



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO

FACULTAD DE QUÍMICO FARMACOBIOLOGÍA

“Estudio de la producción de bioetanol mediante diferentes
procesos de fermentación utilizando una levadura
termotolerante”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICO FARMACOBIOLOGO

PRESENTA:
ARIEL JOAQUÍN RAMÍREZ URIBE

ASESOR:
Doctor en Ciencias Biológicas:
ALFREDO SAAVEDRA MOLINA

CO-ASESOR:
Maestro en Ciencias en Biología Experimental:
JORGE ARTURO MEJÍA BARAJAS

Morelia Mich., enero de 2017



DEDICATORIA

A mi madre Rosario Uribe Prisco...

A mi hermano Ronnie D. Ramírez Uribe...

A mi padre Darío J. Ramírez Rodríguez...

A mi novia Carla Reyes Benítez...

A mis amigos y Asesores...

“Ad astra per aspera”

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

A mi Asesor Dr. Alfredo Saavedra Molina, por su asesoría y por brindarme la oportunidad y el apoyo para llevar a cabo mi proyecto de investigación.

A mi Co-asesor Jorge Arturo Mejía Barajas por su asesoría, sus enseñanzas, la paciencia y el apoyo durante el proyecto.

A Mónica Clemente Guerrero, técnico de laboratorio, por el apoyo que me brindó durante el proyecto y mi estadía.

Al Comité Revisor por su tiempo y recomendaciones.

A mi familia por su cariño y apoyo en todo momento.

Gracias totales.

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

A la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, en especial a la Facultad de Químico Farmacobiología y a los buenos maestros que fueron parte importante de mi formación académica.

Al instituto de Investigaciones Químico-Biológicas, especialmente al Laboratorio de Bioquímica.

Al Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco por su colaboración y apoyo durante el proyecto.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE FIGURAS _____	III
ÍNDICE DE TABLAS _____	III
RESUMEN _____	1
ABSTRACT _____	2
1..INTRODUCCIÓN _____	3
1.1. Combustibles fósiles y sus repercusiones _____	3
1.2. Biocombustibles _____	3
1.3. Etanol como biocombustible _____	4
1.4. Generación de Bioetanol _____	4
1.4.1. Bioetanol de primera generación _____	4
1.4.2. Bioetanol de segunda generación _____	5
1.5. Composición química de la biomasa lignocelulósica _____	5
1.5.1. Composición química de la celulosa _____	6
1.5.2. Composición química de la hemicelulosa _____	6
1.5.3. Composición química de la lignina _____	7
1.6. Residuos agroindustriales como biomasa lignocelulósica para la producción de bioetanol _____	8
1.6.1. Residuos agroindustriales en México destinados a la producción de bioetanol _____	9
1.6.2. Producción de bioetanol en México y sus perspectivas _____	10
1.6.3. Bagazo de agave y su potencial biotecnológico _____	11
1.7. Obtención de bioetanol a través de los procesos de sacarificación fermentación separada y sacarificación fermentación simultánea _____	12
1.7.1. Pretratamiento de la biomasa lignocelulósica _____	12
1.7.1.1. Reducción de la cristalinidad de la celulosa _____	12
1.7.1.2. Aumento del área de superficie _____	12
1.7.1.3. Hidrólisis de la hemicelulosa _____	13
1.7.1.4. Eliminación de la lignina _____	13
1.7.1.5. Tipos de pretratamiento _____	14
1.7.2. Detoxificación de la biomasa lignocelulósica _____	16
1.7.3. Sacarificación enzimática _____	16
1.7.3.1. Celulasas empleadas en el proceso de sacarificación enzimática _____	16
1.7.3.2. Mecanismo de acción enzimático _____	17

1.7.3.3. Complejos enzimáticos comerciales	18
1.7.4. Fermentación alcohólica aplicada a la producción de bioetanol	18
1.7.4.1. Microorganismos empleados en el proceso fermentativo para generar bioetanol	19
1.8. Sacarificación fermentación separada	20
1.9. Sacarificación fermentación simultánea	21
1.9.1. Levaduras termotolerantes	21
1.9.1.2. Principales especies de levaduras termotolerantes utilizadas en sacarificación fermentación simultánea	21
2. JUSTIFICACIÓN	23
3. HIPÓTESIS	23
4. OBJETIVOS	24
4.1. Objetivo general	24
4.2. Objetivos particulares	24
5. MATERIALES Y MÉTODOS	25
5.1. Materiales	25
5.1.1. Material biológico	25
5.1.2. Reactivos	25
5.2. Métodos	25
5.2.1. Análisis composicional del bagazo de agave	25
5.2.2. Hidrólisis termo-ácida del bagazo de agave	25
5.2.3. Determinación de azúcares reductores	26
5.2.4. Hidrólisis enzimática del bagazo de agave	26
5.2.5. Análisis de los compuestos de las muestras hidrolizadas por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC)	26
5.2.6. Sacarificación fermentación separada (SHF) y sacarificación fermentación simultánea (SSF) de los hidrolizados del bagazo de agave	26
6. RESULTADOS	28
6.1. Análisis composicional del bagazo de agave (BA)	28
6.2. Hidrólisis termo-ácida del BA	28
6.3. Análisis mediante HPLC de la fracción líquida después de la hidrólisis termo-ácida del BA	30
6.4. Hidrólisis enzimática del BA después del pretratamiento termo-ácido	30
6.5. Análisis mediante HPLC de la fracción líquida después de la hidrólisis enzimática del BA	32
6.6. Análisis de productos de los procesos de fermentación del BA	34
7. DISCUSIÓN	35

8. CONCLUSIÓN	38
9. PERSPECTIVAS	38
10. REFERENCIAS	39

ÍNDICE DE FIGURAS

<i>Figura 1.</i> Representación estructural de las microfibrillas compuestas por un esqueleto de celulosa y envueltas por hemicelulosa y lignina.	5
<i>Figura 2.</i> Estructura química de la celulosa	6
<i>Figura 3.</i> Representación de la estructura química de la hemicelulosa.	7
<i>Figura 4.</i> Representación de la estructura química de la lignina.	8
<i>Figura 5.</i> Representación de las regiones cristalinas y amorfas de la celulosa.	13
<i>Figura 6.</i> Esquema de la hidrólisis enzimática.	17
<i>Figura 7.</i> Esquema de la ruta de Embdem-Meyerhof-Parnas.	20
<i>Figura 8.</i> Efecto del pretratamiento termo-ácido en la liberación de los azúcares reductores del BA	29
<i>Figura 9.</i> Azúcares liberados en la fracción soluble antes y después del pretratamiento termo-ácido del BA.	30
<i>Figura 10.</i> Azúcares reductores totales generados durante la hidrólisis enzimática del BA pretratado con H_2SO_4	32
<i>Figura 11.</i> Azúcares presentes en la fracción soluble después del pretratamiento termo-ácido e hidrólisis enzimática del BA a las 48 h utilizando una concentración de 1.5 g de enzima/g de BA (peso seco).	33

ÍNDICE DE TABLAS

<i>Tabla 1.</i> Residuos agroindustriales que han sido utilizados para producir bioetanol.	9
<i>Tabla 2.</i> Composición lignocelulósica de residuos agroindustriales de importancia en México.	10
<i>Tabla 3.</i> Estudios realizados para la producción de bioetanol con levaduras termotolerantes mediante SSF con residuos agroindustriales.	22
<i>Tabla 4.</i> Composición lignocelulósica del BA antes y después de la hidrólisis ácida.	28
<i>Tabla 5.</i> Porcentaje de azúcares teórico liberados después del pretratamiento ácido y la hidrólisis enzimática del BA.	33
<i>Tabla 6.</i> Productos de los procesos de fermentación del BA.	34



RESUMEN

El uso de biocombustibles como el bioetanol, puede ser una alternativa de energía biorrenovable que reduzca en gran medida la dependencia de combustibles fósiles. Los residuos lignocelulósicos y las levaduras termotolerantes han sido aplicados en la producción de bioetanol, para lo cual, se han propuesto diversos procesos tales como la sacarificación fermentación separada (SHF) y sacarificación fermentación simultánea (SSF), de estos procesos se considera que la SSF presenta un mayor potencial para la producción de bioetanol. En este estudio se utilizó el bagazo de agave (BA) proveniente de la planta *Agave tequiliana* Weber, para llevar a cabo el proceso de SSF y SHF. El BA fue expuesto a un tratamiento termo-ácido y posteriormente a una hidrólisis enzimática utilizando diferentes complejos enzimáticos comerciales (CTec2, HTec2 y Rapidaza). Estos procesos permitieron la liberación de los azúcares del BA en un 65%. Después de este tratamiento, se utilizaron las fracciones sólidas y solubles para llevar a cabo los dos procesos de fermentación a 40°C, utilizando la levadura termotolerante *Kluyveromyces marxianus* SLP1, y como comparación las levaduras no termotolerantes *K. marxianus* OFF1 y la levadura industrial *Saccharomyces cerevisiae* Ethanol Red. Una vez realizados los procesos, se analizó el rendimiento de la producción de bioetanol, así como la generación de glicerol. La mayor concentración de bioetanol obtenida (10 g/L), fue mediante el uso de las levaduras *K. marxianus*, ambas en el proceso de SSF; por otro lado la levadura *S. cerevisiae* Ethanol Red, presentó una máxima producción de bioetanol de 9 g/L, lo anterior mediante el proceso de SHF. Con estos resultados se observa el potencial uso de la levadura termotolerante SLP1 para la producción de bioetanol mediante el proceso de SSF.

Palabras Clave: (Bioetanol, levadura termotolerante, residuo lignocelulósico, sacarificación fermentación separada, sacarificación fermentación simultánea, *Agave tequiliana* Weber).



ABSTRACT

The use of biofuels such as bioethanol, can be an alternative of biorenewable energy which will greatly reduce dependence on fossil fuels. Lignocellulosic residues and thermotolerant yeasts have been applied in the production of bioethanol, for which, have been proposed various processes such as separate hydrolysis and fermentation (SHF) and simultaneous saccharification and fermentation (SSF), of these processes, it is considered that the SSF has the greatest potential for production of bioethanol. In this study was utilized agave bagasse (AB) from the plant *Agave tequiliana* Weber, to carry out the process of SSF and SHF. The (AB) it was exposed to thermo-acid treatment and subsequent to enzymatic hydrolysis using different commercial enzyme complexes (CTec2, HTec2 and Rapidase). These processes allow the release of sugars from BA by 65%. After this treatment the solid and soluble fractions were used to carry out both fermentation processes at 40°C, using the thermotolerant *Kluyveromyces marxianus* SLP1 yeast, and comparing with two non thermotolerant yeasts, *K. marxianus* OFF1 and the industrial yeast *Saccharomyces cerevisiae* Ethanol Red. Once the process performance, was analyzed the production of bioethanol and the generation of glycerol. The highest concentration of bioethanol obtained (10 g/L) were using *K. marxianus* yeasts, both in the SSF process; on the other hand the *S. cerevisiae* Ethanol Red yeast, presented a maximum production of bioethanol of 9 g/L, by process of SHF. With these results the potential use of thermotolerant yeast SLP1 for bioethanol production by SSF process is observed.

Keywords: (Bioethanol, thermotolerant yeast, lignocellulosic residues, separate hydrolysis and fermentation, simultaneous saccharification and fermentation, *Agave tequiliana* Weber).



1. INTRODUCCIÓN

En la actualidad, la contaminación atmosférica producida por diversos factores, entre los cuales se encuentra el uso de combustibles fósiles, contribuye de manera importante a la emisión de gases tóxicos que repercuten en la salud, la generación de gases de efecto invernadero, el cambio climático y la explotación y destrucción de ecosistemas (García *et al.*, 2013). Estas repercusiones ambientales, aunadas a los altos precios del petróleo, la alta demanda de combustible, el agotamiento de las reservas de combustibles fósiles, y el crecimiento industrial y tecnológico, han contribuido a que la biotecnología centre su interés en el desarrollo de nuevas alternativas de energía biorrenovable (Dufey, 2006; Awasthi *et al.*, 2015). El uso de biocombustibles como el bioetanol, puede ser una alternativa de energía biorrenovable que reduzca en gran medida el impacto medio ambiental causado por el empleo de combustibles fósiles (Gonçalves *et al.*, 2011).

1.1. Combustibles fósiles y sus repercusiones

Los combustibles fósiles tales como el petróleo, carbón y gas natural son los combustibles más utilizados actualmente, generando serias repercusiones económicas, sociales y ambientales (World Energy Council, 2013). Algunas de estas repercusiones son la generación de gases de efecto invernadero tales como dióxido de carbono, metano, óxido nitroso, hidrofluoruro de carbono y hexafluoruro de azufre. La generación de estos gases son los responsables del cambio climático, fenómeno que se ha intensificado en las últimas décadas debido al uso desmedido de los combustibles fósiles (Intergovernmental Panel on Climate Change, 2007). La emisión de estos gases también puede generar repercusiones en la salud (Awasthi *et al.*, 2015). Por otro lado, la cuestión de la seguridad energética es una prioridad ya que la volatilidad de los precios del petróleo y su distribución desigual, ha llevado a muchos países a depender de la importación del petróleo para sustentar sus necesidades energéticas provocando una inestabilidad económica (Dufey, 2006; German Advisory Council on Global Change, 2009).

1.2. Biocombustibles

El término biocombustible se define como todo recurso energético que ha sido procesado por el ser humano mediante diversos procesos tecnológicos a partir de biomasa, y cuya finalidad es liberar la energía contenida en sus componentes químicos mediante una reacción de combustión (United Nations Conference on Trade and Development, 2008; Álvarez, 2009). El término biomasa hace referencia a toda materia orgánica reciente y biodegradable proveniente de seres vivos (Serna *et al.*, 2011). La utilización de biocombustibles reduce el impacto de los combustibles fósiles al medio ambiente, disminuyendo la emisión de gases de efecto invernadero debido al ciclo de vida de estos mismos, ya que el dióxido de carbono absorbido por las materias primas (biomasa) durante su cosecha y crecimiento, es el mismo que se libera en la combustión de los biocarburantes y se reabsorbe durante la generación nuevamente de biomasa, sin producir así un aumento en las emisiones de dióxido de carbono (García *et al.*, 2013). Con este denominado ciclo neutro del carbono se estima que los biocombustibles pueden reducir incluso en un 80% las emisiones globales de dióxido de carbono a la atmósfera, en comparación con los biocombustibles fósiles (Ashfaq *et al.*, 2015). El uso de biocombustibles contribuye a



superar la deficiencia energética en países donde no existen reservas de combustible fósil, por lo que representa una oportunidad para abrir un nuevo mercado competente dentro de diferentes industrias diversificando la economía de estos países (García *et al.*, 2013).

1.3. Etanol como biocombustible

El bioetanol es considerado como la alternativa de combustible renovable con mayor potencial para sustituir a los combustibles fósiles en la actualidad (Baeyens *et al.*, 2015). La producción de bioetanol ha tenido un mayor crecimiento en comparación con otros biocombustibles tales como el biodiesel (USDA, 2015), representando el proceso fermentativo industrial de mayor crecimiento con una producción de 85.2 billones de litros de etanol en el año 2012 (Renewable fuels association, 2012). El creciente uso del bioetanol fue influenciado debido a acuerdos internacionales cuyas reglamentaciones obligaban a distintos países a introducir el uso de biocombustibles en su economía. Los protocolos que principalmente influyeron en el uso de los biocombustibles fueron el programa PROALCOOL (1975) en Brasil, el Protocolo de Montreal (1987), el protocolo de Kyoto (1997), y el protocolo de Copenhague (2009), cuya principal finalidad era la de incluir un determinado porcentaje de bioetanol a la gasolina convencional (Gonçalves *et al.*, 2011). Los países líderes en la producción de bioetanol hasta nuestros días son Estados Unidos y Brasil, sin embargo, la tendencia se ha expandido a otros países tales como China, Argentina y la Unión Europea (Awasthi *et al.*, 2015; USDA, 2015). El bioetanol es el mejor biocombustible, ya que es un buen sustituto del combustible convencional para motores de combustión moderna debido a que tiene un alto número de octano, tiende a tener una menor pérdida por la evaporación en comparación con la gasolina, y la molécula de oxígeno en su estructura química permite la combustión a una baja temperatura (Ashfaq *et al.*, 2015; Awasthi *et al.*, 2015).

1.4. Generación de Bioetanol

La obtención del etanol se lleva a cabo mediante la fermentación de los azúcares contenidos en la biomasa, sin embargo, el rendimiento y el costo del bioetanol producido puede variar considerablemente en función de las características de la biomasa, ya que tanto el porcentaje de azúcares que se encuentre presente en ésta, así como la estructura química misma de estos azúcares, influirá de manera importante en el proceso fermentativo y los procesos tecnológicos empleados (Awasthi *et al.*, 2015). Es por esta razón que se ha clasificado al bioetanol en dos generaciones, de acuerdo a las materias primas o a las tecnologías utilizadas para su obtención.

1.4.1. Bioetanol de primera generación

Podemos definir al bioetanol de primera generación como aquel que se obtiene a través de la fermentación de azúcares simples, utilizando como materia prima insumos alimenticios tales como caña de azúcar, remolacha y sorgo, principalmente (FAO, 2008; Serna *et al.*, 2011). En la actualidad los insumos alimenticios más utilizados para producir bioetanol de primera generación son la caña de azúcar en Brasil, y el maíz en Estados Unidos (USDA, 2015). Una de las desventajas de utilizar insumos alimenticios como materia prima para la producción de bioetanol de primera generación, es la competencia generada con la industria alimenticia, lo cual puede incrementar los precios de los alimentos, por lo que una alternativa es la producción de bioetanol de segunda generación (Saval, 2012).

1.4.2. Bioetanol de segunda generación

El bioetanol de segunda generación es aquel que es obtenido utilizando como sustrato biomasa lignocelulósica, la cual se encuentra presente en una variada serie de materiales forestales, residuos agroindustriales, residuos provenientes de la silvicultura y las partes orgánicas de desechos municipales (FAO, 2008; Serna *et al.*, 2011). La composición química de esta clase de materiales está constituida principalmente por polisacáridos complejos que no pueden ser aprovechados durante la fermentación, es por esta razón que el bioetanol de segunda generación requiere de un pretratamiento químico y/o enzimático cuya finalidad es liberar los azúcares contenidos en estas estructuras antes de poder ser fermentados (Mussatto y Teixeira, 2010). Existen diversas ventajas en la producción de bioetanol de segunda generación; una de estas ventajas es el uso de productos de desecho provenientes de diversas industrias, obteniendo materia prima a muy bajo precio, a su vez son eliminados productos de desecho que pueden ser potencialmente contaminantes (Saval, 2012); otra ventaja es que esta clase de materia prima al no competir con la industria alimenticia, no contribuye a la elevación en el costo de los alimentos, además de que su manipulación y conservación es más eficiente y económica en comparación con el manejo de los insumos alimenticios (FAO, 2008). El gran obstáculo al que se enfrenta la producción de bioetanol de segunda generación es la inversión tecnológica que debe emplearse para dar tratamiento a la materia prima, ya que debido a su composición química no puede ser directamente utilizada para la producción de bioetanol, generando que este proceso aún no sea económicamente rentable (Saval, 2012).

