

**Centro de Investigación en Alimentación  
y Desarrollo, A.C.**

“POTENCIAL DEL CONCENTRADO DE NEJAYOTE  
PRE-TRATADO COMO SUSTRATO PARA LA  
PRODUCCIÓN DE BIOETANOL”

POR

**NALLELI CONCEPCIÓN PÉREZ PÉREZ**

TESIS APROBADA POR LA

**COORDINACIÓN DE CIENCIA DE LOS ALIMENTOS**

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE

**MAESTRÍA EN CIENCIAS**

HERMOSILLO, SONORA

ENERO DE 2012

## APROBACIÓN

Los miembros del comité designado para revisar la tesis de Nalleli Concepción Pérez Pérez, la han encontrado satisfactoria y recomiendan sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestría en Ciencias.



Dr. Ali Asaff Torres  
Director de Tesis



Dra. Ana María Calderón de la  
Barca  
Asesor de Tesis

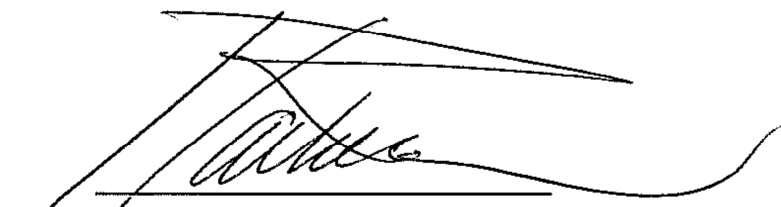


Dr. Rogerio Sotelo Mundo  
Asesor de Tesis

## DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

Se permiten y agradecen las citas breves del material contenido en esta tesis sin el permiso especial del autor, siempre y cuando se dé el crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos se deberá contar con la autorización escrita del director del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD, A.C.).

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis, deberá dar los créditos al CIAD, A.C., previa aprobación escrita del manuscrito en cuestión, del director de la tesis.



Dr. Ramón Pacheco Aguilar  
Director General

## DEDICATORIA

A mis padres,  
mis hermanos y  
a Leo, mi ángel.

## **AGRADECIMIENTOS**

A Dios por permitirme llegar a este momento de crecimiento personal y profesional.

Al CONACYT por la beca proporcionada para lograr este objetivo profesional.

Al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A. C. por darme la oportunidad de realizar mi formación académica y brindarme el apoyo para la realización de este proyecto de tesis.

A mi director de tesis y asesores Dr. Ali Asaff, Dra. Ana Ma. Calderón y Dr. Rogerio Sotelo por su confianza, orientación y paciencia.

Al personal de los laboratorios de Biotecnología Industrial, Productos Pesqueros, Bioquímica de Proteínas de Estrés, Biopolímeros y Minkab por el apoyo para la realización de este proyecto.

A mis amigos que conocí en este camino: Angélica, Gus, Ana Luisa, Sarahi, Karla, Gabriel, Faby, Gabriel Ivan, Pablo y a los que ya formaban parte de este viaje: Ainhoa, Paty, Eri, Ivan y Gaby por su apoyo, cariño y confianza, muchas gracias chic@s.

## ÍNDICE

<b>APROBACIÓN .....</b>	<b>II</b>
<b>DECLARACIÓN INSTITUCIONAL.....</b>	<b>III</b>
<b>SINOPSIS.....</b>	<b>XIII</b>
<b>Capítulo 1. Potencial del nejayote para la producción de bioetanol: revisión bibliográfica</b>	
Introducción .....	2
Proceso de nixtamalización .....	3
Nejayote.....	4
Normatividad para el tratamiento del nejayote .....	7
Estrategias para enfrentar el problema del tratamiento del nejayote .....	9
Tratamiento preliminar del nejayote .....	10
Producción de bioetanol .....	11
Tecnología enzimática aplicada en la hidrólisis de carbohidratos .....	13
Levaduras, microorganismos etanológicos .....	15
Conclusión .....	17
Referencias.....	18

**Capítulo 2. Producción de etanol a partir de los sólidos solubles de un concentrado de nejayote**

Introducción .....	22
Materiales y métodos.....	24
Resultados y Discusión.....	29
Conclusiones .....	42
Referencias.....	43

**Capítulo 3. Tratamiento enzimático de efluentes concentrados de la industria del nixtamal para la obtención de azúcares fermentables**

Introducción .....	46
Materiales y métodos.....	48
Resultados y Discusión.....	52
Conclusiones .....	69
Referencias.....	70

## ÍNDICE DE FIGURAS

### Capítulo 1. Potencial del nejayote para la producción de bioetanol: una revisión bibliográfica

**Figura 1.** Enzimas empleadas en la hidrólisis de almidón..... 15

### Capítulo 2. Producción de etanol a partir de los sólidos solubles de un concentrado de nejayote

**Figura 1.** Producción de etanol por *Saccharomyces cerevisiae* Red Ethanol®, a partir de un hidrolizado de nejayote. .... 34

**Figura 2.** Producción de etanol por *Kluyveromyces marxianus* SLP1, a partir de un hidrolizado de nejayote ..... 34

**Figura 3.** Consumo de glucosa durante la fermentación por *S. cerevisiae* Red Ethanol® y *K. marxianus* SLP1 del concentrado de nejayote pre-tratado con 7 cocteles comerciales. .... 39

**Figura 4.** Consumo de xilosa durante la fermentación por *S. cerevisiae* Red Ethanol® y *K. marxianus* SLP1 del concentrado pre-tratado con 7 cocteles comerciales. .... 40



<b>Figura 5.</b> Consumo de arabinosa durante la fermentación por <i>S. cerevisiae</i> Red Ethanol® y <i>K. marxianus</i> SLP1 del concentrado de nejayote pre-tratado con 7 cocteles comerciales. ....	41
---	----

### **Capítulo 3. Tratamiento enzimático de efluentes concentrados de la industria del nixtamal para la obtención de azúcares fermentables**

<b>Figura 1.</b> Caracterización de azúcares presentes en el concentrado de nejayote, lote L2909, que se generaron antes (A) y después (B) de la hidrólisis ácido-térmica. ....	54
---	----

<b>Figura 2.</b> Hidrólisis del concentrado de nejayote aplicando diversas enzimas a dos temperaturas .....	60
---	----

<b>Figura 3.</b> Glucosa obtenida por hidrólisis enzimática del concentrado de nejayote empleando glucoamilasas de diferente origen comercial. ....	60
---	----

<b>Figura 4.</b> Glucosa obtenida por hidrólisis enzimática del concentrado de nejayote empleando celulasas, xilanasas y/o pectinasas de diferente origen comercial. ....	62
---	----

<b>Figura 5.</b> Rendimientos de xilosa en relación a la hidrólisis ácido-térmica, obtenidos por hidrólisis del nejayote concentrado con 16 cocteles de enzimas comerciales. ....	65
---	----

**Figura 6.** Efecto del pH en la hidrólisis de la hemicelulosa para obtener monómeros de xilosa con los cocteles enzimáticos comerciales CXB, CBL, RUF y RTF. .... 65

**Figura 7.** Rendimientos de arabinosa en relación a la hidrólisis ácido-térmica, obtenidos por hidrólisis del nejayote concentrado con 16 cocteles de enzimas comerciales. .... 66

**Figura 8.** Efecto de los cocteles enzimáticos comerciales CL y NS-N en la hidrólisis de la hemicelulosa para obtener monómeros de arabinosa. .... 68

## ÍNDICE DE TABLAS

### Capítulo 1. Potencial del nejayote para la producción de bioetanol: una revisión bibliográfica

<b>Tabla 1.</b> Parámetros característicos del nejayote.....	6
<b>Tabla 2.</b> Parámetros contaminantes en el nejayote y sus valores máximos establecidos por normatividad.....	8

### Capítulo 2. Producción de etanol a partir de los sólidos solubles de un concentrado de nejayote

<b>Tabla 1.</b> Cocteles enzimáticos comerciales usados durante el desarrollo experimental con las matrices de Hadamard .....	25
<b>Tabla 2.</b> Matriz experimental de 7 variables con 8 experimentos.....	26
<b>Tabla 3.</b> Variables experimentales y sus concentraciones correspondientes...	27
<b>Tabla 4.</b> Variables de respuesta del diseño experimental y sus coeficientes lineales. ....	30
<b>Tabla 5.</b> Efecto de la suplementación de sulfato de amonio a un hidrolizado enzimático de un concentrado de nejayote, fermentado con la cepa de <i>S. cerevisiae</i> Red Ethanol®.....	36

<b>Tabla 6.</b> Efecto de la suplementación de sulfato de amonio a un hidrolizado enzimático de un concentrado de nejayote, fermentado con la cepa de <i>K. marxianus</i> SLP1.....	37
<b>Tabla 7.</b> Concentración de biomasa y rendimiento de etanol obtenidos por la fermentación de las levaduras <i>S. cerevisiae</i> Red Ethanol® y <i>K. marxianus</i> SLP1 del concentrado de nejayote pre-tratado con 7 cocteles comerciales.	42

### **Capítulo 3. Tratamiento enzimático de efluentes concentrados de la industria del nixtamal para la obtención de azúcares fermentables**

<b>Tabla 1.</b> Cocteles enzimáticos comerciales.....	49
<b>Tabla 2.</b> Concentraciones y rendimientos de azúcares generados durante la hidrólisis ácido-térmica del concentrado de nejayote.....	55

## **SINOPSIS**

En la industria de harina de maíz nixtamalizado se producen aguas de desecho, conocidas como nejayote. Estas aguas residuales, contienen altas concentraciones de materia orgánica e inorgánica en suspensión y en solución, convirtiéndolas en efluentes altamente contaminantes. La carga orgánica del nejayote es rica en carbohidratos y compuestos fenólicos que pueden ser recuperados y aprovechados como materias prima para la generación de productos biotecnológicos con valor comercial. En el caso de los carbohidratos, conformados principalmente por glucosa, xilosa y arabinosa, su bioconversión a etanol puede ser factible, si son hidrolizados hasta sus unidades monoméricas y se realiza una adecuada selección de levaduras.

En base a lo anterior, la hipótesis propuesta fue que los carbohidratos del nejayote presentarán un potencial elevado para la producción de bioetanol cuando se aplique el (los) tratamiento(s) y cepa de levadura adecuados, con las mejores condiciones de fermentación.

Para contrastar la hipótesis primero se evaluó la necesidad de suplementar con diferentes micronutrientes y/o aplicar una hidrólisis enzimática a un concentrado de nejayote para la producción de etanol. Se emplearon dos levaduras de los

géneros *Saccharomyces cerevisiae* Red Ethanol® y *Kluyveromyces marxianus* SLP1.

La caracterización inicial de los carbohidratos solubles del nejayote mostró que las concentraciones de unidades monoméricas eran bajas. Entonces fue necesario realizar la caracterización exhaustiva de los mismos, para analizar su composición y diseñar la estrategia que permitiera aumentar su grado de hidrólisis. Después de obtener los mayores rendimientos de azúcares fermentables se obtuvo un concentrado de nejayote susceptible de ser usado como sustrato para la producción de bioetanol. La metodología usada y los resultados, así como la discusión de los mismos, se presentan en dos capítulos por separado (Capítulos 2 y 3) que junto a los antecedentes del proyecto (Capítulo 1) conforman este escrito de tesis.

## **Capítulo 1. Potencial del nejayote para la producción de bioetanol: revisión bibliográfica.**

En este capítulo se presenta el proceso de nixtamalización, sus orígenes, la importancia del cocimiento alcalino del grano de maíz y la generación de los productos de la nixtamalización: el nixtamal empleado para la elaboración de la tortilla y el nejayote, que es el agua de desecho del proceso. Además se revisó la información sobre la composición del nejayote, así como los parámetros y

factores por los que es considerado un efluente contaminante, que requiere de un tratamiento previo para su descarga. También se presentan las estrategias implementadas para aprovechar los compuestos con interés comercial o biotecnológico presentes en el efluente. Se hace énfasis en las investigaciones realizadas recientemente por nuestro grupo de trabajo para reducir su carácter contaminante y se mencionan las operaciones unitarias necesarias para su tratamiento.

Asimismo, se discute la producción de etanol a partir de carbohidratos de almidón, celulosa y hemicelulosa, junto a las tecnologías enzimáticas y de fermentación usadas para el aprovechamiento de los azúcares en la producción de dicho biocombustible.

## **Capítulo 2. Producción de etanol a partir de los sólidos solubles de un concentrado de nejayote.**

En este capítulo se expone la viabilidad del nejayote como sustrato para la producción de etanol generando un rendimiento de  $0.28 \text{ g}_{\text{etanol}}/\text{g}_{\text{glucosa}}$ . Se realizaron experimentos para corroborar que no era necesaria la suplementación con nitrógeno al nejayote para incrementar la producción de etanol. También se comprobó que se requiere el tratamiento enzimático previo a la fermentación del concentrado, para tener mayor concentración de azúcares

disponibles y por tanto mayor producción de etanol. Los rendimientos de etanol en relación a los azúcares totales, usando *Saccharomyces cerevisiae* Red Ethanol® y *Kluyveromyces marxianus* SLP1 no mostraron diferencias significativas, a pesar de que se esperaba un efecto positivo en el rendimiento con *Kluyveromyces marxianus* SLP1 por su capacidad de metabolizar pentosas.

### **Capítulo 3. Tratamiento enzimático de efluentes concentrados de la industria del nixtamal para la obtención de azúcares fermentables.**

En este capítulo se presentan los resultados de la caracterización de los carbohidratos del concentrado de nejayote, a través de un tratamiento químico (ácido-térmico). Se logró identificar la presencia de tres azúcares fermentables: glucosa, xilosa y arabinosa en proporciones 1.7:1.4:1.0, respectivamente. La presencia de estos azúcares sugirió su procedencia a partir de oligosacáridos de almidón, celulosa y hemicelulosa. Específicamente, la obtención de altos rendimientos de glucosa, después de la acción de glucoamilasas, establece su procedencia desde oligosacáridos. Una vez evaluada la acción de 16 cocteles enzimáticos comerciales, se seleccionaron 6 productos, además de glucoamilasas, que al actuar en un posible sinergismo, liberaron 97.08 % de glucosa, 77.03 % de xilosa y 122.94 % de arabinosa. Estos porcentajes se estimaron en relación a las concentraciones de azúcares obtenidas en la hidrólisis ácido-térmica del concentrado de nejayote. El tipo de enzimas



involucradas en la generación de azúcares fermentables incluyen a glucoamilasa,  $\beta$ -glucosidasas, xilanasas y pectinasas.

# **Capítulo I.**

**Potencial del nejayote para la producción de bioetanol: revisión  
bibliográfica**

## **Potencial del nejayote para la producción de bioetanol: revisión bibliográfica**

### ***Introducción***

Actualmente, el tratamiento de efluentes contaminantes es un tema que los gobiernos a nivel mundial han establecido como una estrategia en pro del medio ambiente. Se sabe que el agua más que un recurso limitado es el elemento central de la vida de cualquier especie en el planeta. Por tanto, es importante buscar alternativas convencionales o no convencionales para el tratamiento de aguas residuales provenientes, tanto del sector industrial, como del doméstico. La industria de harina de maíz nixtamalizado produce aguas de desecho, conocidas como nejayote, que contienen una carga orgánica e inorgánica en suspensión muy alta. Bajo estas condiciones, los parámetros relacionados con dicha carga están por encima de la norma y en consecuencia no es posible realizar la descarga del efluente al alcantarillado o cuerpos de agua naturales. Se ha establecido que sí el nejayote no es previamente tratado, se deben pagar cuotas de sanción por lo que para evitar infracciones se viene promoviendo el tratamiento integral de este efluente, sustentado en el aprovechamiento de algunos de sus componentes con valor comercial. Desde esta perspectiva, no sólo se reduciría el carácter contaminante del nejayote,

sino que se generarían ingresos alternos que reduzcan el costo de los tratamientos, incrementando la competitividad de las empresas del rubro.

### ***Proceso de nixtamalización***

El proceso de producción de la tortilla se llama nixtamalización, la palabra proviene de los vocablos náhuatl *nextli* (cenizas de cal) y *tamalli* (masa de maíz cocido). La nixtamalización es un método tradicional y ancestral que consiste en cocer el grano de maíz con agua y cal (Contreras Jiménez, 2009).

Durante la nixtamalización se emplean de dos a tres litros de agua (1-3 % de  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ ) por cada Kg de granos de maíz y se hierve a temperaturas cercanas a los 100 °C por periodos de 35-70 min (Cruz Huerta y Verdalet Guzmán, 2007; Méndez-Albores y col., 2004). Después de la cocción, los granos son dejados en reposo entre 8 a 12 h, después de este periodo el agua de cocimiento conocida como nejayote es drenada. Luego se lavan los granos con agua para eliminar el exceso de cal y restos de pericarpio que se desprenden tras su cocimiento. El maíz lavado es molido para obtener masa, que es la base para obtención de la tortilla. La tortilla se hace a partir de una cantidad suficiente de masa, que se prensa para darle una forma circular de 10 cm de diámetro y 0.3 cm de espesor. Ésta es cocida en un plato circular de metal a 185 °C por 15 s en una cara y 30 s por la otra, regresando a la cara anterior para que con el

vapor producido se infle, señal de que la tortilla está cocida y lista para su consumo (Arámbula Villa y col., 2001). En procesos industriales, la masa se seca y tamiza para obtener harina de maíz nixtamalizado que es el producto comercializado para la elaboración de tortillas a gran escala.

