5	1.5 1.5		1.8 1.8	1.8 1.8	
Ácido acético 0.625 g/L	1 1	1 1.1		1.1 1.1	1.1 1.1	
Ácido acético 1.25 g/L	0.9 0.9	0.9 0.9		1 1	1 1	
Ácido acético 2.5 g/L	0.8 0.8	0.8 0.8		0.9 0.9	0.9 0.9	
Ácido acético 3.75 g/L	0 0	0 0		0 0	0 0	
Ácido acético 5 g/L	0 0	0 0		0 0	0 0	

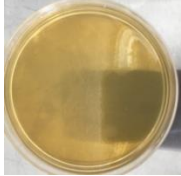
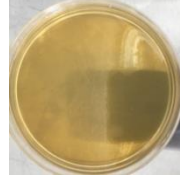
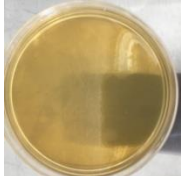
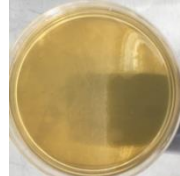


	KM24	KM14		KM24	KM14	
Inhibidor	Diámetro	Diámetro	Fotografía 48 horas	Diámetro	Diámetro	Fotografía 96 horas
Furfural 0g/L	1 1	1 1		1.3 1.3	1.3 1.2	
Furfural 0.95g/L	1 1	1 1		1.3 1.3	1.3 1.3	
Furfural 1.9g/L	0.9 0.9	0.9 0.9		1.2 1.3	1.3 1.3	
Furfural 2.85g/L	0 0	0 0		0.9 0.9	0.9 0.9	
Furfural 3.8g/L	0 0	0 0		0.5 0.5	0 0	
Furfural 5g/L	0 0	0 0		0 0	0 0	

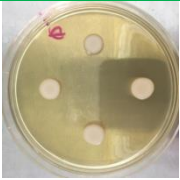

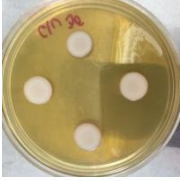

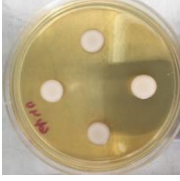

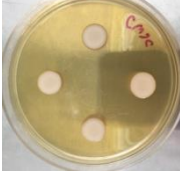

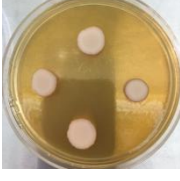
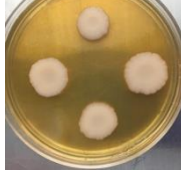
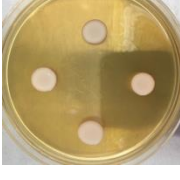

	KM24	KM14		KM24	KM14	
Inhibidor	Diámetro	Diámetro	Fotografía 48 horas	Diámetro	Diámetro	Fotografía 96 horas
Furfural 0g/L	1.5 1.5	1.5 1.5		1.8 1.8	1.8 1.8	
Furfural 0.95g/L	1.1 1.1	1.2 1.1		1.2 1.2	1.2 1.2	
Furfural 1.9g/L	1 1	1.1 1.2		1.1 1.2	1.2 1.2	
Furfural 2.85g/L	0.9 0.9	0.8 0.8		0 0	0 0	
Furfural 3.8g/L	X 0.9	0.9 0.9		0 0	0 0	
Furfural 5g/L	0 0	0 0		0 0	0 0	




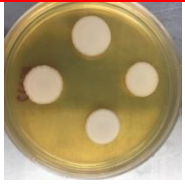
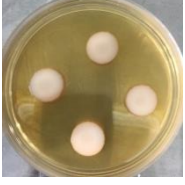
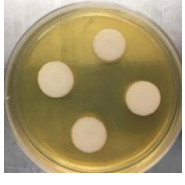



