



**UNIVERSIDAD MICHOCANA DE SAN
NICOLÁS DE HIDALGO
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES
QUÍMICO - BIOLÓGICAS**

TESIS

**DISEÑO DE UN BIOPROCESO PARA LA OBTENCIÓN DE
ETANOL ANHIDRO A PARTIR DE BAGAZO
DEL *Agave tequilana* WEBER**

QUE PRESENTA:

M. C. JAIME SAUCEDO LUNA

PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

CON OPCIÓN EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

ASESOR: D. B. JESÚS CAMPOS GARCÍA (I.I.Q.B.)

CO ASESOR: D. C. AGUSTÍN CASTRO MONTOYA (F.I.Q.)

CO ASESOR: D. C. MAURO M. MARTÍNEZ PACHECO (I.I.Q.B.)

ÍNDICE

ÍNDICE	i
LISTA DE FIGURAS	iii
I.- RESUMEN	1
II.- SUMMARY	2
III.- INTRODUCCIÓN	3
III.1.- Bioenergía y biocombustibles	4
III.2.- Etanol como combustible y ventajas ambientales de su uso	9
III.3.- Etapas relacionadas con la obtención de etanol a partir de residuos lignocelulósicos	12
III.4.- El Tequila y producción del bagazo de <i>Agave tequilana</i> Weber	13
III.5.- Constitución de la pared celular de los materiales lignocelulósicos	15
III.6.- Pre tratamiento de biomasa lignocelulósica	18
III.7.- Obtención de factores de conversión de celulosa y hemicelulosa en la hidrólisis	23
III.8.- Fermentación de los hidrolizados	23
III.9.- Purificación y obtención de etanol anhidro	25
III.10.- Comentarios	25
IV.- HIPÓTESIS	27
V.- OBJETIVOS	28
VI. – RESULTADOS	29
CAPÍTULO 1	29
OPTIMIZATION OF ACID HYDROLYSIS OF BAGASSE FROM <i>Agave tequilana</i> Weber	29
Abstract	29
Resumen	29
1. Introduction	29
2. Materials and methods	31
3. Results and discussion	31
Conclusions	35
References	35
CAPÍTULO 2	37
<i>Colletotrichum lindemuthianum</i> (Sacc. & Magn.) Scrib. is a potential cellulases producer Microorganism	37
ABSTRACT	37

RESUMEN.....	37
1. Introduction.....	37
2. <i>P. vulgaris</i> anthracnose.....	38
3. Taxonomy.....	38
4. Vegetative cycle.....	39
5. Genotypic and phenotypic plasticity.....	40
6. Genome.....	41
7. Saccharification of agave (<i>A. tequilana</i>) lignocellulosic waste by cellulases from <i>C. lindemuthianum</i>	42
8. Conclusions.....	43
9. Acknowledgments.....	44
10. References.....	44
CAPÍTULO 3.....	46
Efficient process for the conversion of lignocellulosic residue of <i>Agave tequilana</i> bagasse to ethanol.....	46
Abstract.....	46
Introduction.....	47
Materials and methods.....	48
Results and discussion.....	52
Conclusions.....	58
References.....	58
CAPÍTULO 4.....	61
BIOPROCESO PARA LA OBTENCIÓN DE ETANOL ANHIDRO A PARTIR DE BAGAZO DEL AGAVE TEQUILANA WEBER.....	61
Resumen.....	61
1. Introducción.....	62
2. Materiales y Métodos.....	64
3. Resultados y discusión.....	65
Conclusiones.....	73
Referencias.....	74
VII.- DISCUSIÓN GENERAL.....	77
Referencias.....	80

LISTA DE FIGURAS

Fig. 1.- Autom3vil Ford Modelo A (1896) para etanol.	5
Fig. 2.- Longitudes de onda en la absorci3n fotoqu3mica y estructura de la clorofila.	8
Fig. 3.- Proceso de la fotos3ntesis.	8
Fig. 4.- Productos de la fotos3ntesis.	9
Fig. 5.- Ciclo sustentable del etanol como combustible.	12
Fig. 6.- Planta de Agave tequilana Weber variedad azul.	14
Fig. 7.- Residuo lignocelul3sico de agave.	14
Fig. 8.-Producci3n de Tequila.	15
Fig. 9.- Consumo de agave.	15
Fig. 10.- Constituci3n de la pared celular.	16
Fig. 11.-Unidad dim3rica b3sica de la celulosa.	16
Fig. 12.-Conformaci3n b3sica de la hemicelulosa.	17
Fig. 13.-Conformaci3n de la lignina y unidad b3sica.	18
Fig. 14.- Mecanismo principal de la hidr3lisis 3cida en los enlaces glucos3dicos.	20
Fig. 15.- Modelos 3D de celulasas.	22
Fig. 16 - Mecanismo principal de la hidr3lisis enzim3tica en los enlaces glucos3dicos.	22

Figuras Cap. 1

Cap. 1 Fig. 1 Production of sugars in the first stage. 1% of H ₂ SO ₄ as catalyst.	33
Cap. 1 Fig. 2 Production of sugars in the first stage. 2% of H ₂ SO ₄ as catalyst.	33
Cap. 1 Fig. 3 Monosaccharides composition profiles for 1% of H ₂ SO ₄ as catalyst and 200 ° C.	33
Cap. 1 Fig. 4 Production of sugars in the second stage. 2% of H ₂ SO ₄ as catalyst.	34
Cap. 1 Fig. 5 Monosaccharides composition profiles for 2% of H ₂ SO ₄ as catalyst and 175 ° C.	34
Cap. 1 Fig. 6 Production of furfural at optimal conditions.	34
Cap. 1 Fig. 7 Response surface for the first stage of hydrolysis 2% H ₂ SO ₄ as catalyst.	34
Cap. 1 Fig. 8 Response surface for the second stage of hydrolysis 2% H ₂ SO ₄ as catalyst.	35

Figuras Cap. 2

Cap. 2 Fig. 1 C. lindemuthianum biological cycle.	iError! Marcador no definido.
Cap. 2 Fig. 2 Production of fermentable sugars from lignocellulosic agave waste.	iError! Marcador no definido.
Cap. 2 Fig. 3 Effect of pH and temperature on cellulases obtained of C. lindemuthianum.	iError! Marcador no definido.
Cap. 2 Fig. 4 Transmission micrographs of cellulosic fibers from agave waste.	iError! Marcador no definido.

Figuras Cap. 3

Cap. 3 Figure 1 Response surface plots of acid saccharification of agave bagasse (BAT).	54
Cap. 3 Figure 2 Response surface plot of enzymatic saccharification of agave bagasse (BAT).	55
Cap. 3 Figure 3 Batch fermentation of acid hydrolyzates obtained from agave bagasse (BAT) using the UM-5 yeast strain.	57
Cap. 3 Figure 4 Batch fermentation of enzymatic hydrolyzates obtained from agave bagasse (BAT) using the UM-5 yeast strain.	57

I.- RESUMEN

El bagazo de *Agave tequilana* Weber es el residuo lignocelulósico que se obtiene del proceso de elaboración del tequila. Actualmente no existe uso industrial para este residuo; sin embargo, puede ser utilizado en la obtención de productos químicos, como el etanol. El objetivo del presente trabajo fue determinar; los componentes principales del bagazo, las condiciones óptimas de hidrólisis para producir azúcares fermentables, la fermentación de los mismos, la separación y purificación del etanol para obtener etanol anhidro. La composición del bagazo resultó en 42 % de celulosa, 20 % de hemicelulosa y 15 % de lignina. La sacarificación del bagazo se realizó utilizando tres métodos: a) hidrólisis ácida, b) hidrólisis enzimática e c) hidrólisis ácida seguida de enzimática. Los mayores rendimientos se obtuvieron con el tercer método, bajo las condiciones de hidrólisis ácida, 147°C, 2 % de ácido sulfúrico por 15 min, seguida de hidrólisis enzimática, 40°C, 72 h y 59 FPU de celulasas y 25 CBU de celobiasas. La concentración obtenida de los hidrolizados químicos y enzimáticos fue de 25.8 g/L y 41 g/L, respectivamente. El máximo de azúcares fermentables fue de 25.76 g/50 g de bagazo, correspondiendo al 73.6 % sobre azúcares teóricos. Los licores azucarados fueron fermentados utilizando una cepa de levadura aislada del bagazo de agave, identificada como *Pichia caribbica* UM5. El rendimiento en la conversión a etanol fue de 50 % con respecto a los azúcares disponibles en los hidrolizados ácidos y de 87 % en los enzimáticos. El etanol total obtenido fue de 8.99 g/50g de bagazo de agave, correspondiendo al 56.75 % del valor teórico en base al material sacarificable. Estos resultados sugieren que el bagazo de agave puede ser utilizado como material lignocelulósico económicamente sustentable para producir bioetanol.

II.- SUMMARY

The bagasse of *Agave tequilana* Weber is a lignocellulosic residue remained from the tequila elaboration process. Actually, industrial usage not has been described for this residue; however it may be used for chemicals production. The aims of the present work were characterization of bagasse components, hydrolysis of agave bagasse to produce fermentable sugars, fermentation to obtain ethanol and dehydration to anhydrous ethanol. Compositions of agave bagasse were cellulose (42 %), hemicelluloses (20 %), lignin (15 %) and other compounds (23 %). Agave bagasse saccharification was carried out using three methods 1) acid hydrolysis, 2) enzymatic hydrolysis and 3) acid hydrolysis followed of enzymatic treatment. Better yields of agave bagasse saccharification were obtained with third option. Optimal conditions for acid hydrolysis were 147° C, 2 % sulfuric acid for 15 min, followed of enzymatic hydrolysis (59 FPU cellulase and 25 CBU of cellobiase, 40°C and 72 hs). Liquors (hydrolysates) obtained from acid and enzymatic hydrolysis shown sugar concentration of 25.8 and 41 g/L, respectively. Fermentable sugars yields under these conditions were 25.76 g/50 g of agave bagasse treated, corresponding to 73.6 % over theoretical sugar obtained. The sugars liquors were fermented using a yeast strain isolated from agave bagasse. It was identified as *Pichia caribbica* UM5 strain. Ethanol yield was 50 % respect available fermentable sugars from acid hydrolysis and 87 % from enzymatic hydrolysis. Total ethanol obtained from hydrolysis process was 8.99 g/50 g of agave bagasse treated, corresponding to total yield of 56.75 % of the theoretical, if total carbon source is converted. These results suggest that the agave bagasse may be proposed as a lignocellulosic raw material economically sustainable for bioethanol production.

III.- INTRODUCCIÓN

El petróleo, gas natural y sus derivados representan el 55 % del consumo mundial de energía. Son estos combustibles los que permiten la existencia de los medios de transporte rápidos y eficientes que tenemos hoy, así como gran parte de las actividades industriales. Un recurso natural no renovable que no va a durar más que algunas décadas: como combustibles fósiles, sus reservas son finitas, la seguridad de abastecimiento es problemática para muchos países que los importan y su uso es la principal fuente de los gases que están provocando cambios climáticos y el calentamiento global.

Es preciso encontrar sustitutos para esos combustibles. Una base racional es producirlos de materia orgánica renovable (biomasa), a partir de la cual en un pasado distante, la naturaleza produjo los combustibles fósiles que utilizamos en la actualidad. Una de las opciones es el etanol, un excelente sustituto para la gasolina, principal combustible usado en automóviles en el mundo.

El Protocolo de Kyoto reconoce la reducción de las emisiones de gases de efecto de invernadero cuando se utilizan combustibles derivados de biomasa vegetal en forma sostenible, que a su vez sustituyen combustibles fósiles. Esta circunstancia genera una valiosa oportunidad para la justificación del proyecto de alcohol como oxigenante de las gasolinas, o bien, como único combustible. El etanol producido mediante procesos biotecnológicos es una opción viable para sustituir la gasolina en la combustión interna de automotores. Una de las principales ventajas de esto es su carácter sustentable.

Aprovechando las herramientas de la biotecnología moderna, los componentes vegetales se pueden utilizar en la producción de etanol, así como los residuos de diversos cultivos agrícolas como el maíz, sorgo, trigo, el bagazo de la caña de azúcar y en este trabajo, la utilización del residuo del agave utilizado en la fabricación del tequila. Normalmente los residuos son un problema industrial de eliminación y confinamiento originando gastos adicionales por el transporte y disposición de los mismos.

III.1.- Bioenergía y biocombustibles

La conversión de energía solar en energía química, que se realiza en los vegetales durante la fotosíntesis, es uno de los fenómenos fascinantes de la naturaleza. En la planta iluminada por el sol, la fugaz radiación solar se transforma en productos estables, absolutamente esenciales a la vida en nuestro planeta. Desde el principio de la humanidad, fue la simbiosis con el mundo vegetal lo que garantizó el suplemento de alimentos, energía y materias primas, permitiendo a lo largo de milenios, que aumenten los niveles de bienestar y productividad económica. Tras la breve interrupción en los últimos siglos, durante los cuales la energía contenida en los materiales fósiles pasó a ser ambiciosamente explotada y utilizada en forma de carbón, petróleo y gas natural, la energía fotosintética vuelve lentamente a ser la protagonista principal. Capaz de mitigar preocupantes problemas ambientales, la energía fotosintética le brinda una nueva dinámica al mundo agroindustrial y ofrece una alternativa efectiva a la necesaria evolución de la sociedad industrial moderna hacia un contexto energético sostenible y racional. Sin pretender ser la solución exclusiva, la captación y el almacenamiento de energía solar en los vegetales pueden desempeñar un rol destacado en el futuro energético de las naciones.

En su acepción más rigurosa, la energía es la capacidad de realizar cambios, presentada bajo diferentes formas; tales como la energía térmica, la energía eléctrica y la energía química, pero siempre representando un potencial para causar transformaciones, ya sean naturales o determinadas por el ser humano. La energía química es la forma de energía que se genera a través de reacciones químicas en las que tienen lugar cambios de composición, transformándose los reactivos en productos, generalmente con liberación de calor. Por ejemplo, la energía química está disponible en los alimentos y en los combustibles, y se usa en los procesos vitales, así como para mover vehículos. Un caso particular de energía química es la *bioenergía*, que se puede definir como cualquier forma de energía asociada a formas de energía química acumulada mediante procesos fotosintéticos recientes. En general, se denomina *biomasa* a los recursos naturales que poseen bioenergía y que se pueden procesar para obtener formas energéticas más elaboradas y adecuadas para su uso final, tal como el bioetanol o biodiesel que se llaman así para denotar su procedencia.

En el amplio contexto de la bioenergía, la producción de biocombustibles líquidos sirve para atender particularmente las necesidades de transporte automotor. Para estos fines, además de

los biocombustibles, aún no existen otras alternativas renovables con sustento tecnológico y viabilidad económica eficiente. Los biocombustibles líquidos se pueden utilizar adecuadamente en motores de combustión interna que equipan los más diversos vehículos automotores y que se clasifican básicamente en dos tipos, dependiendo de la manera como inicia la combustión. Motores del ciclo Otto, con ignición a chispa, para los cuales el biocombustible más recomendado es el bioetanol; y motores del ciclo Diesel, en los cuales la ignición se logra por compresión y que pueden utilizar con buen desempeño el biodiesel. En ambas situaciones, los biocombustibles pueden ser usados puros o mezclados con combustibles convencionales derivados de petróleo. Es interesante observar que, en los primeros años de la industria automotriz, durante la segunda mitad del siglo XIX, los biocombustibles representaban la principal fuente de energía para los motores de combustión interna, con el uso del bioetanol por Henry Ford y del aceite de maní, por Rudolf Diesel. Estos dos productos se reemplazaron por la gasolina y el diesel, respectivamente, a medida que los combustibles derivados de petróleo pasaron a ser abundantes y baratos, a partir del comienzo del siglo pasado. La fig. 1 muestra el primer automóvil creado, el cual utilizaba etanol como combustible.

La producción de biomasa, como resultado de la reacción de fotosíntesis, depende esencialmente de la energía solar, de la presencia de agua y dióxido de carbono (CO_2).



Fig. 1.- Automóvil Ford Modelo A (1896) para etanol.

Tiene lugar en las células vegetales de las hojas, según complejos ciclos que pueden ser representados por la siguiente expresión, en la cual agua y dióxido de carbono se combinan para formar una molécula de glucosa (un azúcar simple) y oxígeno.



En esta reacción, en términos energéticos, la formación de 1 Kg de azúcar corresponde a la fijación aproximada de 17,6 MJ (mega joules) de energía solar, equivalente a medio litro de gasolina. Por balance de masa de esta reacción, se sabe que la síntesis de 1 Kg de glucosa consume 0,6 Kg de agua y 1,4 Kg de dióxido de carbono, liberando a la atmósfera 1 Kg de oxígeno. Naturalmente, esta agua representa sólo la parte utilizada en la composición del azúcar, pues durante su crecimiento y, en particular, durante la fotosíntesis, se produce evapotranspiración y el vegetal necesita agua en volúmenes centenas de veces mayor que la cantidad fijada en el producto vegetal. Así, la condición fundamental para producir biomasa y por lo tanto de bioenergía es; la disponibilidad de radiación solar, agua y dióxido de carbono. Entre los factores básicos para la producción de biomasa vegetal, el dióxido de carbono es el menos problemático, pues está distribuido en la atmósfera, en concentraciones suficientes para las plantas. Sin embargo, es relevante señalar que su presencia mostrada en las últimas décadas es un preocupante aumento principalmente asociado al uso intensivo de combustibles fósiles, capaz de incrementar el efecto invernadero en la atmósfera terrestre y el consecuente calentamiento global. En este escenario dantesco, los biocombustibles presentan dos importantes ventajas: una, su uso permite reducir la emisión de carbono a la atmósfera y, dos, la producción de biomasa es potencialmente favorecida. Dentro de ciertos límites y para algunas especies, en función de la creciente disponibilidad de dióxido de carbono atmosférico. Con relación a la radiación solar, interesa conocer cuál es la fracción utilizada por las plantas y cómo está disponible en el planeta. La fotosíntesis se realiza con absorción de luz por la clorofila en bandas específicas del espectro solar, especialmente para las longitudes de onda entre 400 y 700 nm, región visible y cercana del rojo. En fisiología vegetal, esta banda del espectro de luz se conoce como radiación fotosintéticamente activa (PAR, del inglés *photosynthetically active radiation*) y corresponde, aproximadamente, al 50% del total de la radiación solar (fig.2).

Con relación a la disponibilidad de radiación solar, el factor primordial es la latitud, donde las regiones tropicales reciben más energía solar en comparación con las ubicadas en otras latitudes. Según el Atlas Solarimétrico, un área de un metro cuadrado, ubicada entre 10° y 15° de latitud recibe, aproximadamente, 18 MJ/día, mientras que, para una latitud entre 20° y 25°, la misma área recibe 16.6 MJ/día, cerca del 8% menos de energía (Cresesb, 2000). También asociada a la latitud, la temperatura ambiente es otro factor que influye directamente en la fotosíntesis, mayores temperaturas favorecen la producción bioenergética, reforzando la ventaja de las regiones más calurosas del planeta en este sentido.

La figura 3 muestra los elementos del cloroplasto y el proceso de la fotosíntesis esquemáticamente.

El agua, el último de los factores esenciales para la fotosíntesis, constituye una limitante a considerar para la producción de masa vegetal. La reducida disponibilidad de recursos hídricos con adecuada calidad y su heterogénea distribución sobre los continentes configuran uno de los grandes retos en el desarrollo de muchas naciones. Extensas áreas soleadas en las regiones semiáridas pueden colaborar poco como fuente de biomasa sin ser irrigadas con volúmenes significativos de agua, implicando costos muy elevados y con frecuencia, dispendios energéticos que dificultan la producción bioenergética. Además, los posibles cambios climáticos derivados del aumento del efecto invernadero en nuestro planeta tienden a modificar de manera preocupante los regímenes pluviales e hídricos, ampliando los riesgos de fenómenos críticos, como sequías e inundaciones, que evidentemente afectan la producción vegetal de modo negativo. La consideración conjunta de todos estos factores delimita el área potencialmente cultivable para bioenergía y todos los demás usos. Considerando todo el planeta, esa área está estimada en 13,2 mil millones de hectáreas, de las cuales son actualmente utilizadas para producir alimentos para humanos y animales cerca de 1,5 mil millones de hectáreas, correspondientes al 11% del total (Hoogwijk y col., 2003). De la radiación solar incidente sobre la Tierra, de 178 mil TW (terawatt o mil millones de kilowatts), se estima que cerca de 180 TW (0.1%) son utilizados en los procesos fotosintéticos naturales o promovidos por los seres humanos. De este modo, en todo el planeta, son producidos anualmente cerca de 114 mil millones de toneladas de biomasa en base seca correspondiendo aproximadamente a 1.97 mil millones de TJ (terajoule o mil millones de kilojoules), a su vez equivalentes a 314 mil millones de barriles de petróleo o cerca de diez mil

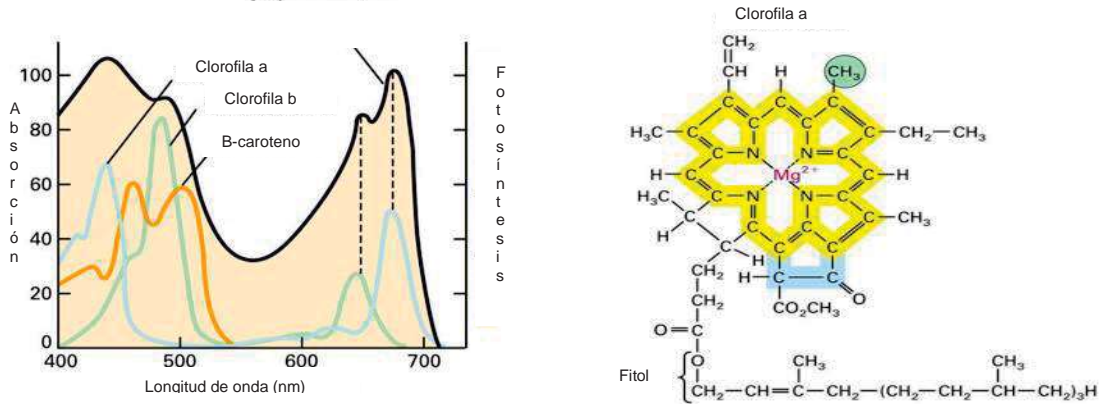


Fig. 2.- Longitudes de onda del espectro electromagnético en donde se realiza la absorción fotoquímica y estructura de la clorofila. (Biología celular y molecular. Lodish, 5ª ed. 2005)

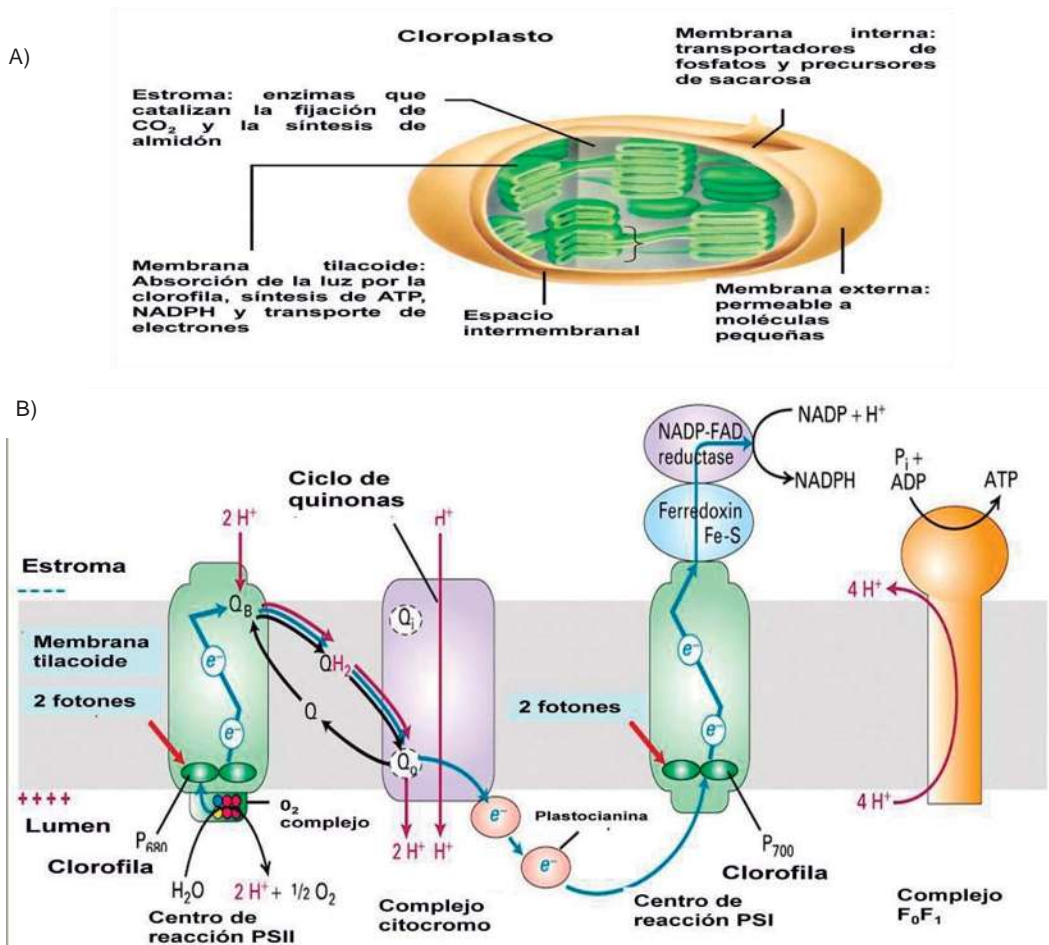


Fig. 3.- Esquema general de la fotosíntesis. A) partes que integran un cloroplasto. B) Proceso de transformación de la energía solar en energía química en los cloroplastos. (Biología celular y molecular. Lodish, 5ª ed. 2005)

veces el actual consumo mundial de ese combustible fósil. En ese contexto, el promedio de la eficiencia de asimilación de la energía solar es inferior al 1%, aunque vegetales de mayor desempeño, como la caña de azúcar, puedan alcanzar un 2.5% en promedio anual (Smil, 1991). Naturalmente, estos valores sirven sólo como referencia para entender la magnitud energética de la fotosíntesis. No tiene sentido imaginar la bioenergía como sustituta de todas las formas fósiles de suplemento energético, principalmente en los países de elevada demanda. Este crecimiento vegetal sucede sobre todo en especies nativas de las regiones tropicales, estimándose que las actividades agrícolas corresponden a cerca del 6% de este total.

La figura 4 muestra la forma como se realiza la captación del CO₂ por la enzima ribulosa 1,5 bisfosfato (Rubisco) y los productos obtenidos.

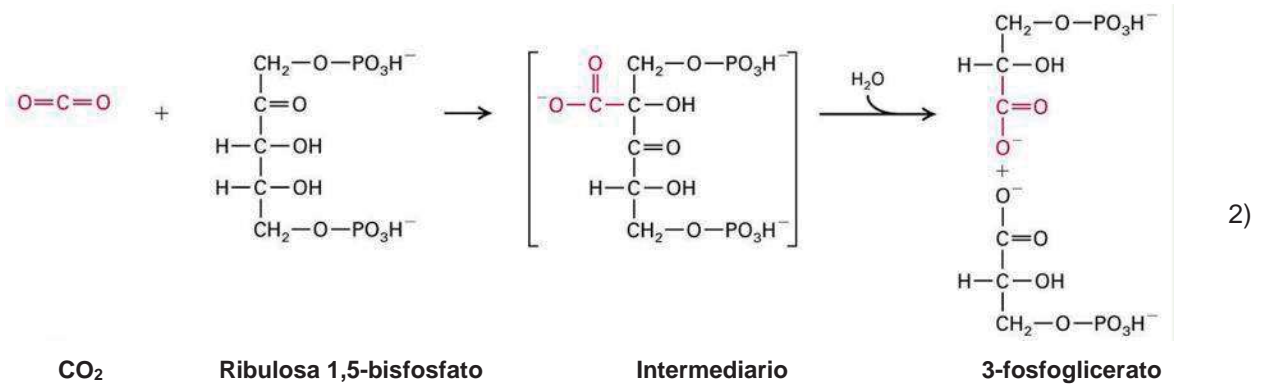


Fig. 4.- Captación del CO₂ y productos de la fotosíntesis. (Biología celular y molecular. Lodish, 5ª ed. 2005)

III.2.- Etanol como combustible y ventajas ambientales de su uso

Cualquiera sea su origen – biomasa o procesos petroquímicos y carboquímicos –, el etanol es un combustible, es decir, libera significativas cantidades de calor al quemarse. Sin embargo, el etanol presenta algunas diferencias importantes con relación a los combustibles convencionales derivados de petróleo. La principal es el elevado porcentaje de oxígeno, que constituye cerca del 35% en masa del etanol. Las características del etanol posibilitan la combustión limpia y mejor desempeño de los motores, lo que contribuye a reducir las emisiones contaminantes, aún al mezclarlo con la gasolina. En estos casos, actúa como un verdadero aditivo para el combustible normal, mejorando sus propiedades. No obstante la larga experiencia con el etanol como combustible en algunos países, en particular Brasil, es

notable cómo en diversos países donde el etanol todavía no se utiliza regularmente subsisten prejuicios y desinformación sobre las reales condiciones de uso y las ventajas que se deben asociar a este combustible y aditivo.