El proceso de nixtamalización tiene algunas ventajas que proporciona el tratamiento alcalino. La adición de  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  facilita el desprendimiento del pericarpio, mantiene el pH cercano a valores de 12.4 necesario para la hidrólisis de la hemicelulosa del pericarpio (Castillo y col., 2009). Además, controla la actividad microbiana y tiene efecto sobre el aroma, color, sabor, vida útil y valor nutricional de las tortillas. Este último resulta por la disponibilidad de niacina, lisina y glutenina; también aumenta la formación de gránulos de almidón gelatinizado. El proceso de nixtamalización es confiable para eliminar la concentración de aflatoxinas presentes en el grano de maíz, sin afectar la calidad de las tortillas (Méndez-Albores y col., 2004).

### **Nejayote**

El proceso tradicional de nixtamalización es casi el mismo que se empleaba desde hace siglos. A escala pequeña no representa graves daños, pero se ha convertido en un problema ecológico a nivel industrial debido a las grandes cantidades de agua residual generadas, producto del cocimiento y lavado del

maíz. Este residual llamado nejayote, contiene una carga orgánica e inorgánica elevada que le da el carácter de efluente contaminante y que se vierte diariamente en grandes volúmenes al drenaje o a los ríos (Méndez-Albores y *col.*, 2004). México se caracteriza por tener una dieta basada en las tortillas, con un consumo per cápita de este producto de 70 Kg (Gómez Flores, 2011). Por tanto, se estima que el volumen de nejayote producido es de 21 millones de m<sup>3</sup>, generando costos por su tratamiento y algunas veces sanciones por descargar el residuo, incumpliendo los parámetros señalados por las normas.

Las características del nejayote son variables por la relación directa con los parámetros del proceso de nixtamalización, tipo de maíz, dureza del endospermo, calidad del grano, tipo y concentración de cal, tiempo y temperatura de cocimiento y remojo, manejo del maíz durante su lavado y transporte, equipo y prácticas de proceso (Rosentrater, 2006).

Para lograr un tratamiento efectivo del nejayote se ha estudiado la composición y concentración de sus componentes. La **Tabla 1** resume esta información clasificada por parámetros físicos y nutricionales.

Nutricionalmente, el nejayote tiene bajas concentraciones de proteína y grasa; sin embargo, es muy rico en carbohidratos. Estos son residuos propios de la composición del endospermo y pericarpio del maíz, tales como hemicelulosa,

celulosa, almidón y lignina. Además, contiene sales de ácido trans-ferúlico, p-cumárico, protocatecoico y 8,5-diferúlico (Asaff Torres y *col.*, 2008; Pflugfelder y *col.*, 1988; Rosentrater y *col.*, 1999).

**Tabla 1.** Parámetros característicos del nejayote.

Propiedad	Compuesto	% base seca*
Nutricional	Proteína soluble	4.76 – 4.90*
	Grasa	0.74 – 5.76*
	Carbohidratos	71.93 – 75.41*
	Almidón	2.57 – 32.0*
	Polisacáridos no amiláceos	49.8 – 79.1 *
	Fibra cruda	19.29 – 22.77*
	Lignina	0.36 – 0.67*
	Extracto libre de nitrógeno	52.45 - 55.67*
	Proteína	0.81 – 7.42*
	Grasa	0.49 – 5.76*
	Cenizas	1.09 – 12.66*
	Calcio	4.68 – 13.13*
	Físicas	Densidad
Límite de elasticidad		1440.04 - 1618.08 N/m <sup>2</sup>
Contenido de humedad		88.15 - 89.29
Actividad de agua		0.99 a 1.00
pH		11.5 a 11.6

Datos tomados y modificados de la revisión de Rosentrater, (2006).

### ***Normatividad para el tratamiento del nejayote***

El Gobierno Federal en México, a través del Plan Nacional de Desarrollo (PND) 2007-2012, en el capítulo cuarto sobre sustentabilidad ambiental, y como parte de las políticas públicas considera estrategias ante el impacto y riesgo ambiental, así como un uso eficiente y racional de los recursos naturales. Un recurso importante en el desarrollo humano sustentable es el uso adecuado del agua. Para evitar que el desarrollo social y económico se vea obstaculizado por escasez de agua se busca que se racionalice el uso de este recurso.

En cuestión de aguas residuales industriales, se generan 178 m<sup>3</sup>/s, de los cuales únicamente se trata el 15 % en cerca de 1,800 plantas de tratamiento, mientras que los 151 m<sup>3</sup>/s restantes son descargados a cuerpos receptores sin ningún tratamiento (Carmona Lara, 2007). Ante esta situación se estableció en el PND 2007-2012 alcanzar un manejo integral y sustentable del agua. Esto tiene por objeto implementar una política integral de reducción de los volúmenes de aguas contaminadas y aumentar el tratamiento de aguas residuales hasta en un 60 %.

Las Normas Oficiales Mexicanas, NOM-001-ECOL-1996 y NOM-002-ECOL-1996, establecen los límites máximos permisibles de contaminantes de las descargas de aguas residuales provenientes de la industria (**Tabla 2**). Los



compuestos orgánicos e inorgánicos y sus concentraciones en el nejayote son más altos con respecto a los límites permisibles de las Normas Oficiales Mexicanas y por tanto, no puede ser arrojado al drenaje o alcantarillado sin previo tratamiento.

**Tabla 2.** Parámetros contaminantes en el nejayote y sus valores máximos establecidos por normatividad.

Parámetro	Valores máximos por normatividad	Valores en nejayote**
pH	5-10*	10.5-11.6
Sólidos suspendidos (mg/L)	60*	5000-35000
Demanda bioquímica de oxígeno (mg O <sub>2</sub> /mL)	60*	190-7875

Datos tomados de las \*NOM-001-ECOL-1996, \*NOM-002-ECOL-1996 y \*\*Rosentrater y col., (2006).

La Ley General de Equilibrio Ecológico y la Protección al Ambiente, establece en el capítulo IV, artículo 171, las sanciones administrativas a la industria que no cumple con la normatividad. Dentro de las sanciones se incluye una multa por el equivalente de veinte a cincuenta mil días de salario mínimo general vigente en el Distrito Federal al momento de imponer la sanción. Sin embargo, las sanciones dependen del daño que causen en la salud pública, la generación de desequilibrios ecológicos, la afectación de recursos naturales o de la biodiversidad y en su caso, los niveles en que se rebasen los límites establecidos en la norma mexicana aplicable.

### ***Estrategias para enfrentar el problema de tratamiento del nejayote***

El nejayote ha sido tratado usando sistemas convencionales en tanques aeróbicos y anaeróbicos; sin embargo, no han sido efectivos porque trabajan a concentraciones bajas de contaminantes, por lo que para disminuir la DQO del nejayote se requiere diluirlo previamente (Civit y col., 1984; Pedroza-Islas y Durán de Bazúa, 1990; Salmerón-Alcocer y col., 2003). Además se necesita controlar el pH para que los microorganismos lleven a cabo la asimilación de los nutrientes presentes en el agua residual.

Velasco-Martínez y col. (1997) utilizaron los sólidos del nejayote para preparar dietas para pollos en engorda. Rosentrater y col. (2001) evaluaron el desarrollo de un alimento para ganado a partir de la biotransformación de los componentes del nejayote. Sin embargo, estos procesos no resultaron rentables y/o no reducían los parámetros contaminantes del nejayote.

Nuestro grupo de trabajo, participó en el desarrollo de una tecnología patentada para la recuperación del ácido ferúlico a partir del nejayote. Dicho compuesto es utilizado como materia prima para la industria alimentaria, cosmética, química, farmacéutica y biotecnológica (Asaff Torres y col., 2008). Sin embargo, el tratamiento y aprovechamiento del nejayote aún no ha sido explotado lo suficiente porque aún queda material de interés que puede ser aprovechado.

Por ejemplo, los carbohidratos presentes en este efluente pueden ser utilizados como fuente de carbono para el crecimiento de microorganismos de interés biotecnológico. Por esto, es necesario desarrollar un proceso donde se aproveche esta materia orgánica, por ejemplo en la producción de etanol y en paralelo se reduzca el carácter contaminante del nejayote.

### ***Tratamiento preliminar del nejayote***

Entre los resultados obtenidos por nuestro grupo de trabajo, se logró desarrollar un proceso enzimático novedoso que permite eliminar completamente el material en suspensión contenido en el nejayote. Hasta la fecha, otros reportes señalan la remoción parcial de los sólidos suspendidos con la aplicación de floculantes (Viniestra-González y Ramírez-Romero, 2007), práctica también común entre las industrias del ramo. Si bien la aplicación de estos compuestos permite la remoción del 50-90% de los sólidos suspendidos, en muchos casos sus valores rebasan los límites establecidos por la norma para su descarga. (Ramírez-Romero y *col.*, 2011).

La importancia de contar con un efluente libre de sólidos suspendidos se debe a que solamente bajo dichas condiciones es posible emplear tecnologías emergentes para su tratamiento, como las de membranas, que incluyen ultrafiltración, nanofiltración y/u ósmosis inversa. Estas tecnologías tienen

costos de operación inferiores al de los otros tratamientos y en el caso particular del nejayote, es la única que permite recuperar agua de calidad para su re-uso en el proceso de nixtamalización en un tiempo mínimo. Gracias a estas características, dicho proceso se está patentando.

Además del agua para re-uso obtenida como permeado, el proceso desarrollado genera un concentrado de nejayote que está formado por los sólidos en solución retenidos por las membranas, los cuales elevan su concentración entre 4 a 5 veces, en relación al nejayote no tratado. Se estimó que entre el 75 al 80 % (base seca) de los sólidos en solución contenidos en el concentrado de nejayote son carbohidratos, siendo las cenizas la segunda fracción en importancia, con una concentración entre el 18 al 23% (también en base seca).

El nejayote concentrado por nanofiltración es el material que se empleó durante el presente trabajo como objeto de estudio, tanto para su hidrólisis enzimática, como para su fermentación.

### ***Producción de bioetanol***

Con el desarrollo e innovación de las herramientas biotecnológicas, principalmente en el área de enzimas y fermentaciones, se abren muchas

oportunidades para su aplicación, por ejemplo en la producción de etanol. El tratamiento integral del nejayote, pretende disponer los carbohidratos presentes en el concentrado de nejayote con la finalidad de producir etanol y en consecuencia reducir su carácter contaminante. El etanol es considerado una fuente de energía, un solvente en las industrias y reactivo químico en la industria química y farmacéutica; biotecnológicamente se puede producir a partir de procesos fermentativos empleando levaduras etanológicas.

El nejayote concentrado, libre de sólidos en suspensión, contiene en solución, hidrolizados de componentes del maíz, como almidón, celulosa y hemicelulosa. El almidón es una estructura polimérica compuesta por dos polisacáridos: amilopectina que es una estructura ramificada y amilosa, que es una estructura lineal. La celulosa está constituida por cadenas de glucosas unidas por enlaces glucosídicos  $\beta$ -1,4. La característica estructural de la celulosa hace que encapsule la lignina provocando que el material lignocelulósico sea más difícil de hidrolizar que el amiláceo (Demírbas, 2005).

La hemicelulosa está constituida por pentosas y hexosas distribuidas de forma ramificada y lineal conformando polímeros tipo polisacáridos denominados no-celulósicos. La hemicelulosa tiene un peso molecular menor que la celulosa y contiene como azúcares constitutivos a la xilosa, arabinosa, galactosa, manosa, glucosa, ácido glucurónico y ácido galacturónico (Matos-Chamorro y Chambilla-

Mamani, 2010). Normalmente es insoluble, pero en condiciones especiales puede ser parcialmente soluble en agua. Las hemicelulosas se pueden clasificar en xilanos,  $\beta$ -D-glucanos y xiloglucanos, que puede variar por el tipo de vegetal de donde provienen.

### ***Tecnología enzimática aplicada en la hidrólisis de carbohidratos***

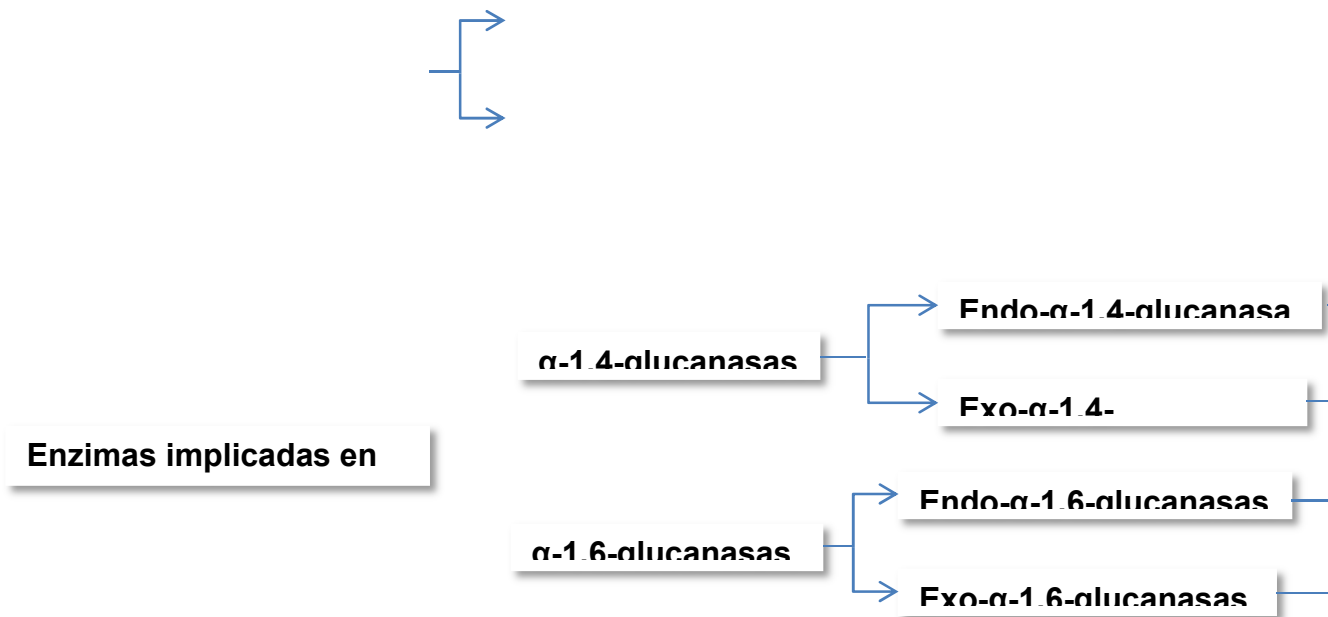
El almidón, celulosa y hemicelulosa requieren de un pre-tratamiento para que microorganismos como las levaduras puedan metabolizar los azúcares sencillos que se obtienen de estos carbohidratos. Hay dos procesos a través de los cuales se puede hidrolizar material celulósico: hidrólisis ácida e hidrólisis enzimática.

La hidrólisis ácida se aplica para generar azúcares fermentables a partir de los biopolímeros de celulosa, hemicelulosa y almidón. Sin embargo, este proceso tiene la desventaja de ser corrosivo y en consecuencia liberar productos como furanos, compuestos fenólicos y ácidos carboxílicos que pueden inhibir el proceso fermentativo y en consecuencia reducir el rendimiento en la producción de etanol (Tahezadeh Mohammad y Niklasson, 2004). Además, involucra temperaturas y presiones elevadas, por lo que el requerimiento energético es muy alto.

En la hidrólisis enzimática se requieren de actividades específicas para lograr altos rendimientos de la hidrólisis de almidón, celulosa y hemicelulosa. Contrariamente al hecho de que las enzimas son de acción lenta y algunas veces su valor económico es alto, tienen la ventaja de ser específicas y el gasto energético que requieren es mucho más bajo que el tratamiento ácido, además de no causar un impacto ambiental.

Típicamente la conversión de almidón a glucosa, requiere de dos etapas: licuefacción y sacarificación en donde intervienen las enzimas amilasas y glucoamilasas, respectivamente. Sin embargo, para una hidrólisis completa de almidón se requiere de enzimas específicas que rompan las estructuras de amilopectina y amilosa. En la **Figura 1** se hace una recopilación de las enzimas que pueden aplicarse en la hidrólisis del almidón.

