



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**PRODUCCIÓN DE ETANOL A PARTIR DE BAGAZO DE
AGAVE POR MEDIO DE *KLUYVEROMYCES MARXIANUS***

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICA DE ALIMENTOS

PRESENTA

Ana Cristina Vides Gómez

DIRECTOR DE TESIS

Dra. Carmina Montiel Pacheco



Ciudad Universitaria, Cd. Mx., 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: QFB Alejandro Camacho Cruz
VOCAL: Dra. Maricarmen Quirasco Baruch
SECRETARIO: Dra. Carmina Montiel Pacheco
1er. SUPLENTE: Dr. Óscar Hernández Meléndez
2° SUPLENTE: QFB Genaro Jiménez Reyes

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:

Ana Cristina Vides Gómez

Este trabajo fue realizado con el apoyo de PAPIIT IA204118, Facultad de Química PAIP5000-9153 y del proyecto BABET-REAL5 financiado por el programa de la Comisión Europea Horizon 2020 (654365).

Índice

Introducción	1
Antecedentes	3
Fijación de CO ₂ en plantas	3
Agave	6
<i>Agave tequilana</i>	8
Bagazo de agave	9
Pretratamientos	12
Enzimas hidrolíticas	17
Levaduras	19
Procesos de producción de etanol	24
Etanol como biocombustible	27
Hipótesis	29
Objetivos	29
Objetivo general	29
Objetivos particulares	29
Metodología	30
Pretratamiento del bagazo de agave	30
Hidrólisis del bagazo pretratado	30
Determinación de concentración de glucosa y xilosa por HPLC	30

Curvas de crecimiento de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> y <i>Kluyveromyces marxianus</i>	31
Determinación de concentración de etanol por HPLC	32
Preparación de preinóculo de <i>Kluyveromyces marxianus</i>	32
Fermentación del hidrolizado de bagazo de agave (SHF)	32
Sacarificación fermentación simultánea de bagazo de agave Parte 1 (SFS)	33
Sacarificación fermentación simultánea de bagazo de agave Parte 2 (SFS)	33
Resultados y discusión	34
Hidrólisis de bagazo	34
Curvas de crecimiento	36
Fermentación del hidrolizado de bagazo de agave (SHF)	45
Sacarificación fermentación simultánea de bagazo de agave Parte 1 (SFS)	46
Sacarificación fermentación simultánea de bagazo de agave Parte 2 (SFS)	51
Conclusiones	54
Perspectivas	55
Referencias	55

Índice de figuras

Figura 1. Comparación entre las distintas vías que se pueden generar a partir de la molécula que interactúe con el sitio activo de la enzima Rubisco	4
Figura 2. Separación espacial de las reacciones de fijación de CO ₂ en plantas C4	5
Figura 3. Separación por tiempo de las reacciones de CO ₂ en plantas CAM	6
Figura 4. Rendimiento del crecimiento de distintas especies de <i>Agave</i> en un cultivo sin irrigación	9
Figura 5. Composición química de celulosa, hemicelulosa y lignina	11
Figura 6. Sitios de la cadena de celulosa en donde tiene acción cada enzima del complejo celulasa	28
Figura 7. Fermentación alcohólica	23
Figura 8. Transporte y metabolismo de carbohidratos en levaduras cofermentadoras	25
Figura 9. Procesos de producción de etanol	27
Figura 10. Rendimiento de hidrólisis de bagazo al 5% a 50 °C y pH 5.02 para la obtención de glucosa y xilosa a distintas concentraciones de enzima Cellic CTec2 [®]	35
Figura 11. Rendimiento de hidrólisis de bagazo al 20% a 50 °C y pH 5.02 para la obtención de glucosa y xilosa a distintas concentraciones de enzima Cellic CTec2 [®]	36
Figura 12. Curva de crecimiento de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Thermosacc [®] a 30 °C	37

Figura 13. Curva de crecimiento de <i>Kluyveromyces marxianus</i> ISO3 a 30 °C	38
Figura 14. Consumo de glucosa y producción de etanol por <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Thermosacc [®] durante curva de crecimiento a 30 °C	39
Figura 15. Consumo de glucosa y producción de etanol por <i>Kluyveromyces marxianus</i> ISO3 durante curva de crecimiento a 30 °C	40
Figura 16. Curva de crecimiento de <i>Kluyveromyces marxianus</i> ISO3 a 50 y 40 °C	41
Figura 17. Consumo de glucosa y producción de etanol por <i>Kluyveromyces marxianus</i> ISO3 durante curva de crecimiento a 50 y 40 °C	41
Figura 18. Curva de crecimiento de <i>Kluyveromyces marxianus</i> ISO3 a 45 °C	42
Figura 19. Consumo de glucosa y producción de etanol por <i>Kluyveromyces marxianus</i> ISO3 durante curva de crecimiento a 45 °C	42
Figura 20. Curva de crecimiento de <i>Kluyveromyces marxianus</i> ISO3 a 40 °C	43
Figura 21. Consumo de glucosa y producción de etanol por <i>Kluyveromyces marxianus</i> ISO3 durante curva de crecimiento a 40 °C	44
Figura 22. Consumo de glucosa y producción de etanol por <i>Kluyveromyces marxianus</i> ISO3 durante fermentación de bagazo (20%) tratado con 15 FPU/g de Cellic CTec2 [®]	45
Figura 23. Rendimiento de fermentación de bagazo (20%) por <i>Kluyveromyces marxianus</i> ISO3 tratado con 15 FPU/g de Cellic CTec2 [®]	46

Figura 24. Sacarificación y fermentación simultánea con inoculación a 24 h	47
Figura 25. Rendimiento de etanol en sacarificación y fermentación simultánea con inoculación a 24 h	48
Figura 26. Sacarificación y fermentación simultánea con inoculación a 12 h	49
Figura 27. Rendimiento de etanol en sacarificación y fermentación simultánea con inoculación a 12 h	49
Figura 28. Sacarificación y fermentación simultánea con inoculación a 6 h	50
Figura 29. Rendimiento de etanol en sacarificación y fermentación simultánea con inoculación a 6 h	51
Figura 30. Sacarificación y fermentación simultánea con inoculación a 24 h en reactor	53
Figura 31. Rendimiento de etanol en sacarificación y fermentación simultánea con inoculación a 24 h en reactor	53

Índice de tablas

Tabla 1. Características de cultivos potenciales para la producción de etanol	7
Tabla 2. Composición del bagazo de agave utilizado en el estudio	12
Tabla 3. Pretratamientos para biomasa lignocelulósica	13
Tabla 4. Uso de distintos microorganismos y diferentes sustratos para la producción de etanol	20
Tabla 5. Uso de distintas cepas de <i>K. marxianus</i> y diferentes sustratos para la producción de etanol	22
Tabla 6. Resumen de resultados de curvas de crecimiento de <i>S. cerevisiae</i> Thermosacc [®] y <i>K. marxianus</i> ISO3	44
Tabla 7. Resumen de resultados para la producción de etanol a partir de bagazo de agave por medio de <i>K. marxianus</i> ISO3	54

Abreviaturas

- 2PG: 2-fosfoglicolato
- 3PG: ácido 3-fosfoglicérico
- ATP: Adenosín trifosfato
- CAM: metabolismo ácido de las crasuláceas
- CBP: bioproceso consolidado
- EC: número de la Comisión de Enzimas
- EM: enzima málica
- FPU: unidades de papel filtro (μmol de azúcar reductor formado por minuto durante la hidrólisis)
- GRAS: Generally Recognized As Safe
- Ha: hectárea
- HPLC: cromatografía de líquidos de alta resolución
- MDH: malato deshidrogenasa
- MTBE: metil ter-butil éter
- NAD: nicotinamida adenina dinucleótido (oxidada)
- NADH: nicotinamida adenina dinucleótido (reducida)
- NADP: nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (oxidada)
- NADPH: nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (reducida)
- PDK: piruvato deshidrogenasa quinasa
- PEP: fosfoenolpiruvato
- PEPC: fosfoenolpiruvato carboxilasa
- PGA: 3-fosfoglicerato
- QPS: Qualified Presumption of Safety
- Rubisco: ribulosa 1,5-bifosfato carboxilasa/oxigenasa
- RuBP- ribulosa 1,5-bifosfato
- SFS: sacarificación fermentación simultánea
- SHF: Hidrólisis y fermentación separadas
- SSCF: sacarificación y cofermentación simultánea
- Ton: tonelada

Introducción

En la actualidad, se considera que los combustibles fósiles implican más adversidades que beneficios para la sociedad a pesar de que estos han sido utilizados por muchos años como la principal fuente de energía. Por esta razón, la búsqueda de combustibles alternativos se ha fortalecido en años recientes. Esta búsqueda se divide en cuatro generaciones. Los combustibles de 1^a generación son obtenidos a partir de recursos como aceites vegetales y maíz, lo cual implica que dichos recursos no serán utilizados para el consumo humano. Para evitar esto se busca que los combustibles de 2^a generación puedan ser obtenidos a partir de recursos renovables no destinados al consumo humano como lo son los residuos de la industria agrícola. Por otro lado, la 3^a generación utiliza microalgas para producir biocombustibles, mientras que la 4^a generación hace uso de cianobacterias y cultivos especializados (Naik et al., 2010; Dutta et al., 2014).

En cuanto a la industria agrícola mexicana, una planta ampliamente cultivada es el agave. La superficie utilizada para su cultivo fue de casi 17 mil hectáreas en el año 2017, lo cual es menor a la superficie en la que se cultiva café pero mayor a la superficie en la que se cultiva aguacate (SIAP, 2017). Agave es un género de plantas xerófilas, lo cual significa que dichas plantas son capaces de propagarse en un ambiente seco. Este género es típico del continente americano y la mayor diversidad de especies se encuentra en México con entre 136-150 especies (Velázquez et al., 2016). En este país, la planta se utiliza para la producción de bebidas como tequila, mezcal y pulque. La parte de la planta que sirve para producir estas bebidas es el tallo, también conocido como piña. En el caso del tequila, la piña es sometida a un proceso de cocción para obtener un jarabe rico en fructosa, el cual será fermentado posteriormente. Además del jarabe, un subproducto de

dicha cocción es el bagazo. Éste está compuesto de aproximadamente 47% de celulosa y 18% de hemicelulosa (Montiel *et al.*, 2016), por lo que podría ser utilizado como fuente de carbohidratos fermentables (glucosa y xilosa) para la producción de etanol de segunda generación posterior a una hidrólisis enzimática. De esta manera se evitaría el uso de recursos destinados al consumo humano para la producción de este combustible alternativo. No obstante, la celulosa y hemicelulosa no están completamente disponibles en el bagazo para la hidrólisis enzimática pues estos polisacáridos se encuentran en una estructura compleja que contiene lignina, por lo que es necesario realizar un pretratamiento del bagazo.

Una levadura capaz de llevar a cabo dicha fermentación es *Kluyveromyces marxianus*, la cual es una levadura termotolerante (Azhar *et al.*, 2017) y ha sido clasificada como GRAS (Generally Recognized As Safe) y QPS (Qualified Presumption of Safety) por Estados Unidos y la Unión Europea respectivamente (Lane y Morrissey, 2010). Dicha clasificación implica que existan pocas restricciones para el uso de esta levadura en el sector biotecnológico.

Antecedentes

Fijación de CO₂ en plantas

Según la vía por medio de la cual se lleve a cabo la fijación de CO₂ para la fotosíntesis en las plantas, éstas pueden ser clasificadas como C3, C4 o de metabolismo ácido (CAM). Primero, el CO₂ ingresa a las plantas por medio de los estomas, los cuales son aberturas microscópicas en las hojas de las plantas y estas aberturas permiten el intercambio de gases en la planta. Es decir, permiten la entrada de CO₂ y la salida de O₂ principalmente. Las plantas C3 llevan a cabo la fijación de CO₂ por medio de la enzima ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa/oxigenasa, también conocida como Rubisco, la cual forma 3-fosfoglicerato para que después se pueda obtener glucosa por medio de esta vía con el fin de almacenar energía. Sin embargo, el sitio activo de dicha enzima también puede interactuar con O₂ para formar CO₂ por medio de una vía llamada fotorrespiración (Figura 1). Esto provoca un gasto energético innecesario para plantas como arroz, trigo y soya, pues por esta otra vía no se genera un compuesto por medio del cual se pueda almacenar energía. Para evitar dicho gasto energético, las plantas C4 y CAM se han adaptado para llevar a cabo de manera más eficiente la fijación de CO₂ (Bear et al., 2016).

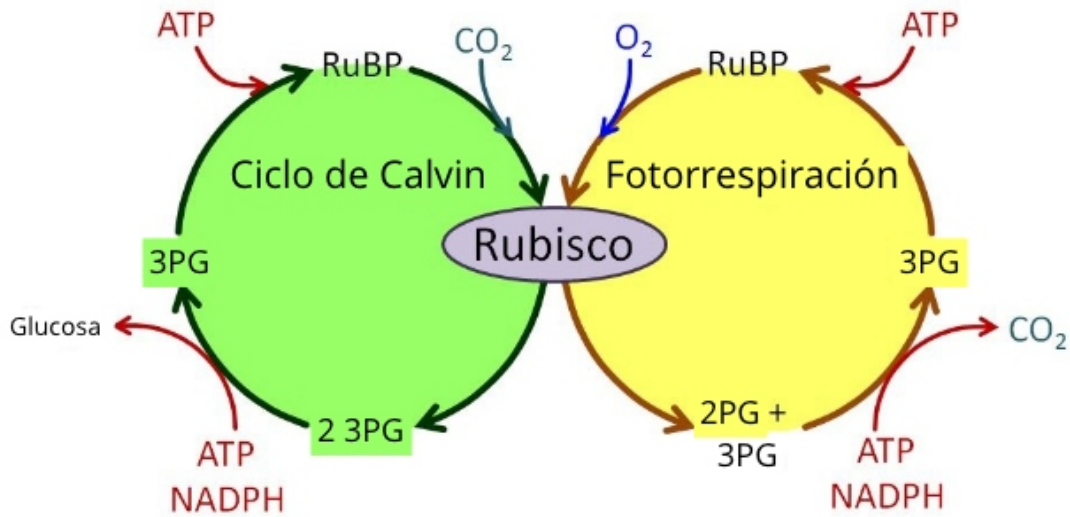


Figura 1. Comparación entre las distintas vías que se pueden generar a partir de la molécula que interactúe con el sitio activo de la enzima Rubisco (Bear et al., 2016)

Las plantas C₄ evitan el gasto energético de la fotorrespiración por medio de la separación de las reacciones de fijación de CO₂ en compartimentos diferentes (Figura 2). El CO₂ también ingresa a la planta por medio del estoma; sin embargo, la enzima encargada de su fijación no es directamente Rubisco, sino fosfoenolpiruvato carboxilasa, la cual se encuentra en las células del mesófilo y forma oxalacetato a partir de fosfoenolpiruvato y CO₂. Dicha carboxilasa reduce la incidencia de la fotorrespiración pues no presenta afinidad por el O₂. Posteriormente, el oxalacetato interactúa con la enzima malato deshidrogenasa para formar malato y éste es transportado a las células del haz vascular. En estas células, el malato es descompuesto por la enzima málica-NADP para liberar CO₂ y que éste interactúe con la enzima Rubisco para seguir el mismo proceso que en las plantas C₃. De esta manera, la enzima Rubisco está rodeada por una alta concentración de CO₂ y una baja concentración de O₂. Por esta razón las plantas C₄,

como la caña de azúcar, el sorgo y el maíz, están mejor adaptadas a climas cálidos y húmedos (Castillo et al., 2005).

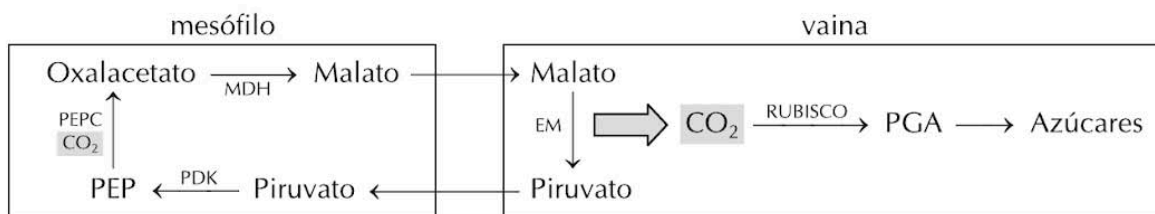


Figura 2. Separación espacial de las reacciones de fijación de CO₂ en plantas C4 (Castillo et al., 2005)

A diferencia de las plantas C₄, las plantas CAM separan las reacciones dependientes de la luz y el ciclo de Calvin por tiempo (Figura 3). Durante la noche, estas plantas mantienen abiertos sus estomas con el fin de difundir CO₂ hacia sus hojas. Al igual que en las plantas C₄, la fijación de CO₂ en las plantas CAM es llevada a cabo por la enzima fosfoenolpiruvato carboxilasa y se forma oxalacetato. Dicho compuesto formará malato por medio de su interacción con la enzima malato deshidrogenasa. El malato será almacenado en la vacuola hasta el día siguiente. Durante el día, los estomas se mantienen cerrados para evitar la difusión de agua hacia el exterior y el malato es descompuesto para liberar CO₂ y que éste sea fijado por medio de la enzima Rubisco para continuar el mismo proceso que en las plantas C₃ y C₄ y así formar glucosa. De esta manera, las plantas CAM no sólo evitan la fotorrespiración, sino que también usan de manera eficiente el agua disponible pues en el día la temperatura tiende a aumentar mientras que la humedad disminuye, por lo que mantener cerrados los estomas en estos momentos implica una gran ventaja para las plantas que crecen en climas cálidos y secos como los cactus, el género *Aloe* y el género *Agave* (Bear et al., 2016).

