



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**SELECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE CEPAS
FERMENTADORAS PARA SU APLICACIÓN EN LA
PRODUCCIÓN DE BIOETANOL**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

PRESENTA

CLAUDIA GABRIELA GARCÍA CALDERÓN

MÉXICO, D.F.

AÑO 2013



JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Dr. José Guillermo de Jesús Aguilar Osorio

VOCAL: Dr. Francisco Ruíz Terán

SECRETARIO: Dra. Carmina Montiel Pacheco

1er. SUPLENTE: M en B. Beatriz Ruiz Villafán

2° SUPLENTE: Verónica Domínguez Valdez

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

LABORATORIO 314 CONJUNTO E FACULTAD DE QUÍMICA. UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

ASESOR DEL TEMA:

Dra. Carmina Montiel Pacheco

SUSTENTANTE:

Claudia Gabriela García Calderón

**Este trabajo fue realizado con el apoyo del proyecto BABETHANOL
FQ-674**

CONTENIDO

Resumen	1
Introducción	2
Hipótesis	4
Objetivos	4
- Objetivos Particulares	4
Antecedentes	5
Biocombustibles. Contexto Internacional	5
Biocombustibles. Definición y Tipos.	7
Bioetanol.	8
Agroresiduos	11
Celulosa	12
Hemicelulosa	12
Lignina	13
Componentes minoritarios	14
Influencia de la composición estructural sobre el aprovechamiento energético	14
Agave tequiliana	15
Bagazo	17
Hidrólisis enzimática	18
La fermentación alcohólica	21
Microorganismos fermentadores	22
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	23
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	24
Comparación entre <i>S. cerevisiae</i> y <i>K. marxianus</i>	25
Metodología	26
Aislamiento de cepas a partir de muestras de Tequila y Agave	26
Determinación de azúcares reductores por Ácido 3,5- Dinitrosalicílico (DNS)	28
Oxidación de alcoholes primarios	28
Tinción Simple	
Identificación genética de las cepas (ITS)	29
Cromatografía de gases	30
Caracterización de Cepas.	31
Fermentaciones	31
Hidrólisis Enzimática y fermentación de bagazo de agave azul	32
Composición del producto de la hidrólisis enzimática del Bagazo de Agave	32
Fermentación después de la Hidrólisis	33
Resultados y Discusión.	33
Identificación de Microorganismos	33
Efecto de la temperatura sobre el crecimiento y producción de etanol.	45
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> R11	45
<i>Kluyveromyces marxianus</i> Pp202	46

Efecto del pH	47
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> R11	47
<i>Kluyveromyces marxianus</i> Pp202	48
Efecto de la concentración inicial de glucosa	49
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> R11	49
<i>Kluyveromyces marxianus</i> Pp202	50
Comparación de las cepas Sc R11, Thermosacc y Ehtanol Red en la producción de etanol	51
Composición del producto de la hidrólisis enzimática del Bagazo de Agave	53
Fermentaciones con sustrato lignocelulósico: Bagazo de agave azul (BAB).	54
Conclusiones	59
Perspectivas	60
Anexo	61
Apéndice	65
Bibliografía.	68

Resumen

Ante la problemática mundial que representa la escasez de recursos no renovables como los Hidrocarburos, principal fuente de los combustibles utilizados en la mayoría de transportes, y basado en la experiencia internacional, un programa de producción de Bioetanol como biocombustible en México, es necesario con el fin de realizar una transición hacia sistemas de transporte sustentable.

Debido a las dificultades técnicas, ambientales y económicas que surgen al producir este Biocombustible a partir maíz, caña de azúcar y trigo, entre otras fuentes, se ha optado por buscar nuevas tecnologías. La producción de Bioetanol a partir del bagazo es una tecnología que se encuentra en desarrollo, por lo que es necesario buscar nuevos recursos que permitan desarrollarla y optimizarla.

El objetivo de esta tesis es realizar el aislamiento de distintas cepas a partir de muestras de bagazo de tequila y pulque, seleccionar las dos mejores y caracterizarlas considerando los siguientes parámetros: pH, temperatura y concentración inicial de glucosa, con el fin de obtener las condiciones óptimas bajo las cuales el rendimiento obtenido en la producción de Etanol es mayor. Posteriormente producir etanol con el bagazo de agave azul (BAB por sus siglas en inglés) como materia prima y las levaduras seleccionadas.

Se obtuvieron alrededor de 38 cepas aisladas a partir de pulque y de bagazo para las. Una vez aisladas fueron secuenciadas y se identificaron como *Saccharomyces cerevisiae* y *Kluyveromyces marxianus*.

Posteriormente se hicieron fermentaciones variando los parámetros de temperatura, pH y concentración inicial de glucosa.

El trabajo se realizó en el Laboratorio 314 del Conjunto E en la Facultad de Química, Departamento de Biotecnología y Alimentos bajo el Proyecto de Babethanol.

Introducción

En la actualidad los biocombustibles se hacen presentes de manera creciente en las agendas de producción e inversión privadas y en las políticas públicas estatales de países desarrollados y en desarrollo.

Varios factores confluyen en la explicación de la importancia creciente que están adquiriendo los biocombustibles: 1) La búsqueda de fuentes alternativas de energía, para reducir la dependencia de los combustibles fósiles, no renovables, básicamente petróleo, apoyándose en el uso de biomasa. 2) La tendencia al aumento en los precios del petróleo y su impacto en los países importadores netos de combustible, que buscan disminuir su dependencia energética. 3) Los efectos nocivos al medio ambiente, provocados a partir de las emisiones de gases de efecto invernadero (GEI). Y 4) Los acuerdos internacionales para controlarlas emisiones de gases de efecto invernadero (GEI), que comprenden el compromiso para el uso en proporciones crecientes de combustibles no contaminantes.

El Bioetanol ha surgido como una alternativa energética importante, principalmente en el sector de transporte, donde se usa en mezclas con la gasolina o nafta convencional, substituyéndola parcialmente como carburante.

Debido a las dificultades técnicas, ambientales y económicas que surgen al producir este Biocombustible a partir maíz, caña de azúcar y trigo, entre otras fuentes, se ha optado por buscar nuevas tecnologías. La producción de bioetanol a partir de residuos agroindustriales es una tecnología que se encuentra en desarrollo, por lo que es necesario buscar nuevos recursos que permitan desarrollarla y optimizarla.(Goldstein & Gutman, 2010)

En este trabajo se aislaron distintas cepas fermentadoras a partir de muestras de bagazo de tequila (*Agave tequilana*) y pulque, se seleccionaron las dos mejores y se estudió el efecto de pH, temperatura y concentración de glucosa, con la finalidad de encontrar las condiciones óptimas de crecimiento y producción de etanol en un medio sintético y se evaluó la capacidad de fermentación en un medio con bagazo de agave azul BAB (por sus siglas en inglés Blue Agave Bagasse). Para el análisis se emplearon técnicas de: cromatografía de gases para la determinación de la concentración, el método de ácido dinitrosalícilico (DNS) para determinar la concentración de azúcares reductores.

Al mismo tiempo las cepas seleccionadas fueron identificadas genéticamente, empleando la amplificación de la región espaciadora interna transcrita ITS (por sus siglas en inglés Internal Transcribed Spacer), como *Saccharomyces cerevisiae* y *Kluyveromyces marxianus*.

Hipótesis

El aislamiento de microorganismos, a partir de medios con presencia de etanol (pulque) o en materiales como el bagazo de agave, que han estado en algún punto del proceso de fermentación del *Agave tequilana* permitirá obtener cepas capaces de fermentar principalmente glucosa proveniente de residuos agroindustriales para su uso en la producción de bioetanol.

Objetivos

- Objetivo General

Aislar e identificar cepas provenientes de muestras de pulque y bagazo de agave, para posteriormente utilizarlas en la producción de bioetanol con bagazo de *Agave tequilana* como materia prima.

- Objetivos Particulares

- Aislar microorganismos a partir de muestras de pulque y de bagazo de agave.
- Seleccionar e identificar las cepas.
- Caracterizar las mejores cepas con los siguientes parámetros: temperatura, pH y concentración de glucosa a las cuales el rendimiento de etanol es mayor.
- Realizar la hidrólisis enzimática y la fermentación con bagazo de agave (previamente tratado) utilizando las cepas seleccionadas.

Antecedentes

Biocombustibles. Contexto Internacional

El incremento en el uso de los combustibles fósiles ha sido responsable del efecto invernadero debido a las emisiones de gases, y ha creado un daño serio al medio ambiente. La inestabilidad actual en los suministros del petróleo, así como las constantes fluctuaciones en los precios del mismo (Figura 1), han provocado un interés generalizado en fuentes de energía alternativas; más económicas sustentables y respetuosas con el medio ambiente.

El sector de transporte es donde se consume la mayor proporción de energía, 30% de la energía global, y el 99% de esta energía es provista por el petróleo (EIA 2007); debido a esto, en este sector es donde es necesaria una alternativa energética a corto plazo.(Goldstein & Gutman, 2010)

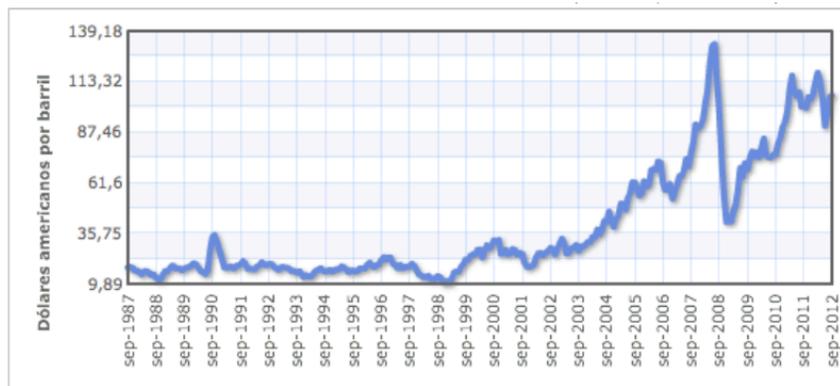


Figura 1. Histórico del precio anual de petróleo crudo (1987-2012), en el mes de Septiembre. (Promedio de tres precios; Brent Fechado, Intermedio de Texas Oeste y Dubai Fateh) Fuente: World Bank tomado de <http://www.indexmundi.com/es/precios-de-mercado>

Al parecer no existe una alternativa que pueda competir completamente al petróleo en términos de costos y conveniencia para el sector de transporte. Sin embargo, en la actualidad, los biocombustibles como el etanol y el biodiesel están surgiendo como alternativas importantes empleadas en vehículos eléctricos/híbridos y vehículos de gas natural.

Un conjunto de elementos, y rasgos tecno-económico y regulatorios que caracterizan a la producción de biocombustibles a nivel global son:

a) La producción de biocombustibles forma parte de alguna de las cadenas de producción agroindustriales consolidadas (principalmente las de granos oleaginoso, maíz y caña de azúcar), y como tal, compite por el uso alimentario de estos cultivos y está influenciada por la dinámica conjunta de estos complejos. En muchos casos, sólo son un subproducto de la actividad principal de la cadena (y/o una alternativa en el uso de parte de las resultantes de la primera industrialización de granos oleaginosos, según la evolución de los precios mundiales y de los contextos regulatorios e impositivos locales).

b) Las inversiones privadas en estas producciones están fuertemente condicionadas por la evolución de los precios relativos internacionales de las materias primas agrícolas y del petróleo, teniendo en cuenta que el costo de la materia prima explica el 50% del costo total en la producción del bioetanol y el 75% en la de biodiesel.

En todos los casos, se trata de mercados fuertemente regulados y reglamentados, en donde la obligatoriedad del cruce de naftas y diesel con biocombustibles impulsa la producción (y/o la importación) de los mismos. En los principales países industrializados existen fuertes subsidios estatales y barreras arancelarias para promover su producción.

c) Las tecnologías disponibles para la producción de los biocombustibles de primera generación (basados en biomasa usada para la producción de alimentos) son accesibles y difundidas. Las alternativas en el uso de biomasa para la producción de biocombustibles de segunda o tercera generación existen principalmente en proyectos demostrativos o plantas pilotos. Entre las nuevas tecnologías, las derivadas de la biotecnología moderna abren importantes oportunidades potenciales para la producción de biocombustibles que no compitan con los usos alimenticios de los cultivos. Se destacan las asociadas a enzimas celulósicas para la producción de etanol a partir de biomasa celulósica (rastrajo de maíz, bagazo, residuos de madera, aserrín, entre otros) y de residuos industriales y municipales. Empresas multinacionales líderes en los agronegocios y en la producción de insumos biotecnológicos están realizando importantes inversiones en la exploración de

nuevas alternativas tecnológicas, y los gobiernos de países industrializados implementan programas de apoyo para el desarrollo de estas alternativas.

d) El tipo de biocombustibles producido, en cada país, depende de la oferta de materia prima (clima, situación geográfica, conformación de la producción agropecuaria), de las tecnologías disponibles y de las políticas públicas de fomento. Los principales países productores de biocombustibles son EEUU (etanol de maíz), Brasil (etanol de azúcar de caña) y la Unión Europea (biodiesel). Diversos países participan en la oferta de etanol (Australia, Canadá, China entre otros); en biodiesel se registra una fuerte expansión en países del sudeste asiático (Malasia, Indonesia, Singapur y China), de América Latina (Brasil y Argentina) y de Europa del Este (Rumania y Serbia)(Goldstein & Gutman, 2010).

Biocombustibles. Definición y Tipos.

Existe una variedad de biocombustibles, de materias primas para su producción y de tecnologías de proceso con diversos grados de llegada al mercado. La producción actual, como se señaló previamente, se basa en su mayor parte, en materias primas usadas para la alimentación humana o animal.

Biocombustibles de primera generación. Son aquellos producidos comercialmente usando tecnologías convencionales. Las materias primas básicas son azúcares, almidones o aceites vegetales, provenientes de semillas o granos de cultivos tales como el maíz, la caña de azúcar, el trigo, semillas de soja o girasol, aceite de palma. El biocombustible más común es el bioetanol, que representa actualmente más del 80% de la producción mundial de biocombustibles líquidos, seguido del biodiesel, y, más distanciado el biogas.

Biocombustibles de segunda generación. Se obtienen a partir de una variedad de materias primas no alimentarias que incluyen biomasa de deshecho, tallos de trigo, rastrojo de maíz, madera, pastos perennes, plantas celulósicas, cultivos energéticos o biomasa de cultivos especiales, residuos orgánicos municipales. Para su producción se usan tecnologías llamadas de biomasa a líquidos (BaL), por

conversión termoquímica (principalmente para producir biodiesel), o por fermentación (para la producción de etanol celulósico). Los procesos productivos son más complejos. Muchos biocombustibles en esta categoría se encuentran en etapa de desarrollo, tales como el bioetanol, el biohidrógeno, el diesel Fischer-Tropsch, o el diesel biohidrógeno.

Biocombustibles de tercera generación. Son aquellos producidos a partir de algas cultivadas para obtener biodiesel del aceite de alga. La tecnología de proceso - una vez obtenido el aceite de las algas a través de métodos por solventes, prensado o con enzimas- es la misma tecnología usada para la producción de biodiesel de segunda generación. Se incluye también en esta categoría la producción de biopropanol bio-butanol, los que se estima que no serán comercialmente viables antes del 2050, para los que pueden utilizarse las mismas materias primas que para el etanol. (Goldstein & Gutman, 2010)

Bioetanol.

El Etanol ha sido parte de la cultura humana desde el principio de los tiempos, pero no fue hasta el final del siglo XIX que fue usado por primera vez como combustible. En la actualidad casi todo el bioetanol producido a partir de recursos renovables es producido en Brasil, Canadá y EUA. En la última década, tan sólo en Estados Unidos, la producción de bioetanol se incrementó de 6.2 (año 2000) a 50 billones de litros/ por año (año 2010). (D. Kumar & Murthy, 2011). Así mismo se observa un incremento de la producción de etanol en las potencias productoras de este biocombustible (Figura 2).

BIOETANOL-MERCADOS MUNDIALES
(en millones de galones)

	2005	2006	2007	2008	2009
I: PRODUCCION					
EEUU (maíz)	3.904	4.884	6.521	9.309	10.699
Brasil (caña de azúcar)	4.163	4.531	5.524	6.547	6.915
Canadá (trigo y maíz)	76	99	187	237	279
China (trigo y maíz)	301	425	448	516	542
UE (caña de azúcar, maíz, trigo, otros)		432	486	703	803
India (caña de azúcar)	335	501	577	443	298
TOTAL MUNDIAL	8.780	10.873	13.742	17.754	19.536
II: EXPORTACIONES NETAS					
Brasil (caña de azúcar)	720	867	930	1.039	945
China (trigo y maíz)	38	267	34	28	35
TOTAL MUNDIAL	794	1.134	964	1.068	980
Precios de exportación (dólares por galón)*	1,31	1,72	1,55	1,74	1,60

Notas: * Precio de Etanol anhidrico de Brasil

El total de las exportaciones netas es la suma de todas las exportaciones netas positivas

Figura 2. Producción de Bioetanol en mercados mundiales. Tomado de (Goldstein & Gutman, 2010)

El etanol puede ser usado como combustible para transporte empleándolo en mezclas con la gasolina o nafta convencional, substituyéndola parcialmente como carburante; las mezclas más usadas en la actualidad son E25, E15 y E10, es decir, gasolina al 75%, 85% y 90% mezclada con e25, e10 y e15 (mezclas con 25%, 15% y 10% de bioetanol, respectivamente. (Goldstein & Gutman, 2010)

El bioetanol de primera generación como se mencionó previamente se produce a partir de materias primas ricas en azúcares (caña de azúcar, remolacha azucarera) y/o productos que puedan fácilmente convertirse en azúcar, como el almidón proveniente de maíz, trigo y otros cereales. El proceso de producción se basa en la fermentación del azúcar empleando levaduras. La producción de bioetanol a partir de granos utilizan la cáscara del grano (maíz) o el grano completo (trigo). La molienda puede ser seca o húmeda, proceso este último de mayor complejidad. En ambos casos el almidón es convertido en azúcar a partir de procesos enzimáticos. Las siguientes etapas son similares al proceso a partir de azúcares: fermentación usando levaduras y otros microorganismos, para obtener alcohol. Varios subproductos se

generan en estos procesos, principalmente alimentos para animales ricos en proteínas.

Sin embargo, los retos como las limitaciones en la disponibilidad y suministro de materias primas, cuestiones como alimento vs combustible, costos elevados de materias primas, uso de tierras y aguas frescas, inversiones intensivas en la agricultura, han conducido a la investigación de bioetanol de segunda generación (también llamado etanol celulósico), a abordar estas preocupaciones.