La hidrólisis enzimática de celulosa y hemicelulosa se lleva a cabo con la aplicación de enzimas celulasas y hemicelulasas (glicosil-hidrolasas) respectivamente. Un sistema completo de celulasas incluye 1,4- $\beta$ -D-glucano celobiohidrolasas, endo-1,4- $\beta$ -D-glucanasas y 1,4- $\beta$ -D-glucosidasas. Las dos primeras enzimas convierten la celulosa a celobiosa, la tercera genera monómeros de glucosa. La  $\beta$ -glucosidasa no es una celulasa pero tiene una acción muy importante para llevar a cabo una despolimerización completa de celulosa a glucosa.



**Figura 1.** Enzimas empleadas en la hidrólisis de almidón. Tomado de Lin y Tanaka, 2006.

La hemicelulosa contiene diferentes tipos de azúcares, característica que requiere un sistema más complejo de enzimas para su degradación. Se involucran actividades endo-1,4-β-D-xilanasas, exo-1,4-β-D-xilosidasas, endo-1,4-β-D-manasas, β-manosidasas, α-glucoronidasas, acetil xilano esterasas, α-



L-arabinofuranosidasas y  $\alpha$ -galactosidasas (Taherzadeh Mohammad y Niklasson, 2004).

### ***Levaduras, microorganismos etanologénicos***

La fermentación es un proceso en el que los azúcares son convertidos por microorganismos a etanol. En el caso de las levaduras, *Saccharomyces cerevisiae* es el microorganismo comúnmente empleado para producir etanol. Esta levadura puede metabolizar azúcares sencillos como glucosa o sacarosa. *Saccharomyces cerevisiae* metaboliza la glucosa hasta etanol por la vía Embden-Meyerhof (van Maris y col., 2006) en condiciones anaeróbicas. En este proceso el etanol es producido conjuntamente a CO<sub>2</sub> en una relación molar 1:1. El aporte energético de esta vía a las células es muy pequeño comparado con el de la glucólisis y el ciclo de Krebs, lo que resulta en una producción celular mínima.

Por otro lado, la biotransformación de los azúcares generados por la hidrólisis de la hemicelulosa requiere de un microorganismo capaz de metabolizar pentosas como fuente de carbono, tal es el caso de la xilosa o arabinosa. Algunas de las levaduras que pueden convertir pentosas a etanol son *Pichia stipitis*, *Pachysolen tanophilus* y *Candida shehatae* (Demirbas, 2005). El metabolismo de xilosa implica rutas diferentes a las empleadas para la glucosa.

Las levaduras que utilizan la xilosa requieren de condiciones aeróbicas debido a que el oxígeno es el promotor de la respiración celular; sin embargo, bajo estas condiciones la xilosa es convertida a etanol con rendimientos bajos (Lin y Tanaka, 2006). Debido a esto, en la fermentación se usan levaduras genéticamente modificadas que son capaces de metabolizar glucosa, xilosa, arabinosa, manosa y galactosa.

En medios de cultivo con glucosa y xilosa como fuentes de carbono se ha empleado una cepa de *Kluyveromyces* sp. IPE453, capaz de biotransformar diferentes tipos de hexosas y pentosas a etanol. Esta levadura convierte el 85 % de glucosa a etanol, alcanzando rendimientos del 46 %. A partir de la xilosa genera rendimientos del 10 % de etanol porque su principal conversión de este azúcar es a xilitol, con un rendimiento del 65 % (Kumar y col., 2009). Por lo tanto, los rendimientos de etanol en relación a azúcares totales (hexosas y pentosas) son bajos.

## **Conclusión**

El nejayote tiene parámetros nutricionales y físicos que requieren ser analizados para elegir la estrategia adecuada para su tratamiento y en consiguiente disminuir su carácter contaminante. Los componentes principales de este efluente son los carbohidratos, almidón y constituyentes de la pared

celular del grano de maíz que durante el proceso de nixtamalización son hidrolizados y se quedan en solución en el nejayote. Estos carbohidratos pueden ser una fuente potencial de carbono para la producción de bioetanol. Sin embargo, es necesario conocer el tipo de carbohidratos que se encuentran en solución, concentración, grado de hidrólisis y confirmar que el nejayote tiene los nutrientes necesarios para el crecimiento de las levaduras que realizaran la conversión de éstos a bioetanol.

## **Referencias**

- Arámbula Villa, G., Barrón Avila, L., González Hernández, J., Moreno Martínez, E. y Luna Barcenás, G. (2001). "Efecto del tiempo de cocimiento y reposo del grano de maíz (*Zea mays L.*) nixtamalizado, sobre las características fisicoquímicas, reológicas, estructurales y texturales del grano, masa y tortillas de maíz." Archivos Latinoamericanos de Nutrición **51**(2): 8.
- Asaff Torres, A., Macías Ochoa, R. y de la Torre Martínez, M. (2008). Proceso para la recuperación de ácido ferúlico. México, Título de patente 259521.
- Carmona Lara, M. C. (2007) "La constitución y el agua: Apuntes para la gobernabilidad en el caso del agua en México."
- Castillo, V. K. C., Ochoa, M. L. A., Figueroa, C. J. D., Delgado, L. E., Gallegos, I. J. A. y Morales, C. J. (2009). "Effect of calcium hydroxide concentration and cooking time of corn grain (*Zea mays L.*) nixtamalized, over physicochemical and rheological nixtamal characteristics." Archivos Latinoamericanos de Nutrición **59**(4): 425-432.
- Civit, E., de Bazúa, C. D., Engelmann, G., González, S. y Hartmann, L. (1984). "Anaerobic treatment of maize processing waste water (Nejayote) in a packed bed reactor cascade." Environmental Technology Letters **5**: 89-96.

- Contreras Jiménez, B. L. (2009). Caracterización de harina de maíz instantánea obtenida por calentamiento óhmico. Centro de Investigación en Ciencia Aplicada y Tecnología Avanzada. Querétaro, Instituto Politécnico Nacional. **Tesis de Maestría**.
- Cruz Huerta, E. y Verdalet Guzmán, I. (2007) "Tortillas de maíz: una tradición muy nutritiva." La Ciencia y el Hombre **20**,
- Demírbas, A. (2005). "Bioethanol from cellulosic materials: A renewable motor fuel from biomass." Energy Sources **27**(4): 327-337.
- Gómez Flores, L. (2011). Se contrae 22.5 % el consumo per cápita de tortilla: Sedeco. La Jornada. Distrito Federal, México, <http://www.jornada.unam.mx/2011/02/23/capital/040n1cap>.
- Kumar, S., Singh, S., Mishra, I. y Adhikari, D. (2009). "Ethanol and xylitol production from glucose and xylose at high temperature by *Kluyveromyces* sp. IIPE453." Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology **36**(12): 1483-1489.
- Lin, Y. y Tanaka, S. (2006). "Ethanol fermentation from biomass resources: current state and prospects." Applied Microbiology and Biotechnology **69**: 627-642.
- Matos-Chamorro, A. y Chambilla-Mamani, E. (2010). "Importancia de la fibra dietética, sus propiedades funcionales en la alimentación humana y en la industria alimentaria." Revista de Investigación en Ciencia y Tecnología de Alimentos **1**(1): 4-17.
- Méndez-Albores, J. A., Arámbula-Villa, G., Loarca-Piña, M. G., González-Hernández, J., Castaño-Tostado, E. y Moreno-Martínez, E. (2004). "Aflatoxins' fate during the nixtamalization of contaminated maize by two tortilla-making processes." Journal of Stored Products Research **40**: 87-94.
- Pedroza-Islas, R. y Durán de Bazúa, C. (1990). "Aerobic treatment of maize-processing wastewater in a 50-liter rotating biological reactor." Biological Wastes **32**(1): 17-27.
- Pflugfelder, R. L., Rooney, L. W. y Waniska, R. D. (1988). "Dry matter losses in commercial corn masa production." Cereal Chemistry **65**(2): 127-132.
- Ramírez-Romero, G., Ortega-Flores, J. L., Cornejo-Villegas, M. A., Reyes-Regalado, A. y Ambríz-García, J. J. (2011). Eliminación de sólidos suspendidos en nejayote y manejo para su reutilización. Simposium Internacional sobre Tecnologías Convencionales y Alternativas en el Procesamiento de Maíz. Chihuahua, Chihuahua.
- Rosentrater, K. A. (2001). Developing value-added processing techniques for corn masa processing byproduct streams. Ames, Iowa, E.U.A., Iowa State University. **Tesis de Doctorado**.
- Rosentrater, K. A. (2006). "A review of corn masa processing residues: Generation, properties, and potential utilization." Waste Management **26**(3): 284-292.

- Rosentrater, K. A., Flores, R. A., Richard, T. L. y Bern, C. J. (1999). "Physical and nutritional properties of corn masa by-product streams." American Society of Agricultural Engineers **15**(5): 515-523.
- Salmerón-Alcocer, A., Rodríguez-Mendoza, N., Pineda-Santiago, V., Cristiani-Urbina, E., Juárez-Ramírez, C., Ruiz-Ordaz, N. y Galíndez-Mayer, J. (2003). "Aerobic treatment of maize-processing wastewater (nejayote) in a single-stream multi-stage bioreactor." Journal of Environmental Engineering and Science **2**(5): 401-406.
- Taherzadeh Mohammad, J. y Niklasson, C. (2004). Ethanol from Lignocellulosic Materials: Pretreatment, Acid and Enzymatic Hydrolyses, and Fermentation. Lignocellulose Biodegradation, American Chemical Society. **889**: 49-68.
- van Maris, A., Abbott, D., Bellissimi, E., van den Brink, J., Kuyper, M., Luttik, M., Wisselink, H., Scheffers, W., van Dijken, J. y Pronk, J. (2006). "Alcoholic fermentation of carbon sources in biomass hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*: current status." Antonie van Leeuwenhoek **90**(4): 391-418.
- Velasco-Martínez, M., Angulo, O., Vázquez-Couturier, D. L., Arroyo-Lara, A. y Monroy-Rivera, J. A. (1997). "Effect of dried solids of nejayote on broiler growth." Metabolism and Nutrition **76**: 1531-1534.
- Viniegra-González, G. y Ramírez-Romero, M. A. G. (2007). Proceso de utilización del nejayote. México, Solicitud Patente Mexicana MX/A/2007/010310.

## **Capítulo II.**

**Producción de etanol a partir de los sólidos solubles de un  
concentrado de nejayote**

## **Producción de etanol a partir de los sólidos solubles de un concentrado de nejayote**

### **Introducción**

El nejayote, efluente residual del proceso de nixtamalización, tiene una carga orgánica, soluble e insoluble de 20-30 g/L (Rosentrater, 2004; Rosentrater, 2002). El material soluble está formado por hidrolizados de los carbohidratos del grano de maíz (Rosentrater, 2002), sales de calcio y sales de ácidos fenólicos (Asaff Torres y *col.*, 2008), mientras que la materia insoluble corresponde a los residuos del tejido del pericarpio del maíz (Rosentrater, 2002).

Asaff Torres (comunicación personal) generó una tecnología que permite recuperar aproximadamente 80% del agua del proceso de nixtamalización, dejándola disponible para reuso. El restante 20% del efluente es recuperado como un concentrado con alto contenido del material soluble, principalmente carbohidratos fermentables que representan más del 84% del contenido. En estudios preliminares se caracterizó el tipo de carbohidratos presentes, encontrando que la glucosa, xilosa y arabinosa son las principales unidades monoméricas que constituyen dicha fracción. En los últimos años, la producción de biocombustibles se realiza a partir de estas fuentes de carbono, usando levaduras capaces de metabolizar hexosas y pentosas (Kuhad y *col.*, 2010; Zhang y *col.*, 2010).

La producción biotecnológica de etanol generalmente se realiza mediante el empleo de levaduras del género *Saccharomyces*, gracias a su gran capacidad de producción de etanol en condiciones limitantes de oxígeno, llegando a tolerar concentraciones de hasta 15 % v/v de alcohol (Gao y Fleet, 1988; Yang y col., 2011) y la presencia de otros compuestos inhibitorios (Eliasson y col., 2000). Sin embargo, su principal desventaja es que su metabolismo solo permite la conversión de hexosas (Gong y col., 1999; van Maris y col., 2006). No obstante, levaduras, como *Kluyveromyces marxianus*, *Pichia stipitis*, *Candida shehatae* y *Pachysolen tannophilus* son capaces de metabolizar hexosas y pentosas en condiciones estrictamente aerobias o en bajas concentraciones de oxígeno (du Preez y Prior, 1985; Kordowska-Wiater y Targonski, 2001; Rodrussamee y col., 2011). La desventaja de este tipo de levaduras es que sus rendimientos de etanol son bajos (Kordowska-Wiater y Targonski, 2001) requiriendo de medios libres de compuestos tóxicos (Rudolf y col., 2008). Así, para fermentar el nejayote, se requiere seleccionar una levadura capaz de aprovechar las fuentes de carbono y que produzca rendimientos altos de etanol.

De igual manera, si bien se ha caracterizado la fracción fermentable del concentrado de nejayote, no se ha estudiado el grado de hidrólisis que presenta y que podría permitir el aprovechamiento de las fuentes de carbono. Tampoco se conoce el contenido de los factores nutricionales necesarios para llevar a cabo una adecuada bioconversión de los azúcares a etanol. En el metabolismo



de las levaduras, la concentración y tipo de fuente de carbono, así como la disponibilidad de oxígeno en el medio de cultivo tienen un impacto determinante (Rodrigues y col., 2006). Por lo tanto, el propósito de este trabajo fue evaluar el efecto de la hidrólisis enzimática sobre la fracción fermentable de un concentrado de nejayote, así como la suplementación con diferentes compuestos para la producción de etanol, empleando levaduras de los géneros *Saccharomyces* y *Kluyveromyces*. Para el efecto, se emplearon matrices de Hadamard como diseños experimentales.

## **Materiales y métodos**

*Enzimas.* Las enzimas empleadas en este proyecto fueron glucanasas, celulasas y hemicelulasas de diferentes casas comerciales, como Novozymes®, ENMEX®, GenenCor® y Sinobios® (**Tabla 1**).

*Concentrado de nejayote.* El nejayote fue proporcionado por una empresa productora de harina de maíz nixtamalizado. A este efluente, se le aplicó un primer tratamiento para remover todos los sólidos en suspensión, obteniéndose dos productos: pastas (sólidos en suspensión sedimentados) y nejayote clarificado. Este último fue pasado a través de membranas de nanofiltración con un tamaño de poro de 200 Da. De este proceso se generaron dos corrientes: agua de buena calidad (para re-uso en el proceso de nixtamalización) y un

concentrado (materia prima del presente estudio). Del concentrado de nejayote obtenido se removieron los compuestos fenólicos mediante resinas a pH 4.5, según procedimiento descrito por Asaff Torres y col. (2008) hasta alcanzar concentraciones residuales de ácido ferúlico < 0.1 g/L.

**Tabla 1.** Cocteles enzimáticos comerciales usados durante el desarrollo experimental con las matrices de Hadamard.

	<b>Clave</b>	<b>Actividad enzimática</b>	<b>Proveedor</b>
<b>1</b>	CXB	Xilanasa, celulasa y glucanasa	ENMEX®
<b>2</b>	CBL	Celulasa y beta glucanasa	ENMEX®
<b>3</b>	A1500	Celulasa	GenenCor®
<b>4</b>	AXC	Endoglucanasa y xilanasa	GenenCor®
<b>5</b>	ABG	Beta glucosidasa	GenenCor®
<b>6</b>	AXY	Hemicelulasa	GenenCor®
<b>7</b>	SCP	Celulasa y xilanasa	Novozymes®
<b>8</b>	PHC	Xilanasa	Novozymes®
<b>9</b>	C	Celulasa, endoglucanasa	Novozymes®
<b>10</b>	An	Feruloil esterasa	CIATEJ
<b>11</b>	NS-N	Beta glucanasa	Novozymes®
<b>12</b>	RUF	Pectinasa	DSM®
<b>13</b>	RTF	Pectinasa y feruloil esterasa	DSM®
<b>14</b>	GL400	Glucoamilasa	ENMEX®

*Levaduras y preparación de los inóculos.* Las levaduras utilizadas para la fermentación alcohólica fueron *Saccharomyces cerevisiae* Red Ethanol® de la casa comercial Fermentis® y *Kluyveromyces marxianus* SLP1, donada por el Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco (CIATEJ). Ambas cepas fueron mantenidas en cajas de Petri a 4 °C. Los cultivos en caja fueron realizados en Agar Papa Dextrosa, sembradas por

estría, incubadas a 32 °C durante 24 h, conservadas en refrigeración hasta su uso.

Los inóculos fueron preparados adicionando una asada de colonias del cultivo en cajas Petri, a un matraz de 250 mL, conteniendo 50 mL de medio Caldo Papa Dextrosa (dextrosa 2 %, infusión de papa 0.65 %) estéril, incubado durante 24 h en agitación de 150 rpm, a 32 °C.