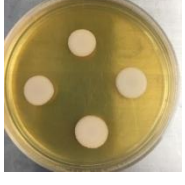
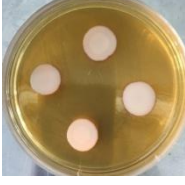
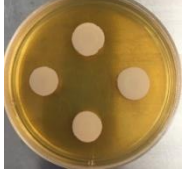
	KM24	KM14		KM24	KM14	
Inhibidor (%)	Diámetro	Diámetro	Fotografía 48 horas	Diámetro	Diámetro	Fotografía 96 horas
Etanol 0	1 1	1 1		1.3 1.3	1.3 1.2	
Etanol 2	1.1 1.1	1.1 1.1		1.6 1.6	1.6 1.6	
Etanol 5	1.1 1.1	1.1 1.1		1.5 1.5	1.4 1.4	
Etanol 7.5	1 1	1 1		1.4 1.54	1.5 1.5	
Etanol 10	0 0	0 0		0.8 0.8	0.8 0.8	
Etanol 12	0 0	0 0		0.8 0.8	0.8 0.8	
Etanol 13	0 0	0 0		0 0	0 0	

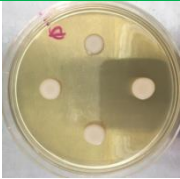

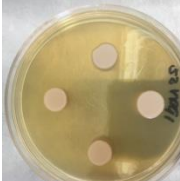

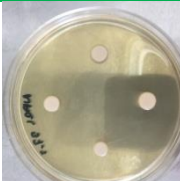
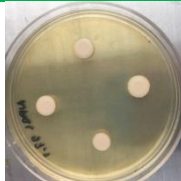


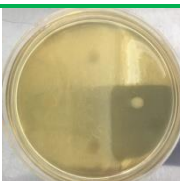
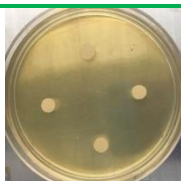
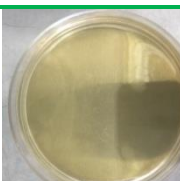
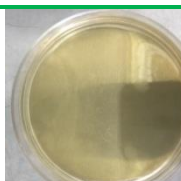
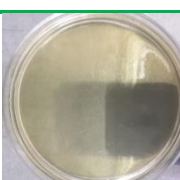
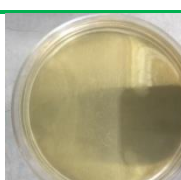
Etanol 14	0	0		0	0	
	0	0		0	0	

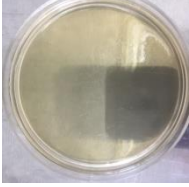
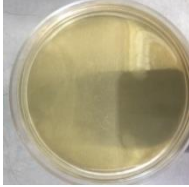
	KM24	KM14		KM24	KM14	
Inhibidor (%)	Diámetro	Diámetro	Fotografía 48 horas	Diámetro	Diámetro	Fotografía 96 horas
Etanol 0	1.5	1.5		1.8	1.8	
	1.5	1.5		1.8	1.8	
Etanol 2	1.1	1		1.2	1.1	
	1.1	1.2		1.2	1.3	
Etanol 5	0.7	0.7		0.8	0.8	
	0.7	0.7		0.8	0.8	
Etanol 7.5	0	0		0	0	
	0	0		0	0	
Etanol 10	0	0		0	0	
	0	0		0	0	
Etanol 11	0	0		0	0	
	0	0		0	0	



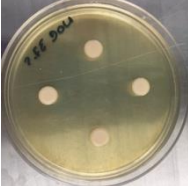
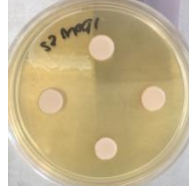
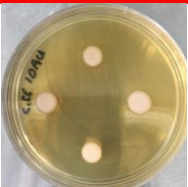

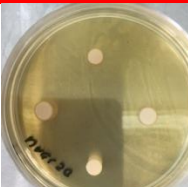
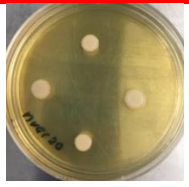
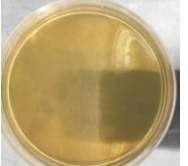
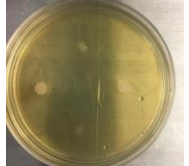
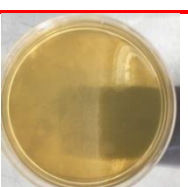