1.5. Composición química de la biomasa lignocelulósica

La biomasa lignocelulósica es un término que es utilizado para referirse a los tres principales componentes que se encuentran presentes en las plantas: celulosa, hemicelulosa y lignina (Gonçalves *et al.*, 2011). La biomasa lignocelulósica posee dos importantes atributos que la transforman en un excelente sustrato para producir bioetanol, ser tanto biorrenovable como biodegradable, y ser una de las fuentes de materia orgánica más abundante en la Tierra (Abril y Abril, 2009). En términos generales, podemos definir a la celulosa, a la hemicelulosa y a la

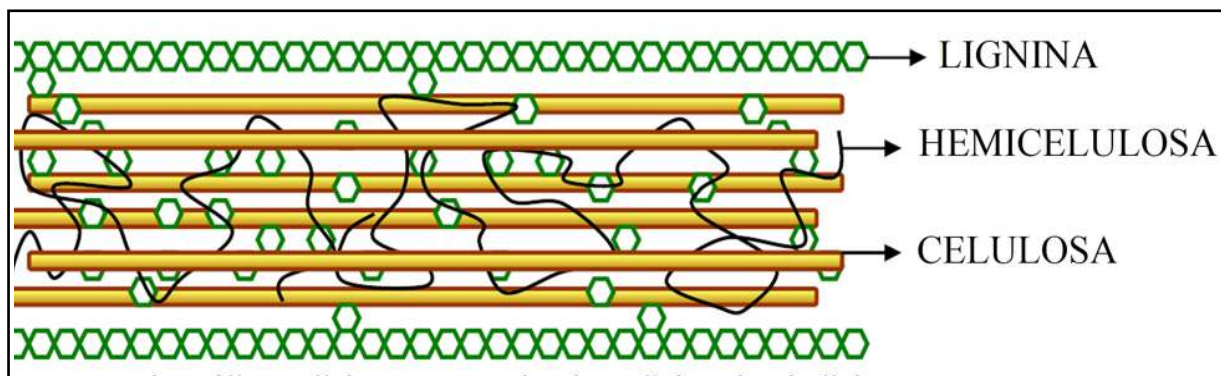


Figura 1. Representación estructural de las microfibrillas compuestas por un esqueleto de celulosa y envueltas por hemicelulosa y lignina (Figura tomada de Mussatto y Teixeira, 2010).

lignina como polímeros orgánicos de alto peso molecular, los cuales se encuentran estrechamente relacionados entre sí (Mussatto y Teixeira, 2010). Al interaccionar por medio de fuerzas moleculares son capaces de formar una compleja estructura denominada microfibrilla, la cual es la unidad fundamental responsable de dar soporte y rigidez a la pared celular de las plantas (*Figura 1*), además de funcionar como una barrera protectora ante la presencia de organismos patógenos (Silveira *et al.*, 2014). La celulosa, hemicelulosa y lignina representan hasta un 75% del total de la biomasa lignocelulósica (Abril y Abril, 2009). La celulosa es la fracción mayoritaria de la pared celular de la planta y corresponde a un 35 a 50%, seguido por la hemicelulosa con un 20 a 35% y finalmente la lignina con un 10 a 25%, no obstante, la proporción de estos componentes depende en gran medida de la especie vegetal de la que proviene la biomasa, así como del procesamiento industrial que se le ha dado (Mussatto y Teixeira, 2010).

1.5.1. Composición química de la celulosa

La celulosa o β -1,4-glucano (*Figura 2*) es un homopolisacárido, es decir que está constituida únicamente por moléculas de glucosa (8000 a 12000 unidades) unidas de forma lineal a través de enlaces 1,4- β glicosídicos. La unión de dos moléculas de glucosa a su vez forma un disacárido conocido como celobiosa (Mussatto y Teixeira, 2010; Gonçalves *et al.*, 2011). La celulosa forma parte esencial de las microfibrillas, las cuales están conformadas principalmente por 36 cadenas de celulosa a través de enlaces de puente de hidrógeno y fuerzas de Van der Waals (Mussatto y Teixeira, 2010; Silveira *et al.*, 2014). Los puentes de hidrógeno entre las cadenas de celulosa de las microfibrillas se disponen de manera paralela formando una estructura altamente cristalina en sus regiones, lo que la vuelve menos soluble y le otorga mayor resistencia a tratamientos químicos (Taherzadeh y Karimi, 2008).

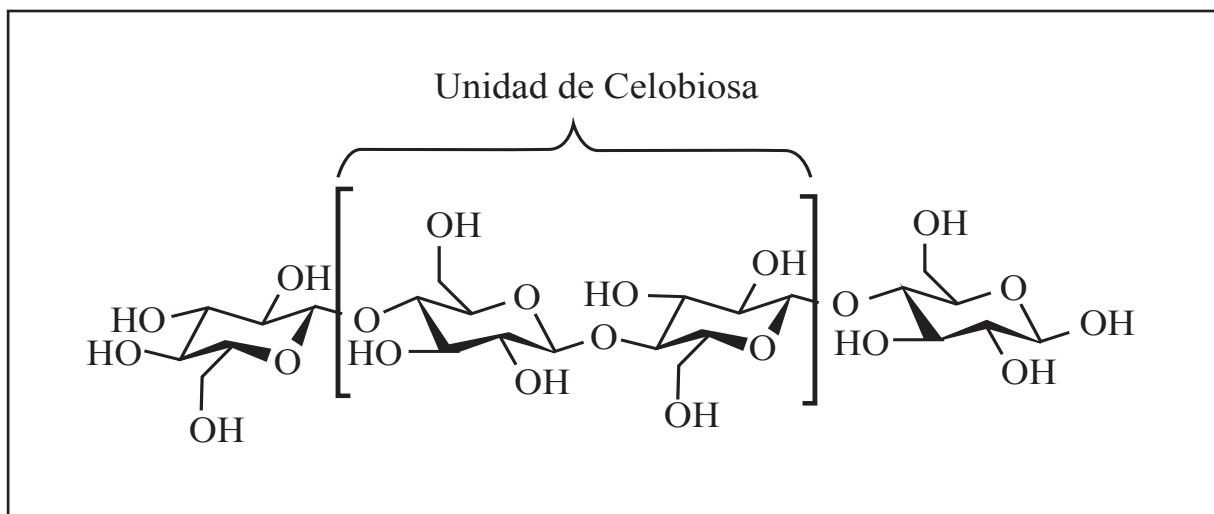


Figura 2. Estructura química de la celulosa. Moléculas de glucosa unidas por enlaces β -1,4-Glicosídicos (Figura tomada de Olsson y Westman, 2013).

1.5.2. Composición química de la hemicelulosa

La hemicelulosa es un heteropolisacárido complejo, que puede estar compuesto de diferentes azúcares tales como lactosa, manosa, xilosa, arabinosa, galactosa y glucosa, no obstante, pueden estar presentes en su estructura algunos ácidos orgánicos tales como el ácido acético, glucurónico,

hialurónico y ferúlico (Mussatto y Teixeira, 2010; Gonçalves *et al.*, 2011). La hemicelulosa (*Figura 3*) a diferencia de la celulosa es una estructura altamente ramificada, sin embargo, estas ramificaciones surgen de una estructura lineal que está compuesta del mismo azúcar, es por esta razón que se clasifican de acuerdo al azúcar que forma la cadena principal, teniendo así algunos de los siguientes heteropolisacáridos: xilanos, glucanos, mananos, arabinanos, xiloglucanos, arabinoxilanos, glucoronoarabinoxilano, glucomanano, galactomananos, galactoglucomanano y glucanos (Mussatto y Teixeira, 2010; Gonçalves *et al.*, 2011); de los anteriores los xiloglucanos, mananos y glucoronoarabinoxilanos son los más abundantes dentro del material lignocelulósico (Silveira *et al.*, 2014). Otra característica de la hemicelulosa es que su cadena tiene una longitud mucho menor que la celulosa ya que poseen un número no mayor a 200 unidades del azúcar (Gonçalves *et al.*, 2011). La función principal de la hemicelulosa dentro de la planta es la de formar una red molecular que envuelve y refuerza las microfibrillas formadas por las cadenas de celulosa al interactuar con ellas (Silveira *et al.*, 2014). La manera en la que se ramifican los azúcares de la hemicelulosa le confieren una estructura amorfa lo que la hace susceptible a tratamientos químicos (Fengel y Wegener, 1984).

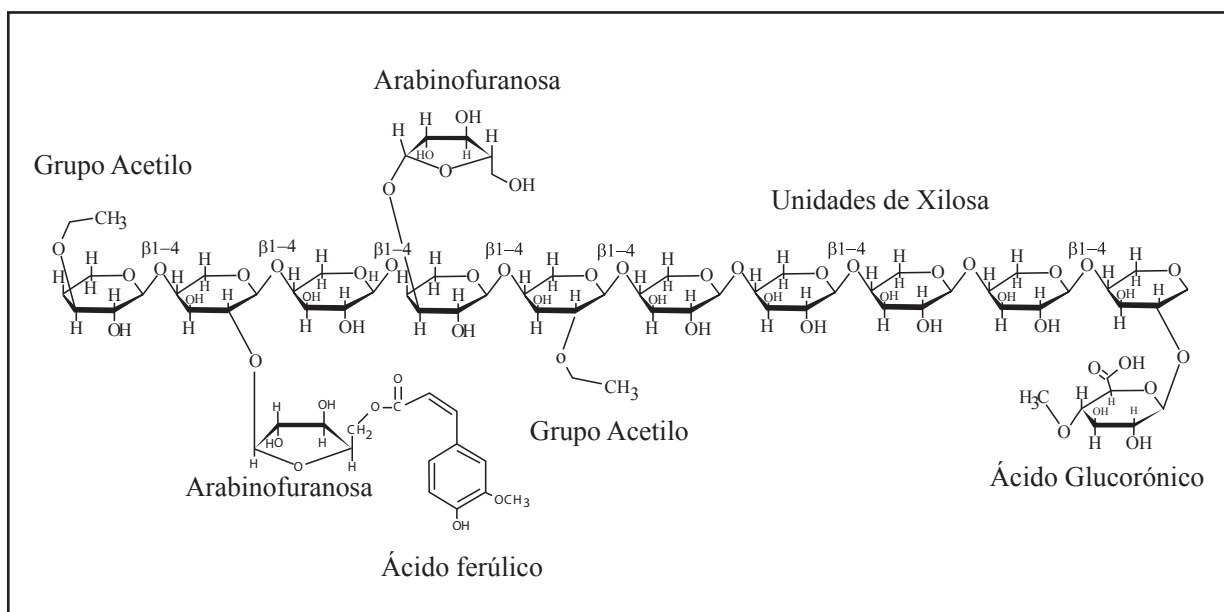


Figura 3. Representación de la estructura química de la hemicelulosa, donde la cadena lineal está compuesta por moléculas de xilosa (Figura modificada de Mussato y Teixeira, 2010).

1.5.3. Composición química de la lignina

La lignina es un polímero fenólico (*Figura 4*) que a diferencia de la hemicelulosa y la celulosa no se encuentra conformada por azúcares, sino que está conformada por unidades de fenilpropano. Los monómeros que forman esta compleja estructura son tres alcoholes fenilpropílicos: cumarílico, coniferílico y sinapílico (Mussatto y Teixeira, 2010). La lignina es el último componente que conforma la estructura de las microfibrillas y su principal función es conferir rigidez y cohesión a la pared celular de las plantas, además de fungir como una barrera fisicoquímica ante el ataque microbiano (Mussatto y Teixeira, 2010). La lignina, debido a la estabilidad de su estructura

química es un compuesto altamente recalcitrante (Taherzadeh y Karimi, 2008).

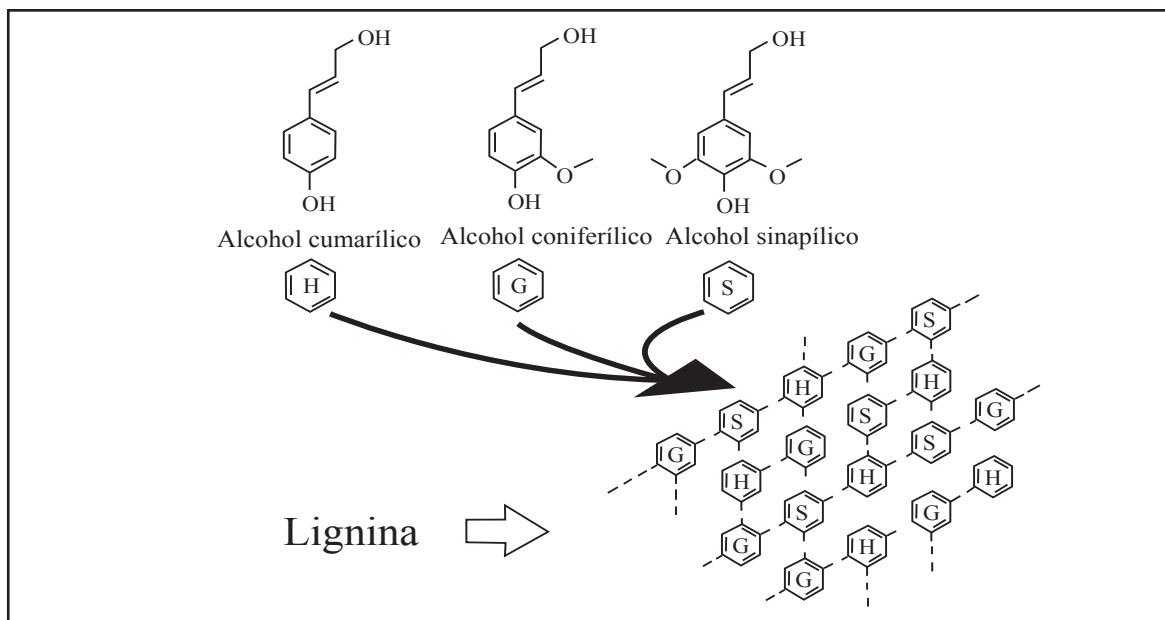


Figura 4. Representación de la estructura química de la lignina y sus tres principales componentes: Alcohol cumarílico, alcohol coniferílico y alcohol sinapílico (Figura tomada de Rubin, 2008).

1.6. Residuos agroindustriales como biomasa lignocelulósica para la producción de bioetanol

Los residuos agroindustriales son un material lignocelulósico que ha sido mayormente utilizado para la producción de bioetanol debido a su accesibilidad, alta cantidad en la que se genera (FAO, 2008) y las ventajas ambientales que conlleva su aprovechamiento, ya que su acumulación anual se calcula en cientos de toneladas que al no ser utilizadas pueden dañar el medio ambiente debido a que contienen compuestos tóxicos altamente contaminantes (Mussatto y Teixeira, 2010; Saval, 2012). Podemos definir a los residuos agroindustriales como todos aquellos materiales que son generados durante el procesamiento industrial de la materia prima agrícola o animal, durante la manufactura de sus productos, y que no son de utilidad para la industria una vez concluido este proceso (Saval, 2012). Los residuos agroindustriales incluyen una variedad de materiales tales como el mosto proveniente de la producción de aguardientes y cerveza, el bagazo de ciertas plantas como la caña de azúcar, cáscaras provenientes del procesamiento de cereales tales como el arroz, sorgo, trigo y maíz, así como las partes de las plantas que no son utilizadas durante la producción como tallos, hojas, paja y rastrojo de frutas (Mussatto y Teixeira, 2010). Son bastos y muy diversos los residuos agroindustriales que han sido investigados para producir bioetanol de segunda generación. Debido a la composición química de la mayoría de los residuos agroindustriales relativamente alta en azúcares, se ha logrado que la producción de bioetanol a partir de estos residuos se vuelva una propuesta atractiva, sin embargo, los principales obstáculos que deben superarse son los altos costos que implica la obtención de bioetanol mediante el uso de las tecnologías actuales, así como un bajo rendimiento (Saval, 2012; Awasthi *et al.*, 2015). Países



como Estados Unidos, México, China, India, Japón, Argentina y países de la Unión Europea, han incursionado dentro de este campo para mejorar las tecnologías que puedan lograr que el aprovechamiento de esta clase de recursos se vuelva una operación unitaria económicamente sustentable (Saval, 2012; Awasthi *et al.*, 2015).

Tabla 1. Residuos agroindustriales que han sido utilizados para producir bioetanol (Saval, 2012).

País	Residuos agroindustriales
México	Bagazo de caña de azúcar, bagazo de maguey o agave, pulpa de café, olotes y tallos de maíz.
Estados Unidos de América	Cáscara de soya, hojas de caña de azúcar, rastrojo de maíz, astillas de madera de álamo.
Colombia	Pulpa, cáscara y tallo de la flor del plátano, mosto resultante de la elaboración de vinos, tallos y cáscara de café.
Argentina	Mosto de la elaboración de vinos y remolacha azucarera.
China	Tallos de maíz, residuos forestales de arce, álamo y abedul.
India	Hojas de caña de azúcar y rastrojo de sorgo.
Canadá	Paja y rastrojo de maíz.
Irán	Residuos forestales de abeto, tubos de cartón y residuos de panificación.
Portugal	Lodos de papel reciclado.

1.6.1. Residuos agroindustriales en México destinados a la producción de bioetanol

El desarrollo industrial que ha tenido México en las últimas décadas ha permitido el crecimiento de diversas industrias tales como la industria agropecuaria, forestal y alimenticia, lo que ha inducido un incremento en la generación de residuos agroindustriales provenientes de estas industrias (Nevárez, 2012). Valdez-Vazquez *et al.* (2010), publicaron un estudio donde se estimó que en México en el año 2006 a partir de 20 cultivos de diferentes alimentos se generaron 60.13 millones de toneladas de residuos primarios (principalmente azúcar, trigo, cebada y frijol), de las cuales 15.60 millones de toneladas correspondieron a residuos secundarios, que son los residuos que se generan después de la cosecha en el procesamiento industrial de la materia prima (principalmente el bagazo de caña de azúcar, subproductos del maíz como hojas y olotes, bagazo de maguey o agave y la pulpa de café), por lo que es razonable pensar que la cifra de residuos agroindustriales que son producidos en la actualidad se mantiene creciendo proporcionalmente con respecto al número de industrias y el tamaño de la producción de cada una. Una de las alternativas propuestas para aprovechar estos residuos agroindustriales es la producción de bioenergéticos tales como el bioetanol de segunda generación (Valdez-Vazquez *et al.*, 2010). Los residuos agroindustriales de mayor importancia que han sido investigados para producir bioetanol son el bagazo de la caña de azúcar, los subproductos del maíz (tallos y olotes) y el bagazo de agave, ya que estos tres residuos son los que mayormente se producen anualmente con un 45.9, 39.81% y 10.15%, respectivamente (Valdez-Vazquez *et al.*, 2010). El bagazo de agave es el tercer residuo agroindustrial que mayormente se produce en México y



ha sido investigado en los últimos años debido a que es una fuente de biomasa lignocelulósica prometedora para producir bioetanol de segunda generación, ya que posee un alto contenido en azúcares en comparación con otros residuos agroindustriales (*Tabla 2*) (Saucedo-Luna *et al.*, 2010; Perez-Pimienta *et al.*, 2012).