*Diseño experimental con matrices de Hadamard.* El diseño estuvo formado de 7 variables ( $k = 7$ ) y 8 experimentos ( $N = 8$ ) (**Tabla 2**). Las variables fueron: coctel de enzimas (incluye mezcla de cocteles comerciales, **Tabla 1**), extracto de levadura (Biotechnica<sup>®</sup>), urea, ZnCl<sub>2</sub>, MgSO<sub>4</sub>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> y (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; con dos niveles (+1 y -1) (**Tabla 3**).

**Tabla 2.** Matriz experimental de 7 variables con 8 experimentos. Cada columna representa una variable o compuesto (k) y las líneas un experimento (N).

Tratamientos	Variables							Variable de respuesta
	Enzimas	Extracto de levadura	Urea	ZnSO <sub>4</sub>	MgSO <sub>4</sub>	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	
1	+	+	-	-	-	+	+	y1
2	+	+	+	-	-	-	+	y2
3	+	+	+	+	-	-	-	y3
4	-	+	+	+	+	-	-	y4
5	-	-	+	+	+	+	-	y5
6	-	-	-	+	+	+	+	y6
7	+	-	-	-	+	+	+	y7
8	-	-	-	-	-	-	-	y8

**Tabla 3.** Variables experimentales y sus concentraciones correspondientes.

	<b>Variables</b>	<b>Unidades</b>	<b>-1</b>	<b>+1</b>
x1	Enzimas	μL/L	0	100
x2	Extracto de levadura	g/L	0	4.23
x3	Urea	g/L	0	1
x4	ZnSO <sub>4</sub>	g/L	0	0.2
x5	MgSO <sub>4</sub>	g/L	0	0.5
x6	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	g/L	0	4
x7	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	g/L	0	2.2

La solución de las matrices de Hadamard se basó en el cálculo de los coeficientes de la variable de respuesta (**b<sub>i</sub>**) para cada factor (**k**), de la siguiente manera:

$$b_i = \frac{\sum y_i \text{ del factor a analizar}}{N}$$

También se calcula  $b_0$ , en base al promedio de  $y_i$  de los 8 tratamientos. Sí,  $b_i - b_0 > 0$  tiene efecto positivo; si,  $b_i - b_0 \leq 0$  su efecto es nulo o negativo.

Las unidades experimentales (UE) fueron matraces de 250 mL conteniendo 50 mL de medio de cultivo de cada uno de los tratamientos. Las UE se incubaron a 50 °C por 30 min (Estufa Frelab<sup>®</sup>) para permitir la hidrólisis en aquellos tratamientos que contenían el coctel enzimático como una de las variables. Al cabo de este tiempo, las UE se esterilizaron a 121 °C por 15 min y luego se enfriaron a temperatura ambiente. Posteriormente, las UE se inocularon con la

cepa de *K. marxianus* SLP1 (3 % v/v), para incubarse a 32 °C por 72 h sin agitación (Incubadora Felisa®). Se cuantificó producción de biomasa, glucosa inicial y producción de etanol, como variables de respuesta. El experimental a partir de la matriz de Hadamard se realizó por duplicado y con dos repeticiones.

*Efecto del sulfato de amonio en la producción de etanol.* Para evaluar el efecto de la adición de sulfato de amonio sobre la fermentación, se usaron concentrados de nejayote hidrolizados enzimáticamente, empleando la mezcla formada por los cocteles enzimáticos de la **Tabla 1**. Para la hidrólisis enzimática se adicionó 1 mL de enzima por litro de concentrado de nejayote con pH ajustado a 4.5 y mantenido a 50 °C, por 60 min. El hidrolizado fue adicionado con 1 g/L de sulfato de amonio y se empleó hidrolizado sin adición del mismo, como control. Se colocaron alícuotas de 50 mL de medio en matraces de 250 mL y se esterilizaron a 121°C, 15 min. Posteriormente, se inocularon al 3% (v/v) con *S. cerevisiae* y *K. marxianus* SLP1, para incubar sin agitación a 32 °C, por 72 h. Se cuantificó producción de biomasa, glucosa inicial y producción de etanol, como variables de respuesta. Este experimento se realizó por duplicado con dos repeticiones.

*Cuantificación de biomasa.* Medida como concentración celular en hemocitómetro de Neubauer con una magnificación de 40X en microscopio óptico (Karl Zeiss Primo Start®).

*Cuantificación de glucosa y etanol.* Por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC, por sus siglas en inglés), empleando una columna Rezex ROA-Ácidos orgánicos H<sup>+</sup> (8%) (Phenomenex), 300 x 7.8 mm, elución isocrática a 60 °C, usando como fase móvil H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.005 N, con un flujo de 0.6 mL/min, detector IR a 40 °C (Perkin Elmer Lambda 25 UV-Vis y Reflective Index Detector Series 200).

*Análisis estadístico.* El efecto entre tratamientos se realizó a través del análisis de varianza (ANOVA). Las diferencias entre tratamientos se establecieron con la prueba de Tukey-Kramer. Para el ensayo del efecto del sulfato de amonio se realizó el análisis de datos por la prueba de Kruskal-Wallis (para datos no normales). Para todos los análisis se usó el paquete estadístico NCSS© 2007.

## **Resultados y Discusión**

En la **Tabla 4** se presentan los datos obtenidos con los tratamientos de las matrices de Hadamard.

**Tabla 4.** Variables de respuesta del diseño experimental y sus coeficientes lineales.

Tratamiento	Glucosa (g/L)	Etanol (g/L)	Biomasa (cel/mL x 10 <sup>7</sup> )	Variables	b <sub>i</sub> - b <sub>0</sub> Glucosa (g/L)	b <sub>i</sub> - b <sub>0</sub> Etanol (g/L)	b <sub>i</sub> - b <sub>0</sub> Biomasa (cel/mL)
1	7.57±0.30	2.25±0.40	2.1(±1.4)	Enzimas	1.81	0.53	3.53x10 <sup>6</sup>
2	7.77±0.69	2.31±0.32	2.6(±1.3)	Extracto de levadura	0.69	0.26	3.09x10 <sup>6</sup>
3	7.54±0.42	1.93±0.26	3.4(±0.68)	Urea	-0.11	-0.06	2.25x10 <sup>6</sup>
4	4.11±1.34	1.11±0.13	2.2(±0.85)	ZnSO <sub>4</sub>	-0.97	-0.39	7.19x10 <sup>5</sup>
5	4.37±1.53	0.98±0.02	1.7(±0.61)	MgSO <sub>4</sub>	-0.71	-0.33	-1.81x10 <sup>6</sup>
6	4.33±1.42	0.99±0.13	2.0(±1.1)	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.16	-0.04	-2.06x10 <sup>6</sup>
7	8.60±1.27	2.18±0.16	2.4(±0.42)	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1.01	0.29	1.25x10 <sup>5</sup>
8	4.19±1.16	1.38±0.10	1.7(±0.81)				
					<b>b<sub>0</sub> = 6.06</b>	<b>b<sub>0</sub> = 1.64</b>	<b>b<sub>0</sub> = 2.26x10<sup>7</sup></b>

De acuerdo a los coeficientes estimados, en el caso de la glucosa y el etanol, las diferencias de  $b_i - b_0$  tienen valores positivos considerables (al menos  $10\% > b_0$ ) para el coctel de enzimas, el extracto de levadura y el sulfato de amonio. Las diferencias, para el resto de los factores ensayados, son despreciables ( $< 10\% b_0$ ) o negativas por lo que la suplementación al nejayote debe ser descartada. En el caso de la concentración de biomasa, únicamente el coctel de enzimas y el extracto de levadura muestran valores positivos mayores al 10% de  $b_0$ .

De las variables de respuesta analizadas, se observa que hay una relación directa entre la cantidad de etanol producido y la cantidad de glucosa liberada,

aunque no hubo efecto directo sobre la cantidad de biomasa. Los tratamientos 1, 2, 3 y 7, que presentan las mayores cantidades obtenidas de glucosa y etanol (**Tabla 4**), corresponden a aquellos ensayos en los que se añadió el coctel enzimático, que permitió la hidrólisis de carbohidratos del nejayote previa a la fermentación. De acuerdo a los resultados, *K. marxianus* SLP1 no fue capaz de degradar los carbohidratos no hidrolizados enzimáticamente del nejayote y pudiera tratarse de trímeros u oligómeros de hexosas y/o pentosas que la levadura no puede metabolizar.

El rendimiento promedio de etanol, calculado sobre el consumo total de glucosa, en los experimentos 1, 2, 3 y 7 fue de  $0.31 \text{ g}_{\text{etanol}}/\text{g}_{\text{glucosa}}$ , valor que es considerado bajo frente a otros reportados por la literatura (Rodrussamee y col., 2011). White y col. (2008) partieron de un material lignocelulósico previamente hidrolizado donde las concentraciones de glucosa, xilosa y arabinosa obtenidas fueron de 27.4, 16.7 y 11.9 g/L, respectivamente. La concentración de etanol generada fue de 5.9 g/L con un rendimiento de  $0.23 \text{ g}_{\text{etanol}}/\text{g}_{\text{sustrato consumido}}$ . Este bajo rendimiento es atribuido a la presencia de compuestos inhibitorios liberados durante la hidrólisis del material lignocelulósico. En nuestro estudio, los compuestos fenólicos que pueden inhibir el crecimiento celular o la actividad enzimática fueron removidos del concentrado de nejayote, por lo que los bajos rendimientos obtenidos son atribuibles a las condiciones de operación del experimento.



Rodrussamee y col. (2011) reportaron que *K. marxianus* convierte eficientemente la glucosa a 45 °C durante la fermentación con y sin agitación, mientras que la producción de etanol se ve favorecida en condiciones estáticas tanto a 30 como 45 °C. Por otra parte, la xilosa y arabinosa son metabolizadas durante la fermentación de manera más eficientemente con agitación; sin embargo, la producción de etanol a partir de arabinosa fue mejor en condiciones estáticas.

Como se mencionó anteriormente, la diferencia de los coeficientes lineales del extracto de levadura y del sulfato de amonio tuvieron también un efecto positivo sobre la producción de etanol. Sin embargo, se observa que de acuerdo al diseño experimental, al menos 3 de los 4 experimentos en los que se añadió extracto de levadura o sulfato de amonio, incluían también enzimas.

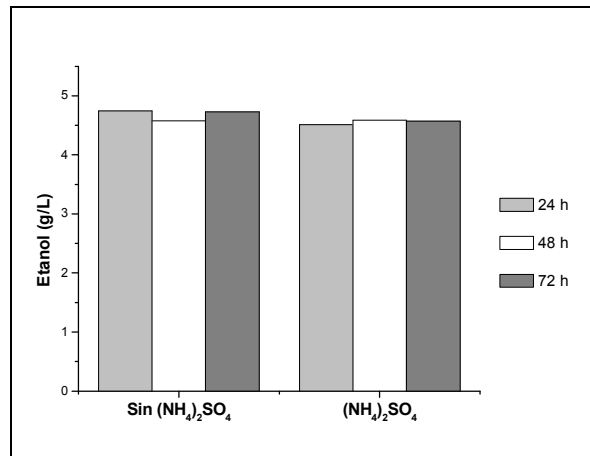
Por ello fue necesario revisar en detalle los resultados de algunos experimentos para descartar que los coeficientes positivos obtenidos del análisis de la matriz de Hadamard, tanto para el extracto de levadura, como para el sulfato de amonio, no fueran verdaderamente resultado de un efecto de las enzimas (falso positivo). Si se compara el tratamiento 6, que no contiene el coctel enzimático pero incluye sulfato de amonio, con los tratamientos 4 y 5, que no contienen ni el coctel ni sulfato de amonio, no se observan diferencias en la concentración de glucosa y producción de etanol en los 3 tratamientos. En cambio en el

experimento 7, que incluye enzimas y sulfato de amonio, las concentraciones de glucosa y etanol prácticamente duplican las concentraciones obtenidas en los experimentos 4, 5 y 6. Por consiguiente, el sulfato de amonio no tiene efecto en la producción de etanol.

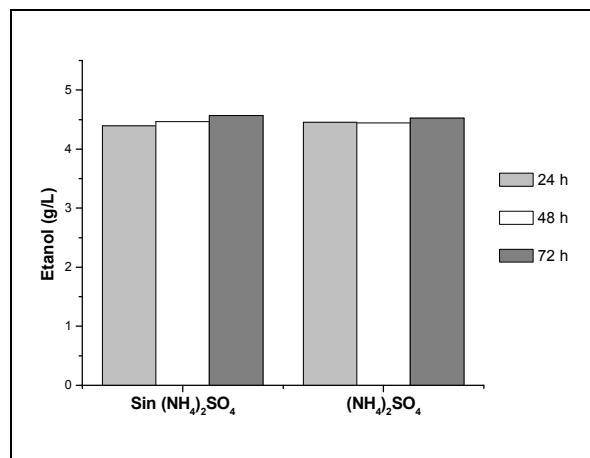
Por otro lado, si se comparan los resultados del tratamiento 4, que contiene extracto de levadura pero no enzimas ni sulfato de amonio, con el tratamiento 3 que contiene enzimas y extracto de levaduras pero no sulfato de amonio, se observan diferencias claras en la concentración de glucosa y etanol entre estos tratamientos. Así, se concluye que en estos experimentos el efecto positivo en la producción de etanol está relacionado con el incremento del grado de hidrólisis de los carbohidratos del nejayote provocado por las enzimas y no por el extracto de levadura.

En el diseño experimental con la matriz de Hadamard se empleó únicamente la cepa de *K. marxianus* SLP1, ya que el objetivo fue probar si era necesario suplementar el nejayote con nutrientes y si el grado de hidrólisis de carbohidratos obtenidos era suficiente para la producción de etanol. Los resultados obtenidos mostraron claramente que la suplementación con nutrientes al concentrado de nejayote es innecesaria y que el grado de hidrólisis de los carbohidratos resulta insuficiente por lo que es necesario aplicar enzimas hidrolíticas. Para corroborar si dichos efectos son similares para

*Saccharomyces cerevisiae* Red Ethanol®, se realizó un segundo experimento comparativo en el cual se utilizó un hidrolizado enzimático de nejayote por el efecto positivo que se observó en el ensayo anterior, con y sin adición de sulfato de amonio, y se evaluó la producción de etanol cada 24 h con las dos levaduras. Los resultados se presentan en las **Figuras 1 y 2**.



**Figura 1.** Producción de etanol por *Saccharomyces cerevisiae* Red Ethanol®, a partir de un hidrolizado de nejayote.



**Figura 2.** Producción de etanol por *Kluyveromyces marxianus* SLP1, a partir de un hidrolizado de nejayote.

Las **Figuras 1 y 2** muestran que no hubo diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) en la producción de etanol entre los medios adicionados con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  y los medios sin adicionar. Este resultado se repitió tanto para las fermentaciones con *S. cerevisiae* Red Ethanol® como en las que se usó *K. marxianus* SLP1. Tampoco hubo efecto del sulfato de amonio en los rendimientos de etanol calculados en base a glucosa (**Tabla 5 y 6**). Por lo tanto se confirma que la suplementación del nejayote con fuentes orgánicas o inorgánicas de nitrógeno y/o algunos minerales, como Mg, Zn o fosfatos es innecesaria. Este hecho concuerda con la caracterización hecha por Rosentrater y col. (1999), quienes establecieron que el nejayote tiene los nutrientes necesarios para ser empleado como medio de cultivo.

Los rendimientos de etanol obtenidos con *K. marxianus* SLP1 en el experimento del efecto del sulfato de amonio sobre la producción de etanol, en comparación con los de la matriz de Hadamard (experimentos 1, 2, 3 y 7) fueron mayores ( $0.61 \text{ g}_{\text{etanol}}/\text{g}_{\text{glucosa}}$  contra  $0.32 \text{ g}_{\text{etanol}}/\text{g}_{\text{glucosa}}$ ); sin embargo, la producción de biomasa fue similar ( $2.6 \times 10^7 \text{ cel/mL}$  vs.  $2.87 \times 10^7 \text{ cel/mL}$ ). Como se detalló en el experimento correspondiente a la matriz de Hadamard, la adición de otros factores, como el extracto de levadura, sulfato de zinc, sulfato de magnesio y/o fosfatos, al parecer tuvieron un efecto negativo en la producción de etanol. Probablemente, el flujo de carbono se redireccionó hacia la formación de otros metabolitos no cuantificados. Por ejemplo, se conoce que la cepa de *K.*

*marxianus* SLP1, produce también xilitol bajo ciertas condiciones (comunicación personal, CIATEJ). El metabolismo de las levaduras se encuentra en constante cambio para convertir las hexosas y pentosas, mediante la ruta de la glicólisis como vía principal y cambios en el precursor para llegar a la formación de etanol (Rodrussamee y col., 2011).

**Tabla 5.** Efecto de la suplementación de sulfato de amonio a un hidrolizado enzimático de un concentrado de nejayote, fermentado con la cepa de *S. cerevisiae* Red Ethanol®.