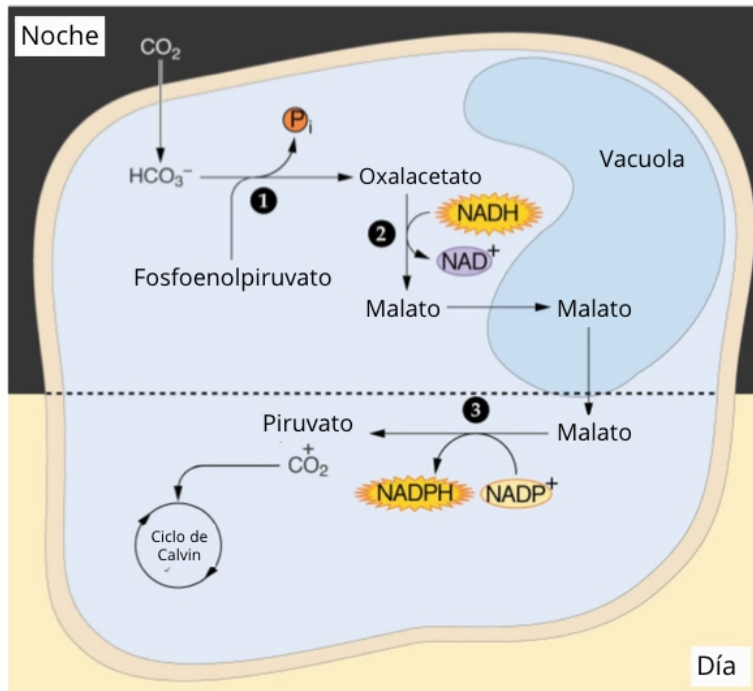


Figura 3. Separación por tiempo de las reacciones de CO_2 en plantas CAM (Bari, 2004)

Agave

Agave es un género de plantas CAM, por lo que crecen en climas calurosos y secos, utilizando de manera eficiente el agua disponible. Dicho uso eficiente de agua reduce su demanda durante el cultivo de este tipo de plantas en comparación con las plantas C3 y C4 (Yang et al, 2015). Lo anterior es visible en la Tabla 1, pues los requerimientos de agua reportados para *Agave spp.* son los más bajos en comparación con el maíz, la caña de azúcar, el pasto *Miscanthus* y el álamo. Además, la productividad de su cultivo es mayor a la del maíz y a la del álamo. Por otra parte, el rendimiento máximo de etanol producido por medio de su procesamiento es el segundo más alto después del rendimiento del pasto *Miscanthus*. El requerimiento de nitrógeno por parte de este

género también es el más bajo; sin embargo, su característica más importante es la resistencia a la sequía, ya que es la única especie con alta tolerancia a la sequía en comparación a los otros cultivos mencionados. Esto implica una gran ventaja pues elimina el conflicto sobre el uso de suelo para cultivo de alimento o para el cultivo de plantas cuyo fin sea la producción de biocombustibles.

Tabla 1. Características de cultivos potenciales para la producción de etanol (Somerville et al., 2010)

Cultivo	Productividad promedio (ton/ha*año)	Rendimiento de etanol (L/ha)	Requerimiento de agua (cm/año)	Tolerancia a sequía	Requerimiento de nitrógeno (kg/ha*año)
Maíz		3800 (total)	50-80	Baja	90-120
Grano	7	2900			
Rastrojo	3	900			
Caña de azúcar	80 (húmeda)	9950 (total)	150-250	Moderada	0-100
Azúcar	11	6900			
Bagazo	10	3000			
Miscanthus	15-40	4600-12,400	75-120	Baja	0-15
Álamo	5-11	1500-3400	70-105	Moderada	0-50
Agave spp.	10-34	3000-10,500	30-80	Alta	0-12

Las plantas del género *Agave* tienen distintos usos. La especie más conocida es *Agave tequilana* Weber variedad azul, la cual, como su nombre lo indica es utilizada en la producción de tequila. Otras especies como *A. mapisaga*, *A. salmiana* y *A. americana* son utilizadas para la producción de mezcal, pulque, aguamiel y jarabe de agave. Por otra parte, este género también puede ser cultivado para la producción de fibras para cuerda, ropa, zapatos, tapetes y bolsas como es el caso de

las especies *A. sisalana* y *A. fourcroyodes* (Iñiguez et al., 2001; Yang et al., 2015).

Agave tequilana

La especie *Agave tequilana* es una planta que florece una sola vez a los diez años de haber sido cultivada y posteriormente muere. La flor es de tipo umbela, lo cual quiere decir que los tallos parten de un mismo punto y se elevan a la misma altura. La polinización de dicha flor depende exclusivamente del murciélago magueyero. Sin embargo, *Agave tequilana* Weber variedad azul se utiliza como materia prima para la producción de tequila, como se mencionó anteriormente, y su extracción se lleva a cabo antes de que ésta florezca, lo cual es aproximadamente después de 7-9 años de su cultivo (Iñiguez et al., 2001; Davis et al., 2011, Velázquez et al., 2016).

En un estudio que comparaba el rendimiento de distintas especies de *Agave* al crecer sin irrigación, se observó que *A. tequilana* y *A. malpisaga* son las que generan más toneladas por hectárea (Figura 4), lo cual implica una ventaja para el uso de *A. tequilana* para la producción de etanol pues de esta manera se generará una mayor cantidad de bagazo. Además, dicha especie es la de mayor producción en el país (SAGARPA, 2017), por lo que utilizar su bagazo como materia prima para la producción de etanol sería benéfico para el tratamiento de residuos de una industria grande como la tequilera, pues se estima que en 2016 la cantidad de bagazo producido por dicha industria fue de más de 300,000 toneladas (Equihua y Barahona, 2017).

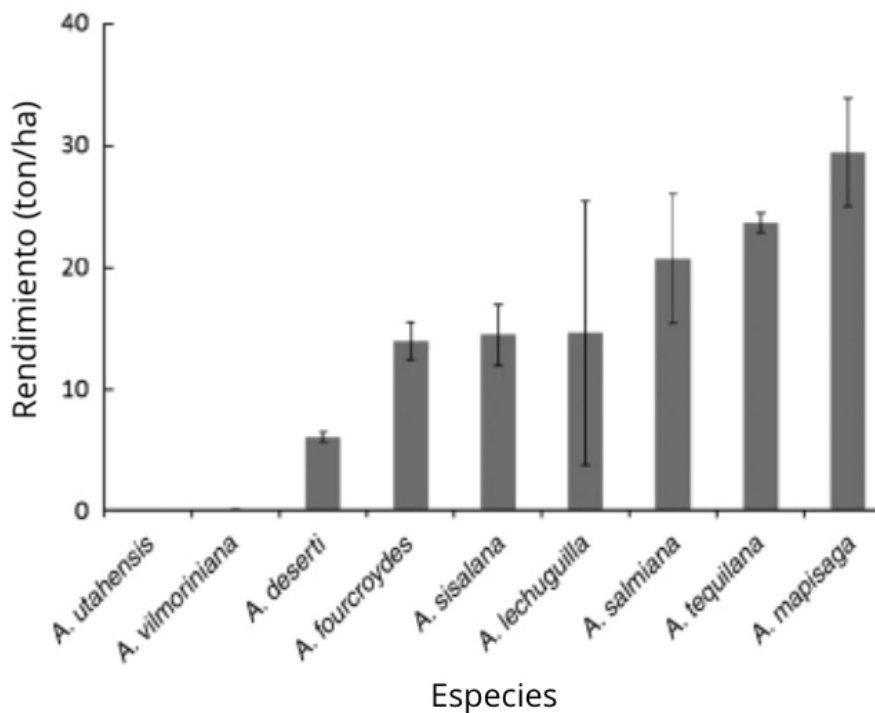


Figura 4. Rendimiento del crecimiento de distintas especies de Agave en un cultivo sin irrigación (Davis et al., 2011)

Bagazo de agave

El bagazo de agave es una biomasa lignocelulósica. Dicha biomasa se compone principalmente de celulosa, hemicelulosa y lignina, los cuales son componentes mayoritarios de la pared celular de las células vegetales y su composición química puede ser observada en la Figura 5. La celulosa es un homopolisacárido lineal formado por unidades de glucosa unidas por enlaces β 1-4. Este compuesto se puede encontrar de dos formas: cristalina y amorfa. La celulosa cristalina se compone de cadenas paralelas de celulosa con moléculas de glucosa firmemente unidas por puentes de hidrógeno entre dichas cadenas, mientras que la celulosa amorfa tiene un arreglo menos ordenado. Al aplicar enzimas hidrolíticas a la celulosa, éstas serán capaces de actuar más fácilmente

sobre la celulosa amorfa. Por otra parte, la hemicelulosa es un heteropolisacárido constituido por diversas hexosas, pentosas y ácidos carboxílicos. Sin embargo, el principal componente de la hemicelulosa es el xilano, el cual está formado por unidades de xilosa unidas por enlaces β 1-4 con diversas ramificaciones en el C3 y sustituciones a lo largo de la cadena. Por otro lado, la lignina es un heteropolímero complejo compuesto principalmente por unidades de fenilpropano unidas por enlaces éter. Además, los enlaces éter también permiten la formación de un complejo con la hemicelulosa con el fin de proteger a la celulosa de una hidrólisis química o enzimática. Por tal razón, para lograr obtener azúcares fermentables a partir del bagazo de agave es necesario realizar un pretratamiento. No obstante, existe una ventaja en cuanto al contenido de lignina para las plantas CAM como el agave. La lignina cumple la función de brindar fuerza al xilema, el cual es el tejido encargado de transportar agua desde las raíces hasta las hojas de las plantas; sin embargo, dicho transporte de agua se ve disminuido en este tipo de plantas al mantener sus estomas abiertos por las noches y cerrados durante el día. Debido a lo anterior, el contenido de lignina en el agave es menor en comparación con otras plantas (Tahezadeh y Karimi, 2008; Davis *et al.*, 2011; Albersheim *et al.*, 2011; Akhtar *et al.*, 2015).

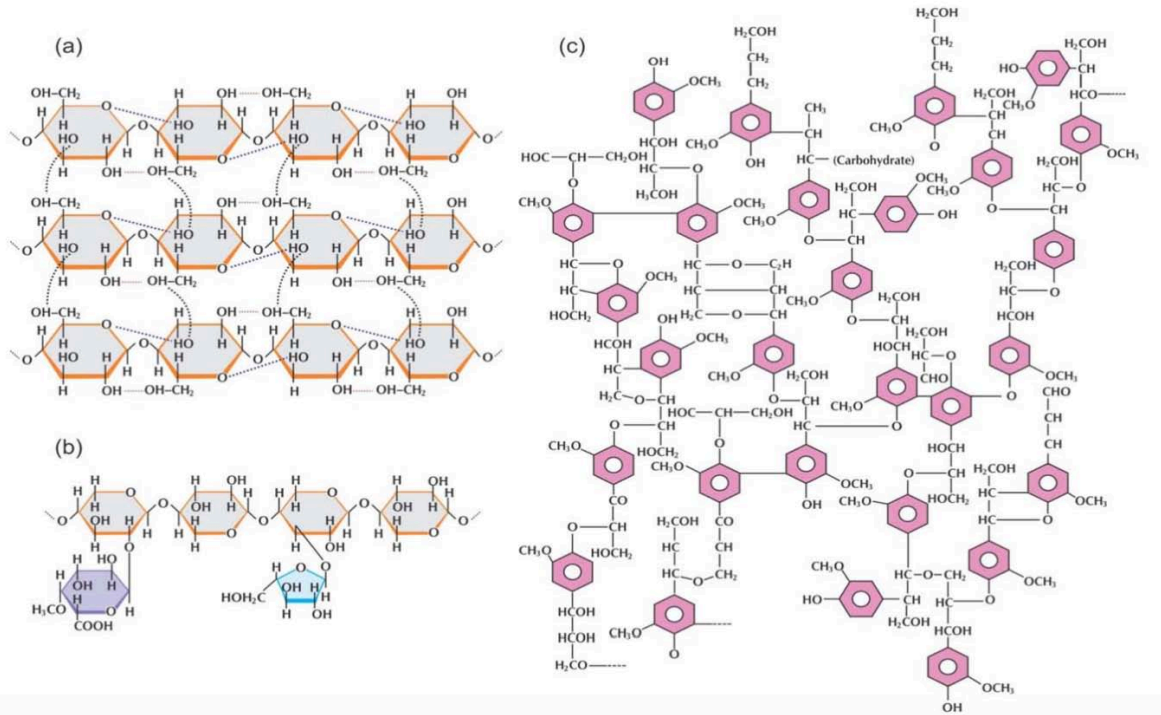


Figura 5. Composición química de celulosa (a), hemicelulosa (b) y lignina (c) (Akhtar et al., 2015)

En cuanto a la proporción bagazo-agave, se calcula que alrededor del 40% del peso húmedo del agave es bagazo. Si dicho bagazo no es desechado, otros usos que puede tener son: alimento para ganado, fibra para producir muebles y relleno de colchones (Iñiguez et al., 2001; Kestur et al., 2013).

En el caso del bagazo de agave utilizado en este estudio, la proporción de celulosa, hemicelulosa y lignina se muestra en la Tabla 2. Estos datos corresponden al contenido de dichos compuestos en el bagazo después de haber sido sometido a un pretratamiento que será descrito posteriormente.

Tabla 2. Composición del bagazo de agave utilizado en este estudio (Montiel et al., 2016)

Composición	Contenido (%)
Materia seca	55.1 ± 0.76
Cenizas ^a	8.6 ± 0.08
Celulosa ^a	47.2 ± 0.87
Hemicelulosa ^a	18.5 ± 0.36
Lignina ^a	16.4 ± 0.23

^a Porcentaje de materia seca

Pretratamientos

Un pretratamiento es el proceso que provoca cambios estructurales en el material lignocelulósico de manera que las enzimas sean capaces de hidrolizar la celulosa. La función de la lignina es mantener la integridad y la rigidez de la estructura de la lignocelulosa, por lo que la proporción en la que se encuentre este compuesto es uno de los principales factores que dificultan la conversión enzimática de celulosa a monómeros de glucosa debido a que limita la accesibilidad de la enzima a los enlaces que hidroliza. Por tal razón, un pretratamiento eficaz es el que disminuye el contenido de lignina en la biomasa. Otros factores que afectan la acción de las enzimas son el contenido de hemicelulosa, la proporción de celulosa cristalina y de celulosa amorfa, el grado de polimerización de la celulosa, el área superficial accesible, la porosidad y el tamaño de partícula (Taherzadeh y Karimi, 2008; Fitzpatrick et al., 2010; Behera et al., 2014; Ravindran y Jaiswal, 2016).

Los pretratamientos pueden ser clasificados en físicos, químicos, fisicoquímicos y biológicos. Algunos ejemplos de estos se encuentran en la Tabla 3 junto con sus ventajas y desventajas.

Tabla 3. Pretratamientos para biomasa lignocelulósica (Adaptado de Akhtar et al., 2015)

Clasificación	Pretratamiento	Ventaja(s)	Desventaja(s)
Físico	Molienda	Reducción de tamaño de partícula y de grado de cristalinidad	Alto consumo de energía
	Irradiación	Alteración de la estructura de la celulosa a fibras más frágiles	Alto costo de operación
	Agua a altas temperaturas	Evita el uso de agentes químicos y la producción de inhibidores	No compatible con madera de coníferas
	Campo de pulsos eléctricos	- Aumento en permeabilidad de masa - Bajo requerimiento energético	Inactivación de enzimas

	Pirólisis	Menor formación de productos volátiles	Alteración lenta de la estructura
Químico	Hidrólisis alcalina	Efectividad al hidrolizar los enlaces éter entre la lignina y la hemicelulosa sin afectar la estructura de la hemicelulosa	<ul style="list-style-type: none"> - Alto costo de agentes alcalinos - Alteración de la estructura de la lignina
	Hidrólisis ácida	<ul style="list-style-type: none"> - No requiere de altas temperaturas - Menor corrosión en equipos al usar ácidos diluidos 	<ul style="list-style-type: none"> - Alto costo de operación y de mantenimiento de equipos - Formación de inhibidores
	Agentes oxidantes	<ul style="list-style-type: none"> - Menor producción de inhibidores - Extracción eficiente de lignina - Bajo consumo de energía 	Alto costo de agentes oxidantes
	Proceso organosolv	<ul style="list-style-type: none"> - Recuperación de lignina pura - Efectivo con ambos tipos de 	<ul style="list-style-type: none"> - Alto costo - Formación de inhibidores

		madera (dura y suave)	
	Líquidos iónicos	<ul style="list-style-type: none"> - Aumento en rendimiento de extracción de celulosa - No hay producción de inhibidores 	<ul style="list-style-type: none"> - Desactivación de enzimas de sacarificación - Mayor tiempo de proceso - Riesgo de explosión
Fisicoquímico	Hidrólisis ácida o alcalina asistida por microondas	Aceleración de reacciones durante pretratamiento	<ul style="list-style-type: none"> - Alto costo de operación - No es viable a gran escala
	Ultrasonido	<ul style="list-style-type: none"> - Reducción del tamaño de partícula - Facilita el transporte de las moléculas de enzima hacia la superficie del sustrato por medio de la cavitación 	No es viable a gran escala
	Explosión de fibras con amoníaco	<ul style="list-style-type: none"> - Aumento de área superficial - Menor producción 	<ul style="list-style-type: none"> - Alto costo de amoníaco - Baja solubilización

		de inhibidores	de hemicelulosa
		- Eficaz para biomasa con bajo contenido de lignina	- Alteración de la estructura de la lignina
	Explosión con CO ₂	- No tóxico ni inflamable - Fácil recuperación de CO ₂ - Ecológico	- Requiere altas presiones - Alto costo de operación a gran escala - Eliminación parcial de lignina
	Explosión por vapor	- Eficaz en relación con su costo	- Ruptura incompleta de la matriz lignocelulósica - Formación de inhibidores
	Fluidos supercríticos	- Eficaz en relación con su costo - Aumento de área superficial	- Requiere altas presiones
Biológico	Hongos descomponedores de madera	Bajo requerimiento energético	Alteración lenta de la estructura

Adicionalmente a dicha clasificación de pretratamientos, estos pueden ser utilizados en combinación. Tal es el caso de la extrusión alcalina utilizada como pretratamiento del bagazo de agave empleado en este proyecto. La elección de dicho pretratamiento se debe al origen de la lignocelulosa, ya que estudios previos han demostrado que el pretratamiento más efectivo en residuos de la industria agrícola es el alcalino, el cual generalmente utiliza NaOH, Ca(OH)₂ o amonio (Taherzadeh y Karimi, 2008). El efecto de estas bases sobre la lignocelulosa es que provocan con mayor facilidad la ruptura de los enlaces éter entre la lignina y los polisacáridos. Por otra parte, durante la extrusión la biomasa se humedece de manera uniforme y se pasa a través de un tornillo, aplicando presión y altas temperaturas. Esto permite obtener un material con mayor porosidad, mayor área superficial y con celulosa de menor grado de polimerización y menor cristalinidad. Dichos cambios permiten obtener mayores rendimientos de azúcares fermentables al llevar a cabo la hidrólisis de la celulosa presente en residuos como el bagazo de agave con una menor concentración de enzima, lo cual economiza el proceso (Behera et al., 2014; Akhtar et al., 2015; Ravindran y Jaiswal, 2016).