Tabla 2. Composición lignocelulósica de residuos agroindustriales de importancia en México (Modificada de Mussatto y Teixeira, 2010).

Biomasa lignocelulósica.	Celulosa %	Hemicelulosa %	Lignina %
Bagazo de agave	42.0	20.0	15.0
Bagazo de caña	40.0	27.0	10.0
Tallos de maíz	35.0	14.4	21.5
Paja de cebada	33.8	21.9	13.8
Olote de maíz	33.7	31.9	6.1
Paja de trigo	32.9	24.0	8.9

1.6.2. Producción de bioetanol en México y sus perspectivas

En México, un 89% del suministro de energía es generada por combustibles fósiles (OCDE, 2013), mientras que el 10% pertenece al uso de energías renovables, donde el 4.5% pertenece a la utilización de la biomasa proveniente del bagazo de la caña y leña (Red Mexicana de Bioenergía, A.C., 2011). Se estima que para el año 2020, México se convierta en un importador neto de combustible debido al agotamiento de las reservas de petróleo por lo que resultará necesario cambiar el paradigma energético actual hacia la generación de energías renovables que puedan sustituir el uso de combustibles fósiles (OCDE, 2013), lo que supone un mercado favorable para el desarrollo y producción de bioetanol en el futuro. En México se llevó a cabo la producción de bioetanol de primera generación por primera vez en el 2006 con la construcción de dos plantas productoras de etanol a partir de granos de maíz, sin embargo, las dificultades del mercado y la poca disponibilidad de materia prima durante esa época fueron dos factores que no permitieron la sustentabilidad de estas plantas productoras (Serna *et al.*, 2011; Red Mexicana de Bioenergía, A.C., 2011), no obstante, la gran cantidad de residuos agroindustriales que son generados en el país ha impulsado la creación de marcos regulatorios tales como la Ley de Promoción y Desarrollo de bioenergéticos en el 2008. Esta ley tiene por finalidad facilitar y regular la producción, transporte y almacenamiento de bioenergéticos tales como el bioetanol y el biodiesel (Red Mexicana de Bioenergía, A.C., 2011), lo cual ha permitido la apertura de nuevas plantas productoras de bioetanol que operan en la actualidad, ejemplos de estas plantas son la planta productora de bioetanol a partir de sorgo dulce en el estado de Veracruz, inaugurada en el año 2015 y la planta productora de bioetanol a partir de agave mezcalero y tequilero en Michoacán, inaugurada en el mismo año (Sagarpa.gob.mx, 2016). Actualmente no existen plantas productoras de bioetanol de segunda generación debido a que la infraestructura económica y tecnología utilizada en el país para el aprovechamiento óptimo de los residuos agroindustriales con este propósito aún no es eficiente (García *et al.*, 2013; Barrera *et al.*, 2016). Las instituciones nacionales que investigan el uso de residuos agroindustriales para su aprovechamiento mediante la producción de bioenergéticos son la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), el Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco (CIATEJ) y el Centro de Investigación y Estudios Avanzados (CINVESTAV) (Saval, 2012).



1.6.3. Bagazo de agave y su potencial biotecnológico

Durante la producción de tequila y mezcal se genera un residuo agroindustrial conocido como bagazo de agave (Chávez-Guerrero *et al.*, 2010; Saucedo-Luna *et al.*, 2010). La materia prima utilizada para producir estas bebidas es una planta endémica de México conocida como maguey. El maguey pertenece a la familia de las agaváceas, por lo que también se le conoce con el nombre del género al que pertenece, es decir, *Agave*. Aunque los procesos tecnológicos utilizados para la obtención a escala industrial de tequila y mezcal son muy similares, varían en la especie de la planta utilizada como materia prima, teniendo así que para la obtención del tequila se utiliza únicamente *Agave tequiliana* Weber (Norma Oficial Mexicana, 2005), mientras que para la obtención del mezcal pueden utilizarse diversas especies tales como *Agave angustifolia* Haw, *Agave esperrii* Jacobi, *Agave weberi* Cela, *Agave potatorum* Zucc y *Agave Salmiana* (Norma Oficial Mexicana, 1994). Los jugos del agave son extraídos mediante la cocción de las partes de la planta denominadas piñas, una vez extraídos estos jugos son fermentados mediante el uso de levaduras y posteriormente se destila para obtener las bebidas correspondientes (Saucedo-Luna *et al.*, 2010). Para producir un litro tanto de tequila como de mezcal se requiere de 15 a 33 kg de agave y se estima que un 40% del total del agave (en peso húmedo) utilizado corresponde a bagazo de agave (Chávez-Guerrero *et al.*, 2010). Durante el 2015, el Consejo Regulatorio del Tequila estimó que el consumo de agave para la producción de tequila fue de 859 000 toneladas donde aproximadamente 343 600 toneladas corresponden al bagazo de agave (Consejo Regulatorio del Tequila, 2016). En vista de la gran cantidad de bagazo de agave que es generado por estas industrias se han propuesto diversas alternativas para reducir el volumen de este residuo agroindustrial y a su vez minimizar el riesgo de contaminación que este puede provocar. Algunas de las operaciones biotecnológicas que se han propuesto son la utilización del bagazo de agave como una fuente de alimento destinada al ganado y para la elaboración de materiales de construcción, sin embargo, su contenido nutricional se encuentra bastante limitado debido a la dificultad de los animales para asimilar dicho alimento y presenta una baja homogeneidad con otros componentes utilizados en la fabricación de materiales de construcción (Valdez-Vazquez, 2010); el bagazo de agave también ha sido utilizado para la fabricación de papel reciclado, así como sustrato para el crecimiento de hongos comestibles (Nevárez 2012), y la mayor parte es incinerado para producir energía eléctrica generando grandes cantidades de ceniza que pueden contaminar ríos, cuerpos de agua y dañar a la flora y fauna (Chávez-Guerrero *et al.*, 2010). Como se mencionó anteriormente, una de las alternativas para la utilización del bagazo de agave es su uso como una fuente de biomasa lignocelulósica para producir bioetanol de segunda generación debido a su contenido alto en azúcares (Saucedo-Luna *et al.*, 2010). La cantidad de azúcares que son fermentados durante la producción de tequila son de 24 a 27% de los carbohidratos totales presentes en el agave (Martínez-Torres *et al.*, 2011); otra característica importante del bagazo de agave es que presenta un bajo contenido en lignina (Nuñez *et al.*, 2011). Saucedo-Luna *et al.*, (2010) reportaron que el bagazo de agave se encuentra constituido por un 42% de celulosa, 20% de hemicelulosa, 15% de lignina y un 23% de otros componentes, mientras que Ramírez *et al.* (2012) reportaron un 42% celulosa, 18.5% hemicelulosa y 14% lignina.



1.7. Obtención de bioetanol a través de los procesos de sacarificación fermentación separada y sacarificación fermentación simultánea

La producción de bioetanol de segunda generación consiste en una serie de procesos biotecnológicos que trabajan de manera consecutiva, esta operación se conoce como sacarificación fermentación separada o SHF por sus siglas en inglés (*Separate hydrolysis and fermentation*). La SHF consta de cuatro procesos fundamentales, comenzando por un pretratamiento de la biomasa lignocelulósica para eliminar los compuestos lignina y hemicelulosa, seguido de una sacarificación enzimática que permita degradar la celulosa a azúcares fermentables, posteriormente una fermentación de los azúcares obtenidos y finalmente la purificación del bioetanol mediante un proceso de destilación. Una opción al proceso de SHF es la sacarificación fermentación simultánea o SSF por sus siglas en inglés (*Simultaneous saccharification and fermentation*) en la cual, a diferencia de la SHF, los procesos de sacarificación y fermentación se llevan a cabo de manera conjunta (Carreón *et al.*, 2009; Dahnum *et al.*, 2015; Awasthi *et al.*, 2015). En este capítulo se describen por separado cada uno de los procesos involucrados tanto en la SHF como en la SSF; en capítulos posteriores se describirán detalladamente estos dos procesos.

1.7.1. Pretratamiento de la biomasa lignocelulósica

La estructura y conformación inherente a la biomasa lignocelulósica no permite que esta pueda ser utilizada directamente para producir bioetanol, es por esta razón que se debe llevar a cabo un pretratamiento de la biomasa lignocelulósica con la finalidad de modificar la estructura de los componentes de la biomasa de tal manera que ésta se vuelva más susceptible al ataque enzimático durante el proceso de sacarificación enzimática. Los objetivos principales del pretratamiento son reducir la cristalinidad de la celulosa, aumentar el área de superficie del material lignocelulósico y reducir el contenido de hemicelulosa y lignina, ya que estos factores son los que rigen la eficacia con la cual se llevará a cabo la catálisis enzimática del material lignocelulósico para obtener los azúcares requeridos para el proceso de fermentación (Cardona *et al.*, 2010; Saucedo-Luna *et al.*, 2010; Dahnum *et al.*, 2015).

1.7.1.1. Reducción de la cristalinidad de la celulosa

La celulosa presente en la biomasa lignocelulósica se encuentra conformada por dos tipos de regiones, las regiones cristalinas y las regiones amorfas (*Figura 5*), sin embargo, la mayor parte de la cadena de celulosa está conformada por regiones cristalinas lo cual le confiere una alta estabilidad y resistencia al ataque enzimático, por otra parte las enzimas pueden hidrolizar fácilmente la cadena de celulosa sobre las regiones amorfas, es por esta razón que durante el pretratamiento se busca llevar a cabo la conversión de las regiones cristalinas a su conformación amorfa y así inducir una mayor accesibilidad de las enzimas a la cadena de celulosa y facilitar la hidrólisis enzimática (Taherzadeh y Karimi, 2008; Saucedo-Luna *et al.*, 2010).

1.7.1.2. Aumento del área de superficie

La despolimerización de la celulosa a celobiosa y glucosa depende del contacto directo entre las enzimas utilizadas durante la hidrólisis enzimática con las cadenas de celulosa, es por esta razón que cuanto mayor sea el área de superficie de las fibras de celulosa más eficiente será el

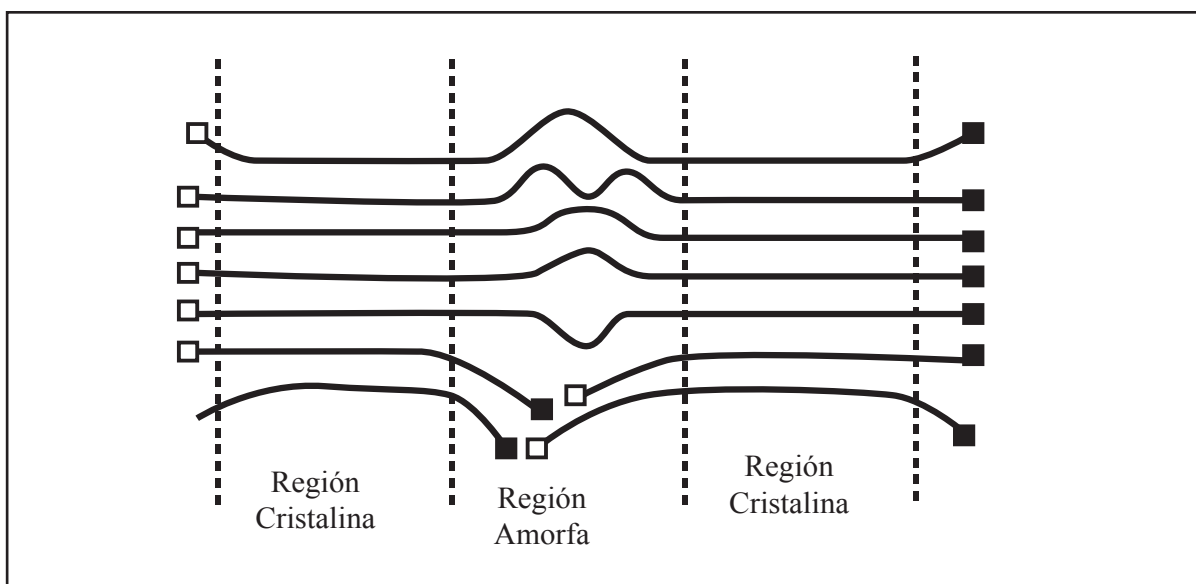


Figura 5. Representación de las regiones cristalinas y amorfas de la celulosa (Tomado de Martínez-Anaya *et al.*, 2008).

proceso de sacarificación. La cadena de celulosa se encuentra protegida por una barrera formada por hemicelulosa y lignina, las cuales reducen el área de superficie restringiendo el acceso de las enzimas a las cadenas de celulosa, por lo cual es importante que durante el pretratamiento se eliminen estos dos componentes para aumentar el área de superficie de las cadenas de celulosa (Tahezadeh y Karimi, 2008, Saucedo-Luna *et al.*, 2010).

1.7.1.3. Hidrólisis de la hemicelulosa

La hemicelulosa es un polímero que posee una estructura amorfa que puede ser hidrolizada a sus monómeros constituyentes durante el pretratamiento utilizado, no obstante, las pentosas liberadas durante la hidrólisis de la hemicelulosa no pueden ser utilizadas eficazmente durante la fermentación e incluso pueden llegar a ser contraproducentes durante el proceso, por lo que una vez hidrolizada la hemicelulosa sus monómeros pueden ser removidos para no afectar el proceso fermentativo (Tahezadeh y Karimi, 2008, Abril y Abril, 2009).

1.7.1.4. Eliminación de la lignina

Cuanto mayor es el contenido de lignina presente en la biomasa más resistencia ejercerá a la acción enzimática, requiriendo de un pretratamiento más riguroso. Durante el pretratamiento debe ser eliminada la mayor cantidad de lignina posible ya que una disminución de la lignina aumenta la porosidad del material lignocelulósico y el área de superficie, mejorando así las condiciones de la hidrólisis enzimática, no obstante, la cantidad de lignina que se libera al medio después del pretratamiento afecta la hidrólisis enzimática ya que ésta causa la inhibición de las enzimas utilizadas en la hidrólisis enzimática, por lo que debe ser removida del medio para no afectar los procesos subsecuentes al pretratamiento (Tahezadeh y Karimi, 2008; Abril y Abril, 2009).



1.7.1.5. Tipos de pretratamiento

Los pretratamientos de la biomasa lignocelulósica se han clasificado en métodos físicos, fisicoquímicos, químicos y biológicos (Cuervo *et al.*, 2009; Ashfaq, 2015).

De acuerdo con Lynd (1996), los requisitos más importantes que debe cumplir el pretratamiento de la biomasa lignocelulósica son:

- i. El pretratamiento no debe generar desechos contaminantes durante el proceso.
- ii. No se deben generar productos que afecten o inhiban la sacarificación enzimática o la fermentación de los azúcares.
- iii. Exponer las fibras de celulosa a las enzimas sin afectar la composición de la celulosa o provocar la degradación de esta misma.
- iv. El pretratamiento debe ser sencillo y económico para poder ser utilizado a escala industrial.

Dentro de los métodos que han sido mayormente utilizados como pretratamiento de la biomasa lignocelulósica proveniente de residuos agroindustriales como el bagazo de agave, están los métodos fisicoquímicos, como el método de explosión de vapor y el método de explosión de fibra con amoníaco, también conocido como AFEX (Ammonia fiber explosion), y los métodos químicos, tales como la hidrólisis ácida, la hidrólisis alcalina y el proceso organosolvente (Saucedo-Luna *et al.*, 2010).

Explosión de vapor. La explosión de vapor es un tratamiento muy efectivo, el cual consiste en tratar la biomasa lignocelulósica con vapor saturado a elevada temperatura (160-260°C) provocando la autohidrólisis de la celulosa, hemicelulosa y lignina. La hidrólisis de los componentes puede mejorar al adicionar ácido sulfúrico, dióxido de azufre o dióxido de carbono, este es un método bastante conveniente ya que se elimina gran parte de la hemicelulosa y requiere una menor inversión de energía en comparación con los métodos físicos, sin embargo, durante este proceso se generan productos que inhiben la fermentación (Taherzadeh y Karimi 2008; Abril y Abril, 2009; Cuervo *et al.*, 2009).

Explosión de fibra con amoníaco. Este método consiste en tratar el material lignocelulósico con amoníaco líquido a elevada temperatura (90-100°C) y presión. Este es un método muy eficiente ya que puede hidrolizar la celulosa hasta en un 90% con la ventaja de que no se producen inhibidores de la fermentación, además de que pueden minimizarse costos al reciclar el amoníaco utilizado durante el proceso, este método es eficiente con material lignocelulósico que contenga un bajo contenido de lignina (Abril y Abril, 2009). Las desventajas de este método son que la lignina disuelta en el medio debe ser lavada con agua durante el proceso provocando



la generación de agua residual que puede ser contaminante, además de que la hemicelulosa no es hidrolizada eficientemente en comparación con otros procesos (Taherzadeh y Karimi, 2008).

Organosolvente. Este método expone la biomasa lignocelulósica a temperaturas de 150 a 200°C, y solventes orgánicos tales como metanol, etanol o acetona. Son utilizados catalizadores tales como ácido sulfúrico y ácido clorhídrico para llevar a cabo la hidrólisis de la celulosa y la lignina, sin embargo, se necesitan remover estos solvente una vez finalizado el proceso ya que son inhibidores de la catálisis enzimática y fermentación. Aunque los solventes pueden ser reutilizados, su recuperación requiere de una inversión de tiempo y equipo que pueden repercutir elevando los costos de operación del proceso (Cuervo *et al.*, 2009).

Hidrólisis alcalina. Consiste en un tratamiento de la biomasa lignocelulósica utilizando bases diluidas tales como hidróxido de sodio e hidróxido de calcio a 120°C. Esta acción permite la separación de la lignina y la hemicelulosa, además de aumentar el área de superficie de las fibras de celulosa al disminuir su cristalinidad. Este método es uno de los más costosos y no resulta competitivo a escala industrial (Cuervo *et al.*, 2009).