Variables de respuesta	Tratamientos	
	Sin (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Con (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
Glucosa inicial (g/L)	7.28±0.27	7.58±0.52
Glucosa residual (g/L)	0.00	0.00
Xilosa inicial(g/L)	1.37±0.16	1.55±0.31
Xilosa residual(g/L)	NC	NC
Arabinosa inicial (g/L)	0.79±0.11	0.81±0.21
Arabinosa residual (g/L)	NC	NC
<sup>a</sup> Biomasa (cel/mL x10 <sup>7</sup> )	2.62(±0.76)	2.68(±0.50)
Concentración de etanol producido (g/L)	4.72 ± 0.42	4.57 ± 0.29
<sup>b</sup> Rendimiento de etanol Y <sub>P/S</sub> (g <sub>etanol</sub> /g <sub>glucosa</sub> )	0.61	0.61

<sup>a,b</sup>Sin diferencias significativas (P>0.05)  
NC: No cuantificado

Se esperaba que durante el proceso de fermentación aumentara la producción de etanol con el transcurso de los días, conforme disminuyera la concentración de azúcares. Sin embargo, la concentración de etanol se mantuvo constante con *S. cerevisiae* Red Ethanol® y *K. marxianus* SLP1 durante las 72 h de fermentación, lo que indica que los azúcares metabolizables fueron consumidos durante las primeras 24 h.

**Tabla 6.** Efecto de la suplementación de sulfato de amonio a un hidrolizado enzimático de un concentrado de nejayote, fermentado con la cepa de *K. marxianus* SLP1.

Variables de respuesta	Tratamientos	
	Sin (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Con (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
Glucosa inicial (g/L)	7.28±0.27	7.58±0.52
Glucosa residual (g/L)	0.00	0.00
Xilosa inicial(g/L)	1.37±0.16	1.55±0.31
Xilosa residual(g/L)	NC	NC
Arabinosa inicial (g/L)	0.79±0.11	0.81±0.21
Arabinosa residual (g/L)	NC	NC
<sup>a</sup> Biomasa (cel/mL x10 <sup>7</sup> )	2.87(±0.36)	2.93(±0.43)
Concentración de etanol producido (g/L)	4.56 ± 0.48	4.52 ± 0.48
<sup>b</sup> Rendimiento de etanol Y <sub>P/S</sub> (g <sub>etanol</sub> /g <sub>glucosa</sub> )	0.61	0.60

<sup>a,b</sup>Sin diferencias significativas (P>0.05)

NC: No cuantificado

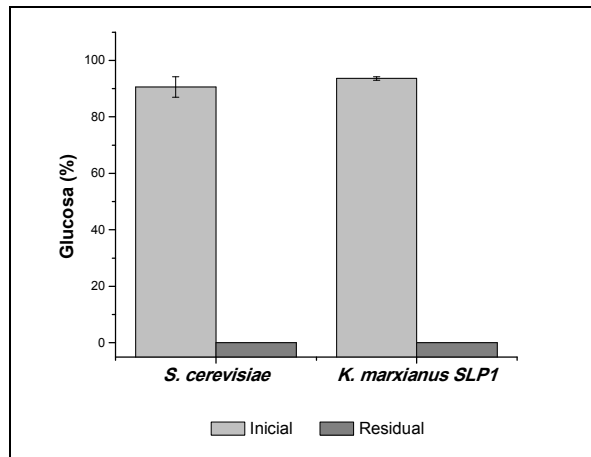
A pesar del aumento en el rendimiento de etanol, la capacidad de *K. marxianus* SLP1 de fermentar pentosas, no provocó diferencias significativas (P>0.05) en el rendimiento de etanol y la producción de biomasa, con respecto a *S. cerevisiae* Red Ethanol® (Tabla 5 y 6). Esto sugiere que el etanol es producido principalmente a partir de la glucosa y que el resto de azúcares fueron transformados a otros metabolitos en baja concentración, ya que en los cromatogramas no apareció un pico que denotara la formación de un subproducto en altas concentraciones. Al hacer una comparación de los aromas de los caldos fermentados se apreciaron diferencias muy notorias. En el caso del fermentado con *Kluyveromyces marxianus* SLP1 se percibieron aromas frutales, particularmente a manzana, mientras que en el caldo de fermentación con *S. cerevisiae* Red Ethanol® el aroma que se percibió fue dulce.

Cabe señalar, que los rendimientos obtenidos fueron estimados solo en base a glucosa debido a que no se cuantificaron los carbohidratos totales, iniciales y residuales o al menos el consumo de la xilosa y arabinosa. Este hecho explicaría porque se obtuvieron rendimientos de etanol superiores al máximo teórico establecido ( $0.5 \text{ g}_{\text{etanol}}/\text{g}_{\text{glucosa}}$ ).

*Efecto de 7 cocteles enzimáticos comerciales en la producción de etanol.*

Se identificaron y seleccionaron 7 cocteles enzimáticos comerciales que generaron altos rendimientos de glucosa, xilosa y arabinosa en el concentrado de nejayote. Para evaluar el consumo de carbono y su aprovechamiento en la producción de etanol, se emplearon dos cepas de levaduras: *S. cerevisiae* Red Ethanol® y *Kluyveromyces marxianus* SLP1.

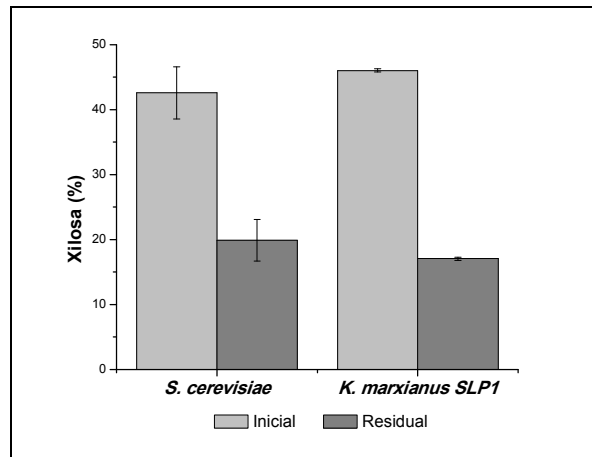
*S. cerevisiae* Red Ethanol® y *K. marxianus* SLP1 convirtieron totalmente la glucosa a etanol, en el pre-tratamiento con los 7 cocteles enzimáticos (**Figura 3**), generando rendimientos significativamente no diferentes ( $P>0.05$ ) de  $0.57 \text{ g}_{\text{etanol}}/\text{g}_{\text{glucosa}}$  y  $0.58 \text{ g}_{\text{etanol}}/\text{g}_{\text{glucosa}}$ , respectivamente.



**Figura 3.** Consumo de glucosa durante la fermentación por *S. cerevisiae* Red Ethanol® y *K. marxianus* SLP1 del concentrado de nejayote pre-tratado con 7 cocteles comerciales.

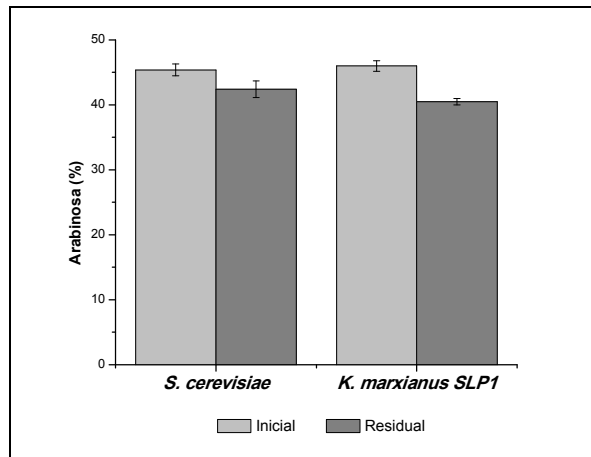
En la **Figura 4** se observa que el consumo de xilosa por *K. marxianus* SLP1 y *S. cerevisiae* Red Ethanol® fue similar. En el caso particular de *S. cerevisiae* Red Ethanol®, se observó un consumo de 53.29 %. Sin embargo, esta levadura no es capaz de metabolizar pentosas (van Maris y col., 2006) pero el azúcar que puede consumir esta levadura, es galactosa, la cual eluye en el mismo tiempo que la xilosa por HPLC. Por lo tanto, la fuente de carbono consumida pudo ser galactosa y lo que se cuantificó en el cromatograma correspondiente como residual fue verdaderamente xilosa. En el caso de *K. marxianus* SLP1, al parecer el consumo también fue de galactosa ya que la xilosa residual es similar a la observada en la fermentación con *S. cerevisiae* Red Ethanol®.





**Figura 4.** Consumo de xilosa durante la fermentación por *S. cerevisiae* Red Ethanol® y *K. marxianus* SLP1 del concentrado pre-tratado con 7 cocteles comerciales.

La arabinosa no es metabolizada por *S. cerevisiae* Red Ethanol®, y en consecuencia su concentración permaneció constante (**Figura 5**). En el caso de *K. marxianus* SLP1, curiosamente la concentración de arabinosa también permaneció constante pese a que esta cepa es conocida por su capacidad de metabolizar xilosa y arabinosa. Una posible explicación para este hecho es que se ha observado que este género de levaduras requiere de tiempos prolongados (72-96 h) de fermentación en condiciones estáticas, para metabolizar las pentosas (Rodrussamee y col., 2011). Así, las condiciones de este experimento (48 h de fermentación en estático) sólo permitieron la conversión de la glucosa y por lo tanto, no se observaron diferencias en la producción de etanol entre las levaduras estudiadas.



**Figura 5.** Consumo de arabinosa durante la fermentación por *S. cerevisiae* Red Ethanol® y *K. marxianus* SLP1 del concentrado de nejayote pre-tratado con 7 cocteles comerciales.

Los rendimientos de etanol obtenidos con *S. cerevisiae* Red Ethanol® y *Kluyveromyces marxianus* SLP1, no fueron significativamente diferentes ( $P=0.10$ ) en las condiciones de cultivo que se establecieron en este ensayo (**Tabla 7**). Debido a que no se cuantificaron los carbohidratos totales antes y después de la fermentación, entonces no fue posible observar diferencias entre los tratamientos, ya que las dos alcanzaron el rendimiento máximo teórico de etanol en base a glucosa, xilosa y arabinosa.

Por lo anterior, se considera necesario emplear una metodología diferente a este ensayo que permita cuantificar xilosa, para explicar el comportamiento de *Kluyveromyces marxianus* SLP1 de acuerdo a su preferencia por metabolizar pentosas (Rodrussamee y col., 2011). Así entonces poder observar diferencias

en la producción de etanol de esta levadura con respecto a *S. cerevisiae* Red Ethanol®.

**Tabla 7.** Concentración de biomasa y rendimiento de etanol obtenidos por la fermentación de las levaduras *S. cerevisiae* Red Ethanol® y *K. marxianus* SLP1 del concentrado de nejayote pre-tratado con 7 cocteles comerciales.

Tratamientos	Biomasa (x 10 <sup>7</sup> cel/mL)	Rendimiento etanol Y <sub>p/s</sub> (g <sub>etanol</sub> /g <sub>glucosa</sub> )	Rendimiento etanol Y <sub>p/s</sub> (g <sub>etanol</sub> /g <sub>sustrato consumido</sub> )
<i>S. cerevisiae</i> Red Ethanol®	2.8(± 0.3)	0.57 ± 0.02	0.55 ± 0.02
<i>K. marxianus</i> SLP1	1.4(± 0.4)	0.58 ± 0.38	0.48 ± 0.15

Los valores en la misma columna no presentaron diferencias significativas entre tratamientos (P>0.05).

## Conclusiones

La adición de fuentes orgánicas o inorgánicas de nitrógeno y minerales al concentrado de nejayote, no tiene ningún efecto sobre el rendimiento de etanol, por lo que es posible considerar que el concentrado tiene los nutrientes requeridos para que las levaduras realicen la conversión de azúcares a etanol. Queda demostrado que el uso de enzimas es necesario para hidrolizar los oligosacáridos, previo a la fermentación, y que dicho tratamiento está relacionado con el incremento en la producción de etanol. Así entre mayor concentración de azúcares fermentables libres, mayor será la concentración de etanol.

*Kluyveromyces marxianus* SLP1 tiene la capacidad de metabolizar pentosas y hexosas; sin embargo, no generó rendimientos superiores de etanol con respecto a *S. cerevisiae* Red Ethanol®. Por lo tanto, es necesario optimizar las condiciones de fermentación para incrementar el potencial del nejayote en la producción de etanol. No obstante, la producción de etanol por estas dos levaduras demostró la viabilidad como sustrato del concentrado de nejayote.

## Referencias

- Asaff Torres, A., Macias Ochoa, R. y de la Torre Martínez, M. (2008). Proceso para la recuperación de ácido ferúlico. México, Título de patente 259521.
- du Preez, J. C. y Prior, B. A. (1985). "A quantitative screening of some xylose-fermenting yeast isolates." *Biotechnology Letters* **7**(4): 241-246.
- Eliasson, A., Christensson, C., Wahlbom, F. C. y Hahn-Hägerdal, B. (2000). "Anaerobic xilose fermentation by recombinant *Sacharomyces cerevisiae* carrying *XYL1*, *XYL2*, and *XKS1* in mineral medium chemostat cultures." *Applied and Environmental Microbiology* **66**: 3381-3386.
- Gao, C. y Fleet, G. H. (1988). "The effects of temperature and pH on the ethanol tolerance of the wine yeasts, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida stellata* and *Kloeckera apiculata*." *Journal of Applied Microbiology* **65**(5): 405-409.
- Gong, C. S., Cao, N. J., Du, J. y Tsao, G. T. (1999). "Ethanol production from renewable resources." *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology* **65**: 207-241.
- Kordowska-Wiater, M. y Targonski, Z. (2001) "Ethanol production on the media containing glucose and xylose by coculture of *Pichia stipitis* CCY 39501 and respiratory deficient mutant of *Sacharomyces cerevisiae* V<sup>30</sup>." *Electronic Journal of Polish Agriculture Universities. Food Science and Technology* **4**,
- Kuhad, R. C., Gupta, R., Khasa, Y. P. y Singh, A. (2010). "Bioethanol production from *Lantana camara* (red sage): Pretreatment, saccharification and fermentation." *Bioresource Technology* **101**(21): 8348-8354.
- Rodrigues, F., Ludovico, P. y Leão, C. (2006). Sugar metabolism in yeasts: an overview of aerobic and anaerobic glucose catabolism biodiversity and

- ecophysiology of yeasts. Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts. G. Péter y C. Rosa, Springer Berlin Heidelberg: 101-121.
- Rodrussamee, N., Lertwattanasakul, N., Hirata, K., Suprayogi, S., Limtong, S., Kosaka, T. y Yamada, M. (2011). "Growth and ethanol fermentation ability on hexose and pentose sugars and glucose effect under various conditions in thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus*." Applied Microbiology and Biotechnology **90**(4): 1573-1586.
- Rosentrater, K. A. (2002). Developing reuse alternatives for corn masa processing byproducts streams. ASAE Annual International Meeting/CIGR XVth World Congress, Chicago, Illinois, USA, American Society of Agricultural and Biological Engineers.
- Rosentrater, K. A. (2004). Analysis of factors affecting corn masa byproduct generation. Annual International Meeting Sponsored by ASAE/CSAE Ottawa, Ontario, Canada, St. Joseph, Michigan.
- Rosentrater, K. A., Flores, R. A., Richard, T. L. y Bern, C. J. (1999). "Physical and nutritional properties of corn masa by-product streams." American Society of Agricultural Engineers **15**(5): 515-523.
- Rudolf, A., Baudel, H., Zacchi, G., Hahn-Hägerdal, B. y Lidén, G. (2008). "Simultaneous saccharification and fermentation of steam-pretreated bagasse using *Saccharomyces cerevisiae* TMB3400 and *Pichia stipitis* CBS6054." Biotechnology and Bioengineering **99**(4): 783-790.
- van Maris, A., Abbott, D., Bellissimi, E., van den Brink, J., Kuyper, M., Luttik, M., Wisselink, H., Scheffers, W., van Dijken, J. y Pronk, J. (2006). "Alcoholic fermentation of carbon sources in biomass hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*: current status." Antonie van Leeuwenhoek **90**(4): 391-418.
- White, J. S., Yohannan, B. K. y Walker, G. M. (2008). "Bioconversion of brewer's spent grains to bioethanol." FEMS Yeast Research **8**(7): 1175-1184.
- Yang, J., Bae, J. Y., Lee, Y. M., Kwon, H., Moon, H.-Y., Kang, H. A., Yee, S.-B., Kim, W. y Choi, W. (2011). "Construction of *Saccharomyces cerevisiae* strains with enhanced ethanol tolerance by mutagenesis of the TATA-binding protein gene and identification of novel genes associated with ethanol tolerance." Biotechnology and Bioengineering **108**(8): 1776-1787.
- Zhang, M., Shukla, P., Ayyachamy, M., Permaul, K. y Singh, S. (2010). "Improved bioethanol production through simultaneous saccharification and fermentation of lignocellulosic agricultural wastes by *Kluyveromyces marxianus* 6556." World Journal of Microbiology and Biotechnology **26**(6): 1041-1046.