La biomasa lignocelulósica (residuos agrícolas, desechos forestales, desechos municipales y algunos industriales), dado su abundancia y bajo costo, son alternativas potenciales para utilizarse como materias primas en la producción de etanol de segunda generación. La producción del etanol celulósico, mediante la conversión biológica, consta de tres pasos críticos: 1) el pretratamiento de la biomasa, 2) la hidrólisis de los polímeros de azúcar (celulosa, hemicelulosa, etc) a monómeros, y 3) la fermentación de monómeros de azúcar a etanol (Figura 3). (D. Kumar & Murthy, 2011)

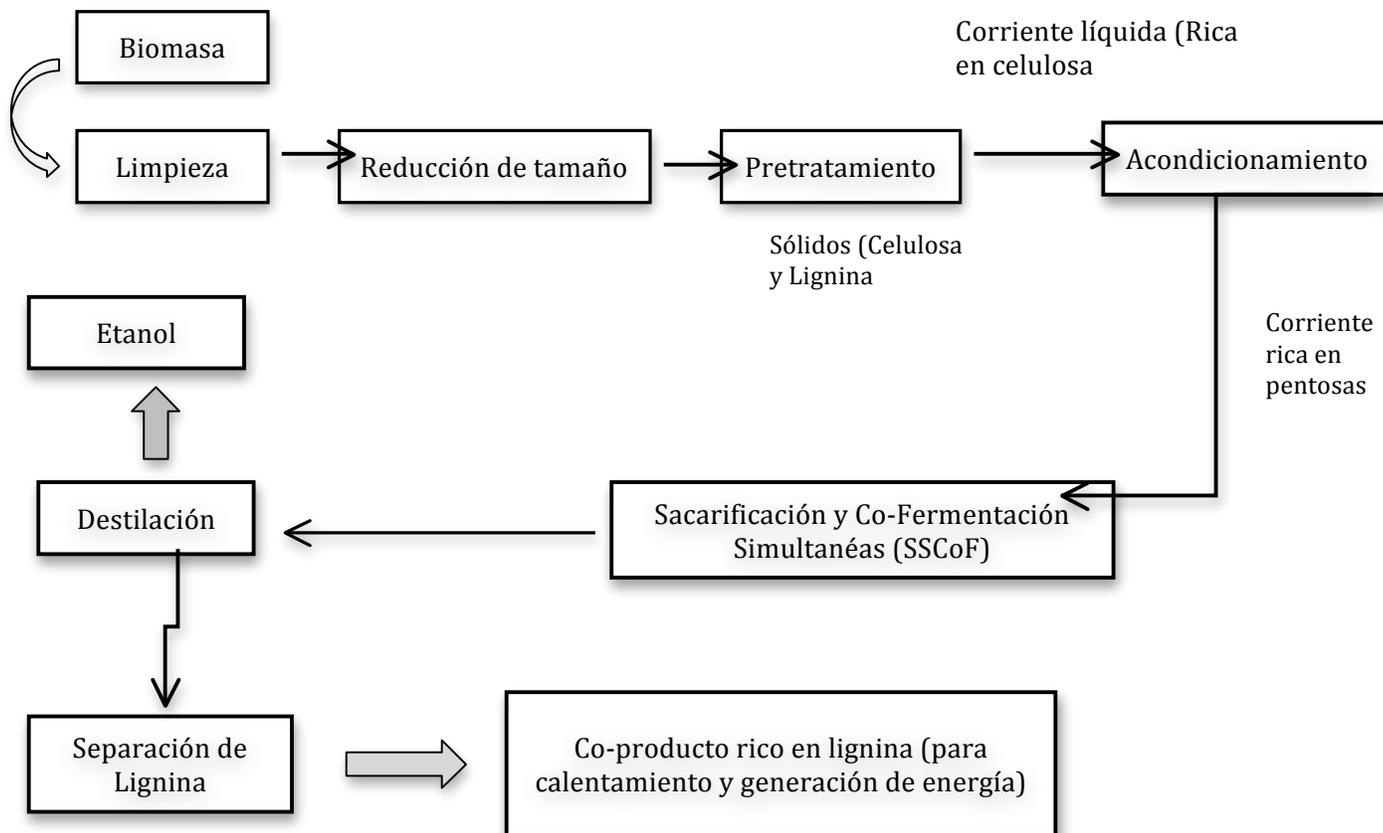


Figura 3 . Proceso de Producción Genérico de Etanol Celulósico. La figura ilustra las operaciones unitarias más comunes en las plantas de producción etanol. Modificada de (D. Kumar & Murthy, 2011)

Agroresiduos

Las materiales lignocelulósicos están compuestos principalmente de celulosa, hemicelulosa, lignina, (las cuales sirven de marco estructural y son la mayor parte, en peso, de la planta); además de extractos y cenizas compuestos de minerales.

Muchas materias primas provenientes de biomasa, pueden ser usadas en la producción de biocombustibles, producción de energía y otros productos como los bioplásticos; debido a que son recursos renovables, tienen una disponibilidad inmediata y anualmente se generan 200 billones de toneladas a nivel mundial. Estas incluyen residuos agrícolas lignocelulosicos, cultivos comestibles y no comestibles, y corrientes de residuos (Ej. Bagazo de la Industria azucarera y tequilera, de productos industriales, y algunos otros).

La composición de la biomasa lignocelulósicavaria entre las diferentes especies, pero por lo general consiste de ~25% lignina y ~75% de polímeros de carbohidratos (celulosa y hemicelulosa) y en mínima parte de extractos y cenizas compuestos de minerales; y es la mayor fuente renovable de carbohidratos conocida hasta el momento. Las porciones celulósicas y hemicelulósicas pueden ser separadas de la lignina y depolimerizadas por hidrólisis para obtener monómeros de azúcar, principalmente glucosa, xilosa y arabinosa.(Garrués et al, 2010)

Celulosa

La celulosa es el componente mayoritario y constituye la base estructural de las células vegetales. Se trata de un polímero de elevado peso molecular formado por moléculas de glucosa unidas por enlaces $\beta(1,4)$ -glucosídicos (Figura 4). Estos enlaces forman fibras impenetrables por el agua y resistentes al ataque químico. La celulosa forma largas cadenas debido a la fluctuante ordenación espacial de los puentes de hidrógeno, que se unen en forma de haz. La celulosa posee gran importancia industrial. Se obtiene preferentemente de la madera o de la paja.(Garrués et al., 2010)

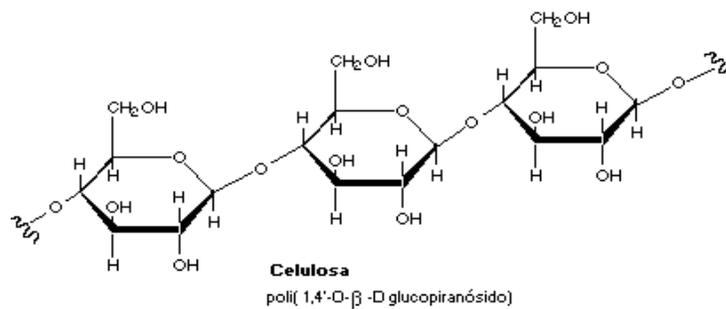


Figura 4. Estructura de la celulosa.Tomada de <http://www.efn.uncor.edu/dep/biologia/intrbiol/macromoleculas/azucar.htm>

Hemicelulosa

La hemicelulosa está siempre acompañando a la celulosa y se encuentran sobre todo en las paredes celulares. A diferencia de la celulosa, la hemicelulosa o poliosa está compuesta por diferentes azúcares formando cadenas más cortas y ramificadas.

Estos azúcares se pueden dividir en diferentes grupos como las pentosas (xilosa, arabinosa), hexosas (glucosa, manosa, galactosa), ácidos hexurónicos (ácidos glucorónico, metilglucorónico y galacturónico) y deoxihexosas (ramnosa y fucosa). (Figura 5). La cadena principal de una poliosa puede consistir en una sola unidad (homopolímero), como por ejemplo los xilanos o en dos o más unidades (heteropolímero), como los glucanomananos. La naturaleza ramificada de la hemicelulosa la hace amorfa y más fácil de hidrolizar que la celulosa. El contenido de hemicelulosa, tanto por cantidad, como por variedad difiere mucho en función de las especies.(Garrués et al., 2010)

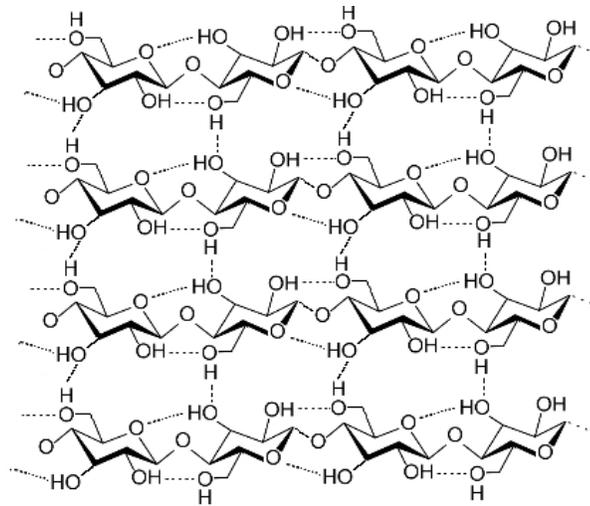


Figura 5. Estructura de la Hemicelulosa. Tomada de <http://www.doitpoms.ac.uk/tlplib/wood/printall.php>

Lignina

Después de la celulosa, la lignina es el polímero más abundante en el mundo vegetal y su función es proporcionar la rigidez a la pared celular, asegurar protección contra la humedad, los agentes atmosféricos y el ataque de microorganismos, además de actuar como elemento de unión de las fibras de celulosa. La lignina es un compuesto formado por un tipo de moléculas distintas de los azúcares. Es un polímero tridimensional amorfo, constituido a partir de unidades de fenilpropano que se unen entre sí por enlaces tipo alquil-aril-éter o carbono-carbono (Figura 6). Su estructura y composición, así como su contenido relativo en la biomasa lignocelulósica, dependen de las diferentes especies.(Garrués et al., 2010)

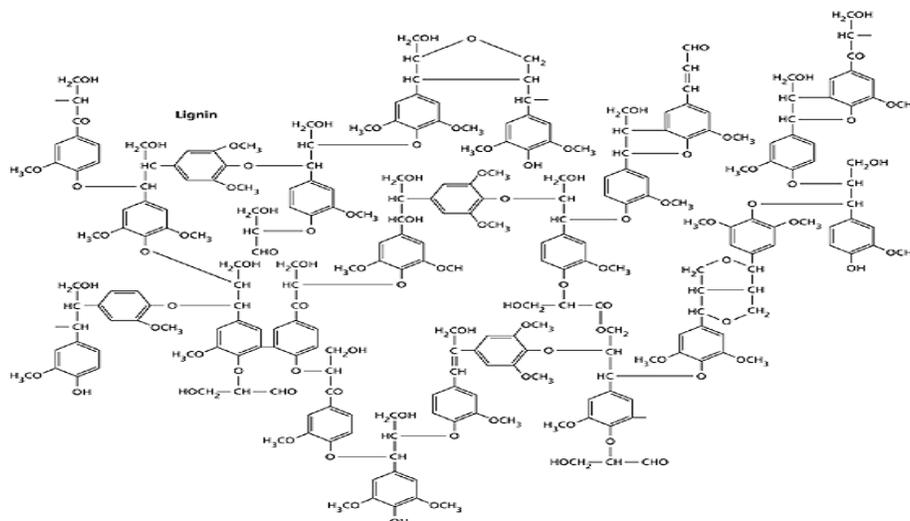


Figura6. Estructura de la lignina.Tomada de <http://5e.plantphys.net/article.php?ch=t&id=24>

Componentes minoritarios

Además de los componentes mayoritarios mencionados, la biomasa lignocelulósica contiene otros productos y por ellos los porcentajes de los componentes principales no siempre suman el 100%. A pesar de estar presentes en menor proporción existen otros compuestos (extractivos y cenizas) que poseen gran influencia en las propiedades y en los procesos de conversión de la biomasa lignocelulósica. Pertenecen a diferentes clases de compuestos químicos, aunque, simplificando, se pueden dividir en dos tipos: extractivos y cenizas.

Los extractivos son los componentes orgánicos de bajo peso molecular. Se llaman así porque se pueden extraer por lavado con agua o con solventes orgánicos. Se incluyen dentro de este grupo: carbohidratos de bajo peso molecular, terpenos, ácidos alifáticos y aromáticos, alcoholes, flavonoides, lignanos, alcaloides, ligninas solubles, ceras, etc. Sus funciones en la célula vegetal son las de protección exterior y reserva de nutrientes.(Garrués et al., 2010)

Las cenizas son la fracción inorgánica del material cuya composición está principalmente formada por sales inorgánicas de calcio, potasio, sodio, magnesio y sílice.

Influencia de la composición estructural sobre el aprovechamiento energético

La composición estructural de la biomasa tiene influencia sobre el poder calorífico de

la materia, siendo la energía desprendida superior en aquellos recursos con mayor porcentaje de lignina. Por otro lado los residuos lignocelulósicos con mayor contenido de lignina precisan de mayor tiempo de residencia para reaccionar completamente (por la complejidad de la estructura).

Durante el almacenamiento de la biomasa, se produce un cambio en la calidad del combustible debido a fenómenos químicos y biológicos. La evolución de la proporción de los tres componentes (lignina, celulosa y hemicelulosa) es un indicador de la degradación de la materia. Así el primer compuesto en degradarse es la hemicelulosa, siendo el porcentaje de lignina el que vaya aumentando durante el proceso de almacenamiento (Richardson et al., 2002).

Puesto que la biodegradabilidad de la celulosa es superior a la de la lignina, la proporción entre los contenidos de celulosa y lignina es un parámetro importante cuando se seleccionan materiales para su conversión bioquímica. Para producir bioetanol de segunda generación, se prefiere una biomasa con un alto porcentaje de celulosa o hemicelulosa. De hecho, por cada tonelada de pasto se puede producir hasta 280 litros de bioetanol mientras que a partir de madera solo se alcanzan 205 litros por tonelada, como resultado del alto contenido de lignina (McKendry, 2002). La lignina es el residuo que quede tras la fermentación de los azúcares a bioetanol.(Garrués et al., 2010)

Agave tequiliana

El género *Agave (sensu stricto)* es una monocotiledónea, endémica de América. De sus aproximadamente 200 especies, 150, es decir más del 75%, se encuentran en México. En nuestro país, los agaves han tenido y tienen una gran importancia económica y cultural, se han aprovechado durante siglos como fuente de alimento, bebida, medicina, combustible, cobijo, construcción de viviendas y elaboración de implementos agrícolas, entre otros usos. Además el género *Agave* tiene una amplia distribución, se encuentra en más del 75% del territorio, sin embargo, su distribución es altamente asimétrica, hay regiones que poseen más especies que otras. (*Consejo*

Regulador del Tequila 2011)

El *Agave tequiliana Weber* es una planta xerófila (que crece en zonas áridas y cálidas) de hojas de color azul-verdoso, delgadas y casi planas (Figura 7); mide aproximadamente 1.25 m de largo y 10 cm de ancho y tiene una espina terminal de color rojo oscuro de 2 cm (Granados, 1993., Bautista-Justo M et al., 2001).

El tequila es uno de los aguardientes más famosos en México y a nivel mundial, cuyo consumo se ha incrementado en los últimos años (Guzmán, 1997). Se obtiene a partir de la planta *Agave tequiliana Weber*, mejor conocido como *Agave azul*. La parte utilizada para la elaboración del tequila es la piña.

El tequila se clasifica en dos tipos de acuerdo a su elaboración: tequila 100% de agave, es en el que se usan exclusivamente los azúcares del *Agave tequiliana Weber* var. *Azul* para su producción y el tequila, al que se le adicionan hasta un 49% de otros azúcares que no son de agave como glucosa, piloncillo o sacarosa (Pinal y Gschaedler, 1998., Bautista-Justo M et al., 2001).



Figura 7. *Agave tequiliana* variedad Weber. Tomada de <http://hablemosdetequila.com/tequilapedia/?p=524>

Es importante señalar que el crecimiento sostenido que la industria tequilera ha manifestado a lo largo de los últimos años, un desarrollo económico y social para las regiones productoras; en datos del Consejo Regulador de Tequila, la producción total de tequila durante el primer semestre de 2012 se ubicó en los 135.3 millones de litros

a 40 % (v/v). De esta cantidad 74.6 millones de litros (55.1% del total) corresponden a la categoría tequila y 60.7 millones (44.9 % del total) a la 100% de agave. Para junio del año en curso se han procesado 466 mil 600 toneladas de *Agave tequilana* *Weber* variedad azul para la producción de ambas categorías de tequila. 285 mil 700 toneladas se utilizaron para la categoría 100% de agave y el resto (180 mil 900) para la categoría tequila. (*Consejo Regulador del Tequila, 2011*)

Bagazo

El bagazo es una fibra residual, que queda después de cocer, moler y extraer los jugos fermentables del agave (Figura 8). Por cada litro de Tequila que se produce se generan aproximadamente 1.5 Kg de bagazo en base húmeda, por lo que se generan importantes volúmenes de este, convirtiéndose en un problema económico y ambiental. (González García et al., 2005)



Figura 8 . Bagazo de Agave tequilana variedad Weber. Tomada de <http://tequilasabeapasion.blogspot.mx/2012/06/tequilapedia.html>

Las fibras de agave están compuestas principalmente de Celulosa (42%), Hemicelulosa (12%), lignina (7.2%), nitrógeno total (3%), Pectina (1%), Azúcares Residuales (10%) y otras sustancias. Tiene un pH= 5.4 y una humedad promedio de 71%. (*Consejo Regulador del Tequila, 2009*)

La visión acerca del bagazo ha cambiado a través de los años, debido a los adelantos tecnológicos, la inversión en oportunidades y el margen de ingresos. Al principio del proyecto Pro-álcohol en los años setenta, en el que se introdujo el etanol de caña de azúcar en larga escala en la matriz de combustibles brasileña y en

donde el bagazo fue considerado como un residuo esponjoso con baja eficiencia. (<http://www.brasil.gov.br/energia-es/matriz-energetica/biocombustibles>)

Como resultado del incremento en los precios de los combustibles tradicionales, como ya se mencionó anteriormente, el bagazo ha venido a ser considerado como un excelente candidato para ser utilizado tanto en la generación de bioelectricidad como una materia prima muy prometedora para la producción de bioetanol de segunda generación (2G).

Sin embargo, el costo de la producción de etanol de segunda generación es todavía bastante elevado, independientemente del costo de la materia prima lignocelulosa usada y el desarrollo de un proceso comercialmente competitivo para la tecnología 2G plantea un reto aunque la integración con la producción 1G podría facilitar enormemente este desarrollo (Goldstein & Gutman, 2010).