Enzimas hidrolíticas

La enzima que se utilice para la sacarificación también es un factor importante para el rendimiento de azúcares fermentables que se puedan obtener a partir del bagazo pretratado. Para hidrolizar la celulosa y obtener glucosa es necesario utilizar un complejo enzimático llamado celulasa (Figura 6), el cual está compuesto por endoglucanasa (EC 3.2.1.4), celobiohidrolasa (EC 3.2.1.91) y β -glucosidasa (EC 3.2.1.21). La endoglucanasa es la primera enzima en actuar, pues ésta hidroliza

enlaces β 1-4 entre unidades de glucosa localizadas al centro de la cadena, es decir, lejos de las zonas terminales. El producto de esta primera hidrólisis son cadenas más cortas de celulosa, las cuales pueden ser hidrolizadas por la celobiohidrolasa para liberar celobiosa, ya que esta enzima hidroliza enlaces cercanos a los extremos de la cadena de celulosa. Finalmente, la β -glucosidasa hidroliza la celobiosa para obtener dos moléculas de glucosa (Yennamalli et al., 2013; Worthington Biochemical Corporation, 2018).

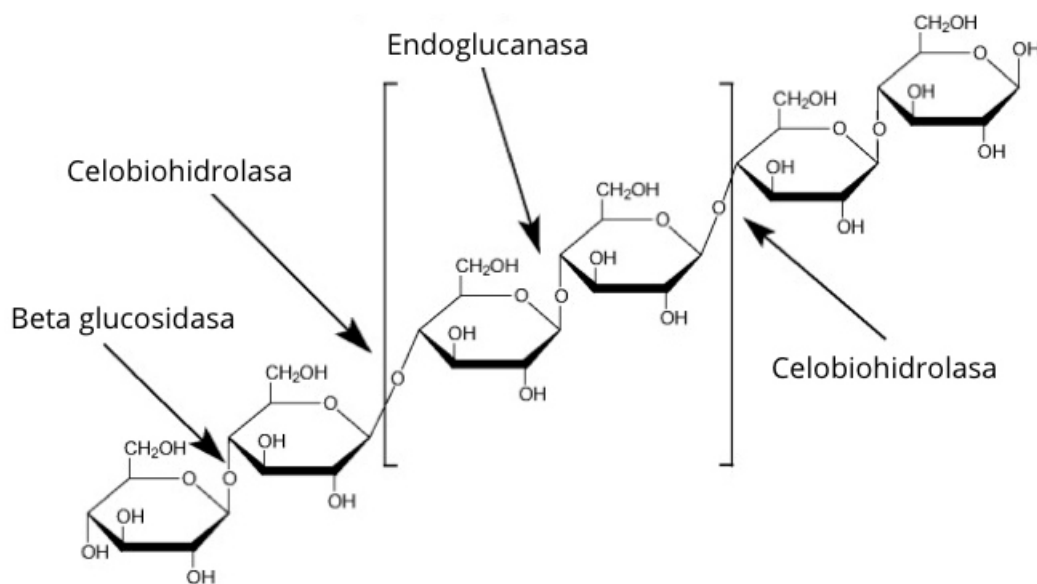


Figura 6. Sitios de la cadena de celulosa en donde tiene acción cada enzima del complejo celulasa

Cellic CTec2[®] (Novozymes) es una mezcla de celulasas con condiciones óptimas de hidrólisis a 45-50 °C en pH 5.0-5.5. Se reporta que esta enzima permanece activa en la presencia de inhibidores como oligosacáridos y monosacáridos (Xue et al., 2015), resulta en altos rendimientos de hidrólisis, es efectiva a altas concentraciones de sólidos, es estable y es compatible con distintas materias primas y pretratamientos (Novozymes, 2010). En un estudio, Cellic CTec2[®] fue

comparada con Celluclast[®] y se comprobó que con la primera se obtienen mayores rendimientos de hidrólisis (Rodrigues et al., 2015). Este mismo estudio evalúa la posibilidad de reciclar dicha enzima por medio de desorción alcalina y comprueba que esto es posible si la hidrólisis se realiza a temperaturas menores a 50 °C.

Levaduras

Existe una amplia variedad de levaduras y hongos capaces de fermentar la glucosa para producir etanol como se muestra en la Tabla 4. La levadura más utilizada para este fin es *Saccharomyces cerevisiae*; sin embargo, otras levaduras como *Kluyveromyces marxianus* también son capaces de llevar a cabo la fermentación de monosacáridos como la glucosa. Esta levadura es termotolerante, secreta enzimas líticas extracelulares, asimila una amplia variedad de carbohidratos y ha sido aislada de distintos hábitats como uvas, hojas de sisal en descomposición, drenaje de fábricas de azúcar y yogur. Algunos de los carbohidratos que son asimilados por esta levadura son lactosa, sacarosa, galactosa, fructosa, glucosa, inulina y xilosa. En este caso, la cepa ISO3 fue aislada del bagazo de agave, por lo que se piensa que dicha cepa será capaz de producir etanol a partir del hidrolizado de dicho bagazo. Además, debido a su capacidad de duplicarse a temperaturas mayores a 40 °C, *K. marxianus* puede ser utilizada para llevar a cabo una sacarificación fermentación simultánea (SFS) (Lertwattanasakul et al., 2007; Fonseca et al., 2008; Faga et al., 2010; Lane y Morrissey, 2010; Pentjuss et al., 2017).

Tabla 4. Uso de distintos microorganismos y diferentes sustratos para la producción de etanol (Narra et al., 2015)

Cepa	Sustrato	Enzima	Temperatura (°C)	Rendimiento EtOH (%)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> NRRI-Y-132	Hojas de <i>Antigonon leptopus</i>	Celluclast, Novozyme 188	38.5	69.21
<i>Rhizopus oryzae</i>	Paja de arroz	Celulasa comercial de BTXL, ASA	38	73.58
<i>Mucor indicus</i>	Paja de arroz	Spezialenzyme GmbH (Alemania)	38	67.62
<i>S. cerevisiae</i>	Celulosa		38	75.91
<i>E. coli</i> recombinante FBR5	Paja de trigo	Celluclast, Novozyme 188	37	45.00
<i>S. cerevisiae</i>	Paja de trigo	Celulasa de <i>Trichoderma viridae</i>	40	81.20
<i>K. marxianus</i> IMB3	Pasto varilla	Accellerase 1500	45	86.00
<i>Mucor indicus</i>	Tallo de sorgo dulce	Celluclast, Novozyme 188	37	85.60
<i>S. cerevisiae</i>	Harina de yuca	α -amilasa y β -glucanasa	30	86.10 (laboratorio)
<i>Kluyveromyces</i> sp.	Paja de arroz	Celulasa de <i>Trichoderma reesei</i> 26291 (Sigma) + β -glucosidasa de <i>Aspergillus niger</i> (Sigma)		84.56
	Paja de trigo		42	79.64
	Bagazo de caña			78.45

	Paja de arroz			71.76
Kluyveromyces sp.	Paja de trigo	Celulasa de <i>Aspergillus terreus</i> + β -glucosidasa de <i>Aspergillus niger</i>	42	63.37
	Bagazo de caña	(Sigma)		57.15

Algunos ejemplos de procesos en los que se utilizó *K. marxianus* para la producción de etanol se encuentran en la Tabla 5. Como se mencionó anteriormente, esta levadura ha sido aislada de distintos hábitats, por lo que los sustratos utilizados en los estudios mencionados son diversos. En cuanto a la temperatura del proceso, se ha detectado que esta levadura es capaz de crecer desde 28 hasta 52 °C; sin embargo, la máxima temperatura a la que es capaz de producir etanol es a 45 °C. En general, esta levadura se desarrolla en un intervalo de pH entre 4.5 y 5.5. La única excepción para este intervalo se da cuando esta levadura crece en el suero de leche, ya que su pH se encuentra entre 6.3 y 6.5 (Zadow, 2012). El rendimiento de la producción de etanol por medio de esta levadura es relativamente menor a los obtenidos con otros microorganismos, pero como se mencionó antes, la temperatura a la que *K. marxianus* puede producir etanol implica una ventaja.

Tabla 5. Uso de distintas cepas de *K. marxianus* y diferentes sustratos para la producción de etanol

Cepa	Sustrato	Temperatura (°C)	pH	Rendimiento EtOH (%)	Fuente
<i>K. marxianus</i> WR12	Melaza de caña de azúcar	43	4.5	46.9	Abdel et al. (2000)
<i>K. marxianus</i> recombinante CECT I0875	Papel reciclado	42	4.8	80.3	Ballesteros et al. (2002)
<i>K. marxianus</i> IMB4	Pasto varilla	45	5.5	78.0	Suryawati et al. (2008)
<i>K. marxianus</i> K213	Jacinto	42	4.8	16.0	Yan et al. (2015)
<i>K. marxianus</i> Y01070	Papel reciclado	40	5.3	33.7	Kádár et al. (2004)
<i>K. marxianus</i> IMB3	Pasto varilla	45	5.5	80.7	Faga et al. (2010)
<i>K. marxianus</i> CCT 4086	Suero de leche	30	6.2	52.0	Gabardo et al. (2015)
<i>K. marxianus</i> recombinante S1.17	Hojas de caña de azúcar	40	5.0	8.0	Jutakanoke et al. (2017)

La vía que sigue *K. marxianus* para la producción de etanol a partir de glucosa es la de la fermentación alcohólica (Figura 7). Para que la glucosa sea metabolizada por esta levadura, primero es necesario que esta molécula sea transportada al interior de *K. marxianus* por medio de

un transportador de hexosas localizado en su membrana. En el interior de la célula, la glucosa será fosforilada e isomerizada para obtener fructosa-6-fostato. Este compuesto será fosforilado nuevamente para después ser hidrolizado y obtener gliceraldehído-3-fosfato y fosfato de hidroxiacetona. Este segundo compuesto se isomeriza para obtener otra molécula de gliceraldehído-3-fosfato. El gliceraldehído es oxidado y fosforilado para producir 1,3-difosfoglicerato. Después, este compuesto pierde un grupo fosfato y se isomeriza para obtener 2-fosfoglicerato. Esta molécula se deshidrata para producir fosfoenolpiruvato y éste pierde un fosfato para obtener piruvato. El piruvato es descarboxilado y se produce acetaldehído para que finalmente éste sea reducido a etanol.

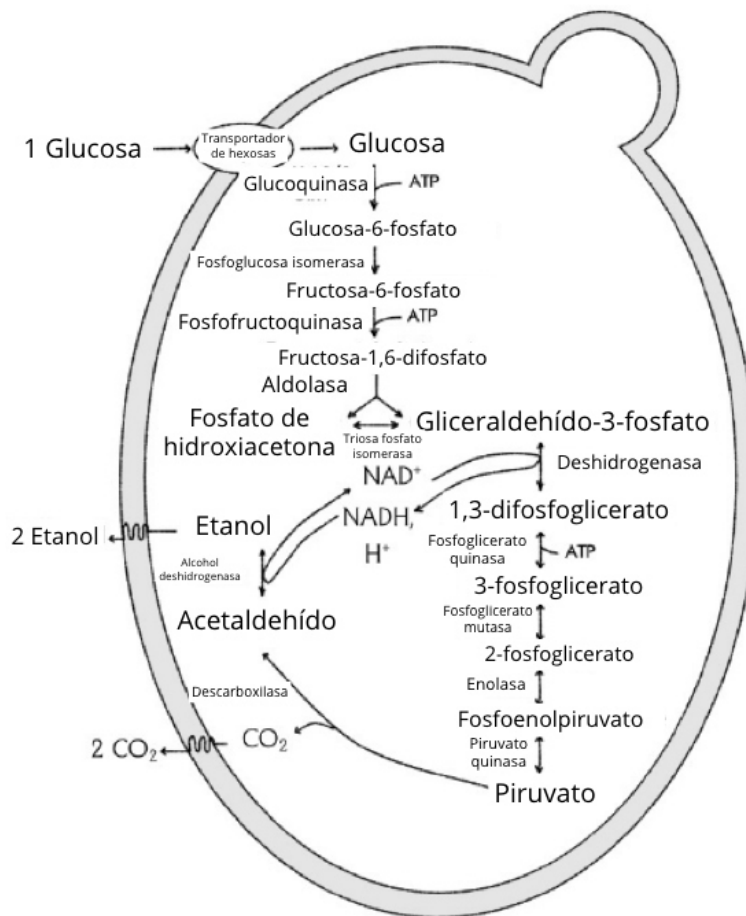


Figura 7. Fermentación alcohólica (Faria et al., 2013)

Procesos de producción de etanol

Como se ha descrito previamente, la producción de etanol a partir de materiales lignocelulósicos implica cuatro pasos principalmente: pretratamiento, hidrólisis o sacarificación, fermentación y destilación. La sacarificación y la fermentación pueden ser tratadas de distintas maneras, es decir, puede existir cierta interacción entre estas dos partes del proceso. Lo más común es que en la producción de etanol la hidrólisis y la fermentación se realicen en tanques y tiempos distintos, lo cual se conoce como hidrólisis y fermentación separadas (SHF, por sus siglas en inglés). Esto permite que las enzimas y las levaduras sean capaces de actuar en su temperatura óptima. Sin embargo, este proceso implica desventajas como la posibilidad de que el producto de la hidrólisis se contamine con otros microorganismos no fermentadores como bacterias debido al contenido de glucosa generado previo a la fermentación. Otra desventaja es el tiempo que implica llevar a cabo estos procesos por separado, pues una hidrólisis completa dura 48 horas mientras que la fermentación varía de 72 a 168 horas. Por estas razones, se han buscado alternativas para optimizar dicho proceso (Rana *et al.*, 2014; Azhar *et al.*, 2017).

Una manera de optimizar el proceso es la sacarificación fermentación simultánea (SFS), la cual es un nuevo método que se está implementando debido a las ventajas que ofrece y debido a la investigación previa en búsqueda de levaduras termotolerantes. La SFS consiste en realizar en un mismo reactor la hidrólisis y la fermentación de la materia prima. Las ventajas de este proceso son que disminuye los costos de enfriamiento, la obtención de etanol se logra en menor tiempo, disminuye la probabilidad de contaminación, facilita la posterior extracción del etanol y elimina del medio de reacción los inhibidores de la enzima pues el producto de hidrólisis inmediatamente es

metabolizado por la levadura. Una modificación que se puede aplicar en este mismo proceso es involucrar microorganismos que puedan fermentar tanto la glucosa como la xilosa obtenidas de la hidrólisis del material lignocelulósico (Figura 8). Este otro proceso se conoce como sacarificación y cofermentación simultánea (SSCF). La SSCF se ha llevado a cabo con cepas recombinantes de *Saccharomyces cerevisiae* y de *Zimomonas mobilis*; no obstante, para que esto sea posible la concentración de glucosa debe permanecer baja pues los transportadores de membrana para estos carbohidratos tienen una menor afinidad por la xilosa (Olofsson et al., 2008; Nonklang et al., 2008; Abdel et al., 2010; Pessani et al., 2011; Techaparina et al., 2017).