Hidrólisis ácida. La hidrólisis ácida es uno de los métodos que han sido más utilizados para llevar a cabo el pretratamiento de la biomasa lignocelulósica para la obtención de bioetanol de segunda generación, ya que este resulta ser un método económico y eficiente (Carreón *et al.*, 2009). Este método permite alcanzar altas velocidades de reacción, lo cual mejora la hidrólisis de la celulosa además de disminuir su cristalinidad y aumentar el área de superficie, igualmente con este tratamiento se puede hidrolizar la hemicelulosa casi en un 100% y así aumentar la susceptibilidad de la celulosa al ataque enzimático, sin embargo, este método no es capaz de eliminar gran parte de la lignina del material lignocelulósico (Taherzadeh y Karimi, 2008; Abril y Abril, 2009; Cardona *et al.*, 2010). Este método consiste en tratar la biomasa lignocelulósica con ácido a una baja concentración y alta temperatura o utilizar ácido concentrado a baja temperatura, sin embargo, esta última combinación acarrea grandes desventajas ya que el uso de ácido a altas concentraciones puede destruir gran parte de la celulosa además de ser potencialmente tóxico, altamente corrosivo y difícil de manipular, por lo que dificulta el pretratamiento, merma los rendimientos de etanol y requiere de una mayor inversión económica (Taherzadeh y Karimi, 2008). El ácido que ha sido utilizado más comúnmente para llevar a cabo este pretratamiento es el ácido sulfúrico, no obstante, se han utilizado otros ácidos tales como el ácido clorhídrico, nítrico y fosfórico. El ácido que ha dado mejores resultados respecto al rendimiento de glucosa es el ácido sulfúrico (Cardona *et al.*, 2010). Las condiciones de temperatura, tiempo y concentración de ácido son importantes ya que dependerá de estos parámetros la efectividad del pretratamiento, rendimiento de etanol y costo del proceso. Las condiciones a las cuales se ha llevado a cabo este pretratamiento suelen variar respecto al material lignocelulósico investigado, sin embargo, las temperaturas que han sido utilizadas se sitúan en un rango de 100 a 150°C, utilizando concentraciones de ácido entre 1 y 5% a tiempos de 15 a 240 min (Cardona *et al.*, 2010). La concentración de ácido afecta los rendimientos de la hidrólisis enzimática ya que al aumentar su concentración el rendimiento de glucosa decrece (Cardona *et al.*, 2010).



1.7.2. Detoxificación de la biomasa lignocelulósica

En el pretratamiento con ácido sulfúrico diluido se generan productos de descomposición que son capaces de inhibir el proceso fermentativo debido a la toxicidad que representan, tales productos de descomposición son el 5-hidroxiacetilfurfural, el cual es un producto proveniente de la deshidratación de las hexosas, el furfural proveniente de la degradación de pentosas y el ácido acético formado por la hidrólisis de los grupos acetilo que forman parte de la estructura de los azúcares. La concentración de estos productos puede reducirse mediante una detoxificación posterior al pretratamiento (Taherzadeh y Karimi, 2008; Cuervo *et al.*, 2009; Cardona *et al.*, 2010). La capacidad inhibitoria de estos compuestos depende de la concentración que se haya generado durante el pretratamiento, generalmente para el ácido acético una concentración de 4 a 10 g/L puede inhibir la capacidad fermentativa de la levadura, mientras que una concentración de furfural mayor a 1 g/L puede afectar la capacidad fermentativa de la levadura (Cardona *et al.*, 2010). Las concentraciones en las que se obtengan estos compuestos dependerán de las condiciones utilizadas durante el pretratamiento, ya que cuanto mayor sea la concentración de ácido sulfúrico y la temperatura utilizada durante el pretratamiento, mayor serán las concentraciones de productos inhibitorios generados. Para llevar a cabo la detoxificación de la biomasa lignocelulósica se emplean diversos métodos, tales como la neutralización, detoxificación alcalina, detoxificación con carbón activado, detoxificación enzimática y detoxificación de la biomasa utilizando resinas de intercambio iónico (Cardona *et al.*, 2010). Uno de los métodos más comúnmente utilizados por su bajo costo es la detoxificación alcalina, la cual consiste en neutralizar el ácido sulfúrico con hidróxido de sodio con la subsecuente formación de una sal insoluble que se puede remover fácilmente mediante filtración (Carreón *et al.*, 2009), este método puede remover el furfural y el 5-hidroxiacetilfurfural eficazmente, sin embargo, no reduce significativamente las concentraciones de ácido acético. Otros métodos más eficientes son la detoxificación enzimática, la detoxificación con carbón activado o la detoxificación con resinas de intercambio iónico (Cardona *et al.*, 2010).

1.7.3. Sacarificación enzimática

La sacarificación enzimática es el proceso posterior al pretratamiento de la biomasa lignocelulósica mediante el cual se transforma la celulosa a sus monómeros constituyentes. Este proceso se realiza mediante el empleo de una mezcla de enzimas las cuales forman un complejo enzimático que llevan a cabo diferentes funciones catalíticas (Saval, 2012). Las enzimas que son empleadas en el proceso de sacarificación enzimática son celulasas, las cuales pertenecen a la categoría de las glicosil hidrolasas debido a que rompen los enlaces glicosídicos (Martínez-Anaya *et al.*, 2008; Machado *et al.*, 2010). Las celulasas han sido utilizadas ampliamente tanto en el proceso de sacarificación fermentación simultánea como en el proceso de sacarificación fermentación separada (Machado *et al.*, 2010).

1.7.3.1. Celulasas empleadas en el proceso de sacarificación enzimática

En función del sitio de la cadena de celulosa donde actúan las celulasas se han dividido en tres: endoglucanasas (EC 3.2.1.4), exoglucanasas (EC 3.2.1.91) y β -glucosidasas (EC 3.2.1.21) (Mussato y Teixeira, 2010). La razón por la cual se utiliza este complejo enzimático se debe a la generación de un sinergismo entre las enzimas que lo componen, esto significa que la actividad

de estas enzimas aumenta considerablemente en comparación con la actividad enzimática de cada una por separado (Machado *et al.*, 2010).

1.7.3.2. Mecanismo de acción enzimático

El efecto catalítico de las enzimas ocurre en tres etapas (*Figura 6*), comenzando por la adsorción de las enzimas sobre la superficie del sustrato, seguido de la biodegradación del sustrato para liberar los azúcares, y por último la desorción de las enzimas una vez finalizada la catálisis. Esta última etapa puede no ser concertada debido a la adsorción irreversible que manifiestan algunas enzimas, generando una disminución de la hidrólisis enzimática. Para lo anterior se ha propuesto incluir agentes surfactantes que modifiquen las propiedades de la superficie de la celulosa impidiendo la unión irreversible de las celulasas a las cadenas de celulosa (Talebnia *et al.*, 2010). La despolimerización de la celulosa es la parte fundamental del proceso de sacarificación enzimática, y comienza con la acción de las β -1-4-endoglucanasas, también denominadas endocelulasas, estas enzimas rompen de manera aleatoria los enlaces glicosídicos en las regiones de celulosa amorfa o de baja cristalinidad desde el interior del polisacárido, generando así oligosacáridos de distintos tamaños, una disminución de la longitud de la cadena de celulosa y la generación de nuevos extremos reactivos, donde actuarán posteriormente las β -1-4-exoglucanasas. Dentro del grupo de las exoglucanasas se encuentran las celobiohidrolasas y las glucanodextrinas, ambas actúan en los extremos terminales de la molécula de celulosa liberando directamente moléculas de glucosa en el caso de las glucanodextrinas o liberando dos moléculas unidas de glucosa (celobiosa) en el caso de las celobiohidrolasas. Finalmente las β -glucosidasas se encargan de romper el enlace glicosídico del disacárido para obtener dos monómeros de glucosa (Martínez- Anaya *et al.*, 2008; Mussato y Teixeira, 2010; Machado *et al.*, 2010).

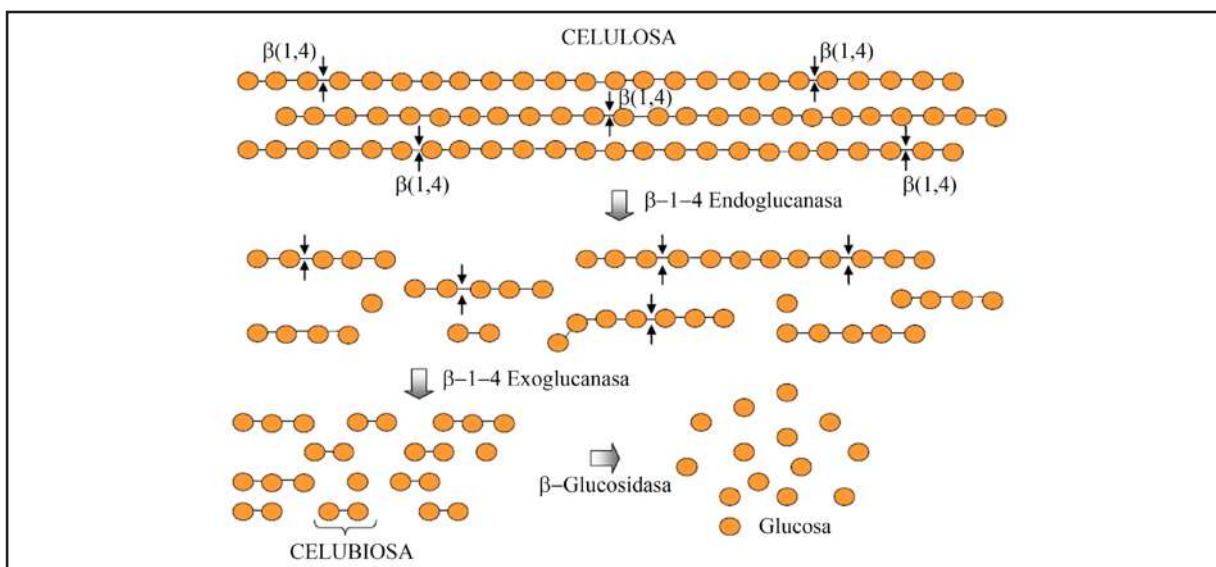


Figura 6. Esquema de la hidrólisis enzimática realizada por las celulasas sobre la cadena de celulosa (Tomado de Mussato y Teixeira, 2010).

Aunque la celulosa puede ser degradada por efecto de la sinergia generada por el complejo enzimático, las enzimas pueden presentar inhibición por producto, afectando los rendimientos



de azúcares liberados y por tanto el rendimiento de etanol (Ovando-Chacon y Waliszewski, 2005; Machado *et al.*, 2010). La eficiencia de la sacarificación enzimática depende de diversos factores tales como el tipo de pretratamiento del material lignocelulósico, temperatura, pH, agitación, tiempo de reacción, concentración de sustrato y enzima utilizada (Leu y Zhu, 2013). Se ha demostrado que las celulasas ejercen óptimamente su función catalítica a temperaturas de 45 a 55°C y condiciones de pH de 4 a 5, mientras que la dosis de celulasas utilizada se encuentra relacionada con los gramos de sustrato a hidrolizar. Se han utilizado dosis de 10 a 30 FPU/g de celulosa obteniendo un alto rendimiento de glucosa en un tiempo de 48 a 72 h (Talebnia *et al.*, 2010).

1.7.3.3. Complejos enzimáticos comerciales

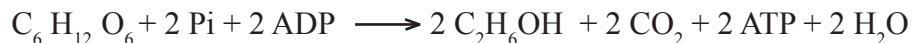
Actualmente en el mercado existen diversos complejos enzimáticos comerciales que están constituidos principalmente por las tres enzimas anteriormente descritas, estos complejos enzimáticos son obtenidos a partir de hongos celulolíticos y algunas bacterias (Lynd *et al.*, 2002). Los hongos que son mayormente utilizados para la obtención de estas enzimas son *Trichoderma reesei* y *Aspergillus niger* (Cuervo *et al.*, 2009), mientras que una de las bacterias más comúnmente utilizadas es *Bacillus subtilis* (Bhat, 2000). Diversas compañías tales como Genecor International® y Novozymes Biotech®, se han dedicado al desarrollo de nuevos complejos enzimáticos para optimizar el proceso de sacarificación enzimática, mejorar los rendimientos de bioetanol a partir de diversas materias primas y minimizar los costos de operación reduciendo el precio de las celulasas utilizadas que van desde 4,5 dólares por galón de etanol a 20 centavos por galón (Moreira, 2005). Novozymes Biotech® es la compañía que más ampliamente ha desarrollado complejos enzimáticos para ser utilizados en la producción de bioetanol de segunda generación y han llevado a cabo diversas mejoras en sus complejos enzimáticos, tales como incrementar la concentración de β -glucosidasas, tolerancia a la inhibición por producto y la adición de hemicelulasas (Associate Scientist, Novozymes North America, 2010). Las hemicelulasas son otro grupo de enzimas utilizadas para degradar la hemicelulosa entre las cuales podemos encontrar a las endo-1,4- β -xilanasas (Saval 2012). Novozymes produce dos complejos enzimáticos aplicados a la producción de bioetanol, CTec2 y HTec2, los cuales han demostrado ser eficaces durante la hidrólisis enzimática de una gran variedad de materiales lignocelulósicos pretratados. CTec2 es un complejo de celulasas las cuales tienen un alto nivel de β -glucosidasas y hemicelulasas, este complejo es eficaz a una alta concentración de sólidos, es resistente a la inhibición por producto y es compatible con múltiples pretratamientos y materiales lignocelulósicos, con una actividad óptima a un pH de 5.0-5.5 y temperatura de 45-50°C. El segundo complejo enzimático HTec2 está compuesto de endoxilanasas de alta especificidad que pueden degradar fácilmente la hemicelulosa convirtiéndola en azúcares fermentables, la actividad óptima de HTec2 se logra a pH de 5.0 y temperatura de 45-50°C. Ambas permiten un ahorro en el costo del proceso debido a que las concentraciones de enzimas requeridas son menores en comparación con otros complejos enzimáticos (Novozymes A/S, 2010).

1.7.4. Fermentación alcohólica aplicada a la producción de bioetanol

La fermentación alcohólica es un proceso catabólico mediante el cual microorganismos tales como levaduras y bacterias obtienen energía (ATP), mediante la oxidación incompleta de glucosa u otros azúcares, comúnmente en condiciones anaerobias (no estrictas) y con la subsecuente



transformación del sustrato a etanol y CO₂ (Melo y Cumatzi, 2007; Jorgensen y Fath, 2008). La fermentación alcohólica es representada de manera general por medio de la siguiente ecuación (Melo y Cumatzi, 2007):



La fermentación alcohólica se lleva a cabo mediante la ruta de Embden-Meyerhof-Parnas (*Figura 7*), también conocida como glicólisis o glucólisis. Esta ruta consiste en la transformación de la molécula de glucosa a piruvato, el cual por efecto de la enzima piruvato descarboxilasa es oxidado a acetaldehído y éste a su vez reducido por efecto de la enzima alcohol deshidrogenasa, obteniendo así etanol y dióxido de carbono.

El proceso fermentativo mediante el cual se produce bioetanol es más complejo que el proceso fermentativo convencional, ya que este requiere ciertas características en los microorganismos para fermentar los azúcares liberados durante la sacarificación enzimática, debido a que las condiciones en las cuales se lleva a cabo la fermentación alcohólica pueden resultar desfavorables para la mayoría de los microorganismos, induciendo así la producción de otros metabolitos secundarios y bajos rendimientos de etanol, como respuesta al estrés al que son sometidos durante el proceso (Zaldivar *et al.*, 2001). Es por esta razón que el proceso fermentativo en la producción de bioetanol requiere de un microorganismo el cual tenga o adquiera la capacidad de producir altos rendimientos de etanol, elevada tolerancia al mismo, así como a los productos inhibitorios generados durante el pretratamiento, al estrés osmótico producido por las altas concentraciones de azúcares producidas durante la sacarificación enzimática y poseer una gran versatilidad en cuanto al aprovechamiento de distintos sustratos (Zaldivar *et al.*, 2001; Hahn- Hägerdal *et al.*, 2007).

1.7.4.1. Microorganismos empleados en el proceso fermentativo para generar bioetanol

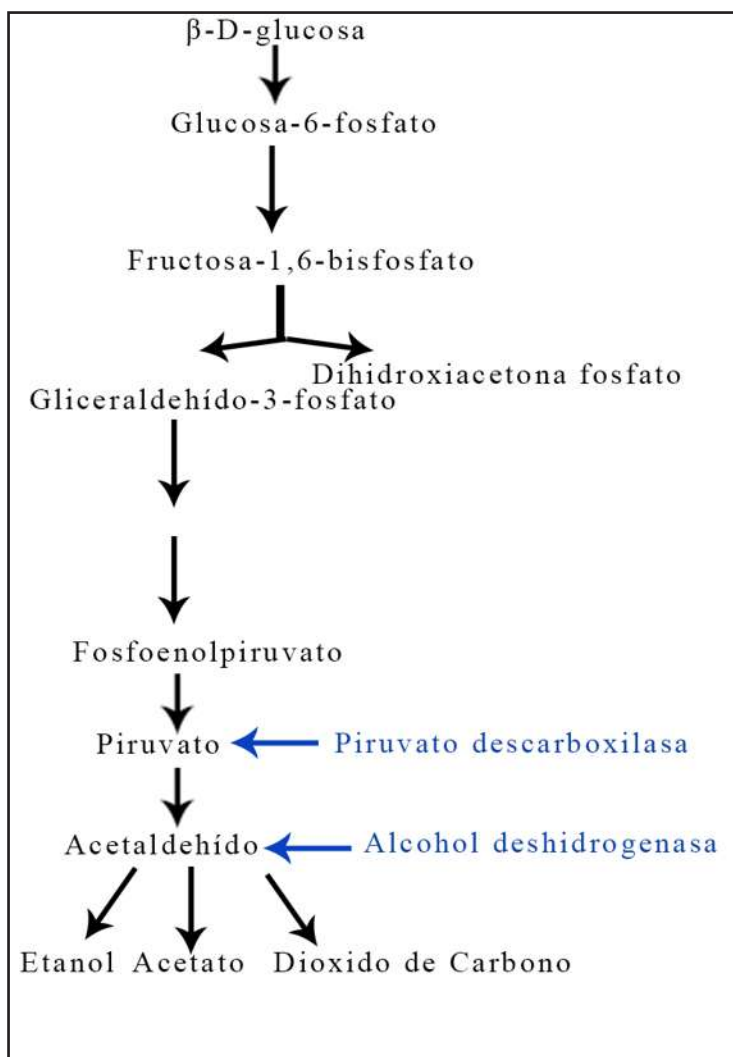
Hasta la fecha no existe un microorganismo que cumpla con todas las características ideales para el proceso de fermentación, no obstante, existen diversos microorganismos que han sido ampliamente estudiados para ofrecer soluciones o nuevas alternativas a los principales problemas relacionados al proceso fermentativo. Los microorganismos que más comúnmente han sido utilizados y estudiados para llevar a cabo la fermentación son las levaduras *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia stipitis*, *Kluyveromyces marxianus*, *Kluyveromyces fragilis*, *Candida utilis*, así como bacterias etanológicas tales como *Zymomonas mobilis* (Talebna *et al.*, 2010). De las levaduras anteriormente mencionadas, la más ampliamente utilizada es *S. cerevisiae*, ya que tiene la capacidad de fermentar la glucosa rápidamente obteniendo altos rendimientos de etanol (90-97% del rendimiento teórico con 0.5g de etanol por gramo de glucosa), además de poseer una elevada tolerancia al mismo (10-15%) y a la concentración de azúcares, tiene una baja generación de subproductos durante la fermentación y una alta viabilidad, por lo que puede ser reciclada para procesos posteriores, generando una disminución de los costos de producción del proceso (Talebna *et al.*, 2010; Domínguez *et al.*, 2016). Otra ventaja de levaduras *S. cerevisiae* es que presentan relativa alta tolerancia a los productos inhibitorios generados durante



los pretratamientos (Liu y Zhou *et al.*, 2015). A pesar de que levaduras de *S. cerevisiae* han demostrado ser de los mejores microorganismos productores de etanol, tienen la desventaja de no poder fermentar pentosas tales como la xilosa, de tal manera que al utilizar microorganismos con la capacidad de fermentar únicamente hexosas se desaprovecha totalmente este sustrato, el cual puede mejorar considerablemente el rendimiento final de etanol. Por lo anterior es que se han buscado microorganismos que cuenten con la capacidad de fermentar una mayor variedad de monosacáridos incluyendo tanto hexosas como pentosas. Dentro de los microorganismos fermentadores tanto de hexosas como de pentosas existe un género de levadura denominado *Kluyveromyces*, algunas especies de este género pueden fermentar una diversa gama de azúcares tales como xilosa, glucosa, manosa y galactosa, además de obtener buenos rendimientos de etanol (Zhang *et al.*, 2010).