## **Capítulo III.**

**Tratamiento enzimático de efluentes concentrados de la  
industria del nixtamal para la obtención de azúcares  
fermentables**

## **Tratamiento enzimático de efluentes concentrados de la industria del nixtamal para la obtención de azúcares fermentables.**

### ***Introducción***

Las industrias de harina de maíz nixtamalizado, nixtamal y tortilla, producen aguas de desecho conocidas como nejayote, que contienen altas concentraciones de materia orgánica, soluble e insoluble, en concentraciones de 20-30 g/L (Rosentrater, 2004); además de material inorgánico en solución. Las condiciones alcalinas de cocción del maíz, provocan el desprendimiento del pericarpio, la hidrólisis parcial de la celulosa, hemicelulosa y la gelatinización del almidón, lo que conlleva a que en el nejayote se encuentren oligosacáridos parcialmente solubles, junto a algunos compuestos fenólicos (Serna-Saldivar y *col.*, 1990). Las proporciones de las fracciones de carbohidratos son variables y oscilan entre 20-64 % (Pflugfelder y *col.*, 1988).

Es difícil tratar el nejayote por métodos convencionales debido a la alta concentración de material orgánico, calcio y pH mayores a 10 (González-Martínez, 1984; Pedroza-Islas y Durán de Bazúa, 1990; Tatarko, 2010; Wang y *col.*, 1995). Como una posible solución, se ha sugerido crear una cadena de valor de estos efluentes, para que a través del aprovechamiento de los productos contenidos en el nejayote, se logre financiar el costo de las

operaciones unitarias necesarias para reducir su carácter contaminante (Asaff Torres, 2010).

Asaff Torres y col. (2008) desarrollaron una tecnología para la remoción de los compuestos fenólicos disueltos, en especial del ácido ferúlico que tiene un valor comercial elevado. Adicionalmente, en los últimos años generaron otra tecnología para la concentración del material residual de dicho proceso y la recuperación simultánea de agua para reuso en el proceso de nixtamalización. El material concentrado residual, libre de la fracción fenólica, formado principalmente por carbohidratos puede ser utilizado como sustrato para la producción de proteína unicelular (levaduras), bioetanol o en diversos procesos biotecnológicos, por ejemplo para la producción de enzimas.

Para las fermentaciones con levaduras, se requieren pre-tratamientos que permitan la degradación del almidón, la celulosa o la hemicelulosa en su forma natural, ya que dichos microorganismos carecen de las enzimas necesarias para hacerlo (Hashem y Darwish, 2010; Lin y Tanaka, 2006). Asimismo, dependiendo del género, no todas las levaduras son capaces de metabolizar las unidades monoméricas o diméricas que conforman a los carbohidratos. Por ejemplo, *Saccharomyces cerevisiae*, es capaz de metabolizar hexosas, como la glucosa o sus disacáridos (Gong y col., 1999; van Maris y col., 2006) pero no pentosas, como la xilosa o la arabinosa, resultantes de la hidrólisis de la



hemicelulosa. Otras levaduras etanológicas como *Pichia stipitis*, *Candida shehatae* y *Pachysolen tannophilus* sí son capaces de metabolizar pentosas (du Preez y Prior, 1985; Kordowska-Wiater y Targonski, 2001) y también hexosas.

Aunque se conoce la naturaleza de los carbohidratos contenidos en el nejayote, su relación es muy variable y depende fundamentalmente de la variedad de maíz y el proceso de nixtamalización utilizado. Así, el propósito del presente trabajo fue identificar y cuantificar los carbohidratos contenidos en el concentrado de nejayote de una empresa productora de harina de maíz nixtamalizado. Además, seleccionar el tipo de enzimas más adecuadas que permitan su hidrólisis total y generen azúcares metabolizables por levaduras para la producción de etanol.

### ***Materiales y métodos***

*Concentrado de nejayote.* El nejayote proporcionado por una empresa productora de harina de maíz nixtamalizado fue tratado para remover completamente los sólidos en suspensión. De este tratamiento se obtuvieron dos productos: pastas (sólidos en suspensión) y nejayote clarificado. El sobrenadante clarificado se separó por decantación e inmediatamente se hizo pasar a través de membranas de nanofiltración con un tamaño de poro de 200

Da. De este proceso se generaron dos corrientes: agua de buena calidad (para re-uso en el proceso de nixtamalización) y un concentrado (fracción empleada en este proyecto). Los compuestos fenólicos contenidos en el concentrado de nejayote fueron removidos según procedimiento descrito por Asaff Torres y col. (2008) hasta alcanzar una concentración de ácido ferúlico de 0.1 g/L.

*Enzimas.* Las enzimas empleadas en este trabajo fueron glucanasas, celulasas y hemicelulasas de diferentes casas comerciales (**Tabla 1**).

**Tabla 1.** Cocteles enzimáticos comerciales

	<b>Clave</b>	<b>Actividad enzimática</b>	<b>Proveedor</b>
<b>1</b>	CXB	Xilanasa, celulasa y glucanasa	ENMEX®
<b>2</b>	CBL	Celulasa y beta glucanasa	ENMEX®
<b>3</b>	A1500	Celulasa	GenenCor®
<b>4</b>	AXC	Endoglucanasa y xilanasa	GenenCor®
<b>5</b>	ABG	Beta glucosidasa	GenenCor®
<b>6</b>	AXY	Hemicelulasa	GenenCor®
<b>7</b>	SCP	Celulasa y xilanasa	Novozymes®
<b>8</b>	PHC	Xilanasa	Novozymes®
<b>9</b>	C	Celulasa, endoglucanasa	Novozymes®
<b>10</b>	An	Feruloil esterasa	CIATEJ
<b>11</b>	NS-N	Beta glucanasa	Novozymes®
<b>12</b>	RUF	Pectinasa	DSM®
<b>13</b>	RTF	Pectinasa y feruloil esterasa	DSM®
<b>14</b>	Ch1	Glucoamilasa	Sinobios®
<b>15</b>	Ch2	Glucoamilasa	Sinobios®
<b>16</b>	GL400	Glucoamilasa	ENMEX®

Adicionalmente, para la hidrólisis de fracciones de almidón en el nejayote se evaluaron dos  $\alpha$ -amilasas de casas comerciales diferentes (PAT y SRSL). La dosis de enzima fue 2  $\mu\text{L}/\text{mL}$  de concentrado de nejayote. Las condiciones de hidrólisis fueron de  $\text{pH} = 5$  con temperaturas de 50 y 85  $^{\circ}\text{C}$ . Los tubos fueron tapados, homogeneizados e incubados por 30 min. Una vez detenida la reacción se añadió glucoamilasa GL400 en una dosis de 0.2  $\mu\text{L}/\text{mL}$  de concentrado de nejayote. Las condiciones de hidrólisis fueron  $\text{pH} = 5$ , temperatura de 50  $^{\circ}\text{C}$  con un tiempo de incubación de 30 min. Al final de la hidrólisis se filtraron las muestras para su análisis por cromatografía líquida de alta resolución. Las pruebas fueron hechas por duplicado, con dos repeticiones.

Los experimentos de hidrólisis de fracciones de celulosa y hemicelulosa fueron realizados con los cocteles enzimáticos comerciales detallados en la **Tabla 1**, bajo las siguientes condiciones: la dosis de enzima fue de 2  $\mu\text{L}/\text{mL}$  de concentrado de nejayote y se evaluaron dos valores de  $\text{pH}$  (4.5 y 6.0). Los tubos de reacción fueron tapados, homogeneizados e incubados a 50  $^{\circ}\text{C}$  por 60 min. Al final de la hidrólisis se filtraron las muestras para su análisis posterior. Las pruebas fueron realizadas por duplicado, con dos repeticiones.

*Hidrólisis ácido térmica de los carbohidratos del nejayote.* El concentrado de nejayote fue sometido a una hidrólisis química en baño de agua a 96  $^{\circ}\text{C}$  por 15 min usando  $\text{HCl}$  12 M, en una relación 1:0.75 v/v. La reacción ácido-térmica se

detuvo en baño de hielo durante 10 min. Posteriormente, la muestra fue filtrada y analizada por cromatografía líquida de alta resolución. La prueba fue realizada por duplicado, con dos repeticiones.

*Análisis cualitativo y cuantitativo de azúcares y otros compuestos.* Por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC, por sus siglas en inglés). Para la detección de azúcares se empleó una columna Rezex ROA-Ácidos orgánicos H<sup>+</sup> (8%) (Phenomenex), 300 x 7.8 mm, elución isocrática a 60 °C, usando como fase móvil H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.005 N, con un flujo de 0.6 mL/min, detector IR a 40 °C y corridas de 20 min (Perkin Elmer Lambda 25 UV-Vis y Reflective Index Detector Series 200). Se determinaron estándares de glucosa, arabinosa, galactosa, maltosa, manosa, sacarosa y xilosa para caracterizar los azúcares en el concentrado de nejayote en base a los tiempos de retención (10.3, 11.9, 10.9, 7.3, 10.9, 10.1 y 10.9, respectivamente). También se realizaron curvas de concentración de glucosa, xilosa y arabinosa.

Se cuantificaron los sólidos totales, sólidos solubles (metodología de la A.O.A.C., método 986.25), carbohidratos totales (A.O.A.C., método 932.12) y cenizas (NMX-F-615-NORMEX-2002) del concentrado de nejayote.

*Análisis estadístico.* El efecto de los cocteles enzimáticos en el tratamiento del nejayote se realizó a través del análisis de varianza (ANOVA) y las diferencias

entre tratamientos con la prueba de Tukey-Kramer usando el paquete estadístico NCSS© 2007.

## ***Resultados y Discusión***

### *Caracterización del concentrado de nejayote.*

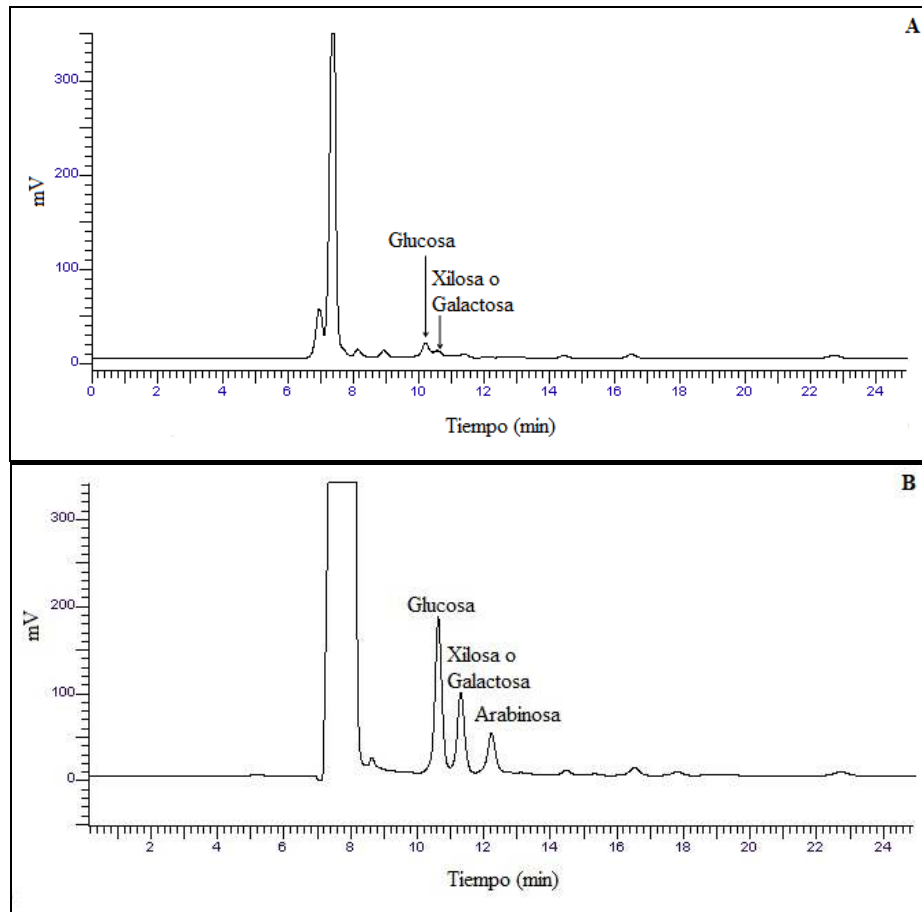
Inicialmente se cuantificó el contenido de sólidos solubles de dos lotes de concentrado del nejayote. El primer lote (L1409) tuvo 24.61 g/L, mientras que el segundo lote (L2909) alcanzó 48.17 g/L. Pese a que se utilizó la misma membrana de nanofiltración y se separó el mismo porcentaje de agua ( $\approx 80\%$  del volumen inicial), los sólidos solubles en el concentrado muestran una variabilidad muy elevada ya que para una media de 36.39 g/L, la desviación estándar es de 16.65 g/L. Esta variabilidad se debe a que en el proceso industrial, las condiciones de nixtamalización se modifican ligeramente de acuerdo a la variedad del maíz utilizado y a la naturaleza del tipo de maíz. Según la revisión realizada por Rosentrater (2006), la composición del nejayote presenta gran variabilidad, dependiendo de la variedad de maíz y las condiciones de nixtamalización. El análisis bromatológico del lote L1409 muestra que las principales fracciones son los carbohidratos totales con una concentración de 19.6 g/L (80%) y las cenizas con 5.1 g/L (19.9%), siendo los demás componentes prácticamente despreciables. Estos datos coinciden con

los de Rosentrater (2006) donde se muestra que el contenido de carbohidratos totales del nejayote oscila entre 72 a 75%, mientras que el contenido de cenizas entre 12 a 23%.

Para establecer la proporción del tipo de carbohidratos contenidos en el concentrado se realizó una hidrólisis ácida. El cromatograma del análisis HPLC realizado muestra, la aparición de tres picos mayoritarios, cuyos tiempos de retención coinciden con los de la glucosa, xilosa (y/o galactosa, y/o manosa) y arabinosa, respectivamente (**Figura 1**). En el concentrado previo a la hidrólisis, entre el minuto 7 y 9, aparecen algunos picos correspondientes a dímeros u oligómeros de azúcares. Por ejemplo, la maltosa y las dextrinas tienen tiempos de retención de 7.3 y de 8.7 min, respectivamente. Sin embargo, en el hidrolizado se evidenció que el HCl utilizado provoca una señal en el mismo rango, lo que interfiere con el análisis de una posible disminución de estas fracciones.

En la **Tabla 2** se presentan los resultados cuantitativos del análisis de HPLC de azúcares generados por hidrólisis ácido-térmica de dos lotes de concentrados diferentes. De acuerdo a los resultados, el lote L2909 tiene más del doble de azúcares que el lote L1409, guardando relación directa con su contenido de sólidos solubles. Sin embargo, en ambos casos, la proporción de hexosas (glucosa) y pentosas (arabinosa y xilosa) fue más o menos similar. En el lote

L1409, dicha proporción fue de 1:1.44, mientras que en el lote L2909 fue de 1:1.01.



**Figura 1.** Caracterización de azúcares presentes en el concentrado de nejayote, lote L2909 que se generaron antes (A) y después (B) de la hidrólisis ácido-térmica.

**Tabla 2.** Concentraciones y rendimientos de azúcares generados durante la hidrólisis ácido-térmica del concentrado de nejayote.

Lote	Glucosa (g/L)	Xilosa (g/L)	Arabinosa (g/L)	Carbohidratos totales (g/L)*	Sólidos totales (g/L)	Rendimientos con respecto a carbohidratos totales (%)		
						Glu	Xil	Ara
L1409	7.04 ± 0.18	5.80 ± 0.11	4.36 ± 0.04	19.51	24.61	36.08	29.72	22.35
L2909	18.38 ± 0.10	11.03 ± 0.14	7.46 ± 0.05	43.07	48.17	42.67	25.61	17.32

\*Estimado con base al contenido de cenizas del análisis proximal.

Glu= Glucosa, Xil= Xilosa y Ara= Arabinosa.

La suma de las concentraciones de estos tres azúcares representan el 88.5% de los carbohidratos totales en el lote L1409 y del 85.3% para el lote L2909. En el caso de la arabinosa y la xilosa, su contenido a partir de los carbohidratos totales sería ligeramente superior, ya que la hidrólisis ácida permite liberar un 85.8 % de xilosa y 95.7 % de arabinosa, a partir de la hidrólisis de hemicelulosa (Mussatto y Roberto, 2005). Hoseinpour y col. (2010), reportan que la hidrólisis de almidón suele ser más eficiente con rendimientos del 99 %. Si bien no se tuvo la certeza de que la hidrólisis ácido térmica fue 100% eficiente, las concentraciones de azúcares obtenidas por este tratamiento fueron tomadas como valores de referencia para expresar, como cantidades relativas (porcentajes), las obtenidas por hidrólisis enzimática. De esta manera fue posible expresar el grado de hidrólisis minimizando la alta variabilidad de la composición de dos lotes de concentrado de nejayote evaluados.