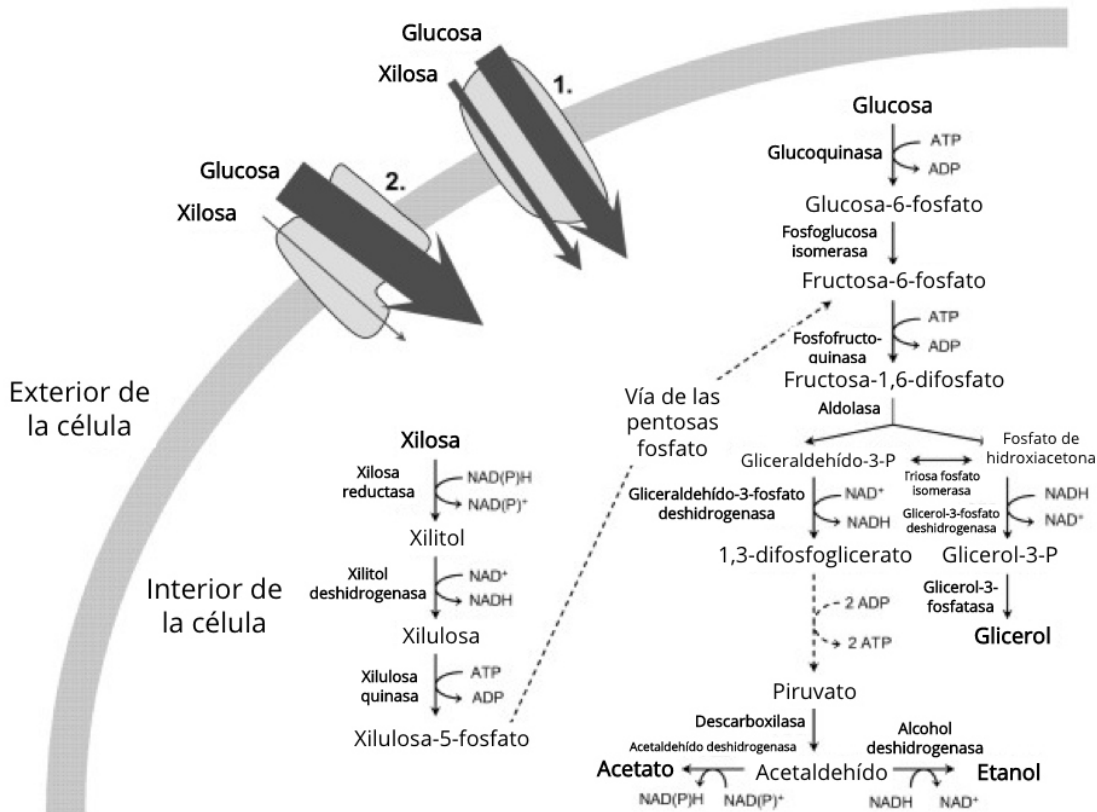


Figura 8. Transporte y metabolismo de carbohidratos en levaduras cofermentadoras (Olofsson et al., 2008)

Otra alternativa para optimizar el proceso de producción de etanol es el bioproceso consolidado (CBP). Éste se refiere a que un solo microorganismo o conjunto de microorganismos sean capaces de producir las enzimas para hidrolizar la celulosa y la hemicelulosa presente y de fermentar la glucosa y la xilosa para producir etanol. Esto disminuiría el costo de producir y purificar las celulasas y hemicelulasas, además de las ventajas de una SSF. La principal dificultad para este bioproceso es la búsqueda del microorganismo que posea todas las cualidades mencionadas. Por ejemplo, la bacteria anaerobia *Clostridium thermocellum* es capaz de llevar a cabo este proceso pero sus productos de fermentación son diversos (etanol, acetato, hidrógeno y CO₂), lo cual limita el rendimiento de la producción de etanol. Otro ejemplo son los hongos *Trichoderma reesei* y *Fusarium oxysporum*, aunque estos presentan una degradación de celulosa lenta y el rendimiento de su producción de etanol es bajo. Por esta razón, la investigación se enfoca en el diseño de microorganismos recombinantes con capacidad celulolítica y que puedan fermentar hexosas y pentosas como las bacterias *Zymomonas mobilis* y *Escherichia coli* y las levaduras *Saccharomyces cerevisiae* y *Pichia stipitis*. Un resumen de los procesos descritos previamente se encuentra en la Figura 9 (Scheper et al., 2007).

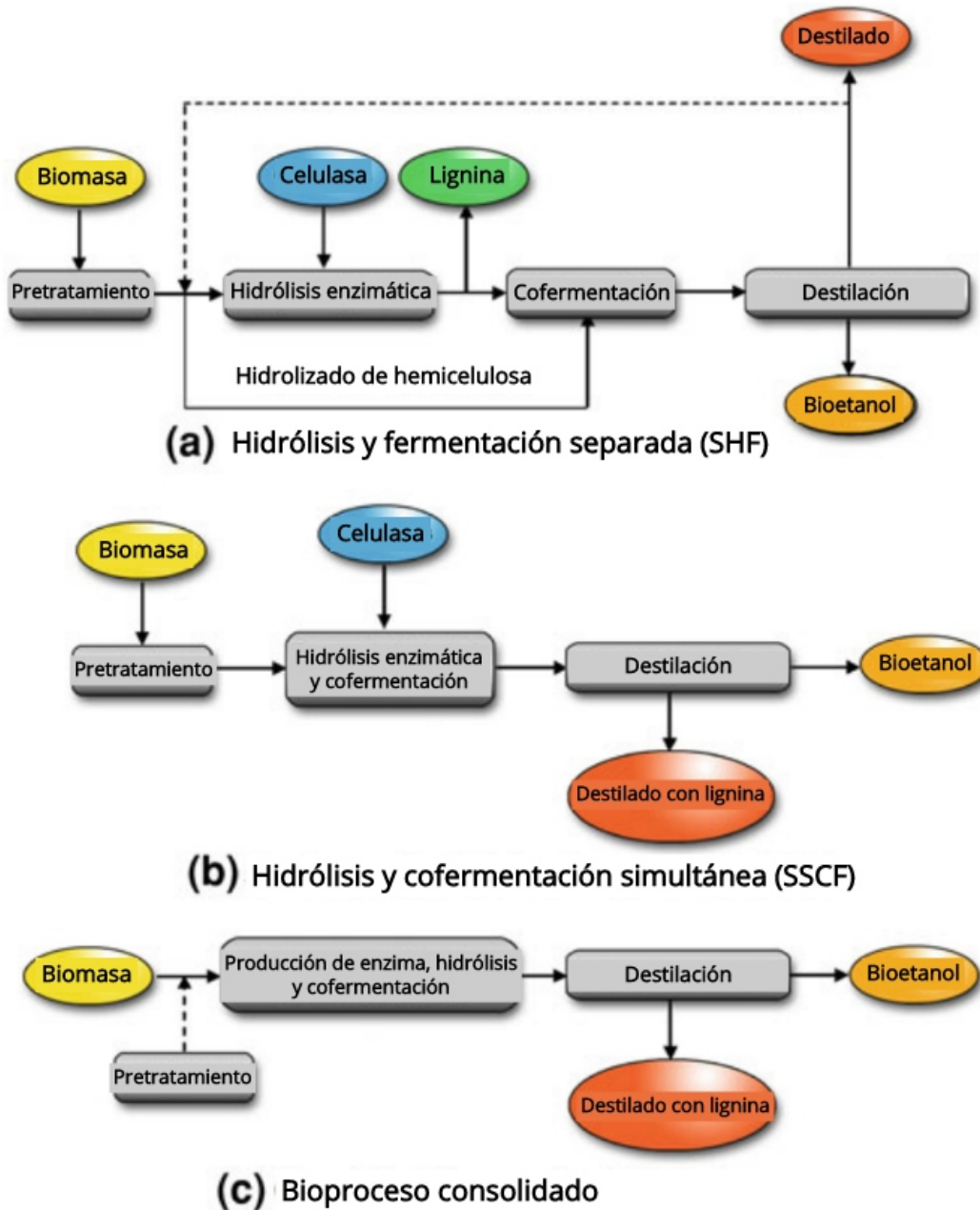


Figura 9. Procesos de producción de etanol (Bai et al., 2012)

Etanol como biocombustible

Existe una crisis energética debido a que la población mundial crece exponencialmente y los recursos energéticos son limitados. Tal es el caso de los combustibles fósiles pues estos no son renovables, además

de que su quema implica otros problemas como la producción de contaminantes que contribuyen al cambio climático como CO₂, CO y óxidos de nitrógeno. Con el fin de proponer soluciones a dicha crisis, la búsqueda de fuentes de energía renovables es un tema de investigación importante alrededor del mundo. Una de estas fuentes son los biocombustibles, los cuales se refieren a los combustibles líquidos utilizados en el sector de transporte como el etanol. Éste es obtenido de fuentes renovables como cultivos, residuos de la industria agrícola, desechos forestales, entre otros. Además, este biocombustible libera una menor cantidad de contaminantes al ambiente al ser quemado (Balat y Balat, 2009).

Los países con mayor producción de etanol como biocombustible son Estados Unidos y Brasil; sin embargo, la combustión del etanol proporciona una menor cantidad de energía que la combustión de la gasolina, por lo que generalmente se utilizan mezclas de etanol:gasolina, las cuales pueden tener desde un 15 hasta un 85% de etanol en Estados Unidos. Dichas mezclas, además de reducir las emisiones de contaminantes también aumentan el octanaje de la gasolina, lo cual significa que aumenta su capacidad antidetonante (Balat y Balat, 2009).

En México el etanol solamente se utiliza como oxigenante de gasolina y su contenido máximo es de 5.8% para alcohol anhidro. Los oxigenantes se utilizan debido a que si no hay una cantidad suficiente de oxígeno en el momento de la combustión de la gasolina, se genera monóxido de carbono, el cual es un gas tóxico para animales y humanos. El oxigenante más común es el metil ter-butyl éter (MTBE) pero se requiere una mayor cantidad de éste en la gasolina (11%) para igualar los equivalentes de oxígeno que proporciona una menor cantidad de etanol en la gasolina (5.8%) (NOM-016-CRE-2016).

Hipótesis

Si *Kluyveromyces marxianus* ISO3 es capaz de crecer a temperaturas entre 40-50 °C, será posible realizar una sacarificación fermentación simultánea a partir del bagazo de agave pretratado.

Objetivos

Objetivo general

Producir etanol de segunda generación a partir de azúcares provenientes del bagazo de agave utilizando la cepa de *Kluyveromyces marxianus* ISO3.

Objetivos particulares

- Determinar las condiciones de hidrólisis (carga enzimática y concentración de bagazo) que resulten en un mayor rendimiento de azúcares fermentables
- Determinar la temperatura más cercana a la de hidrólisis en la que *Kluyveromyces marxianus* ISO3 sea capaz de producir etanol
- Determinar el tiempo de inoculación con mayor rendimiento de etanol al llevar a cabo la sacarificación fermentación simultánea del bagazo de agave

Metodología

- Pretratamiento del bagazo de agave

El bagazo fue sometido a un pretratamiento alcalino con una solución al 3.75% de NaOH en un extrusor a 150 °C.

- Hidrólisis del bagazo pretratado

La hidrólisis del bagazo a distintas cargas enzimáticas se llevó a cabo en matraces Erlenmeyer de 50 mL ($V_{\text{medio}}=30$ mL) con tapa de rosca. Se colocaron 1.5 g de bagazo para las pruebas de hidrólisis a 5% y 6 g de bagazo para las pruebas a 20%. Los matraces se esterilizaron y 30 mL de amortiguador de acetatos pH 5.02 fueron añadidos junto con la cantidad de Cellic CTec2[®] (Novozymes) para obtener las siguientes cargas: 5, 10, 15, 20 y 30 FPU/g (unidades de papel filtro: μmol de azúcar reductor formado por minuto durante la hidrólisis). Los matraces fueron incubados por 48 h a 50 °C y 200 rpm. Esta prueba se realizó por duplicado con un control de enzima y un control de bagazo sin enzima. Las muestras obtenidas fueron congeladas para su análisis.

- Determinación de concentración de glucosa y xilosa por HPLC

Las muestras se descongelaron y se llevó a cabo una dilución 1:5. Posteriormente, éstas se filtraron y se colocaron en frascos viales. La cromatografía se realizó en una columna UNISON UK-Amino de 250 x 2 mm (Imtakt, USA) con una fase móvil de acetonitrilo:agua (80:20), flujo de 0.2 mL/min, temperatura de 37 °C, presión de 80 bar y un detector de dispersión de luz (PL-ELS 1000) bajo las siguientes condiciones: nebulizador 60 °C, evaporador 80 °C y flujo de nitrógeno 1 mL/min. Cada prueba duró 15 minutos y se utilizaron las áreas correspondientes a glucosa y xilosa para determinar la concentración de cada compuesto por medio de curvas patrón realizadas previamente. El rendimiento de carbohidratos en la hidrólisis fue calculado con la siguiente ecuación:

$$\text{Rendimiento} = \frac{[\text{Azúcar}] - [\text{Azúcar inicial}]}{f[\text{Bagazo}]} \times 100$$

En donde [Azúcar] corresponde a la concentración máxima de azúcares alcanzada a las 48 horas de hidrólisis, [Azúcar inicial] corresponde a la concentración de azúcar presente en la muestra antes de su hidrólisis, *f* corresponde a la fracción de celulosa (0.47) y de hemicelulosa (0.18), [Bagazo] corresponde a la concentración inicial de sólidos.

- Curvas de crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* y *Kluyveromyces marxianus*

Se utilizaron la cepa de *Saccharomyces cerevisiae* Thermosacc[®] (Lallemand Biofuels & Distilled Spirits), la cual es una levadura comercial para la obtención de etanol y la cepa de *Kluyveromyces marxianus* ISO3, la cual fue aislada del bagazo de agave y pertenece a la colección del Laboratorio 314 del Conjunto E de la Facultad de Química (UNAM). Las curvas de crecimiento para cada microorganismo se llevaron a cabo en matraces Erlenmeyer de 500 mL con 100 mL de medio de cultivo: 10% glucosa, 0.2% extracto de levadura, 0.1% sulfato de amonio, 0.1% fosfato monobásico de potasio, 0.05% sulfato de magnesio. Dichos matraces fueron incubados a 30 (*S. cerevisiae* y *K. marxianus*), 40, 45 y 50 °C (*K. marxianus*) a 150 rpm. Las curvas se realizaron por duplicado y se tomaron muestras a 0, 2, 4, 6, 24, 26, 28, 30, 48, 50 y 52 horas. Se determinó la densidad óptica de las muestras en un espectrofotómetro a 600 nm llevando a cabo una dilución 1:10.

- Determinación de concentración de etanol por HPLC

La concentración de etanol fue determinada en las muestras obtenidas para la curva de crecimiento. Éstas se filtraron y se colocaron en frascos viales. La cromatografía se realizó en una columna Carbomix H-NP5:8% de 7.8 x 100 mm (Sepax, USA) con una fase móvil de agua, flujo de 0.6 mL/min, temperatura de 60 °C, presión de 30 bar y para la detección se utilizó índice de refracción. Cada prueba duró 10 minutos y se utilizaron las áreas correspondientes a etanol para determinar su concentración por medio de curvas patrón realizadas previamente. El rendimiento de etanol en la fermentación fue calculado con la siguiente ecuación:

$$Rendimiento = \frac{[EtOH] - [EtOH\ inicial]}{0.5(0.47[Bagazo])} \times 100$$

En donde [EtOH] corresponde a la máxima concentración de etanol producida durante la fermentación, [EtOH inicial] corresponde a la concentración de etanol que aporta el preinóculo de *K. marxianus*, 0.5 corresponde al factor de conversión de glucosa a etanol, 0.47 corresponde a la fracción de celulosa en el bagazo de agave, [Bagazo] corresponde a la concentración inicial de sólidos.

- Preparación de preinóculo de *K. marxianus*

Se prepararon preinóculos de 5 mL de medio de cultivo: 5% glucosa, 0.2% extracto de levadura, 0.1% sulfato de amonio, 0.1% fosfato monobásico de potasio, 0.05% sulfato de magnesio en tubos de ensayo 13x100 mm con tapa.

- Fermentación del hidrolizado de bagazo de agave (SHF)

A los matraces de la hidrólisis con bagazo al 20% se les añadieron 0.2% extracto de levadura, 0.1% sulfato de amonio, 0.1% fosfato monobásico de potasio, 0.05% sulfato de magnesio y fueron sometidos a una pasteurización (80 °C, 20 segundos). Después se les añadieron 2 mL del

preinóculo de *K. marxianus*. Los matraces se incubaron por 72 h a 30 °C y 150 rpm. Se tomaron muestras a 0, 24, 48 y 72 horas y éstas fueron congeladas para su posterior análisis.

- Sacarificación fermentación simultánea del bagazo de agave Parte 1 (SFS)

Se prepararon seis matraces Erlenmeyer ($V_{\text{nominal}} = 50 \text{ mL}$, $V_{\text{medio}} = 30 \text{ mL}$) con tapa para llevar a cabo la hidrólisis del bagazo a 15 FPU/g con concentración de bagazo al 20% y se realizó un muestreo del tiempo cero. Posteriormente, se siguió el procedimiento para llevar a cabo la fermentación (45 °C, 150 rpm) de dicho bagazo; sin embargo, la inoculación de cada matraz se realizó a distintos tiempos de hidrólisis: 6, 12 y 24 horas (un duplicado para cada tiempo). Después de la inoculación se tomaron muestras a 0, 24 y 48 horas, las cuales fueron congeladas para su posterior análisis.

- Sacarificación fermentación simultánea del bagazo de agave Parte 2 (SFS)

Se preparó un reactor ($V_{\text{nominal}} = 250 \text{ mL}$, $V_{\text{medio}} = 200 \text{ mL}$) para llevar a cabo la hidrólisis del bagazo a 15 FPU/g con concentración de bagazo al 20% y se realizó un muestreo del tiempo cero. Posteriormente, se siguió el procedimiento para llevar a cabo la fermentación (45 °C, 150 rpm) de dicho bagazo con inoculación a 24 horas. Después de la inoculación se tomaron muestras a distintos tiempos y éstas fueron congeladas para su posterior análisis.

Resultados y Discusión

Hidrólisis

Para analizar las condiciones de hidrólisis que resultan en un mayor rendimiento de azúcares fermentables primero se llevó a cabo la hidrólisis de bagazo de agave en una concentración de 5% a 50 °C, 180 rpm y pH 5.02.

La Figura 10 muestra el rendimiento de la hidrólisis con concentración de bagazo al 5% a las 48 h para las distintas cargas enzimáticas. El mayor rendimiento se alcanzó con 15 FPU/g. A 20 y 30 FPU/g no se observa un aumento significativo en el rendimiento debido a que hay un exceso de enzima para degradar la cantidad de celulosa y hemicelulosa presente (Pessani *et al.*, 2011). Por esta razón, 15 FPU/g de enzima fueron utilizados en las siguientes pruebas. De esta manera se busca disminuir el costo de esta etapa del proceso para la producción de etanol. Por otra parte, en comparación con otras pruebas realizadas bajo las mismas condiciones con la enzima Cellic CTec2[®], el rendimiento de azúcares fermentables fue más bajo de lo esperado. Lo anterior pudo haber sido provocado por un error al añadir la enzima a los matraces.