Hidrólisis enzimática

Las rutas para la producción de etanol a partir de material lignocelulósico son más complicadas que aquellas a partir de azúcares y almidones, debido a que los materiales lignocelulósicos contienen, como ya se mencionó anteriormente, más polímeros de azúcares complejos, como celulosa y hemicelulosa, los cuales son más difíciles de descomponer químicamente junto con la lignina. Los procesos que han sido desarrollados incluyen el pre-tratamiento para separar la biomasa en celulosa, hemicelulosa y lignina (proceso que por lo general hidroliza la hemicelulosa a azúcares) después hidroliza la celulosa para producir azúcares (Figura 9). (D. Kumar & Murthy, 2011)

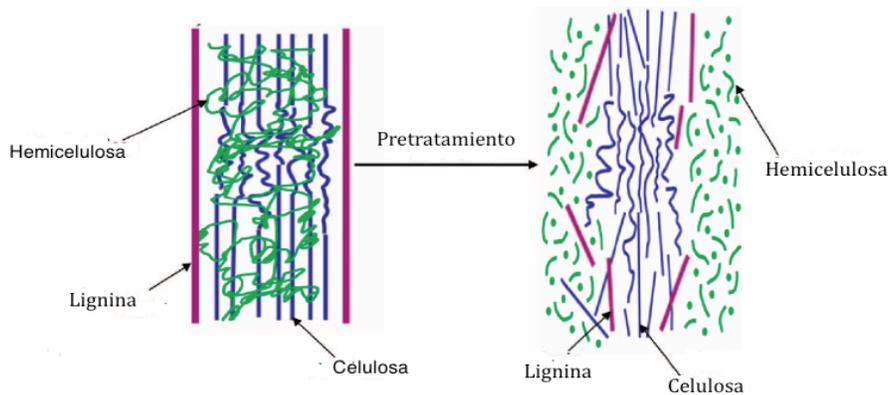


Figura 9. Esquema de la función del pretratamiento en la conversión de biomasa para combustibles. Modificada de (P. Kumar et al., 2009)

La hidrólisis de los polímeros de azúcar puede realizarse químicamente usando ácido o biológicamente usando enzimas. La hidrólisis enzimática es favorecida sobre la hidrólisis ácida debido a varios factores, un menor consumo de energía (gas natural, electricidad), condiciones sencillas de operación: utilizando incubadoras y matraces, altos rendimientos de azúcares, así como un capital más bajo y un menor costo en el mantenimiento de los equipos.

La etapa correspondiente a la hidrólisis de la celulosa se lleva a cabo por varias rutas químicas, como hidrólisis ácida, la cual es bien conocida, o por rutas biológicas, usando enzimas, etapa que está en desarrollo. Los azúcares derivados de la celulosa y hemicelulosa después son fermentados a etanol, usando levaduras.

Actualmente, algunos aspectos en la producción de etanol lignocelulósico están bien desarrollados. Por ejemplo, tiempo de vapor dilución ácida e hidrólisis alcalina usado comúnmente como proceso de pre-tratamiento (separación), la hidrólisis ácida diluida es comúnmente usada para la conversión de hemicelulosa y celulosa a azúcares respectivamente (D. Kumar & Murthy, 2011).

Una de las alternativas considerada más prometedora para la producción de azúcares fermentables es la hidrólisis enzimática. Actualmente, esta tecnología es más cara que otras tecnologías de hidrólisis, pero se cree que tiene el mayor

potencial en reducción de costos, a un nivel competitivo con el etanol producido a partir de otras fuentes.

Ambos procesos presentan ventajas y desventajas. La hidrólisis enzimática se lleva a cabo bajo condiciones suaves de reacción, mientras que la hidrólisis ácida requiere altas temperaturas y bajo pH, lo cual conlleva a problemas de corrosión. Mediante la hidrólisis enzimática los rendimientos son cercanos al 100% (Ogier et al., 1999).

En la hidrólisis ácida dependiendo del material es difícil llegar a esa conversión, además se producen compuestos inhibitorios durante esta reacción, mientras que este problema no se ve en la enzimática (Lee et al., 1999; Taherzadeh 1999; Wyman 1996).

Por otro lado, la hidrólisis enzimática tiene sus propios inconvenientes comparado con la hidrólisis ácida. El tiempo de hidrólisis enzimática puede llevarse varios días mientras que la química sólo un par de minutos (Tengborg et al., 2001). Los precios de las enzimas son mucho mayores que, por ejemplo el H_2SO_4 que se usa en la hidrólisis ácida (Sheehan&Himmel 2001).

En la hidrólisis ácida los productos finales no inhiben la reacción. Sin embargo en la hidrólisis enzimática los azúcares producidos inhiben la reacción (Eklund&Zacchi 1995; Hari Krishna &Chowdary 2000; Kádár et al., 2004; Linde et al., 2007). Para resolver el problema la sacarificación y fermentación simultánea (SSF por sus siglas en inglés) fue desarrollada. En el cual los azúcares producidos en la hidrólisis son directamente consumidos por los microorganismos presentes (Wyman 1999). Sin embargo la fermentación y la hidrólisis, regularmente tienen diferentes temperaturas de operación.

El reto principal del proceso enzimático es la obtención de altos rendimientos de azúcares y evitar la inhibición de las enzimas.

La fermentación alcohólica

El etanol o alcohol etílico (C_2H_5OH), se ha producido en grandes cantidades por siglos, y ha sido asociado con las bebidas alcohólicas. El empleo de levaduras para producir bebidas alcohólicas es un proceso muy antiguo. La mayoría de los jugos de frutas se fermentan por la acción de levaduras silvestres que están presentes en la fruta. De estas fermentaciones naturales se han aislado algunas levaduras y debido a esto la producción de bebidas alcohólicas es una gran industria en todo el mundo . (Bautista-Justo M. et al., 2001)

La fermentación es un proceso biológico anaeróbico, donde los azúcares simples, como la glucosa y fructosa son transformados a etanol y dióxido de carbono por la acción de las levaduras (Voet, 1995). La ruta bioquímica más común para la fermentación de la glucosa es la glucólisis o también conocida como ruta de Embden-Meyerhof (Figura 10). La glucólisis puede dividirse en tres etapas principales y varias reacciones enzimáticas.

En la primera etapa de la glucólisis se forma el gliceraldeído 3-fosfato. En la segunda etapa ocurre una reacción de oxidación-reducción, se producen enlaces fosfato de alta energía en forma de ATP y se forman dos moléculas de piruvato. En la última etapa (Fermentación) se presenta otra reacción de oxidación-reducción y se forman los productos de la fermentación: etanol y CO_2 (Madigan et al., 1997).

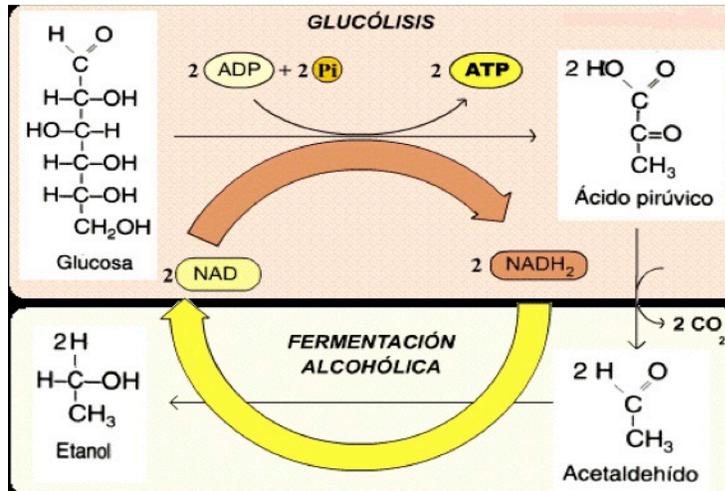


Figura 10. Esquema de la glucólisis. Tomada de <http://www.biologia.edu.ar/metabolismo/met4.htm>

Microorganismos fermentadores

Tanto bacterias como levaduras pueden producir celulasas para la hidrólisis de materiales lignocelulosicos. Estos microorganismos pueden ser aerobios o anaerobios, mesofilos o termófilos. Los bacterias de los géneros *Clostridium*, *Cellulomonas*, *Bacillus*, *Thermomonospora*, *Ruminococcus*, *Bacteroides*, *Erwinia*, *Acetovibrio*, *Microbispora* y *Streptomyces* pueden producir celulasas (Balat et al., 2008). Las levaduras son la mayor fuente de celulasas y hemicelulasas (Gusakov, 2007).

Las enzimas o el tratamiento ácido frecuentemente hidrolizan la lignocelulosa, el hidrolizado obtenido, más tarde es utilizado para la fermentación de bioetanol por microorganismos como levaduras. Debido a que el hidrolizado lignocelulosico contiene no solamente glucosa, sino también varios monosacáridos como xilosa, manosa, galactos, arabinosa y oligosacáridos, es necesario que los microorganismos fermenten eficientemente estos azúcares para una producción industrial de bioetanol exitosa (Katahira, 2006).

La fermentación involucra microorganismos que usan azúcares fermentables como alimento y en el proceso producen alcohol etílico y otros subproductos. Estos microorganismos pueden usar típicamente azúcares de 6 carbonos, uno de los más comunes es la glucosa. Debido a que los materiales de biomasa lignocelulósica contienen altos niveles de glucosa o precursores de la glucosa son los más fáciles para convertir a bioetanol.

Kluyveromyces marxianus

En la actualidad se han aislado diferentes cepas de la levadura *Kluyveromyces marxianus* de una gran variedad de hábitats lo cual resulta en una amplia diversidad metabólica. Como consecuencia diferentes aplicaciones biotecnológicas de esta levadura han sido investigadas. Debido a cualidades como: termotolerancia, grandes tasas de crecimiento, y menor tendencia a fermentar cuando es expuesta a un exceso de azúcar el futuro biotecnológico de esta levadura es muy prometedor.

K. marxianus (Figura 11) fue descrita por primera vez en 1888 por E. C. Hansen quien en ese tiempo la llamó *Saccharomyces marxianus* por Marx, la persona que originalmente aisló la cepa de las uvas. La edición más reciente de “TheYeasts, a taxonomic study” (Kurtzman&Fell 1998), el capítulo del género *Kluyveromyces* incluye 15 especies. La gran mayoría de estudios publicados acerca de *K. marxianus* no son enfocados hacia su bioquímica, metabolismo o fisiología, la mayoría de los trabajos se ha realizado explorando las aplicaciones potenciales de este organismo, sin investigar lo que ocurre a nivel intracelular.

Típicamente las levaduras *K. marxianus* son cultivadas en un sustrato específico y las mediciones se llevan a cabo de una manera en la que solo se determinan las concentraciones del sustrato o del producto más allá de determinar la concentración celular. *K. marxianus* ha sido usada como fuente de inulinasa, β -galactosidasa, β -glucosidasa y endopoligalacturonasas.

Esta levadura ha sido clasificada como fermentadora facultativa, por lo tanto se le considera efecto Crabtree- negativo (van Dijken et al. 1993). El efecto Crabtree consiste en que en presencia de medios muy bien oxigenados pero con altas concentraciones de azúcares fermentables se reprime la síntesis y actividad de las enzimas respiratorias y se produce etanol. (Jones, R.P et al., 1981). Es importante notar que *K. marxianus* no puede crecer bajo condiciones anaeróbicas estrictas por lo que se puede decir que la formación de etanol está ligada a la limitación de oxígeno en el medio. (Fonseca et al., 2008)

Se ha reportado que algunas cepas de *K. marxianus* llevan a cabo la producción de etanol a temperaturas incluso por arriba de 40° C; y tienen un máximo crecimiento a 47° C y a un pH =5. (Fonseca et al., 2008)

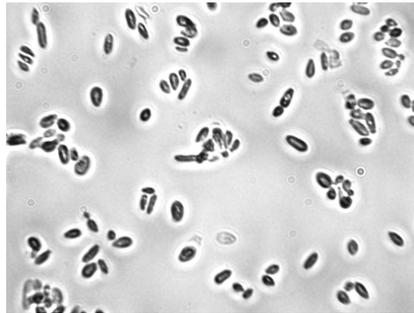


Figura 11. Microscopía de la levadura *Kluyveromyces marxianus*

Saccharomyces cerevisiae

Saccharomyces cerevisiae es el microorganismo más aplicado y tradicional para la producción de etanol. La forma de las células de *S. cerevisiae* puede ser esférica, elipsoidal, cilíndrica o sumamente alargada en agrupaciones de dos, cadenas cortas o racimos o bien sin agruparse; pueden formar o no pseudomicelio (Figura 12). La apariencia de las colonias es muy diversa. Fermentan y asimilan la glucosa y normalmente también la sacarosa, maltosa y galactosa, no así la lactosa, ni la xilosa. Tiene una alta tolerancia al mismo y rendimientos altos de fermentación, sin embargo su incapacidad de fermentar xilosa, el segundo azúcar más importante en la naturaleza, limita su uso en la producción de biocombustibles. (Kotter & Ciriacy, 1993).

Existen algunas levaduras como *Pichia stipitis* y *Candida shehateae* que pueden fermentar xilosa y otras hexosas importantes relativamente con altas tasas y rendimientos, el problema es que tienen poca tolerancia al Etanol y concentraciones de Etanol superiores a 30/35 g/L inhiben su reacción (Laplace, 1991).

En la literatura se reportan diversas condiciones a las cuales el rendimiento de la fermentación es mayor, en el caso de esta levadura, *Saccharomyces cerevisiae* la temperatura ideal reportada en la literatura es 37°C y el pH óptimo es 5. (Nörgård, 2005)

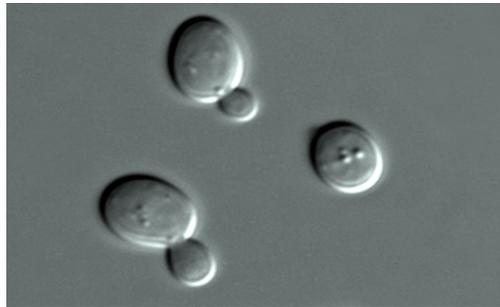


Figura 12. Microscopía de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*

Comparación entre *S. cerevisiae* y *K. marxianus*

En 1973 Chassang-Douillet et al. Presentaron un estudio de comparación fisiológica entre *S. cerevisiae* y *K. marxianus* usando medio sintético y demostraron el llamado efecto llamado glucosa, el cual consiste en la represión catabólica iniciada por esta molécula, está ausente en *K. marxianus* mientras que en *S. cerevisiae* está presente.

Una diferencia entre *S. cerevisiae* y *K. marxianus* radica en que para *K. marxianus* el ergosterol es el único esteroles presente en esta levadura. Mientras que para *S. cerevisiae* existe un requerimiento absoluto por ergosterol y otros esteroides, ácidos grasos insaturados y ácido nicotínico en cuando se crece en condiciones estrictamente anaerobias; estos requerimientos no se manifiestan cuando la levadura crece en condiciones anaerobias o microaerofilas, ya que con la presencia de oxígeno en concentraciones de por lo menos 1 ppm el microorganismo es capaz de

sintetizar estos nutrientes. La anerobiosis absoluta en ausencia de estos compuestos se manifiesta en baja productividad de alcohol, pobre viabilidad y finalmente en imposibilidad de seguir creciendo.

K. marxianus presenta un efecto Crabtree negativo, debido a que no se observa producción de etanol después de que un pulso de glucosa es aplicado a las células, en contraste con lo observado en *S. cerevisiae*.

Se observa una menor tolerancia al etanol cuando *K. marxianus* es comparada con *S. cerevisiae* y esto es relacionado con la actividad de la ATPasa de membrana.

Las cepas de *Kluyveromyces* son más termotolerantes que las de *Saccharomyces*, las cuales a su vez pueden producir mayores rendimientos en la producción de etanol. (Fonseca et al., 2008)

Metodología

- Aislamiento de Cepas a partir de muestras de Tequila y de Bagazo

Se realizó un aislamiento a partir de muestras de pulque proveniente de Los Remedios, Naucalpan, Estado de México, pulque del Estado de Hidalgo y de bagazo y mosto muerto de *Agave tequilana* variedad Weber, proveniente de Tequila, Jalisco. El aislamiento de las cepas se llevó a cabo, realizando cultivos en placas con medio sólido, usando diluciones de las muestras de pulque y bagazo.

En el caso del pulque se tomó directamente el volumen necesario y se diluyó con agua, las diluciones fueron 1:10, 1:100 y 1:1000 con un volumen final de 10 mL.

Para las muestras de bagazo, se tomó una muestra del sólido, se depositó en un tubo de ensayo de 10 mL y se le agregó un volumen de 3 mL, los tubos se dejaron reposar durante 8 horas y posteriormente se tomó el volumen necesario para realizar

las diluciones correspondientes a 1:10, 1:100 y 1:1000 con un volumen final de 10 mL.

Medio sólido

Ingrediente	Porcentaje (m/v) todos
Agar	1.5 %
Extracto de levadura	0.1 %
Glucosa	0.01 %
Sulfato de amonio (NH ₄) ₂ SO ₄	0.5 %
Buffer sulfatos	c.b.p. pH = 7

De cada una de estas diluciones se tomó 1 mL el cual se depositó en una placa con medio sólido las placas, fueron incubadas a 30°C durante 24 horas. Se realizaron resiembras de las colonias que crecieron para obtenerlas puras.

Posteriormente, con las colonias seleccionadas, se realizaron cultivos en tubos de ensayo con 5 mL con medio líquido a una temperatura de 30°C durante 72 horas.

Medio líquido

Ingrediente	Porcentaje (m/v) todos
Glucosa	10 %
Extracto de levadura	0.5 %
Sulfato de amonio (NH ₄) ₂ SO ₄	0.1 %
Fosfato de potasio KH ₂ PO ₄	0.1 %
Sulfato de magnesio MgSO ₄	0.05 %

Del *screening* realizado se obtuvieron aproximadamente 500 colonias aisladas, de las cuales se seleccionaron solamente 38 cepas productoras de etanol. Para identificarlas se emplearon las letras P, Pp, S y SS que corresponden a los microorganismos aislados de muestras de bagazo provenientes de Jalisco, la letra H corresponde al pulque del estado de Hidalgo y la letra R al Pulque del Estado de México.

Posteriormente, con la finalidad de reducir la cantidad de cepas a estudiar, las 38 cepas fermentadoras se estudiaron en función del etanol producido y glucosa consumida. Se tomaron muestras de los cultivos a las 0, 24, 48 y 72 horas, en condiciones estériles, se determinó el consumo de glucosa, por el método de azúcares reductores (DNS); así como la producción de etanol de manera cualitativa,

utilizando el método de oxidación de alcoholes primarios con dicromato de potasio ($K_2Cr_2O_7$). Con estos datos se calculó la relación estequiométrica etanol/glucosa. Para la prueba de tinción simple, la toma de la asada, se llevo a cabo a las 24 horas de haber iniciado el cultivo, en condiciones estériles.

Determinación de azúcares reductores por *Ácido 3,5- Dinitrosalicílico (DNS)*

Para realizaresta determinación se colocaron en un tubo Eppendorf, 1 mL de cada muestra medio líquido, a los respectivos tiempos de incubación. Se centrifugó la muestra a 14, 00 rpm durante 5 minutos, se tomaron 100 μ L del sobrenadante y se realizó una dilución con agua destilada 1:20. Posteriormente se tomaron 100 μ L de la dilución anterior, se agregaron 200 μ L de buffer de acetatos pH = 5 y 600 μ L de reactivo DNS. Se agitó el tubo para mezclar bien y se sometió a calentamiento en un baño a 100°C con agitación magnética durante 5 minutos. Terminados los 5 minutos se colocaron en un baño con hielo durante 20 minutos. Después se añadieron 4 mL de H_2O , y se mezcló. Se midió la absorbancia a 540 nm en un espectrofotómetro UV/VIS Perkin Elmer Lamda 25.