El etanol o alcohol etílico, es una sustancia con fórmula molecular C_2H_6O , que puede ser utilizada como combustible en motores de combustión interna con ignición a chispa (ciclo Otto) de dos maneras, básicamente: 1) en mezclas de gasolina y etanol anhidro; 2) como etanol hidratado. El etanol hidratado debe ser usado en motores fabricados o adaptados específicamente para este fin, en particular adoptando índices de compresión más elevados, buscando utilizar adecuadamente el octanaje más alto del etanol frente a la gasolina y obtener ganancias de eficiencia del 10%. En otras palabras, el mayor octanaje del etanol permite que los motores obtengan más energía útil del calor de combustión, comparativamente a la gasolina. Otros cambios deben ser efectuados en el sistema de alimentación de combustible y en la ignición, para compensar las diferencias en la relación aire-combustible y otras propiedades. Además, debe haber algunos cambios de materiales en contacto con el combustible, como tratamiento anticorrosivo de las superficies metálicas de los tanques, filtros y bombas de combustible y sustitución de tuberías o adopción de materiales más compatibles con el etanol. Actualmente, tras décadas de perfeccionamiento de motores especialmente fabricados para etanol, la tecnología automotriz ha evolucionado lo suficiente como para permitir que los vehículos a etanol puro hidratado tengan desempeño, maniobrabilidad, condiciones de arranque en frío y durabilidad absolutamente similares a los motores a gasolina, especialmente en países con inviernos moderados. Con la intensa utilización de la electrónica aplicada a sistemas avanzados de control de mezcla y de ignición, a partir del 2003 se lanzaron comercialmente vehículos con motores flexibles (*flex-fuel*), capaces de utilizar sin cualquier interferencia del conductor, gasolina (con 20% a 25% de etanol), etanol puro hidratado o mezclas de esos dos combustibles en cualquier proporción, según exigencias de eficiencia y maniobrabilidad y atendiendo a los límites legales de emisiones de gases de escape (Joseph Jr., 2007). Los vehículos equipados con estos motores ya representan la mayoría de los vehículos nuevos vendidos en Brasil a partir de 2005 y desde entonces, están perfeccionándose en términos de desempeño y funcionalidad de los sistemas de arranque en frío. Actualmente, existen más de 60 modelos diferentes, fabricados por diez montadoras de origen estadounidense, europeo y japonés. Obsérvese que esta concepción de vehículo flexible

permite que el usuario elija, según su conveniencia, el combustible que usará, desde 100% de etanol hidratado hasta una gasolina con 20% a 25% de etanol. En Estados Unidos, Canadá o en Suecia también se comercializan vehículos con motores flexibles pero bajo otro concepto, operando en franjas de concentraciones de etanol que van desde la gasolina pura, sin etanol, hasta una mezcla con el 85% de etanol anhidro y el 15% de gasolina. Producto que está disponible en cantidad creciente, pero todavía limitada en las gasolineras, con la sigla E85. No obstante, la manera más sencilla, frecuente e inmediata para utilizar el etanol como combustible es a través de las mezclas con gasolina en los vehículos ya existentes en el país, sin necesidad de efectuar modificaciones en los motores. Esta es la situación de mayor interés, tanto para los países en desarrollo, los cuales pueden producir etanol y dependen de importaciones de combustibles para su abastecimiento a un costo cada vez más elevado, como para los países industrializados que tienen actualmente un potencial limitado de producción interna de etanol, pero que pueden diversificar su matriz de combustibles líquidos agregando a la producción local el etanol importado de regiones con condiciones favorables para producir este biocombustible.

Pimentel en 1980 comparó el funcionamiento del etanol contra la gasolina basada en el consumo de combustible, la energía y el encendido en frío del motor. Los cálculos teóricos del autor demostraron que el consumo del etanol por los motores es 9% más alto que el consumo de gasolina. Los resultados de las pruebas de camino eran de igual manera, más altos en el consumo de etanol, de 10 a 20% con respecto al consumo de gasolina. Sin embargo, se puede lograr mayor rendimiento del etanol al aumentar el cociente de compresión (8:1 para la gasolina, al 12:1 para el etanol). El aumento del cociente de compresión es permitido por las características antiknocking del etanol. Los datos experimentales demostraron que el etanol puede entregar 20% más de energía que la gasolina (Pimentel y col., 1980).

La presión de vapor del etanol es baja, de tal forma que los arranques en frío son más difíciles en temperaturas abajo de 15 °C, por lo que se requiere un sistema de arranque en frío para evitar este defecto (Pimentel y col., 1980).

La figura 5 muestra el ciclo sustentable que forma el etanol al ser utilizado como combustible en los automotores en comparación de combustibles fósiles.

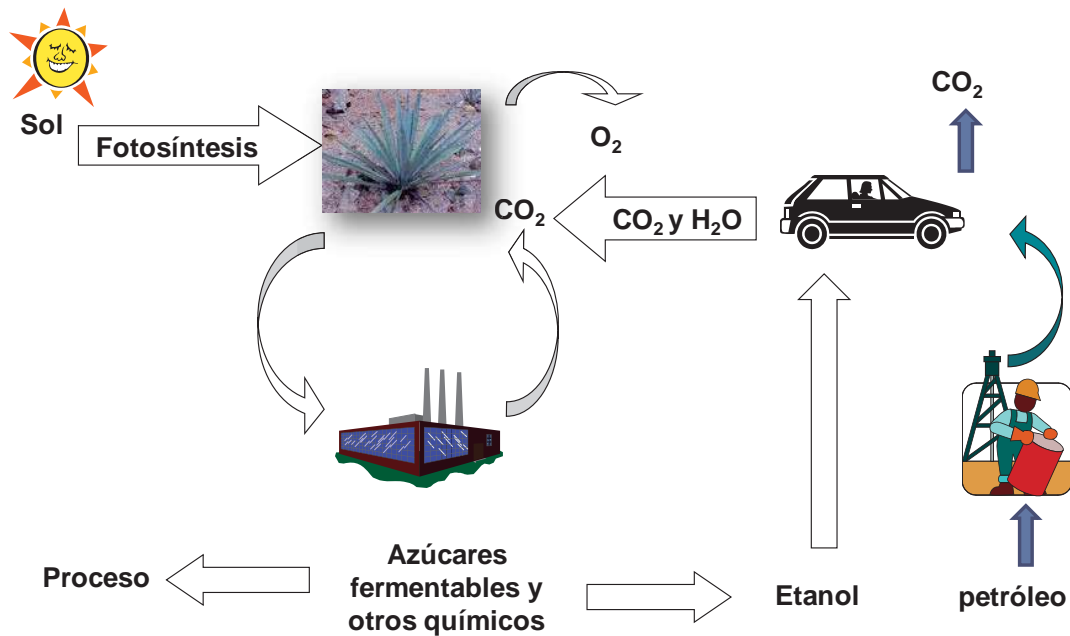


Fig. 5.- Ciclo sustentable que se forma al producir etanol de biomasa vegetal y utilizarlo como combustible, en comparación de petróleo.

III.3.- Etapas relacionadas con la obtención de etanol a partir de residuos lignocelulósicos.

Para desarrollar un proceso que utilice el bagazo del agave para la producción de etanol, se requiere hacer varias consideraciones; 1^a) si la composición del material es suficientemente alta para la producción de azúcares fermentables, 2^a) accesibilidad de los polímeros para la hidrólisis y 3^a) optimización de la fermentación. Considerando azúcares fermentables a todos los azúcares viables para su fermentación alcohólica por microorganismos.

La composición del material determina si la biomasa es conveniente para utilizarla como materia prima, por lo tanto, es deseable un alto contenido de material sacarificable. La biomasa agrícola puede tener altos contenidos de compuestos inorgánicos “cenizas” que producirán polvo y partículas contaminantes. El contenido de la lignina, un polímero asociado no sacarificable, es muy importante ya que éste puede obstaculizar el acceso a los componentes fermentables.

La biomasa lignocelulósica no es fermentable porque los azúcares fermentables potenciales están en forma polimérica y se requiere un tratamiento previo para permitir el acceso a los azúcares. Los polisacáridos están limitados en las membranas celulares de la planta por interacciones entre los polisacáridos así como con otros componentes. En última instancia, se

requiere un tratamiento previo para romper los polisacáridos en las unidades constitutivas, los monosacáridos. Una forma molecular que el organismo fermentador pueda utilizar para su crecimiento y la producción de etanol. Varias formas de tratamiento previo se han investigado, los procesos predominantes son hidrólisis ácida e hidrólisis enzimática.

Una fase muy importante para desarrollar un proceso adecuado en la producción de etanol utilizando el residuo del agave es tener un gran contenido de azúcares para su conversión a etanol en la fermentación. Los estudios en esta área implican la optimización de los parámetros de la fermentación tales como; la naturaleza del organismo, las condiciones de fermentación y el rendimiento de la fermentación. Tradicionalmente se han utilizado las levaduras como el organismo fermentador debido a su naturaleza resistente. Sin embargo, una de las desventajas principales de la levadura es su inhabilidad de fermentar azúcares de 5 carbonos (pentosas). Aunque éstos no sean las formas dominantes de monosacáridos en la biomasa vegetal, esta es una limitante en la conversión total de los monosacáridos hasta etanol. El trabajo de la ingeniería genética ha producido organismos nuevos con tasas de crecimiento vigorosas y altas eficiencias de producción de etanol que pueden ser utilizados en la conversión de biomasa vegetal (Ingram y col., 1987, Lindsay y col., 1995, Asghari y col., 1996).

III.4.- El Tequila y producción del bagazo de *Agave tequilana* Weber

La fabricación del Tequila, se ha generalizado con tal nombre, habiéndose extendido su fama por casi todo el mundo, como bebida típica de México y es objeto de exportación. El 9 de Diciembre de 1974 se concedió protección oficial a varios municipios de los Estados de Jalisco y Nayarit, productores de aguardiente de agave variedad azul, así como el registro de la denominación de origen del tequila a nivel internacional.

Descripción del proceso

El *Agave tequilana* Weber variedad Azul (fig.6), es recibido, fraccionado y después es transportado hacia el patio que corresponde a un almacén temporal del mismo. Las fracciones del agave son introducidas a autoclaves u hornos, en donde se lleva a cabo la hidrólisis de los polímeros mediante el cocimiento del mismo con vapor a una presión de 1.2 Kg/cm^2 , durante 4 horas para autoclave y de 8 a 16 hrs para hornos, permaneciendo el agave por un tiempo total de 18 horas a una temperatura aproximada de 105°C . El agave cocido se lleva a un molino, en donde se extrae el jugo y el residuo se lava para disminuir pérdidas de azúcares.

Una vez extraído el jugo de agave, la fibra residual es conocida con el nombre de bagazo, el cual no tiene ninguna utilidad en la elaboración del Tequila, y es el material lignocelulósico que sirve como materia prima en este proyecto (fig. 7).

Las figuras 8 y 9 muestran las cantidades de Tequila producido en el año 2008 y los requerimientos de agave para esta producción.



Fig. 6.- Planta de *Agave tequilana* Weber variedad azul. (Consejo Regulador del Tequila, 2009)



Fig. 7.- Residuo lignocelulósico de agave. (Consejo Regulador del Tequila, 2009)

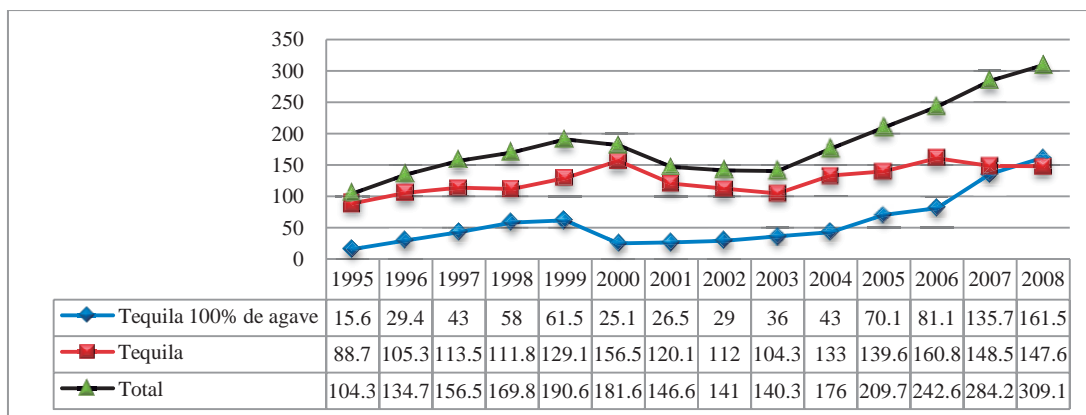


Fig. 8.-Producción de Tequila (Vol. millones de litros, 40% Alc. Consejo Regulator del Tequila, 2009).

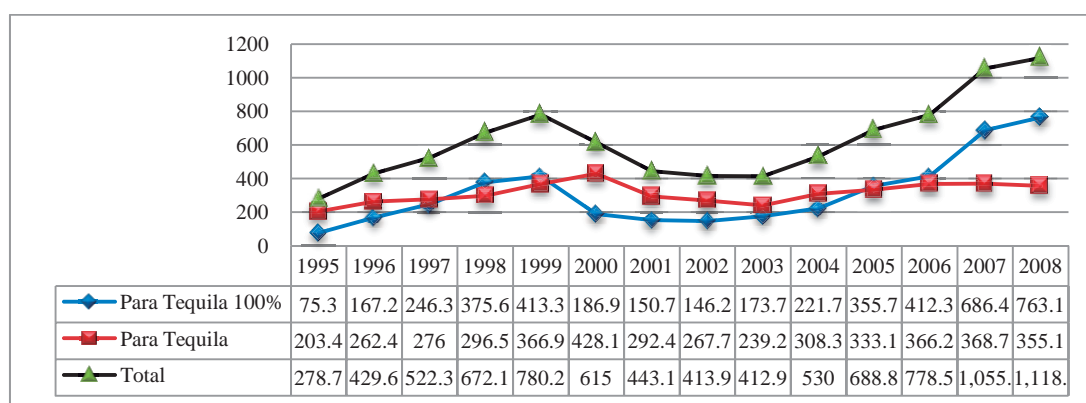


Fig. 9.- Consumo de agave (miles de ton. Consejo Regulator del Tequila, 2009).

III.5.- Constitución de la pared celular de los materiales lignocelulósicos

Los materiales lignocelulósicos consisten en tres grupos principales de polímeros como se muestra en la fig. 10: celulosa, hemicelulosa y lignina. La celulosa y la hemicelulosa son polisacáridos que contienen azúcares fermentables. La celulosa es un polímero de glucosa, un azúcar de 6 carbonos. La hemicelulosa es más diversa, consistiendo en una mezcla de azúcares con 5 y 6 carbonos, tales como xilosa, manosa, glucosa, arabinosa, galactosa y ácidos urónicos. La lignina es un polímero fenólico y los microorganismos de la fermentación del etanol no lo utilizan.

Las estructuras, la organización y las interacciones básicas entre estas moléculas determinan en gran parte las características físicas y químicas de la pared celular vegetal. Algunos de los componentes extraíbles tales como ceras y lípidos, también están presentes en membranas celulares, pero no responden a propósitos estructurales. Los compuestos de materiales inorgánicos tales como calcio, el potasio y sílice, se refieren como cenizas y generalmente son del 1 al 2 %, no se pueden utilizar como sustratos fermentables.

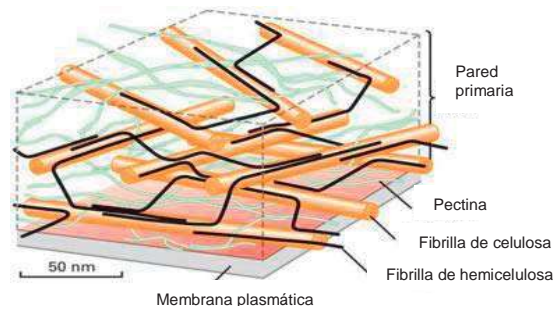


Fig. 10.- Constitución de la pared celular. (Biología celular y molecular. Lodish, 5ª ed. 2005)

Celulosa

Es un polímero lineal de fórmula $(C_6H_{10}O_5)_n$ constituidos por unidades de glucosa unidas entre sí por enlaces β 1-4. La glucosa es un monosacárido cíclico de seis carbonos que presenta las conformaciones ecuatoriales α y β siendo la β la más estable. En la naturaleza son frecuentes los polímeros de glucosa. La polimerización de α -glucosa conduce al almidón, compuesto vegetal de propiedades muy distintas a la celulosa. El glucógeno, muy abundante en el reino animal, es un homopolímero ramificado de glucosa con enlaces α -1-4 en las cadenas lineales y α -1-6 en las ramificaciones (Lehninger y col., 2005). Las cadenas lineales de celulosa se asocian en subunidades, que a su vez se agrupan por enlaces de hidrógeno intermoleculares formando fibrillas. El índice de polimerización oscila entre 1000 y 10000. Las fibrillas se unen en haces, dando lugar a secuencias alternadas de zonas amorfas y zonas cristalinas (fig. 11).

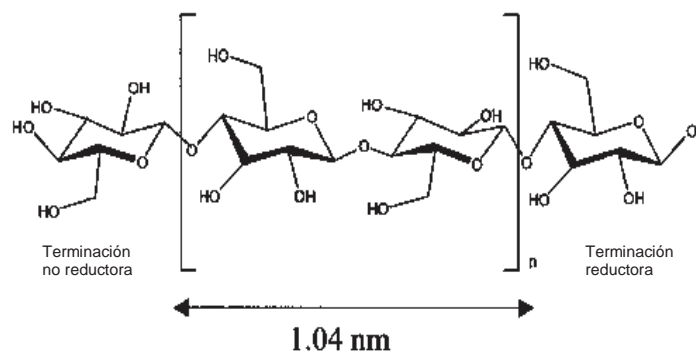


Fig. 11.-Unidad dimérica básica de la celulosa.

Hemicelulosa

La hemicelulosa es un conjunto de polímeros formados por distintos azúcares, por lo que su caracterización es más compleja que en el caso de la celulosa. Los principales monómeros que aparecen formando la hemicelulosa son: glucosa, manosa y galactosa (hexosas) y las pentosas arabinosa y xilosa. Algunos monómeros (glucosa, manosa y xilosa) presentan grupos acetilo.

Dentro de la hemicelulosa se distinguen normalmente entre la gamma celulosa (constituidos por azúcares distintos de la glucosa) y la beta celulosa (constituidas por unidades de glucosa).

Presenta un grado de polimerización entre 50 y 300, menor que el de la celulosa. Son polímeros cortos y ramificados, lo que le confiere una estructura amorfa. Se orientan al azar, aunque dispuestos mayoritariamente en la dirección de las fibrillas elementales de celulosa (fig. 12). Su función en la pared celular es unir la lignina con la celulosa, actuando como cemento entre dichos polímeros, que no presentan enlaces directos sino a través de la hemicelulosa. La hemicelulosa puede hidrolizarse a azúcares con mayor facilidad que la celulosa, aunque la reacción deberá estar catalizada igualmente por ácidos o por enzimas.

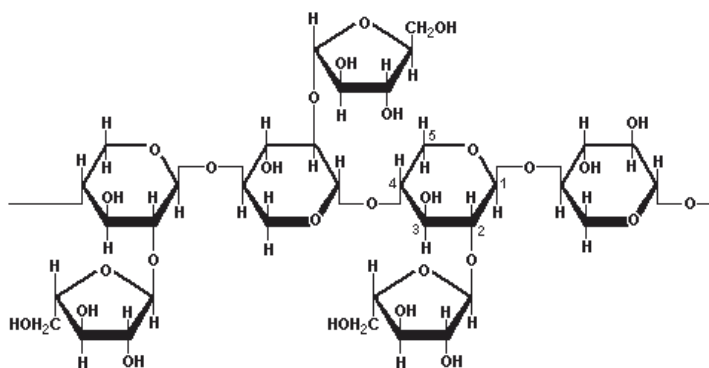


Fig. 12.-Conformación básica de la hemicelulosa.

Lignina

Es un polímero tridimensional amorfo compuesto principalmente por moléculas de fenilpropano unidas entre sí por enlaces tipo éter o carbono-carbono. Presenta en su estructura grupos hidroxilo y metoxilo, en cantidades dependientes del material vegetal considerado (fig.13). Hay tres tipos mayoritarios de fenilpropanos formando la lignina, siendo el trans-coniferil el más abundante en la madera. Su estructura no ha podido determinarse con exactitud.

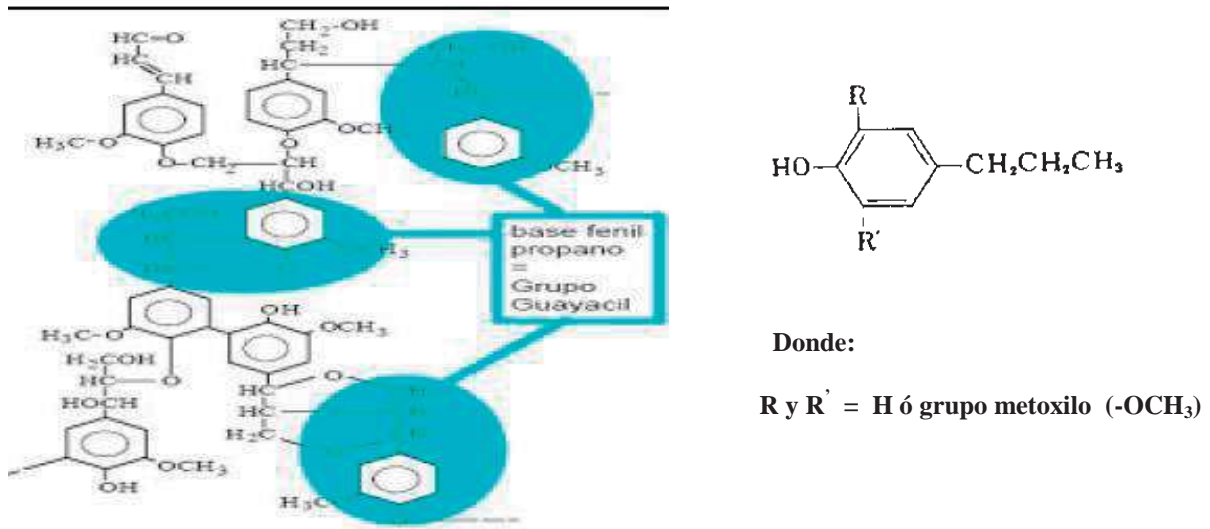


Fig. 13.-Conformación de la lignina y unidad básica.

Las funciones biológicas de la lignina son aglomerar las fibras de celulosa dándoles mayor rigidez, protegerlas de ataques externos (tanto ambientales como microbiológicos) y conferirle carácter hidrofóbico.

Debido a estas funciones, presenta una gran resistencia a los ataques químicos y biológicos, siendo uno de los polímeros naturales más resistentes. Todos los métodos empleados para aislarla provocan cambios en su estructura.

III.6.- Pre tratamiento de biomasa lignocelulósica

Para calificar como eficaz un proceso de hidrólisis de polisacáridos en el tratamiento previo debe: 1) maximizar la producción de azúcares fermentables, 2) evitar o reducir al mínimo la degradación de carbohidratos, 3) evitar o reducir al mínimo la formación de subproductos que tienen la capacidad de inhibición del crecimiento microbiano, y 4) generar un proceso energética y económicamente eficiente. En términos más simples, el propósito de un tratamiento previo son romper la estructura lignocelulósica a sus componentes monosacáridos para ser utilizados como substratos de la fermentación.

Los factores principales que están involucrados en el rompimiento del material lignocelulósico son los espacios intersticiales o poros de la pared vegetal (Grous y col., 1986), cristalinidad de la celulosa (Goldstein, 1983) y la eliminación de la lignina (Dekker, 1988). La accesibilidad de la celulosa en la pared vegetal se puede aumentar al retirar la hemicelulosa ya que crea poros más grandes en las micro fibrillas (McMillan, 1994). Indica también que la

digestibilidad de la celulosa por enzimas es directamente proporcional a la eliminación de la hemicelulosa. Grous y col., (1986) demostró que existe una correlación positiva entre la porosidad (o la superficie disponible) y la producción de glucosa por la hidrólisis enzimática; (es decir mayor porosidad corresponde a porcentajes más altos de producción de glucosa.)

La cristalinidad de la celulosa es el segundo factor que determina la producción de glucosa. Grados de cristalinidad mayores son proporcionales a proceso de hidrólisis lentas (Goldstein, 1983). Weimar y col. (1995) demostraron que los tratamientos químicos y termales tienen una tendencia a aumentar el índice relativo de la cristalinidad (RCI) de la celulosa amorfa. El mismo estudio demostró que no se considera ningún aumento significativo en RCI para la celulosa cristalina. En tercer lugar, el acceso a las microfibrillas de la celulosa está altamente restringido por la matriz circundante de lignina, el retiro de la lignina realzará en gran parte la accesibilidad a los polisacáridos. Hay varios tipos de procedimientos de tratamientos previos para convertir la biomasa lignocelulósica hasta azúcares fermentables. Éstos incluyen tratamientos con álcalis y ácidos, concentrados y diluidos, explosión con vapor, explosión de vapor con amoníaco (AFEX), hidrólisis enzimática, etc. En este trabajo se utiliza hidrólisis ácida y enzimática porque demuestran ventajas energéticas y económicas sobre las otras.

Hidrólisis ácida

La hidrólisis ácida ha sido el tratamiento previo tradicional para la fermentación lignocelulósica. La fig, 14 muestra el mecanismo de reacción de la hidrólisis ácida.

Bracconet descubrió en 1819 que al tratar la madera con ácido sulfúrico concentrado se obtiene glucosa (según lo citado en Goldstein, 1983). El proceso “americano”, también conocido como el método de Simonsen, fue utilizado entre 1910 y 1922. La producción del etanol del proceso producía 22 galones/tonelada, demostrando ser poco económico. Un proceso alemán, desarrollado algunos años más tarde por Heinrich Scholler tenía producciones en 52-58 galones de etanol /tonelada con tiempos de hidrólisis de 13-20 h. El proceso de Scholler utilizó “un método de filtración por pulsos” donde las hornadas con 0.8% de ácido sulfúrico fueron infiltradas a través de una columna de madera comprimida con temperaturas de 120 °C a 180 °C. La operación máxima del proceso de Scholler se mantuvo durante la Segunda Guerra Mundial en Alemania. Posteriormente en E.E.U.U. se mejoró el proceso de Scholler, aumentando la producción de etanol a 64.5 galones/tonelada en un tiempo de tres horas de hidrólisis.

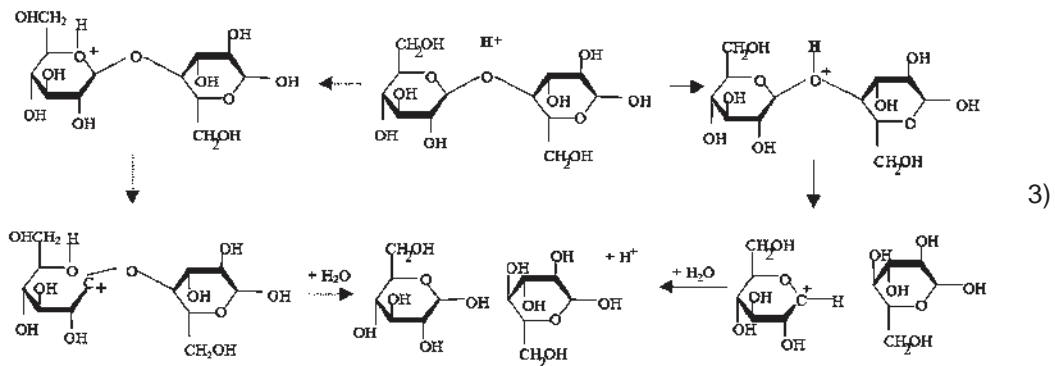


Fig. 14.- Mecanismo principal de la hidrólisis ácida en los enlaces glucosídicos.

La mejora considerada en el proceso era debido al flujo continuo de ácido diluido así como al retiro continuo del hidrolizado, reduciendo al mínimo la degradación de monosacáridos. El proceso de Madison nunca fue establecido comercialmente por no competir eficazmente con el etanol derivado de fuentes del petróleo.

Hidrólisis enzimática

Las celulasas son un grupo de enzimas que actúan sinérgicamente para hidrolizar la celulosa. Actualmente, el mecanismo real de la hidrólisis de la celulosa y las interacciones entre los componentes todavía están bajo investigación. Según la comprensión actual, los componentes de la celulasas incluyen endoglucanasas, exoglucanasas (celobiohidrolasas), y β -glucosidasas (celobiasas) (Nidetsky y col., 1995). Sin embargo, las β -glucosidasas están bajo controles genéticos separados y no se consideran a menudo como celulasas (Mandels, 1982).