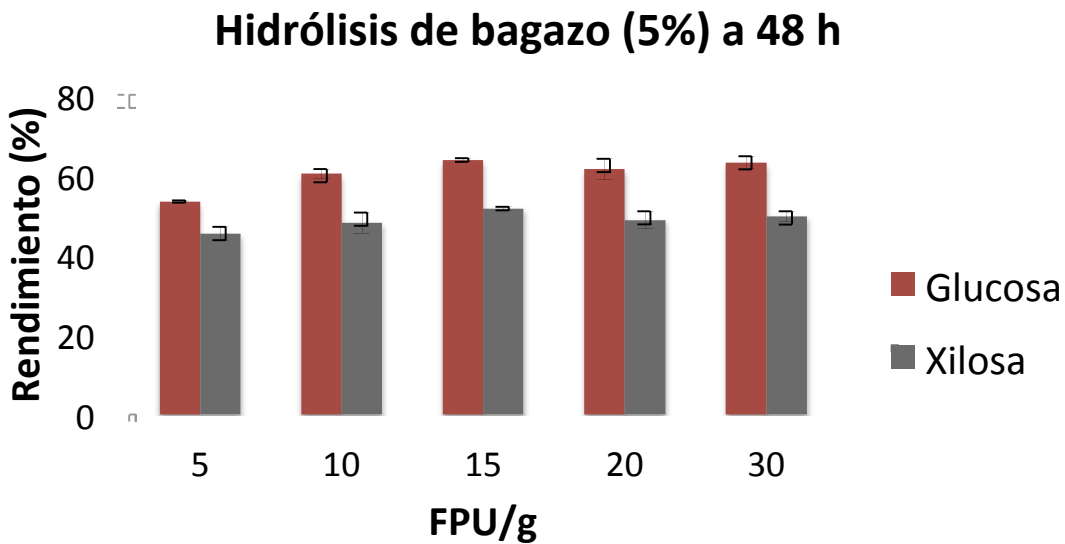


Figura 10. Rendimiento de hidrólisis de bagazo al 5% a 50 °C y pH 5.02 para la obtención de glucosa y xilosa a distintas concentraciones de enzima Cellic CTec2[®], n=2

A continuación, se llevó a cabo la hidrólisis del bagazo de agave en una concentración de 20% a 50 °C, 180 rpm y pH 5.02 con carga enzimática máxima de 15 FPU/g para comprobar la viabilidad de optimizar el proceso de producción de etanol al utilizar una mayor concentración de sólidos.

En la Figura 11 se presenta el rendimiento de la hidrólisis con concentración de bagazo al 20% a las 48 h para tres cargas enzimáticas. En todos los casos, el rendimiento fue mayor que para la hidrólisis de bagazo al 5%, lo cual se debe a que Cellic CTec2[®] es una mezcla de celulasas diseñada para ser eficaz a altas concentraciones de sólidos. Esto, a su vez, marca una diferencia con otros estudios sobre producción de etanol ya que generalmente se utilizan cargas de sólidos menores a 20% (Ahmed et al., 2013). A 15 FPU/g se hidrolizó cerca del 100% de celulosa presente; sin embargo, a 10 FPU/g se obtienen rendimientos mayores a 90%, por lo que, si no es posible realizar una

gran inversión en la enzima para la hidrólisis, dicha carga enzimática también puede ser utilizada.

□

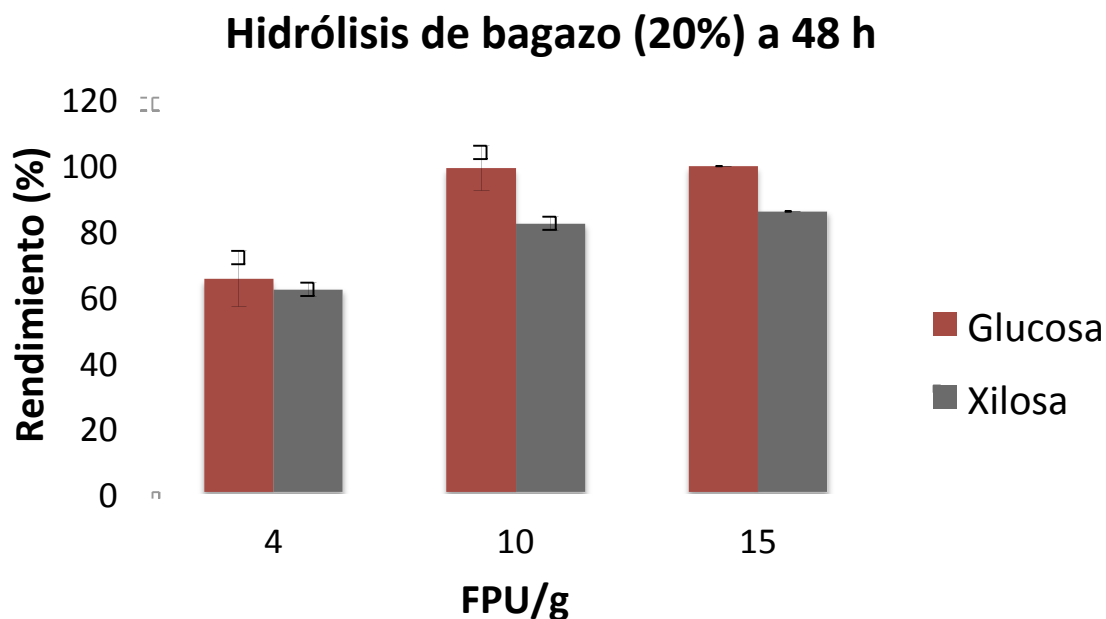


Figura 11. Rendimiento de hidrólisis de bagazo al 20% a 50 °C y pH 5.02 para la obtención de glucosa y xilosa a distintas concentraciones de enzima Cellic CTec2[®], n=2

Curvas de crecimiento

Las siguientes pruebas se llevaron a cabo con el fin de conocer la temperatura más cercana a la de hidrólisis (50 °C) en la cual *K. marxianus* ISO3 fuera capaz de producir etanol. Para esto se realizaron curvas de crecimiento a distintas temperaturas con *K. marxianus*. Además, se llevó a cabo una curva de crecimiento a 30 °C con *S. cerevisiae* Thermosacc[®] (Lallemand Biofuels & Distilled Spirits) con la finalidad de comparar el rendimiento de la producción de etanol entre estas dos levaduras, ya que dicha cepa de *S. cerevisiae* es capaz de llevar a cabo fermentaciones a altas concentraciones de azúcar y de etanol, tolera altas concentraciones de ácidos orgánicos y produce pocos

subproductos durante la fermentación (Lallemand Biofuels & Distilled Spirits, 2013). Dichas curvas de crecimiento se llevaron a cabo en matraces Erlenmeyer de 500 mL con 100 mL de medio de cultivo con 10% glucosa.

Las Figuras 12 y 13 exponen el crecimiento de las distintas levaduras. Éstas muestran que a las mismas condiciones de incubación (30 °C, 150 rpm) *Saccharomyces cerevisiae* tiene una mayor velocidad específica de crecimiento que *Kluyveromyces marxianus* (Tabla 6), por lo que la primera levadura se desarrolla de mejor manera a esta temperatura que *K. marxianus*. En la curva de *K. marxianus* resalta la densidad óptica a 28 horas, pues la fase exponencial se ve interrumpida. Este dato tiene un error debido a que las células no fueron resuspendidas para llevar a cabo la determinación en el espectrofotómetro.

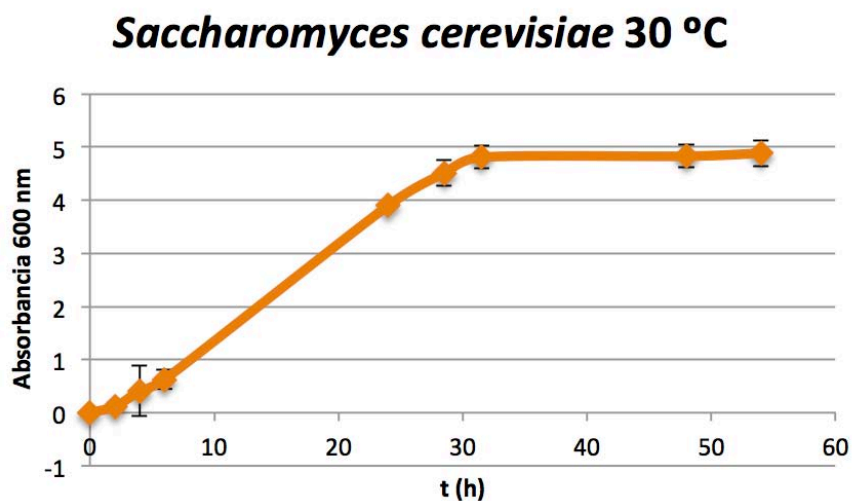


Figura 12. Curva de crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* Thermosacc® a 30 °C, n=2

***Kluyveromyces marxianus* 30 °C**

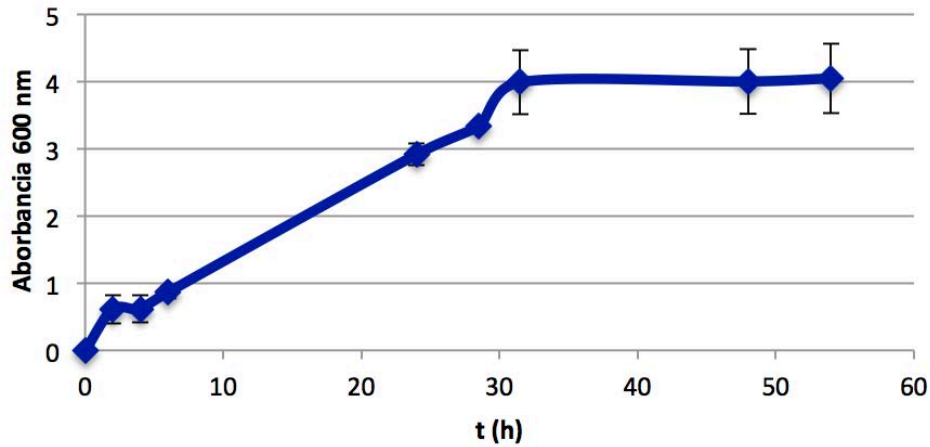


Figura 13. Curva de crecimiento de *Kluyveromyces marxianus* ISO3 a 30 °C, n=2

En las Figuras 14 y 15 se compara la producción de etanol por medio de dos distintas levaduras: por un lado, *S. cerevisiae* Thermosacc[®], la cual es una levadura comercial para la obtención de etanol; por otro lado, *K. marxianus* ISO3, la cual fue aislada del bagazo de agave. No se muestran algunos datos para *S. cerevisiae* y para *K. marxianus* debido a que las muestras fueron conservadas a temperatura ambiente por dos días y la presión del CO₂ generado provocó que se abrieran los tubos Eppendorf y derramaran su contenido, por lo que no había muestra suficiente para llevar a cabo la cromatografía de líquidos. En la Figura 14, se observa que la concentración de glucosa disminuye al progresar la reacción, lo cual indica que está siendo consumida por la levadura para producir etanol. Además, *S. cerevisiae* produjo una mayor concentración de etanol que *K. marxianus*. Sin embargo, con el uso de *K. marxianus* se pueden obtener otros beneficios como el incremento de la temperatura durante la fermentación debido a que ésta es una levadura capaz de producir etanol a temperaturas mayores a 40 °C (Azhar et al., 2017). Con respecto a la Figura 15, ésta muestra una

disminución en la concentración de etanol de las 28.5 a las 48 horas. Esto se puede deber a que *K. marxianus* es una levadura menos resistente a concentraciones altas de etanol en comparación con *S. cerevisiae*, por lo cual debe utilizar un mecanismo de detoxificación (Lertwattanasakul et al., 2007). Dicho mecanismo se refiere a la conversión de etanol en ácido acético por acción de las enzimas alcohol deshidrogenasa y aldehído deshidrogenasa (Pessani et al., 2011).

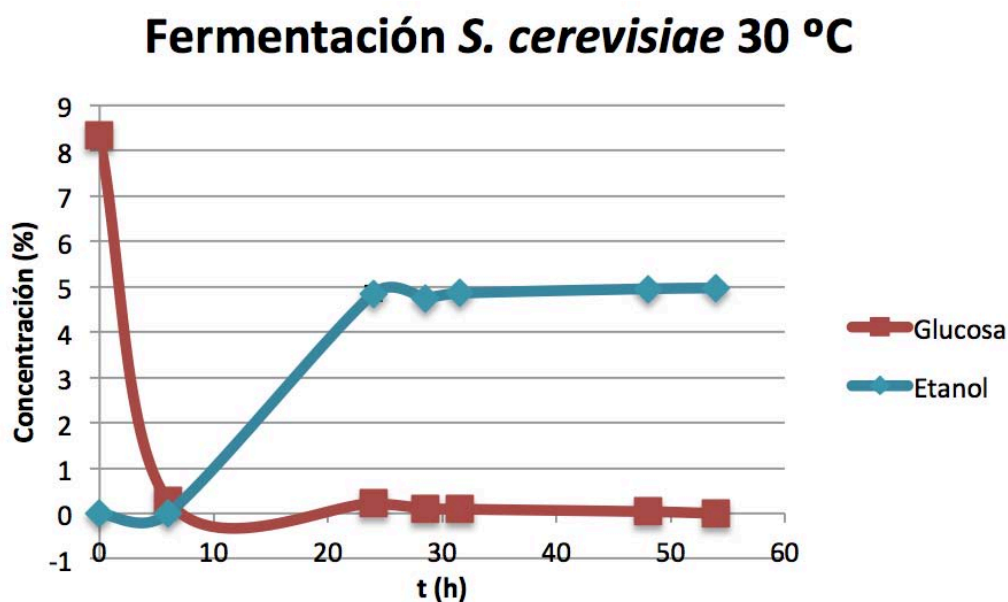


Figura 14. Consumo de glucosa y producción de etanol por *Saccharomyces cerevisiae* Thermosacc® durante curva de crecimiento a 30 °C, n=2

Fermentación *K. marxianus* 30 °C

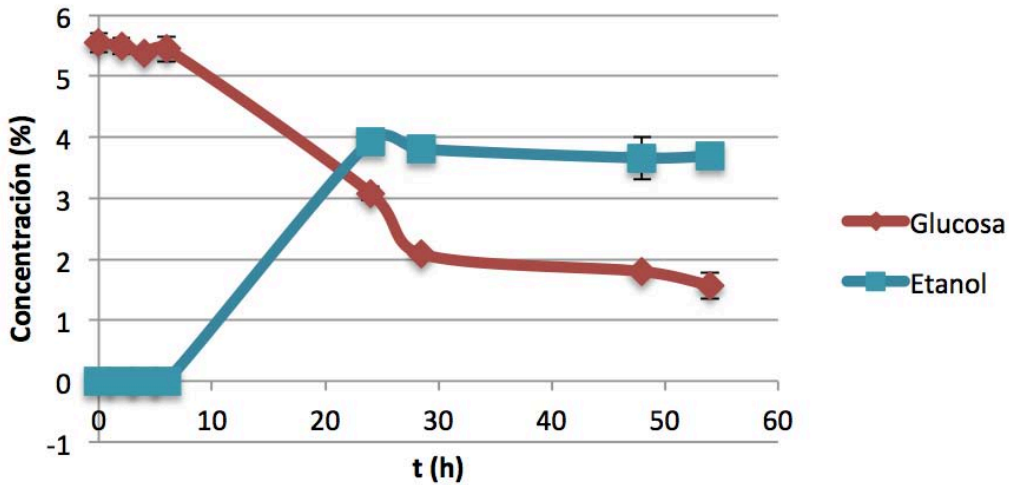


Figura 15. Consumo de glucosa y producción de etanol por *Kluyveromyces marxianus* ISO3 durante curva de crecimiento a 30 °C, n=2

La Figura 16 muestra el crecimiento de *K. marxianus* a 50 °C y 150 rpm. Poco antes de cumplir las 24 horas, la temperatura se ajustó a 40 °C debido a que a este tiempo la duplicación de dicha levadura no era evidente. Esto provocó que durante el tiempo de monitoreo no se alcanzara la fase estacionaria. Sin embargo, aún con este cambio en las condiciones de crecimiento, *K. marxianus* obtuvo una velocidad específica de crecimiento similar a la observada para esta misma levadura a 30 °C, por lo cual se decidió realizar una curva de crecimiento a 45 °C. En cuanto al etanol producido, presentado en la Figura 17, solamente se detectó su presencia en las muestras posteriores al ajuste a 40 °C y la cantidad producida fue mínima.