Etanol 12	0 0	0 0		0 0	0 0	
Etanol 13	0 0	0 0		0 0	0 0	
Etanol 14	0 0	0 0		0 0	0 0	

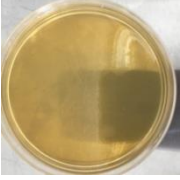
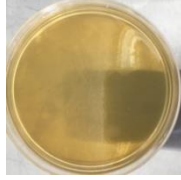
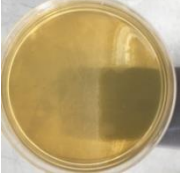
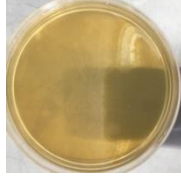
	KM24	KM14		KM24	KM14	
Inhibidor (%)	Diámetro	Diámetro	Fotografía 48 horas	Diámetro	Diámetro	Fotografía 96 horas
Glucosa 0	1 1	1 1		1.3 1.3	1.3 1.2	
Glucosa 30	1.3 1.2	1.3 1.2		1.5 1.5	1.5 1.5	
Glucosa 40	1.1 1.2	1.1 1.2		1.5 1.5	1.5 1.5	
Glucosa 50	1.1 1.2	1.1 1.2		1.5 1.5	1.5 1.5	
Glucosa 60	1 1	1.3 1.2		1.5 1.5	1.5 1.5	
Glucosa 70	1.1 1.1	1.1 1.1		1.4 1.4	1.4 1.4	

	KM24	KM14		KM24	KM14	
Inhibidor (%)	Diámetro	Diámetro	Fotografía 48 horas	Diámetro	Diámetro	Fotografía 96 horas
Glucosa 0	1.5 1.5	1.5 1.5		1.8 1.8	1.8 1.8	
Glucosa 30	1.5 1.5	1.5 1.5		1.6 1.5	1.6 1.5	
Glucosa 40	1.5 1.5	1.5 1.5		1.5 1.6	1.5 1.6	
Glucosa 50	1.5 1.5	1.5 1.5		1.7 1.7	1.7 1.8	
Glucosa 60	1.5 1.5	1.5 1.5		1.5 1.4	1.5 1.5	
Glucosa 70	1.5 1.5	1.5 1.5		1.5 1.5	1.5 1.5	

	KM24	KM14		KM24	KM14	
Inhibidor	Diámetro	Diámetro	Fotografía 48 horas	Diámetro	Diámetro	Fotografía 96 horas
NaCl 0g/L	1 1	1 1		1.3 1.3	1.3 1.2	
NaCl 25g/L	1 1	1 1		1.3 1.3	1.3 1.3	
NaCl 37.5g/L	0.8 0.7	0.7 0.7		0.8 0.9	0.8 0.8	
NaCl 50g/L	0.7 0.7	0.7 0.7		0.8 0.8	0.8 0.8	
NaCl 75g/L	0 0	0 0		0.5 0.5	0.6 0.6	
NaCl 100g/L	0 0	0 0		0 0	0 0	
NaCl 125g/L	0 0	0 0		0 0	0 0	


NaCl	0	0		0	0	
150g/L	0	0		0	0	

	KM24	KM14		KM24	KM14	
Inhibidor	Diámetro	Diámetro	Fotografía 48 horas	Diámetro	Diámetro	Fotografía 96 horas
NaCl 0g/L	1.5 1.5	1.5 1.5		1.8 1.8	1.8 1.8	
NaCl 25g/L	1 1	1 1		1.2 1.1	1.1 1.1	
NaCl 37.5g/L	0.9 0.9	0.9 0.9		1.2 1.2	1.2 1.2	
NaCl 50g/L	0.7 0.7	0.6 0.6		0.9 0.9	0.9 0.9	
NaCl 75g/L	0 0	0 0		0 0	0.6 0.6	
NaCl 100g/L	0 0	0 0		0 0	0 0	

NaCl 125g/L	0 0	0 0		0 0	0 0	
NaCl 150g/L	0 0	0 0		0 0	0 0	

IX.6.- Anexo F

IX.6.1 Hoja técnica de la enzima



Cellulosic ethanol

Novozymes Cellic[®] CTec2 and HTec2 -Enzymes for hydrolysis of lignocellulosic

Application sheet

Conversion of lignocellulosic biomass to ethanol involves the liberation of sugars from biomass feedstocks. These materials are composed of three major fractions: cellulose, hemicellulose, and lignin. Cellulose and hemicellulose contain sugars in polymeric form that can be converted by enzymes to fermentable monomers for subsequent fermentation.