1.8. Sacarificación fermentación separada

Un proceso para llevar a cabo el aprovechamiento de la biomasa lignocelulósica es la sacarificación fermentación separada (o SHF por sus siglas en inglés), que como se mencionó incluye cuatro



fases anteriormente descritas, es decir un pretratamiento, seguido de una sacarificación enzimática, posteriormente la fermentación y finalmente la destilación. El llevar a cabo la sacarificación separada del proceso fermentativo ofrece algunas ventajas, ya que los dos procesos necesitan diferentes condiciones de temperatura y pH, logrando así una optimización de la función catalítica de las enzimas y del microorganismo utilizado, sin embargo, este proceso presenta desventajas, ya que los azúcares liberados durante la sacarificación enzimática ocasionan inhibición de las enzimas utilizadas durante el proceso, es necesario el empleo de dos biorreactores y largos periodos de tiempo para concluir la operación (Abril y Abril, 2010, Talebnia *et al.*, 2010).

Figura 7. Esquema de la ruta de Embden-Meyerhof-Parnas (Figura traducida de Pathway. yeastgenome.org, 2016).



1.9. Sacarificación fermentación simultánea

La sacarificación fermentación simultánea (o SSF por sus siglas en inglés) surge como una propuesta para mejorar la SHF. En este proceso se lleva a cabo la sacarificación y el proceso fermentativo de manera conjunta, al llevar a cabo la operación en un solo biorreactor se reduce de manera importante la inversión de energía y por tanto los costos de operación, además de optimizar el proceso al reducir el tiempo necesario. Otra ventaja del proceso de SSF es que la liberación de los azúcares no causa inhibición de las celulasas utilizadas, debido a que estos azúcares son consumidos simultáneamente por el microorganismo utilizado, formando así un equilibrio entre la actividad enzimática y la actividad fermentativa (Carreón *et al.*, 2009; Cuervo *et al.*, 2009; Talebnia *et al.*, 2010). A pesar de las grandes ventajas que presenta la SSF frente a la SHF, las condiciones de temperatura a las cuales se lleva a cabo tanto la sacarificación como la fermentación de manera óptima son diferentes. La temperatura óptima a la cual trabajan las celulasas es de 45 a 50°C, mientras que para la mayoría de las levaduras etanológicas la temperatura óptima es de 30 a 37°C (Suryawati *et al.*, 2008; Taylor *et al.*, 2009). La diferencia entre las temperaturas de estos dos procesos se manifiesta como una disminución o inhibición de la capacidad fermentativa de los microorganismos utilizados o un decremento en la capacidad catalítica de las enzimas, provocando rendimientos deficientes de bioetanol (Talebnia *et al.*, 2010). Debido al problema anteriormente descrito se optó por buscar microorganismos que fueran capaces de soportar temperaturas más elevadas (mayores a 40°C), siendo una propuesta prometedora el estudio y empleo de levaduras etanológicas termotolerantes (West y Kennedy, 2014).

1.9.1. Levaduras termotolerantes

Koedrith *et al.* (2008) define a las levaduras termotolerantes como aquellas levaduras que son capaces de crecer a temperaturas mayores a 40°C. El uso de levaduras termotolerantes en el proceso de SSF puede mejorar este proceso debido a que éstas pueden crecer y fermentar a una temperatura aproximada o igual a la temperatura mediante la cual las celulasas ejercen su efecto catalítico de manera óptima (Ballesteros *et al.*, 2003; Caspeta *et al.*, 2014). Debido a esta razón son diversas las investigaciones que han tenido como objetivo aislar, caracterizar y comprobar la eficiencia de diversas especies de levaduras etanológicas termotolerantes en el proceso de SSF (Araque *et al.*, 2008).

1.9.1.2. Principales especies de levaduras termotolerantes utilizadas en sacarificación fermentación simultánea

Son diversas las especies de levaduras termotolerantes que se han utilizado para la producción de bioetanol (Tabla 3), donde la mayoría de estos estudios han reportado a *S. cerevisiae* y *K. marxianus* como las levaduras con mayor capacidad termotolerante, sin embargo, la termotolerancia de *K. marxianus* suele ser superior con respecto a *S. cerevisiae* (Mejía-Barajas *et al.*, 2016). *K. marxianus* es la especie de levadura más promisorio para llevar a cabo el proceso de SSF debido a su capacidad para fermentar sustratos a temperaturas superiores a 40°C, obtener altos rendimientos de etanol y tener la capacidad de metabolizar una gran variedad de azúcares tales como glucosa, xilosa, manosa y galactosa (Zhang *et al.*, 2010).



Tabla 3. Estudios realizados para la producción de bioetanol con levaduras termotolerantes mediante SSF con residuos agroindustriales (Mejía-Barajas *et al.*, 2016).

Hojas de maleza <i>Antigonum leptopus</i>	<i>K. fragilis</i> NCIM3358	Hari <i>et al.</i> (2001).
Alcachofa de Jerusalén (<i>Helianthus tuberosus</i>)	<i>K. marxianus</i> (PT-1) <i>S. cerevisae</i> (JZ1C)	Hu <i>et al.</i> (2012).
Rastrojo de maíz	<i>S. cerevisae</i> DQ1	Chu <i>et al.</i> (2012).
Subproducto del proceso de extracción del jugo de zanahoria	<i>K. marxianus</i> K21	Chi-Yang <i>et al.</i> (2013).
Bagazo de caña pretratado	<i>K. marxianus</i> ATCC 8554 <i>K. marxianus</i> CCT 4086 <i>S. cerevisae</i> CAT-1 <i>S. cerevisae</i> PE-2	Costa <i>et al.</i> (2014).



2. JUSTIFICACIÓN

El uso de bioetanol contribuye a la reducción de la utilización de combustibles fósiles. El bioetanol puede ser generado a partir de residuos agroindustriales tales como el bagazo de agave, el cual es producido en grandes cantidades en México. Sin embargo, la producción de bioetanol actualmente no es costeable económicamente, por lo que es necesario estudiar su producción a través de diferentes procesos de fermentación tales como la sacarificación fermentación simultánea con el uso de levaduras termotolerantes.

3. HIPÓTESIS

Se genera una mejor producción de bioetanol mediante el proceso de sacarificación fermentación simultánea utilizando una levadura termotolerante.



4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general

Estudiar la producción de bioetanol mediante diferentes procesos de fermentación y levaduras.

4.2. Objetivos particulares

1. Conocer las mejores condiciones de hidrólisis química-enzimática del material lignocelulósico de estudio.
2. Analizar los productos de los procesos de fermentación.



5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Materiales

5.1.1 Material biológico

El bagazo de agave (BA) fue obtenido de la destilería “La Madrileña”, Tototlán, Jalisco, México. El BA fue obtenido de piñas de agave de edad de 5 a 8 años, sometidas al proceso de difusor (Casas, 2006). El BA fue lavado y secado en un horno a 70°C, después de lo cual fue almacenado a 4°C hasta su uso.

Las levaduras utilizadas en este estudio fueron obtenidas de la colección de cultivos del CIATEJ (Centro de Investigaciones y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, México). Las levaduras SLP1 y OFF1 de *K. marxianus* fueron aisladas de fermentaciones espontáneas de destilerías rurales mexicanas de los estados de San Luis Potosí y Guerrero, respectivamente. La levadura *S. cerevisiae* Ethanol Red, fue obtenida de la empresa LESAFFRE FERMENTIS.

Los complejos enzimáticos comerciales empleados en este estudio fueron CTec2, HTec2 y Rapidaza, adquiridos de la empresa NOVOZYMES, SIGMA.

5.1.2 Reactivos

El ácido tricloroacético, ácido 3,5-Dinitrosalicílico (DNS), ácido nítrico, cloroformo y la peptona animal fueron adquiridos en SIGMA-ALDRICH. El ácido acético fue adquirido en FERMONT, el ácido sulfúrico y el metanol fueron adquiridos en J. T. BAKER; el extracto de levadura fue adquirido en BBL, la dextrosa fue adquirida en BIOXON, y el hidróxido de sodio fue adquirido en MACRON. La acetona y el etanol absoluto fueron adquiridos en MERCK.

5.2. Métodos

5.2.1. Análisis composicional del bagazo de agave

El análisis composicional del BA se llevó a cabo mediante una hidrólisis ácida inorgánica de acuerdo a la técnica descrita por Foster *et al.* (2010). A partir de 3 g de BA se llevó a cabo el aislamiento de la pared celular. El sedimento insoluble en ácido tricloroacético de la pared celular se trató con reactivo Updegraff (ácido acético: ácido nítrico: agua. 8: 2: 1 v/v) a 100°C durante 30 min. El sedimento restante se lavó y se hidrolizó (ácido sulfúrico 72%) a temperatura ambiente durante 1 h.

5.2.2. Hidrólisis termo-ácida del bagazo de agave

La hidrólisis termo-ácida del BA se llevó a cabo utilizando una proporción 1:10 w/v (Saucedo-Luna *et al* 2010). A 3 g de BA en matraces Erlenmeyer se les adicionó 30 mL de ácido sulfúrico a concentraciones de 1 a 3%, posteriormente fueron incubadas a temperaturas de 110°C, 130°C y 140°C por 30 min. Se tomó muestra cada 10 min, posteriormente las muestras se centrifugaron a 3000 rpm por 15 min y se colectó por decantación la fracción líquida de la muestra para realizar la determinación de azúcares reductores mediante el método de Miller (1959).



5.2.3. Determinación de azúcares reductores

La determinación de azúcares reductores se llevó a cabo mediante la técnica descrita por Miller (1959), la cual consiste en la reducción del ácido 3,5-Dinitrosalicílico (DNS) por los azúcares reductores presentes en la muestra. El DNS al reducirse adquiere una coloración amarillo-naranja cuya densidad óptica es directamente proporcional a la concentración de los azúcares reductores presentes en la muestra. La densidad óptica de cada muestra se registró a 540 nm usando un espectrofotómetro UV/VIS Perkin-Elmer Lambda 18. La concentración de azúcares se calculó mediante una curva de calibración utilizando glucosa como estándar.

5.2.4 Hidrólisis enzimática del bagazo de agave

El hidrolizado del BA (fracción líquida y sólida) proveniente de la hidrólisis termo-ácida a las mejores condiciones de tiempo, temperatura y concentración de ácido sulfúrico fue ajustado con NaOH 2 M a un pH de 5. La hidrólisis enzimática se llevó a cabo utilizando tres complejos enzimáticos comerciales (CTec2, HTec2 y Rapidaza) de la empresa Novozymes, Sigma. Cada complejo enzimático fue utilizado a concentraciones de 0.15%, 1.5% y 15% con respecto al peso seco del sustrato (BA: 3 g). Las condiciones a las cuales se llevó a cabo la hidrólisis enzimática fueron: 40°C, con una agitación de 100 rpm durante 72 h. Se tomó muestra cada 24 h, posteriormente las muestras se centrifugaron a 3000 rpm por 15 min, se colectó el sobrenadante para realizar la determinación de azúcares reductores de acuerdo a la técnica descrita en el apartado 5.2.4 y por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) de acuerdo a la técnica descrita a continuación.

5.2.5. Análisis de los compuestos de las muestras hidrolizadas por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC)

La concentración de azúcares y alcohol presentes en la fracción líquida producidos durante la hidrólisis ácida, hidrólisis enzimática y los procesos de sacarificación fermentación separada (SHF) y sacarificación fermentación simultánea (SSF) se determinaron por HPLC utilizando una columna Aminex HPX-87C 300 mm x 7.8 mm (BioRad). Las muestras se centrifugaron a 3000 rpm por 15 min para obtener el sobrenadante por decantación. Una fase móvil de H₂SO₄ 5 mM se utilizó a 0.5 mL/min, y 60°C. La concentración de azúcares y etanol se calcularon mediante una curva de calibración utilizando el respectivo estándar.

5.2.6. Sacarificación fermentación separada (SHF) y sacarificación fermentación simultánea (SSF) de los hidrolizados del bagazo de agave

Se realizó un pre-inóculo de las levaduras *K. marxianus* SLP1 y OFF1, así como de la *S. cerevisiae* Ethanol Red, mediante la inoculación con un asa bacteriológica en 40 mL de cultivo YPD líquido (extracto de levadura 1%, peptona 2% y dextrosa 2%), con incubación a temperatura ambiente y agitación constante a 180 rpm. Después de 24 h se realizó un conteo celular en cámara de Neubauer para calcular el número de células por mililitro de cada pre-inóculo utilizando la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{No. de Células} \times \text{Vol.} \times \text{Factor de dilución}}{\text{No. de cuadrantes}} = X \times 10^6$$



Una vez realizado el cálculo se inocularon las levaduras en los hidrolizados de BA previamente sometidos a la hidrólisis ácida y a la hidrólisis enzimática a las mejores condiciones, utilizando un número de células de 2.4×10^{10} células/mL, se incubaron a 40°C con agitación constante a 100 rpm. En el proceso SHF las células fueron inoculadas en los hidrolizados de BA una vez concluida la hidrólisis enzimática (48 h) mientras que en el proceso SSF las células se inocularon al inicio de la hidrólisis enzimática. Ambos procesos se llevaron a cabo sin la adición de nutrientes o ajuste de pH después de la hidrólisis enzimática. La determinación de azúcares residuales y etanol se llevó a cabo por HPLC como se mencionó en el apartado 5.2.4.



6. RESULTADOS

6.1. Análisis composicional del bagazo de agave (BA)

Los resultados del análisis composicional del BA utilizando 30 g de material seco tanto para el BA pretratado como para el BA sin pretratar se expresan en la *tabla 4*. Los resultados se expresan como porcentaje de celulosa y hemicelulosa presentes en el BA sin el pretratamiento químico y después del pretratamiento. Los resultados muestran un aumento en el porcentaje de celulosa en el BA pretrado (40.06%) en comparación con el BA sin pretratar (36.03%), mientras que para el caso de la hemicelulosa se muestra una disminución en el porcentaje obtenido en el bagazo pretratado (18,71%) en comparación con el bagazo sin pretratamiento (27.12%).

Tabla 4. Composición lignocelulósica del BA antes (a) y después (b) de la hidrólisis ácida. Las condiciones utilizadas en el pretratamiento y la concentración de azúcares liberados tras el pretratamiento (c y d, respectivamente). Porcentaje de azúcares reductores totales liberados (e).

a) Peso seco antes de la hidrólisis ácida (% g/g)	
Celulosa	36,03±1,4
Hemicelulosa	27,12±1,5
b) Peso seco después de la hidrólisis ácida (% g/g)	
Celulosa	40,06±1,2
Hemicelulosa	18,71±0,76
c) Condiciones	
H ₂ SO ₄ (%)	1
Temperatura (°C)	110
Tiempo (min)	10
d) Concentración de azúcares liberados (g/L) de BA 1:10 g/L en H ₂ SO ₄	
	0.66±0,07
e) Porcentaje (% g/g)	
	3,5±0,22

Los valores son la media de tres réplicas del experimento ±DE.

6.2. Hidrólisis termo-ácida del BA

Mediante la prueba de DNS se analizó la concentración de azúcares reductores liberados del BA sometido a diferentes concentraciones de ácido, tiempo y temperatura a las cuales se llevó a cabo el pretratamiento. Posteriormente se analizó la concentración de azúcares reductores liberados utilizando las mejores condiciones del pretratamiento termo-ácido (H₂SO₄ a 110°C) por un tiempo de 1 h. En ambos casos los resultados se expresan como concentración de azúcares reductores liberados. En la *figura 8 (a)* se muestra la máxima concentración de azúcares reductores liberados a los 10 min tanto para las tres concentraciones de ácido utilizadas como para las tres temperaturas a las que fueron sometidas las muestras de BA. En los resultados se observó que no hay diferencias significativas en la liberación de azúcares reductores entre las concentraciones de ácido y temperaturas utilizadas. La máxima concentración de azúcares liberados se llevó a cabo a los 10 min sin presentar un aumento en la concentración de azúcares



durante los 30 min. En la *figura 8 (b)* se muestra la concentración de azúcares liberados a las mejores condiciones de concentración de ácido y temperatura (H_2SO_4 a 110°C) por 1 h, mostrando la máxima concentración de azúcares liberados a los 10 min sin presentar un aumento significativo en la concentración de azúcares durante el tiempo restante.