En investigaciones anteriores, fue discutida la existencia de un componente C1 para iniciar la hidrólisis de la celulosa altamente cristalina (Rey y Vessal, 1968). La idea del componente C1 para romper los enlaces de hidrógeno intermoleculares de las fibrillas y aumentar áreas amorfas fue presentada primero por Reese, Siu, y Levinson en 1950 (citado en Selby, 1968). El componente C1, sin embargo, nunca fue aislado y su actividad no se podía medir directamente. Wood y McCrae (1978) exploraron la posibilidad que el componente C1 podría ser igual que exoglucanasas. La conclusión de esta investigación fue que la actividad C1 y la de exoglucanasas eran debido a la misma proteína. Actualmente se considera las exoglucanasas (celobiohidrolasas) como “el componente C1” (Woodward, 1991). El mecanismo generalmente aceptado de un sistema de celulasas (particularmente de *Trichoderma reesei*) en la celulosa cristalina es: las endoglucanasas hidrolizan los enlaces glucosídicos

internos de β -1,4- de las regiones amorfas, de tal modo que aumentan el número de extremos no reductores expuestos. Las exoglucanasas rompen los oligómeros en unidades de celobiosa utilizando los extremos no reductores, que alternadamente son hidrolizados a las unidades de celobiosa y esta a su vez hasta glucosa por las β -glucosidasas (Woodward, 1991). Hay varias isoenzimas de las endo- y exo- glucanasas que se diferencian principalmente en la estereospecificidad. Para la hidrólisis óptima de la celulosa se requiere la acción concertada de los componentes enzimáticos en varias configuraciones.

Las celulasas, sin embargo, hidrolizan con facilidad las regiones amorfas de celulosa (Fan y col., 1980). El mismo estudio analizó los efectos de la superficie disponible sobre la hidrólisis y no encontró ninguna relación significativa. Caulfield y Moore, (1974) habían establecido con anterioridad que las regiones amorfas de celulosa hidrolizan dos veces más rápido que las regiones cristalinas. Grous y col., (1985) y Dekker (1988) utilizaron una preparación enriquecida con celobiasas con el fin de obtener mayor rendimiento de glucosa. El exceso de celobiosa en el hidrolizado tiene un efecto de inhibición sobre las celulasas disminuyendo la producción de glucosa. Por lo que al preparar soluciones de enzimas aumentando la proporción de β -glucanasas puede reducir al mínimo los efectos inhibitorios rompiendo la celobiosa a unidades de glucosa (Dekker, 1988). La fig. 15 muestra el modelo en tres dimensiones de celulasas provenientes de *A. niger* y de *R. marinus*. Saddler y col., (1982) aplicaron varios tratamientos para la biomasa incluyendo explosión con vapor a la madera de álamo para estudiar sus efectos sobre producción de glucosa en la hidrólisis enzimática.

Las celulasas usadas en este estudio fueron de especies de *Trichoderma*. Las muestras de madera de álamo se explotaron con vapor a 250 °C y tiempos de 20s, 60s y 120s. Otros tratamientos fueron aplicados individualmente o en varias combinaciones, incluyendo secado con aire; molienda del material y oxidación con clorito de sodio del 2 al 10%.

Las muestras explotadas con vapor y secadas con aire mostraron que reducían la cantidad de azúcar obtenida por la hidrólisis enzimática. De igual manera, se encontró para las muestras de explosión con vapor y molidas.

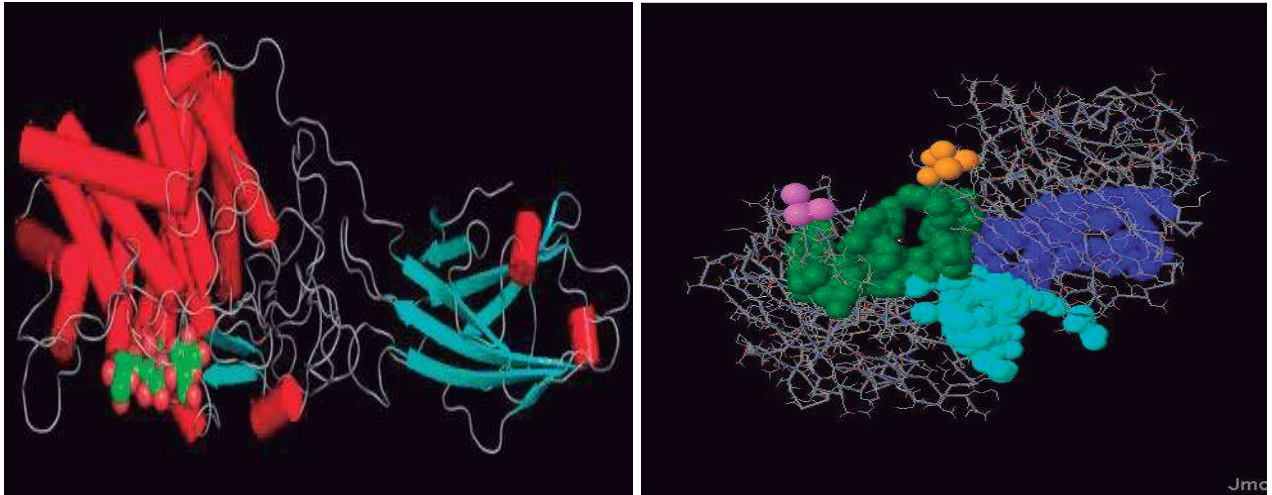


Fig. 15.- Modelos 3D de celulasas de *A. niger* y de *R. marinus*. (Computed Atlas of surface topography of proteins)

El tratamiento de las muestras de explosión con vapor y tratadas con clorito del sodio al 2% mostraron producciones mejoradas de glucosa en la hidrólisis enzimática. El clorito del sodio oxidó la lignina en las muestras, y por lo tanto, expone mayor superficie de celulosa a las celulasas incrementando el rendimiento. El mecanismo de acción de las enzimas mediante el cual rompen los enlaces glucosídicos del material lignocelulósico se aprecia en la Fig. 16.

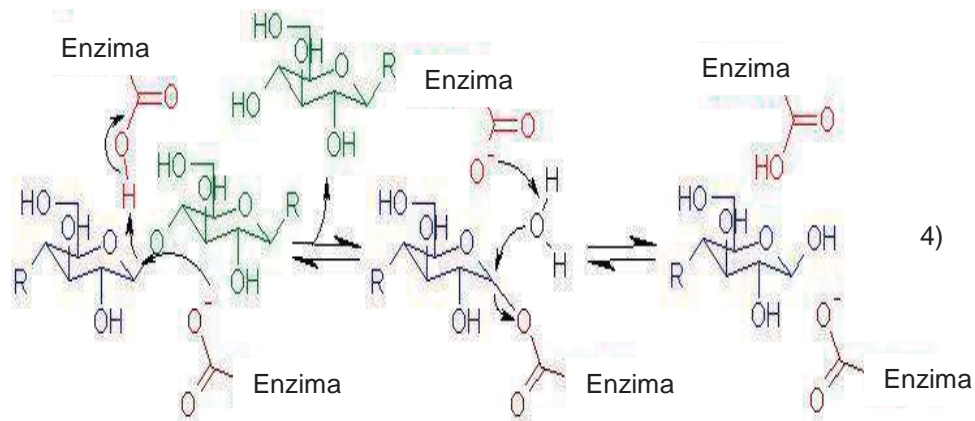
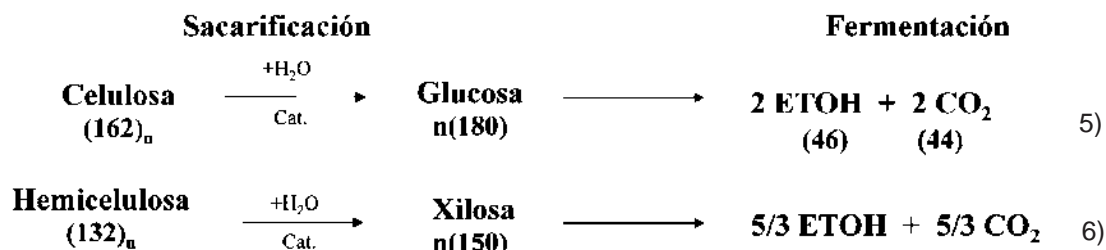


Fig. 16 - Mecanismo principal de la hidrólisis enzimática en los enlaces glucosídicos.

III.7.- Obtención de factores de conversión de celulosa y hemicelulosa en la hidrólisis.

La relación estequiométrica de la conversión de material lignocelulósico hasta azúcares y etanol se pueden expresar de acuerdo con las expresiones 5) y 6).



Utilizando las relaciones estequiométricas, podemos obtener los siguientes factores de conversión para todos los materiales lignocelulósicos en base al % en peso de cada componente.

Para celulosa:

(Para bagazo de agave)

$$\text{Glucosa} = 180/162 (\%_w)(1000/100) \text{ g/Kg} = \mathbf{11.11 (\%_w)} = 466$$

$$\text{Etanol} = 1.11(\%_w)(1000/100)(2 \times 46/180) = \mathbf{5.677 (\%_w)} = 237 \text{ g/Kg}$$

Para hemicelulosa

$$\text{Xilosa} = 150/132 (\%_w)(1000/100) \text{ g/Kg} = \mathbf{11.36 (\%_w)} = 227$$

$$\text{Etanol} = 1.136 (\%_w)(1000/100)(5/3 \times 46/150) = \mathbf{5.80 (\%_w)} = 115 \text{ g/Kg}$$

$$\mathbf{\text{Total} = 693 = 352 \text{ g/kg}}$$

Así, por ejemplo, para el bagazo de *A tequilana* Weber el contenido de celulosa es 40% y de hemicelulosa 20% encontramos que la máxima cantidad de azúcares que se pueden obtener es 693 g de azúcares y 352 g de etanol/kg de bagazo.

La obtención y aplicación de estos factores permiten conocer el potencial de un material lignocelulósico en base a su contenido en polímeros sacarificables.

III.8.- Fermentación de los hidrolizados

Son varios reportes publicados sobre la producción de etanol por fermentación con microorganismos (bacterias, levaduras y hongos) que se han utilizado en la producción de etanol. Históricamente, los microorganismos más utilizados han sido levaduras y dentro de las

levaduras a *Saccharomyces cerevisiae*, la cual puede producir caldos de fermentación hasta con 18% de etanol (Lin y Tanaka, 2005).

S. cerevisiae metaboliza glucosa por la ruta Embden–Meyerhof (EM). Comparado con esto, la ruta Entner–Doudoroff (ED) es el principal camino del consumo de glucosa en muchas bacterias, como *Zymomonas sp.* El alto rendimiento en etanol y productividad observado por *Zymomonas sp.* es a consecuencia de su fisiología. *Zymomonas sp.* es el único microorganismo que metaboliza glucosa anaeróbicamente utilizando la ruta ED (Matthew et al., 2005). El rendimiento en ATP de la ruta ED es la mitad por mol de glucosa en comparación de la ruta EM. Como consecuencia, *Zymomonas sp.* produce menos biomasa que las levaduras y más carbono es canalizado hacia productos de la fermentación. También, como consecuencia del bajo rendimiento en ATP, *Zymomonas* mantiene un flujo alto de glucosa a través de la ruta ED. Todas las enzimas involucradas en la fermentación son expresadas constitutivamente y constituyen el 50% de las proteínas totales de la célula. (Sprenger 1996). *Z. mobilis* es un microorganismo Gram-negativo inusual, que tiene varias propiedades atractivas para la producción de etanol. Este microorganismo tolera más de 120 g/l etanol. Tiene el mejor rendimiento de etanol (5–10% más etanol por glucosa fermentada) y tiene la productividad mayor de etanol (2.5×) que *Saccharomyces sp.* (Sprenger 1996). Más aún, *Z. mobilis* es generalmente reportada como una bacteria sanitariamente segura y tiene necesidades nutricionales simples. Sin embargo, *Z. mobilis* no es adecuada para todos los recursos obtenibles de la biomasa porque sólo fermenta glucosa, fructosa y sacarosa. En general, *S. cerevisiae* es un microorganismo preferido por la industria debido a su resistencia y maniobrabilidad. Otro recurso bacteriano valioso es *Escherichia coli* modificada genéticamente para la producción de etanol. La construcción de cepas de *E. coli* selectivas para producir etanol fue uno de los primeros éxitos de la aplicación de la ingeniería metabólica (Millichip y Doelle, 1989). *E. coli* tiene varias ventajas como biocatalizador para la producción de etanol, incluyendo la habilidad para fermentar un amplio espectro de azúcares, no requiere de complejos factores de crecimiento. Las desventajas mayores asociadas con la utilización de cultivos de *E. coli* son el intervalo estrecho y neutro de pH (6.0–8.0) para su crecimiento, cultivos menos resistentes comparados con levaduras y la percepción del público de peligro con las cepas de *E. coli*.

III.9.- Purificación y obtención de etanol anhidro

Es recomendable que en el etanol no haya presencia de agua por lo que es necesario desarrollar la tecnología para su purificación y lograr la producción de etanol anhidro, sin embargo, al ser esta etapa la de mayor consumo energético de todo el proceso, cualquier avance en la disminución de la energía requerida para la separación del etanol impactará de manera sobresaliente en el rendimiento energético global del proceso. Debido a la formación de un azeótropo en la mezcla etanol-agua no es posible purificarlo por los métodos tradicionales de destilación, por lo que han surgido diferentes alternativas tecnológicas como son: la destilación extractiva (Maciel y Brito, 1995; Lelkes, 2000), la adsorción con diferentes materiales como zeolitas, con los mismos materiales lignocelulósicos (Carmo y Gubulin, 1997 a y b; Beery, 2001; Sun, 2007), la pervaporación con membranas poliméricas (Tsuyumoto, 1997; Jiratananon, 2002; Kanti, 2004; Dubey, 2005; Kupiec, 2008) y la utilización de sales iónicas para el desfaseamiento y/o ruptura del azeótropo (Iliuta y Thyron, 1996; Pinto, 2000; Ligerio y Ravagnani, 2003). Existe un número grande de esfuerzos que se han generado en este sentido, sin embargo, no hay un proceso ya establecido que logre las metas de disminución energética

III.10.- Comentarios

La revisión bibliográfica presentó la evidencia que apoya las ventajas del uso del etanol como combustible así como la perspectiva de su producción partiendo de biomasa lignocelulósica. Los residuos lignocelulósicos son una fuente de carbón con un potencial muy atractivo pero su utilización requiere tecnología innovadora, recursos renovables y fácilmente disponibles. Actualmente investigadores en todo el mundo están motivados para encontrar formas de utilizar estos recursos y medios para explotarlos económicamente.

Por lo tanto, el presente proyecto se enfocó en generar un proceso para etanol, a escala de laboratorio, a partir de residuos lignocelulósicos del *Agave tequilana* Weber obtenidos de la preparación del tequila. Para lograr esto se investigaron las características del agave, la forma eficiente de romper los polímeros de celulosa y hemicelulosa mediante hidrólisis ácida, biológica y/o una combinación de ambas para obtener sus monómeros que son glucosa y xilosa principalmente. Se aislaron y seleccionaron microorganismos del mismo residuo del agave, capaces de fermentar los hidrolizados para obtener etanol, contemplando la optimización de las variables en la fermentación alcohólica. Posteriormente se implementó un

proceso de destilación y obtención de etanol anhidro con la utilización de sales iónicas que conducen al desplazamiento del azeótropo y con lo cual se reduce el número de platos en la columna de destilación necesaria y por consiguiente, el consumo energético. Además se estudiaron materiales de adsorción o mallas moleculares que permiten la separación del etanol-agua.

IV.- HIPÓTESIS

El bagazo del *Agave tequilana* Weber variedad azul que resulta del proceso de producción de Tequila es un sustrato lignocelulósico viable para la obtención de etanol anhidro.

V.- OBJETIVOS

El objetivo general del presente proyecto fue generar un proceso para obtener etanol a partir de residuos lignocelulósicos del *Agave tequilana* Weber obtenidos de la preparación del tequila.

Los objetivos particulares fueron:

1. Caracterizar el residuo lignocelulósico del *Agave tequilana* Weber.
2. Obtener y caracterizar jugos azucarados a partir de residuos lignocelulósicos del *Agave tequilana* Weber por hidrólisis ácida, hidrólisis enzimática y la combinación de ambas.
3. Seleccionar organismos fermentadores de diferentes fuentes empleando los hidrolizados obtenidos.
4. Establecer las condiciones óptimas de fermentación de los jugos obtenidos por sacarificación.
5. Estudiar las condiciones óptimas de la destilación y deshidratación del etanol.

VI. – RESULTADOS

CAPÍTULO 1

Revista Mexicana de Ingeniería Química

Vol. 9, No. 1 (2010) 91- 97

OPTIMIZATION OF ACID HYDROLYSIS OF BAGASSE FROM *Agave tequilana* Weber

J. Saucedo-Luna², A. J. Castro-Montoya^{1*}, J. L. Rico¹, J. Campos-García²

¹*División de Estudios de Posgrado, Facultad de Ingeniería Química, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Edif. V-1, Cd. Universitaria, 58060, Morelia, Michoacán, México.*

²*Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Edif. B3, Cd. Universitaria, 58058, Morelia, Michoacán, México.*

Received 7 of October 2009; Accepted 4 of March 2010

Abstract

The bagasse of *Agave tequilana* Weber is a lignocellulosic residue resulting from the production of tequila. At present, the bagasse is not industrialized, and poses a serious contamination problem. Thus, an ongoing research effort is to explore the possibility to obtain added value chemicals from it. The aim of the present work was to determine the effect of temperature, concentration of H₂SO₄ and reaction time on the hydrolysis of agave bagasse to produce fermentable sugars. The hydrolysis was performed in two sequential batch stages: (a) in the first stage the optimal conditions were 151° C, 2% of sulfuric acid and 10 min of reaction, yielding 236 g/Kg dry matter and concentration of 26.9g/L of fermentable sugars, and (b) in second stage the optimal experimental conditions for the depolymerization of the biomass resulting from the first stage were 175° C, 2% of sulfuric acid and 30 min of reaction, yielding 90 g/kg dry matter and concentration of 15 g/L of fermentable sugars. Total fermentable sugars yield from the sequential batch stages was 326 g/kg dry matter (48.50% of the theoretical value).

Keywords: Agave bagasse, dilute-acid hydrolysis, optimization

Resumen

El bagazo de *Agave tequilana* Weber es un residuo lignocelulósico que se genera en el proceso de producción de tequila. Actualmente, este bagazo no tiene una aplicación industrial, sin embargo por su composición química puede ser utilizado para la producción de productos químicos con un valor agregado. El objetivo del presente trabajo consistió en determinar el efecto de la temperatura, la concentración de H₂SO₄ y del tiempo de reacción sobre la hidrólisis de bagazo de agave para la producción de azúcares fermentables. La hidrólisis se llevó a cabo en dos etapas en serie y las condiciones óptimas para cada una de ellas fueron las siguientes: para la primera etapa 151 °C, 2 % de H₂SO₄ y 10 minutos de reacción con un rendimiento de 236 g/kg de materia seca y una concentración de 26.9 g/l; para la segunda etapa 175 °C, 2 % de H₂SO₄ y 30 minutos de reacción con un rendimiento de 90 g/kg de materia seca y una concentración de 15 g/l. De manera global se obtuvo un rendimiento de 326 g/kg de materia seca equivalente a un 48.05 % del valor teórico.

Palabras clave: Bagazo de agave, hidrólisis ácida diluida, optimización.

1. Introduction

The blue agave (*Agave tequilana* Weber) is a plant highly cultivated in México and used as raw material in the production of

tequila. The bagasse is a residual fiber obtained from the process and represents 40% of the processed agave (Iñiguez *et al.*, 2001). The annual

generation of bagasse in México is about 1.05×10^8 kg. From it, only small portion is used to prepare compost and the rest throw away. It is then clear that this particular situation is very attractive to look for better usage of agave bagasse. It is known that the lignocellulosic materials are considered as the only renewable source to produce biofuels and/or chemical products, with a great potential to supply energy (Bozell *et al.*, 2000). It is worth mentioning that the bioprocess for the production of ethanol from lignocellulosic materials takes place mainly in three stages: hydrolysis of the cellulosic polymers to form monosaccharides, fermentation of sugars by yeast or bacteria to ethanol and finally, the purification of ethanol. Currently hydrolysis is carried out in either concentrated acid environment or in presence of enzymes. The latter requires pretreatment of the biomass in order to improve the enzymatic digestion. Several pretreatment processes have been investigated, for instance: Mechanical comminuting, pyrolysis, steam explosion, ammonia fiber explosion, CO₂ explosion, ozonolysis, hydrolysis acid and alkaline, organosolv process and biological (Sun and Cheng, 2002). However, among all the pretreatment methods proposed, dilute-acid pretreatment has been widely studied because it is effective and inexpensive (Wyman, 1994).

The variables commonly studied in acid hydrolysis are the type and concentration of acid, reaction temperature, solid/liquid ratio and reaction time. The aim of such studies is frequently the determination of the total amount of fermentable sugars, or the concentration of monosaccharides such as xylose, glucose and arabinose. It was reported that for Bermuda grass and rye straw, dilute-acid hydrolysis is effective for the depolymerization of hemicelluloses, to obtain a yield between 50 to 60% of

xylose. The experimental conditions were 1.2% of sulfuric acid, 121°C and 60 min of reaction. Using similar experimental conditions, it was reported that hydrolysis of cellulose to glucose was 27-33% (Sun and Cheng, 2005). For raw *Paja Brava*, typical grass from Bolivia, the maximum yield to xylose was obtained using 0.5-1% sulfuric acid and 190 °C, whereas for the hydrolysis of cellulose a higher temperature of 235°C was needed (Sanchez *et al.*, 2004). The barley straw, residue of brewery process was hydrolyzed by sulfuric acid to obtain 70.83 % of conversion to fermentable sugars for 110 °C, 1% of acid concentration and 210 minutes of reaction (Aguilar-Rivera and Canizalez-Leal, 2004). Acid hydrolysis was also applied to agricultural stubble of rice, wheat, sorghum and sugarcane bagasse using different acids, for instance, phosphoric acid (Gámez *et al.*, 2004), sulfuric acid (Aguilar *et al.*, 2002; Roberto *et al.*, 2003), nitric acid (Rodriguez-Chong *et al.*, 2004), and hydrochloric acid (Herrera *et al.*, 2004; Herrera *et al.*, 2003). The concentration of acid ranges was from 1 to 6%, the temperature from 100 to 200 °C, and reaction time up to 300 min. All of these reports agree that the depolymerization of hemicellulose requires lower severity for hydrolysis than that for cellulose. If high temperatures and long reaction times are applied, the monosaccharides resulted from hemicellulose degrade to form furan compounds and carboxylic acids, in agreement with our experimental observations, where furfural and hydroxymethylfurfural were qualitatively detected. For this reason, it is recommended that the hydrolysis process to be performed in two stages.

In that respect, no reports have been found in the open literature about the dilute-acid hydrolysis of agave bagasse to

fermentable sugars. The aim of the present research project was to study the transformation of agave bagasse by dilute-acid hydrolysis, in order to evaluate the potential of the available biomass to produce fermentable sugars.

2. Materials and methods

2.1. Materials

Bagasse from *Agave tequilana* Weber, was collected from different tequila distilleries (*El Quiote, El Viejito, el Consuelo Jalisco-México*), washed with water at room temperature until no sugars (monosaccharides) were detected in the liquid, dried, milled in a laboratory mill and sieved to particles of 0.5 mm diameter, homogenized in a single lot and stored until needed. The analysis of the main polymeric fractions was done by quantitative acid hydrolysis at standard conditions (Garrote *et al.*, 1999). The reaction was followed by quantifying the glucose, xylose and arabinose (fermentable sugars) by liquid chromatography (HPLC) equipped with a refractive index detector and provided with a Metacarb 87°C Varian column. Water was used as a mobile phase at 0.6 ml/min and the column temperature was 70° C. Furfural was analyzed by spectrophotometry at 280 nm (Vázquez *et al.*, 2007; Téllez-Luis *et al.*, 2002).

2.2. Acid hydrolysis

The experiments were performed using a Multiple Reactor System (Parr Instruments, Model 5000 Multiple Reactor System) provided with 6 reactors of 75 ml each. Each reactor has temperature and agitation control. For each of the operating conditions evaluated all the reactors were loaded simultaneously with 5 g of agave bagasse, 1 or 2% of dilute-sulfuric acid and various temperatures were applied, in the

range of 100 to 200° C. A solid- liquid ratio 1/10 was used for all experiments. Every 10 minutes one of the reactors was stopped and cooled to room temperature to separate by filtration the liquid and solid phase. The solid phase was used to quantify the global yield (g of residual biomass/g of biomass treated) of hydrolysis and the liquid phase for the quantification of sugars and analysis of furfural by HPLC. The solid remain from 1st stage of acid hydrolysis was exposed to a second hydrolysis, using similar experimental conditions as first stage.

2.3. Design of experiments

The experiments were performed using a factorial design of experiments with multiple levels. The order of runs was random with 3 replicas each. The total concentration of fermentable sugars was fitted to Eq. (1), that is second order empirical model, which was then utilized to predict the optimal experimental conditions:

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^3 \beta_i X_i + \sum_{i=1}^3 \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i=1}^2 \sum_{j=2}^3 \beta_{ij} X_i X_j + e_i \quad (1)$$

Where Y is the response variable, X_i and X_j are the independent variables, temperature, reaction time and concentration of catalyst, β_0 is the intersection parameter β_i are the lineal coefficients, β_{ii} are the square coefficients, β_{ij} are the interaction coefficients ($i \neq j$) and e_i is the random error.

3. Results and discussion

3.1. Composition of agave bagasse

Composition of the agave bagasse was measured by quantitative acid hydrolysis (Garrote *et al.*, 1999), with the follow

results: cellulose (42 ± 2), hemicelluloses (20 ± 1) and lignin (15 ± 1) %w dry basis (table 1).

Table 1 Composition of agave bagasse.

Compound	wt %, dry basis
Cellulose	42 ± 2
Hemicelluloses	20 ± 1
Insoluble lignin	15 ± 1

These results are comparable to other biomass source used to the same objective, for instance, Canettieri *et al.*, (2007), reported for eucalyptus grandis residue, 40%, 16% and 23 % for cellulose, hemicelluloses and insoluble lignin, respectively. In a different study, Rocha (2000), reported for sugarcane bagasse 47%, 27% and 20.5% for cellulose, hemicelluloses and insoluble lignin, respectively. The high cellulose and hemicelluloses content measured for agave bagasse indicates a high potential for production of a great variety of products, as ethanol, which may be then used as a fuel or raw material for synthesis of different chemicals, (Werpy and Petersen, 2004).

Hydrolysis in the first stage

Acid hydrolysis of agave bagasse was carried out using a multilevel factorial experiment design. The independent variables were temperature, residence time and catalyst concentration and fermentable sugars (glucose, xylose and arabinose) as variable dependent (table 2). As example, in the figs. (1) - (2) show the concentration profiles of fermentable sugars as function of reaction time using 1% and 2 % of sulfuric acid as catalyst at various reaction temperatures. As expected, a low temperature fermentable sugars concentration is small with a maximum production of sugars about 2.5 g/L for 1% catalyst concentration and of 10 g/L for

2% catalyst concentrate of liquor; the hydrolysis rate becomes significant at greater temperatures with maximum sugar production of 25 g/L for 2% catalyst concentrate. In Fig. 3 are reported monosaccharides composition profiles for 1% concentration of catalyst and 200 °C. It was observed that the glucose and xylose concentration reached a maximum value and then decreased with the reaction time. This suggests that decomposition reactions exist, conducting probably to furfural. Them also show that there is a synergistic effect between temperature and the concentration of catalyst for both reactions: for the desired reaction that is the hydrolysis of cellulosic materials and for the undesirable reaction that is the decomposition of sugars. The optimal conditions for the hydrolysis of cellulosic materials were temperature 150°C, 10 min of residence time and 2% of H₂SO₄ as catalyst. Fermentable sugars yield was 200 g/ Kg of agave bagasse treated. The solid phase composition was quantified by quantitative acid hydrolysis. Results show solid remained were constituted in dry weight by cellulose (60%), insoluble lignin (25%), no hemicelluloses was found.

Hydrolysis in the second stage

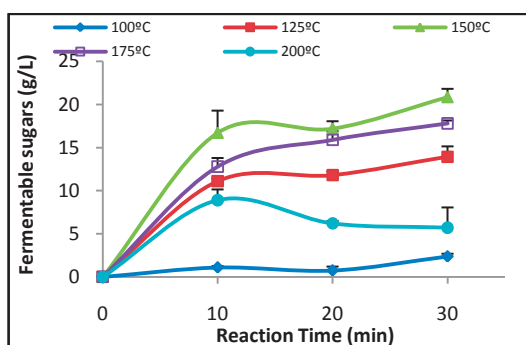
Solid remained from 1st stage of acid hydrolysis was exposed to 2nd stage of hydrolysis. Fig. 4 exhibits the results of the second hydrolysis stage, using again 2% de H₂SO₄ as catalyst. These results indicate that lower hydrolysis rates are observed, for hydrolysis of cellulose, which is more difficult to depolymerize than hemicellulose. However, the concentration profiles are similar to those observed during the first stage. The hydrolysis rate is greater as the temperature increases and a maximum sugars concentration of 14 g/L at 175 °C was observed, instead of that at 150 °C noticed in the first stage.