- Oxidación de alcoholes primarios con dicromato de Potasio ($K_2Cr_2O_7$)

Para determinar de manera cualitativa la presencia de etanol en cada cultivo, se colocó 1 mL de cada muestra del tubo con medio líquido después de las 72 h de incubación en un tubo Eppendorf de 1.5 mL. Los tubos se centrifugaron a 14 000 rpm durante 5 minutos. Se extrajo el sobrenadante y se agregó CCl_4 en una proporción 1:1 con el objetivo de extraer el etanol. Después se sometió a agitación por vortex durante 1 minuto. Los tubos se dejaron reposar, hasta que se observó la separación de 2 fases. Se extrajo la fase orgánica (fase inferior) y se depositó en un tubo de ensaye. (El volumen aproximado fue de 0.7 – 1mL, para cada muestra). Se añadió un volumen de solución oxidante igual al anterior. Los tubos se calentaron durante 1

minuto, se dejaron enfriar a temperatura ambiente y posteriormente se observó el cambio de coloración.

- Tinción simple

La morfología de los microorganismos aislados se observó en un microscopio OLYMPUS BX40. Sobre un portaobjetos se colocó una asada del cultivo líquido de cada muestra. Se esparció el volumen formando una película homogénea. La preparación se fijó pasando tres veces el portaobjeto a través de la llama del mechero. Después cada preparación se cubrió con una película de colorante safranina durante 1 minuto. Se quitó el exceso de colorante con agua. Se dejó secar al aire. Finalmente se añadió una gota de aceite de inmersión y se observó al microscopio con objetivo de 100x.

Identificación genética de las cepas (ITS)

Para conocer el género y especie de las cepas aisladas y seleccionadas se amplificó la región ITS, para lo cual se extrajo el DNA genómico con solución DNAzol (Gibco-BRL)

Los tubos con cultivo de cada colonia 5 mL se centrifugaron por 5 min a 12000 rpm, posteriormente se calentaron a 80°C por 10 minutos y se enfriaron con N₂ líquido. Se agregó 1mL de DNAzol y se homogeneizaron agitando los tubos por inmersión aproximadamente 10 veces. (La agitación fue lentamente, debido a que el DNA se podía romper). Los tubos se centrifugaron 10 min a 10, 000 rpm a temperatura ambiente. El sobrenadante (aprox. 0.9 mL) se pasó a un tubo limpio usando una pipeta de 1 mL ensanchada de la boca.

Se agregó 0.5 mL de isopropanol (-20°C) y se mezcló por inversión. Posteriormente se incubó a temperatura ambiente por 3 minutos. Después se centrifugó 10 min a 10, 000 rpm a 4°C y se eliminó el sobrenadante por decantación. Se realizó un lavado con 1mL de etanol (70%) y se centrifugó (2 min/ 10 00 rpm / 4°C) el sobrenadante se eliminó por decantación. Se dejó secar el precipitado con el tubo abierto por unos 15 minutos, finalmente se añadieron 4µL de H₂O.

- Amplificación de DNA por PCR

Los cebadores empleados para la amplificación fueron:

ITS4 5`-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3`

ITS5 5`-GCTGCGTTCTTCATCGATGC-3`

- Condiciones de PCR 34 ciclos

1-. Iniciación: 3 minutos a 94°C

2-. Desnaturalización: 40 segundos a 94°C

3-. Alineación: 40 segundos a 56°C

4-. Extensión: 40 segundos a 72°C

5-. Elongación final: 7 minutos a 72°C

Reactivo	Cantidad
Buffer 5x	1x
dNTP's 10 mM	0.2 mM
Oligo Forward 20 µM	0.4 µM
Oligo Reverse 20 µM	0.4 µM
DNA	100 ng
Taq polimerasa	1 µL
Agua	c.b.p 20 µL

Posteriormente se realizó una reacción de amplificación a mayor volumen, 80µL, con el objetivo de purificar los productos para su posterior secuenciación.

La secuenciación se llevó a cabo en la unidad de Biología Molecular del el Instituto de Fisiología Celular de la UNAM. Los datos de secuenciación se introdujeron a una base de datos (BLAST NCBI) para su alineamiento y comparación.

Cromatografía de gases

La determinación cuantitativa de etanol se realizó en un cromatógrafo de gases Hewlett Packard 5890 Series II, Se colocó 1 mL de medio líquido de cada muestra a

los tiempos de fermentación indicados. Cada muestra se centrifugó a 14 000 rpm durante 5 minutos. El sobrenadante se extrajo con una pipeta y se filtro utilizando una jeringa tipo luerlock, el filtrado se recibió en un tubo de vidrio. Las muestras se inyectaron en el cromatógrafo con las siguientes condiciones de trabajo:

Columna Marca Grace: PORAPAK Q 80/1003 M X 1/8" X 0.85 " SS

Temperatura del inyector	150 °C
Temperatura del horno	150 °C
Temperatura del detector	170 °C
Volumen de Inyección	1 µL

Caracterización de Cepas.

Fermentaciones

Posterior al análisis de producción de etanol y en base a la relación glucosa/etanol se eligieron dos de las mejores cepas fermentadoras.

Para realizar la caracterización de las dos cepas seleccionadas, se realizaron fermentaciones en matraces Erlenmeyer de 250 mL, con 100 mL de medio líquido y un pre-inóculo de 500 µL, de la cepa respectiva, para cada fermentación. El pre-inóculo se creció durante 24 horas en un medio líquido con 10% de glucosa como única fuente de carbono. Se colocó una asada del microorganismo (conservado previamente en glicerol a -80°C) y se incubó a 30°C.

Medio líquido para preinóculo

Glucosa	10 %
Extracto de levadura	0.5 %
Sulfato de amonio (NH ₄) ₂ SO ₄	0.1 %
Fosfato de potasio KH ₂ PO ₄	0.1 %
Sulfato de magnesio MgSO ₄	0.05 %

Medio líquido 20% de glucosa

Glucosa	20 %
Extracto de levadura	0.5 %
Sulfato de amonio (NH ₄) ₂ SO ₄	0.1 %
Fosfato de potasio KH ₂ PO ₄	0.1 %
Sulfato de magnesio MgSO ₄	0.05 %

El primer parámetro a estudiar fue la temperatura, las fermentaciones se llevaron a cabo durante 72 horas a 200 rpm, se tomaron muestras de 1 mL en condiciones estériles, a los tiempos 0, 2, 3, 4, 6, 8, 24, 32, 48, 52 y 72 horas, para construir las curvas de crecimiento, respecto al consumo de glucosa y la producción de etanol. Las temperaturas estudiadas fueron: 25° C, 30° C, 35° C, 40° C y en el caso de *K. marxianus* se realizó una temperatura extra a 45° C.

Una vez, obtenida la temperatura óptima para el crecimiento de la célula, el siguiente parámetro a analizar fue el pH. Se emplearon las mismas condiciones de volumen, inóculo y concentración de glucosa. Para este experimento solo se ajustó el pH agregando una solución diluida de NaOH ó H₂SO₄, hasta alcanzar el pH de 4.5, 5 y 5.5 para ambas cepas. Las muestras fueron tomadas de igual manera, que en el parámetro de temperatura.

Con la temperatura y pH óptimos para el crecimiento de las dos cepas elegidas se analizaron 3 concentraciones de glucosa inicial; 20, 30 y 40%.

Hidrólisis Enzimática y fermentación de bagazo de agave azul

La reacción enzimática se llevo a cabo en matraces Erlenmeyer de 50 mL con una consistencia de 20% (p/v) en un volumen total de 30 mL, pH 5.5 con agitación de 200 rpm y 50C. La reacción se inició al agregar la celulasa y la xilanasas (10 mg de proteína/g de material seco), Cellic CT2 y Vyzcozyme respectivamente, ambas proporcionadas amablemente por la compañía Novozyme. Se tomaron muestras de 300 µL a diferentes tiempos (0, 2,4,8,24,30 h).

Composición del producto de la hidrólisis enzimática del Bagazo de Agave

Con la finalidad de conocer la composición de azúcares producidos después de la hidrólisis enzimática. La muestra se centrifugó a 14000 rpm para eliminar restos sólidos y posteriormente se pasó a través de un filtro de 0.22 µm. Los azúcares

presentes se determinaron en un cromatógrafo de líquidos de alta presión (HPLC por sus siglas en inglés) marca Hewlett Packard 1100. Columna phenomenex Luna 5u NH2 100 A, fase móvil acetonitrilo: agua (85:15) y un detector de dispersión de luz PL-ELS 1000. Para la identificación de cada uno de los azúcares de interés se emplearon estándares.

Fermentación después de la Hidrólisis

Posterior a las 30 horas de hidrólisis se agregó al medio 0.2% de extracto de levadura y se inoculó con 200 μ L de la cepa R11 y Pp202. Los medios se incubaron por 72 horas y se tomaron muestras a tiempos 0, 8, 24, 48 y 72h.

Resultados y Discusión.

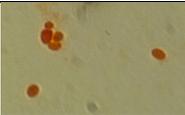
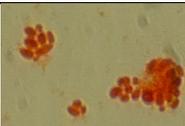
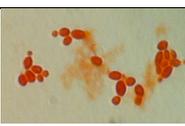
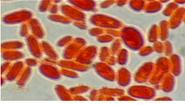
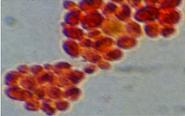
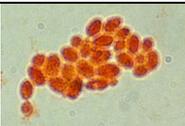
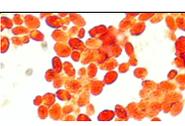
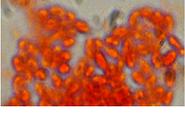
Identificación de Microorganismos

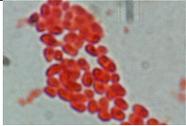
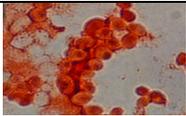
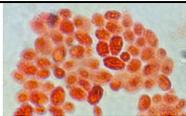
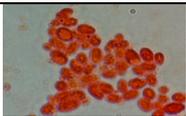
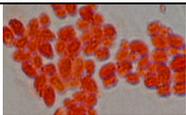
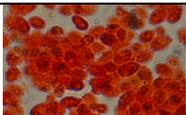
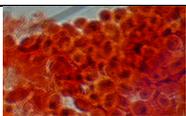
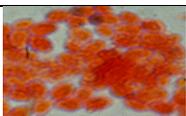
En la tabla 1 se muestran los resultados obtenidos para las 38 cepas de manera resumida.

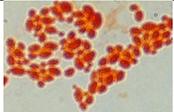
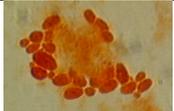
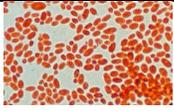
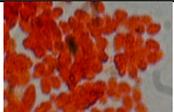
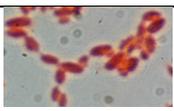
Es importante señalar que existe una variación en la cantidad de glucosa inicial en cada determinación. Esta variación puede deberse a que al principio de las fermentaciones los medios se esterilizaban con la glucosa, esto puede provocar la reacción de tipo Maillard lo cual interferiría tanto en la cantidad de azúcar libre disponible, como en la determinación de esta. En la segunda parte del trabajo , es decir en las fermentaciones con las dos cepas seleccionadas la esterilización de los componentes del medio se realizó por separado de la esterilización de la glucosa, con el fin de evitar el comportamiento observado anteriormente al momento de determinar la glucosa inicial mediante el método de DNS.

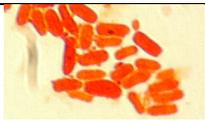
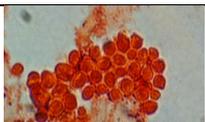
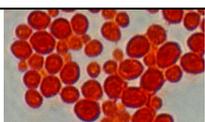
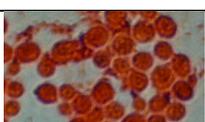
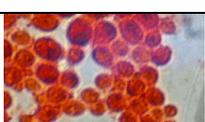
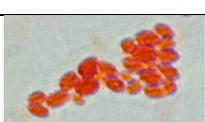
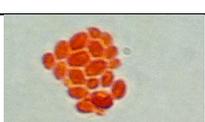
El criterio para elegir a las mejores cepas productoras de etanol fue el rendimiento máximo posible considerando la relación estequiométrica etanol/glucosa: 0.50, considerando que los valores con ± 0.05 cumplen con el criterio debido al posible error experimental.

Tabla 1. Resultados de las 38 colonias seleccionadas por ser productoras de etanol. Fermentaciones a 72 horas. Temperatura 30°C. Medio líquido con glucosa. Composición del medio: Glucosa 20% (p/v), extracto de levadura 0.5% (p/v), sulfato de amonio 0.1% (p/v), Fosfato de potasio monobásico 0.1% (p/v), sulfato de magnesio 0.05% (p/v).

Cepa	Glucosa inicial (g/L)	Glucosa final 72 horas (g/L)	Glucosa consumida (g/L)	Etanol producido 72 horas (g/L)	% Glucosa consumida	Relación etanol/glucosa	Imagen por microscopía
D12	154.3	25.51	128.79	49.76	83.5	0.38	
H1a	228.33	45.93	182.4	56.93	79.9	0.31	
H14	196.15	78.64	117.51	75.37	59.9	0.64	
H17	167.38	81.01	86.37	35.13	51.6	0.40	
JG4	163.87	33.54	130.33	67.89	79.5	0.52	
P01	145.74	9.97	135.77	77.8	93.2	0.57	
P01	153.78	0	153.78	77.8	100.0	0.50	
P02	175.59	0	175.59	31.40	100.0	0.17	
P03	203.88	0	203.88	111.84	100.0	0.54	

Cepa	Glucosa inicial (g/L)	Glucosa final 72 horas (g/L)	Glucosa consumida (g/L)	Etanol producido 72 horas(g/L)	% Glucosa consumida	Relación etanol/glucosa	Imagen por microscopía
P04	166.67	6.5	160.17	57.23	96.1	0.35	
P05	159.88	0.99	158.89	72.3	99.4	0.45	
P06	163.94	0	163.94	52.59	100.0	0.32	
P201	252.61	9.55	243.06	110.01	96.2	0.45	
P201	222.8	37.95	184.85	74.64	83.0	0.40	
P202	165.17	18	147.17	214.63	89.1	1.45	
P203	198.2	5.92	192.28	127.56	97.0	0.66	
P204	270.08	21.71	248.37	ND	92.0	-	
Pp202	150.97	3.09	147.88	75.91	98.0	0.51	

Cepa	Glucosa inicial (g/L)	Glucosa final 72 horas (g/L)	Glucosa consumida (g/L)	Etanol producido 72 horas(g/L)	% Glucosa consumida	Relación etanol/glucosa	Imagen por microscopía
R5	156.8	92.1	64.7	44.98	41.3	0.69	
R11	176.18	0	176.18	96.18	100	0.54	
R13	187.04	58.69	128.35	58.29	68.6	0.45	
R14	166.43	8.11	158.32	74.69	95.1	0.47	
R1a	160.85	48.85	110.2	51.76	69.6	0.46	
R1b	252.42	120.06	132.36	39.95	52.4	0.30	
S02	167.7	10.79	156.91	78.6	93.6	0.50	
S03	155.78	22.25	133.53	76.21	85.7	0.57	
S05	240.48	62.3	178.18	86.35	74.1	0.48	
S07	192.88	77.43	115.45	48.62	59.9	0.42	

Cepa	Glucosa inicial (g/L)	Glucosa final 72 horas (g/L)	Glucosa consumida (g/L)	Etanol producido 72 horas(g/L)	% Glucosa consumida	Relación etanol/glucosa	Imagen por microscopía
S15	187.04	86.01	101.03	ND	52.0	-	
S18	167.2	0	167.2	65.97	100.0	0.39	
SS01	150.53	0	150.53	67.15	100.0	0.44	
SS02	146.67	0	146.67	54.83	100.0	0.37	
SS04	141.14	44.82	96.32	73.73	68.2	0.76	
SS05	160.14	5.93	154.21	88.33	96.3	0.57	
SS06	160.06	57.54	102.52	97.39	64.1	0.94	
SS15	240.85	130.08	110.77	62.14	46.0	0.56	
S010N	203.78	9.51	194.27	88.33	95.3	0.45	
S011N	190.67	0	190.67	49.86	100.0	0.26	

Un aspecto importante durante la caracterización simple de las cepas, fue su morfología, en la tabla 1 se puede observar una amplia variedad de formas, con diferente patrón de agrupación, hasta varias morfologías levaduriformes, por ejemplo esféricas, ovoides, elipsoidales y cilíndricas.

Las colonias con morfología cocoide y bacilar fueron descartadas durante la selección, debido a que se creyó podrían ser bacterias, y como se sabe los rendimientos máximos en fermentaciones se obtienen utilizando levaduras. Aunque hay bacterias como *Zimomonasmobilis* forma bacilar que presenta altos rendimientos y tolerancia a etanol.

De las 38 cepas de acuerdo al criterio antes señalado se seleccionaron nueve cepas (tabla 1, remarcado): D12, P203, Pp202, R11, S02, P201, S02, R14 y P03. Cabe señalar que en el caso de las cepas D12 y P203 se eligieron a pesar de que los valores de la relación glucosa etanol estaban fuera del criterio establecido, esto debido a que presentaron una morfología peculiar que llamó la atención en nuestro grupo de trabajo.

Para identificar el género y especie de cada una, se extrajo el DNA genómico y se amplificó por PCR la región ITS, que es una zona altamente conservada para las levaduras. La región ITS por sus siglas en inglés (InternalTranscribedSpacer) es la región con la probabilidad más alta de una identificación exitosa en el reino fungi, con la diferencia del código de barras más claramente definida en la variación inter e intra específica. Esta región es una parte de RNA no funcional, que se encuentra repetidamente en los genes del RNA ribosomal de la subunidad mayor y menor del DNA nuclear. Si se lee de 5' a 3' este precursor de transcrito policistrónico de ARNr contiene la secuencia externa 5' no transcrita, 18S rRNA, ITS1, 5.8S rRNA, ITS2, rRNA 28S y finalmente la secuencia externa 3' no transcrita (Schoch et al., 2012).

Los productos de la PCR para la D12, Pp202 y R11 se muestran en la figura 13. Como se puede observar el peso molecular de la región amplificada varía para cada cepa, lo que indica que los tres microorganismos son diferentes.