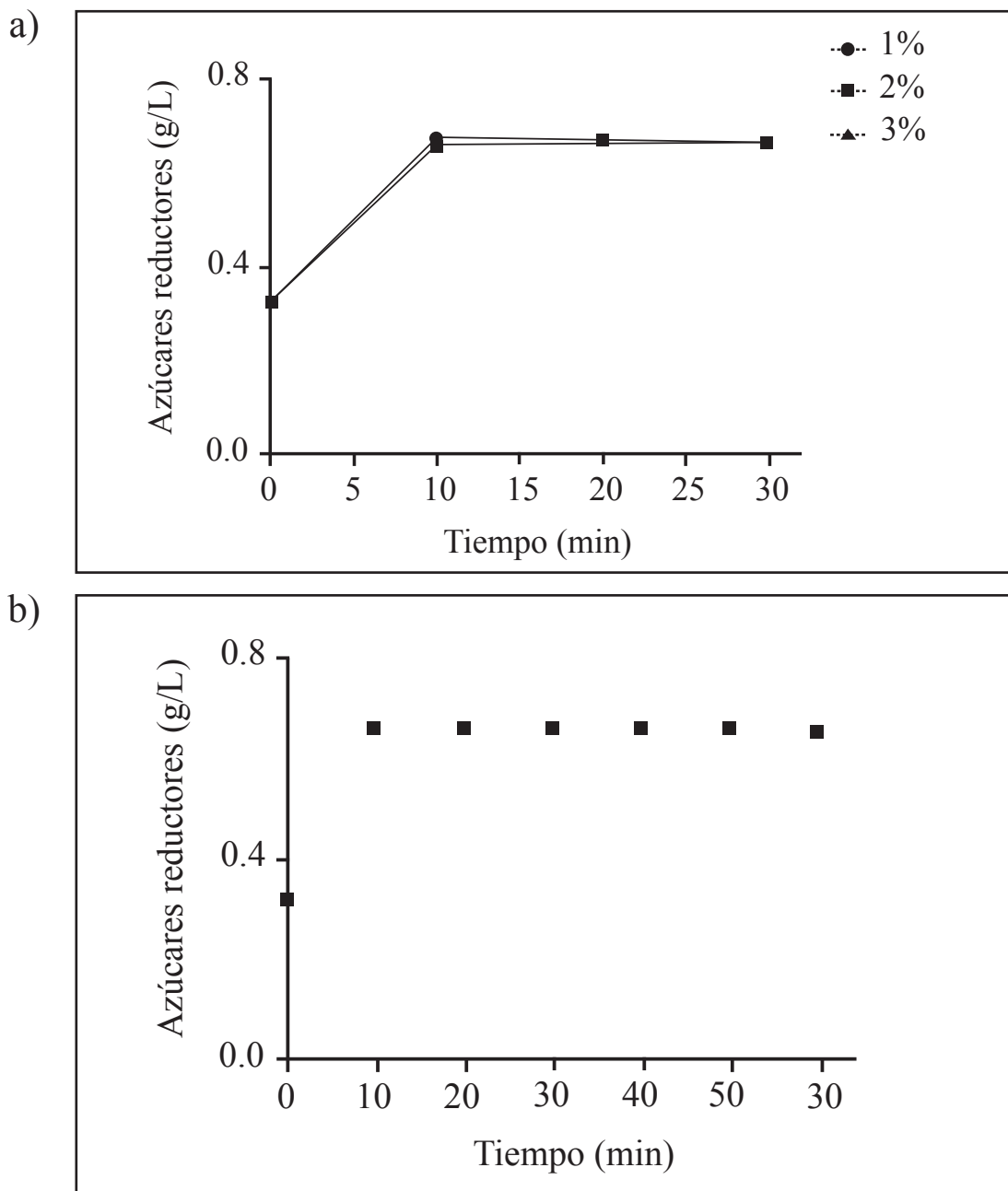


Figura 8. Efecto del pretratamiento termo-ácido en la liberación de los azúcares reductores del BA 1:10 g/L en H_2SO_4 (1, 2 y 3% como se describe en la *figura 8a*) a una temperatura ($^\circ\text{C}$): de 110 (líneas punteadas); 130 (líneas discontinuas); 140 (líneas continuas). Expuesto a un tiempo de 30 min (a) o 60 min con las mejores condiciones de hidrólisis (b). Los valores son la media de tres réplicas del experimento $\pm\text{DE}$



6.3. Análisis mediante HPLC de la fracción líquida después de la hidrólisis termo-ácida del BA

Se llevó a cabo el análisis por cromatografía líquida de alta eficiencia de la concentración de azúcares reductores (glucosa, xilosa y fructosa) de las muestras del tiempo inicial y del tiempo final del pretratamiento termo-ácido a las mejores condiciones (H_2SO_4 a 110°C por 10 min). En la *figura 9* se muestra la concentración de azúcares (g/L) presentes al inicio y al final del pretratamiento, se aprecia que no existen diferencias significativas en la concentración de glucosa presente al inicio del pretratamiento (0.63 g/L) con respecto a la concentración de glucosa al final del mismo (0.65 g/L), mientras que los azúcares xilosa y fructosa no se encontraron presentes en las muestras.

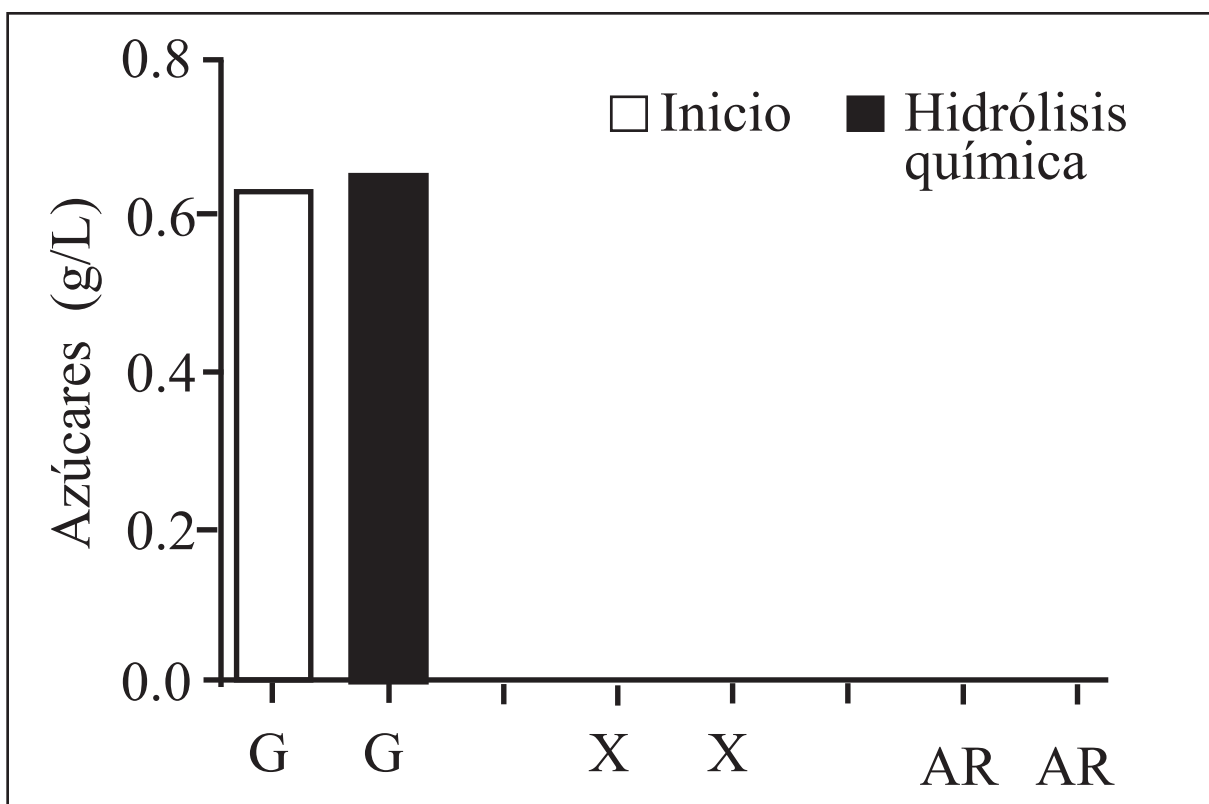


Figura 9. Azúcares liberados en la fracción soluble antes (blanco) y después (negro) del pretratamiento termo-ácido del BA. Glucosa (G); Xilosa (X); Arabinosa (AR). Los valores son la media de tres réplicas del experimento $\pm$ DE.

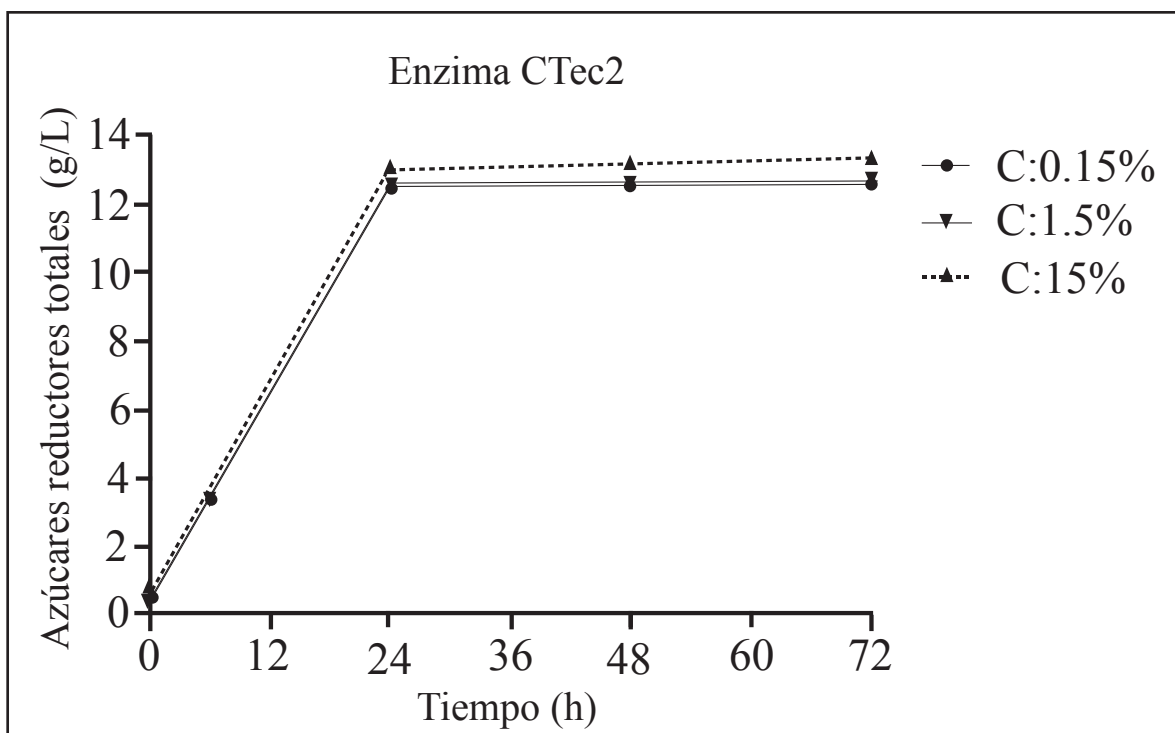
6.4. Hidrólisis enzimática del BA después del pretratamiento termo-ácido

Mediante el ensayo de DNS se analizó la concentración de azúcares reductores totales liberados durante el proceso de hidrólisis enzimática del BA pretratado. La hidrólisis enzimática se llevó a cabo utilizando los tres complejos enzimáticos (CTec2, HTec2, y Rapidaza), a tres concentraciones (0.15, 1.5 y 15%), durante 72 h, a una temperatura de 40°C . En la *figura 10 a* se observa que la concentración de enzima CTec2 al 15% generó una mayor liberación de azúcares

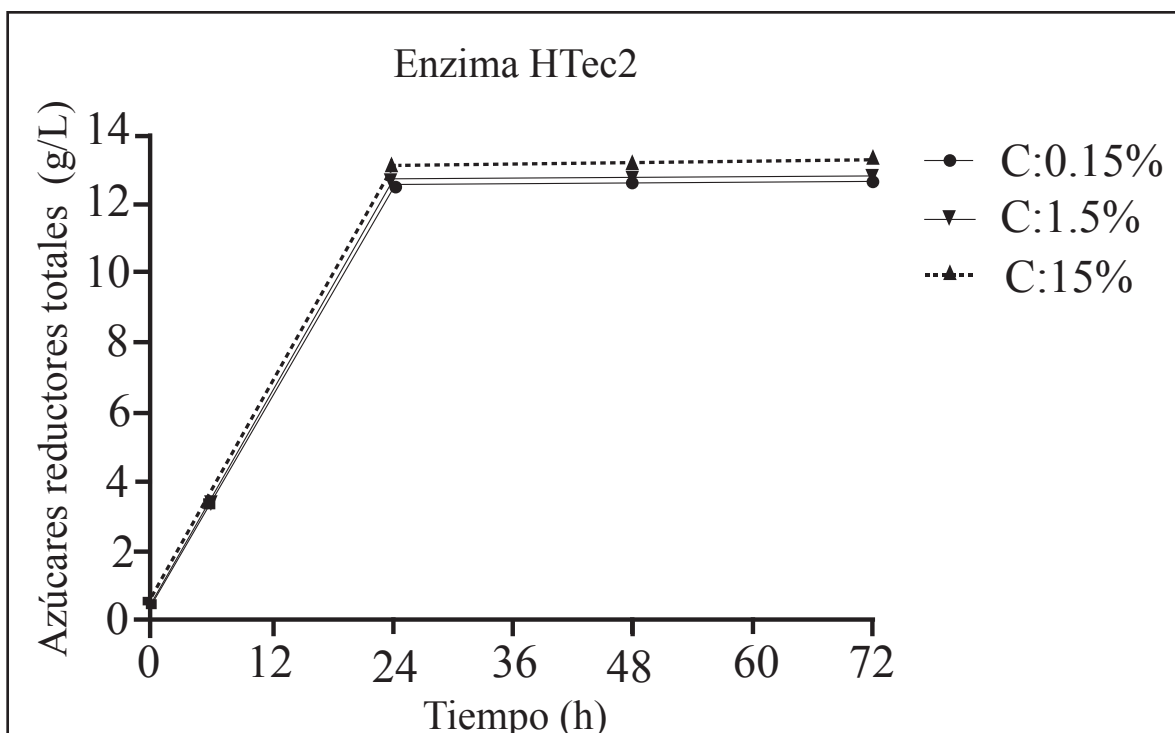


a las 48 y 72 h, mientras que a las 24 h de hidrólisis enzimática no se observaron diferencias en la cantidad de azúcares liberadas en función de la concentración de enzima. El comportamiento en la liberación de los azúcares mediante la hidrólisis con las enzimas HTec2 y Rapidaza (*Figura 10 b y c*, respectivamente), fue similar al observado con la enzima CTec2, donde la mayor liberación de azúcares fue utilizando la enzima al 15%, a partir de las 48 h. Para las tres enzimas la concentración de azúcares reductores totales liberados fue alrededor de 13 g/L.

a)



b)



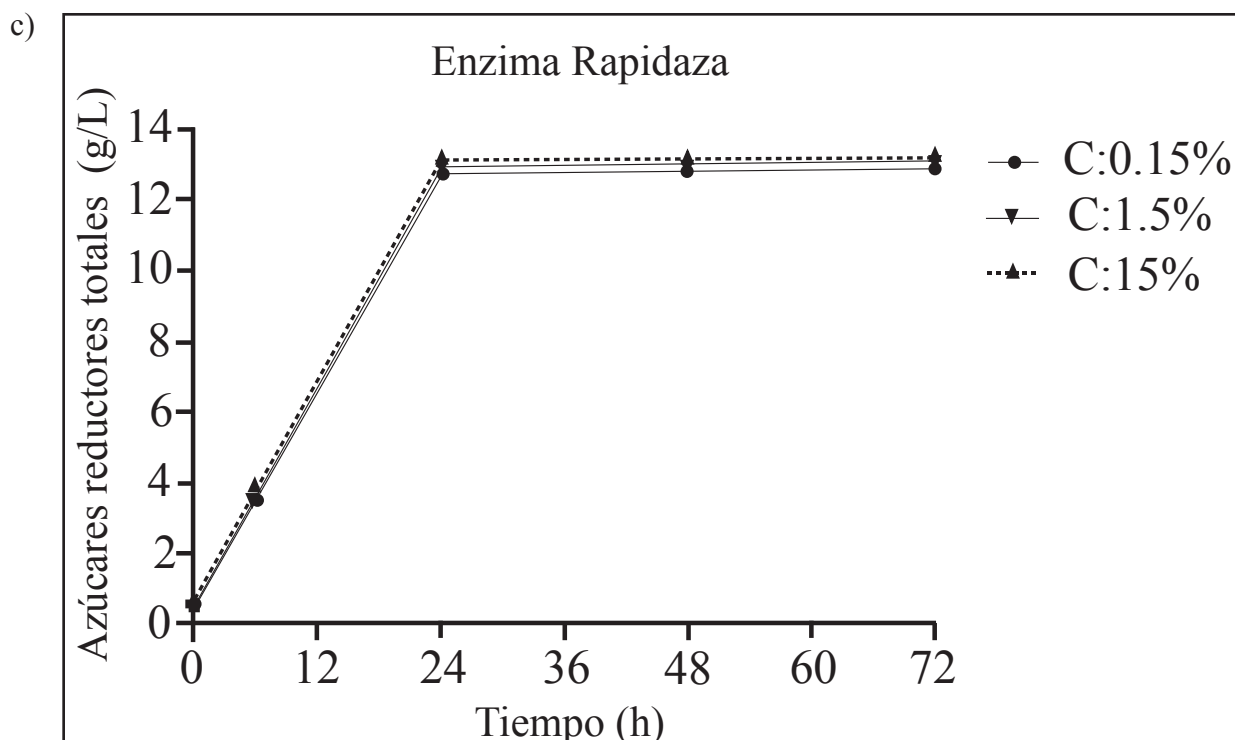


Figura 10. Azúcares reductores totales generados durante la hidrólisis enzimática del BA pretratado con H_2SO_4 . Las determinaciones se realizaron a las 0, 24, 48 y 72 h de haber adicionado los complejos enzimáticos. Los valores son la media de tres réplicas del experimento $\pm$ DE.

6.5. Análisis mediante HPLC de la fracción líquida después de la hidrólisis enzimática del BA

Se llevó a cabo el análisis por cromatografía líquida de alta eficiencia de los tipos de azúcares reductores liberados mediante la hidrólisis enzimática. El análisis se llevó a cabo a las 48 h de la hidrólisis enzimática utilizando una concentración de 1.5% de los complejos enzimáticos (CTec2, HTec2 y Rapidaza). En la *figura 11* se observa que la mayor proporción de los azúcares liberados fue generada por glucosa, alcanzando la mayor concentración con el complejo enzimático Rapidaza, sin embargo, no presenta una diferencia significativa estadísticamente en comparación con la concentración de glucosa liberada con el complejo enzimático CTec2. El complejo enzimático HTec2 generó la menor concentración de glucosa presentando una diferencia significativa respecto a la concentración liberada por el complejo Rapidaza, pero no respecto a la generada por CTec2. Otro de los azúcares detectados fue la fructosa, para la cual no existen diferencias significativas entre ninguno de los complejos enzimáticos utilizados. Los azúcares xilosa y arabinosa no fueron identificados en las muestras.