De acuerdo a los análisis cromatográficos (**Figura 1** y **Tabla 2**), la glucosa, arabinosa y xilosa se encuentran en el concentrado de nejayote en



proporciones molares promedio de 1.7:1.4:1.0, respectivamente. Se conoce que el pericarpio del maíz contiene una cantidad considerable de ácido ferúlico (2.82 a 4 %, base seca) (Lapierre y *col.*, 2001; Saulnier y *col.*, 1995) ligado a cadenas de hemicelulosa que durante la nixtamalización es hidrolizada, liberando ácido ferúlico, dímeros de este compuesto y fraccionando las cadenas de hemicelulosa en oligómeros (González y *col.*, 2005; González y *col.*, 2004; Gutiérrez-Cortez y *col.*, 2010; Martínez-Bustos y *col.*, 2001). De la hidrólisis de la hemicelulosa de maíz se pueden obtener heteroxilanos, cadenas formadas de xilas unidas por enlaces  $\beta$ -1,4 sustituidas por cadenas monoméricas de arabinosa, ácido glucorónico, galactosa y xilas, o bien por cadenas oligoméricas que contienen arabinosa, xilosa y algunas veces galactosa (Saulnier y *col.*, 1995).

En el maíz, los heteroxilanos en mayor proporción son los arabinoxilanos, formados por cadenas lineales de  $\beta$ -1,4-D-xilas, sustituidas aleatoriamente por  $\alpha$ -L-arabinosas en la posición O-3 u O-2,3 de las xilas. Durante el proceso de nixtamalización, los arabinoxilanos se quedan en solución en el nejayote debido a que los ácidos de la hemicelulosa son neutralizados por el efecto del  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  y parcialmente degradados (Gutiérrez-Cortez y *col.*, 2010). Por lo tanto, se pueden encontrar restos de ácido ferúlico unidos aleatoriamente a residuos de arabinosa por enlaces éster O-5 (Smith y Hartley, 1983). A estos

arabinoxilanos se les conoce como arabinoxilanos ferulados y tienen la característica de formar geles por acoplamiento oxidativo del ácido ferúlico.

Niño-Medina y col., (2009) extrajeron un arabinoxilano ferulado del nejayote que contenía 0.23  $\mu\text{g}/\text{mg}$  de ácido ferúlico, una proporción de arabinosa-xilosa (A/X) de 0.65, una viscosidad intrínseca de 183 mL/g y un peso molecular de 60 kDa. Cuando el concentrado de nejayote fue sometido a un tratamiento ácido térmico se obtuvieron residuos de arabinosa y xilosa, en proporción (A/X) de 0.75 y 0.68 para cada lote, respectivamente. Esta proporción fue similar a la reportada por Niño-Medina y col., (2009) con lo cual asumieron una moderada complejidad de la estructura de los arabinoxilanos presentes en el nejayote. Carvajal-Millán y col. (2007) obtuvieron una proporción A/X más alta (0.85), a partir de arabinoxilanos extraídos de salvado de maíz por tratamiento alcalino suave. Con base a esta información, la hemicelulosa del maíz es principalmente una fuente de arabinosa y xilosa, debido a las altas concentraciones de estos dos azúcares, por lo que se puede descartar que de este polisacárido se obtenga glucosa.

Con los resultados de la hidrólisis ácido-térmica, se infiere que la glucosa proviene de diferentes fracciones de almidón y celulosa, componentes del grano de maíz. Como parte del proceso de nixtamalización, el tratamiento alcalino-térmico, permite hidrolizar parcialmente los carbohidratos antes mencionados y

de los cuales está formado el maíz. Por lo tanto, en el concentrado de nejayote se quedan en solución dextrinas o maltosas provenientes del almidón (Pflugfelder y *col.*, 1988; Rosentrater y *col.*, 1999) proporcionando fuentes de glucosa. Otra fuente probable de glucosa puede ser la celulosa, que posiblemente corresponda con el disacárido conocido como celobiosa o algunos oligómeros.

#### *Obtención de glucosa de fuentes amiláceas y/o celulósicas.*

La glucosa fue el monómero que se obtuvo en mayor concentración de la hidrólisis ácido-térmica del concentrado de nejayote (36.08 y 42.67 % con respecto a carbohidratos totales). Con el propósito de establecer su origen, se realizaron tratamientos enzimáticos con enzimas amilolíticas o celulolíticas. En el primer caso, se realizó un tratamiento enzimático consistente en la aplicación consecutiva de dos tipos de enzimas, las amilasas y glucoamilasas. Las primeras realizan la hidrólisis de los enlaces glucosídicos endo  $\alpha$ -1,4 del almidón, generando oligómeros de glucosa. Las segundas, hidrolizan estos oligómeros actuando en los enlaces exo  $\alpha$ -1,4 y exo  $\alpha$ -1,6 (Murthy y *col.*, 2011; van der Maarel y *col.*, 2002).

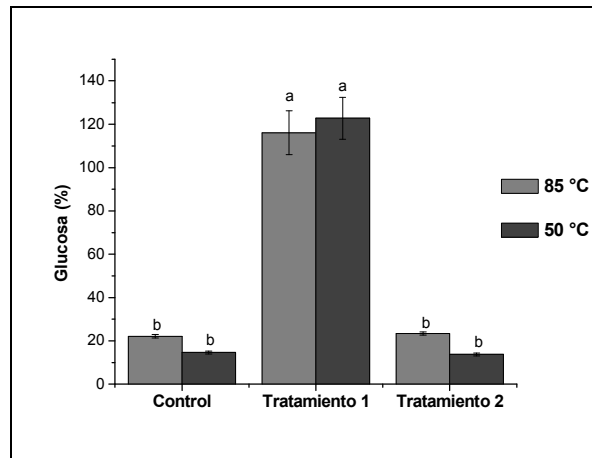
En la **Figura 2** se presentan los resultados de la hidrólisis resultante de la aplicación secuencial de dos tipos de enzimas: las  $\alpha$ -amilasas (PAT y SRSL),

seguidas de una glucoamilasa. En el caso del control (tratamiento sin enzimas) y el tratamiento 2 (solo  $\alpha$ -amilasas) no se observó efecto en la liberación de glucosa; sin embargo, en el caso del tratamiento 1 ( $\alpha$ -amilasas, seguida de una aplicación de glucoamilasa) se obtuvo una liberación elevada de glucosa, incluso superior a la obtenida por hidrólisis ácida (122.97%). Por tanto se infiere que las glucoamilasas son el tipo de enzimas que tienen el principal efecto hidrolítico. Así mismo, se observa que la temperatura no tuvo efecto en la hidrólisis pues el rendimiento de glucosa no fue significativamente diferente a 50 °C u 85 °C.

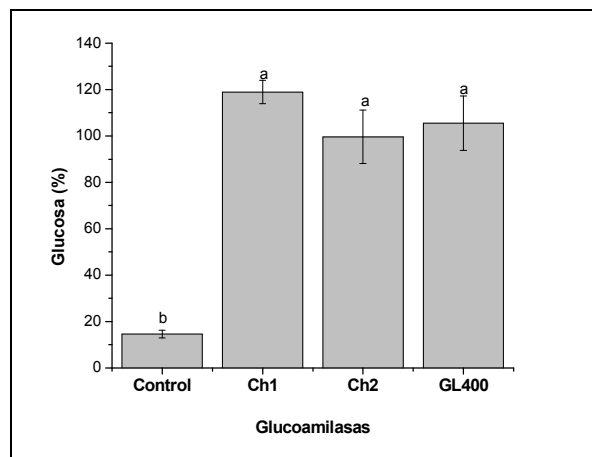
Los resultados sugieren que la glucosa obtenida por hidrólisis química o enzimática del nejayote proviene principalmente de dextrinas, oligómeros o dímeros de glucosa, que pueden ser fácilmente degradadas por exoglucanasas, prescindiendo del uso de endoglucanasas.

Adicionalmente, se evaluó la efectividad de enzimas de distinta procedencia con la misma actividad glucoamilasa. Se compararon tres enzimas con los resultados presentados en la **Figura 3**. Los cocteles enzimáticos Ch1, Ch2 y GL400 generaron rendimientos de glucosa de 118.95 %, 99.56 %, y 106.46 %, respectivamente, sin diferencias significativas entre ellos. Se partió de un concentrado de nejayote con una cantidad de glucosa libre de 14.60%, tomado

como control absoluto y en el que no se observó aumento en el grado de hidrólisis durante el tiempo que duró el ensayo.



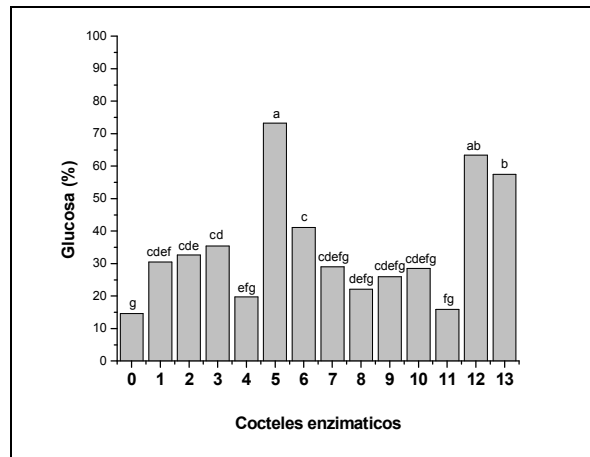
**Figura 2.** Hidrólisis del concentrado de nejayote aplicando diversas enzimas a dos temperaturas. El control no incluye enzimas; tratamiento 1 comprende aplicación secuencial de  $\alpha$ -amilasas y una glucoamilasa; tratamiento 2 solo comprende  $\alpha$ -amilasas. Barras con literales similares indican que no hay diferencias significativa entre los tratamientos ( $P>0.05$ ), según prueba de Tukey-Kramer.



**Figura 3.** Glucosa obtenida por hidrólisis enzimática del concentrado de nejayote empleando glucoamilasas de diferente origen comercial. Barras con literales iguales indican que no hay diferencias significativas según prueba de Tukey-Kramer ( $P>0.05$ ).

Las glucoamilasas Ch1 y Ch2 provienen de la misma casa comercial pero tienen diferentes actividades específicas, con valores de 300,000 U/mL y 150,000 U/mL, respectivamente. Para estas glucoamilasas, una unidad (U) es equivalente a la cantidad de enzima que hidroliza almidón soluble para producir 1 mg de glucosa a 40 °C y pH 4.6, en una hora. De acuerdo a sus actividades específicas, la cantidad de enzima utilizada en este ensayo fue muy alta, por lo que no se observan diferencias en los resultados pese a que Ch1 tiene el doble de actividad que Ch2. En el caso de la GL400 su actividad específica es de 400 DU/mL, donde cada unidad (DU) es la cantidad de enzima que cataliza la producción de un gramo de glucosa en una hora, bajo las condiciones de ensayo; es decir, equivale a 400 000 U/mL. Para observar posibles diferencias en su actividad es necesario reducir su concentración o bien acortar los tiempos de evaluación. Como las enzimas empleadas fueron productos comerciales que, usualmente comprenden cocteles enzimáticos, no se puede descartar una actividad  $\beta$ -glucosidasa marginal. De ser así, las fracciones de celulosa también estarían contribuyendo al contenido total de glucosa en el hidrolizado enzimático.

Además, se evaluó el efecto de enzimas comerciales con actividades celulolíticas, xilanolíticas y/o pectinolíticas, sobre la producción de glucosa. Los resultados se presentan en la **Figura 4**.



**Figura 4.** Glucosa obtenida por hidrólisis enzimática del concentrado de nejayote empleando celulasas, xilanasas y/o pectinasas de diferente origen comercial. 0) Control negativo, 1) CXB, 2) CBL, 3) A1500, 4) AXC, 5) ABG, 6) AXY, 7) SCP, 8) PHC, 9) CL, 10) An, 11) NS-N, 12) RUF y 13) RTF. Barras con literales iguales indican que no hay diferencias significativas según una prueba de Tukey-Kramer ( $P > 0.05$ ).

Los cocteles enzimáticos ABG, RUF y RTF tuvieron el efecto más alto sobre el rendimiento de glucosa ( $P < 0.05$ ). El primer coctel, con actividad  $\beta$ -glucosidasa, indica que parte de la glucosa obtenida ( $\approx 60\%$ , en relación a la obtenida con  $\alpha$ -glucosidasas) proviene de fracciones de celulosa, probablemente celobiosa u oligómeros. Sin embargo, al no haber realizado análisis específicos de actividad  $\alpha$ -glucosidasa marginal, no se puede descartar la contribución de oligómeros provenientes del almidón.

Los cocteles RUF y RTF también generaron rendimientos significativos de glucosa durante la hidrólisis. Estos cocteles tienen actividad pectinasa pero se ha detectado que también tienen actividad feruloil esterasa (comunicación personal, CIATEJ). Así, tampoco se puede descartar que tengan otras

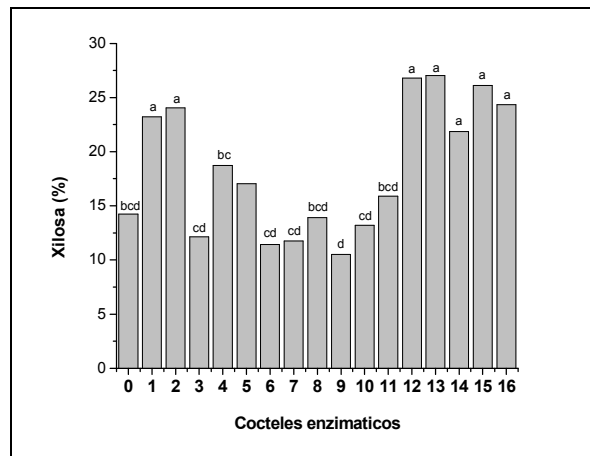
actividades, ya que es conocido que los cocteles pectinolíticos incluyen diversas enzimas para lograr un efecto sinérgico. Si este es el caso, parte de la glucosa podría provenir también de heteropolímeros de hemicelulosa. En la hidrólisis ácida se había asumido su presencia con respecto a la posible unión de galactosa a cadenas de xilosas.

#### *Obtención de xilosa y arabinosa a partir de hemicelulosa*

En la caracterización del concentrado de nejayote, se identificaron pentosas, como xilosa y arabinosa, siendo un indicativo de la presencia de fracciones de hemicelulosa en solución. Se evaluaron los 16 cocteles comerciales para la liberación de xilosa. Los resultados se presentan en la **Figura 5**. Los mejores resultados ( $24.01 \pm 6.45 \%$ ) se obtuvieron con CXB, CBL, RUF, RTF, Ch1, Ch2 y GL400. En el caso de CXB y CBL, están descritas como enzimas con actividad celulasa y hemicelulasa, por lo que los resultados coinciden con las actividades declaradas por el fabricante. Como se mencionó en el análisis de la **Figura 4**, los cocteles RUF y RTF son descritos como pectinasas, que por los resultados obtenidos se confirma que también tienen actividad xilanasa. Este hecho sugiere, al igual que en el punto anterior, el origen de parte de la glucosa desde fracciones del heteropolímero de hemicelulosa.



En el caso de Ch1, Ch2 y GL400, corresponden a glucoamilasas que, por los resultados, incluyen también enzimas con actividad  $\beta$ -glucosidasas, tal como se había supuesto durante el análisis de resultados de la **Figura 3**.

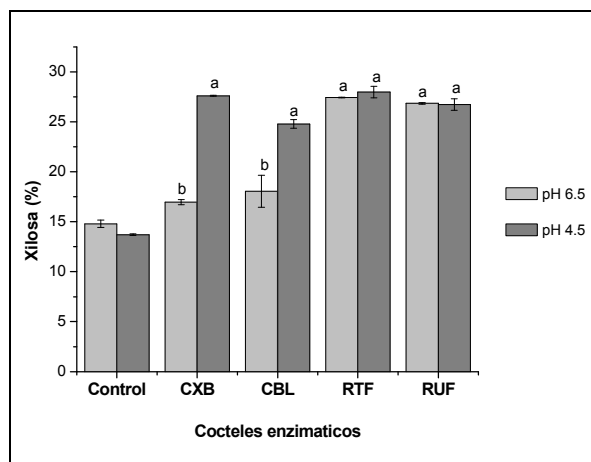


**Figura 5.** Rendimientos de xilosa en relación a la hidrólisis ácido-térmica, obtenidos por hidrólisis del nejayote concentrado con 16 cocteles de enzimas comerciales. 0) Control negativo, 1) CXB, 2) CBL, 3) A1500, 4) AXC, 5) ABG, 6) AXY, 7) SCP, 8) PHC, 9) CL, 10) An, 11) NS-N, 12) RUF, 13) RTF, 14) Ch1, 15) Ch2 y 16) GL400. Barras con literales iguales indican que no hay diferencias significativas según una prueba de Tukey-Kramer ( $P > 0.05$ ).