Kluyveromyces marxianus 50 y 40 °C

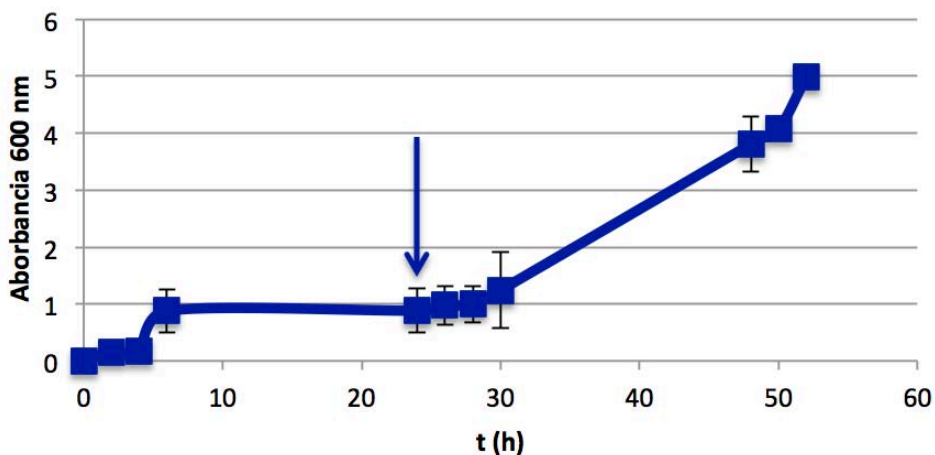


Figura 16. Curva de crecimiento de *Kluyveromyces marxianus* ISO3 a 50 y 40 °C, la flecha indica el tiempo en el que la temperatura de incubación se modificó, n=2

Fermentación *K. marxianus* 50 y 40 °C

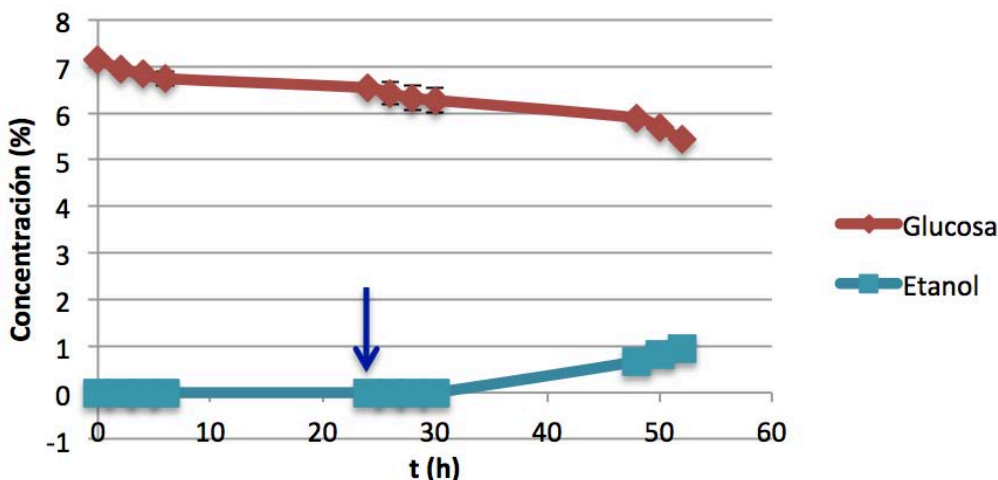


Figura 17. Consumo de glucosa y producción de etanol por *Kluyveromyces marxianus* ISO3 durante curva de crecimiento a 50 y 40 °C, la flecha indica el tiempo en el que la temperatura de incubación se modificó, n=2

La curva de crecimiento de *K. marxianus* a 45 °C se muestra en la Figura 18. En este caso sí se observa la duplicación de dicha levadura. La velocidad específica de crecimiento fue mayor a las velocidades

obtenidas en las curvas de crecimiento anteriores de *K. marxianus* y fue menor a la obtenida para *S. cerevisiae* a 30 °C (Tabla 6). Por otra parte, en la Figura 19 se observa que *K. marxianus* fue capaz de producir etanol a 45 °C pero se alcanzó una concentración menor a la producida en la curva de crecimiento a 30 °C (Tabla 6).

Kluyveromyces marxianus 45 °C

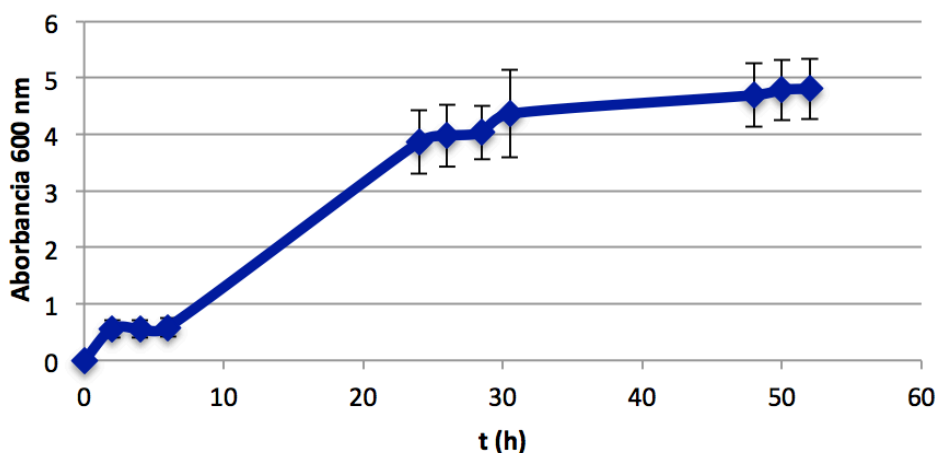


Figura 18. Curva de crecimiento de *Kluyveromyces marxianus* ISO3 a 45 °C, n=2

Fermentación *K. marxianus* 45 °C

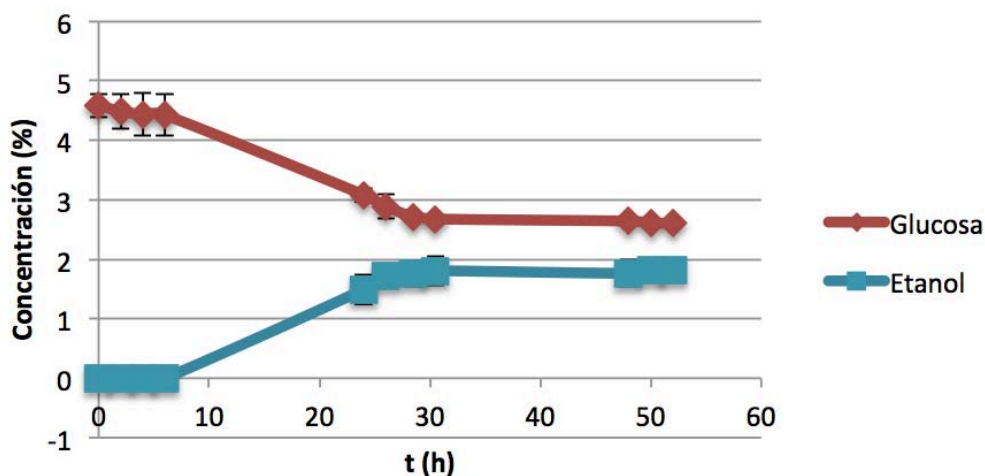


Figura 19. Consumo de glucosa y producción de etanol por *Kluyveromyces marxianus* ISO3 durante curva de crecimiento a 45 °C, n=2

Debido a los resultados obtenidos en la curva de crecimiento a 50 °C y ajustada a 40 °C, se realizó también una curva de crecimiento de *K. marxianus* solamente a 40 °C. Dicha curva se muestra en la Figura 20. La velocidad específica de crecimiento fue la mayor entre las obtenidas en las curvas de crecimiento de *K. marxianus* e incluso fue mayor a la de *S. cerevisiae* (Tabla 6). Por otro lado, en la Figura 21 se observa que *K. marxianus* fue capaz de producir etanol a 40 °C pero se alcanzó una concentración menor a la producida en la curva de crecimiento a 30 °C y menor a la producida en la curva a 45 °C (Tabla 6), lo cual puede deberse a que la cantidad de levadura presente era menor a la que había en la curva a 45 °C. Por tal razón, las pruebas de sacarificación fermentación simultánea fueron realizadas a 45 °C, además de que ésta es una temperatura más cercana a la de hidrólisis (50 °C).

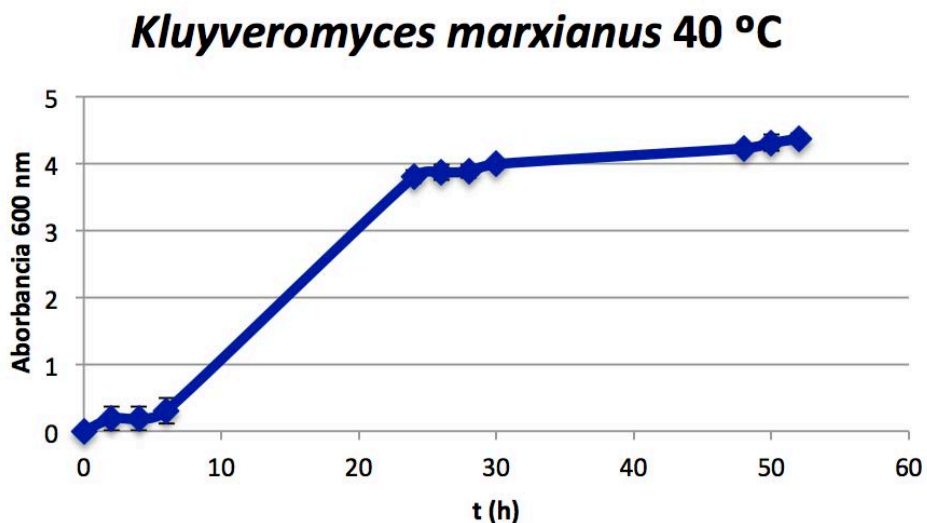


Figura 20. Curva de crecimiento de *Kluyveromyces marxianus* ISO3 a 40 °C, n=2

Fermentación *K. marxianus* 40 °C

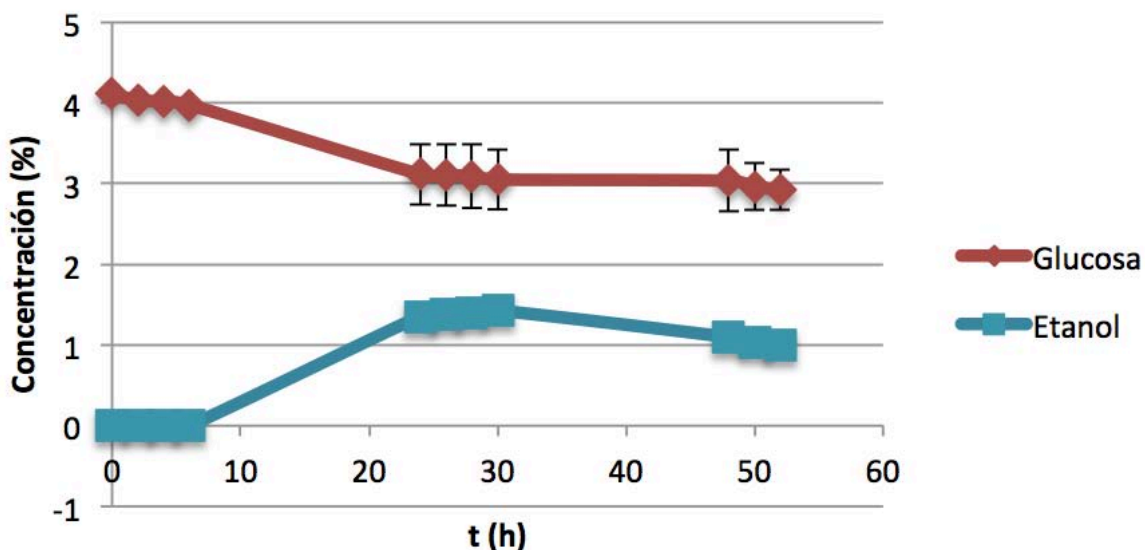


Figura 21. Consumo de glucosa y producción de etanol por *Kluyveromyces marxianus* ISO3 durante curva de crecimiento a 40 °C, n=2

Tabla 6. Resumen de resultados de curvas de crecimiento de *S. cerevisiae* Thermosacc[®] y *K. marxianus* ISO3

Cepa	Temperatura (°C)	Velocidad específica de crecimiento (h ⁻¹)	Concentración máxima de etanol (%)
<i>S. cerevisiae</i>	30	0.11092	4.97
Thermosacc [®]	30	0.06596	3.93
<i>K. marxianus</i> ISO3	50 y 40	0.06418	0.94
<i>K. marxianus</i> ISO3	45	0.08646	1.82
<i>K. marxianus</i> ISO3	40	0.12377	1.43

Fermentación del hidrolizado de bagazo de agave (SHF)

Para comprobar que *K. marxianus* ISO3 fuera capaz de producir etanol a partir del bagazo de agave hidrolizado se llevó a cabo la fermentación (SHF) a 30 °C sobre el producto de la hidrólisis que resultó en una mayor concentración de azúcares fermentables, es decir sobre el hidrolizado de bagazo al 20% con carga enzimática de 15 FPU/g.

El progreso de esta fermentación se muestra en la Figura 22 y su rendimiento, en la Figura 23. De 0 a 24 horas se observa un aumento pronunciado en la producción de etanol y de 24 a 48 horas también hay un aumento, pero éste no es significativo. Esto se debe a que dicho compuesto es un metabolito primario, por lo que en la fase estacionaria dejará de ser producido. De 48 a 72 horas se observa una disminución en el rendimiento de la fermentación pero éste tampoco es significativo. El rendimiento máximo de etanol para esta fermentación fue de 63%.

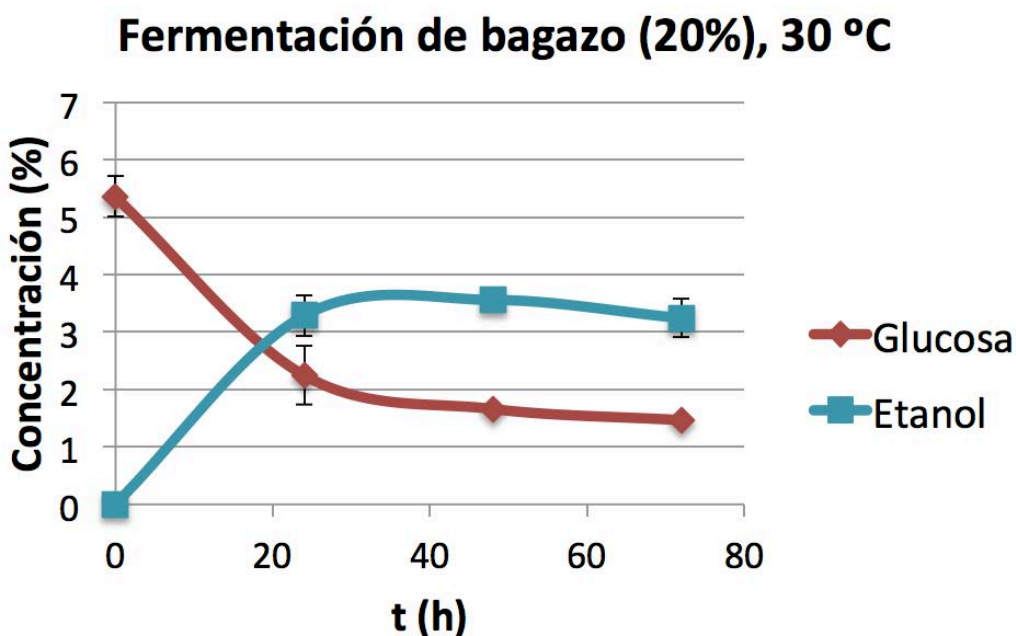


Figura 22. Consumo de glucosa y producción de etanol por *Kluyveromyces marxianus* ISO3 durante fermentación de bagazo (20%) tratado con 15 FPU/g de Cellic CTec2[®], n=2

Rendimiento de fermentación de bagazo (20%), 30 °C

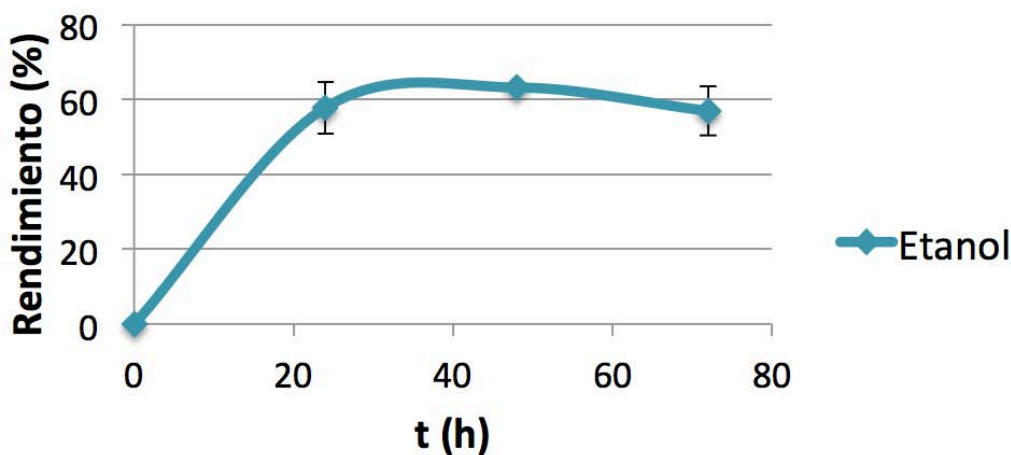


Figura 23. Rendimiento de fermentación de bagazo (20%) por *Kluyveromyces marxianus* ISO3 tratado con 15 FPU/g de Cellic CTec2[®], n=2

Sacarificación fermentación simultánea de bagazo de agave Parte 1 (SFS)

Al observar que *K. marxianus* fue capaz de producir etanol a partir del hidrolizado de bagazo de agave, se llevaron a cabo SFS a 45 °C a distintos tiempos de inoculación.

Las Figuras 24 y 25 muestran el avance de la sacarificación y fermentación simultánea (SFS), la cual fue realizada a 45 °C. Las primeras 24 horas corresponden a la hidrólisis y las siguientes 48 horas corresponden a la SFS. A esto se debe que la presencia de etanol sea evidente hasta las 48 horas de reacción, las cuales son equivalentes a las 24 horas de fermentación. A las 24 horas de reacción se alcanzó un rendimiento de hidrólisis de 64% de glucosa y 82% de xilosa. La concentración de glucosa disminuyó al progresar la reacción para dar

paso a la producción de etanol, del cual se obtuvo un rendimiento de 53%. Sin embargo, la concentración de xilosa aumentó para alcanzar un rendimiento de 86%, lo cual quiere decir que la hidrólisis continuó, pero *K. marxianus* ISO3 no fue capaz de asimilar dicho carbohidrato. Estos resultados se oponen a lo establecido por Azhar et al., 2017 y por Fonseca et al., 2008, pero esto puede deberse a que *K. marxianus* presenta represión catabólica por carbono, pues al tener glucosa en el medio esta levadura no asimila otros carbohidratos como xilosa, galactosa ni arabinosa (Rodrussamee et al., 2011).