Table 2. Experimental variables involved in the study of agave bagasse saccharification.
Acid hydrolysis: 1st step.

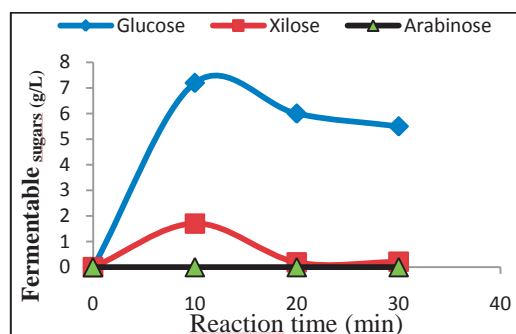
Variable	Levels	unit
Independent variables		
Temperature	5 (100, 125, 150, 175 y 200)	°C
Time	4 (10, 20, 30 y 40)	min
Catalyst	2 (1 y 2)	%
Dependent variables		
Fermentable sugars (Glucose, Xylose and Arabinose)		g/L

Acid hydrolysis: 2nd step.

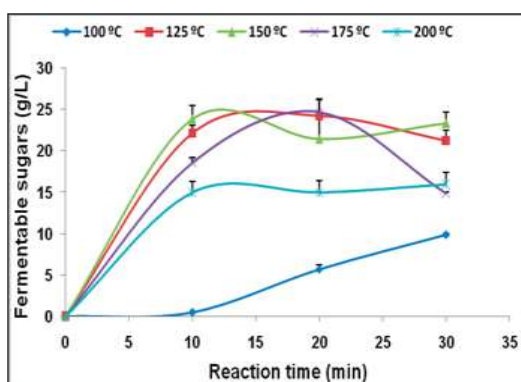
Variable	Levels	Units
Independent variables		
Temperature	3 (150, 175 y 200)	°C
Time	4 (10, 20, 30 y 40)	min
Catalyst	2 (1 y 2)	%
Dependent variables		
Fermentable sugars (Glucose)		g/L



Cap. 1 Fig. 1 Production of sugars in the first stage. 1% of H₂SO₄ as catalyst

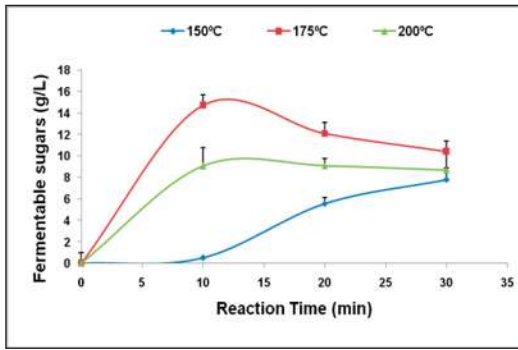


Cap. 1 Fig. 3 Monosaccharides composition profiles for 1% of H₂SO₄ as catalyst and 200 ° C

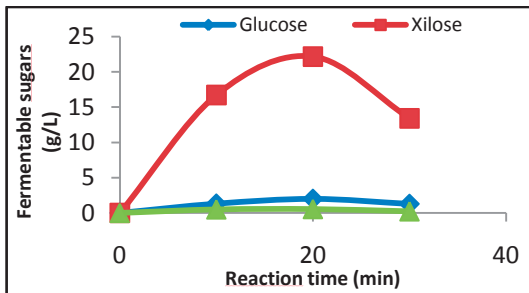


Cap. 1 Fig. 2 Production of sugars in the first stage. 2% of H₂SO₄ as catalyst.

Similarly, degradation of sugars is favored at higher temperatures and longer reaction times as it show in the Fig. 5 for 2 % of catalyst and 175 °C. Optimal conditions were 175°C of temperature, 10 min and 2% of catalyst. Fermentable sugars yield was 84 g/Kg of agave bagasse.



Cap. 1 Fig. 4 Production of sugars in the second stage. 2% of H₂SO₄ as catalyst.



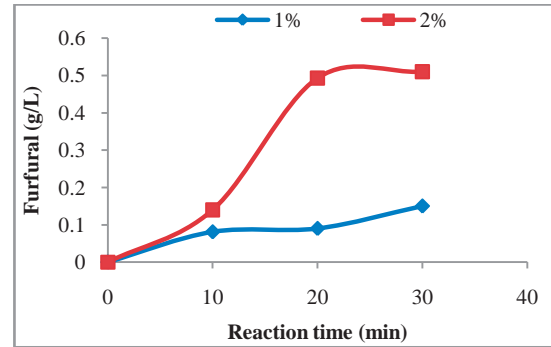
Cap. 1 Fig. 5 Monosaccharides composition profiles for 2% of H₂SO₄ as catalyst and 175 ° C

The Fig. 6 shows the furfural production profiles at optimal conditions for each step of hydrolysis: for high temperature and catalyst concentration the degradation of sugars is bigger.

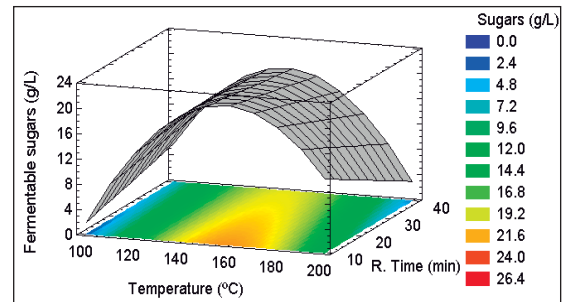
3.2. Sugar formation

Hydrolysate analysis show up that release of glucose and xylose were dependent on experimental operating conditions. The monosaccharides concentration (g/L) in first stage in optimal condition were of glucose (1.0), xylose (24.6) and arabinose (0.4) when reaction was carried out at 150°C, reaction time 10 min and 2% of catalyst. Fermentable sugars yield was 200 g/Kg. Glucose concentration of 14 g/L was obtained with 2nd stage of acid hydrolysis when reaction time was 30 min, 175 °C, and 2 wt % sulfuric acid. Fermentable sugars yield was 84 g/Kg raw material. Total amount of fermentable sugars was 284 g/Kg of agave

bagasse treated. Total yield was 40.98% over theoretical value.



Cap. 1 Fig. 6 Production of furfural at optimal conditions.



Cap. 1 Fig. 7 Response surface for the first stage of hydrolysis 2% H₂SO₄ as catalyst.

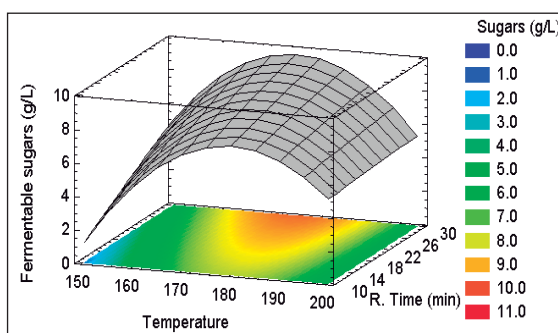
3.3. Optimization

Mathematical models was developed to optimize the dilute-acid hydrolysis process of agave bagasse with sulfuric acid, an empirical model, equation 1, was used. The coefficient of this equation and the analysis of variance (ANOVA) were obtained using the software Statgraphics Centurion XV. The model found for Y was evaluated for the test-F with a significance level of 0.05. The analysis of variance demonstrates that the three studied variables have an individual and a synergetic effect on the hydrolysis. Eqs. (2)-(3) represent the empirical models found for the experimental conditions used in our study:

$$Y_1 = -140.003 + 1.922X_1 + 0.560X_2 + 5.128X_3 - 0.006X_1^2 - 0.0042X_2^2 \quad (2)$$

$$Y_2 = -215.686 + 2.421X_1 + 0.835X_2 - 97.916X_3 - 0.007X_1^2 - 0.0036X_1X_2 + 0.092X_1X_3 - 0.0006X_2^2 + 0.0517X_2X_3 \quad (3)$$

Where Y_1 and Y_2 are the total concentrations of sugars in the first and second stage, respectively; X_1 is the reaction temperature, X_2 is the reaction time and X_3 is the concentration of H_2SO_4 . Figs. (7) - (8) show the response surface for two hydrolysis stages.



Cap. 1 Fig. 8 Response surface for the second stage of hydrolysis 2% H_2SO_4 as catalyst.

Fig. 5 indicates that the maximum concentration of fermentable sugars for the first stage was 26.8 g/L and 236 g/Kg dry matter, at 10 min, a reaction temperature of 151° C using 2wt % of sulfuric acid. In the other hand, Fig. 6 show a maximum of 15.0 g/L of fermentable sugars at 30 min, 180 °C and 2 % of H_2SO_4 for the second stage and 90 g/Kg dry matter, was obtained. Total of fermentable sugars were 326 g/Kg and 48.5% respect of theoretical value. Maximum in the production of fermentable sugars was as expected since it is known that at high temperatures and long reaction times, the degradation of sugars to by-products, takes place.

Conclusions

The results from acid hydrolysis were obtained in two stages. The yield to fermentable sugars can be increased as high as 48.5% of theoretical value, obtaining a total concentration of 22.02 g/L

and rendering 326 g/Kg of agave bagasse treated. In addition to hydrolysis, the decomposition of sugars, mainly glucose and xylose, was also observed and is related to the reaction temperature, acid concentration and reaction time. The optimization results indicate agave bagasse is a promising raw material for production of fermentable sugars.

References

- Aguilar, R., Ramírez, J.A., Garrote, G. and Vazquez, M. (2002). Kinetic study of acid hydrolysis of sugar cane bagasse. *Journal of Food Engineering* 55, 309-318.
- Aguilar-Rivera, N. y Canizalez-Leal, M.J. (2004). Cinética de la hidrolisis acida de la cascarilla de cebada. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, Vol. 3, 257-263.
- Bozell, J.J., Moens, L., Elliott, D.C., Wang, Y., Neuenschwander, G.G., Fitzpatrick, S.W., Bilski, R.J. and Jarnefeld, J.L. (2000). Production of levulinic acid and use as a platform chemical for derived products. *Resources Conservation and Recycling* 28, 227-239.
- Canettieri, E.V., de Moraes Rocha, G.J., de Carvalho Jr., J.A. and de Almeida and Silva, J.A. (2007). Optimization of acid hydrolysis from the hemicellulosic fraction of Eucalyptus grandis residue using response surface methodology. *Bioresource Technology* 98, 422-428.
- Gámez, S., Ramírez, J.A., Garrote, G. and Vazquez, M. (2004). Manufacture of fermentable sugars solutions from sugar cane bagasse with phosphoric acid at atmospheric pressure. *Journal of*

- Agricultural and Food Chemistry* 52, 4172-4177.
- Garrote, G., Dominguez, G., and Parajo, J.C. (1999). Mild autohydrolysis: an environmentally friendly technology for xylooligosaccharide production from wood. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 74, 1101-1109.
- Herrera, A., Tellez-Luis, S.J., Gonzalez-Cabriales, J.J., Ramirez, J.A. and Vazquez, M. (2004). Effect of the hydrochloric acid concentration on the hydrolysis of sorghum straw at atmospheric pressure. *Journal of Food Engineering* 63, 103-109.
- Herrera, A., Téllez-Luis, S.J., Ramírez, J.A., Vázquez, M. (2003). Production of xylose from sorghum straw using hydrochloric acid. *Journal of Cereal Science* 37, 267-274.
- Iñiguez-Covarrubias, G. Lange, S.E. and Rowell, R.M. (2001). Utilization of byproducts from the tequila industry: part 1: agave bagasse as a raw material for animal feeding and fiberboard production. *Bioresource Technology* 77, 25-32.
- Roberto, I.C., Mussato, S.I. and Rodriguez, R. (2003). Dilute-acid for optimization of xylose recovery from rice straw in a semi-pilot reactor. *Industrial Crops and Products* 17, 171-176.
- Rocha, G.J.M. (2000). Deslignificao de bagaco de cana de acucar assistida por oxigenio. Sao Carlos, SP, Brazil: Instituto de Quimica de Sao Carlos-USP, Doctor thesis, p. 136.
- Rodriguez-Chong, A., Ramírez, J.A., Garrote, G. and Vazquez, M. (2004). Hydrolysis of sugar cane bagasse using nitric acid: a kinetic assessment. *Journal of Food Engineering* 61, 143-152.
- Sanchez, G., Pilcher, L., Rosalnder, C., Modig, T. Galbe, M., and Liden, G. (2004). Dilute-acid hydrolysis for fermentation of the Bolivian straw Paja Brava. *Bioresource Technology* 93, 249-256.
- Sung, Y., and Cheng, J.J. (2005). Dilute acid pretreatment of rye straw and Bermuda grass for ethanol production. *Bioresource Technology* 96, 1599-1606.
- Sung, Y., and Cheng, J. (2002). Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresource Technology* 83, 1-11.
- Téllez-Luis, S.J., Ramírez, J.A. and Vázquez, M. (2002). Modelling of the hydrolysis of sorghum straw at atmospheric pressure, *Journal of the Science of Food and Agriculture* 82, 505-512.
- Vázquez, M., Oliva, M., Téllez-Luis, S.J. and Ramírez, J.A. (2007). Hydrolysis of sorghum straw using phosphoric acid: Evaluation of furfural production, *Bioresource Technology* 98 (2007) 3053-3060.
- Werpy, T. and Petersen, G. (2004). Top Value Added Chemicals From Biomass Volume I: Results of Screening for Potential Candidates from Sugars and Synthesis Gas. Available at: www1.eere.energy.gov/biomass/pdfs/35523.pdf. Accessed: July 14, 2009.
- Wyman, C.E. (1994). Ethanol from lignocellulosic biomass: technology, economics and opportunities. *Bioresource Technology*, 50, 3-16.



Colletotrichum lindemuthianum (Sacc. & Magn.) Scrib. is a potential cellulases producer Microorganism

MM Martínez-Pacheco, J Saucedo-Luna, A Flores-García, RE Martínez-Muñoz, J Campos-García

ABSTRACT.

C. lindemuthianum a hemibiotrophic fungus is the causal agent of anthracnose in *Phaseolus vulgaris* L. shows a complex and peculiar vegetative life cycle with unique cell differentiation and growth process, and a high degree of genetic and metabolic plasticity which contribute with its adaptation under adverse environmental conditions. Therefore, the fungus is able to propagate and to survive easily in its specific host and plant detritus, where extracellular enzymes play an important role in the biopolymers degradation. A source of carbon and other nutrients for this fungus is the large quantity of lignocelluloses available in the tequila industry waste, this motivates the thought in the production of sugars from enzymatic degradation of cellulosic waste from the agave as an interesting and inexpensive alternative to obtain products from this solid waste. *C. lindemuthianum* was subject to screening of cellulases, we founded that this fungus secretes a high level of cellulases in medium containing agave lignocellulosic waste when it was compared with other cellulose fungi producer. The enzymatic activity of these lytic enzymes showed saccharification percentage value of 34.3 at optimal pH and temperature. This fungus is an ideal model to study aspects as development, cell differentiation and production of extracellular enzymes with biotechnological application.

Key words: *Colletotrichum lindemuthianum*, hemibiotroph, anthracnose, extracellular enzymes, saccharification, agave waste.

1. Introduction

It is well known that fungi possess an amazing secretion system that allow them to produce an extraordinary essential metabolism necessary to obtain compounds from the surrounding to support

* Instituto de Investigaciones Químico Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia, Michoacán, México.

First version received: October 27, 2009; first version revised: February 02 and February 10, 2010; second version received in revised form: April 08, 2010; second version revised: April 30, 2010. Accepted: May 07, 2010.

RESUMEN.

C. lindemuthianum un hongo hemibiotrofo el agente causal de la antracnosis en *Phaseolus vulgaris* L. muestra un complejo y peculiar ciclo de vida con un singular proceso de crecimiento y diferenciación celular, así como una gran plasticidad genética y metabólica, la cual contribuye a su adaptación a diversas condiciones ambientales. Con ello, el hongo es capaz de propagarse y sobrevivir fácilmente en su hospedante o en detritus vegetal, donde las enzimas extracelulares tienen una función importante en la degradación de biopolímeros. Una fuente de carbono y otros nutrientes para este hongo es la gran cantidad de lignocelulosa disponible en el desecho de la industria del tequila, lo que motiva a pensar en la producción de azúcares a partir de la degradación enzimática de los residuos celulósicos provenientes del agave como una alternativa barata e interesante para obtener productos de desechos sólidos.

C. lindemuthianum fue sujeto a un escrutinio de celulasas; encontramos que este hongo secreta una gran cantidad de celulasas en medio que contiene residuo lignocelulósico de agave, cuando fue comparado con otros hongos productores de celulasas. La actividad enzimática de estas enzimas líticas mostró porcentajes de sacarificación de 34.3 a temperatura y pH óptimos. Este hongo es un modelo ideal para estudiar aspectos como el desarrollo, diferenciación celular y la producción de enzimas extracelulares con aplicación biotecnológica.

Palabras clave: *Colletotrichum lindemuthianum*, hemibiotrofo, antracnosa, enzimas extracelulares, sacarificación, residuo de agave.

defense, growth and development process. A very wide range of waste polymers must be degrading to monomers outside of fungal cell by hydrolytic extracellular enzymes, then, the simpler and smaller molecules will be taken up by the fungi and used as nutrients involved in the energy generation, building blocks in the cell structure and other physiological functions. Extracellular enzymes are normally produced and secreted by the fungi, they are constitutive enzymes and always are present in span life cycle, and others are produced in response to presence of particular substrates, known as inducible enzymes. The fungal extracellular enzymes are stables to environmental conditions (e.g. large array of substrates and

physicochemical conditions), such as, growth medium, pH, heavy metal, salinity, temperature and final product tolerance. These characteristics of fungal extracellular enzymes encourage researching the best enzyme producer fungal strain, the cost-effective enzymatic hydrolysis process and enzymes tolerant to the extreme environmental conditions. Currently industrial use of extracellular enzymes from microorganisms is an integral part of a wide variety of commercial processes and applications. The early scientific investigations on fungi were concerned with their devastating and destructive effects on plant crops more than with ancestral beneficial effects in manufacture of beer, bread, wine, chess and other foods. However, a small number of fungal species are pathogens or harmful and some of them could to have a beneficial effect. Also, it is possible to unite in a specific topic the classical approach to the study of fungi and the current view of biotechnology concerning the use of fungi. An example is the deuteromycete *C. lindemuthianum* the causal agent of common bean anthracnose disease, in which, both the secretion system as extra cellular enzymes are an important key in its life cycle. This fungus have two feeding behavior to obtain carbon and nitrogen by using the lytic enzymes to break the plant cell wall polymers, in the hemibiotrophic behavior it is feeding of plant living cell, whereas in saprophytic behavior it is feeding of plant detritus. To know the molecular factors that support the cell plasticity to adapt in the environment and to be able to survive and to propagate the fungal specie, will be very useful to form a general sketch of the potential biotechnological use of *C. lindemuthianum* as extracellular enzymes producer such as cellulases. *C. lindemuthianum* cells were used in the hydrolysis of polysaccharides obtained from the cellulosic waste of the agave (*Agave tequilana* Weber). This knowledge will define a better way of handling the causal agent of bean common anthracnose disease. We focusing this topic with a general review of *C. lindemuthianum* biology and then we show the enzymatic work of its cellulases on lignocellulosic waste produced from agave head which is used for Tequila manufacture, an emblematic Mexican and international alcoholic beverage and to Mexico is the first domination of origin, awarded in 1974.

2. *P. vulgaris* anthracnose.

The anthracnose is a common and widespread bean (*P. vulgaris*) disease; it is caused by the fungus *C. lindemuthianum*. The disease was first registered on bean (*P. vulgaris*) in France in 1843 year. The causal agent was designated with several names such as, *Gleosporium lindemuthianum* (1878), *Septoria leguminum* (1882), *Septoria leguminum* var *phaseolorum*, *C. lindemuthianum* (1889), *C. lagenarium* (1893), *Gleosporium lindemuthianum* (1894) and

Glomerella lindemuthiana (1993). In 1875, in Germany in other bean species were detected the symptoms of the disease; the pathogenic fungus was denominated *S. leguminum* pro *Lindemuth*. Recently, the causal agent of the common bean anthracnose disease has been clearly identified as a fungus that presents imperfect and perfect forms, which have been denominated *Colletotrichum lindemuthianum* and *Glomerella cyngulata* f. *sp phaseoli*, respectively (Rodriguez and Yoder 1987). When the fungus is established in a susceptible plant, the first noticeable symptoms are easily detected. They are yellowish spots that later will develop into ulcerous necrotic wounds affecting all plant structures (leaves, stems, flowers and fruits). Later, a generalized infection is seen in the plant; the mycelia growth and the fungus fruiting structures may be detected over the surface of the plant which soon will cause its death. In the infested bean crop areas, the fungus prevails annually and in the bean detritus for more than twelve years. The remarkable resistance of *C. lindemuthianum* and its capacity for survivability in any environmental condition renders its presence capable of losses in bean crops. In fact, the damage caused by this fungus in bean crops is so great that it had produced an economical loss in productive and consumer countries of the American continent (Dillard *et al.* 1993). Furthermore, *C. lindemuthianum* is a fungus that has a reduced number of plant hosts, mainly *P. vulgaris*. In less extent and severity, this fungus can also colonize *P. acutifolius* var *lactifolius*, *P. coccineus*, *P. aureus*, *P. lunatus*, *P. limensis*, *Medicago sativa* and *Vicia faba* (Delphine *et al.* 1988). Also, in bean resistant plants *C. lindemuthianum* cause «the hypersensitive response» - groups of red-brownish wounds of different sizes that are produced by the plant to delimit the spread of the pathogenic fungus and to kill it (Elliston *et al.* 1976).

3. Taxonomy

C. lindemuthianum is considered as hemibiotrophic fungus, its taxonomical classification was a difficult, confused task. This fungus had been named with different synonymous throughout the years. Then, it could be hardly identified through classical taxonomy, because it produces acervuli with or without fruiting body depending of the quality and amount of substrate (Sicard *et al.* 1997). Now, the fungal names are given according to principles and rules of the International Code of Botanical Nomenclature, although, there is still some controversy in the designated names to some fungus. Some authors have even proposed particular, systematic, fungal classification which is still in discussion because certain fungal species are difficult to be classified than others. The *C. lindemuthianum* classification was made following the Alexopoulos and Mim (1979) proposal.

In this case, most authors agreed that *C. lindemuthianum* belongs to: Family, Melanconiaceae; Order, Melanconiales; Sub Class, Coelomycetidae; Class, Deuteromycetes; Sub Division, Deuteromycotina; Division Amastigomycota; Kindom Myceteae; Super Kindom, Eucariota. They are considered taxonomic units below the species such as the *form specialis* (*f. sp*) - a group of individuals in the same species that have the ability to infect several plant species; while the **physiological race** is pathogenic only for certain varieties of plant species.

4. Vegetative cycle

C. lindemuthianum deploys a complex life cycle which has various development phases and two ways to take food. In every phase may be seen as unique, differentiated stages that let the fungus survive. Independently of the fungus development phase, the spore germination occurs in a similar manner (Figure 1). In the imperfect form of *C. lindemuthianum* the reproduction is asexual, the spores are produced inside acervulus and immerse in water soluble pre-formed mucilage (O'Connell 1996). The development of fungal spore shows a biphasic behavior which means two life styles, as a saprophyte and biotroph; therefore, the fungus has been classified as hemibiotroph. In life style saprophytic the fungus growth in any carbon source including crystalline cellulose which can be easily converted into molecules fuel by extracellular lytic enzymes. On the other hand, as a biotroph fungus has the ability to feeding of nutriments outright of living plant.

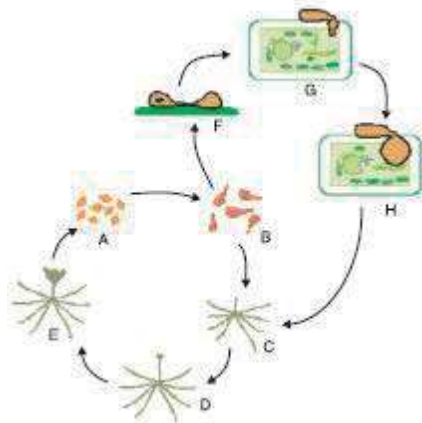


Figure 1. *C. lindemuthianum* biological cycle. A. Spores, B. Germination, C. Vegetative Growth, D. Aerial structures, E. Sporogenesis, G. Penetration, H. Primary hyphae Formation.

As a saprophyte fungus, the spore germination process begins with the adhesion of spore to the plant surface under adequate humidity conditions; specifically, correct aqueous content in the spore envelope (mucilage). At this level, the oval spores of the fungus round off by water absorption and active growth. Later, the germinating tube is formed (germinule phase), and the hyphae elongates to colonize the substrate. The aerial mycelia appear; then the fungal reproductive structures are formed where the spores are storage. Finally, their life cycle is completed and it starts all over again.

During the spore adhesion, the hydrophobicity of vegetal surface, the physical-chemistry bidirectional signalization and the mucilage play a major role (Young and Kaus 1984; Sela-Buurlage *et al.* 1991; Mercure *et al.* 1994). The mucilage is formed by heavy molecular weight glycoproteins, a variety of enzymes and germination inhibitors; but it does not contain chitin (O'Connell *et al.* 1996; Hughes *et al.* 1999). Besides, it acts as a structure that protects the spore from dehydration and even as a protective barrier against environmental toxic and defense plant metabolites. The 6 μm length fimbriae structures which are part of the germinule and the appressorium also participate in the adhesion process (O'Connell 1996). The *C. lindemuthianum* hyphae grow constantly reaching a size of 2 or 3 times bigger than their original size spore. It is believed that critical nutrient conditions and chemical bidirectional communication induce the formation of the dome in the hyphae tip or appressorium. At same time, it initiates the melanin synthesis and the formation of the septum that separates cytoplasm from appressorium and germinule. Also, the plasmatic membrane presents a biochemical differentiation process which separates into two domains, one in the domo or appressorium and the other in the infection peg (Pain *et al.* 1996). The appressorium produces and accumulates melanin an important factor involved in the turgency pressure which is required for the *C. lindemuthianum* to penetrate into the plant cell (Kubo and Furusawa 1991). A new distribution and localization of plasmatic membrane proteins occur in the base of appressorial dome. It is necessary for the formation of a penetration pore, the synthesis of new cell walls layers, and the secretion of some other materials (O'Connell 1996). The melanin is storage in a cell wall layer which lies very close to the plasmatic membrane (Bailey *et al.* 1992). The penetration pore is rounded by an internal wall layer with funnel shape called, «appressorial cone». This structure is contiguous with the peg penetration wall and does not have chitin or melanin. The apical growth starts

again with the infection peg emission and the injection of the plasmatic membrane and the cytosol through the penetration pore then grows down to the intramural space between plasmatic membrane and cell wall. This will become the infection hyphae which is present in the biotrophic phase (Pain *et al.* 1996). Knowledge about the biotrophical phase between *C. lindemuthianum* and bean cells interaction recently has started. However, it is known that during this phase, the primary hyphae growing between the vegetal plasmatic membrane and the cell wall. This fungus does not form specialized structures such as haustorium, like the ones seen in some strict biotrophs (O'Connell *et al.* 1987; Green *et al.* 1995). One characteristic of biotrophic intracellular interaction between plant cell and fungus, is that, pathogen avoids or suppresses the initiation event of the plant defense responses, those that switch the «hypersensitivity reaction» or the synthesis and deposition of callose on cell wall (Heath and Skalamera 1997).