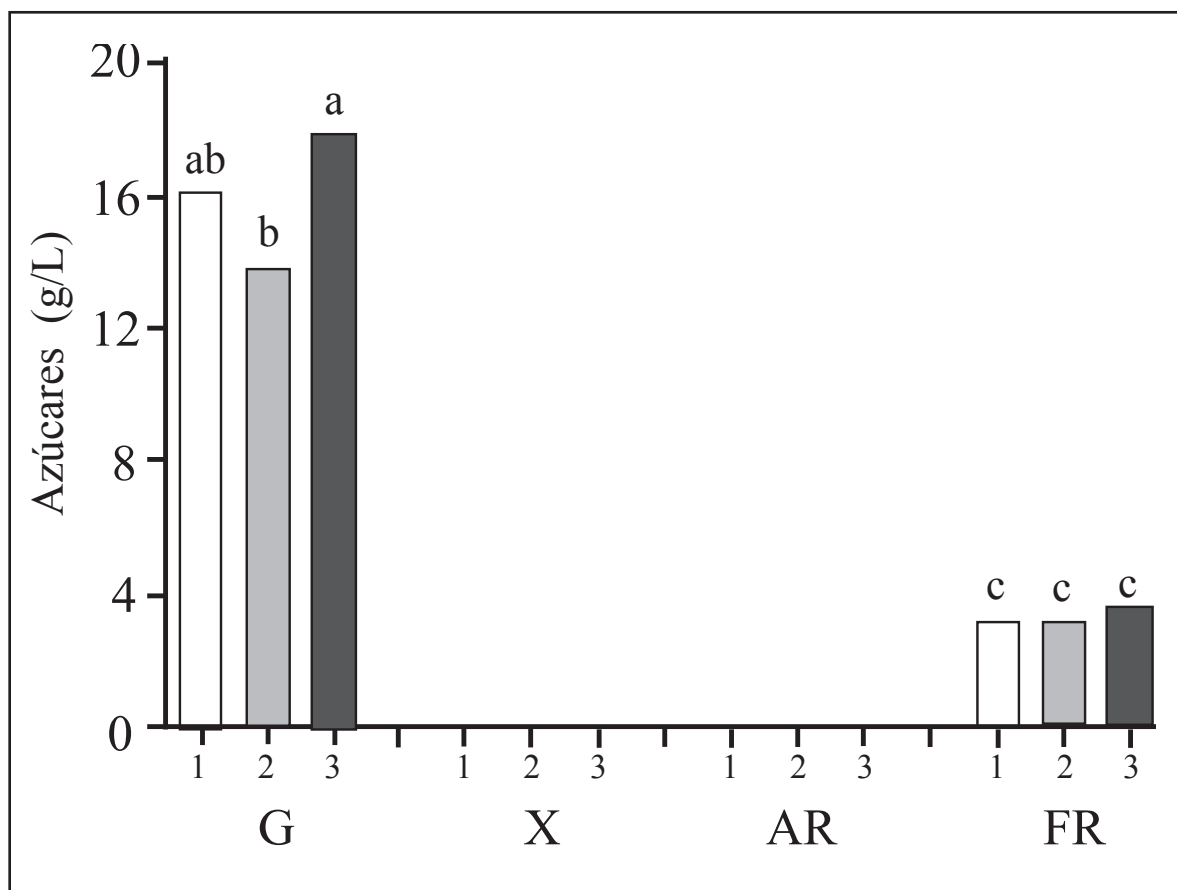


Figura 11. Azúcares presentes en la fracción soluble después del pretratamiento termo-ácido e hidrólisis enzimática del BA a las 48 h utilizando una concentración de 1.5 g de enzima/g de BA (peso seco). Complejos enzimáticos empleados: CTe2 (1); HTec2 (2); Rapidaza (3). Azúcares: Glucosa (G); Xilosa (X); Arabinosa (AR); Fructosa (FR). Se realizó análisis de varianza (ANOVA), se utilizó la prueba de comparación de medias múltiple Tukey ($p < 0.05$). Los valores son la media de tres réplicas del experimento $\pm$ DE.

El mayor porcentaje de azúcares teórico liberado a las 48 h en el proceso de hidrólisis enzimática se obtuvo mediante el complejo enzimático Rapidaza (65%), seguido del complejo enzimático CTec2 (64%), mientras que el menor porcentaje se obtuvo utilizando el complejo enzimático HTec2 (60%) (*Tabla 5*).

Tabla 5. Porcentaje teórico de azúcares liberados después del pretratamiento ácido y la hidrólisis enzimática del BA.

(%)			
Enzima	C	H	RAP
48 h	64±0,7	60±2,1	65±1,7

Complejos enzimáticos empleados: CTec2 (C), HTec2 (H) y Rapidaza (RAP) a una concentración de 1.5 g de enzima/g de BA (peso seco). Los valores son la media de tres réplicas del experimento $\pm$ DE.



6.6. Análisis de productos de los procesos de fermentación del BA

En la *tabla 6* se muestran los productos obtenidos mediante el uso de la levadura termotolerante SLP1 y de la no termotolerante OFF1, ambas del género *K. marxianus*. De igual manera se muestran los productos de los procesos de fermentación de la levadura industrial *S. cerevisiae* Ethanol Red.

La concentración de azúcares residuales después de 48 h de los procesos de fermentación (SHF y SSF) fue similar para las tres levaduras. Los valores fueron de 9 a 11 g/L de glucosa residual. En cuanto a la producción de glicerol, aunque no se observa una diferencia en la concentración producida, en función de la levadura o proceso de fermentación utilizado, sí hay una mayor concentración cuando fue utilizado el BA obtenido de la sacarificación con la enzima Rapidaza, con valores de hasta 4.8 g/L. Con los hidrolizados obtenidos con las enzimas CTec2 y HTec2, las concentraciones fueron de alrededor de 2 g/L. La mayor producción de etanol fue de 10 g/L, generada en dos condiciones por la levadura termotolerante SLP1, mientras que la levadura OFF1 igualmente generó 10 g/L de etanol en una condición. Mientras que para la levadura SLP1 la mayor producción de etanol fue por el proceso SHF y SSF, para la levadura OFF1 fue mediante el proceso de SSF. La levadura *S. cerevisiae* Ethanol Red fue la que presentó la menor producción de etanol, ya que de las seis condiciones generadas en 3 condiciones generó menos de 6 g/L de etanol, la mayor concentración de etanol producido por esta levadura fue de 9 g/L. Las mayores concentraciones de etanol producidas no muestran una correlación con la enzima utilizada para la hidrólisis. En función del proceso de fermentación, de las 6 condiciones generadas con las dos levaduras *K. marxianus*, en cinco se observó una mayor producción de etanol mediante SSF, mientras que con la levadura *S. cerevisiae* en todos los casos la mayor producción de etanol fue a través del proceso SHF (*Tabla 7*).

Tabla 6. Productos de los procesos de fermentación del BA.

Levadura		Compuestos (g/L)								
		Glucosa			Glicerol			Etanol		
		C	H	R	C	H	R	C	H	R
SLP1	SHF	9±0,18	10±0,07	9±0,08	2,5±0,07	2,6±0,59	4,8±0,51	10±1,2	7,2±1,2	7,5±0,55
	SSF	9±0,02	10±1,4	10±0,4	2,2±0,02	2±0,02	3±0,05	7,5±0,2	8,3±0,47	10±0,88
OFF1	SHF	10±0,07	9±0,14	9±0,27	2,6±0,028	2,4±0,23	4,2±0,02	9,8±3	8,6±4,9	6,4±0,24
	SSF	10±0,25	9±0,44	9±0,41	2,4±0,01	2,5±0,04	3±0,08	10±0,61	9,6±0,18	9,6±2,4
Ethanol Red	SHF	10±0,05	10±0,25	9±0,16	0	2,4±0,18	3,3±0,41	4,8±0,04	9±1,3	8,7±2,3
	SSF	9±0,42	9±0,09	11±0,13	2,4±0,02	2,2±0,09	3,2±0,14	4,5±0,2	6,9±1,7	5,6±0,52

Proceso de sacarificación fermentación separada (SHF) y proceso de sacarificación fermentación simultánea (SSF). Las muestras se tomaron 48 h después de la inoculación de las respectivas levaduras. Las fermentaciones se llevaron a cabo en matraces a 40°C con agitación constante de 100 rpm. Complejos enzimáticos utilizados: CTec2 (C), HTec2 (H) y Rapidaza (R) a una concentración de 1.5 g de enzima/g de BA (peso seco). Los valores son la media de dos réplicas del experimento ±DE.



7. DISCUSIÓN

El bagazo de agave (BA) es uno de los principales residuos agroindustriales producidos en México (Valdez-Vazquez *et al.*, 2010), cuya cantidad corresponde a un 40% (peso húmedo) del agave utilizado durante la producción de tequila y mezcal (Chávez-Guerrero *et al.*, 2010). Estudios previos han demostrado el potencial del BA como una fuente de biomasa lignocelulósica para producir bioetanol (Hernández-Salas *et al.*, 2009; Saucedo-Luna *et al.*, 2010; Perez-Pimienta *et al.*, 2012; Caspeta *et al.*, 2014), sin embargo, en estos estudios no se ha considerado el uso de levaduras termotolerantes, aun cuando las levaduras termotolerantes han sido utilizadas para producir bioetanol a partir de otros materiales lignocelulósicos (Suryawati *et al.*, 2008; Ballesteros *et al.*, 2003; Narra *et al.* 2015; Yang *et al.* 2015). Por otro lado, tampoco se ha investigado el proceso de sacarificación fermentación simultánea (SSF) a partir de BA, a pesar de que este proceso puede mejorar el rendimiento de bioetanol y reducir la inversión de tiempo y energía en comparación con el proceso de sacarificación fermentación separada (SHF) (Dahnum *et al.*, 2015). Ya que la levadura *Kluyvermyces marxianus* es la especie de levadura etanológica con mayor capacidad termotolerante, y varias de sus cepas han sido investigadas para llevar a cabo el proceso de SSF a partir de otros materiales lignocelulósicos (Mejía-Barajas *et al.*, 2016); en este trabajo se sugirió que es posible obtener una mejor producción de bioetanol mediante el proceso de SSF utilizando una levadura termotolerante *K. marxianus*, comparada con la producción obtenida mediante el proceso de SHF, usando una levadura *K. marxianus* no termotolerante o una levadura *S. cerevisiae*.

El BA utilizado en este estudio fue de una destilería cuyo procesamiento de las piñas del agave es a través de difusor, proceso explicado por Casas, (2006). Ya que la hidrólisis termo-ácida es un método que ha sido ampliamente utilizado para llevar a cabo el pretratamiento de la biomasa lignocelulósica debido a que es económico y eficaz, Carreón *et al.*, (2009), y Cardona *et al.*, (2010) describen este método como el pretratamiento mediante el cual se obtiene el mejor rendimiento de azúcares a partir de bagazo; en este trabajo fue el método utilizado para el tratamiento del BA. Al realizar el pretratamiento con H_2SO_4 se observó una reducción en la proporción de hemicelulosa y un aumento porcentual de celulosa (Tabla 4, a y b), coincidiendo con lo reportado por Chandel *et al.*, 2012, donde menciona que el tratamiento termo-ácido genera una degradación de hemicelulosa. Aunque Cardona *et al.*, 2010 reportan que la concentración de ácido, temperatura y tiempo son factores que afectan el rendimiento de azúcares liberados durante el pretratamiento, en este trabajo no se observó tal efecto (Figura 8 a), ya que aun con el aumento de estos factores, la mayor liberación de azúcares (0.66 g/L) se mantuvo sin cambios (Figura 8 b). Saucedo-Luna *et al.*, (2010) reportaron las mejores condiciones para el pretratamiento termo-ácido del BA a una concentración de ácido sulfúrico 2%, y temperatura de 147°C por 15 min, mientras que en este trabajo fueron de 1%, 110°C y 15 min. La concentración de glucosa en la fracción líquida del BA se mantuvo igual antes y después del pretratamiento termo-ácido (Figura 9), indicándonos que el pretratamiento no degradó este azúcar en el BA. Las concentraciones de azúcares liberados fue menor en comparación con los resultados reportados por Saucedo-Luna *et al.*, (2010). Se sugiere que esto se debe a que en este trabajo se utilizaron las fibras íntegras del BA, ya que no se empleó un método para reducir el tamaño de partícula de las fibras, puesto que esto requiere una mayor inversión de energía y equipo, lo que conlleva



a una elevación en los costos de producción del proceso (Taherzadeh y Karimi, 2008; Cuervo *et al.*, 2009). El BA es un residuo lignocelulósico con un bajo contenido en lignina (Nuñez *et al.*, 2011), razón por la cual este componente no fue determinado en el análisis composicional del BA.

Los complejos enzimáticos comerciales han sido utilizados ampliamente en la producción de bioetanol de segunda generación, tanto en el proceso de SSF como en SHF (Hernández- Salas *et al.*, 2009; Machado *et al.*, 2010). En este estudio los complejos enzimáticos comerciales utilizados fueron CTec2, HTec2 y Rapidaza, ya que anteriormente se ha reportado una alta liberación de azúcares mediante su uso (Hang Woodams 2001; Jabbour *et al.*, 2013; Dahnum *et al.*, 2015). De acuerdo con Dahnum *et al.* (2015), la concentración de enzima afecta directamente la cantidad de azúcares liberados, ya que cuanto mayor es la concentración de enzima mayor es el rendimiento de azúcares, por otro lado, debe considerarse las implicaciones económicas que conlleva utilizar concentraciones altas de enzimas durante el proceso (Ballesteros *et al.*, 2003), por lo que cuanto menor sea la concentración de enzima utilizada a la cual se obtiene un rendimiento óptimo de azúcares más económico resultará el proceso. Dahnum *et al.* (2015) y Saucedo-Luna *et al.* (2010) reportaron la máxima concentración de azúcares liberados a las 72 h de la hidrólisis enzimática; en este trabajo la concentración máxima de azúcares liberados durante el proceso de sacarificación se obtuvo a las 48 h, concentración que se mantuvo sin presentar diferencias significativas hasta 72 h (Figura 10). Saucedo-Luna *et al.* (2010) reportaron una liberación teórica de azúcares de 73.6%, mientras que en este trabajo fue de 65%. Los resultados anteriores sugieren que el tratamiento termo-ácido del BA proveniente de difusor, podrían estar influyendo en la actividad de las enzimas, sin embargo, para asegurar lo anterior es necesario realizar el proceso de sacarificación sin previo pretratamiento del BA.

Tanto la SHF como la SSF se llevaron a cabo utilizando 10% g/L de BA, ya que de acuerdo con Rosgaard *et al.*, (2007) el contenido de biomasa para llevar a cabo la fermentación, especialmente en el proceso de SSF, debe limitarse a un 10%, debido a la viscosidad de los materiales lignocelulósicos. El proceso de SHF se llevó a cabo utilizando las condiciones de hidrólisis ácida y enzimática que generaron la mayor liberación de azúcares. De acuerdo con Dahnum *et al.*, (2015) el tiempo óptimo mediante el cual se obtiene la mayor concentración de etanol durante la SSF es a las 48 h después de la inoculación de las levaduras, a su vez Saucedo-Luna *et al.*, (2010) reportaron la máxima concentración de etanol a las 48 h del comienzo de la fermentación, razón por la cual se analizaron los metabolitos presentes en los procesos de fermentación a las 48 h de haber sido inoculadas las levaduras. Mientras que la mayor concentración de bioetanol obtenida (10 g/L) fue mediante el uso de las levaduras *K. marxianus*, ambas en el proceso de SSF, la levadura *S. cerevisiae* Ethanol Red presentó una máxima producción de 9 g/L, esto mediante el proceso de SHF (Tabla 6). Moreno *et al.* (2013) generaron mediante la cepa de *K. marxianus* CECT 10875 rendimientos de etanol similares a los obtenidos con la cepa industrial de *S. cerevisiae* Ethanol Red. Con este antecedente y los resultados de este trabajo podemos afirmar que las levaduras *K. marxianus*, son capaces de producir concentraciones de etanol similares e incluso superiores a las producidas por levaduras *S. cerevisiae* utilizadas para la producción de etanol industrialmente, como la levadura Ethanol Red. Un alto consumo de azúcares y rendimiento en la producción de etanol, con una baja producción de metabolitos secundarios como el glicerol, se considera como un buen proceso de



fermentación, sin embargo, en nuestros experimentos la concentración de azúcares residuales, producción de glicerol y etanol, fueron similares entre las levaduras *K. marxianus* OFF1 y SLP1, aun cuando la levadura OFF1 a diferencia de la SLP1, no presenta termotolerancia. Lo anterior puede ser debido a que los procesos de fermentación se llevaron a cabo a 40°C, temperatura que podría no estar causando daños significativos en la levadura OFF1 al igual que en la SLP1, ya que se ha reportado que la mayoría de las levaduras *K. marxianus* presentan cierto grado de termotolerancia (Tomás-Pejó *et al.*, 2009). Lo anterior también explica por que la levadura *S. cerevisiae* Ethanol Red, la cual no presenta termotolerancia, generó una menor concentración de etanol, aun cuando los consumos de azúcares fueron similares a las levaduras *K. marxianus*. Ya que el proceso de SSF puede generar mejores rendimientos de bioetanol mediante el empleo de levaduras termotolerantes en temperaturas de 45°C o mayores (Abreu-Cavalheiro y Monteiro, 2013; Caspeta *et al.*, 2014), se propone aumentar la temperatura de los procesos de fermentación con las levaduras *K. marxianus* OFF1 y SLP1, lo cual permitiría observar de manera más significativa las diferencias en la producción de etanol mediante el uso de levaduras termotolerantes y no termotolerantes en el proceso de SSF.



8. CONCLUSIÓN

El uso de levaduras *K. marxianus* termotolerantes en el proceso de SSF promueve una mayor producción de bioetanol de segunda generación.

9. PERSPECTIVAS

Analizar la influencia del pretratamiento termo-ácido del BA en el grado de hidrólisis enzimática.

Estudiar el efecto de temperaturas mayores en el proceso de SSF utilizando levaduras *K. marxianus*.



10. REFERENCIAS

- Abreu-Cavalheiro, A. y Monteiro, G. (2013). Solving ethanol production problems with genetically modified yeast strains. *Brazilian Journal Of Microbiology*, 44(3), 665-671. <http://dx.doi.org/10.1590/s1517-83822013000300001>
- Abril, D. y Abril, A. (2009). Ethanol from lignocellulosic biomass. *Ciencia e investigación agraria*, 36(2), 177–190.
- Álvarez Maciel, C. (2009). Biocombustibles: desarrollo histórico-tecnológico, mercados actuales y comercio internacional. *Economía Informa*, 359, 63-89.
- Araque, E. C., Parra, M., Rodríguez, J., Freer y J. Baeza. (2008). Selection of thermotolerant yeast strains *Saccharomyces cerevisiae* for bioethanol production. *Enzyme And Microbial Technology*, 43(2), 120-123. <http://dx.doi.org/10.1016/j.enzmitec.2008.02.007>
- Ashfaq, A., Kaifiyan, M. y Mohammad, S. (2015). Review Article Production Technologies, Economic Performance and Future Development Policies of Alternative Fuels : An Environmental Approach. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 4(4), 617–624
- Associate Scientist, Novozymes North Americas. (2010). *Cellic® CTec2 and HTec2 Enzymes for hydrolysis of lignocellulosic materials*. (pp. 1-9). Bagsvaerd: Novozymes.
- Associate Scientist, Novozymes North America, (2010). *Performance Improvement and Versatility on Commercial Lignocellulosic Feedstocks Using NOVOZYMES CELLIC® CTEC2*. (pp.1-15). San Luis: Croonenberghs, J.
- Awasthi, P., Shrivastava, S., Kharkwal, A. C. y Varma, A. (2015). Review Article Biofuel from agricultural waste : A review. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 4(1), 470–477.
- Baeyens, J., Kang, Q., Appels, L., Dewil, R., Lv, Y. y Tan, T. (2015). Challenges and opportunities in improving the production of bio-ethanol. *Progress in Energy and Combustion Science*, 47, 60–88. <http://doi.org/10.1016/j.pecs.2014.10.003>
- Ballesteros, M., Oliva, J., Negro, M., Manzanares, P. y Ballesteros, I. (2004). Ethanol from lignocellulosic materials by a simultaneous saccharification and fermentation process (SFS) with *Kluyveromyces marxianus* CECT 10875. *Process Biochemistry*, 39(12), 1843-1848. <http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2003.09.011>
- Barrera, L., Amezcua- Allieri, M., Estupiñan, L., Martínez, T. y Aburto, J. (2016). Technical and economical evaluation of bioethanol production from lignocellulosic residues in Mexico: Case of sugarcane and blue agave bagasses. *The Institution of Chemical Engineers.*, 107, pp.91-101.
- Bhat, M. K. (2000). Cellulases and related enzymes in biotechnology. *Biotechnology Advances*, 18(5), 355–383.