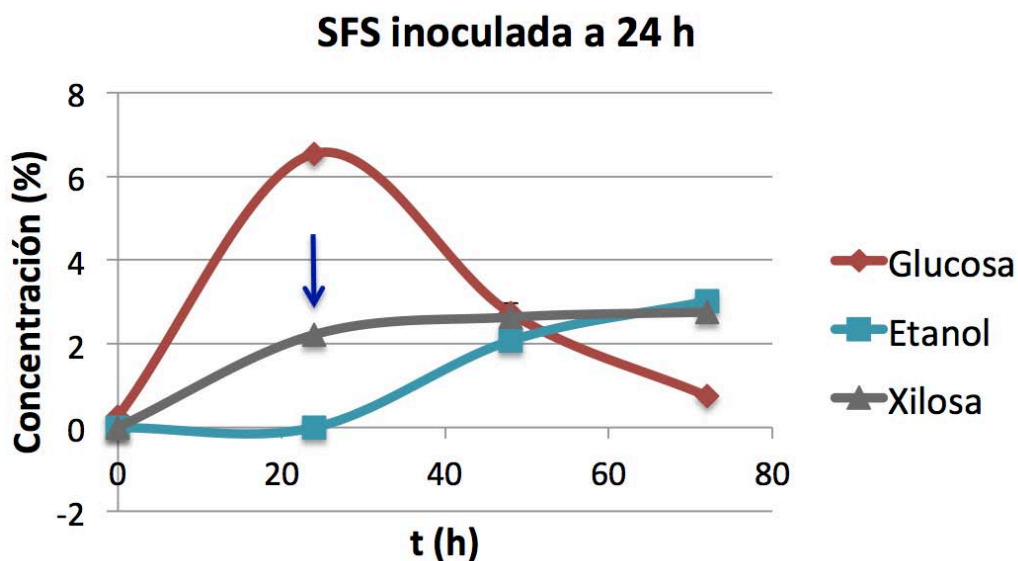


Figura 24. Sacarificación y fermentación simultánea con inoculación a 24 h, la flecha indica el tiempo en el que se inoculó *K. marxianus*, n=2

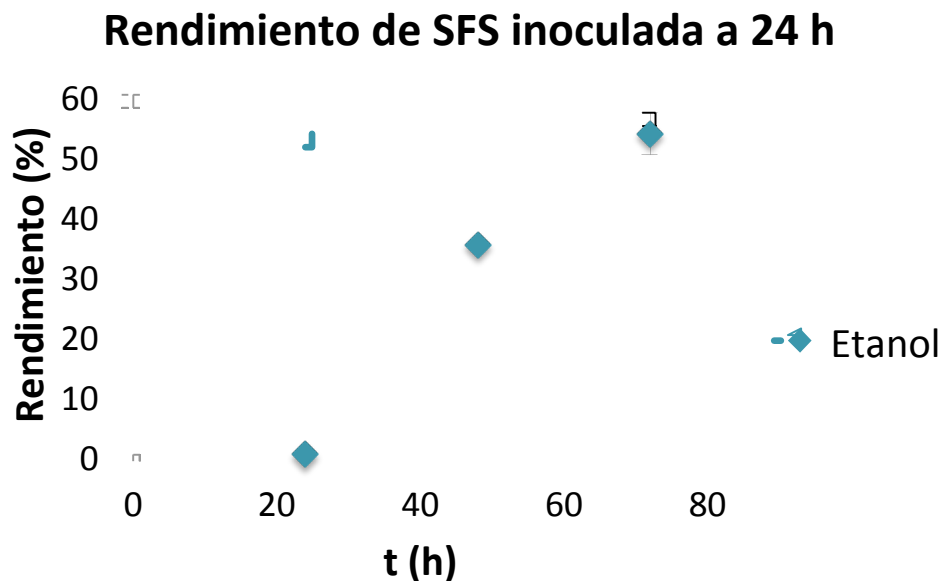


Figura 25. Rendimiento de etanol en sacarificación y fermentación simultánea con inoculación a 24 h, n=2

Las Figuras 26 y 27 muestran el avance de la SFS a 45 °C. Las primeras 12 horas corresponden a la hidrólisis y las siguientes 48 horas corresponden a la SFS. En cuanto al rendimiento de hidrólisis, éste alcanzó su máximo punto a las 12 horas de reacción y fue de 62% para glucosa, mientras que el rendimiento de xilosa fue de 96% al finalizar la reacción. El rendimiento de hidrólisis para glucosa a las 12 horas es equiparable con dicho rendimiento a las 24 horas (64%), lo cual permitió la fermentación de este sustrato para alcanzar un rendimiento de etanol de 46% a las 60 horas de reacción. El rendimiento de etanol fue menor al obtenido en la SFS con inoculación a 24 horas; sin embargo, se obtuvo una mayor productividad (Tabla 7).

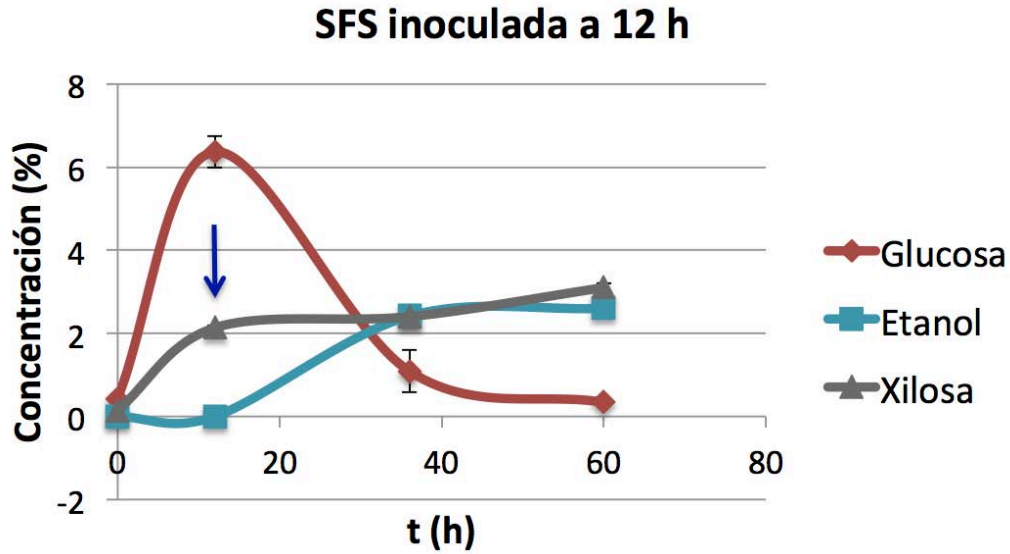


Figura 26. Sacarificación y fermentación simultánea con inoculación a 12 h, la flecha indica el tiempo en el que se inoculó *K. marxianus*, n=2

□

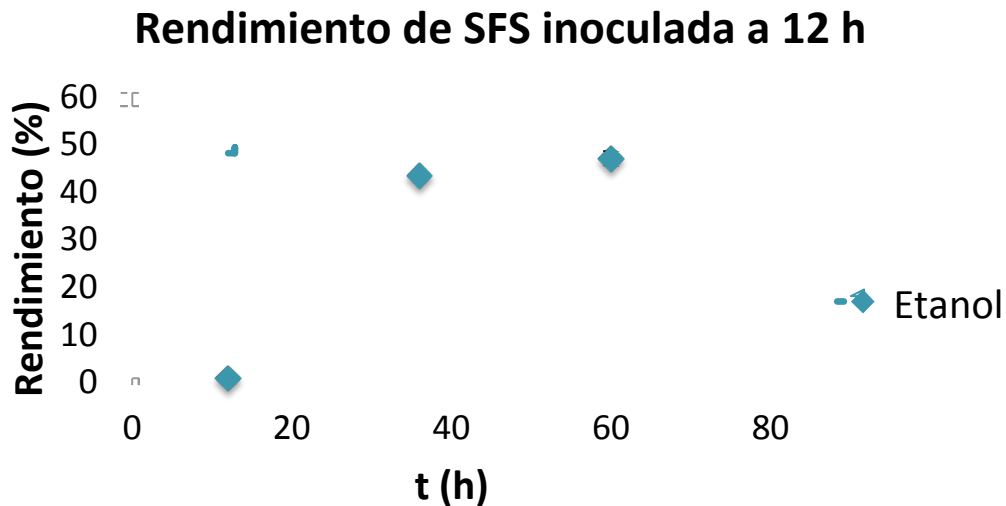


Figura 27. Rendimiento de etanol en sacarificación y fermentación simultánea con inoculación a 12 h, n=2

Las Figuras 28 y 29 muestran el avance de la SFS a 45 °C. Las primeras 6 horas corresponden a la hidrólisis y las siguientes 48 horas corresponden a la SFS. A las 6 horas de reacción, se obtuvo un rendimiento de hidrólisis de 47% para glucosa, el cual es menor a los

rendimientos obtenidos a 12 y 24 horas. No obstante, *K. marxianus* fue capaz de fermentar la glucosa presente y producir etanol para alcanzar un 43% de rendimiento, el cual es menor a los obtenidos para las pruebas anteriores, pero tuvo una mayor productividad que la SHF (Tabla 7). Por otro lado, el rendimiento de hidrólisis al finalizar la reacción fue de 95% para xilosa, lo cual confirma que *K. marxianus* no fue capaz de fermentar la xilosa.

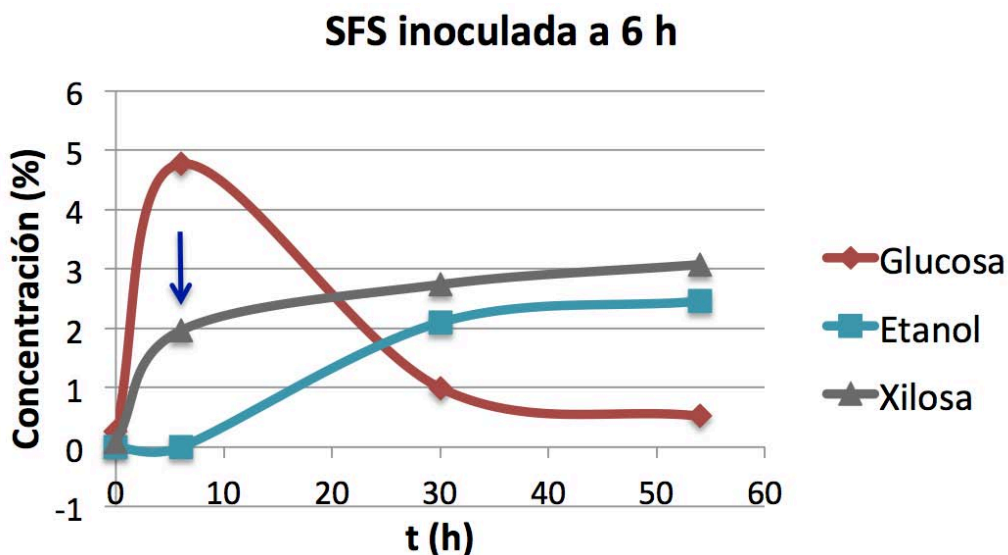


Figura 28. Sacarificación y fermentación simultánea con inoculación a 6 h, la flecha indica el tiempo en el que se inoculó *K. marxianus*, n=2

□

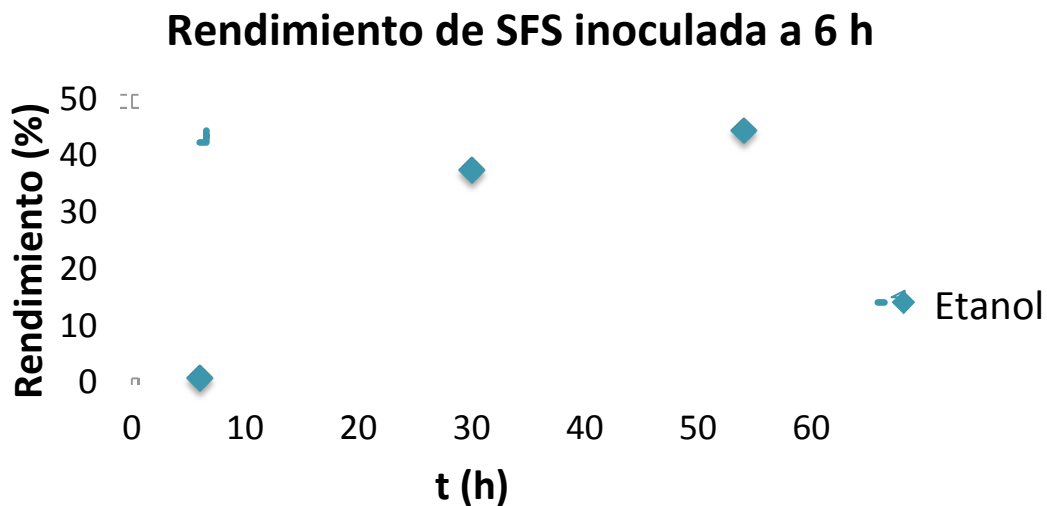


Figura 29. Rendimiento de etanol en sacarificación y fermentación simultánea con inoculación a 6 h, n=2

Sacarificación fermentación simlutánea de bagazo de agave Parte 2 (SFS)

Otros estudios realizados con *Kluyveromyces marxianus* han obtenido rendimientos de etanol más altos para SFS a diferencia de este proyecto (53%): 78 y 80% (Tabla 4); sin embargo, estos otros estudios utilizan distintas materias primas y distintas cepas de dicha levadura. Otro factor que varía entre estos estudios y el proyecto es la capacidad de los matraces utilizados para llevar a cabo la SFS, pues en este caso fue realizada en matraces de 50 mL ($V_{\text{medio}}=30$ mL) mientras que los estudios utilizan matraces de 250 mL ($V_{\text{medio}}=200$ mL). Para saber si este factor afecta el rendimiento de etanol sería necesario llevar a cabo la SFS en contenedores de mayor capacidad volumétrica bajo las condiciones estudiadas en este proyecto.

Para confirmar lo anterior, se llevó a cabo una SFS a 45 °C con inoculación a 24 h en un reactor con capacidad de 250 mL ($V_{\text{medio}}=200$ mL). De dicha SFS se obtuvieron los resultados que se muestran en las Figuras 30 y 31. El rendimiento máximo de glucosa se alcanzó a las 24 horas de reacción y fue de 76%, mientras que el rendimiento máximo de xilosa se alcanzó al finalizar la reacción y fue cercano al 100%. A las 69 horas, se observa un decrecimiento en la concentración de xilosa, indicando que, al haber una baja concentración de glucosa, la xilosa pudo haber sido asimilada por *K. marxianus*. Sin embargo, a las 72 horas la concentración de xilosa aumentó nuevamente, por lo que pudo existir un error en la determinación de la concentración de la muestra anterior. Por otra parte, a pesar de que ésta fue la única reacción en la que la glucosa se consumió por completo, el rendimiento máximo de etanol (65%) no logró igualar los mayores rendimientos mencionados previamente en otros estudios similares. No obstante, el rendimiento y la productividad de esta SFS fueron incluso mayores a los de la SHF (Tabla 7), lo cual es una ventaja debido a que sería posible escalar la producción de etanol bajo las condiciones descritas en esta tesis.

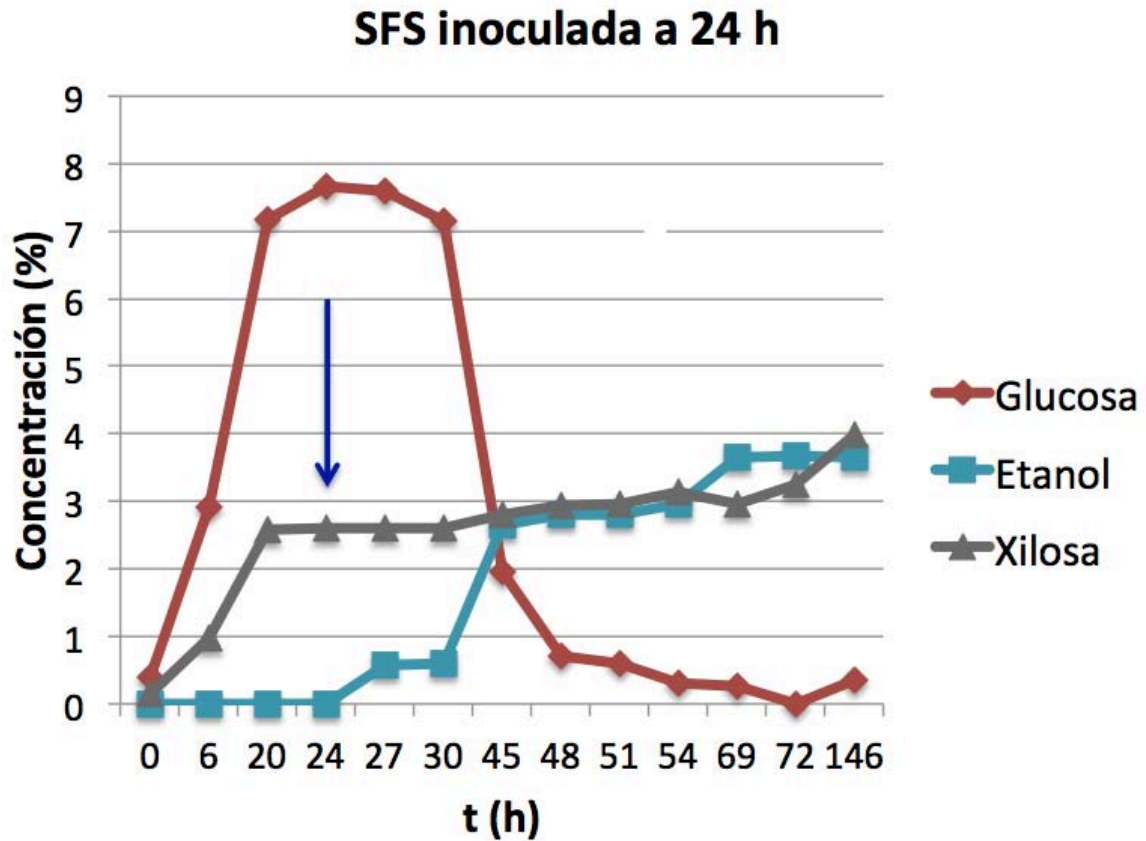


Figura 30. Sacarificación y fermentación simultánea con inoculación a 24 h en reactor, la flecha indica el tiempo en el que se inoculó *K. marxianus*, n=1