The lignin component, however, protects the cellulose and hemicellulose against microbial and enzymatic attack. Hence, the use of lignocellulose as a raw material requires a physical or chemical pretreatment in order to render the cellulose and hemicellulose fractions accessible for enzymatic hydrolysis. This pretreatment step is a fine balancing act aimed at opening the fibers to increase water access and enzyme accessibility while minimizing sugar loss and inhibitor generation to ensure high yields and a substrate suitable for enzymatic hydrolysis and fermentation

Cellic CTec2 and HTec2 are state-of-the-art enzymes that have proven effective on a wide variety of pretreated lignocellulosic materials for the conversion of the carbohydrates in these materials to simple sugars prior to fermentation.

Products

Product	Cellic [®] CTec2	Cellic HTec2
Tech specifications/description	Cellulase complex for degradation of cellulose to fermentable sugars A blend of Aggressive cellulases High level of β -glucosidases	Endoxylanase with high specificity toward soluble hemicellulose Cellulase background
Features	High conversion yield Effective at high solids concentrations Inhibitor tolerant Compatible with multiple feedstocks and pretreatments	Can improve cellulose hydrolysis when combined with CTec2 Helps in case of mild acid or alkaline pretreatment Converts hemicellulose to
Benefits	Up to 50% lower enzyme dosage Lower operating and capital costs from optimization of process, e.g., higher total solids loading and higher ethanol titer Enabling low ethanol cost	20% lower enzyme usage cost Enables higher ethanol yields Provides increased flexibility for pretreatment technology

Table 1. A description of Cellic[®] CTec2 and HTec2 and their features.

Application

CTec2 and HTec2 in application

Novozymes has partnered broadly with different cellulosic ethanol production companies that have worked with the Cellic product family to optimize the cellulosic ethanol production process. We have gathered application information using CTec2 and HTec2 in various process setups using different feedstocks and pretreatments. It is recommended to dose Cellic CTec2 based on the level of cellulose contained in the substrate to allow direct comparisons of enzyme effectiveness on various biomass materials, including those from different feedstocks and pretreatment combinations.

Dosing guidelines

The suggested enzyme trial dosage levels for initial investigation of a substrate are 1.5 %, 3%, 6.0 %, and 30.0 % w/w (g enzyme/g cellulose). These

data points should be used to generate a dose response curve (enzyme dosage vs. percentage cellulose conversion). The low dosage provides a target for commercially feasible cellulose hydrolysis, while the high dosage provides an indication of maximum enzymatically accessible cellulose content. Additional testing is recommended to refine the dose response curve and determine the effect of time, solids loading, cellulose conversion, and enzyme dosage.

If the pretreated feedstock of interest contains an appreciable amount of hemicellulose, it is advised to combine Cellic CTec2 and HTec2 to boost the cellulose hydrolysis. In some cases, other Novozymes hemicellulases may also be relevant. The enzyme dosage recommendation for Cellic HTec2 is 0.05–0.50 % w/w (g enzyme/g cellulose), but the dosage required is heavily dependent on feedstock type, pretreatment technology, and processing conditions.

Using CTec2 and HTec2 in combination

When pretreatments result in a feedstock that would benefit from additional hemicellulose degradation, one should test whether there is synergy between CTec2 and HTec2. It is recommended to perform a dose response test and a dose response-replacement test where the total dosage of the CTec2 and HTec2 equals the dosages in the CTec2-only dose response test. An example of an initial study design is shown in table 2.

Treatment	Enzyme dosage % w/w (g enzyme/g cellulose)	
	CTec2	HTec2
Cellulase – low	1.50 %	0.00 %
Cellulase – mid	3.00 %	0.00 %
Cellulase – high	6.00 %	0.00 %
Replacement – low	1.35 %	0.15 %
Replacement – mid	2.70 %	0.30 %
Replacement – high	5.4 %	0.60 %

Table 2. Example of an experimental design to test for synergy between Cellic[®] CTec2 and HTec2 with 10% HTec2 replacement.