Cardona, C. A., Quintero, J. A. y Paz, I. C. (2010). Bioresource Technology Production of bioethanol from sugarcane bagasse : Status and perspectives. *Bioresource Technology*, 101(13), 4754–4766. <http://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.10.097>

Casas, R. (2006). Between traditions and modernity: Technological strategies at three tequila firms. *Technology In Society*, 28(3), 407-419. <http://dx.doi.org/10.1016/j.techsoc.2006.06.007>
Caspeta, L., Chen, Y., Ghiaci, P., Feizi, A., Buskov, S. y Hallstrom, B. (2014). Altered sterol composition renders yeast thermotolerant. *Science*, 346(6205), 75-78. <http://dx.doi.org/10.1126/science.1258137>

Caspeta, L., Cario Bermúdez, M., Ponce-Noyola, T. y Martínez, A. (2013). Enzymatic hydrolysis at high-solids loadings for the conversion of agave bagasse to fuel ethanol. 113, 277-286. doi:10.1016/j.apenergy.2013.07.036

Carreón Rodríguez, O., Ramos López, A., Centeno Leija, S., Leal Reyes, L., Martínez Jiménez, A. y Fernández Sandoval, M. (2009). Etanol Carburante. *BioTecnología*, 13(3), pp.79-102.
Chandel, A., Antunes, F., de Arruda, P., Milessi, T., da Silva, S. y de Almeida Felipe, M. (2012). Dilute Acid Hydrolysis of Agro-Residues for the Depolymerization of Hemicellulose: State-of-the-Art. *D-Xylitol*, 39-61. http://dx.doi.org/10.1007/978-3-642-31887-0_2

Chávez-Guerrero, L., Flores, J. y Kharissov, B. (2010). Recycling of ash from mezcal industry: A renewable source of lime. *Chemosphere*, 81(5), 633-638. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2010.08.042>

Chi-Yang, Y., Bo-Hong, J. y Kow-Jen, D. (2013). Production of bioethanol from carrot pomace using the thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus*, *Energies*, 6(3), 1794-1801.

Chu, D., Zhang, J. y Bao, J. (2012). Simultaneous Saccharification and Ethanol Fermentation of Corn Stover at High Temperature and High Solids Loading by a Thermotolerant Strain *Saccharomyces cerevisiae* DQ1. *Bioenergy Research*, 5(4), 1020-1026. <http://dx.doi.org/10.1007/s12155-012-9219-x>

Consejo Regulatorio del Tequila, 2016. Producción total de tequila. Recuperado de: <<https://www.crt.org.mx/EstadisticasCRTweb/>>.

Consejo Regulatorio del Tequila, 2016. Consumo de agave para Tequila y Tequila 100%. Recuperado de:< <https://www.crt.org.mx/EstadisticasCRTweb/>>.

Costa, D., de Souza, C., Costa, P., Rodrigues, M., dos Santos, A. y Lopes, M. et al. (2014). Physiological characterization of thermotolerant yeast for cellulosic ethanol production. *Applied Microbiology And Biotechnology*, 98(8), 3829-3840. <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-014-5580-3>



Cuervo, L., Folch, J. L. y Quiroz, R. E. (2009). Lignocelulosa Como Fuente de Azúcares Para la Producción de Etanol. *BioTecnología*, 13(3), 11–25.

Dahnum, D., Octavia, S., Triwahyuni, E. y Nurdin, M. (2015). Comparison of SHF and SSF processes using enzyme and dry yeast for optimization of bioethanol production from empty fruit bunch. *Energy Procedia*, 68, 107–116. <http://doi.org/10.1016/j.egypro.2015.03.238>

Muruaga, M., Carvalho, K., Domínguez, J., de Souza Oliveira, R. y Perotti, N. (2016). Isolation and characterization of *Saccharomyces* species for bioethanol production from sugarcane molasses: Studies of scale up in bioreactor. *Renewable Energy*, 85, 649-656. <http://dx.doi.org/10.1016/j.renene.2015.07.008>

Dufey, A. (2006). Biofuels production, trade and sustainable development: emerging issues. *International Institute for Environment and Development*, 1-54.

Fengel, D. y G. Wegener. (1984). Wood-chemistry, Ultrastructure Reactions. *Journal Of Polymer Science: Polymer Letters Edition*, 23(11), 601-602. <http://dx.doi.org/10.1002/pol.1985.130231112>

Foster, C., Martin, T. y Pauly, M. (2010). Comprehensive Compositional Analysis of Plant Cell Walls (Lignocellulosic biomass) Part II: Carbohydrates. *Journal of Visualized Experiments*, (37), pp.1-4.

García, C. A., Riegelhaupt, E. y Masera, O. (2013). Escenarios de bioenergía en México: potencial de sustitución de combustibles fósiles y mitigación de GEI. *Revista Mexicana de Física*, 59(2), 93–103.

German Advisory Council on Global Change. (2009). *Future Bioenergy and Sustainable Land Use*. (pp. 1-393). Berlin: Earthscan.

Gonçalves, F., Sanjinez-Argandoña, E. y Fonseca, G. (2011). Utilization of Agro-Industrial Residues and Municipal Waste of Plant Origin for Cellulosic Ethanol Production. *Journal Of Environmental Protection*, 02(10), 1303-1309. <http://dx.doi.org/10.4236/jep.2011.210150>

Hang, Y. y Woodams, E. (2001). Enzymatic Production of Reducing Sugars from Corn Cobs. *LWT - Food Science And Technology*, 34(3), 140-142. <http://dx.doi.org/10.1006/fstl.2000.0733>

Hahn-Hagerdal, B., Karhumaa, K., Fonseca, C., Spencer-Martins, I. y Gorwa-Grauslund, M. (2007). Towards industrial pentose-fermenting yeast strains. *Applied Microbiology and Biotechnology* 74, 937–953.

Hari Krishna, S., Janardhan Reddy, T. y Chowdary, G. (2001). Simultaneous saccharification and fermentation of lignocellulosic wastes to ethanol using a thermotolerant yeast. *Bioresource Technology*, 77(2), 193-196. [http://dx.doi.org/10.1016/S0960-8524\(00\)00151-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0960-8524(00)00151-6)



Hernández-Salas, J.M., Villa-Ramírez, M.S., Veloz-Rendón, J.S., Rivera-Hernández, K.N., González-César, R.A., Plascencia-Espinosa, M.A. y Trejo-Estrada, S.R. (2009). Comparative hydrolysis and fermentation of sugarcane and agave bagasse. *Bioresource Technology*, 100, 1238–1245.

Hu, N., Yuan, B., Sun, J., Wang, S. y Li, F. (2012). Thermotolerant *Kluyveromyces marxianus* and *Saccharomyces cerevisiae* strains representing potentials for bioethanol production from Jerusalem artichoke by consolidated bioprocessing. *Applied Microbiology And Biotechnology*, 95(5), 1359-1368. <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-012-4240-8>

Intergovernmental Panel on Climate Change. (2007). *Summary for Policymakers. In: Climate Change 2007: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change* (pp. 1-19). Cambridge and New York: Solomon, S., Qin, D., Manning, M., Chen, Z., Marquis, M., Averyt, K.B., Tignor, M., y Miller, H.L.

Jabbour, D., Borrusch, M., Banerjee, G. y Walton, J. (2013). Enhancement of fermentable sugar yields by α -xylosidase supplementation of commercial cellulases. *Biotechnology For Biofuels*, 6(1), 58. <http://dx.doi.org/10.1186/1754-6834-6-58>

Jorgensen, S. y Fath, B. (2008). *Encyclopedia of Ecology* (1st ed., pp. 1548-1541). Amsterdam: Elsevier B. A.

Koedrith, P., Dubois, E., Scherens, B., Jacobs, E., Boonchird, C. y Messenguy, F. (2008). Identification and characterization of a thermotolerant yeast strain isolated from banana leaves. *Scienceasia*, 34(2), 147. <http://dx.doi.org/10.2306/scienceasia1513-1874.2008.34.147>

Lynd, L., Weimer, P., van Zyl, W. y Pletorius, I. (2002). Microbial Cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 66(3), 506-577. Doi:10.1128/MMBR.66.3.506–577.2002

Lynd, L.R. (1996). Overview and evaluation of fuel ethanol from cellulosic biomass: technology, economics, the environment and policy. *Annual Reviews Energy Environ*, 21, 403-465.

Leu, S. Y. y Zhu, J. Y. (2013). Substrate-related factors affecting enzymatic saccharification of lignocelluloses: our recent understanding. *Bioenergy Research*, 6(2), 405–415.

Liu, Y., Zhou, H., Wang, L., Wang, S. y Fan, L. (2016). Improving *Saccharomyces cerevisiae* growth against lignocellulose-derived inhibitors as well as maximizing ethanol production by a combination proposal of γ -irradiation pretreatment with in situ detoxification. *Chemical Engineering Journal*, 287, 302-312. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cej.2015.10.086>

Machado de Castro, A., Ferreira, M., da Cruz, J., Pedro, K., Carvalho, D., Leite, S. y Pereira, N. (2010). High-Yield Endoglucanase Production by *Trichoderma harzianum* IOC-3844 Cultivated in Pretreated Sugarcane Mill Byproduct. *Enzyme Research*, 2010, 1-8. <http://dx.doi.org/10.4061/2010/854526>



Martínez Anaya, C., Balcázar López, E., Dantán González, E. y Folch Mallol, J. (2008). Celulasas fúngicas: Aspectos biológicos y aplicaciones en la industria energética. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 50 (3-4), 119-131.

Martínez-Torres J., Barahona-Pérez, F., Lappe-Oliveras, P., Garcia-Marin, P.C., Magdub-Mendez, A., Vergara-Yoisura, S. y Larque-Saavedra, A. (2011). Ethanol production from two varieties of henequen (*Agave fourcroydes* Lem). *GCB Bioenergy*, 3(1), 37-42. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1757-1707.2010.01081.x>

Mejía-Barajas, J., Saavedra-Molina., A., Montoya-Pérez, R. y Cortés-Rojo, C. (2016). Levaduras Termotolerantes: Aplicaciones Industriales, Estrés Oxidativo y Respuesta Antioxidante.

Melo, V. y Cumatzi, O. (2007). *Bioquímica de los procesos Metabólicos* (2nd ed., pp.160-162). Barcelona: Reverté S.A.

Miller, G.L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, 31(3), 426–428.

Moreira N. (2005). Growing expectations: new technology could turn fuel into a bump crop. *Science News Online*, 168 (14), 209-224.

Moreno, A., Ibarra, D., Ballesteros, I., González, A. y Ballesteros, M. (2013). Comparing cell viability and ethanol fermentation of the thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus* and *Saccharomyces cerevisiae* on steam-exploded biomass treated with laccase. *Bioresource Technology*, 135, 239-245. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2012.11.095>

Mussatto, S. I. y Teixeira, J. A. (2010). Lignocellulose as raw material in fermentation processes. *Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*, 2, 897–907.

Narra, M., James, J. y Balasubramanian, V. (2015). Simultaneous saccharification and fermentation of delignified lignocellulosic biomass at high solid loadings by a newly isolated thermotolerant *Kluyveromyces* sp. for ethanol production. *Bioresource Technology*, 179, 331-338. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2014.11.116>

Nevárez Quiñones, D. (2012). *Aprovechamiento de residuos agroforestales para el cultivo de hongos comestibles (Pleurotus sp.)*. (Maestría). Instituto Politécnico Nacional.

Norma Oficial Mexicana NOM-006-SCFI-2005, Bebidas Alcohólicas-Tequila. México.

Norma Oficial Mexicana NOM-070-SCFI-1994, Bebidas Alcohólicas-Mezcal. México.

Núñez, H. M., Rodríguez, L.F. y Khanna, M. (2011). Agave for tequila and Biofuels: an economic assessment and potential opportunities. *Global Change Biol. Bionergy* 3, 43-57.



Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos. (2013). *Evaluaciones de la OCDE sobre el desempeño ambiental: MÉXICO 2013*. (pp. 1-622). OCDE Publishing.

Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. (2008). *El estado mundial de la agricultura y la alimentación. Biocombustibles: Perspectivas, riesgos y oportunidades* (pp. 1-110). Roma: Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación.

Ovando-chacon, S. L. y Waliszewski, K. N. (2005). Preparativos de Celulasas Comerciales y Aplicaciones en Procesos Extractivos. *Universidad y Ciencia*, 21(42), 111–120.

Pathway.yeastgenome.org. (2016). *Saccharomyces cerevisiae superpathway of glucose fermentation*. [online] Available at: <http://pathway.yeastgenome.org/YEAST/NEW-IMAGE?type=PATHWAY&object=GLUCFERMEN-PWY> [Accessed 28 Jul. 2016].

Perez-Pimienta, J., Lopez-Ortega, M., Varanasi, P., Stavila, V., Seema Singh, G. y Simmons, B. (2012). Comparison of the impact of ionic liquid pretreatment on recalcitrance of agave bagasse and switchgrass. *Bioresource Technology*, 127, 18-24. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2012.09.124>

Ramírez Cortina, C., Alonso Gutiérrez, M. y Rigal, L. (2012). Tratamiento alcalino de los residuos agroindustriales de la producción del tequila para su uso como complementos de rumiantes. *Revista Aidis de Ingeniería y Ciencias Ambientales: Investigación, desarrollo y práctica*, 5(2), 69-77.

Red Mexicana de bioenergía, A.C. (2011). *LA BIOENERGÍA EN MÉXICO. Situación actual y perspectivas*. (pp. 1-39). México: Red Mexicana de bioenergía, A.C.

Renewable fuels association. [<http://www.ethanolrfa.org/news/entry/global-ethanol-production-to-reach-85.2-billion-litres-in-2012>].

Rosgaard, L., Andric, P., Dam-Johansen, K., Pedersen, S. y Meyer AS. (2007). Effects of substrate loading on enzymatic hydrolysis and viscosity of pretreated barley straw. *Appl Biochem Biotechnol*, 143, 27–40.

Rubin E. (2008). Genomics of cellulose biofuels. *Nature* 454(7206), 841-845. <http://dx.doi.org/10.1038/nature07190>

Sagarpa.gob.mx. (2016). *Inauguración de la Planta Piloto para la producción de etanol a través del Agave Mezcalero y Tequilero*. [online] Available at: <http://www.sagarpa.gob.mx/Delegaciones/michoacan/boletines/Paginas/B1102015.aspx> [Accessed 28 Jul. 2016].

Sagarpa.gob.mx. (2016). *Inauguran planta piloto para producción de bioetanol a base de sorgo dulce en Veracruz*. [online] Available at: <http://www.sagarpa.gob.mx/saladeprensa/2012/Paginas/2015B571.aspx> [Accessed 28 Jul. 2016].

Saval, S. (2012). Aprovechamiento de Residuos Agroindustriales: Pasado, Presente y Futuro Susana. *BioTecnología*, 16(2), 14-46.

Saucedo-Luna, J., Castro-Montoya, A., Martinez-Pacheco, M., Sosa-Aguirre, C. y Campos-Garcia, J. (2010). Efficient chemical and enzymatic saccharification of the lignocellulosic residue from Agave tequilana bagasse to produce ethanol by *Pichia caribbica*. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 38(6), 725-732.



Serna, F., Barrera, L. y Montiel, H. (2011). Impacto Social y Económico en el Uso de Biocombustibles. *Journal of Technology Management & Innovation*, 6(1), 101-114.

Silveira Buckeridge, M., Dantas dos Santos, W. y Pereira de Souza, A. (2014). ROUTES FOR CELLULOSIC ETHANOL IN BRAZIL. In: *Sugarcane bioethanol — R&D for Productivity and Sustainability*, (1st ed., pp.365-380). São Paulo: Edgard Blücher.

Suryawati, L., Wilkins, M. R., Bellmer, D. D., Huhnke, R. L., Maness, N. O. y Banat, I. M. (2008). Simultaneous Saccharification and Fermentation of Kanlow Switchgrass Pretreated by Hydrothermolysis Using *Kluyveromyces marxianus* IMB4. *Biotechnology and Bioengineering*, 101(5), 894–902. <http://doi.org/10.1002/bit.21965>

Taherzadeh, M. y Karimi, K. (2008). Pretreatment of Lignocellulosic Wastes to Improve Ethanol and Biogas Production: A Review. *International Journal Of Molecular Sciences*, 9(9), 1621-1651. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms9091621>

Talebnia, F., Karakashev, D. y Angelidaki, I. (2010). Production of bioethanol from wheat straw: An overview on pretreatment, hydrolysis and fermentation. *Bioresource Technology*, 101(13), 4744-4753. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2009.11.080>

Taylor, M., Eley, K., Marti, S., Tuffin, M., Burton, S. y Cowan, D. (2009). Thermophilic ethanologenesi: future prospects for second-generation bioethanol production. *Trends in Biotechnology*, 27(7), 398-405.

Tomás-Pejó, E., Oliva, J., González, A., Ballesteros, I. y Ballesteros, M. (2009). Bioethanol production from wheat straw by the thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus* CECT 10875 in a simultaneous saccharification and fermentation fed-batch process. *Fuel*, 88(11), 2142-2147.

United Nations Conference on Trade and Development. (2008). *Biofuel production technologies: status, prospects and implications for trade and development* (pp. 1-49). New york y Geneva: United Nations Secretariat.

United States Department of Agriculture. (2015). *Biofuel Use in International Markets: The Importance of Trade* (pp.1-31). Washington: Economic Research Service.

Valdez-Vazquez I, Acevedo-Benitez J A y Hernandez-Santiago C. (2010). Distribution and potential of bioenergy resources from agricultural activities in Mexico. *Renew. Sust. Energy Rev.* 14, 2147-2153.

West, T.P y I.I. Kennedy. (2014). Isolation of Thermotolerant Yeast Strains for Ethanol Production: A Need for New Approaches. *Journal of Microbial & Biochemical Technology*, 6, 120. <http://dx.doi.org/10.4172/1948-5948>.

World Energy Council. (2013). *World Energy Resources 2013. Survey: Summary* (pp. 1-129). London: World Energy Council.



Yang, J., Wei, Z., Wanga, Q., He, M., Li, S. y Irbis, C. (2015). Bioethanol production from sodium hydroxide/hydrogen peroxide pretreated water hyacinth via simultaneous saccharification and fermentation with a newly isolated thermotolerant *Kluyveromyces marxianus* strain. *Bioresour Technology*, 193,103–109. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2015.06.069>.

Zaldivar, J., Nielsen, J. y Olsson, L. (2001). Mini- review fuel ethanol production from lignocellulose: a challenge for metabolic engineering and process integration. *App. Microbiol. Biotechnol.* 56,17-34.

Zhang, M. y Shukla, P. (2010). Improved bioethanol production through simultaneous saccharification and fermentation of lignocellulosic agricultural wastes by *Kluyveromyces marxianus* 6556, 1041–1046. <http://doi.org/10.1007/s11274-009-0267-0>