Los cocteles CXB, CBL, RUF y RTF fueron evaluados también bajo dos condiciones de pH diferentes, 4.5 y 6.5, respectivamente. Los resultados se muestran en la **Figura 6**.

Los cocteles se dejaron actuar durante 60 min, observando que CXB y CBL únicamente muestran actividad a pH 4.5 ( $P < 0.05$ ), generando 27.61 % y 24.79 % de xilosa, respectivamente. En los cocteles RUF y RTF, el pH no tuvo efecto

significativo sobre el rendimiento de xilosa. La xilosa que se obtuvo fue de  $27.25 \pm 0.62 \%$ , tanto a pH 6.5 como a pH 4.5

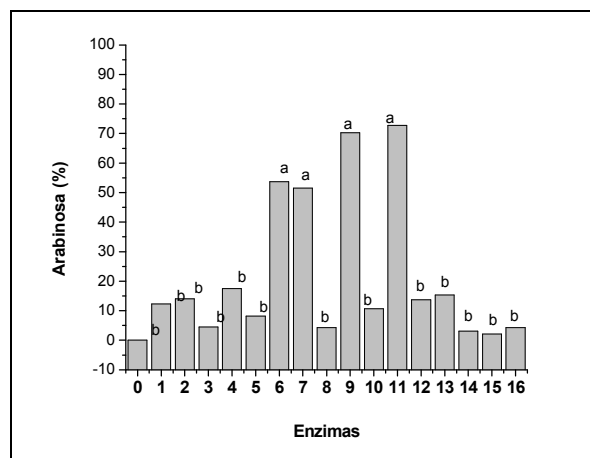


**Figura 6.** Efecto del pH en la hidrólisis de la hemicelulosa para obtener monómeros de xilosa con los cocteles enzimáticos comerciales CXB, CBL, RUF y RTF. Barras con literales diferentes indican diferencias significativas según una prueba de Tukey-Kramer ( $P < 0.05$ ).

Posteriormente, se evaluaron CXB, CBL, RUF y RTF a pH 4.5 durante 24 h, para obtener el máximo rendimiento de unidades de xilosa. El coctel CBL generó un máximo rendimiento de xilosa ( $40.9 \pm 2.99 \%$ ), mientras que con los otros 3 cocteles se obtuvieron rendimientos de  $31.69 \pm 3.68 \%$ . En los cromatogramas de HPLC, a partir de los hidrolizados obtenidos con los cocteles RUF y RTF, se observó un pico con un tiempo de retención de 14.8 min, cuya área aumentó proporcionalmente al área del pico de glucosa. Se presume que el pico no identificado corresponde al ácido galacturónico o ácido glucurónico, que probablemente se encuentre unido a la glucosa y xilosa en los

heteroxilanos de la hemicelulosa. Con este resultado, se confirma la presencia de actividad xilanasa en los cocteles RUF y RTF.

De los 16 cocteles enzimáticos evaluados, los rendimientos más altos en arabinosa, se obtuvieron con los cocteles AXY, SCP, CL y NS-N, con un valor promedio de  $(62.07 \pm 15.72 \%)$ , sin diferencia significativa entre ellos (**Figura 7**). El primer coctel tiene actividad hemicelulasa, lo que lleva a suponer que en este coctel hay  $\alpha$ -arabinofuranosidasas que permiten la hidrólisis de la unión de arabinosa con xilosa. El segundo coctel tiene actividad xilanasa reportada por el fabricante y se confirma en este ensayo, por los altos rendimientos de arabinosa obtenidos.



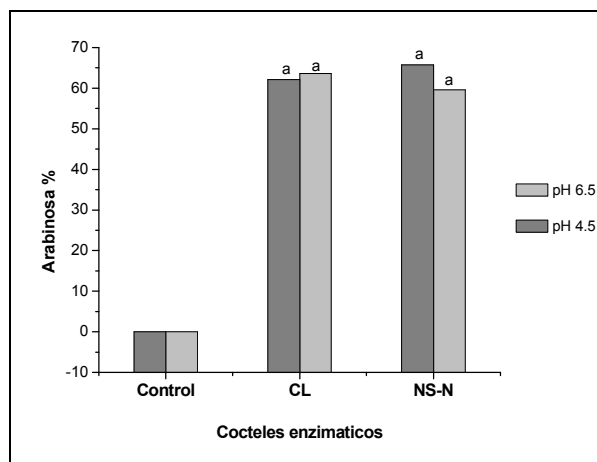
**Figura 7.** Rendimientos de arabinosa en relación a la hidrólisis ácido-térmica, obtenidos por hidrólisis del nejayote concentrado con 16 cocteles de enzimas comerciales. 0) Control negativo, 1) CXB, 2) CBL, 3) A1500, 4) AXC, 5) ABG, 6) AXY, 7) SCP, 8) PHC, 9) CL, 10) An, 11) NS-N, 12) RUF y 13) RTF, 14) Ch1, 15) Ch2 y 16) GL400. Barras con la misma letra no son significativamente diferentes según una prueba de Tukey-Kramer ( $P > 0.05$ ).

El coctel CL tiene actividad celulasa declarada por el fabricante, aunque Yuliarti y col., (2011) demostraron actividad pectinasa con este coctel, por lo que no se descarta la presencia de algún tipo de actividad hemicelulasa que generó la liberación de unidades de arabinosa. Con respecto al coctel NS-N, este tiene actividad xilanasa reportada por el fabricante. En base a las actividades enzimáticas de los cocteles AXY, SCP, CL y NS-N, se infiere que contienen arabinofuranosidasas y endo- $\beta$ -xilanasas.

Las endo- $\beta$ -xilanasas rompen los enlaces glicosídicos de la cadena principal de los arabinoxilanos (xilosas unidas por enlaces  $\beta$ -1,4). Las xilosas tienen enlazados una, dos o tres moléculas de arabinosa dependiendo de la complejidad de la estructura (Niño-Medina y col., 2009). Así, al hidrolizarse la cadena principal, es necesario una actividad enzimática adicional, en este caso la arabinofuranosidasa que hidroliza los enlaces de arabinosa-xilosa (Saha, 2003). En los cocteles CL y NS-N también se evaluó el efecto de pH (4.5 y 6.0). Luego de 60 min de reacción, no se observó un efecto significativo sobre la liberación de arabinosa (**Figura 8**).

Aunque no hubo efecto del pH, se evaluó el rendimiento máximo de arabinosa a pH 4.5 durante 24 h. Los resultados obtenidos fueron del  $70.48 \pm 21.48$  % y  $72.39 \pm 15.66$  % de arabinosa para cada coctel, respectivamente. Al comparar el rendimiento de arabinosa a pH 4.5 en diferentes tiempos (60 min y 24 h), no

se obtuvieron incrementos significativos por efecto de esta variable, tanto con el coctel CL ( $P=0.64$ ), como con el coctel NS-N ( $P=0.61$ ).



**Figura 8.** Efecto de los cocteles enzimáticos comerciales CL y NS-N en la hidrólisis de la hemicelulosa para obtener monómeros de arabinosa. Barras con la misma letra no son significativamente diferentes según una prueba de Tukey-Kramer ( $P>0.05$ ).

Con los cocteles CXB, CBL, RUF, RTF, C y NS-N no fue posible obtener el 100 % de rendimiento de arabinosa y xilosa alcanzado con el tratamiento ácido-térmico. Por lo tanto, se mezclaron los 6 cocteles enzimáticos, para que a través del sinergismo de las actividades enzimáticas, se pudiera obtener un incremento en el rendimiento de xilosa y arabinosa. Después de 24 h se lograron rendimientos de 77.03 % de xilosa y 122.94 % de arabinosa. De acuerdo a estos resultados, la mezcla de los cocteles usados favoreció la hidrólisis de los heteroxilanos de hemicelulosa, para la liberación de xilosa y arabinosa y probablemente de residuos de ácido galacturónico o ácido glucurónico. En los cromatogramas de HPLC, entre los 14 y 17 min aparecen

picos que pueden corresponder a los últimos compuestos mencionados. Sin embargo, es necesario adicionar un coctel con  $\beta$ -xilosidasa, que permita el 100 % de conversión de xilosa y así obtener los porcentajes que se obtuvieron con el tratamiento ácido-térmico.

De esta manera, el trabajo continuaría con la evaluación de los parámetros de dosis con respecto a la cantidad de sustrato y establecer el sinergismo propuesto cuando se usa la mezcla de cocteles, para obtener rendimientos más altos. Así mismo, para evitar la formación de subproductos que disminuyan el crecimiento de las levaduras o reduzcan los rendimientos en la producción de etanol.

### ***Conclusiones***

Se caracterizaron los azúcares presentes en el concentrado de nejayote siendo la glucosa, xilosa y arabinosa los productos mayoritarios, tanto de la hidrólisis ácido-térmica, como de la enzimática.

La glucosa fue el azúcar en mayor proporción con respecto a las pentosas obtenidas por tratamiento químico y enzimático. El mayor rendimiento de glucosa se obtuvo con glucoamilasas, esto indica que su origen principal fue a partir de dextrinas y/o maltosas provenientes del almidón. Las enzimas  $\alpha$ -

amilasas (endoglucanasas) no tienen efecto sobre el concentrado de nejayote, confirmando que el almidón presenta un alto grado de hidrólisis.

Las actividades enzimáticas de los cocteles usados y las concentraciones de azúcares obtenidos permitieron inferir que el tipo de oligosacáridos de hemicelulosa que se encuentran en suspensión en el concentrado de nejayote, son arabinosilanos.

### **Referencias**

- Asaff Torres, A., Macias Ochoa, R. y de la Torre Martínez, M. (2008). Proceso para la recuperación de ácido ferúlico. México, Título de patente 259521.
- Asaff Torres, A. J. (2010). Transformando riesgos en oportunidades: del nejayote a la vainillina. Ciencia, tecnología e innovación para el desarrollo de México. La Paz, B.C.S. 29 de Agosto de 2010, El Sudcaliforniano. **3**(60).
- Carvajal-Millán, E., Rascon-Chu, A., Márquez-Escalante, J. A., Micard, V., Ponce de León, N. y Gardea, A. (2007). "Maize bran gum: Extraction, characterization and functional properties." Carbohydrate Polymers **69**: 280-285.
- du Preez, J. C. y Prior, B. A. (1985). "A quantitative screening of some xylose-fermenting yeast isolates." Biotechnology Letters **7**(4): 241-246.
- Gong, C. S., Cao, N. J., Du, J. y Tsao, G. T. (1999). "Ethanol production from renewable resources." Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology **65**: 207-241.
- González-Martínez, S. (1984). "Biological treatability of the wastewaters from the alkaline cooking of maize (Indian corn)." Environmental Technology Letters **5**: 365-372.
- González, R., Reguera, E., Figueroa, J. M. y Sánchez-Sinencio, F. (2005). "On the nature of the Ca binding to the hull of nixtamalized corn grains." LWT - Food Science and Technology **38**(2): 119-124.
- González, R., Reguera, E., Mendoza, L., Figueroa, J. M. y Sánchez-Sinencio, F. (2004). "Physicochemical changes in the hull of corn grains during their

- alkaline cooking." Journal of Agricultural and Food Chemistry **52**(12): 3831-3837.
- Gutiérrez-Cortez, E., Rojas-Molina, I., Rojas, A., Arjona, J. L., Cornejo-Villegas, M. A., Zepeda-Benítez, Y., Velázquez-Hernández, R., Ibarra-Alvarado, C. y Rodríguez-García, M. E. (2010). "Microstructural changes in the maize kernel pericarp during cooking stage in nixtamalization process." Journal of Cereal Science **51**(1): 81-88.
- Hashem, M. y Darwish, S. M. I. (2010). "Production of bioethanol and associated by-products from potato starch residue stream by *Sacharomyces cerevisiae*." Biomass and Bioenergy **34**: 953-959.
- Hoseinpour, H., Karimi, K., Zilouei, H. y Taherzadeh, M. J. (2010). "Simultaneous pretreatment of lignocellulose and hydrolysis of starch in mixtures to sugars." BioResources **5**(4): 2457-2469.
- Kordowska-Wiater, M. y Targonski, Z. (2001) "Ethanol production on the media containing glucose and xylose by coculture of *Pichia stipitis* CCY 39501 and respiratory deficient mutant of *Sacharomyces cerevisiae* V<sup>30</sup>." Electronic Journal of Polish Agriculture Universities. Food Science and Technology **4**.
- Lapierre, C., Pollet, B., Ralet, M.-C. y Saulnier, L. (2001). "The phenolic fraction of maize bran: evidence for lignin-heteroxytan association." Phytochemistry **57**(5): 765-772.
- Lin, Y. y Tanaka, S. (2006). "Ethanol fermentation from biomass resources: current state and prospects." Applied Microbiology and Biotechnology **69**: 627-642.
- Martínez-Bustos, F., Martínez-Flores, H. E., Sanmartín-Martínez, E., Sánchez-Sinencio, F., Chang, Y. K., Barrera-Arellano, D. y Rios, E. (2001). "Effect of the components of maize on the quality of masa and tortillas during the traditional nixtamalisation process." Journal of the Science of Food and Agriculture **81**(15): 1455-1462.
- Murthy, G., Johnston, D., Rausch, K., Tumbleson, M. y Singh, V. (2011). "Starch hydrolysis modeling: application to fuel ethanol production." Bioprocess and Biosystems Engineering **34**(7): 879-890.
- Mussatto, S. I. y Roberto, I. C. (2005). "Acid hydrolysis and fermentation of brewer's spent grain to produce xylitol." Journal of the Science of Food and Agriculture **85**(14): 2453-2460.
- Niño-Medina, G., Carvajal-Millán, E., Lizardi, J., Rascon-Chu, A., Marquez-Escalante, J. A., Gardea, A., Martinez-Lopez, A. L. y Guerrero, V. (2009). "Maize processing waste water arabinoxylans: Gelling capability and cross-linking content." Food Chemistry **115**(4): 1286-1290.
- Pedroza-Islas, R. y Durán de Bazúa, C. (1990). "Aerobic treatment of maize-processing wastewater in a 50-liter rotating biological reactor." Biological Wastes **32**(1): 17-27.
- Pflugfelder, R. L., Rooney, L. W. y Waniska, R. D. (1988). "Dry matter losses in commercial corn masa production." Cereal Chemistry **65**(2): 127-132.



- Rosentrater, K. A. (2004). Analysis of factors affecting corn masa byproduct generation. Annual International Meeting Sponsored by ASAE/CSAE Ottawa, Ontario, Canada, St. Joseph, Michigan.
- Rosentrater, K. A. (2006). "A review of corn masa processing residues: Generation, properties, and potential utilization." Waste Management **26**(3): 284-292.
- Rosentrater, K. A., Flores, R. A., Richard, T. L. y Bern, C. J. (1999). "Physical and nutritional properties of corn masa by-product streams." American Society of Agricultural Engineers **15**(5): 515-523.
- Saha, B. (2003). "Hemicellulose bioconversion." Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology **30**(5): 279-291.
- Saulnier, L., Vigouroux, J. y Thibault, J.-F. (1995). "Isolation and partial characterization of feruloylated oligosaccharides from maize bran." Carbohydrate Research **272**(2): 241-253.
- Serna-Saldivar, S. O., Gomez, M. H. y Rooney, L. W. (1990). "Technology, chemistry, and nutritional value of alkaline-cooked corn products. ." Advances in Cereal Science and Technology **10**: 243-307.
- Smith, M. M. y Hartley, R. D. (1983). "Occurrence and nature of ferulic acid substitution of cell-wall polysaccharides in graminaceous plants." Carbohydrate Research **118**: 65-80.
- Tatarko, M. (2010). Waste water treatment. Novozymes Biological, Inc., Salem, VA. United States of America, Titulo de patente US 2010/0213122 A1.
- van der Maarel, M. J. E. C., van der Veen, B., Uitdehaag, J. C. M., Leemhuis, H. y Dijkhuizen, L. (2002). "Properties and applications of starch-converting enzymes of the  $\alpha$ -amylase family." Journal of Biotechnology **94**(2): 137-155.
- van Maris, A., Abbott, D., Bellissimi, E., van den Brink, J., Kuyper, M., Luttik, M., Wisselink, H., Scheffers, W., van Dijken, J. y Pronk, J. (2006). "Alcoholic fermentation of carbon sources in biomass hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*: current status." Antonie van Leeuwenhoek **90**(4): 391-418.
- Wang, L. K., Kurylko, L. y Hrycyk, O. (1995). Biological process for groundwater and wastewater treatment. International Environmental Systems, Inc., Pittsfield, Mass., USA. United States of America, Titulo de patente 5,451,320.
- Yuliarti, O., Matia-Merino, L., Goh, K. K. T., Mawson, J. A. y Brennan, C. S. (2011). "Effect of Celluclast 1.5L on the Physicochemical Characterization of Gold Kiwifruit Pectin." International Journal of Molecular Sciences **12**(10): 6407-6417.