5. Genotypic and phenotypic plasticity

C. lindemuthianum shows plasticity against various environmental stimuli such as substratum in quality and quantity, thermal and aqueous stress resistance, and the invasion capacity of the specific host in relation with the live nutritional source. The variability of the *C. lindemuthianum* colonies are the result of the fungus adaptation growth to the nutrient support. It can be explained as the fungal, morphological colonies changes by the environmental pressure (Van Kan *et al.* 1990). The biological manifestation that the fungus shows is the great capacity to survive in different environmental conditions such as extreme temperatures between 4 – 50 °C, dramatic variations of soil pH and the alterations in substrate quality (Dillard *et al.* 1993). Eventually, the fungus is induced into a co-evolution process due to the emergence of resistant bean varieties which allow the easy establishment of the infection. As a result, there is a formation of stable variants of the same fungal specie that can be detected comparing virulent strains of the same

specie against different type of host. The race pathogenic variability in the same species of *C. lindemuthianum* is another form of plasticity shown by this organism. Considering the genetically heterogenic population in spite of the morphological uniformity, the phytopathogenic species express differences in their pathogenic potential (virulence) to different varieties of the same species. Many races and clones have been described for *C. lindemuthianum* (Table 1). Barrus in 1911 made the first report of α γ β races Burkholder in 1923 described γ race; in 1942 Andrus and Wade reported race δ ; In a French thesis of Blondet, he gave evidences of λ race, cited by Charrier and Bennerot in 1970; Hubbeling in 1974 reported λ race; Schnock in 1974 indicated K race presence; and Tu *et al.* in 1984 reported ϵ race in Canada. Recently, three biodiversity centers have been reported to have the biggest quantity of *C. lindemuthianum* races: The first is located in Mexico and the southern part of the United States, the second in Colombia, Peru and Brazil, and the third in the Central America countries (Balardin *et al.* 1997; Sicard *et al.* 1997). Numerous studies have been made to identify new races of *C. lindemuthianum* in countries where bean (*Phaseolus* spp) is cultivated; therefore, different groups of bean varieties denominated, «differential set of common bean varieties» were used in those researches. The new races have been classified using different nomenclatures such as, assignation Greek letter or with binary number that making it difficult to compare the races from one to another (Drijfhout and Davis 1989; Pastor Corrales *et al.* 1995). In Mexico for example, Yerkes and Telis in 1952 used the next differential set of common bean varieties; Amarillo 155, Bayo 164, Canario 1001, MDR K, Michelite, Negro 150, Negro 152 and Parry Marrow, three of them are American varieties and other three are Mexican varieties. Then, they could identify the MA1 to MA10 races and formed three groups. The group I is formed by the MA1 to MA6 races; the group II is formed by the MA7 and MA17 races; the group III is formed by the A8 to MA10 races. Later, the group IV was classified and

Table 1. *C. lindemuthianum* cloned genes

Genes	Protein	Function	References
<i>Clpg1</i>	Endopolygalacturonase	Necrotrophic development	Centis <i>et al.</i> 1996
<i>Clpg2</i>	Endopolygalacturonase	Necrotrophic development	Centis <i>et al.</i> 1997
<i>Clk1</i>	Ser-Tre protein kinase	Signalization	Dufresne <i>et al.</i> 1998
<i>CIH1</i>	Biotrophy-related protein	Biotrophy	Perfect <i>et al.</i> 1998
<i>gpd</i>	Glyceraldehide-3P- dehydrogenase	Houskeeping genes	Templeton <i>et al.</i> 1992
<i>Clpt1</i>	<i>C. lindemuthianum</i> protein transport 1	Rab/GTPase protein transport	Dumas <i>et al.</i> 2001

Table 2. Set of *P. vulgaris* differential varieties to differentiate races of *C. lindemuthianum* and its assignation with Greek letter proposal by Drijfhout and Davis (1989). (*) = Michigan Dark Red Kidney. (-) = cultivar resistant; (+) = cultivar sensible.

Cultivar	Fungal races							
	alpha	beta	delta	epsilon	gamma	iota	kappa	lambda
Coco a la Crème	-	+	-	-	+	+	-	+
Cornell 49242	-	-	-	-	-	+	+	-
Evolutive	-	-	-	-	-	+	-	-
Kaboon	-	-	-	-	+	+	-	+
MDRK*	-	+	+	-	+	+	+	+
Mexique 222	-	-	-	-	-	-	-	-
PI 165422	+	+	-	-	-	-	-	+
PI 207262	-	+	-	-	-	-	-	-

it is formed by MA19 and MA20 races. Lastly, the alpha group is formed by the MA11 to MA15, and MA21 and MA22 races. Consequently, the correct comparison could be possible between all the races reported by participating countries following the proposals of *Tables 2 or 3*. Therefore it is necessary to have a single agreement on the criteria for naming the different races of *C. lindemuthianum*.

6. Genome

The *C. lindemuthianum* genome of various isolates was analyzed using flow cytometry to measure the genome size. It revealed that the strains presented a meaningful variation in the genome size, up to 40 %. Later, the Southern analysis of fungal, cloned telomeres revealed that the chromosome number varies from nine to twelve. While the chromosomes separation using electrophoresis in gel of pulse camp (PFGE) showed that there are two different sizes: the polymorphic and small chromosomes of 2.5 Mbp, and the big chromosomes of 7 Mbp that were not resolved by the electrophoretic method. Furthermore, two repeated grouped elements were found in different polymorphic chromosomes, they have a single copy of a flanking region sequence which was used as a probe of small chromosomes. However, this probe could not be detected in some stocks (O'Sullivan *et al.* 1998). Evidences indicate that part of the variations observed in *C. lindemuthianum* genome organization is due to genome and/or chromosomal essential regions which are necessary for the fungus vegetative cycle (O'Sullivan *et al.* 1998). Moreover, it can be speculated that the biological variations detected in the pathogenic virulence of the fungus against different bean varieties is just due to the differences in their genome size. Besides, *C. lindemuthianum* is an organism that only a reduced number of genes have been cloned, but none of them is related to its pathogenicity or virulence (Table 2).

Table 3. Set of *P. vulgaris* differential varieties and assignation number to the binary assignation to races of *C. lindemuthianum*. Binary system: $2n$, n is equivalent to number place of the cultivar in the set. The sum of each bean varieties values with susceptible reaction give a binary number of a specific race. Example, the race 17 of *C. lindemuthianum*, is virulent to Michelite (1) + Widusa (16) varieties. (*) = Michigan Dark Red Kidney. Pastor Corrales *et al.* 1995.

Varieties	Assignment number	Bean resistance gene
Michelite	1	
MDRK*	2	<i>Co-1</i>
Perry Marrow	4	<i>Co-1</i> ³
Cornell 49242	8	<i>Co-2</i>
Widusa	16	<i>Co-1</i> ⁵ , <i>Co-9</i> ³
Kaboon	32	<i>Co-1</i> ²
México 222	64	<i>Co-3</i>
PI 207262	128	<i>Co-4</i> ³ , <i>Co-9</i>
TO	256	<i>Co-4</i>
TU	512	<i>Co-5</i>
AB 136	1024	<i>Co-6</i> , <i>Co-8</i>
G2333	2048	<i>Co-4</i> ² , <i>Co-5</i> , <i>Co-7</i>

Whereas the host (*P. vulgaris*), several different resistance genes have been identified and named *Co-1* *Co-12*, *Co-13*, *Co-15*, *Co-2*, *Co-3*, *Co-4*, *Co-42*, *Co-43*, *Co-5*, *Co-6*, *Co-7*, *Co-8*, *Co-9*, and *Co-93*, all of them have been correlated with the plant resistance. In *C. lindemuthianum* has been reported twelve virulence genes assigned with the letters *a*, *b*, *c*, *d*, *e*, *f*, *g*, *h*, *i*, *j*, *k*, and *l* compatibles with the common bean differential varieties show in Table 3, respectively (Tamayo *et al.* 1995; Basset 1996). Every day into biodiversity centers, it is reporting new *C. lindemuthianum* pathotypes indicating a large pathogenic variability of this phytopathogen fungus, as it was recently demonstrated by Sanchez Garcia *et al.* (2009).

7. Saccharification of agave (*A. tequilana*) lignocellulosic waste by cellulases from *C. lindemuthianum*

Recently has started a study of the secretion system and the extracellular enzymes in *C. lindemuthianum*, two important factors for the survival of specie both for hemibiotrophic as saprophytic lifestyles. A few *C. lindemuthianum* extracellular enzymes that hydrolyze complex biopolymers had been reported, such as; proteases, pectin and pectate lyases (Wijesundera *et al.* 1989), polygalacturonases and chitinases (Anderson 1978; Keon 1990), and recently cellulases (Acosta Rodriguez *et al.* 2005). Other enzyme reported is the chitin deacetylases that modified the chitin, (Tsigos and Bouriotis 1995). Some of these enzymes have been proposed to hydrolysis of cellulose from agroindustry and municipal wastes and recycling paper industry. Also is true that agave lignocellulosic waste containing a large amount of Carbon that could be recycling for several chemical and biological processes, *e.g.* to produce cellulose fiber, molasses, unicellular protein, organic acid, sugar alcohol, syrup, and ethanol. The key for to obtaining this cellulose products derivates involves the enzymatic hydrolysis of plant hemicelluloses and cellulose to oligo- and mono-saccharides and other molecules. With this information in mind we screened a stock of wild isolates of *C. lindemuthianum* from infected bean plants collected

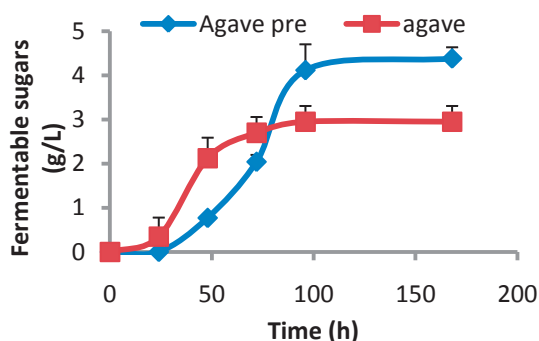


Figure 2. Production of reducing sugars from lignocellulosic agave waste. Agave lignocellulosic waste without (- -) and with (- -) sulfuric acid treatment were hydrolyzed with a total crude enzyme cocktail from *C. lindemuthianum*. The enzymatic activity was assayed in accord to Habu *et al.*, method(1997) and the reducing sugars produced were assayed by DNS method. The agave bagasse was pre-washed with water, and then was hydrolyzed with 2 % H_2SO_4 at 150 °C per 10 min. $N = 3$, size simple = 3. Tukey ($\alpha < 0.05$).

of crops field situated in the common bean producer area of the north central Mexican plain, to select the best wild strain cellulases producers, the result was a selection of three fungal isolates named AFG 1-3, all of them produce β -glycosidases, endo and exo-cellulases, assayed with the substrates; *p*-nitrophenyl glycoside, carboxymethyl cellulose and avicel, respectively (Flores Garcia *et al.* 2005).

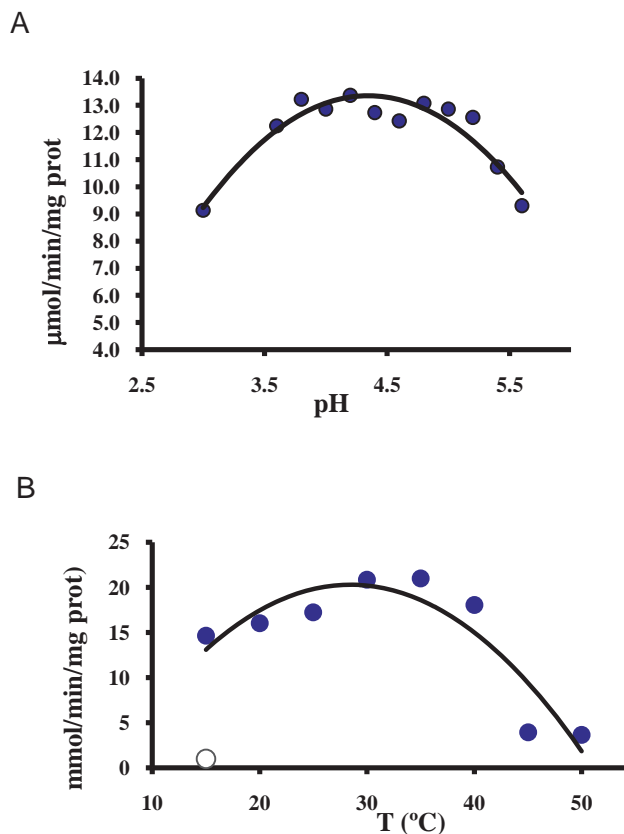


Figure 3. Effect of pH and temperature on cellulases obtained of *C. lindemuthianum*. The cellulase specific activity was measured with 1% agave cellulose waste acid treated as substrate. A) pH, B) Temperature. $N = 3$, size sample = 3. Tukey ($\alpha < 0.05$).

The solid lignocellulosic waste a major by-product of tequila industry was assayed with cellulases obtained from fungal AFG-3 isolate. The fungal cellulases hydrolyzed the agave lignocellulosic

waste to mono- and oligosaccharides, recorded by reducing sugars (Figure 2), these enzymes have a broad range of optimal pH into acid zone and they are moderately resistant at high temperature for its enzyme work (Figure 3). The best result of the hydrolysis enzymatic was obtained with agave lignocellulosic waste pre-hydrolyzed with sulfuric acid. An explication is that there are not any residual monosaccharides that inhibiting the fungal cellulases or cellulose microcrystalline form is perturbed by acid treatment. After acid treatment it is observed that cellulose fibers are too far apart and broken in short fibers, doing that the cellulose fibers are exposed to enzymatic attack (Figure 4). When cellulases from *C. lindemuthianum* were compared to cellulases from another organism, based on the hydrolysis of the lignocellulosic residue pre-hydrolyzed with H_2SO_4 , it was observed that the enzymatic activity of *C. lindemuthianum* cellulases was similar to that of commercial cellulases obtained from *Penicillium funiculatum*. Between them, there were not a large difference in the enzymatic activities values and saccharification index values were similar (Table 4). Also, it was observed that the enzymatic hydrolysis of crystalline cellulose101 (Sigma Co.) was less efficient with both the *C. lindemuthianum* cellulases as the commercial cellulases. Two explications are

possible: the cellulases are inhibited by monosaccharides and these have scarcity tolerance to end products; or a poor substrate affinity of the cellulases by the cellulose in its natural microcrystalline form was shown.

8. Conclusions

The study of *C. lindemuthianum* fungus represents a constant challenge for any scientific research. That is because this pathogenic fungus still held a lot of questions regarding to its biology. However, they may be related to the genetic, biochemical and molecular behavior of the fungus that can be considered as fungal ubiquitous process in the extracellular enzyme production during the phytopathogenesis process and cycle life. The extraordinary feeding behavioral pattern and the unique, biological development of *C. lindemuthianum* make it an interesting biological model of study. Furthermore, the economical importance of fungus when it grows as a biotroph in common bean plant (*P. vulgaris*) highly increases its relevance and the interest of the researchers toward its biology.

This organism -as a simple, unique, single cell-presents various differentiation processes and morphologies; the hyphae, the appressorium, the infection peg and the primary hyphae which have their own, independent, cell functions.

Therefore, the different basic mechanisms that govern the cell growth and differentiation can be approached in the same organism.

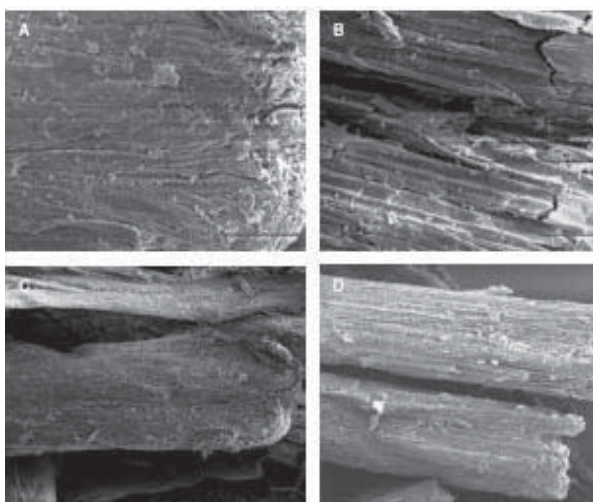


Figure 4. Transmission micrographs of cellulose fibers from agave waste. A. Fiber agave waste without (A and C) and with (B and D) acid treatment. Cellulose agave waste was treated with 2% H_2SO_4 at 150 °C by 10 min. Dry up fibers were coated with thin layer of cooper by 20 min/15 mA in Edwards S150A Sputter coater. A and B at 300 X; C and D at 100x.

Table 4. Comparison of enzymatic saccharification of lignocellulosic agave waste with two fungal cellulases source. 10 U/ml of fungal cellulases were added to 2 g of with or without acid hydrolysis lignocellulosic agave waste suspended in 100 ml of 50 mM acetate buffer pH 4.8, then incubated at 40 °C in shaking. Saccharification percentage was determined at 96 h using DNS method.

Cellulases source	Acid hydrolysis	Saccharification (%)
<i>C. lindemuthianum</i>	+	34.3
	-	23.8
<i>P. foniculatum</i> TM	+	29.73
	-	19.40

At the same time, it is very important to know the biochemical and genetic -mainly the DNA content-mechanisms that regulate the extraordinary morphological and colonial variability and how all this is related to the specific virulence effect against a certain common bean varieties. It is also of great importance the understanding of the pathology of new and virulent *C. lindemuthianum* wild isolates, and to know about the fungal adaptation to new and resistant bean varieties.

At industrial level the use of large amount of agave lignocellulosic waste to obtain any by-products right now is not possible, because there are not available cellulase enzyme preparations, this is a limitation. However, *C. lindemuthianum* secretes an important level of cellulases in medium containing crystalline cellulose or agave lignocellulosic waste prehydrolyzed with sulfuric acid. From a different point of view, this fungus is an ideal model to study different aspects of its development such as growth, biochemical, molecular, cell differentiation and the production of extracellular enzyme with biotechnological application.

9. Acknowledgments

The research was support partially by grants from Consejo Estatal de Ciencia y Tecnología del Estado de Michoacan and Universidad Michoacana de San Nicolas de Hidalgo. AFG and JSL were postgraduate fellowship of CONACYT Mexico.

10. References

- Acosta Rodriguez, I., M.G. Pinon Escobed, M.G. Zavala Paramo, E. López Romero, & H. Cano Camacho.

- Degradation of cellulose by the bean-pathogenic fungus *Colletotrichum lindemuthianum*. Production of extracellular cellulolytic enzymes by cellulose induction. Antonie van Leeuwenhoek, 2005; 87: 301-310.
- Alexopoulos, C.J. & C.W. Mims. 1979. Introductory Mycology. Third Edition. Ed. Wiley.
- Alzate Marin, A.L., G. Soares Baia, T.J. de Paula Junior, G.A. de Carvalho, E. Gonzalves de Barros & M. Alves Moreira. Inheritance of anthracnose resistance in common bean differential cultivars AB 136. Plant Disease, 1995; 81: 996-998.
- Anderson, A.J. Extracellular enzymes produced by *Colletotrichum lindemuthianum* and *Helmintosporium maydis* during growth on isolated bean and corn walls. Phytopathology, 1978; 68: 1585-1589.
- Anderson, D.W. & R.L. Nicholson. Characterization of a laccase in the conidial mucilage of *Colletotrichum graminicola*. Mycologia, 1996; 88: 996-1002.
- Bailey, J.A., R.J. O'Connell, R.J. Pring & C. Nash. 1992. Infection strategies of *Colletotrichum* species. pp. 88-120. In: J.A. Bailey & M.J. Jeger (Eds). *Colletotrichum: Biology, Pathology and control* CAB International, Wallingford.
- Balardin, R.S., A.M. Jarosz & J.D. Kelly. . Virulence and molecular diversity in *Colletotrichum lindemuthianum* from South Central, and North America. Phytopathology, 1997; 87: 1184-1191.
- Basset, M.J. List of genes of *Phaseolus vulgaris*. Annual Report of the Bean Improvement Cooperative, 1996; 39: 1-19.
- Bonnen, A.M. & R. Hammerschmidt. Role of cutinolytic enzymes in infection of cucumber by *Colletotrichum lagenarum*. Physiology and Molecular Plant Pathology, 1989; 35: 475-481.
- Centis, S., B. Dumas, J. Fournier, M. Marolda & M-T. Esquerré-Tugayé. Isolation and sequence analysis of CLPG1, a gene coding for an endopolygalacturonase of the phytopathogenic *Colletotrichum lindemuthianum*. Gene, 1996; 170: 125-129.
- Centis, S., I. Guillas, N. Sejalon, M-T. Esquerre-Tugaye & B. Dumas. Endopolygalacturonase genes from *Colletotrichum lindemuthianum*. Cloning of CLPG2 and comparison of its expression to that of CLPG1 during saprophytic and parasitic growth of the fungus. Molecular Plant Microbe Interactions, 1997; 10: 769-775.
- Carrier, A. & H. Bennerot. Contribution al etude des races physiologiques de l' anthracnose du haricot. Annals of Phytopathology, 1970; 2: 489-506.
- Dickman, M.B., S.S. Patil & P.E. Kolattukudy. Effect of organophosphorus pesticides on cutinase activity and infection of papaya by *Colletotrichum gloesporoides*. Physiological Biochemistry 1983; 73: 1209-1214.
- Dickman, M.B. & S.S. Patil. Cutinase deficient mutants of *Colletotrichum gloesporoides* are nonpathogenic to papaya fruit. Physiology and Molecular Plant Pathology 1986; 28: 235-243.
- Dillard, H.R. & A.C. Cobb.. Survival of *Colletotrichum lindemuthianum* in bean debris in New York State. Plant Disease 1993; 77: 1233- 1238.
- Drijfhout, E. & H.J.C. Davis. Selection of a new set of homogeneously reacting bean (*Phaseolus vulgaris*) differential to differentiate races of *Colletotrichum lindemuthianum*. Plant Pathology 1989; 38: 391-396.
- Dufresne, M., J.A. Bailey, M. Dron & T. Langin. clk1, a serin/threonine protein kinase encoding gene, is involved in pathogenicity of *C. lindemuthianum* on common bean. Molecular Plant Microbe Interactions 1998; 11: 99-108.
- Dumas, B., C. Borel, C. Hebert, J. Maury, C. Jaquet, R. Balsse & M.T. Esquerre-Tugaye. Molecular characterization of CLPT1, a SEC-4 like Rab/GTPase of

- the phytopathogenic fungus *Colletotrichum lindemuthianum* which is regulated by the carbon source. *Gene* 2001; 272: 219-225.
19. Flores Garcia, A. & M.M. Martinez Pacheco. Capacidad celulolítica de *Colletotrichum lindemuthianum* en la fase saprofítica. *Ciencia Nicolaita* 2005; 42: 60-72.
 20. Green, J.R., N.A. Pain, M.E. Cannell, G.L. Jones, C.P. Leckie, S. Mc-Cready, K. Mendgen, A.J. Mitchell, J.A. Callow and R.J. O'Connell. Analysis of differentiation and development of the specialized infection structures formed by biotrophic fungal plant pathogens using monoclonal antibodies. *Canadian Journal of Botany* 1995; 73: s408-s417.
 21. Habu, N., K. Igarashi, M. Samejima, B. Petersson & K-E. Eriksson. Enhanced production of cellobiose dehydrogenase in cultured of *Phanerochaete cryosporium* supplemented with bovine calf serum. *Biotechnology and Applied Biochemistry* 1997; 20:97-102.
 22. Heath, M.C. & D. Skalamera. Cellular interaction between plants and biotrophic fungal parasites. In: Tommerup IC, Andrews JH, ed. *Academic Press. Advances in Botany Research* 1997; 24: 196-225.
 23. Hughes, H.B., R. Carzaniga, S.L. Rawling, J.R. Green & R.J. O'Connell. Spore surface glycoproteins of *Colletotrichum lindemuthianum* are recognized by a monoclonal antibody, which inhibits adhesion to polystyrene. *Microbiology* 1999; 147: 1927-1936.
 24. Hubbeling, N. Resistance in beans to the lambda race of *Colletotrichum lindemuthianum*. Proc. 19th International Horticultural Congress 1A 1974: 293.
 25. Keon, J.P.R., G. Waksman & J.A. Bailey. A comparison of the biochemical and physiological properties of a polygalacturonase from two races of *Colletotrichum lindemuthianum*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 1990; 37: 193-206.
 26. Kubo, Y., & I. Furusawa. Melanin biosyntheses: Pre-requisite for successful invasion of the plant host by appressoria of *Colletotrichum* and *Pyricularia*. In: G.T. Cole & H.C. Hoch (Plenum, Eds). *The fungal spore and disease initiation in plants and animals*. New York. 1991: 205-218.
 27. Mercure, E.W., B. Leite & R.L. Nicholson. Adhesion of ungerminated conidia of *Colletotrichum graminicola* to artificial hydrophobic surfaces. *Physiology and Molecular Plant Pathology* 1994; 45: 421- 440.
 28. O'Connell, R.J. Absence of a specialized interface between intracellular hyphae of *Colletotrichum lindemuthianum* and cells of *Phaseolus vulgaris*. *New Phytologist* 1987; 107: 725-734.
 29. O'Connell, R.J., N.A. Pain, K.A. Hutchinson, G.L. Jones & J.R. Green. Ultrastructure and composition of the cells surfaces of infection structures formed by the fungal plant pathogen *Colletotrichum lindemuthianum*. *Journal of Microscopy* 1996; 181: 204-212.
 30. O'Sullivan, D., P. Tosi, F. Creusot, B.M. Cooke, T.H. Phan, M. Dron & T. Langin. Variation in genome organization of the plant pathogenic fungus *Colletotrichum lindemuthianum*. *Current Genetic* 1998; 33: 291-298.
 31. Pain, N.A., J.R. Green, G.L. Jones & R.J. O'Connell. Composition and organization of extracellular matrices around germ tubes and appressoria of *Colletotrichum lindemuthianum*. *Protoplasma* 1996; 190: 119-130.
 32. Pain, N.A., R.J. O'Connell & J.T. Green. A plasma membrane associated protein is a marker for differentiation and polarization of *Colletotrichum lindemuthianum* appressoria. *Protoplasma* 1995; 188: 1-11.
 33. Pastor Corrales, M.A., M.M. Otoyá, A. Molina & S.P. Singh. Resistance to *Colletotrichum lindemuthianum* isolates from Middle America and Andean South America in different common bean races. *Plant Disease* 1995; 79: 63-67.
 34. Perfect, S.E., R.J. O'Connell, E.F. Green, C. Doering-Saad & J.R. Green. Expression cloning of a fungal proline-rich glycoprotein specific to the biotrophic interface formed in the *Colletotrichum*-bean interaction. *Plant Journal* 1998; 15: 273-279.
 35. Rodriguez, R.J. & O.C. Yoder. Selectable genes for transformation of the fungal plant pathogen *Glomerella cingulata* fsp *phaseoli* (*Colletotrichum lindemuthianum*). *Gene* 1987; 54: 73-81.
 36. Sánchez García, B.M., A. Flores Oliva, A. Sánchez Arizpe, S. Pineda Rodríguez, G. López Jiménez, S. Fraire Velasquez, E.R. Garrido Ramírez, J.A. Acosta Gallegos, J. Simpson Williamson & R. Rodríguez Gerra. *Colletotrichum lindemuthianum* pathotypes in Oaxaca and San Luis Potosi, Mexico and resistance in common bean. *Agricultura Técnica de Mexico* 2009; 35: 46-57.
 37. Schnock, M.G., G.M. Hoffman & J. Kruger. A new physiological strain of *Colletotrichum lindemuthianum* infecting *Phaseolus vulgaris* L. *Horticultural Science* 1975; 10: 40.
 38. Sela-Buurlage, M.B., L. Epstein & R.J. Rodriguez. Adhesion of ungerminated *Colletotrichum musae* conidia. *Physiology and Molecular Plant Pathology*, 1991; 39: 345-352.
 39. Sicard, D., Y. Michelakis, M. Dron & C. Neema. Variability of resistance to *Colletotrichum lindemuthianum* in the three centers of diversity of common bean of its host *Phaseolus vulgaris*. *Phytopathology* 1997; 87: 807-813
 40. Tamayo, P.J., M. Otoyá & M.A. Pastor-Corrales. Diversidad de los patotipos de *Colletotrichum lindemuthianum*, el patógeno de la antracnosis, en Río Negro, Antioquia. *Fitopatología Colombiana*, 1995; 19: 1-6.
 41. Templeton, M.D., E.H.A. Rikkerink, S.L. Solon & R.N. Crowhurst. The cloning and molecular characterization of the glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase encoding gene and cDNA from the plant pathogenic fungus *Glomerella cingulata*. *Gene* 1992; 122: 225-230.
 42. Tu, J.C., J.W. Sheppard & D.M. Laidlaw. Occurrence and characterization of the epsilon race of bean anthracnose in Ontario. *Plant Disease* 1984; 68: 69-70.
 43. Tsigos, T.Y. & V. Bouriotis. Purification and characterization of chitin deacetylase from *Colletotrichum lindemuthianum*. *Journal of Biological Chemistry* 1995; 270: 26286-26291.
 44. Van Dyke, C.G. & C.W. Mims. Ultrastructure of conidia, conidium germination and appressorium development in the plant pathogenic fungus *Colletotrichum truncatum*. *Canadian Journal of Botany*, 1991; 69: 2455-2467.
 45. Wattard, C., D. Kobiler, A. Dinoor & D. Prusky. Pectate lyase of *Colletotrichum gloeosporoides* attacking avocado fruit: cDNA cloning and involvement in pathogenicity. *Physiology and Molecular Plant Pathology* 1997; 50: 197-212.
 46. Wijesundera, R.L.C., J.A. Bailey, R.J.W. Byrde & A.H. Fielding. Cell wall degrading enzymes of *Colletotrichum lindemuthianum*: their role in the development of bean anthracnose. *Physiology and Molecular Plant Pathology* 1989; 34: 403-413.
 47. Yerkes, W.D. & O.M. Telis. New races of *Colletotrichum lindemuthianum* in Mexico. *Phytopathology* 1956; 46: 564-567.
 48. Young, D.H. & H. Kauss. Adhesion of *Colletotrichum lindemuthianum* spores to *Phaseolus vulgaris* hypocotyls and polystyrene. *Applied and Environmental Microbiology* 1984; 47: 616-619.