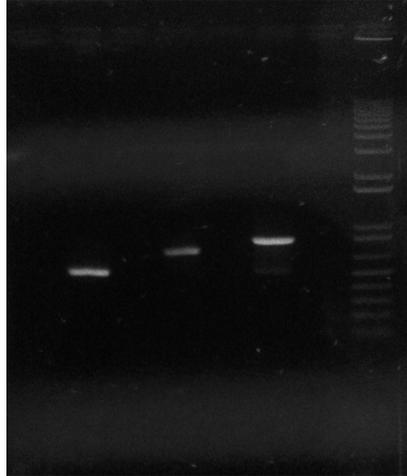


Figura 13. Producto de PCR de la región ITS de las siguientes colonias en orden de izquierda a derecha: D12, Pp202 y R11.

También se amplificó la región ITS de las cepas P03, P203, P201, R14 y S02 por el mismo método y el producto de PCR se envió a secuenciar. Los datos obtenidos se analizaron en el programa 4peaks (Ver Anexo) para posteriormente introducir las secuencias de bases nitrogenadas para cada microorganismo en la base de datos BLAST de NCBI. Esta base de datos es capaz de comparar una secuencia problema contra una gran cantidad de secuencias que se encuentren en ella. El algoritmo encuentra las secuencias que tienen mayor parecido a la secuencia problema (Figura 12). El alineamiento de cada una de las cepas en casi todos los casos nos proporcionó el género y la especie. Sin embargo, para las cepas P03 y R14 solo el género. Esto debido probablemente a una baja cantidad de DNA secuenciado o bien a algún problema en la calidad del DNA molde, que pudo ser ocasionado por contaminación por nucleasas, RNA o sales. (Tabla 2).



Figura 14. Secuencia de la colonia R11 sentido 5' - 3' vista en el programa 4peaks.

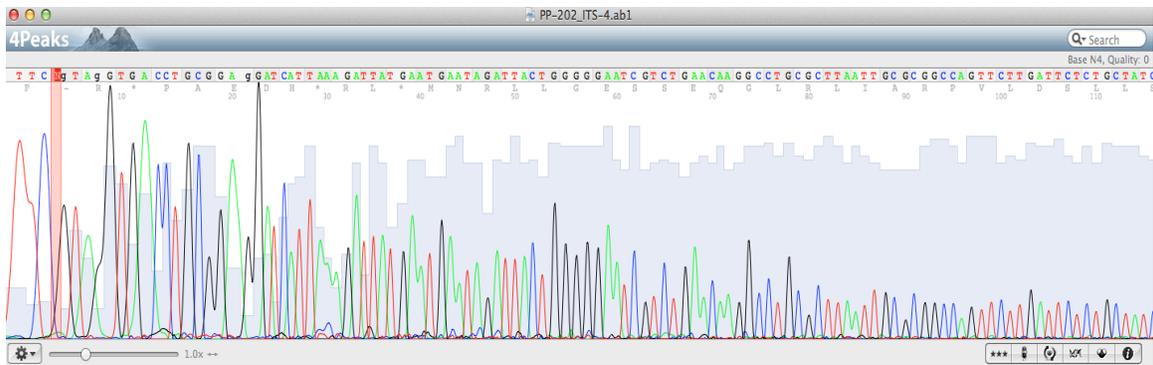


Figura 15. Secuencia de la colonia R11 en sentido 3' - 5' vista en el programa 4peaks.

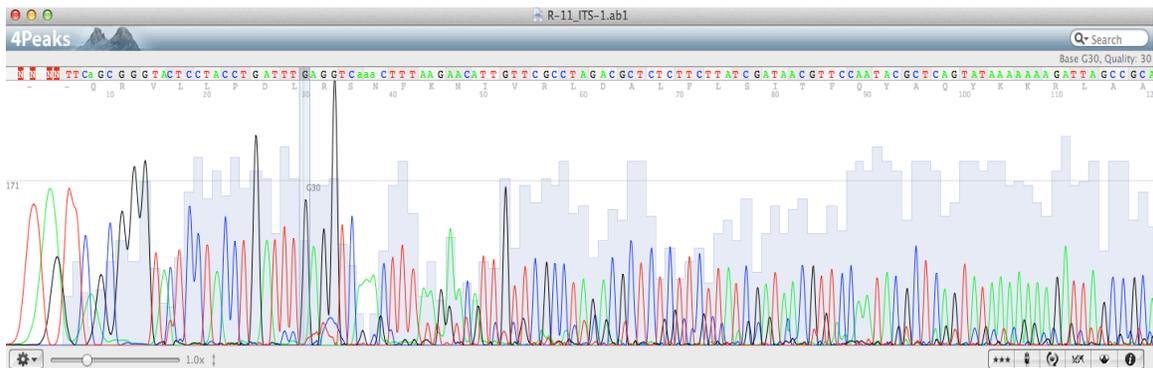


Figura 16. Secuencia de la colonia Pp202 en sentido 3' - 5' vista en el programa 4peaks.

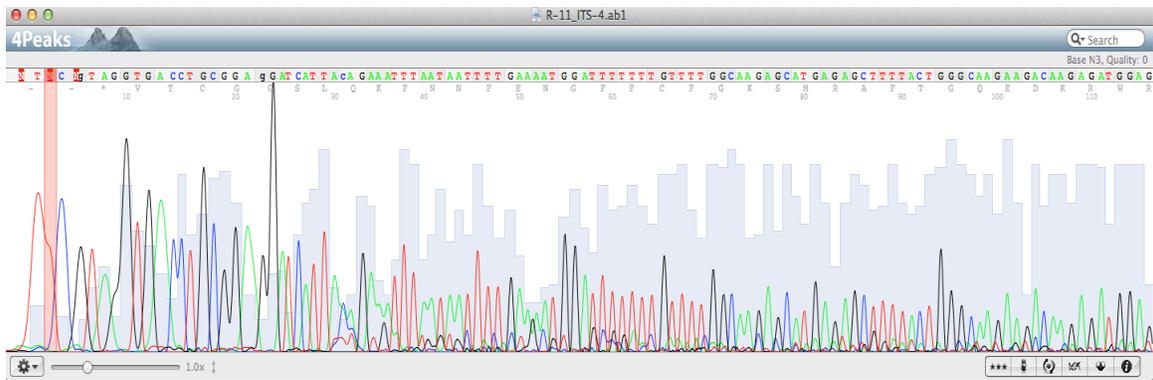
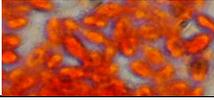
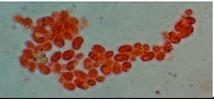
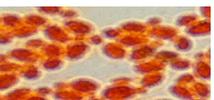
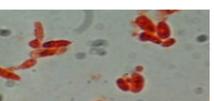


Figura 17. Secuencia de la colonia Pp202 en sentido 3'-5' vista en el programa 4peaks.

Tabla 2. Identificación de las cepas seleccionadas por secuenciación de la región ITS.

D12	<i>Pichia kudravzevi</i>	
P03	<i>Kluyveromycessp</i>	
P203	<i>Kluyveromyces lactis</i>	
P201	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	
Pp202	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	
R11	<i>Saccharomycescerevisiae</i>	
R14	<i>Saccharomyces sp.</i>	
S02	<i>Issatchenkiaorientalis</i>	

Una vez identificadas las cepas, se seleccionaron dos de ellas con la finalidad de encontrar las mejores condiciones de temperatura, pH y cantidad de glucosa para producción de etanol. Para estos experimentos se empleó un medio sintético rico en glucosa. Una vez obtenidos los parámetros de temperatura y pH, el reto fue producir etanol a partir de la hidrólisis enzimática de bagazo de agave. Para cumplir el objetivo se seleccionaron las cepas Pp202 *Kluyveromyces marxianus* y R11 *Saccharomyces cerevisiae*. Se decidió usar una levadura tan conocida como *S. cerevisiae*, debido a que en la literatura se reportan rendimientos altos en fermentaciones y se sabe que es tolerante a altas cantidades de etanol presente en el medio, algunos investigadores han analizado el fenómeno de adaptación de las levaduras a altas concentraciones de etanol. Lloyd et al. encontraron que levaduras que han crecido previamente en presencia de 5% de etanol pueden crecer en medios que contengan 10% de etanol, en cambio levaduras que son inoculadas directamente en medios que contienen 10% de etanol no llevan a cabo un crecimiento. (Dinh, Nagahisa, et al., 2008) Sin embargo, debido a la gran cantidad de subespecies que presenta se consideró importante caracterizar una cepa proveniente del pulque.

En el caso de *K. marxianus*, se sabe que esta levadura tiene un futuro biotecnológico muy prometedor, no obstante como se menciona en los antecedentes, se sabe poco acerca de ella, debido a que se analizan sus rendimientos más allá de sus características, además contrario a *S. cerevisiae*, esta levadura tiene la propiedad de fermentar pentosas, las cuales están presentes en la hemicelulosa de los materiales lignocelulosicos. (Fonseca et al., 2008)(Garrués et al., 2010)

Para evaluar el crecimiento, consumo de glucosa y producción de etanol de ambas, cepas se crecieron a 30°C con 20% de glucosa (Figuras 18 y 19). De estos datos se observa que el comportamiento es diferente, mientras que *S. cerevisiae* presenta un consumo total de azúcares reductores con una trayectoria exponencial, el consumo de azúcares reductores de *K. marxianus* no es total, el porcentaje residual es alrededor del 30% de la cantidad inicial de glucosa. El crecimiento observado a partir de medir la biomasa es menor en *K. marxianus* que en *S. cerevisiae*, la primera llega

alrededor de nueve unidades logarítmicas, mientras que la segunda solamente alcanza a superar las cinco unidades. Así mismo se observa que *S. cerevisiae* alcanza la fase log de crecimiento a un menor tiempo que *K. marxianus*, este factor puede ser el que determine la diferencia del crecimiento observado. Con estos resultados se podría inferir que *K. marxianus* tiene un tiempo de desarrollo más largo que el de *S. cerevisiae*.

La producción de etanol es acorde con los dos datos anteriores, *S. cerevisiae* alcanza un mayor rendimiento y el comportamiento exponencial es claro, en el caso de

K. marxianus el rendimiento es menor, alrededor de 50% menos que *S. cerevisiae*, además se observa que la producción de etanol aumenta de manera lineal, lo contrario a *S. cerevisiae*. Este comportamiento probablemente se deba a que la temperatura o pH para *K. marxianus* no sean las adecuadas, al parecer esta cepa necesita más tiempo para completar el consumo de glucosa y producción de etanol bajo estas condiciones. (Figuras 18 y 19).

Dado este comportamiento se decidió estudiar el efecto de la temperatura y pH sobre la producción de etanol y crecimiento de los microorganismos.

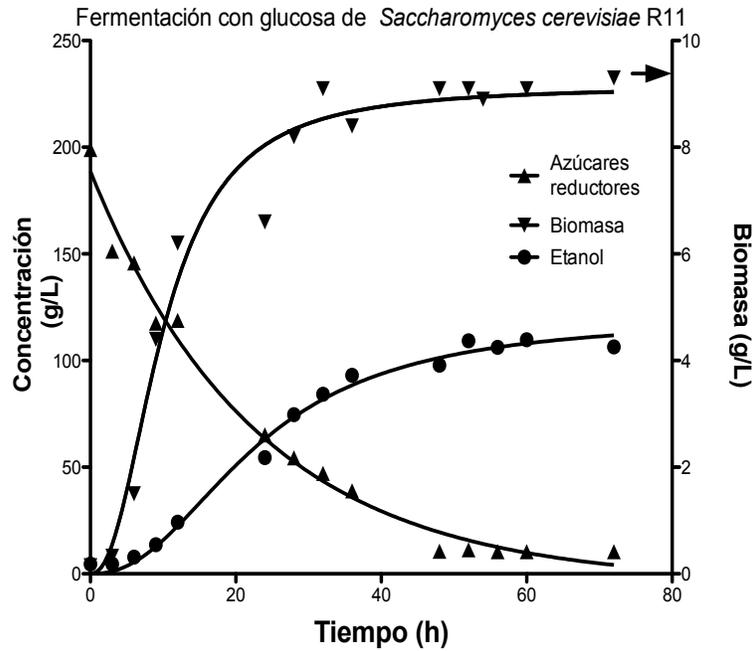


Figura 18 Fermentación con glucosa de *Saccharomyces cerevisiae*. En medio líquido con glucosa a 30°C por 72 horas. Composición del medio: Glucosa 20% (p/v), extracto de levadura 0.5% (p/v), sulfato de amonio 0.1% (p/v), Fosfato de potasio monobásico 0.1% (p/v), sulfato de magnesio 0.05% (p/v).

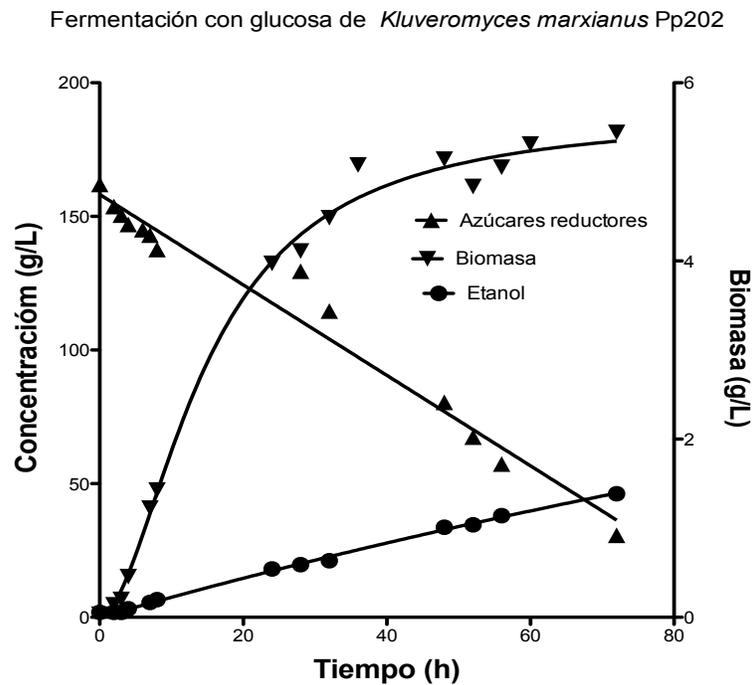


Figura 19. Fermentación con glucosa de *Kluveromyces marxianus*. En medio líquido con glucosa a 30°C por 72 horas. Composición del medio: Glucosa 20% (p/v), extracto de levadura 0.5% (p/v), sulfato de amonio 0.1% (p/v), Fosfato de potasio monobásico 0.1% (p/v), sulfato de magnesio 0.05% (p/v).

Efecto de la temperatura sobre el crecimiento y producción de etanol.

***Saccharomyces cerevisiae*R11**

La producción de etanol a partir de glucosa (20% p/v) con R11 se llevó a cabo a temperaturas de 25° C, 30° C y 35° C. Se puede observar en la figura 20 que la mayor concentración de etanol se alcanza a 30°C y por tanto la concentración de glucosa residual es mínima. A 30° C la glucosa consumida fue 163.04 g/L y el etanol producido 75.74 g/L, mientras que a 35° C la glucosa consumida fue 139.15 g/L y 73.08 g/L de etanol producido. La diferencia entre 30 y 35°C aunque pequeña es significativa.

A las temperaturas de 25 y 40°C observa que existe consumo de glucosa en menor cantidad que en las temperaturas del centro, sin embargo a 25°C la glucosa residual es mayor que en cualquiera de las otras temperaturas. Y en el caso de la temperatura 40°C existe una menor cantidad de glucosa residual que a 25°C pero una menor cantidad de etanol producido. Esto podría explicarse considerando que *S. cerevisiae* se encuentra en un ambiente de crecimiento más cómodo a 25°C, su metabolismo podría comenzar a funcionar de manera más rápida y necesitar menos glucosa, pero la mayor parte de la que consume llevarla hasta la producción de etanol. Mientras que a 40°C el metabolismo arranca de manera más lenta, necesita consumir más glucosa para ponerse en marcha y por lo tanto se produce menos etanol.

El resultado de la temperatura ideal para *S. cerevisiae* del reportado en la literatura (Nörgård, 2005), se cree que esto puede explicarse debido a que la temperatura ideal reportada es un promedio de las temperaturas ideales para varias cepas.

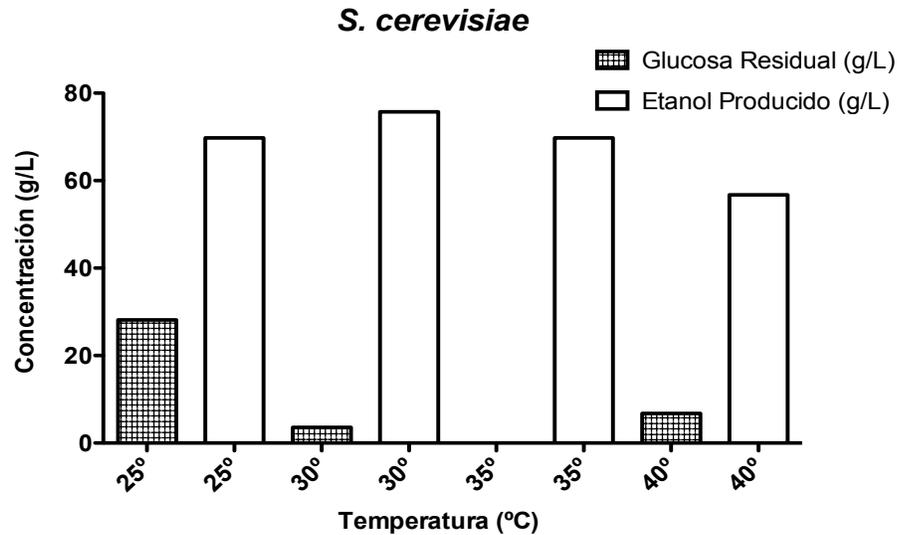


Figura 20 Fermentaciones en medio líquido con 20% p/v de glucosa con la levadura *Saccharomyces cerevisiae* a diferentes temperaturas durante 72 horas. Composición del medio: Glucosa 20% (p/v), extracto de levadura 0.5% (p/v), sulfato de amonio 0.1% (p/v), Fosfato de potasio monobásico 0.1% (p/v), sulfato de magnesio 0.05% (p/v).

***Kluyveromyces marxianus* Pp202**

En el caso del estudio de la temperatura ideal para *K. marxianus* (Figura 21) los mayores rendimientos también se obtuvieron entre 30° C y 35°C, a 30° C la producción de etanol es de 68.27 g/L, para 35°C la producción es de 67 g/L, el factor decisivo fue que existe una menor cantidad de glucosa residual a 30° C.

En la figura 22 se muestran los resultados de crecimiento y producción de etanol a 45°C para esta cepa, en el caso de *S. cerevisiae* el crecimiento a esta temperatura no se presentó. *K. marxianus* se reporta en la literatura, como una levadura termotolerante, sin embargo la producción de etanol a esta temperatura es mínima (12.93 g/L), comparada con la producción obtenida en las otras temperaturas, con lo cual se observa que *K. marxianus*, si es termotolerante, sin embargo, el rendimiento en las fermentaciones no es mayor, a medida que este factor aumenta.