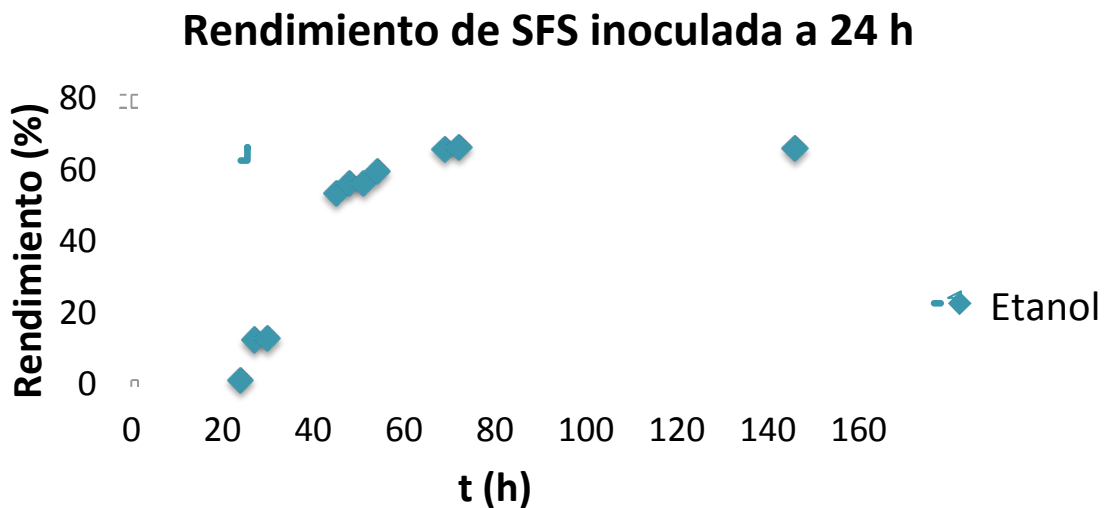


Figura 31. Rendimiento de etanol en sacarificación y fermentación simultánea con inoculación a 24 h en reactor, n=1

Tabla 7. Resumen de resultados para la producción de etanol a partir de bagazo de agave por medio de *K. marxianus* ISO3

Tipo de proceso	Temperatura (° C)	Tiempo de inoculación (h)	Volumen de medio (mL)	Rendimiento de etanol (%)	Productividad (g*L ⁻¹ *h ⁻¹)
SHF	30	N/A	30	63	0.49
SFS	45	24	30	53	0.62
SFS	45	12	30	46	0.54
SFS	45	6	30	43	0.50
SFS	45	24	200	65	0.75

N/A: no aplica

Conclusiones

Las condiciones de hidrólisis que resultan en una mayor concentración de azúcares fermentables son: carga enzimática de 10 FPU/g y concentración de bagazo de 20% (m/v).

K. marxianus ISO3 fue capaz de producir etanol a partir de bagazo de agave a 45 °C.

Para llevar a cabo la sacarificación fermentación simultánea, el tiempo de inoculación con mayor rendimiento de etanol (53%) fue de 24 horas.

Perspectivas

Evaluar la posibilidad de escalar la producción de etanol bajo las condiciones descritas en esta tesis.

Llevar a cabo la SFS en un fermentador para evaluar la producción de etanol con *K. marxianus* ISO3 dando seguimiento al pH y a la concentración de O₂ durante la fermentación.

Evaluar la capacidad fermentadora de *K. marxianus* ISO3 a partir de xilosa.

Evaluar la producción de etanol de *K. marxianus* ISO3 por medio de cultivos por lote, por lote alimentado y continuo.

Referencias

Abdel, B., Hoshida, H., Ano, A., Nonklang, S., Akada, R., 2010. High-temperature fermentation: how can processes for ethanol production at high temperatures become superior to the traditional process using mesophilic yeast? *Applied Microbiology and Biotechnology*, 85, 861-867.

Abdel, W., Fadil, M., Nigam, P., Banat, I., 2000. Isolation of thermotolerant ethanologenic yeasts and use of selected strains in industrial scale fermentation in an Egyptian distillery. *Biotechnology and Bioengineering*, 68 (5), 531-535.

Ahmed, I., Nguyen, P., Huynh, L., Ismadji, S., Ju, Y., 2013. Bioethanol production from pretreated *Melaleuca leucadendron* shedding bark – Simultaneous saccharification and fermentation at high solid loading. *Bioresource Technology*, 136, 213-221.

Akhtar, N., Gupta, K., Goyal, D., Goyal, A., 2015. Recent Advances in Pretreatment Technologies for Efficient Hydrolysis of Lignocellulosic Biomass. *Environmental Progress & Sustainable Energy*, 35 (2), 489-511.

Albersheim, P., Darvill, A., Roberts, K., Sederoff, R., Staehelin, A., 2011. *Plant Cell Walls*. Nueva York: Garland Science.

Aro, E. (2016). From first generation biofuels to advanced solar biofuels. *Ambio*, 45, 24-31.

Azhar, S., Abdulla, R., Jambo, S., Marbawi, H., Gansau, J., Mohd, A., Rodrigues, K., 2017. Yeasts in sustainable bioethanol production: A review. *Biochemistry and Biophysics Reports*, 10, 52-61.

Bai, F., Liu, C., Huang, H., Tsao, G., 2012. *Biotechnology in China III: Biofuels and Bioenergy*. Nueva York: Springer.

Balat, M., Balat, H., 2009. Recent trends in global production and utilization of bio-ethanol fuel. *Applied Energy*, 86, 2273-2282.

Ballesteros, M., Oliva, J., Manzanares, P., Negro, M., Ballesteros, I., 2002. Ethanol production from paper material using a simultaneous saccharification and fermentation system in a fed-batch basis. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 18, 559-561.

Bari, R., 2004. A novel approach for the suppression of photorespiration in C3 plants by gene transfer. Doctorado. Universidad Técnica de Aquisgrán. Asesor: Fritz Kreuzaler.

Bear, R., Rintoul, D., Snyder, B., Smith, M., Herren, C., Horne, E., 2016. *Principles of Biology*. Manhattan: New Prairie Press.

Behera, S., Arora, R., Nandhagopal, N., Kumar, S., 2014. Importance of chemical pretreatment for bioconversion of lignocellulosic biomass. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 36, 91-106.

Borland, A., Griffiths, H., Hartwell, J., Smith, A., 2009. Exploiting the potential of plants with crassulacean acid metabolism for bioenergy production on marginal lands. *Journal of Experimental Botany*, 60 (10), 2879-2896.

Castillo, F., Roldán, M., Blasco, R., Huertas, M., Caballero, F., Moreno, C., Martínez, M., 2005. *Biotecnología Ambiental*. Madrid: Editorial Tébar.

Davis, S., Dohleman, F., Long, S., 2011. The global potential of Agave as a biofuel feedstock. *GCB Bioenergy*, 3, 68-78.

Dutta, K., Daverey, A., Lin, J., 2014. Evolution retrospective for alternative fuels: First to fourth generation. *Renewable Energy*, 69, 114-122.

Equihua, M., Barahona, L., 2017. Physical and Chemical Characterization of *Agave tequilana* Bagasse Pretreated with the Ionic Liquid 1-Ethyl-3-Methylimidazolium Acetate. *Waste and Biomass Valorization*, 1-10.

Faga, B., Wilkins, M., Banat, I., 2010. Ethanol production through simultaneous saccharification and fermentation of switchgrass using

Saccharomyces cerevisiae D5A and thermotolerant *Kluyveromyces marxianus* IMB strains. *Bioresource Technology*, 101 (7), 2273-2279.

Faria, F., Puga, S., Ferreira, C., 2013. *Food Industry*. Londres: Intech.

Fitzpatrick, M., Champagne, P., Cunningham, M., Whitney, R., 2010. A biorefinery processing perspective: treatment of lignocellulosic materials for the production of value-added products. *Bioresource Technology*, 101 (23), 8915-8922.

Fonseca, G., Heinzle, E., Wittmann, C., Gombert, A., 2008. The yeast *Kluyveromyces marxianus* and its biotechnological potential. *Applied Microbiology and Technology*, 79 (3), 339-354.

Gabardo, S., Feix, G., Rech, R., Záchia, M., 2015. The modeling of ethanol production by *Kluyveromyces marxianus* using whey as substrate in continuous A-Stat bioreactors. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 42 (9), 1243-1253.

Hanson, D., 2016. Breaking the rules of Rubisco catalysis. *Journal of Experimental Botany*, 67, 3180-3182.

Iñiguez, G., Lange, S., Rowell, R., 2001. Utilization of byproducts from the tequila industry: part 1: agave bagasse as a raw material for animal feeding and fiberboard production. *Bioresource technology*, 77 (1), 25-32.

Jutakanoke, R., Tolieng, V., Tanasupawat, S., Akaracharanya, A., 2017. Ethanol Production from Sugarcane Leaves by *Kluyveromyces marxianus*

S1.17, a Genome-Shuffling Mediated Transformant. *BioResources*, 12 (1), 1636-1646.

Kádár, Z., Szengyel, Z., Réczey, K., 2004. Simultaneous saccharification and fermentation (SSF) of industrial wastes for the production of ethanol. *Industrial Crops and Products*, 20 (1), 103-110.

Kestur, S., Flores, T., Pereira, L., Dos Santos, J., Mazzaro, I., Mikowski, A., 2013. Characterization of blue agave bagasse fibers of Mexico. *Composites Part A: Applied Science and Manufacturing*, 45, 153-161.

Kumar, R., Tabatabaei, M., Karimi, K., Sárvári, I., 2016. Recent updates on lignocellulosic biomass derived ethanol - A review. *Biofuel Research Journal*, 9, 347-356.

Lallemand Biofuels & Distilled Spirits, 2013. *Product Sheet: Yeast Thermosacc[®] Dry*. [En línea] (Actualizado en 2013). Disponible en: http://www.lallemandbds.com/wp-content/uploads/2012/12/2013_LBDS_Data-Sheet_Yeast_Thermosacc-Dry_10080_Data_Rev.00.01.01.20131_n.pdf [Último acceso el 22 de octubre de 2018]

Lane, M., Morrisey, J., 2010. *Kluyveromyces marxianus*: A yeast emerging from its sister's shadow. *Fungal Biology Reviews*, 24 (1-2), 17-26.

Lertwattanasakul, N., Sootsuwan, K., Limtong, S., Thanonkeo, P., Yamada, M., 2007. Comparison of the Gene Expression Patterns of Alcohol Dehydrogenase Isozymes in the Thermotolerant Yeast

Kluyveromyces marxianus and Their Physiological Functions. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 71 (5), 1170-1182.

Montiel, C., Hernández, O., Vivaldo, E., Hernández, M., Bárzana, E., 2016. Enhanced Bioethanol Production from Blue Agave Bagasse in a Combined Extrusion–Saccharification Process. *Bioenergy Research*, 9 (4), 1005-1014.

Naik, S., Goud, V., Rout, P., Dalai, A., 2010. Production of first and second generation biofuels: A comprehensive review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 14 (2), 578-597.

Narra, M., James, J., Balasubramanian, V., 2015. Simultaneous saccharification and fermentation of delignified lignocellulosic biomass at high solid loadings by a newly isolated thermotolerant Kluyveromyces sp. for ethanol production. *Bioresource Technology*, 179, 331-338.

Nonklang, S., Abdel, B., Cha-aim, K., Moonjai, N., Hoshida, H., Limtong, S., Yamada, M., Akada, R., 2008. High-Temperature Ethanol Fermentation and Transformation with Linear DNA in the Thermotolerant Yeast Kluyveromyces marxianus DMKU3-1042. *Applied and Environmental Microbiology*, 74 (24), 7514–7521.

Norma Oficial Mexicana NOM-016-CRE-2016. Diario Oficial de la Federación, 29 de agosto de 2016.

Novozymes, 2010. *Application sheet: Cellic CTec2 and HTec2*. [En línea] (Actualizado en 2010). Disponible en:

<http://www.shinshu-u.ac.jp/faculty/engineering/chair/chem010/manual/Ctec2.pdf> [Último acceso el 26 de abril de 2018]

Olofsson, K., Bertilsson, M., Lidén, G., 2008. A short review on SSF – an interesting process option for ethanol production from lignocellulosic feedstocks. *Biotechnology for Biofuels*, 1, 1-14.

Pentjuss, A., Stalidzans, E., Liepins, J., Kokina, A., Martynova, J., Zikmanis, P., Mozga, I., Scherbaka, R., Hartman, H., Poolman, M., Fell, D., Vigants, A., 2017. Model-based biotechnological potential analysis of *Kluyveromyces marxianus* central metabolism. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 44 (8), 1177-1190.

Pessani, N., Atiyeh, H., Wilkins, M., Bellmer, D., Banat, I., 2011. Simultaneous saccharification and fermentation of Kanlow switchgrass by thermotolerant *Kluyveromyces marxianus* IMB3: The effect of enzyme loading, temperature and higher solid loadings. *Bioresource Technology*, 102 (22), 10618-10624.

Rana, V., Eckard, A., Ahring, B., 2014. Comparison of SHF and SSF of wet exploded corn stover and loblolly pine using in-house enzymes produced from *T. reesei* RUT C30 and *A. saccharolyticus*. *SpringerPlus*, 3, 516.

Ravindran, R., Jaiswal, A., 2016. A Comprehensive Review on Pre-treatment Strategy for Lignocellulosic Food Industry Waste: Challenges and Opportunities. *Bioresource Technology*, 199, 92-102.

Rodrigues, A., Haven, M., Lindedam, J., Felby, C., Gama, M., 2015. Celluclast and Cellic CTec2[®]: Saccharification/fermentation of wheat straw, solid–liquid partition and potential of enzyme recycling by alkaline washing. *Enzyme and Microbial Technology*, 79-80, 70-77.

Rodrussamee, N., Lertwattanasakul, N., Hirata, K., Suprayogi, M., Limtong, S., Kosaka, T., Yamada, M., 2011. Growth and ethanol fermentation ability on hexose and pentose sugars and glucose effect under various conditions in thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus*. *Applied Microbiology and Technology*, 90, 1573-1586.

SAGARPA, 2017. *Planeación Agrícola Nacional 2017-2030* [En línea]

(Actualizado en 2017). Disponible en:

https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/255627/Planeaci_n_Agr cola_Nacional_2017-2030-_parte_uno.pdf

Scheper, T., Belkin, S., Bley, T., Bohlmann, J., Gu, M., Hu, W., Mattiasson, B., Nielsen, J., Seitz, H., Ulber, R., Zeng, A., Zhong, J., Zhou, W., 2007. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*. Nueva York: Springer

SIAP (Sistema de Información Agroalimentaria y Pesquera), 2017. *Atlas agroalimentario 2017*. SIAP/SAGARPA, Ciudad de México.

Silveira, M., Morais, A., da Costa, A., Oleksyszzen, D., Bogel, R., Andreaus, J., Pereira, L., 2015. Current Pretreatment Technologies for

the Development of Cellulosic Ethanol and Biorefineries. *ChemSusChem*, 8 (20), 3366-3390.

Somerville, C., Youngs, H., Taylor, C., Davis, S., Long, S., 2010. Feedstocks for Lignocellulosic Biofuels. *Science*, 329, 790-792.

Taherzadeh, M., Karimi, K., 2008. Pretreatment of Lignocellulosic Wastes to Improve Ethanol and Biogas Production: A Review. *International Journal of Molecular Sciences*, 9 (9), 1621-1651.

Suryawati, L., Wilkins, M., Bellmer, D., Huhnke, R., Maness, N., Banat, I., 2008. Simultaneous Saccharification and Fermentation of Kanlow Switchgrass Pretreated by Hydrothermolysis Using *Kluyveromyces marxianus* IMB4. *Biotechnology and Bioengineering*, 101 (5), 894-902.

Techaparina, A., Thanonkeo, P., Klanrit, P., 2017. High-temperature ethanol production using thermotolerant yeast newly isolated from Greater Mekong Subregion. *Brazilian Journal of Microbiology*, 48, 461-475.

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

Velázquez, U., Farías, J., Vargas, A., Castro, A., 2016. *Tequilana weber* Agave Bagasse Enzymatic Hydrolysis for the Production of Fermentable

Sugars: Oxidative-Alkaline Pretreatment and Kinetic Modeling. *BioEnergy Research*, 9 (4), 998-1004.

Worthington Biochemical Corporation, 2018. *Cellulase*. [En línea] (Actualizado en 2018). Disponible en <http://www.worthington-biochem.com/cel/default.html> [Último acceso el 24 de abril de 2018]

Xue, S., Uppugundla, N., Bowman, M., Cavalier, D., Da Costa, L., Dale, B., Balan, V., 2015. Sugar loss and enzyme inhibition due to oligosaccharide accumulation during high solids-loading enzymatic hydrolysis. *Biotechnology for Biofuels*, 8, 195-209.

Yan, J., Wei, Z., Wang, Q., He, M., Li, S., Irbis, C., 2015. Bioethanol production from sodium hydroxide/hydrogen peroxide-pretreated water hyacinth via simultaneous saccharification and fermentation with a newly isolated thermotolerant *Kluyveromyces marxianus* strain. *Bioresource Technology*, 193, 103-109.

Yang, L., Lu, M., Carl, S., Mayer, J., Cushman, J., Tian, E., Lin, H., 2015. Biomass characterization of *Agave* and *Opuntia* as potential biofuel feedstocks. *Biomass and Bioenergy*, 76, 43-53.

Yennamalli, R., Rader, A., Kenny, A., Wolt, J., Sen, T., 2013. Endoglucanases: insights into thermostability for biofuel applications. *Biotechnology for Biofuels*, 6, 1-9.

Zadow, J., 2012. *Whey and Lactose Processing*. Nueva York: Elsevier