CAPÍTULO 3

Efficient process for the conversion of lignocellulosic residue of *Agave tequilana* bagasse to ethanol

Saucedo-Luna Jaime^{a, b}, Castro-Montoya Agustin Jaime^b, Martinez-Pacheco Mauro Manuel^a, Sosa-Aguirre Carlos Ruben^a and Campos-Garcia Jesus^{a*}

^aInstituto de Investigaciones Químico Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Edif. B-3, Ciudad Universitaria, CP 58030, Morelia, Michoacán, México. ^bFacultad de Ingeniería Química, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Edif. M, Ciudad Universitaria, CP 58030, Morelia, Michoacán, México.

Short running title: Ethanol obtained from *Agave tequilana* bagasse

Abstract

The bagasse of *Agave tequilana* (BAT) is a residue that remains from the elaboration process of tequila and is considered as a lignocellulosic waste. Characterization of BAT, saccharification and fermentation to ethanol was carried out. BAT was constituted by cellulose (42%), hemicellulose (20%), lignin (15%) and other (23%). Saccharification of BAT was carried out at 147°C with 2% (w/v) sulfuric acid for 15 min, rendering 25.8 g/L of fermentable sugars, corresponding to 36.1% of hydrolysis. The remaining lignocellulosic material was further hydrolyzed by commercial enzymes under 8.2% (w/v) of BAT load incubated for 72 h at 40°C, rendering 41 g/L of fermentable sugars corresponding to 73.6%. Sugar liquors from both acid and enzymatic hydrolysis were fermented independently using the native yeast *Pichia caribbica* UM-5, with an ethanol yield of 50% and 87%, respectively. Total yield in the optimized process was 8.99 g ethanol/50 g of BAT, corresponding to an overall yield of 56.75% of theoretical ethanol. The results indicate that BAT may be employed as an economically lignocellulosic raw material for bioethanol production.

Keywords: Lignocellulose, acid hydrolysis, enzymatic hydrolysis, fermentation, ethanol, *Agave tequilana*.

Introduction

Different countries around the globe are studying and decreeing bills and laws to use ethanol in gasoline in order to reduce greenhouse gas emissions. This has contributed with demand for ethanol worldwide, increasing the number of fermentation facilities to comply with the demand. Currently, ethanol is fermented mainly from food crops, and this practice has increased food prices in different countries. The use of lignocellulosic biomass as a source of fermentable sugars has received much attention especially for its low cost and abundance. Furthermore, the combination of efficient pretreatment of the lignocellulosic material with more efficient and cost-effective enzyme blends to obtain fermentable sugars from food crops are searched (Lynd et al., 2005).

Agave tequilana Weber (BAT) is a plant cultivated in México and used as raw material in the elaboration of alcoholic beverage tequila. BAT is a residual fiber obtained from the tequila process and represents 40% (wet basis) of the agave processed (Cedeño-Cruz, 2003). Hence the fiber accumulated through 2008 should account for up to 178,910 ton (Consejo Regulador del Tequila, CRT). The composition of the BAT (var. Weber, from tequila industry), 42% cellulose, 20% hemicellulose and 15% lignin, makes it a suitable candidate for bioconversion to ethanol as suggested recently (Hernandez-Salas et al., 2009).

However, enzymatic degradation rate of lignocellulosic materials is low due to the resistance of crystalline structure of cellulose and the physical barrier formed by lignin that surrounds the cellulose polymer (Zhao et al., 2009). Therefore, BAT pretreatment is essential to disrupt the lignin bonds and thereby enhancing susceptibility of lignocellulosic materials to enzyme activity. An efficient pretreatment of lignocellulosic residues has been described to reduce lignin content, cellulose crystallinity and to increase the surface area for enzymatic reactions (Ruiz et al., 2008; Zhao et al., 2009). Different chemical and mechanical methods for the pretreatment of sugar cane and agave bagasses have been described based on the use of acid (Hernandez-Salas et al., 2009; Martin et al., 2002), steam (Kaar et al., 1998), alkali (Hernandez-Salas et al., 2009), and ammonium freeze explosion (AFEX; Prior and Day, 2008). However, despite pretreatment of the lignocellulosic substrates, the compromise of

endoglucanase, cellobiohydrolase, β -glucosidase and different hemicellulytic activities that plays an important role for the hydrolysis efficiency (Zhang and Lynd, 2004). Commercial cellulose from the *Trichoderma reesei*, often display a limiting activity of β -glucosidases (Messner and Kubicek, 1991; Saloheimo et al., 2002), therefore supplementation with extra β -glucosidase is required (Rosgaard et al., 2007).

The efficiency in hydrolysis of the lignocellulosic material depends on several process parameters such as catalyst concentration, substrate concentration, reaction time, enzyme concentration, and hemicellulolytic activities (Sun and Cheng, 2002). These factors often interact with one another, thus analysis of multiple variables or factors may lead to a more comprehensive understanding of their relationship. One approach to tackle this obstacle is the use of response surface methodology, that analyzes the effect of multiple variables, alone or in combination, on a given process with a minimal number of experiments while keeping a high degree of statistical significance in the results (Qi et al., 2009). This approach can be used to optimize the pretreatment conditions and enzymatic saccharification of the lignocellulosic materials.

Although, fermentation of the hydrolysates obtained from both chemical and enzymatic treatment has been highly studied, the efficiency of ethanol production remains to be increased in order to achieve an economical process. From lignocellulosic residues, mainly glucose from cellulose and xylose from hemicelluloses may be obtained (Bozell et al., 2000). In the case of glucose, *Saccharomyces cerevisiae* is recommended for the hydrolysates fermentation step, while for xylose-containing hydrolysates, the use of recombinant yeasts has also been proposed (Matsushika et al., 2008). Other studies described the utilization of microbial consortia for fermentation, such as yeast or bacteria that may ferment both glucose and xylose (Stephanopoulos, 2007). On the other hand, the current trend is to obtain genetically-modified microorganisms able to carry out in coupled processes the saccharification and fermentation steps of lignocellulosic residues to obtain ethanol (Okuda et al., 2008).

The aim of the present work was to find the optimal conditions BAT saccharification using acid and enzymatic hydrolysis following with fermentation step using native microorganism in order to produce ethanol.

Materials and methods

Raw material

Agave bagasse from *A. tequilana* Weber was collected from tequila distilleries located in Jalisco, México (El Consuelo, El Quiote, and El Viejito). The BAT samples were washed with distilled water, dried in oven until constant weights, milled and sieved to 0.5 mm diameter particles. The obtained material was mixed to obtain a homogeneous sample and stored at room temperature in polyethylene bags.

Compositional analysis

Analysis of the main polymeric fractions was carried out by quantitative inorganic acid hydrolysis as described (Browning, 1967). Glucose, xylose, arabinose and ethanol concentrations in hydrolysates during the course of saccharification and fermentation were determined by HPLC with a Metacarb 87C column 300 x 7.8 mm (Varian). The HPLC system was equipped with a Prostar 350 differential refractometer, HPLC pump, external heater module Metatherm(Varian). The temperature of the column was maintained at 70°C and the eluant (water) flow rate was 0.6 mL/min. Compounds quantification were carried out using calibration plots for glucose, xylose, arabinose, and ethanol (Sigma or Baker) obtaining correlation coefficients of $R^2=0.99$. Furfural and methyl furfural were analyzed at 280 nm (UV) using a spectrophotometer. The yield of sugars from acid and enzymatic hydrolysis was calculated as described previously (Qi et al., 2009):

$$\text{Hydrolysis yield (\%)} = \frac{[\text{Fermentable sugars (g)}]^{0.9}}{[\text{Cellulose (g)}] + [\text{Hemicellulose (g)}]} \times 100 \quad 1)$$

Agave bagasse saccharification

Acid hydrolysis

Acid hydrolysis was carried out using a Multiple Reactor System (Parr Instruments, Model 5000) provided with six reactors of 75 mL, each controlled independently. Reactors were charged with 50 mL (5 g of BAT/50 mL), dilute-sulfuric acid (1 to 3 %). A 1:9 (solid:liquid) ratio in weight was used for all assays, and incubation was from 125 to 175 °C. Samples were taken at different times according to the experimental design. Samples from the reactors were filtered with a 0.45 μm membrane (Millipore), and the retained solids were weighed. Carbohydrates, furfural and methyl furfural concentrations in the filtrate were determined as described above.

Enzymatic hydrolysis

BAT was exposed to enzymatic hydrolysis using commercial cellulase mixture, Celluclast 1.5L from *Trichoderma reesei* and β -glucosidase preparation Novozym 188 from *Aspergillus niger* (Novozymes). The lignocellulosic material was resuspended in 50 mM sodium acetate/acetic acid, pH 5, until the desired concentration was achieved. The dosage used was 59 Filter Paper Units (FPU) and 25 Cellobiase Units (CBU) per gram of total solids (TS), at 2-14% (w/w) TS loading, of Celluclast 1.5L and Novozym 188, respectively. One unit of FPU is defined as the amount of enzyme that releases 1 μ mol of glucose from Whatman No. 1 filter paper per minute. One CBU is the amount of enzyme that converts 1 μ mol of cellobiose to 2 μ mol of glucose per min. Thirty grams of pretreated BAT were suspended in acetate buffer pH 5. The reaction was carried out in a flask incubated at 40 °C and 100 rpm. After incubation the reactions were stopped by boiling for 10 min. Each sample was then centrifuged, the supernatant was collected, filtered through a 0.2 μ m membrane (Millipore) and subjected to HPLC analysis.

Mathematical model

Factorial experiment design 3^3 for acid hydrolysis and 3^2 for enzymatic hydrolysis were carried out. A three-level factorial experiment design was used to investigate the parameters affecting the sugars yield from the acid and enzymatic hydrolysis of BAT. For acid hydrolysis, H_2SO_4 loading (1-3% w/w), temperature (125-175 °C), and hydrolysis time (10-30 min) were variable input parameters; fermentable sugars were an output parameter. For enzymatic hydrolysis, BAT loading (6-14% w/w), and hydrolysis time (24-72 h) were variable input parameters; hydrolysis yield (%) was an output parameter. Coded values are described in Table 1, and their relation with the actual values is described with the dimensionless equation:

$$X_i = \frac{(x_i - X_i^0)}{\Delta X_i} \quad 2)$$

Where x_i is the coded value of the i th independent variable, X_i is the actual value of the i th independent variable, X_i^0 is the actual value of the i th independent variable at center point, and ΔX_i is the step change value.

The relationship between independent variables is described by the general second degree quadratic polynomial equation:

$$Y = \beta_0 + \sum \beta_i X_i + \sum \beta_{ii} X_i^2 + \sum \sum \beta_{ij} X_i X_j \quad 3)$$

Where for acid hydrolysis, Y, fermentable sugars (g/L); X_i , when $i = 1$, H_2SO_4 loading (% w/w); $i = 2$, hydrolysis time; and $i = 3$, temperature. For enzymatic hydrolysis, Y, hydrolysis yield (%); X_i , when $i = 1$, BAT loading (% w/w); $i = 2$, hydrolysis time. β_0 is the offset term, β_i , are linear coefficients, β_{ij} , are cross-product coefficients, and β_{ij} , when $i=j$, are quadratic coefficients. The reliability of the polynomial model was evaluated by its correlation coefficient R^2 .

The statistical significance of the model coefficients was determined by the analysis of variance (ANOVA), along with Fisher's F test with a significance level of 0.05. The three-dimensional surface plots generated by the polynomial model were obtained using the software Statgraphics Centurion XV (Statpoint Technologies, Inc. USA).

Table 1.- Coded values of the variables for the experiment designs in agave bagasse (BAT) hydrolysis.

Variable	Coded symbol	Values of coded levels		
		-1	0	1
Acid hydrolysis				
H_2SO_4 loading (% w/w)	X1	1	2	3
Hydrolysis time (min)	X2	10	20	30
Temperature ($^{\circ}C$)	X3	125	150	175
Enzymatic hydrolysis				
Agave bagasse (BAT) loading (% w/w)	X1	6	10	14
Hydrolysis time (h)	X2	24	48	72

Fermentation of hydrolysates

Fermentation assays were carried out with the obtained hydrolysates, inoculating with microorganisms isolated from rotten BAT. The hydrolysates were adjusted to pH=5 with $Ca(OH)_2$ and filtered through paper Whatman No. 1. All fermentation experiments were carried out with 8 mL of hydrolyzate inoculated with 2 mL of an overnight culture of the

microorganism grown in YPD medium (1×10^8 cells/mL), at 30° C and 100 rpm. Ethanol and sugars quantification was carried out by HPLC as described above.

Results and discussion

Saccharification of agave bagasse (BAT)

The potential usage of BAT that remained from the tequila elaboration process for ethanol production was evaluated. BAT from factories that extract the sugars by milling the agave tend to leave a remnant of sugars in the residue which may account for up to 6% of wet weight. Even though these sugars were not used for this study, their incorporation in the acid enzymatic hydrolysis can increase the overall yield of the bioconversion process.

BAT was analyzed for chemical components before and after acid pretreatment (Table 2). BAT remained from tequila elaboration contains cellulose (42 ± 2 %, w/w), hemicellulose (20 ± 1 %, w/w), and lignin (15 ± 1 %, w/w). After acid hydrolysis treatment under optimal conditions described below the BAT contains the followed proportions: cellulose (60 ± 1 %, w/w), hemicelluloses (not detected), and lignin (25 ± 1 %, w/w). Cellulose and lignin contained in BAT were increased of 47.5% and 44.3%, respectively, after acid pretreatment. In contrast, all hemicellulose was completely hydrolyzed with the acid pretreatment. Furthermore, the material conversion yield was 33.96% as fermentable sugars.

Table 2.- Agave bagasse (BAT) composition before and after acid hydrolysis treatment.

Component	Dry matter (%)	
	before	after
Cellulose	42 ± 2	60 ± 1
Hemicellulose	20 ± 1	no detected
Lignin	15 ± 1	25 ± 1

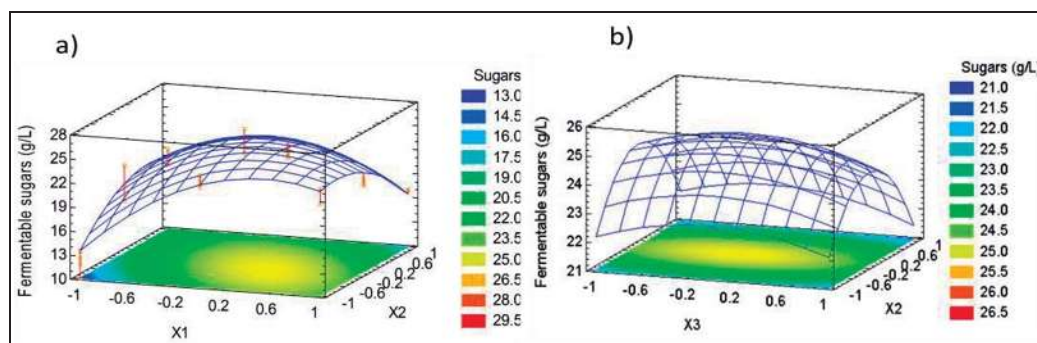
Recently performed an acid hydrolysis of agave bagasse (without cooking after tequila elaboration process) varying the HCl ratio from 30 to 90 mg/g of dry matter, obtaining yields

of up to 10% hydrolysis (Hernandez-Salas et al., 2009). Even though the difference in the hydrolysis yield may be explained by the temperature employed (150 °C), which will increase the reaction rate in presence of the catalyst. The nature of the BAT, which suffers a cooking process prior to sugars extraction from the agave core for the fermentation process of tequila elaboration, may play an important role in opening the lignocellulosic matrix, facilitating the action of the catalyst during the acid hydrolysis. Further analysis, such as scanning electronic microscopy (SEM), could help to determine the extent of the damage in the fiber structure due to the cooking process of the BAT material.

The acid hydrolysis was optimized with response surface method using a 3³ full factorial design, and yielding an empirical second-order polynomial equation (equation 4).

$$\text{Fermentable sugars} = 25.0526 + 1.81611 \cdot X_1 - 0.261667 \cdot X_2 - 0.173333 \cdot X_3 - 4.47944 \cdot X_1^2 - 3.025 \cdot X_1 \cdot X_2 + 0.158333 \cdot X_1 \cdot X_3 - 2.53278 \cdot X_2^2 - 0.115833 \cdot X_2 \cdot X_3 - 0.567778 \cdot X_3^2 \quad (4)$$

The quality of fit for the second-order polynomial equation was checked using the coefficient of determination (R^2) which was 0.90, indicating a satisfactory correlation between the observed and predicted responses. The p values obtained for the different coefficients implied that X_1 (H₂SO₄ %) and X_2 (hydrolysis time) have significant effect on the release of fermentable sugars from the fiber (supplemental material, Table S1). Thus, according with the predicted model, the optimal values for obtaining fermentable sugars during acid hydrolysis of BAT were 147 °C, 2.3% of H₂SO₄, and 15 min of hydrolysis time (Figure 1). The predicted concentration of fermentable sugars under these conditions was 25.8 g/L, which corresponds for 37.4% of total hydrolysis. Additionally, liquors obtained after acid hydrolysis gave concentrations lower than 1 g/L of furfural and methyl-furfural (data not shown), which are non toxic for yeast fermentation. The reliability of the model for acid hydrolysis of 10% (w/v) BAT was measured at reaction



Cap. 3 Figure 1 Response surface plots of acid saccharification of agave bagasse (BAT).

A) Catalyst (X1) and time (X2) effect. B) Temperature (X3) and time (X2) effect. Bars represent experimental points obtained in the confirmation of conditions predicted (147 °C, 2.0% of H₂SO₄, and 15 min), n=3.

conditions of 147 °C, 2.0% (w/v) of H₂SO₄, and 15 min of hydrolysis time (Table 3). A total of 24.9 g/L of fermentable sugars were obtained, that corresponds to a 36.14% hydrolysis yield. This result deviated from the predicted value by 3.51%, suggesting that the model fits adequately the experimental data.

Enzymatic hydrolysis

Enzymatic hydrolysis of BAT residue from acid treatment was carried out using commercial cellulases as described under methods. The remaining lignocellulosic material consisted mainly of cellulose and lignin (Table 2 and 3). The cellulase mixture had a hydrolysis yield of 61.5% when an 10% w/w TS loading was used to achieve a sugar concentration of 41.02 g/L (Table 3).

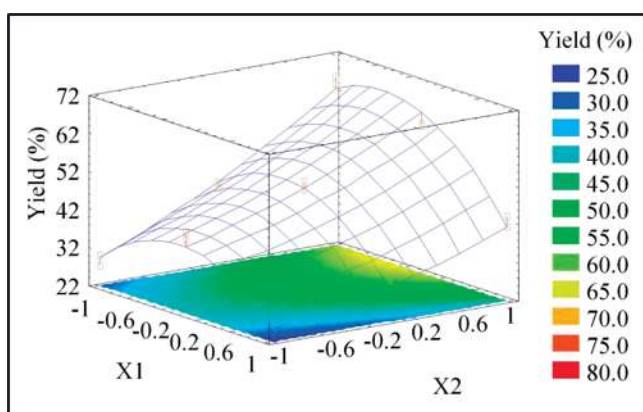
Table 3.- Confirmation assays of agave bagasse (BAT) hydrolysis treatment.

Conditions			Fermentable sugars (g/L)			
Acid hydrolysis:						
H ₂ SO ₄ (%)	Hydrolysis time (min)	Temperature (°C)	Actual ^a	Predicted ^a	Residual	Error (%)
1.0	20	150	18.5(26.8)	18.12(26.3)	0.40	2.20
2.0	15	147	24.9(36.1)	25.80(37.4)	-0.90	3.51
2.0	20	150	24.9(36.1)	25.24(36.6)	-0.33	1.34
3.0	20	150	21.0(30.4)	21.70(31.4)	-0.70	3.22
Enzymatic hydrolysis:						
BAT (%)	Hydrolysis time (hr)		Actual ^a	Predicted ^a	Residual	Error
6	48		17.49(43.7)	18.12(45.3)	-1.57	3.47
8.2	72		37.08(67.8)	36.71(67.1)	0.67	0.99
10	72		41.02(61.5)	40.89(61.3)	0.17	0.34

^aIn parenthesis, percentage of hydrolysis yield are shown.

This result is in agreement with previous reports that using with other fibers, however if the stoichiometric factor of the hydrolysis yield equation is disregarded, the value will increase in about 11%, giving one of the highest hydrolysis yield reported (Öhgren et al., 2006; Olofsson et al., 2008; Rudolf et al., 2008).

A surface response analysis of the enzymatic hydrolysis of pretreated BAT depicted a direct dependence of the yield with the incubation time, and a quadratic behavior against the BAT loading, having its optimum at 72 h and 8.2% (w/v), respectively (Figure 2).



Cap. 3 Figure 2 Response surface plot of enzymatic saccharification of agave bagasse (BAT).

Effect of BAT loaded(X1) over time (X2) effect. Bars represent experimental points obtained in the confirmation of conditions predicted (40 °C, 8.2% of BAT loaded, and 72 h), n=2.

The mathematical model of the process is shown in equation 5. The *p* values obtained for the different coefficients implied that X_1 (BAT loading %) and X_2 (hydrolysis time) have significant effect on the released fermentable sugars from the fiber (supplemental material, Table S2). The reliability of the model for enzymatic hydrolysis of BAT was measured at reaction conditions of 8.2 % (w/v) BAT load and 72 h, 37.8 g/L of fermentable sugars were obtained, that corresponds to 67.8 % hydrolysis yield. This result deviated from the predicted value by 0.99%, suggesting that the model fits adequately the experimental data.

$$\text{Yield (Enzymatic hydrolysis)} = 49.605 - 6.50833*X_1 + 12.4125*X_2 - 12.11*X_1^2 - 4.3225*X_1*X_2 + 2.4025*X_2^2 \quad (5)$$

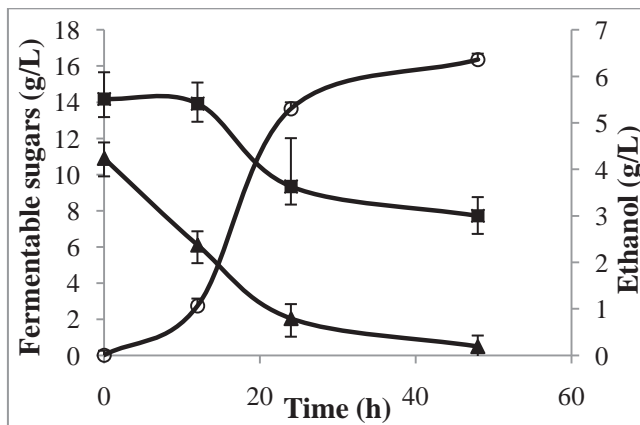
The combined hydrolysis yields for the acid and enzymatic hydrolysis of the BAT obtained in this work at optimal conditions is resumed as follow. For acid hydrolysis as 1st batch stage was

10% (w/v) of BAT in sulfuric acid solution 2% (w/v) at 147°C for 15 min residence; a 2st batch enzymatic hydrolysis stage was carried out with 8.2% (w/v) of BAT load from 1st acid-treatment, pH 5 and incubation for 72 h at 40°C rendering 41.02 g/L of fermentable sugars (Table 3). These BAT saccharification rendered 25.36 g of fermentable sugars/50g de BAT treated, corresponding to hydrolysis yield of 73.62%. Our data describes a process where the acid pretreatment is very efficient in breaking down the hemicellulose fraction present in the BAT, and the enzymatic preparation was efficient in breaking down the remaining cellulose fraction, rendering a yield around 69%. The acid treatment is able to fully unfold the hemicellulose fraction present in the BAT, our results suggest that cellulose hydrolysis may be improved by using a different enzymatic preparation, or recombinant origin.

Fermentation of hydrolysates

Fermentation assays with liquors obtained from saccharification processes were carried out using the isolated yeast UM-5 strain, that it was isolated from putrid BAT and selected due to its ethanologenic properties (data unpublished). By sequencing of a 550 nt fragment of 26S rRNA UM-5 was identified as *Pichia caribbica*, showing a 100% of identity with this species (data not shown) and suggesting that this yeast probably corresponds to this lineage.

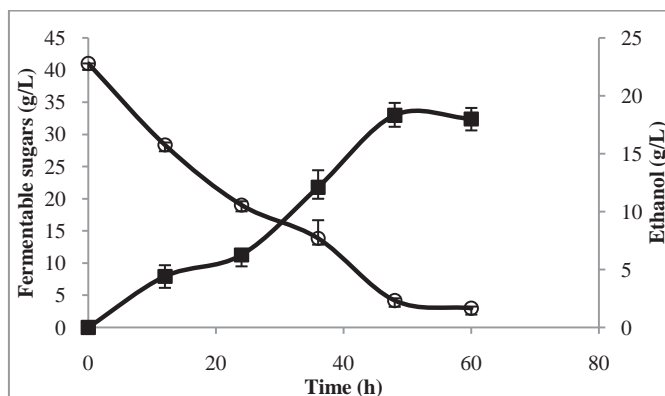
The liquor obtained after acid pretreatment with 24.9 g/L of fermentable sugars (Table 3), had the pH adjusted to 5 and inoculated with UM-5 strain. After 48 h of fermentation a concentration of ethanol of 6.37 g/L was obtained, that gives a 50.16% yield (Figure 3). Interestingly, glucose was completely exhausted, while xylose was only consumed up to 45% of its initial concentration, explaining the yield obtained in the fermentation.



Cap. 3 Figure 3 Batch fermentation of acid hydrolyzates obtained from agave bagasse (BAT) using the UM-5 yeast strain. ▲) Glucose, ■) Xylose, ○) Ethanol. S.D., are shown as bars, n=3.

On the other hand, the liquor obtained after enzymatic hydrolysis had 41.02 g/L of fermentable sugars, all in the form of glucose (Table 3). This liquor was fermented with UM-5 strain for 60 h giving a final ethanol concentration of 18.31 g/L after 48 h (Figure 4). At this time, all the glucose was consumed, and gave a yield of 87.05%. Thus, the combined yield of both acid and enzymatic obtained liquors was 8.99 g of ethanol/50 g of BAT, corresponding to yield of 56.77% (based on maximal theoretical ethanol yield on available hexoses and pentoses).

Furthermore, the fermentation of the hydrolysis liquors by UM-5 strain was very promising since the strain was able not only to ferment glucose with yields of 87%, but to ferment xylose too (45%). This yield is in agreement with those reported for other lignocellulosic sources when fermented with the genetically yeast *Saccharomyces cerevisiae* TMB3400 (Olofson et al., 2008; Wahlbom et al., 2003). Interestingly, the UM-5 strain had the ability to metabolize xylose to ethanol. Even though the causes for not consuming the totality of xylose during fermentation, it is possible that oxygen limitation might play an important role in xylose fermentation, as first described for *Pachysolen tannophilus* (Neirinck et al., 1984) and *Mucor indicus* (Millati et al., 2005). Further studies of the strain are required specially studying those factor that affect xylose consumption.



Cap. 3 Figure 4 Batch fermentation of enzymatic hydrolyzates obtained from agave bagasse (BAT) using the UM-5 yeast strain. ○) Glucose, and ■) Ethanol. S.D., are shown as bars, n=3.

Conclusions

The results obtained in this work indicate that the BAT residue under acid followed of enzymatic hydrolysis process and fermentation using the yeast *Pichia caribbica* UM-5, may be considered for ethanol production. In addition, the BAT from *A. tequilana* is suggested as an important source of raw material for ethanol production. Data presented in this work indicate that the BAT under boarding process may be considered as an raw material economical feasible, and it process may contribute to solving elimination of environmental residue waste remain of the tequila elaboration.

ACKNOWLEDGMENTS

This research was funded by CONACYT, COECYT and C.I.C./UMSNH grants.

References

1. Bozell JJ, Moens L, Elliott DC, Wang Y, Neuenschwander GG, Fitzpatrick SW, Bilski RJ, Jarnefeld JL. 2000. Production of levulinic acid and use as a platform chemical for derived products. *Res Conserv Recycl* 28: 227-239.
2. Browning BL. 1967. *Methods of wood chemistry*. New York: John Wiley & Sons.
3. Cedeño-Cruz M. 2003. Tequila production from agave; historical influences and contemporary processes. *The Alcohol Textbook*. 4th Ed. Nottingham University Press. 223-245 p.
4. Hernández-Salas JM, Villa-Ramírez MS, Veloz-Rendón JS, Rivera-Hernández KN, González-César RA, Plascencia-Espinosa MA, Trejo-Estrada SR. 2009. Comparative hydrolysis and fermentation of sugarcane and agave bagasse. *Biores Technol* 100: 1238-1245.
5. Kaar WE, Holtzapple MT. 1998. Benefits from Tween during enzymatic hydrolysis of corn stover. *Biotechnol Bioeng* 59:419.