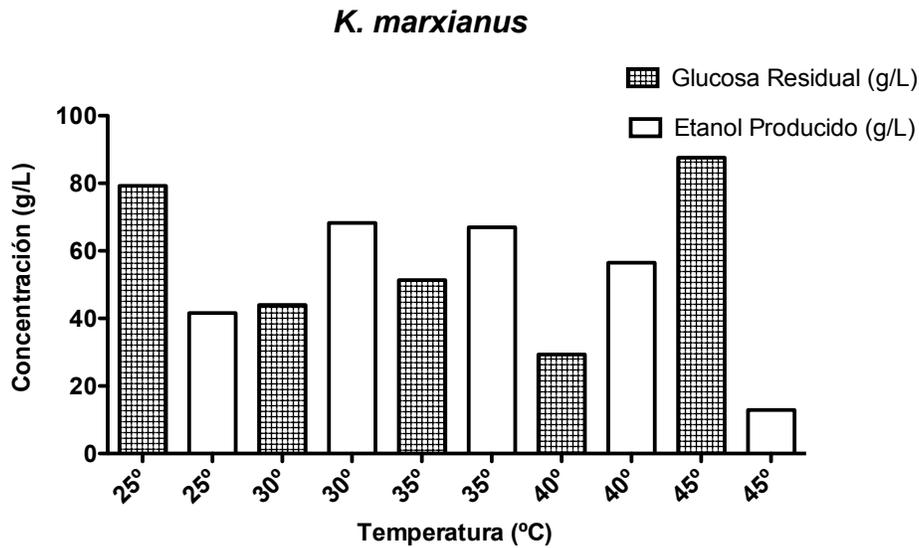


Figura 21 Fermentaciones en medio líquido con 20% p/v de glucosa con la levadura *Kluyveromyces marxianus* a diferentes temperaturas durante 72 horas. Composición del medio: Glucosa 20% (p/v), extracto de levadura 0.5% (p/v), sulfato de amonio 0.1% (p/v), Fosfato de potasio monobásico 0.1% (p/v), sulfato de magnesio 0.05% (p/v).

Efecto del pH

Saccharomyces cerevisiae R11

El comportamiento que se observa (Figura 22) a medida que el pH aumenta, es menor la cantidad de glucosa residual, para 4.5 es de 23.52 g/L mientras que para el pH de 5.5 es de 4.53 g/L. Se eligió el pH de 5.5 debido a que la producción de etanol fue 113 g/L, para pH 4.5 y 5 fue de 108 g/L y 107 g/L respectivamente.

En este caso también el dato reportado en la literatura difiere del pH obtenido experimentalmente, el reportado es 5 (Fonseca et al., 2008) y el obtenido es 5.5.

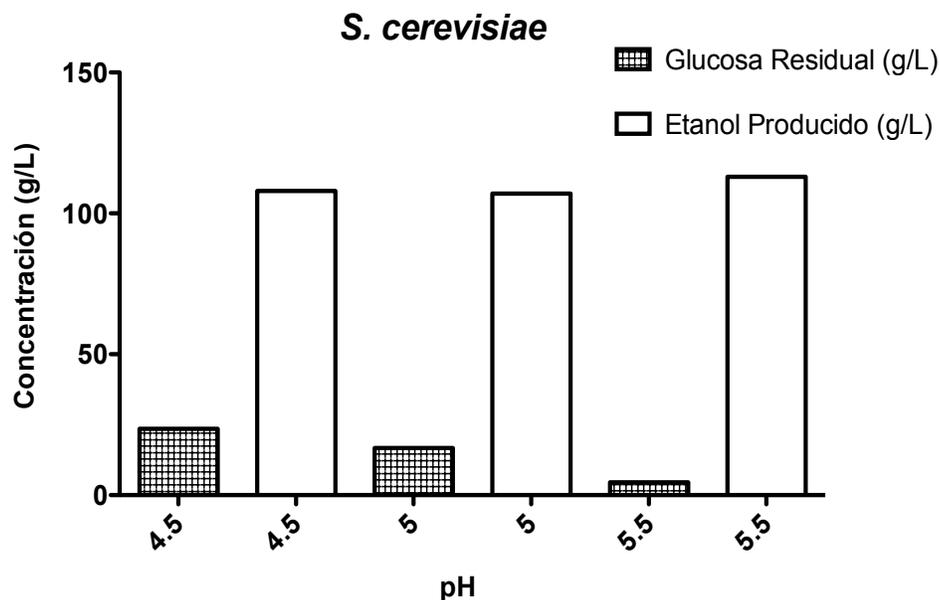


Figura 22 Fermentaciones en medio líquido con 20% p/v de glucosa con la levadura *Saccharomyces cerevisiae* a diferentes valores de pH, a 30°C durante 72 horas. Composición del medio: Glucosa 20% (p/v), extracto de levadura 0.5% (p/v), sulfato de amonio 0.1% (p/v), Fosfato de potasio monobásico 0.1% (p/v), sulfato de magnesio 0.05% (p/v).

Kluyveromyces marxianus Pp202

El comportamiento de *K. marxianus* a diferentes valores de pH (Figura 23) no presenta un patrón, se puede observar que el consumo de glucosa disminuye a medida que el pH aumenta, la mayor cantidad de glucosa residual esta presente a pH 5.5 y la menor a pH 4.5 . En el caso de la producción de etanol el mayor rendimiento es a pH 5 con 65.75 g/L de etanol producido. A pH 5.5 se obtuvo un rendimiento de 17.44 g/L, no obstante el valor obtenido al pH más ácido 4.5 y donde existe una menor cantidad de glucosa residual comparándola con los demás valores de pH se encuentra entre los dos valores anteriores siendo de 49.48 g/L.

El dato de pH ideal obtenido coincide con el reportado en la literatura para la el mayor rendimiento en la producción de etanol para *K. marxianus* pH 5.

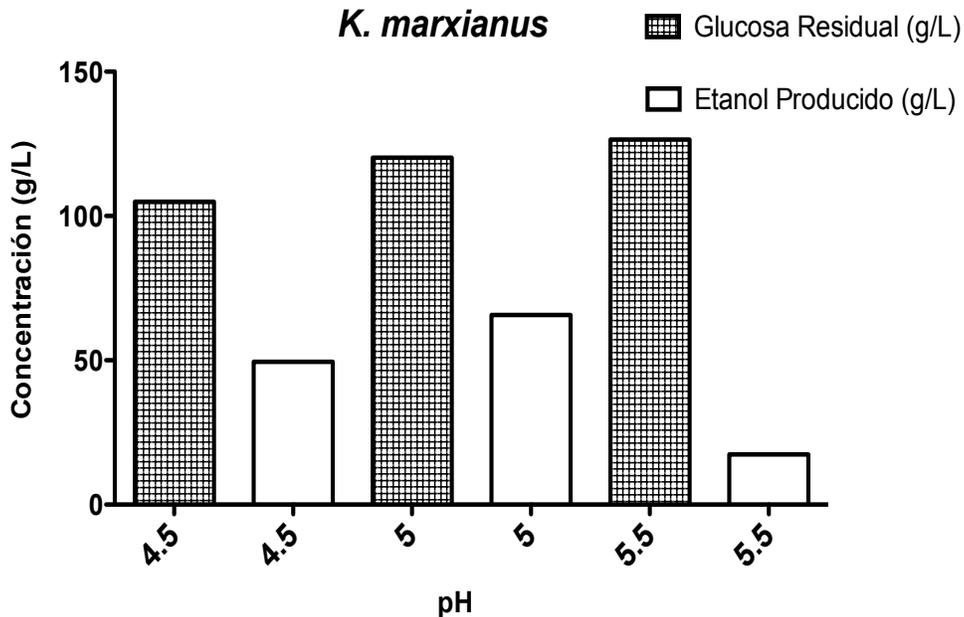


Figura 23 Fermentaciones en medio líquido con 20% p/v de glucosa con la levadura *Kluyveromyces marxianus* a diferentes valores de pH, a 30°C durante 72 horas. Composición del medio: Glucosa 20% (p/v), extracto de levadura 0.5% (p/v), sulfato de amonio 0.1% (p/v), Fosfato de potasio monobásico 0.1% (p/v), sulfato de magnesio 0.05% (p/v).

Efecto de la concentración inicial de glucosa

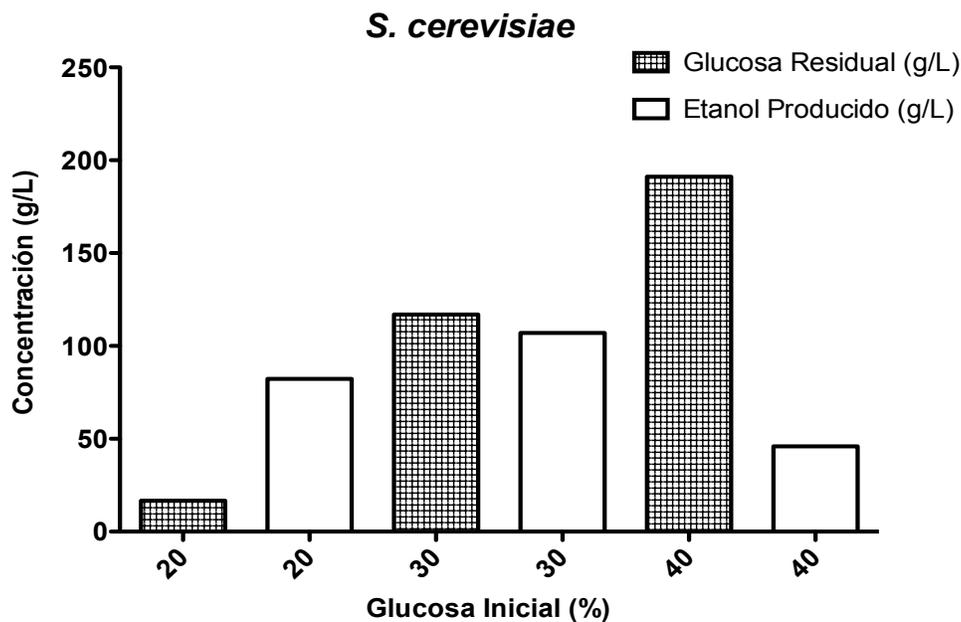
Saccharomyces cerevisiae R11

Esta prueba resultó interesante, debido a que al mismo tiempo que se pretendía conocer que concentración de glucosa inicial es la ideal para obtener un mayor rendimiento en la producción de etanol, se podría observar de manera indirecta la tolerancia al mismo para cada una de las levaduras.

Los resultados obtenidos (Figura 24) muestran que la glucosa residual es mayor a medida que la concentración inicial aumenta, y la producción de etanol no aumenta si en el medio hay mayor presencia de glucosa. Este dato podría explicarse por la producción de compuestos furfúricos durante la esterilización de los medios que impiden la producción de etanol.

En la gráfica resalta el mayor rendimiento de etanol a 30% de concentración inicial con este consumo de glucosa se esperaría una producción de etanol de aproximadamente 125 g/L, sin embargo el resultado experimental fue de 107 g/L.

En el caso de una concentración inicial de 40% de glucosa, se esperaría que el consumo de glucosa fuera mayor que a la concentración de 30%, pero no ocurrió así, se comprobó que al someter el medio con 40% de glucosa al proceso de esterilización se lleva a cabo un proceso de caramelización de la glucosa, por eso no se parte de un 40% sino que se tiene casi la misma cantidad en g/L de glucosa inicial que para la concentración de 30%.



Figura

24 Fermentaciones con medio líquido de glucosa de *Saccharomyces cerevisiae* a diferentes concentraciones iniciales p/v, a 30°C y pH= 5.5 durante 72 horas. Composición del medio: Extracto de levadura 0.5% (p/v), sulfato de amonio 0.1% (p/v), Fosfato de potasio monobásico 0.1% (p/v), sulfato de magnesio 0.05% (p/v).

Kluyveromyces marxianus Pp202

La mayor producción de etanol se obtiene a la concentración de 30%, a 40% la producción es muy baja y a 20% se encuentra a la mitad de los valores anteriores. (Figura 25)

Se cree que la concentración ideal de glucosa para esta levadura es 30%, con un rendimiento en la producción de etanol de 65.49 g/L

Agrupando los datos de los parámetros anteriores con este último de concentración se concluye que a pesar de que *K. marxianus* tiene un buen crecimiento a altas temperaturas y a altas concentraciones de glucosa, los rendimientos de etanol disminuyen a medida que la temperatura, el pH y la concentración aumentan.

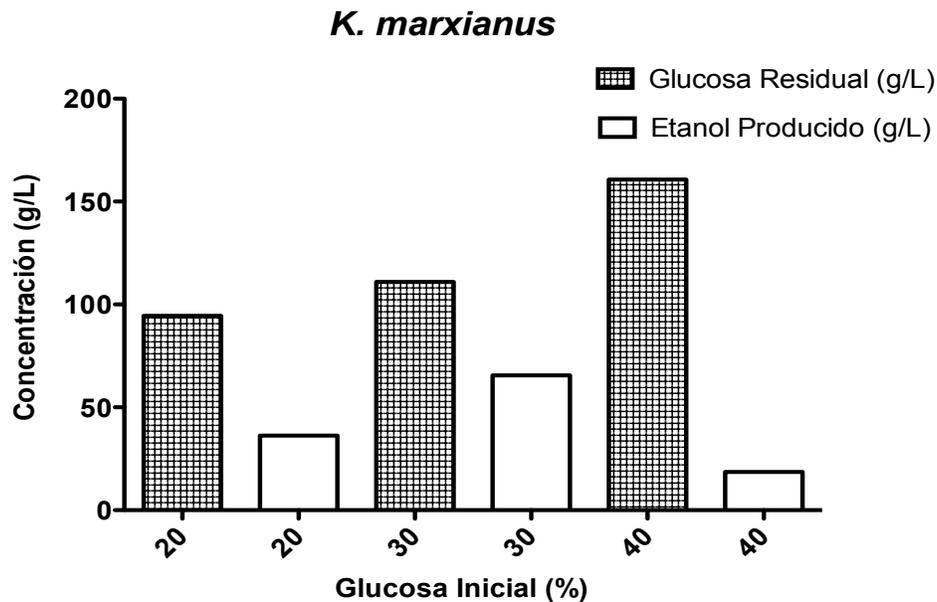


Figura 25 Fermentaciones con medio líquido de glucosa de *Kluyveromyces marxianus* a diferentes concentraciones iniciales p/v a 30°C y pH= 5 durante 72 horas. Composición del medio: Extracto de levadura 0.5% (p/v), sulfato de amonio 0.1% (p/v), Fosfato de potasio monobásico 0.1% (p/v), sulfato de magnesio 0.05% (p/v).

Comparación de las cepas Sc R11, Thermosacc y Ehtanol Red en la producción de etanol.

Con el objetivo de probar la eficiencia de la cepa R11 *Saccharomyces cerevisiae* aislada anteriormente. Se comparó la producción de etanol de esta cepa con la producción de dos cepas comerciales (Thermosacc y Ehtanol Red). Inicialmente se realizaron controles de fermentación con 20% de glucosa (p/v) como se hizo durante el screening y caracterización. Los resultados obtenidos muestran que la cantidad de

etanol producido por la cepa R11 es comparable con una de las mejores levaduras del mercado que es *Thermosacc*. La diferencia entre una y otra varía alrededor del 10%. Mientras que la eficiencia de *Ethanol red* es inferior a las antes descritas (Figuras 26). Con base a estos resultados las tres cepas se evaluaron en la muestra de hidrolizado del BAB, las muestras no se centrifugaron y sólo se agregó en cada caso 0.2% de extracto de levadura para enriquecer el medio y se agregó la cepa correspondiente. Como se observa en la figura 27, la producción de etanol por R11 es cercana a la de *Thermosacc* (26.2 y 29.1g/L respectivamente). Este resultado hace a R11 una cepa candidata para llevar a cabo el estudio de la fermentación de los hidrólizados enzimáticos de BAB.

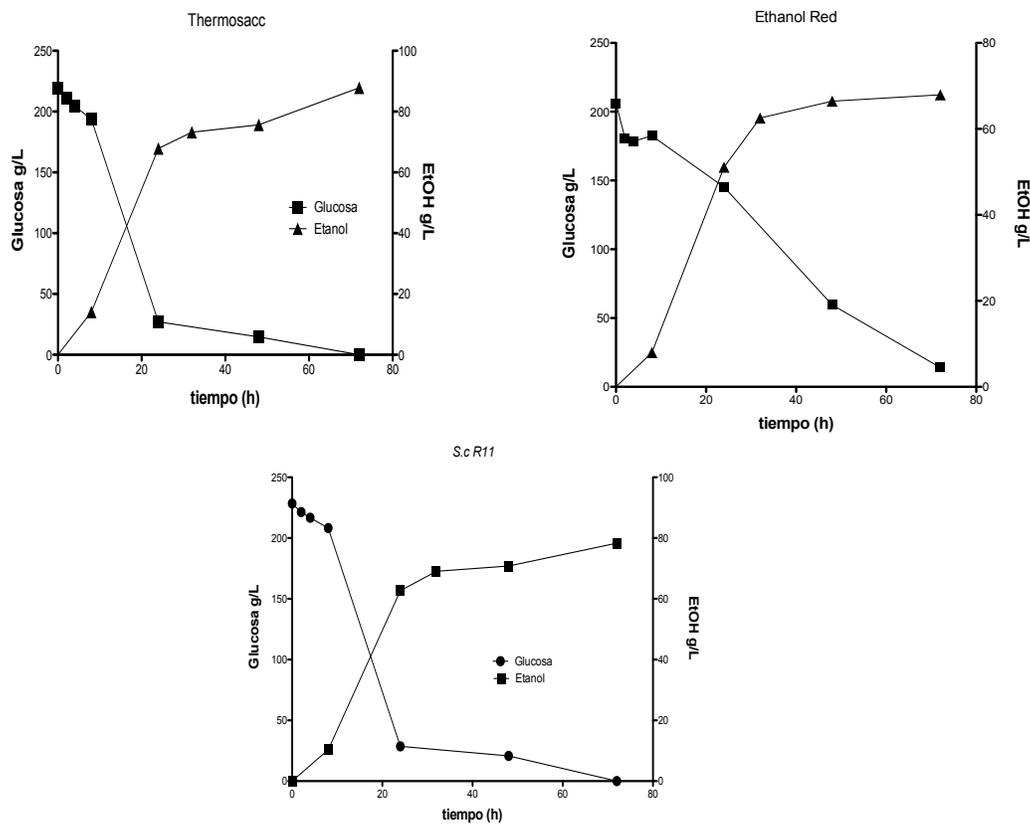


Figura 26. Fermentación con la cepa *Thermosacc* utilizando 20% (p/v) de glucosa. Condiciones de la fermentación: 30°C por 72 horas. Composición del medio: Extracto de levadura 0.5% (p/v), sulfato de amonio 0.1% (p/v), Fosfato de potasio monobásico 0.1% (p/v), sulfato de magnesio 0.05% (p/v).