Optimal temperature and pH

The optimal temperature and pH for Cellic CTec2 are 45–50 °C and pH 5.0–5.5, as shown in figures 1 and 2 respectively. The activity profiles were produced using a dilute acid- pretreated corn stover at 5% total solids loading. The temperature was kept constant at 50 ° C for the pH profile, and the pH was kept at 5.0 for the temperature profile throughout the 72-hour hydrolysis.

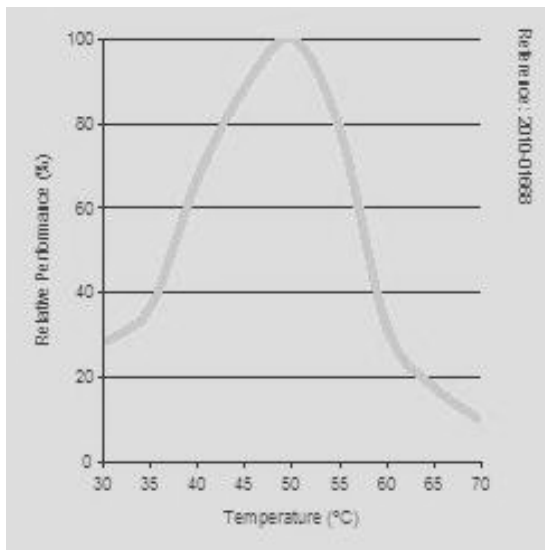


Fig. 1. Temperature curve

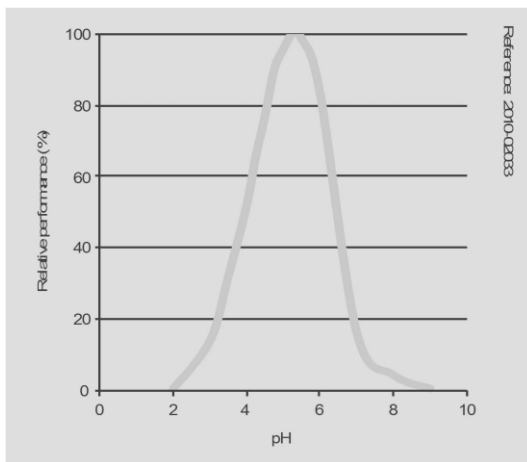


Fig. 2. pH curve

The optimal temperature and pH for Cellic HTec2 are 45–50 °C and pH 5.0.

Figures 3 and 4 illustrate the activity of Cellic HTec2 at different temperatures and pH values using azo-wheat arbinoxylan as substrate.

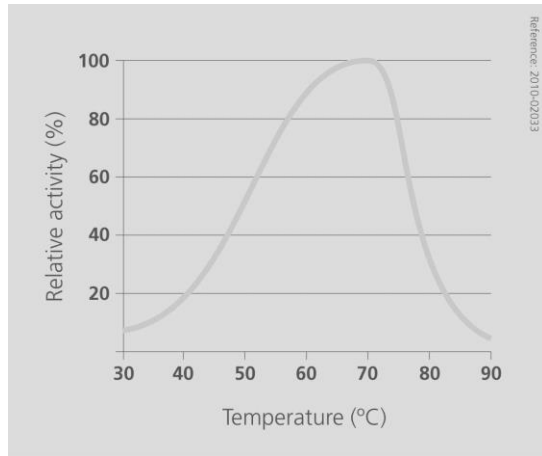


Fig. 3. Effect of temperature on the activity of Cellic[®] HTec2.

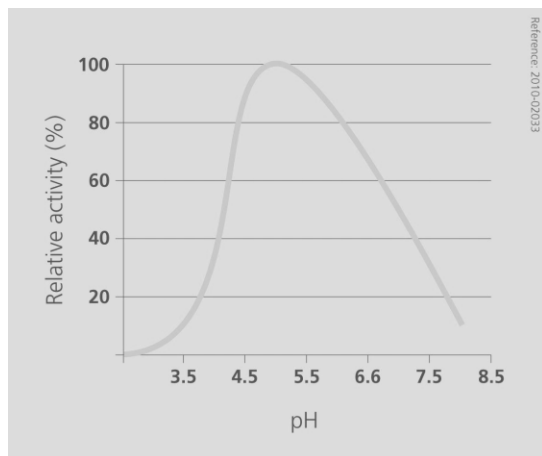


Fig. 4. Effect of pH on the activity of Cellic[®] HTec2.