6. Lynd L, van Zyl W, McBride J, Laser M. 2005. Consolidated bioprocessing of cellulosic biomass: an update. *Curr Op Biotechnol* 16:577-583.
7. Martin C, Galbe M, Nilvebrant NO, Jonsson LJ. 2002. Comparison of the fermentability of enzymatic hydrolysates of sugarcane bagasse pretreated by steam explosion using different impregnating agents. *Appl Biochem Biotechnol* 98: 699-716.
8. Matsushika A, Watanabe S, Kodaki T, Makino K, Sawayama S. 2008. Bioethanol production from xylose by recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biosci Bioeng* 105: 296-299.
9. Messner R, Kubicek CP. 1991. Carbon source control of cellobiohydrolase I and II formation by *Trichoderma reesei*. *Appl Environ Microbiol* 57:630-635.
10. Millati R, Sues A, Edebo L, Taherzadeh M. 2005. Ethanol production from hexoses, pentoses, and dilute-acid hydrolyzate by *Mucor indicus*. *FEMS Yeast Res* 5: 669-676.
11. Neirinck LG, Maleszka R, Schneider H. 1984. The requirement of oxygen for incorporation of carbon from D-xylose and D-glucose by *Pachysolen tannophilus*. *Arch Biochem Biophys* 228:13-21.
12. Öhgren K, Bengtsson O, Gorwa-Grauslund MF, Galbe M, Hahn-Hägerdal B, Zacchi G. 2006. Simultaneous saccharification and co-fermentation of glucose and xylose in steam-pretreated corn stover at high fiber content with *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biotechnol* 126:488-498.
13. Okuda N, Ninomiya K, Katakura Y, Shioya S. 2008. Reducing supplemental medium cost in bioethanol production from waste house wood hydrolysate by ethanologenic *Escherichia coli*: Inoculum size increase and coculture with *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biosci Bioeng* 105: 90-96.
14. Olofsson K, Rudolf A, Lidén G. 2008. Designing simultaneous saccharification and fermentation for improved xylose conversion by a recombinant strain of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biotechnol* 134:112-120.
15. Prior BA, Day DF. 2008. Hydrolysis of ammonia-pretreated sugar cane bagasse with cellulase, β -glucosidase, and hemicellulase preparations. *Appl Biochem Biotechnol* 146:151-164.

16. Qi K, Chen X, Shen F, Su Y, Wan Y. 2009. Optimization of enzymatic hydrolysis of wheat straw pretreated by alkaline peroxide using response surface methodology. *Ind Eng Chem Res* 48: 7346-7353.
17. Rosgaard L, Andric P, Dam-Johansen K, Pedersen S, Meyer AS. 2007. Effects of substrate loading on enzymatic hydrolysis and viscosity of pretreated barley straw. *Appl Biochem Biotechnol* 143: 27-40.
18. Rudolf A, Baudel H, Zacchi G, Hahn-Hägerdal B, Lidén G. 2008. Simultaneous saccharification and fermentation of steam-pretreated bagasse using *Saccharomyces cerevisiae* TMB3400 and *Pichia stipitis* CBS6054. *Biotechnol Bioeng* 99:783-790.
19. Ruiz E, Cara C, Manzanares P, Ballesteros M, Castro E. 2008. Evaluation of steam explosion pre-treatment for enzymatic hydrolysis of sunflower stalks. *Enz. Microbial Technol* 42: 160-166.
20. Saloheimo M, Kuja-Panula J, Penttila M. 2002. Enzymatic properties and intracellular localization of the novel *Trichoderma reesei* β -glucosidase BGLII (Cel1A). *Appl Environ Microbiol* 68:4546-4553.
21. Stephanopoulos G. 2007. Challenges in engineering microbes for biofuel production. *Science* 315:801.
22. Sung Y, Cheng J. 2002. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Biores Technol* 83:1-11.
23. Wahlbom CF, van Zyl WH, Jönsson LJ, Hahn-Hägerdal B, Otero RR. 2003. Generation of the improved recombinant xylose-utilizing *Saccharomyces cerevisiae* TMB 3400 by random mutagenesis and physiological comparison with *Pichia stipitis* CBS6054. *FEMS Yeast Res* 3:319-326.
24. Zhang YH, Lynd LR. 2004. Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: noncomplexed cellulase systems. *Biotechnol Bioeng* 88:797-824.
25. Zhao H, Jones CL, Baker GA, Xia S, Olubajo O, Person VN. 2009. Regenerating cellulose from ionic liquids for an accelerated enzymatic hydrolysis. *J Biotechnol* 139: 47-54.

CAPÍTULO 4.

BIOPROCESO PARA LA OBTENCIÓN DE ETANOL ANHIDRO A PARTIR DE BAGAZO DEL AGAVE *TEQUILANA* WEBER

J. Saucedo-luna^a, A. J. Castro-Montoya^b, M. Martínez-Pacheco^a, J. Campos-García^a

^a Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas, ^b Facultad de Ingeniería Química, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia, Michoacán, México.

Tel 3164108 email jsaucedo@umich.mx.

Resumen

El bagazo de *Agave tequilana* Weber es el desecho lignocelulósico que se produce en la fabricación del tequila. Debido a su composición puede ser utilizado en la producción de químicos de alto valor agregado, tal como el etanol. El creciente interés en la utilización de residuos lignocelulósicos se justifica por el bajo costo de estos materiales, el impacto ecológico y su naturaleza renovable. Por lo anterior, los objetivos que conforman el presente refieren a la implementación de un bioproceso integral que contempla desde la caracterización de bagazo, sacarificación, la selección y obtención de una cepa fermentadora, la fermentación de los hidrolizados, así como, la purificación y obtención de etanol anhidro. El análisis del bagazo del agave resultó con 42 % de celulosa, 20 % de hemicelulosa y 15 % de lignina. Para la sacarificación del bagazo del agave se analizaron y compararon dos formas de hidrólisis, hidrólisis química e hidrólisis enzimática por separado y en forma combinada, definiendo que el mejor arreglo fue combinando las propiedades de ambos métodos. Las condiciones óptimas en la hidrólisis química fueron 130°C, 4 % de H₂SO₄ como catalizador y 30 min de tiempo de hidrólisis. El residuo del primer paso se llevó a hidrólisis enzimática, las condiciones óptimas fueron 45°C, 2 % (w/w) de bagazo y 72 h. Con estas condiciones se obtuvieron 30.87 g de azúcares fermentables/50 g de bagazo tratado, para un rendimiento total de sacarificación del 89.62 % con respecto al material sacarificable. Los hidrolizados del paso anterior se fermentaron utilizando una levadura aislada del bagazo del agave (UM-5), obteniendo 9.61 g de etanol/50 g de bagazo y correspondiendo a un rendimiento combinado de 55.25 % con respecto al teórico tomando en consideración la sacarificación completa del material sacarificable. La deshidratación del etanol se realizó con desplazamiento del azeótropo con sales de CaCl₂ y mallas moleculares de 3Å, obteniendo etanol con 98.6 %. Los resultados obtenidos sugieren que bajo el proceso descrito en este trabajo, el bagazo de Agave puede ser utilizado como materia prima para la obtención de etanol anhidro.

Palabras clave: Bioetanol, sacarificación, biomasa lignocelulósica, hidrólisis.

1. Introducción

El agave azul (*Agave tequilana* Weber) es una planta que se cultiva extensamente en México, ya que es la materia prima para la producción de la bebida alcohólica denominada “tequila”. El bagazo es la fibra residual que se obtiene después de que el agave es sometido al proceso de extracción de jugos para la producción de tequila. Este residuo representa aproximadamente el 40% del peso total de agave procesado (Iñiguez y col., 2001) y actualmente se generan alrededor de 1.78×10^8 kg/año, de los cuales la mayoría se utiliza como composta. Relacionando el alto volumen de generación de este residuo con las nuevas tendencias de producción de biocombustibles a partir materiales lignocelulósicos, considerados como la única fuente renovable con el potencial para suministrar las demandas energéticas (Bozell, 2004), surge la idea de evaluar su factibilidad de conversión a bioetanol. Cabe mencionar que el proceso de producción de etanol a partir de materiales lignocelulósicos comprende tres etapas: hidrólisis de los polímeros celulósicos hacia azúcares, fermentación de éstos últimos hacia etanol y finalmente la purificación y deshidratación para obtener etanol anhidro.

Existen estudios de sacarificación para otras fuentes de biomasa como son: bagazo de caña de azúcar, residuos de trigo, sorgo, pastos, etc. Para estos materiales lignocelulósicos se han reportado diferentes alternativas de procesamiento, tales como: físicos (pulverización y pirólisis), físico-químicos (explosión con vapor, amonio y bióxido de carbono) (Prior y Day, 2008), químicos (ozonólisis, hidrólisis ácida, hidrólisis alcalina, deslignificación oxidativa, organosolv) y biológicos (Sun y Cheng, 2002; Lynd et al., 2005; Ruiz et al., 2008). De todas estas alternativas la mejor posicionada desde el punto de vista económico es la hidrólisis ácida (Wyman, 1994). La producción de etanol ha tenido como objetivo la obtención de bebidas alcohólicas para consumo humano mediante destilación. El uso del etanol como materia prima o en la industria química es extenso, pero su obtención es mediante la hidratación catalítica del etileno. Recientemente la atención regresa a la producción de etanol por fermentación para fines químicos y combustibles, debido a la aparición de nuevos procesos biotecnológicos (Hernandez-Salas et al., 2009; Zhao et al., 2009).

Actualmente en los Estados Unidos se utiliza maíz como materia prima para la producción de etanol (Dien, 2002). El almidón constituye aproximadamente el 70 % del maíz, este polímero es roto fácilmente, obteniéndose glucosa la cual puede fermentarse a etanol. En contraste, de los residuos lignocelulósicos se obtiene glucosa de la celulosa y xilosa de la hemicelulosa. En el caso de la glucosa la levadura recomendada para la fermentación de los hidrolizados es *Saccharomyces cerevisiae*, mientras que para los hidrolizados que contienen xilosa se recomienda levaduras genéticamente modificadas (Matsushika et al., 2008; Ikram-ul-Haq, 2005). Otros estudios describen la utilización de mezcla de microorganismos como levaduras/bacterias que pueden fermentar glucosa y xilosa al mismo tiempo (Okuda et al., 2008; Stephanopoulos, 2007).

La tecnología de producción de etanol se ha desarrollado rápidamente en los últimos 30 años, de tal forma que ha permitido una disminución en los costos de producción del etanol, de 2.47 dólares/galón en 1978 a 1.43 en 1994 y 0.48 en 1999 (McAloon, 2000). Hasta el momento no se espera reducción de costos significativos en base a modificaciones tecnológicas, por lo cual utilizar materias primas de bajo costo es la clave para reducirlos aún más.

El etanol puede ser utilizado como combustible de automotores ya sea mezclado con gasolina o de manera independiente. Cualquiera de estas opciones demanda que no haya presencia de agua por lo que es necesario desarrollar la tecnología para su purificación y lograr la obtención de etanol anhidro, sin embargo, al ser esta etapa la de mayor consumo energético de todo el proceso, cualquier avance en la disminución de la energía requerida impactará de manera sobresaliente en el rendimiento global del proceso. La formación de un azeótropo en la mezcla etanol-agua impide purificarlo por los métodos tradicionales de destilación, por lo que surgen diferentes alternativas como son: la destilación extractiva (Maciel y Brito, 1995; Lelkes, 2000), la adsorción con diferentes materiales como zeolitas, con los mismos materiales lignocelulósicos (Carmo y Gubulin, 1997 a y b; Beery, 2001), separación con membranas poliméricas (Tsuyumoto, 1997; Jiratananon, 2002; Kanti, 2004; Dubey, 2005) y la utilización de sales iónicas para el desfasamiento y/o ruptura del azeótropo (Iliuta y Thyron, 1996; Pinto, 2000; Ligerio y Ravagnani, 2003).

Existe un número muy grande de esfuerzos que se han generado en este sentido, sin embargo, no hay un proceso ya establecido que logre las metas de disminución energética.

2. Materiales y Métodos

2.1. Material crudo

El residuo de *Agave Tequilana* Weber fue recolectado de varias plantas tequileras localizadas en Jalisco, México (*El Quiote, El Viejito, El Consuelo*). Las muestras del bagazo de agave fueron lavadas, secada al sol hasta peso constante y molida a 0.5 mm de diámetro de partícula. El material obtenido fue homogenizado y guardado en bolsas de polietileno.

2.2. Composición del bagazo

El análisis de la fracción principal se realizó utilizando la hidrólisis ácida cuantitativa descrita por Browning (1967). La concentración de glucosa, xilosa, arabinosa y etanol en los hidrolizados durante la sacarificación y fermentación fueron determinados por HPLC con una columna metacarb 87C de 300 x 7.8 mm acoplada a una precolumna metacarb 87C de 50 x 4.6 mm (Varian). El HPLC está equipado con un refractómetro diferencial Prostar 350, módulo de calentamiento Metatherm y automuestreador (Varian). La temperatura en la columna se mantuvo en 70°C y el flujo de eluente (agua) fue de 0.6 mL/min. La cuantificación de los compuestos se realizó utilizando gráficos de calibración obtenidos para glucosa, xilosa, arabinosa y etanol (Sigma, Baker) obteniendo coeficientes correlación de $r^2 = 0.99$. El rendimiento de la hidrólisis ácida y enzimática fue calculada con:

$$\text{Rendimiento (\%)} = \frac{\text{Azúcares Fermentables (g/L)}}{(\text{Celulosa} + \text{Hemicelulosa, g/L})(1.1)} \times 100$$

En donde (1.1) es el factor de conversión estequiométrico del material sacarificable (celulosa y hemicelulosa).

2.3. Sacarificación del bagazo de agave

2.3.1. Hidrólisis ácida

La hidrólisis ácida se realizó en autoclave, las muestras fueron de 50 mL (5 g de agave/50 mL), ácido sulfúrico (2, 4 y 6 %), temperaturas(100, 121 y 130°C) y tiempos de hidrólisis de 30, 60 y 90 min. Una relación de 1:10 (sólido:líquido) se mantuvo en todos los experimentos. Las muestras fueron filtradas, el sólido pesado y los azúcares en los hidrolizados fueron determinados por HPLC.

2.3.2. Hidrólisis enzimática

La hidrólisis enzimática del bagazo de agave se realizó utilizando celulasas comerciales (*Trichoderma viridae*, *Aspergillum niger*) y hemicelulasas (*Aspergillum niger*), (Novozymes). Por otra parte se utilizó enzimas de un microorganismo autóctono (*Colletotricum lindemuthianum*) obtenidas en el laboratorio. La dosis de enzima fue de 0.1g/g de sólidos totales y la concentración de residuo de agave fue de 2% (w/w). La hidrólisis se realizó a 40 y 45°C de acuerdo con las enzimas utilizadas, las muestras se centrifugaron, filtraron, el hidrolizado recolectado fue analizado por HPLC.

2.3.3. Fermentación de los hidrolizados

Los hidrolizados obtenidos se inocularon con un microorganismo aislado del bagazo de agave (UM-5). El pH de los hidrolizados se ajustó a 5 con $\text{Ca}(\text{OH})_2$ y filtrados con papel Whatman. Todos los experimentos se llevaron a cabo a 30°C con 8 mL de hidrolizado y 2 mL de cultivo crecido 12 h en medio YPD. La cuantificación del etanol y los azúcares se determinaron por HPLC.

2.3.4. Purificación y deshidratación del etanol

El etanol obtenido se destiló utilizando el desplazamiento del azeótropo por CaCl_2 y posterior paso por mallas moleculares de 3Å (Camen Química, S.A. de C.V.). La determinación del etanol fue por HPLC y con densímetro digital (Parr instruments).

3. Resultados y discusión

3.1. Caracterización del bagazo de *Agave tequilana* Weber variedad azul.

El bagazo de agave, así como residuo de la hidrólisis química se analizaron utilizando el método de hidrólisis química cuantitativa, los resultados se muestran en la tabla 1.

Tabla 1. Composición del bagazo de agave antes y después de la hidrólisis ácida

Componentes	% (w/w) Base seca	
	Antes de hidrólisis	Después de hidrólisis
Celulosa	42 +/- 2	50
Hemicelulosa	20 +/- 1	No se detectó
Lignina	15 +/- 1	25

En la tabla 1 se observa que el contenido de celulosa y lignina se incrementó después del tratamiento ácido en 8 y 10% respectivamente; por el contrario, la hemicelulosa fue degradada a sus monómeros por la hidrólisis ácida, no detectándose en el residuo proveniente de la hidrólisis ácida. La conversión de material en la hidrólisis química fue de 40%. La diferencia en la conversión con respecto a datos reportados en la bibliografía (Hernández-Salas et al., 2009) puede explicarse posiblemente a la naturaleza del bagazo de agave el cual ya fue sometido a un cocimiento durante el proceso de elaboración del tequila y puede tener importancia en la apertura de la matriz lignocelulósica, facilitando la catálisis en la hidrólisis ácida.

3.2. Sacarificación del material

La sacarificación se hizo por hidrólisis química, hidrólisis enzimática y una combinación de las anteriores.

3.2.1. Hidrólisis Química.

La hidrólisis se realizó en autoclave con tres variables independientes, temperatura (100, 121 y 130°C), tiempo (30,60 y 90 min), concentración de catalizador (2, 4 y 6%) y una variable respuesta, azúcares fermentables (g/L).

El perfil de azúcares fermentables que se presenta en la figura 1 es el correspondiente a una concentración del 4% de ácido, ya que en estas condiciones se obtuvo los mejores rendimientos.

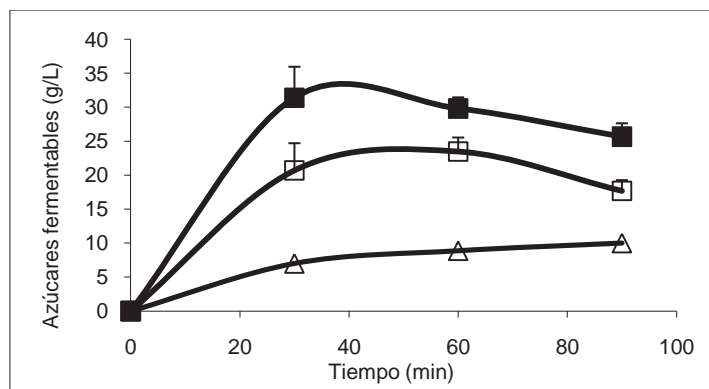


Figura 1. Efecto de la temperatura sobre el perfil de azúcares fermentables obtenidos por hidrólisis química de bagazo de agave. Δ 100°C, \square 121°C y \blacksquare 130°C. 4% de ácido sulfúrico como catalizador. n = 3

Podemos apreciar en la figura que al inicio de la hidrólisis existe una rápida conversión a azúcares del material para llegar a un equilibrio y disminuir posteriormente, este efecto se explica porque los azúcares que se están obteniendo continúan reaccionando hasta llegar a productos secundarios como el furfural e hidroximetilfurfural llegando al equilibrio cinético de la reacción azúcares – productos secundarios, una vez que el material se va agotando la producción de azúcares disminuye pero si la reacción no se detiene los azúcares continúan degradándose.

Las condiciones en donde se obtiene una concentración mayor de azúcares fermentables en la hidrólisis química fueron 130°C, 4% de H_2SO_4 y 30 min de tiempo de hidrólisis. Con estas condiciones la concentración de azúcares en el hidrolizado fue de 31.39 g /L con una distribución de monómeros de 6.95, 22 y 2.44 g/L de glucosa, xilosa y arabinosa respectivamente. Un rendimiento de 50.62%, mientras que la concentración de productos fenólicos en estas condiciones es baja, 0.81 g/L, como se puede apreciar en la figura 2. Esto es favorable, ya que se ha reportado que altas concentraciones de éstos compuestos inhibe la fermentación de los hidrolizados (Palmqvist et al. 2000).

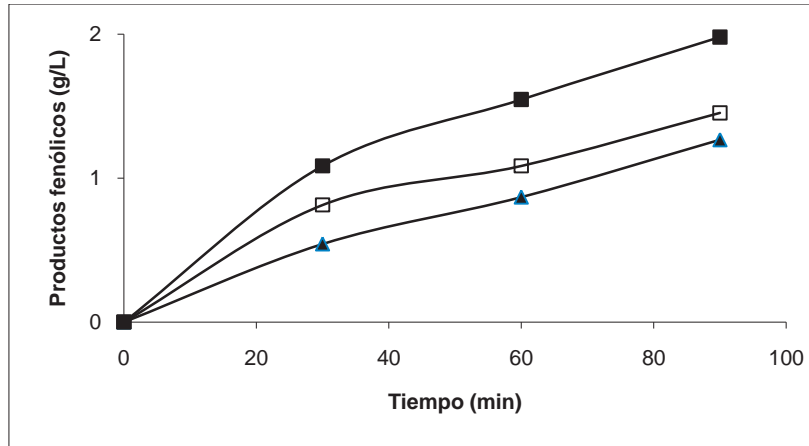


Figura 2. Obtención de productos fenólicos por hidrólisis química de bagazo de agave a 130 °C. Δ 2%, \square 4% y \blacksquare 6% de ácido sulfúrico.

3.2.2. Hidrólisis enzimática

3.2.2.1 Enzimas comerciales de *Aspergillum niger* y *Trichoderma viridae*.

Los residuos de bagazo de agave y el proveniente de la hidrólisis ácida se llevaron a hidrólisis enzimática por separado utilizando celulasas y hemicelulasas de *Aspergillum niger* y, de igual manera, *Trichoderma viridae*. Los azúcares fermentables obtenidos se muestran en las figura 3 y 4. La dosis de cada una de las enzimas fue de 0.1g de enzimas/g de sólido en ambos residuos.

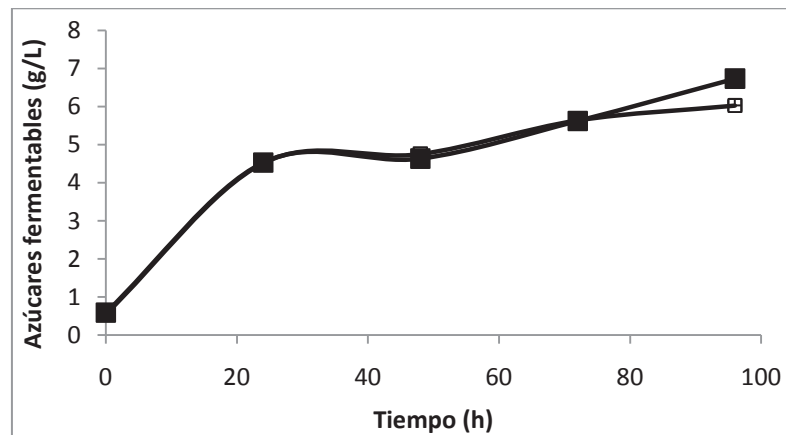


Figura 3. Producción de azúcares fermentables. \blacksquare Bagazo de agave lavado \square Residuo del hidrolizado químico. Hemicelulasas y celulasas de *A. niger* (novozyme). pH = 4.0 Temperatura = 45 °C. n = 3

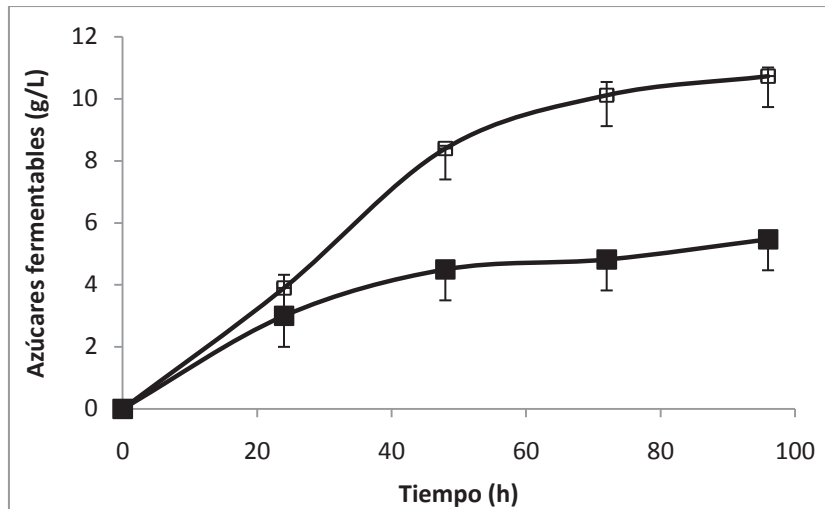


Figura 4. Hidrólisis enzimática de ■ bagazo de agave y □ residuo sólido proveniente de la hidrólisis ácida con celulasas de *Trichoderma viridae* (novozyme). pH = 5.0 y temperatura = 40 °C y n = 3.

En la figura 3 se puede apreciar que las enzimas provenientes de *A niger* metabolizan de manera semejante al bagazo de agave, como al residuo de la hidrólisis química dando hidrolizados con una concentración máxima de 6.74 g/L para el residuo ácido. En la figura 4, los resultados de la hidrólisis enzimática con *T viridae*, mejoran la conversión y rendimiento del residuo ácido obteniendo concentraciones máximas de 10.12 g/L de azúcares fermentables en el hidrolizado, mientras que, en el bagazo de agave tan sólo alcanzan 5.47 g/L.

3.2.2.2 Enzimas obtenidas de *C. Lindemuthianum*

Los residuos de bagazo de agave y el proveniente de la hidrólisis ácida se trataron utilizando el conjunto de enzimas liofilizadas que se obtuvieron de *C. Lindemuthianum*.

Los resultados de azúcares fermentables se muestran en la figura 5. La dosis de enzimas fue de 0.1 a 0.5g/g de bagazo.

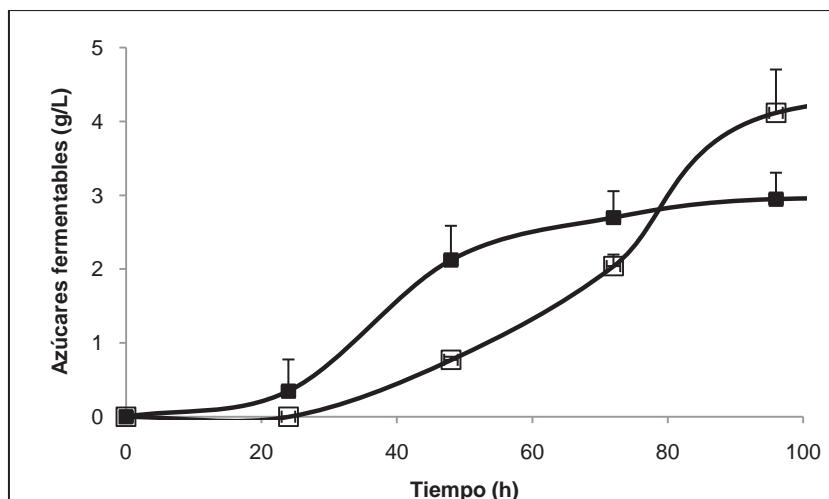


Figura 5. Hidrólisis enzimática de ■ bagazo de agave y □ residuo sólido proveniente de la hidrólisis ácida con enzimas de *Colletotricum lindemuthianum*. pH = 5.0 y T = 45 °C y n = 3.

La figura 5 nos muestra los resultados de la hidrólisis con 0.5 g de enzimas/g de material en donde la máxima concentración de azúcares fermentables corresponde a 4.11 g/L para el hidrolizado obtenido con el residuo ácido.

Los resultados de los diferentes métodos de sacarificación se reúnen en la tabla 2 así como el rendimiento en base al material sacarificable.

Tabla 2 Obtención de azúcares fermentables de la hidrólisis química y enzimática, así como el rendimiento.

Método	Azúcares fermentables (g/L)		Rendimiento (%)	
Hidrólisis ácida	31		46.02	
Hidrólisis enzimática	Bagazo	residuo ácido	Bagazo	residuo ácido
<i>A niger</i>	6.03	6.74	43.75	50.54
<i>T viridae</i>	4.82	10.12	38.87	75.89
<i>C lindemuthianum</i>	2.95	4.11	21.40	30.81

El mayor rendimiento en la sacarificación del bagazo de agave se consigue al combinar un paso de hidrólisis química y el residuo que se obtiene llevarlo a un segundo paso con enzimas, de las cuales *T. viridae* obtiene mejores resultados. El total de azúcares fermentables por 50 g de bagazo tratado lo podemos calcular de la manera siguiente:

En el primer paso con ácido se obtienen (31.39 g/L) (0.5L) = 15.69 g de azúcares fermentables.

En el segundo paso con enzimas (10.12 g/L) (1.5L) = 15.18 g

Total = 15.69 + 15.18 = 30.87 g/50 g de bagazo.

De esta forma el rendimiento combinado de sacarificación es 89.62% con respecto al material sacarificable (celulosa + hemicelulosa).