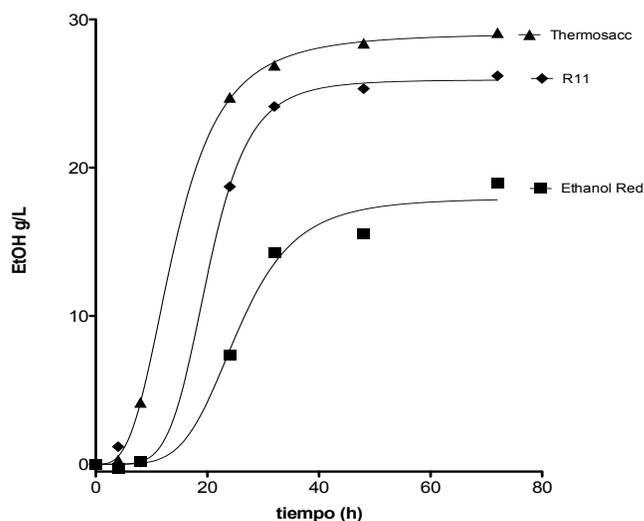


Figura 27 Comparativo de las fermentaciones realizadas con las cepas *Thermosacc*, *Ethanol Red* y *S.c. R11* utilizando 20% (p/v) de bagazo de agave azul previamente hidrolizado, como sustrato. Condiciones de la fermentación: 30°C por 72 horas. Enriquecimiento del medio con 0.2 % de Extracto de Levadura.

Composición del producto de la hidrólisis enzimática del Bagazo de Agave

Después de la hidrólisis enzimática los azúcares producidos se identificaron por HPLC. Se encontró que el medio estaba constituido principalmente por glucosa >90%, xilosa <10% así como trazas de celobiosa y oligos (Figura 28). Para su identificación se emplearon diferentes mono- y di-sacáridos como estándares (Figura 29). Este dato es relevante dado que nos permitió enfocarnos principalmente en la transformación de glucosa a etanol, por tal razón el medio sintético se constituyó principalmente de glucosa y el criterio de selección se basó en aquellos microorganismos cuya producción de etanol fuera máxima.

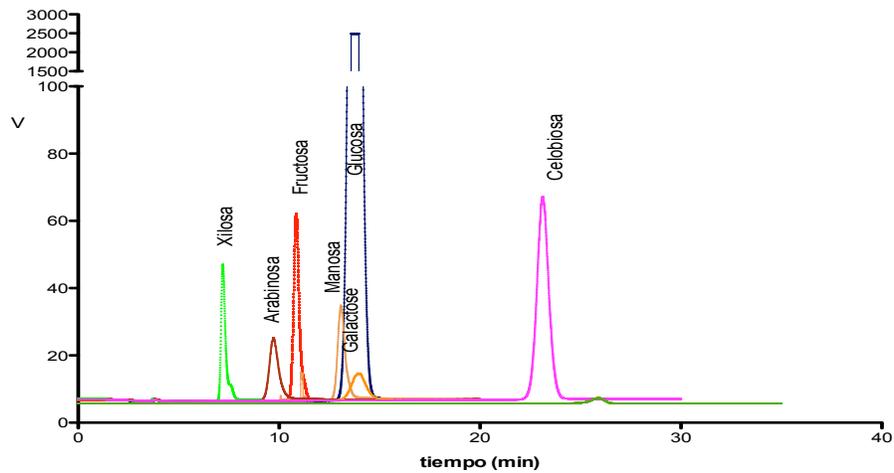
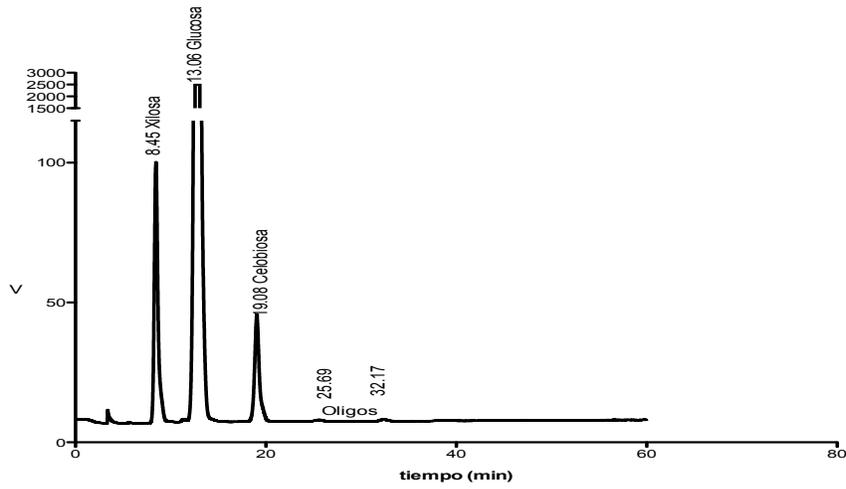


Figura 28 Perfil cromatográfico del estándar de azúcares, determinado por HPLC



Perfil cromatográfico de BAB hidrolizado por Cellic CTec2

Figura 29. Perfil cromatográfico de BAB hidrolizado por Cellic CTec2. Condiciones de la hidrólisis: 50°C y 30 horas. Al 10% de consistencia de Bagazo de Agave Azul (p/v).

Fermentaciones con sustrato lignocelulósico: Bagazo de agave azul (BAB).

La finalidad de obtener cepas a partir de bebidas alcohólicas como el pulque y el bagazo y posteriormente caracterizarlas fue conseguir microorganismos aptos para llevar a cabo la fermentación de los azúcares provenientes de la hidrólisis enzimática del bagazo de agave azul (BAB).

La hidrólisis enzimática del BAB se realizó con muestras tratadas previamente de manera mecánica con hidróxido de sodio, con el objetivo de extraer lignina y abrir las fibras para dejar expuesta la celulosa a las enzimas. Las concentraciones de sólidos empleadas en la reacción fueron de 10 y 20%.

La concentración de azúcares reductores alcanzada después de la reacción con las enzimas fue similar en ambas concentraciones de sólidos (Figuras 30 y 32). A los resultados obtenidos para cada tiempo se le restaron los azúcares reductores provenientes de la enzima y los provenientes de la hidrólisis alcalina y tratamiento mecánico. Sin embargo, para llevar a cabo la fermentación, dichos azúcares son considerados, es por eso que la concentración inicial de azúcares reductores observada para la fermentación es superior a la obtenida de la hidrólisis.

Las fermentaciones se llevaron a cabo usando el producto de la hidrólisis enzimática y las dos cepas seleccionadas previamente. A los hidrolizados se agregó únicamente 0.2% de extracto de levadura, el pH del medio no se ajustó ya que desde la reacción de hidrólisis enzimática se manejó un pH de 5.5. Después se incrementó la temperatura hasta 80°C por un minuto para asemejar un proceso de pasteurización y evitar una posible contaminación. Posteriormente el sistema se enfrió a 30°C para agregar la levadura R11 o Pp202. La fermentación se siguió por 72 horas. Los resultados obtenidos para cada levadura se muestran en las figuras 31 y 33. Las gráficas muestran que el rendimiento de producción de etanol para *S. cerevisiae* R11 y *K. marxianus* Pp202 fue de 68% y 66% respectivamente. Para el cálculo de rendimiento se consideró la cantidad de etanol que se podría producir a partir de la concentración de azúcares reductores totales al inicio de la fermentación.

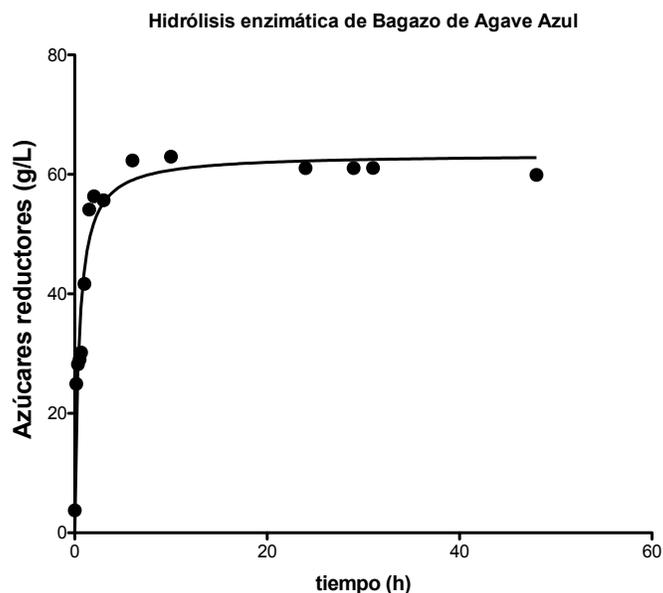


Figura 30. Hidrólisis enzimática de Bagazo de Agave Azul al 20% (p/v). Condiciones de la hidrólisis: 50°C y 30 horas. Enzimas utilizadas: Cellic CT2 y Vyscozyme (10 mg de proteína/material seco).

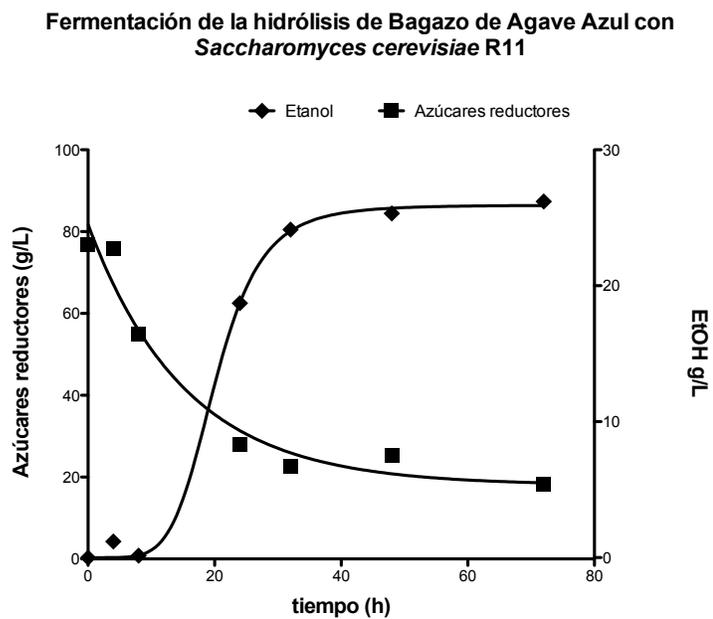


Figura 31. Fermentación con la cepa *S. cerevisiae* utilizando 20% de Bagazo Agave Azul previamente tratado como sustrato. Condiciones de la fermentación: 30°C por 72 horas. Enriquecimiento del medio con 0.2 % de Extracto de Levadura.

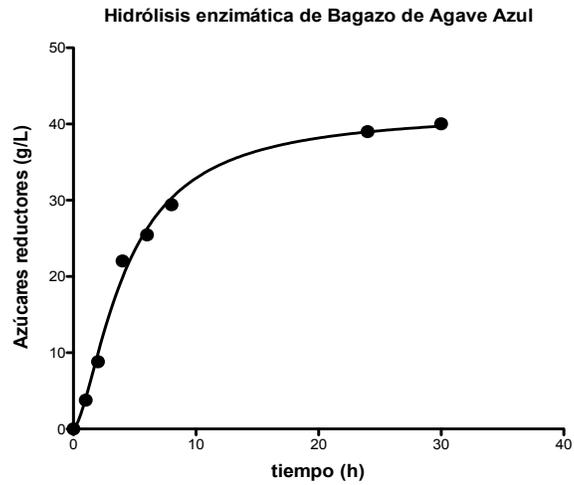


Figura 32. Hidrólisis enzimática de Bagazo de Agave Azul al 10% p/v. Enzimas utilizadas: Cellic CT2 y Vyscozyme (10 mg de proteína/material seco).

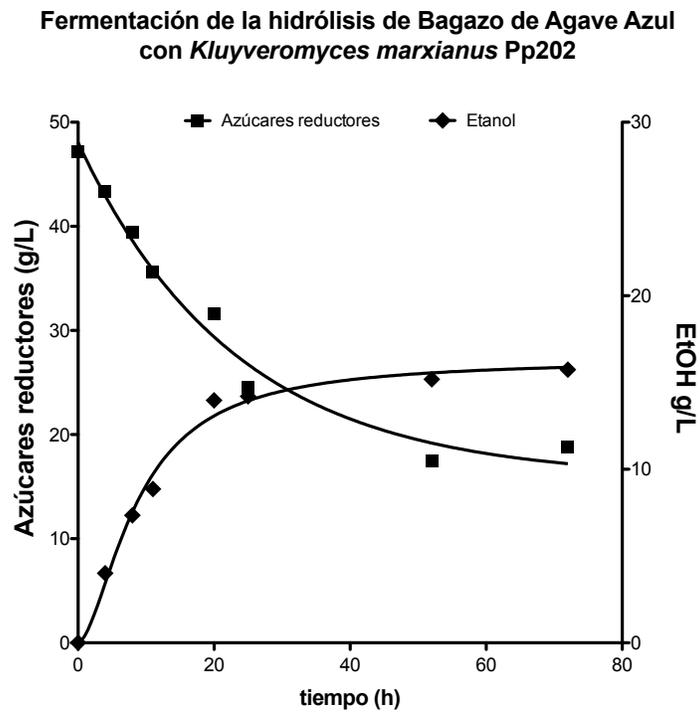


Figura 33. Fermentación con la cepa *K. marxianus* utilizando 10% de bagazo de agave azul previamente tratado como sustrato. Condiciones de la fermentación: 30°C por 72 horas. Enriquecimiento del medio con 0.2 % de Extracto de Levadura.

Comparando los rendimientos de las fermentaciones con ambas cepas se observan resultados similares. En un medio de fermentación natural (BAB hidrolizado) *K.marxianus*Pp202 es capaz de adaptarse alcanzando el mismo rendimiento que el obtenido en el medio sintético (glucosa y sales), mientras que *S.cerevisiae* R11 no consume la totalidad de la glucosa presente en el medio con BAB, hecho que se refleja en una disminución de casi 30% en el rendimiento obtenido con el medio con BAB comparado con el medio sintético.

Conclusiones

Se realizó el aislamiento de microorganismos fermentadores a partir de muestras de pulque y bagazo de agave azul. Se seleccionaron las mejores 38 colonias y mediante secuenciación se identificaron 9 de ellas: *Pichia kudravzevi*, *Kluyveromyces sp*, *Kluyveromyces lactis*, *Kluyveromyces marxianus*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces sp* y *Issatchenkia orientalis*

Se obtuvieron las condiciones óptimas para la producción de etanol para las dos cepas seleccionadas: *Saccharomyces cerevisiae* y *Kluyveromyces marxianus*:

Para *Saccharomyces cerevisiae* se encontró que las condiciones óptimas de crecimiento son: 30°C, pH= 5.5. Sin embargo, la producción de etanol no se ve incrementada al aumentar la concentración de glucosa inicial.

En el caso de *Kluyveromyces marxianus* la temperatura óptima es de 30°C, pH= 5.5, con un rendimiento máximo de etanol de 70% a partir de una concentración de glucosa inicial de 20%, mientras que para *S. cerevisiae*R11 el rendimiento máximo de etanol alcanzado fue de 98% bajo las mismas condiciones.

De acuerdo a los resultados obtenidos *S. cerevisiae*R11 es la mejor cepa para producir etanol. Cabe señalar que *K. marxianus* es una cepa que a diferencia de la R11 es capaz de crecer hasta temperaturas de 45°C, lo que haría una buena candidata para un proceso de sacarificación-fermentación simultánea ya que las temperaturas óptimas para llevar a cabo la hidrólisis de la celulosa y hemicelulosa del bagazo se encuentran entre los 40 y 50°C.

Se realizó la hidrólisis enzimática del bagazo de agave azul para su posterior fermentación con las cepas seleccionadas. A diferencia de los resultados obtenidos con el medio sintético, *K. marxianus* Pp202 resultó ser una buena alternativa para la producción de etanol a partir del residuo lignocelulósico, ya que no existe diferencia

en cuanto a rendimiento tanto en medio sintético como el medio con BAB. En el caso de la cepa *S. cerevisiae* R11 el rendimiento en el medio con BAB disminuyó considerablemente.

Perspectivas

Identificar y caracterizar las cepas restantes con potencial de fermentación de glucosa.

Evaluar el potencial para fermentar pentosas de las cepas aisladas.

Estudiar cuales son los factores que afectan la producción de etanol por *S.cerevisiae* R11 en sistemas con BAB. (Agitación, aereación, concentración de inhibidores, sales y fuente de nitrógeno en el medio).

Evaluar la capacidad de *K. marxianus*Pp 202 para la fermentación de pentosas.

Estudiar a profundidad la reacción de hidrólisis enzimática con el objetivo de mejorar los rendimientos de los azúcares reductores presentes.

Anexo

NCBI Blast:Nucleotide Sequence (767 letters)

8/10/11 10:22 PM

BLAST®

Basic Local Alignment Search Tool

[NCBI/BLAST/blastn suite/](#) Formatting Results - 46JN37C501N

Nucleotide Sequence (767 letters)

Query ID |cl|30379
Description None
Molecule type nucleic acid
Query Length 767

Database Name nr
Description All GenBank+EMBL+DDBJ+PDB
sequences (but no EST, STS,
GSS, environmental samples or phase 0,
1 or 2 HTGS sequences)
Program BLASTN 2.2.25+

Graphic Summary

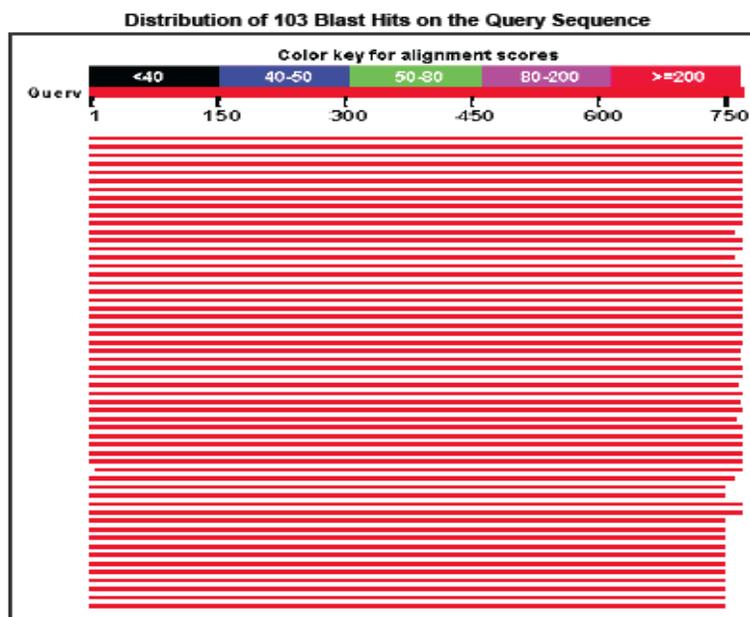


Figura 1 . Resultado de BLAST para la colonia R11 identificada como *Saccharomyces cerevisiae*.