Figure 5 shows the enzyme dose response of Cellic CTec2 at 50 °C and pH 5.0 for an unwashed sample of dilute acid-pretreated corn stover at 15 % total solids loading.

The enzymes are also effective on other feedstocks such as sugarcane bagasse, corn cob, corn fiber, and wood pulp. The dose response will depend on feedstock, pretreatment, and process conditions.

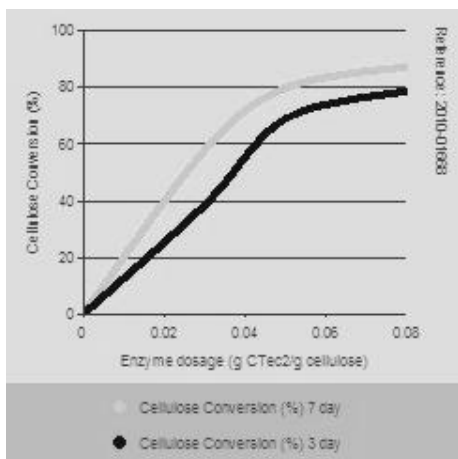


Fig. 5. Enzyme dosage (g enzyme/g cellulose).

Storage in application

The recommended storage conditions are 0–25 °C (32–77 °F) in sealed packaging, well-protected from the sun. The product has been formulated for optimal stability. However, enzymes gradually lose activity over time. Extended storage and/or adverse conditions such as higher temperature may lead to a higher dosage requirement.

CELLULOSIC ETHANOL PRIMER

Biofuels are a key to reducing global CO₂ emissions, and cellulosic bioethanol offers the opportunity to reduce CO₂ emissions by up to 90% compared to conventional gasoline. The

cellulosic ethanol industry holds a lot of promise for meeting the demand for an alternative global liquid transportation fuel, and at Novozymes we recognize this potential as a worthwhile focus for our company. That is why we started working on developing cellulosic ethanol solutions in 2000 and have continued to grow our research efforts in this area every year since then. Our cellulosic ethanol work has become the largest endeavor in our company's history, with more than 150 people dedicated to this effort. We have learned a lot through our internal research and through our partnerships with leading companies across the globe.

The information in this section has been collected through our efforts over the years and is offered to help you progress in your cellulosic ethanol work.

Hydrolysis

The primary goal of hydrolysis is to convert as much cellulose as possible into monomeric sugars as quickly as possible, which is achieved by adding cellulases and hemicellulases. A good measure of the effectiveness of an enzyme is percentage cellulose conversion, which is defined as the amount of cellulose converted to glucose divided by the total amount of cellulose. A high cellulose conversion can be achieved by increasing either the enzyme dosage or the hydrolysis time. However, a small fraction of the cellulose in a feedstock is harder to convert than the majority; hence, there can be a diminishing return where it takes a large amount of enzyme to convert a relatively minor fraction of cellulose.

A brief note on fermentation and SSF

It is strongly recommended to identify the optimal time to switch from hydrolysis to fermentation for the specific feedstock. Simultaneous saccharification and fermentation (SSF), a process design where yeast and enzyme are added together and run at 32–37 °C, is commonly cited as a way of decreasing process costs because it can remove the end-product inhibition on enzymes by fermenting glucose to ethanol.

However, for cellulosic bioethanol, suboptimal conditions during SSF necessitate longer processing time for the enzymes and C5 sugar conversion to reach a specific glucose conversion level. The temperature is not favorable for optimal enzyme performance, and higher inhibitors, due to high solids in hydrolysis, cause the normal yeast dosage to not perform effectively. For cellulases, CTec2 and HTec2 have significantly more activity at hydrolysis temperatures than at fermentation temperatures (Figures 1 and 3), and CTec2 also has an improved β -glucosidase enzyme that has less glucose inhibition.