Fermentación de los hidrolizados

Los hidrolizados químicos y enzimáticos que se obtuvieron de la sacarificación combinada se fermentaron por separado con la levadura aislada del bagazo de agave de acuerdo a las condiciones descritas anteriormente. El hidrolizado químico se trató con $\text{Ca}(\text{OH})_2$ para disminuir el efecto de contaminantes como el ácido acético que inhiben el crecimiento de los microorganismos utilizados en la fermentación (Palmqvist et al. 2000). El pH se aumentó a 8.5 y posteriormente a pH = 5, existiendo una disminución o pérdida de azúcares fermentables en un 33%, quedando con 19.3 g/L. Los resultados de la fermentación de los hidrolizados químicos para cada uno de los monómeros los observamos en la figura 6. En cuanto a los hidrolizados enzimáticos no fue necesario tratarlos y en la figura 7 observamos el perfil de azúcares fermentables obtenido.

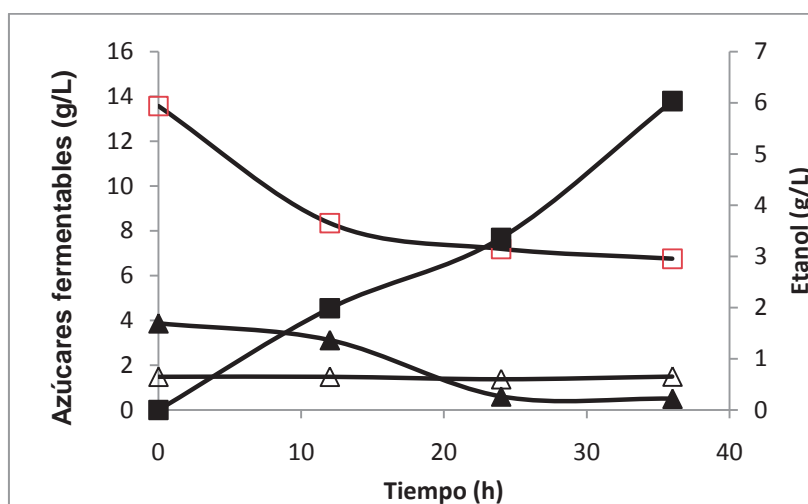


Figura 6. Fermentación de los hidrolizados químicos por UM-5. Δ rabinosa, \blacktriangle glucosa, \square xilosa y \blacksquare etanol producido.

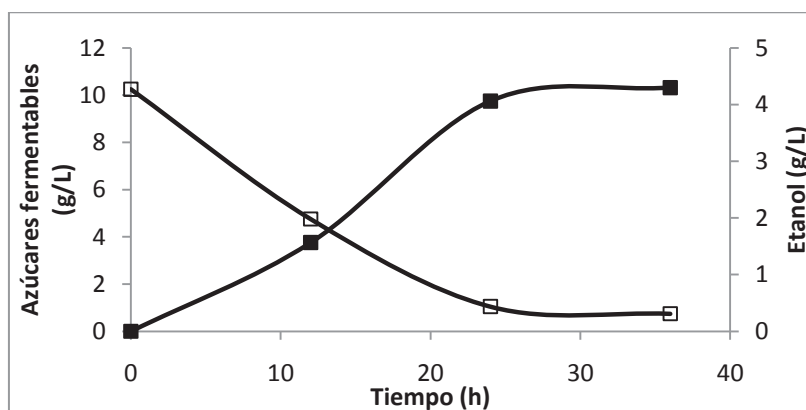


Figura 7. Fermentación de los hidrolizados enzimáticos por UM-5. □ Glucosa y ■ etanol producido.

La fermentación de los hidrolizados químicos da un rendimiento de 61.30% con respecto al valor máximo teórico de etanol. Este bajo rendimiento es originado por los azúcares de 5 carbonos, pentosas, que no son metabolizados completamente, en la figura 6 se observa que el 50.27% de la xilosa se utiliza, mientras que en el caso de la arabinosa el consumo es cero. Mientras que las hexosas como la glucosa se consume completamente a las 24 hrs. En los hidrolizados enzimáticos se consume totalmente la glucosa con un rendimiento del 82.0% a las 36 hrs.

El cálculo de etanol que se obtiene al tratar 50 g de bagazo lo podemos expresar de la siguiente forma.

Del hidrolizado químico 6.36 g/L de etanol con un volumen de hidrolizado de 0.5 L ó (6.36g/L) (0.5 L) = 3.18 g de etanol a las 36 hrs.

Del hidrolizado enzimático 4.29 g/L de etanol con un volumen de 1.5 L ó (4.29 g/L) (1.5 L) = 6.43 g de etanol a las 36 hrs.

El rendimiento combinado es = $(3.18 + 6.43) (100)/(50)(0.62)(1.1)(0.51) = 55.25\%$

Purificación y deshidratación del etanol

Para la purificación del etanol se utilizó destilación con desplazamiento del azeótropo al utilizar sales de CaCl_2 . Los resultados los observamos en la figura 8. Podemos apreciar el desplazamiento de la curva de saturación al utilizar CaCl_2 con lo cual los requerimientos de platos teóricos en la torre de destilación son menores en una proporción casi directa con la concentración de CaCl_2 utilizado.

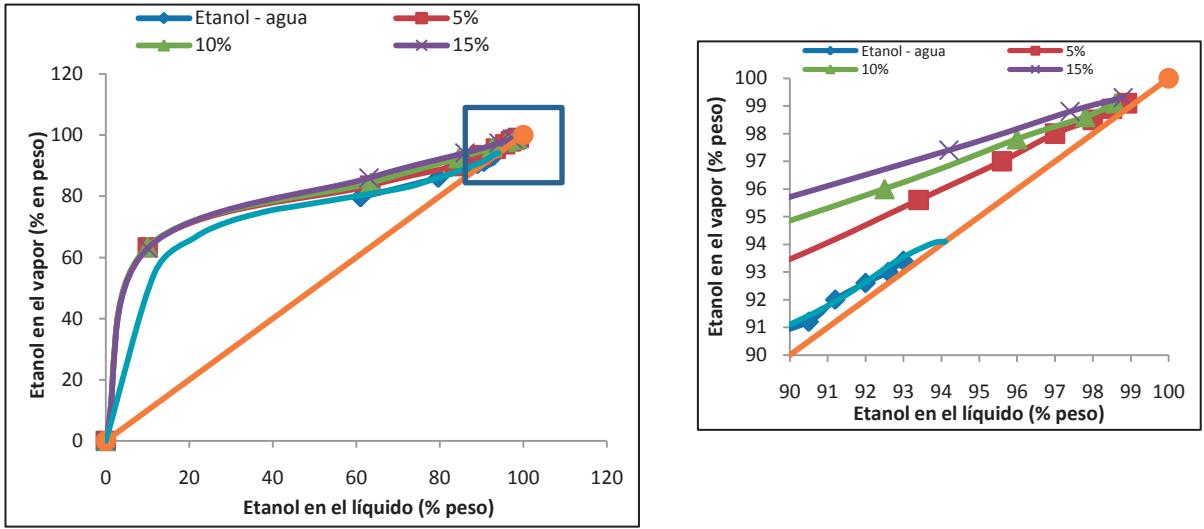


Figura 8. Desplazamiento del azeótropo por CaCl_2 utilizando diferentes concentraciones de sal.

La utilización de CaCl_2 en la destilación abre la curva de equilibrio etanol-agua, lo que permite disminuir la cantidad de platos teóricos en la columna de destilación hasta un 60%, sin embargo, al llegar al azeótropo los platos teóricos necesarios se hace infinita, por lo cual, es necesario utilizar otro método para terminar la deshidratación del etanol. Este método es la utilización de mallas moleculares, que en este caso, fueron mallas moleculares de 3 A (Camen S.A.) con lo cual se obtuvo etanol con 99% de concentración y puede obtenerse en la concentración deseada.

Conclusiones

De los resultados anteriores podemos concluir que el bagazo de agave resultante del proceso de producción del tequila tiene alto potencial para obtener etanol por su contenido de material sacarificable, la apertura de la matriz lignocelulósica es fundamental en la sacarificación de este residuo siendo mayor que otros trabajos reportados, estos resultados pueden deberse a los procesos de cocción al cual el agave es sometido en la elaboración del tequila, que comienza la degradación de los polímeros de la matriz lignocelulósica, lo que permite alta conversión del material tanto en la hidrólisis química como en la enzimática. El rendimiento logrado en este trabajo, 89% del material sacarificable, es uno de los valores más altos reportados

para sacarificación de un material lignocelulósico. La fermentación de los hidrolizados por la cepa autóctona aislada UM-5 es buena, sin embargo, aún puede aumentarse si se logra mejorar el rendimiento en la fermentación de los hidrolizados ácidos. Un resultado que es necesario remarcar es la obtención de hidrolizados químicos y enzimáticos por separado, ya que los primeros contienen principalmente pentosas y los segundos hexosas y al tenerlos separados, se pueden tratar de la manera más conveniente para su fermentación. La formación de un azeótropo en la mezcla etanol-agua impide la deshidratación del producto vía destilación simple por lo que se requiere utilizar técnicas para romper o desplazar este azeótropo. Para este efecto se utilizó la combinación de dos métodos, primero destilación con efecto de sales de CaCl_2 para desplazar el azeótropo y posteriormente utilización de mallas moleculares, con este arreglo se disminuyen los requerimientos de platos teóricos en la columna de destilación con respecto a un arreglo de destilación convencional, mejorando así el rendimiento total del proceso de deshidratación.

Agradecimientos

A la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo por la beca otorgada a JSL.
Al CONACyt, *por el financiamiento otorgado para la beca 204395*

Referencias

26. Bozell, J.J., Moens, L., Elliott, D.C., Wang, Y., Neuenschwander, G.G., Fitzpatrick, S.W., Bilski, R.J., Jarnefeld, J.L. 2000. Production of levulinic acid and use as a platform chemical for derived products. Resources, conservation and recycling. 28: 227-239.
27. Browning, B. L. 1967. Methods of wood Chemistry. John Wiley & Sons. New York.
28. Dien BS, Bothast RJ, Nichols NN, y Cotta MA. 2002. The U.S. corn ethanol industry: an overview of current technology and future prospects. *International-Sugar-Journal*, 204-208, 210-211.
29. J.M. Hernández-Salas, M.S. Villa-Ramírez, J.S. Veloz-Rendón, K.N. Rivera-Hernández, R.A. González-César, M.A. Plascencia-Espinosa, S.R. Trejo-

- Estrada 2009. Comparative hydrolysis and fermentation of sugarcane and agave bagasse. *Bioresource Technology* 100: 1238-1245
30. Ikram-ul-Haq, Muhammad Mohsin Javed, Tehmina Saleem Khan, Zafar Siddiq. 2005. Cotton saccharifying activity of cellulases produced by co-culture of *Aspergillus niger* and *Trichoderma viride*. *Res. J. Agric. and Biol. Sci.* 1: 241-245.
31. Iñiguez-Covarrubias, G., Lange, S.E., Rowell, R.M. 2001. Utilization of byproducts from the tequila industry: part 1: agave bagasse as a raw material for animal feeding and fiberboard production. *Bioresour. Technol.* 77: 25-32.
32. Lynd, L., van Zyl, W., McBride, J. and Laser, M. 2005. Consolidated bioprocessing of cellulosic biomass: an update. *Current Opinion in Biotechnology.* 16:577–583
33. Maciel, M., Brito, R.P. 1995. Evaluation of the dynamic behavior of an extractive distillation column for dehydration of aqueous ethanol mixtures *Computers and Chemical Engineering*
34. McAloon, A., Taylor, F., Yee, W., Ibsen, K., Wooley, R., October, 2000. Determining the Cost of Producing Ethanol from Corn Starch and Lignocellulosic Feedstocks. Report No: NREL/TP-580-28893. Eastern Regional Research Center Wyndmoor, PA and National Renewable Energy Laboratory, Golden, CO. <http://www.afdc.doe.gov/pdfs/4898.pdf>.
35. Matsushika, A., Watanabe, S., Kodaki, T., Makino, K., Sawayama, S. 2008. Bioethanol production from xilose by recombinant *Sacharomyces cerevisiae*. *J. of Bioscience and Bioengineering.* 105: 296-299.
36. Okuda, N., Ninomiya, K., Katakura, Y., and Shioya, S. 2008. Reducing supplemental medium cost in bioethanol production from waste house wood hydrolysate by ethanologenic *Escherichia coli*: Inoculum size increase and coculture with *Sacharomyces cerevisiae*. *J. of Bioscience and Bioengineering.* 105: 90 - 96.
37. Palmqvist, E. and Hanh-Hagerdal, B. (2000). Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. I: inhibition and detoxification. *Bioresource technology.*

38. Prior B.A. and Day D.F. 2008. Hydrolysis of Ammonia-pretreated Sugar Cane Bagasse with Cellulase, β -Glucosidase, and Hemicellulase Preparations. *Appl Biochem Biotechnol.* 146:151-164.
39. Ruiz, E., Cara, C., Manzanares, P., Ballesteros, M., Castro, E. 2008. Evaluation of steam explosion pre-treatment for enzymatic hydrolysis of sunflower stalks. *Enz. Microbial technol.* 42: 160-166.
40. Stephanopoulos, G., 2007. Challenges in engineering microbes for biofuel production. *Science* **315**, 801
41. Sung, Y., Cheng, J. 2002. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresour. Technol.* 83:1-11.
42. Zhao, H., Jones, C.L., Baker, G.A., Xia, S., Olubajo, O., Person, V.N. 2009. Regenerating cellulose from ionic liquids for an accelerated enzymatic hydrolysis. *J. Biotechnol.* 139: 47-54.
43. Wyman, C.E., 1994, Ethanol from lignocellulosic biomass: technology, economics and opportunities. *Bioresource Technology*, 50, 3-16.

VII.- DISCUSIÓN GENERAL

En el presente trabajo se determinó la composición de materiales sacarificables; celulosa y hemicelulosa, así como la cantidad de lignina que está contenida en el bagazo de agave *Tequilana* Weber procedente del proceso de elaboración de tequila con objeto de determinar si es conveniente o no utilizarlo como materia prima en la elaboración de bioetanol. Es importante conocer la cantidad de lignina ya que ésta actúa como barrera impidiendo la hidrólisis tanto química como enzimática y, por lo tanto, aumentando los requerimientos de enzimas y condiciones generales de hidrólisis. Por otra parte, la cantidad de lignina influye sobre el rendimiento general en la sacarificación del material. Los resultados sugieren un material lignocelulósico con alto potencial, al contener 62 % de material sacarificable y una cantidad de lignina baja (15 %), lo cual hace suponer hasta este momento una mayor facilidad de ataque para el rompimiento de los polímeros.

La sacarificación del material lignocelulósico se estudió primero con hidrólisis ácida utilizando ácido sulfúrico como catalizador. En un primer paso de hidrólisis química se tiene una conversión de 33 % en las condiciones óptimas encontradas de hidrólisis, se determinó que el polímero degradado fue la hemicelulosa y una mínima cantidad de celulosa ya que los hidrolizados presentaron un 92 % de pentosas. El residuo remanente del primer paso de hidrólisis, posteriormente fue sometido a un segundo paso de hidrólisis ácida para incrementar la conversión del material lignocelulósico y, lo más importante, la cantidad o concentración de azúcares fermentables en el hidrolizado. Los resultados bajo las mejores condiciones encontradas de hidrólisis químicas mostraron azúcares fermentables que representaron el 15 % de conversión adicional ya que dadas las condiciones drásticas del tratamiento, los azúcares que se producen también se degradan a subproductos. Para optimizar los resultados favoreciendo la obtención de azúcares fermentables se utilizó el método de superficie de respuesta, con un diseño de experimentos factorial completo 3^3 . Aún así, la máxima conversión que se logró fue de 47 % de sacarificación del material inicial en dos pasos de hidrólisis ácida, el cual se puede considerar regular. Por otra parte se observó que de los azúcares fermentables obtenidos en esta sección el 90 % está representado por xilosa (una pentosa) y están ampliamente documentadas las dificultades de canalizar pentosas mediante

fermentación hacia etanol, ya que la proporción de microorganismos nativos capaces de metabolizarlas es reducida al comparar con fermentadores de hexosas.

Debido a los resultados obtenidos en la hidrólisis ácida, se estudió el rompimiento de los polímeros mediante métodos biológicos, hidrólisis enzimática del bagazo de agave. Se utilizaron varias enzimas comerciales para tal objetivo, así también, se obtuvieron enzimas de un microorganismo nativo; *C. lindemuthianum* con las cuales se hicieron pruebas de digestión del material lignocelulósico.

Usando las enzimas comerciales se logró bajo las mejores condiciones un 51 % de conversión del material lignocelulósico en dos pasos consecutivos de hidrólisis; mientras que utilizando las enzimas obtenidas de *C. lindemuthianum* se obtuvo un 30 % como máximo. Se detectaron varios problemas que inhiben la acción de las enzimas; destacándose entre ellos la absorción de las mismas en el material lignocelulósico, sin embargo, será necesario aumentar los estudios tendientes a fortalecer el conocimiento de la acción de las enzimas en este residuo y poder mejorar los resultados, permitiendo reducir los costos de consumo de enzimas y, por consiguiente, reducir los costos haciendo viable la utilización de este método en la sacarificación del bagazo de agave.

Considerando que la hidrólisis química rompe el polímero de la hemicelulosa y con esto permite la apertura de la matriz lignocelulósica dejando expuesta la celulosa para el ataque enzimático, se considera un proceso con un paso de hidrólisis química seguida de una hidrólisis enzimática. De esta forma, se utilizó el residuo proveniente de la hidrólisis química y se llevó a digestión con las enzimas comerciales descritas y con las obtenidas en el laboratorio. Los resultados indicaron un aumento notorio de sacarificación en los tratamientos con las enzimas probadas. Lo anterior sugiere que la apertura de la matriz lignocelulósica es primordial para una eficiente sacarificación.

El arreglo de hidrólisis ácida seguida de hidrólisis enzimática aumentó el rendimiento total de sacarificación del bagazo de agave, pero igualmente importante, es la obtención de dos hidrolizados separados, uno con prevalencia de pentosas; (el hidrolizado ácido) y el otro con exclusivamente hexosas (el enzimático); con lo cual la fermentación se facilitó al no requerir de microorganismos modificados genéticamente que metabolizan pentosas y hexosas a la vez.

Para la fermentación de los hidrolizados se aisló una levadura que se encontró en el mismo material lignocelulósico que se denominó UM-5. Con esta levadura la fermentación de los

hidrolizados químicos que principalmente contienen pentosas, tuvieron un rendimiento del 50 %, un resultado importante para un microorganismo nativo; mientras que para el hidrolizado enzimático, el cual contiene glucosa exclusivamente, el rendimiento obtenido fue de 87 % en promedio. Estos resultados demuestran que el microorganismo nativo aislado UM-5 tiene buenas propiedades para metabolizar tanto pentosas como hexosas; sin embargo, será necesario incrementar los estudios con este microorganismo sobre todo en la fermentación de los hidrolizados ácidos lo que permitiría incrementar el rendimiento de la fermentación hasta un 16 % adicional. La secuenciación del ARN ribosomal 26S del microorganismo aislado UM-5 permitió su identificación correspondiendo al organismo *Pichia caribbica*.

Para la purificación del etanol obtenido se utilizó el método de desplazamiento del azeótropo con sales iónicas utilizando CaCl_2 y posterior paso por mallas moleculares, observándose que a partir de una concentración del 5 % de CaCl_2 se abre la curva de equilibrio etanol-agua, lo suficiente para que exista una disminución sensible de los requerimientos de platos teóricos para la separación por destilación. Sin embargo, al llegar a 95 %, nuevamente el aumento en platos teóricos requeridos se presenta, por lo cual se decide complementar la deshidratación utilizando mallas moleculares partiendo del 95 % hasta 99 % de acuerdo con los requerimientos.

De los resultados mostrados se puede concluir que el residuo lignocelulósico proveniente del proceso de elaboración del tequila puede convertirse a etanol eficientemente utilizando el proceso descrito en este documento quedando aún la posibilidad de mejorarlo en los temas ya mencionados.

Referencias

Asghari, A., R. J. Bothast, J. B. Doran, L. O. Ingram. 1996. Ethanol Production from Hemicellulose Hydrolysates of Agricultural Residues Using Genetically Engineered *Escherichia coli* strain K011. *Journal of Industrial Microbiology* 16:42-47.

Beery, K.E., Ladisch, M.R. 2001. Chemistry and properties of starch based desiccants. *Enzyme and Microbial Technology*.

Carmo, M.J. and Gubulin, J.C. 1997. Ethanol-water separation in the PSA Process. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*. 4: 3.

Caulfield, D.F., Moore, W.E. 1974. Effect of varying crystallinity of cellulose on enzymic hydrolysis. *Wood Science* 6: 375.

CRESESB/UFPE/CHESF. Atlas solarimétrico. Centro de Referencia para Energía Solar y Eólica. Sérgio de Salvo Brito (Cresesb), Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) y Companhia Hidroelétrica do São Francisco (Chesf). Recife: UFPE, 2000.

Dekker, R.F.H. 1988. Steam Explosion: An Effective Pretreatment Method for use in the Bioconversion of Lignocellulosic Materials. In B. Focher, A. Marzetti and V. Crescenzi (Eds.) *Proceedings of The International Workshop on Steam Explosion Techniques: Fundamentals and Industrial Applications*: 277-305.

Dekker, R.F.H., Wallis, A.F.A. 1983. Enzymic Saccharification of Sugarcane Bagasse Pretreated by Autohydrolysis-Steam Explosion. *Biotechnology and Bioengineering* 25:3027-3048.

Dubey, V., Pandey, L.K., Saxena, C. 2005. Pervaporative separation of ethanol/water azeotrope using a novel chitosan-impregnated bacterial cellulose membrane and... *Journal of Membrane Science*.

Fan, L.T., Lee, Y.H., Beardmore, D.H. 1980. Mechanism of the Enzymatic Hydrolysis of Cellulose: Effects of Major Structural Features of Cellulose on Enzymatic Hydrolysis. *Biotechnology and Bioengineering* 22:177-199.

Goldstein, I. S. 1983. Acid Processes for Cellulose Hydrolysis and Their Mechanisms. In E. J. Soltes (Ed.) *Wood and Agricultural Residues*. 315-328.

Grous, W. R., A. O. Converse, H. E. Grethlein. 1986. Effect of Steam Explosion Pretreatment on Pore Size and Enzymatic Hydrolysis of Poplar. *Enzyme Microb. Tech.* 8.

Horta, L. A. Perspectivas de un programa de biocombustibles en América Central. Ciudad de México: Proyecto Cepal/GTZ Uso Sustentable de Hidrocarburos, Comisión Económica para América Latina y el Caribe, 2004.

_____. Costos y precios para etanol en Centro América. Ciudad de México: Proyecto Cepal/ Gobierno de Italia, Comisión Económica para América Latina y el Caribe, 2006a.

_____. Ethanol as fuel in Brazil (small distilleries and use of ethanol as cooking fuel). Belo Horizonte: Projeto Gaia, Winrock Foundation e Banco do Povo, 2006b.

_____. Biocombustíveis na América Latina: situação atual e perspectivas. São Paulo: Cadernos do Memorial da América Latina, 2007.

_____. Sustainable woodfuel production in Brazil. Roma: Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2008.

Hoogwijk, M., Faaij, A., van den Broek, R., Berndes, G., Gielen, D., Turkenburg, W. 2003. Exploration of the ranges of the global potential of biomass for energy. *Biomass Bioenergy* 25(2):119–133

Iliuta, M.C., Thyron, F.C., 1996. Salt effects on vapour-liquid equilibrium of acetone-methanol system. *Fluid Phase Equilibria*.

Ingram, L.O., Conway, T., Clark, D.P., Sewell, G.W., Preston, J.F. 1987. Genetic Engineering of Ethanol Production in *Escherichia coli*. Applied Environmental Microbiology 53(10): 2420-2425

Ingram, L.O., Aldrich, H.C., Borges, A.C.C., Causey, T.B., Martinez, A., Morales, F., Saleh, A., Underwood, S.A., Yomano, L.P., York, S.W., Zaldivar, J., Zhou, S. 1999. Enteric Bacterial Catalysts for Fuel Ethanol Production. Biotechnology Progress 15(5):855-866.

Jiraratananon, R., Chanachai, A., Huang, R.Y.M. 2002. Pervaporation dehydration of ethanol-water mixtures with chitosan/hydroxyethylcellulose (CS/HEC) composite membranes -... Journal of Membrane Science.

Joseph Jr., H. Ethanol fuel: vehicular application technology. São Paulo: Anfavea, Energy and Environment Division, 2005.

_____. Flex fuel technology in Brazil. São Paulo: Anfavea, Energy and Environment Division, 2007.

Kanti, P., Srigowri, K., Madhuri, J., Smitha, B., Sridhar, S. 2004. Dehydration of ethanol through blend membranes of chitosan and sodium alginate by pervaporation. Separation and Purification Technology.

Kupiec, K., Rakoczy, J., Zieliński, L., Georgiou, A. 2008. Adsorption–Desorption Cycles for the Separation of Vapour-phase Ethanol/Water Mixtures. Adsorption Science and Technology. 26: 209-224.

Lehninger, A. Nelson D. L., Cox, M.M. Principios de la Bioquímica Ed. Omega. 4ta edición, 2005.

Lelkes, Z, Lang, P., Modla, G., Benadda, B. 2000. Homoazeotropic distillation of maximum azeotropes in a batch rectifier with continuous entrainer feeding. Computers and Chemical Engineering

Ligero, E.L., Ravagnani, T.M.K., 2003. Dehydration of ethanol with salt extractive distillation – a comparative analysis between processes with salt recovery. *Chemical Engineering and Processing*.

Lin, Y. Tanaka, S. 2006. Ethanol fermentation from biomass resources: current state and prospects. *Appl Microbiol Biotechnol*.

Lindsay, S. E., Bothast, R.J., Ingram, L.O. 1995. Improved Strains of Recombinant *Escherichia coli* for Ethanol Production from Sugar Mixtures. *Applied Microbiology and Biotechnology* 43:70-75.

Lodish, *Biología celular y molecular*. 5ª ed. 2005

Maciel, M., Brito, R.P. 1995. Evaluation of the dynamic behavior of an extractive distillation column for dehydration of aqueous ethanol mixtures *Computers and Chemical Engineering*

Mandels M, Medeiros JE, Andreotti RE, Bissett FH. 1981. Enzymatic hydrolysis of cellulose: Evaluation of cellulose culture filtrates under use conditions. *Biotechnol Bioeng* 23: 2009-2026.

McMillan, J. D., M. M. Newman. 1995. Experimental Protocols for Assessing the Toxicity of Hemicellulose Hydrolyzates Using *Zymomonas mobilis* CP4 (pZB5) and *Saccharomyces cerevisiae* D5A. Draft. Chemical Analysis and Testing Standard Procedure. NREL, Alternative Fuels Division.

Millichip RJ, Doelle HW (1989) Large-scale ethanol production from Milo (Sorghum) using *Zymomonas mobilis*. *Process Biochem* 24:141–145.

Nidetzky, B., W. Steiner, M. Claeysens. 1995. Synergistic Interaction of Cellulases from *Trichoderma reesei* During Cellulose Degradation. In J. N. Saddler, M. H Penner (Eds.),

Enzymatic Degradation of Insoluble Carbohydrates: 90-112. American Chemical Society, Washington, D.C.

Pimentel, D., Moran, M.A., Fast, S., Weber, G., Bukantis, R., Balliett, L., Boveng, P., Cleveland, C., Hindman, S. and Young, M. 1980. Biomass Energy from Crop and Forest. *Residues Science*: 212: 1110 – 1115.

Pimentel, D. and Patzek, T. W. 2005. Ethanol production using corn, switchgrass, and wood; biodiesel production using soybean and sunflower. *Natural Resources Research*, v. 14 (1).

Pinto, R., Maciel, W. 2000. Saline extractive distillation for ethanol purification. *Computers and Chemical Engineering*.

Saddler, J. N., H. H. Brownell, L. P. Clermont, N. Levitin. 1982. Enzymatic Hydrolysis of Cellulose and Various Pretreated Wood Fractions. *Biotechnology and Bioengineering* 26: 1289-1402.

Saddler, J. N., C. Hogan, M. K. –H. Chan, G. Louis-Seize. 1982. Ethanol Fermentation of Enzymatically Hydrolysed Pretreated Wood Fractions Using *Trichoderma* cellulases, *Zymomonas mobilis*, and *Saccharomyces cerevisiae*. *Canadian Journal of Microbiology* 28: 1311-1319.

Sprenger, G.A. 1996. Carbohydrate metabolism in *Zymomonas mobilis*: a catabolic highway with some scenic routes. *FEMS Microbiol Lett* 145:301–307.

Sun, N., Okoye, Ch., Niu, C. and Hui Wang, H. 2007. Adsorption of Water and Ethanol by Biomaterials. *Internacional Journal of Green Energy*. 4: 623-634.

Tsuyumoto, M., Teramoto, A., Meares, P. 1997. Dehydration of ethanol on a pilot-plant scale, using a new type of hollow-fiber membrane. *Journal of Membrane Science*

Weimer, P. J., Hackney, J.M., French. A.D. 1995. Effects of Chemical Treatments and Heating on the Crystallinity of Celluloses and their Implications for Evaluating the Effect of Crystallinity on Cellulose Biodegradation. *Biotechnology and Bioengineering* 48:169-178.