Descriptions

Legend for links to other resources: [U](#) UniGene [E](#) GEO [G](#) Gene [S](#) Structure [M](#) Map Viewer [V](#) PubChem BioAssay

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident	Links
BK006345.2	TPA: TPA_inf: Saccharomyces cerevisiae S288c chromosome XII, complete sequence	1373	2746	99%	0.0	98%	
FN393995.1	Saccharomyces cerevisiae 18S rRNA gene (partial), ITS1, 5.8S rRNA gene, ITS2 and 26S rRNA gene (partial), strain MUCL 51208	1373	1373	99%	0.0	98%	
GQ376091.1	Saccharomyces cerevisiae isolate UQA/HCPF 5911 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; Internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and Internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 26S ribosomal RNA gene, partial sequence	1373	1373	99%	0.0	98%	
FJ738809.1	Saccharomyces cerevisiae 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; Internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and Internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 26S ribosomal RNA gene, partial sequence	1373	1373	99%	0.0	98%	
FJ502348.1	Saccharomyces cerevisiae isolate ZY9 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; and Internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and Internal transcribed spacer 2, complete sequence	1373	1373	99%	0.0	98%	
FM177660.1	Uncultured compost fungus 18S rRNA gene (partial), ITS1, 5.8S rRNA gene, ITS2 and 26S rRNA gene (partial), clone NK009_032	1373	1373	99%	0.0	98%	
EU719073.1	Saccharomyces bayanus x Saccharomyces cerevisiae strain CHFY0321 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; Internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and Internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 26S ribosomal RNA gene, partial sequence	1373	1373	99%	0.0	98%	
AY428861.1	Saccharomyces boulardii 26S ribosomal RNA gene, partial sequence; Internal transcribed spacer 2, 5.8S ribosomal RNA gene, and Internal transcribed spacer 1, complete sequence; and 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	1373	1373	99%	0.0	98%	
AY235811.1	Saccharomyces cerevisiae 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; Internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene and Internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 26S ribosomal RNA gene, partial sequence	1373	1373	99%	0.0	98%	
Z73326.1	S.cerevisiae chromosome XII reading frame ORF YLR154c	1373	1373	99%	0.0	98%	
U53879.1	Saccharomyces cerevisiae chromosome XII cosmid 9634	1373	2746	99%	0.0	98%	
AM711362.1	Uncultured compost fungus partial 18S rRNA gene, ITS1, 5.8S rRNA gene, ITS2 partial 26S rRNA gene, clone AF03	1371	1371	98%	0.0	99%	
GUS42435.1	Uncultured eukaryote clone N709T_73 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; Internal transcribed spacer 1, complete sequence; and 5.8S ribosomal RNA gene, partial sequence	1367	1367	99%	0.0	98%	
GUS42384.1	Uncultured eukaryote clone N707T_71 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; Internal transcribed spacer 1, complete sequence; and 5.8S ribosomal RNA gene, partial sequence	1367	1367	99%	0.0	98%	
GU319981.1	Saccharomyces cerevisiae strain ATCC 204505 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; Internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and Internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 26S ribosomal RNA gene, partial sequence	1367	1367	98%	0.0	99%	
EU649673.1	Saccharomyces cerevisiae strain CHFY0901 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; Internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and Internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 26S ribosomal RNA gene, partial sequence	1367	1367	99%	0.0	98%	
AM902094.1	Uncultured ascomycete ITS region including 18S rRNA gene, ITS1, 5.8S rRNA gene, ITS2 and 26S rRNA gene, clone BF-OTU256	1367	1367	99%	0.0	98%	
DQ167468.1	Saccharomyces cerevisiae strain W22 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; Internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and Internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 26S ribosomal RNA gene, partial sequence	1367	1367	99%	0.0	98%	

Figura 1 (Continuación). Resultado de BLAST para la colonia R11 identificada como *Saccharomyces cerevisiae*.

BLAST®

Basic Local Alignment Search Tool

[NCBI/BLAST/blastn suite/](#) Formatting Results - 46KCD2WH01S

Nucleotide Sequence (699 letters)

Query ID |d|11127
Description None
Molecule type nucleic acid
Query Length 699

Database Name nr
Description All GenBank+EMBL+DDBJ+PDB sequences (but no EST, STS, GSS, environmental samples or phase 0, 1 or 2 HTGS sequences)
Program BLASTN 2.2.25+

Graphic Summary

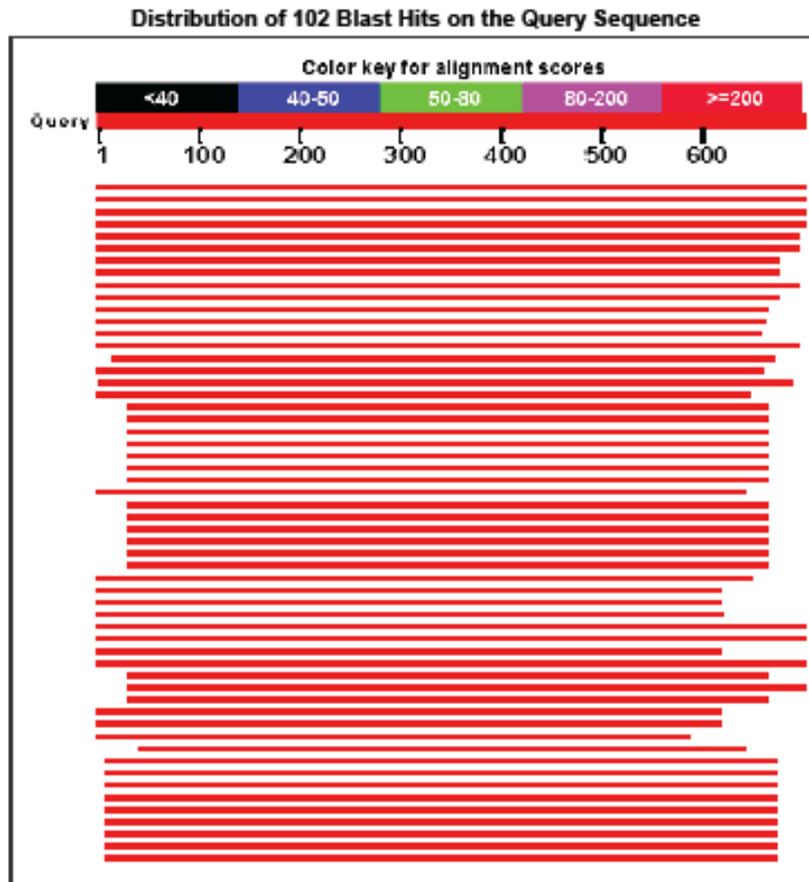


Figura 2. Resultado de BLAST para la colonia Pp202 identificada como *Kluyveromyces marxianus*

Descriptions

Legend for links to other resources: [U](#) UniGene [E](#) GEO [G](#) Gene [S](#) Structure [M](#) Map Viewer [P](#) PubChem BioAssay

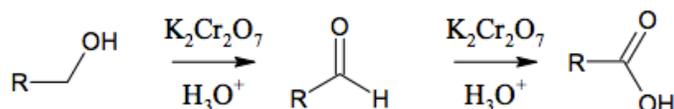
Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident	Links
HQ396523.1	Kluyveromyces marxianus strain CHY1612 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; Internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and Internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 26S ribosomal RNA gene, partial sequence	1291	1291	100%	0.0	100%	
FM177658.1	Uncultured compost fungus 18S rRNA gene (partial), ITS1, 5.8S rRNA gene, ITS2 and 26S rRNA gene (partial), clone NK009_030	1291	1291	100%	0.0	100%	
HQ014731.1	Kluyveromyces marxianus strain WM10.112 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; Internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and Internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	1286	1286	100%	0.0	99%	
AF543841.1	Kluyveromyces marxianus 26S ribosomal RNA, 18S ribosomal RNA genes, Internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene and Internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 26S ribosomal RNA gene, partial sequence	1284	1284	100%	0.0	99%	
AY339806.1	Kluyveromyces marxianus isolate VA 116042-03 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; Internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and Internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	1267	1267	98%	0.0	99%	
EU019227.1	Kluyveromyces marxianus isolate AS2.1549 Internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and Internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 26S ribosomal RNA gene, partial sequence	1256	1256	98%	0.0	99%	
FM173070.1	Uncultured compost fungus 18S rRNA gene (partial), ITS1, 5.8S rRNA gene, ITS2 and 26S rRNA gene (partial), clone TT037	1243	1243	96%	0.0	100%	
AM711389.1	Uncultured compost fungus partial 18S rRNA gene, ITS1, 5.8S rRNA gene, ITS2 partial 26S rRNA gene, clone AP33	1243	1243	96%	0.0	100%	
EU019224.1	Kluyveromyces marxianus isolate F4-3 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; Internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and Internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 26S ribosomal RNA gene, partial sequence	1236	1236	98%	0.0	98%	
FM173088.1	Uncultured compost fungus 18S rRNA gene (partial), ITS1, 5.8S rRNA gene, ITS2 and 26S rRNA gene (partial), clone TTD41	1229	1229	96%	0.0	99%	
AB365315.1	Kluyveromyces marxianus genes for ITS1, 5.8S rRNA, ITS2, 28S rRNA, complete and partial sequence, strain: 13B03	1223	1223	94%	0.0	100%	
DQ249191.1	Kluyveromyces marxianus strain ATCC 4135 Internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and Internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	1214	1214	94%	0.0	99%	
EF568057.1	Kluyveromyces marxianus strain WM 39 Internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and Internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	1210	1210	93%	0.0	100%	
L47107.1	Kluyveromyces marxianus 18S ribosomal RNA gene, 3' end, 5.8S ribosomal RNA gene, complete, 25S ribosomal RNA gene, 5' end	1206	1206	98%	0.0	97%	
GU256755.1	Kluyveromyces marxianus strain ATCC 60480 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; Internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and Internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 26S ribosomal RNA gene, partial sequence	1205	1205	93%	0.0	100%	
DQ249190.1	Kluyveromyces marxianus strain 00-81-1864 Internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and Internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	1194	1194	94%	0.0	99%	
	Kluyveromyces marxianus ATCC:66028 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; Internal transcribed spacer 1, 5.8S						

Figura 2 (Continuación). Resultado de BLAST para la colonia Pp202 identificada como *Kluyveromyces marxianus*.

Apéndice

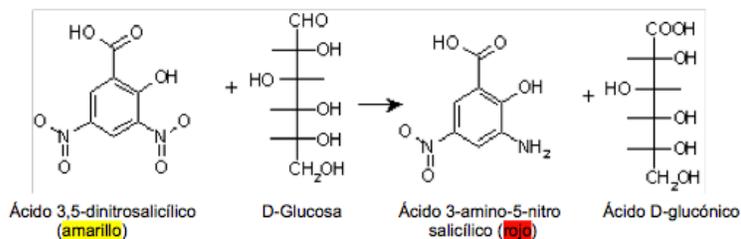
- Oxidación de alcoholes primarios con dicromato de Potasio ($K_2Cr_2O_7$)

La oxidación de alcoholes primarios produce, primeramente, el correspondiente aldehído, que fácilmente se oxida al ácido. Esta reacción no es muy conveniente para preparar el aldehído, a menos que éste, con menor punto de ebullición que el alcohol o el ácido, se destile durante su formación. En este caso el único propósito de utilizar esta metodología es detectar la producción de etanol de manera cuantitativa, detectando la oxidación del etanol a ácido acético.



- Metodología Ácido 3,5- Dinitrosalicílico (DNS)

El método colorimétrico del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS), también llamado método de azúcares reductores, se basa en la presencia de un grupo carbonilo libre (C=O). Consiste en la reducción del DNS (de color amarillo) por la glucosa u otro azúcar al ácido 3-amino-5-nitrosalicílico (de color rojo ladrillo), bajo condiciones alcalinas (Chaplin, 1986), cuya presencia puede detectarse por la lectura de la Absorbancia en la zona de 540-570 nm.



Teóricamente la reacción ocurre entre un mol de azúcar, el cual reacciona con un mol de ácido 3,5-dinitrosalicílico, sin embargo se piensa que existe más de un sitio de reacción y que la estequiometría es más complicada, de la descrita anteriormente.

- *Cromatografía de Gases*

La cromatografía es un método físico de separación en el cual los componentes a ser separados son distribuidos entre dos fases, una de las cuales es estacionaria mientras la otra se mueve en una dirección definida. Los componentes son separados por sus diferentes tasas de migración (IUPAC). La cromatografía puede ser clasificada por su utilidad y en base al material que se utilice como eluyente para separar los solutos. De acuerdo a su utilidad la cromatografía se clasifica en: analítica, utilizada para determinar los químicos presentes en una mezcla y en que concentración; y preparativa, utilizada para purificar grandes cantidades de químicos.

Si los componentes de la mezcla son analizados cuantitativamente, recibe el nombre de *evaluación* o *cuantificación*. Si el soluto es separado del adsorbente por lavado antes del análisis, entonces se le llama *elución* y al agente a ser analizado se le llama *eluyente*, al líquido que sale de la columna se le nombra *efluente*. Cuando la fase móvil es líquida, la técnica suele recibir un nombre relacionado con la forma en que se dispone la fase estacionaria (columna, capa fina, papel, etc.). Existen tres formas de desarrollar este proceso: elución, análisis frontal y desplazamiento. Cuando la fase móvil es un gas, solamente se utilizan columnas y el proceso siempre se realiza por elución.

La forma más usual de hacer cromatografía de gases es utilizando un líquido como fase estacionaria; recibe entonces el nombre de cromatografía gas-líquido (CGL). También se utilizan adsorbentes, dando lugar a la cromatografía gas-sólido (CGS), pero en mucho menor proporción.

La cromatografía de gases es una técnica analítica que puede ser utilizada para separar compuestos orgánicos basada en sus volatilidades. También provee información cualitativa y cuantitativa de los componentes presentes en una mezcla. Los componentes son separados por sus diferencias de partición entre la fase móvil gaseosa y la fase estacionaria en la columna, permitiendo que sean separados en tiempo y espacio.

Bibliografía.

- 1-. Balat M., Balat H., Öz C., "Progress in bioethanol processing", *Progress in Energy and Combustion Science* 34:551-573 (2008).
- 2-. Bautista-Justo M. , Garcia-Oropeza L. , Barboza-Corona J.E., P.-N. L. A. (2001). El agave tequilana Weber y la producción de tequila. *Acta Universitaria*, 11, 26–34.
- 3-. Chassang-Douillet A, Ladet J, Boze H, Galzy P (1973) Respiratory metabolism of *Kluyveromyces fragilis* van der Walt. *Z Allg Mikrobiol* 13:193–199
- 4-. Dinh, T. N., Nagahisa, K., Hirasawa, T., Furusawa, C., & Shimizu, H. (2008). Adaptation of *Saccharomyces cerevisiae* cells to high ethanol concentration and changes in fatty acid composition of membrane and cell size. *PLoS one*, 3(7), e2623. doi:10.1371/journal.pone.0002623
- 5-. Eklund, R., and Zacchi G (1995) Simultaneous saccharification and fermentation of steam- pre treated willow. *Enzyme Microb. Tech.* 17(3), 225-259
- 6-. Fonseca, G. G., Heinzle, E., Wittmann, C., & Gombert, A. K. (2008). The yeast *Kluyveromyces marxianus* and its biotechnological potential. *Applied microbiology and biotechnology*, 79(3), 339–54. doi:10.1007/s00253-008-1458-6
- 7-. Garrués, J. A., Reseau, A., & García-Galindo, D. (2010). *Energía de la biomasa, volumen I* (p. 557). Universidad de Zaragoza. Retrieved from <http://books.google.com/books?id=P58rcPu5O90C&pgis=1>
- 8-. Goldstein, E., & Gutman, G. E. (2010). Biocombustibles y biotecnología . Contexto internacional , situación en Argentina.
- 9-. González García Yolanda, González Reynoso Orfil, N. A. J. (2005). Potencial del bagazo de agave tequilero para la producción de biopolímeros y carbohidrasas

por bacterias celulolíticas y para la obtención de compuestos fenólicos. *E-gnosis*, 3(14). Retrieved from

<http://148.202.105.18/websecgral/sites/archivos/acuerdo/2007acuerdorg01.pdf>

- 10-. Gusakov, A., Salanovich, T., Antonov, A., Ustinov, B., Okunev, O., Burlingame, R., Emalfarb, M., Baez, M., Sinitsyn, A., (2007) Design og highly efficient cellulase mixtures for enzymatic hydrolysis of cellulose. *Biotechnology and Bioengineering*. 97(5), 1028-1038.
- 11-. saccharification and fermentation for the production of ethanol from lignocellulosic biomass. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 48(5), 1971-1976.
- 12-. Jones TD, Havard JM, Daugulis AJ (1993) Ethanol production from lactose by extractive fermentation. *Biotechnol Lett* 15:871–876
- 13-. Kádár, Z., Emtiazi, G., and Taherzadeh, M.J (2006 a). Ethanol production from diluted-acid pretreated rice straw by simultaneous saccharification and fermentation.
- 14-. Katahira, S., A. Mizuike, et al. (2006). "Ethanol fermentation from lignocellulosic hydrolysate by a recombinant xylose- and cellooligosaccharide-assimilating yeast strain." *Applied Microbiology and Biotechnology* 72(6): 1136-1143.
- 15-. Kotter, P., Ciriacy, M (1993) Xylose fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 38: 776-783
- 16-. Kumar, D., & Murthy, G. S. (2011). Impact of pretreatment and downstream processing technologies on economics and energy in cellulosic ethanol production. *Biotechnology for biofuels*, 4, 27. doi:10.1186/1754-6834-4-27
- 17-. Kumar, P., Barrett, D. M., Delwiche, M. J., & Stroeve, P. (2009). Methods for Pretreatment of Lignocellulosic Biomass for Efficient Hydrolysis and Biofuel

Production. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 48(8), 3713–3729.
doi:10.1021/ie801542g

18-. Kurtzman, C. P. & Fell, 1. W. (1998). *The Yeasts - a Taxonomic Study*, 4th edn. Amsterdam: Elsevier

19-. Laplace JM, Delgenes JP, Molleta R, Navarro JM (1991). Combined alcoholic fermentation of D-xylose and D-glucose by four selected microbial strains: process considerations in relation to ethanol tolerance. *Biotechnol. Letters*. 13: 445-450.

20 -. Linde, M., GalbeM., and Zacchi G. (2007). Simultaneous saccharification and fermentation of steam pretreated barley straw at low enzyme loadings and low yeast concentration "Enzyme Microb. Tech. 40(5), 1100-1107.

21-. Nörgård, J. (n.d.). *Ethanol Production from Biomass - Optimization of Simultaneous Saccharification and Fermentation with Respect to Stirring and Heating*.

22-. Schoch, C. L., Seifert, K. a, Huhndorf, S., Robert, V., Spouge, J. L., Levesque, C. A., & Chen, W. (2012). Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(16), 6241–6.
doi:10.1073/pnas.1117018109

23-. van Dijken JP, Weusthuis RA & Pronk JT (1993) Kinetics of growth and sugar consumption in yeasts. *Anton Leeuw Int J G* 63: 343–352.