



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

---

---

FACULTAD DE QUÍMICA

Evaluación de la producción de etanol mediante la  
cofermentación de los hidrolizados de residuos de  
agave con *Saccharomyces cerevisiae* y *Pichia stipitis*

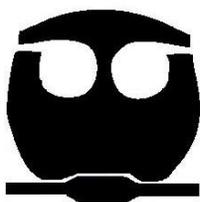
T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICO DE ALIMENTOS

PRESENTA:

AARÓN ROBERTO MONTERO ALFARO



MÉXICO, D.F.

2010



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:**      **Profesor:** MARÍA DEL CARMEN WACHER RODARTE

**VOCAL:**            **Profesor:** MARICARMEN QUIRASCO BARUCH

**SECRETARIO:**    **Profesor:** FRANCISCO RUIZ TERÁN

**1er. SUPLENTE:**   **Profesor:** GLORIA DÍAZ RUIZ

**2° SUPLENTE:**    **Profesor:** JORGE ARTURO ABURTO ANELL

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:** Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Química conjunto E, Edificio de Alimentos y Química Ambiental, Laboratorio 321, Ciudad Universitaria, México, D.F.

---

**ASESOR DEL TEMA:**   DR. FRANCISCO RUIZ TERÁN  

---

**(nombre y firma)**

**SUPERVISOR TÉCNICO (Si lo hay):**   QFB. AGUSTÍN REYO HERRERA  

---

**(nombre y firma)**

**SUSTENTANTE:**    AARÓN ROBERTO MONTERO ALFARO  

---

**(nombre y firma)**

## **AGRADECIMIENTOS**

Gracias a Pancho por la oportunidad de realizar este trabajo, y por el apoyo y orientación que me brindó para realizarlo.

Agradezco a Reyo por su apoyo a durante la carrera y por su asesoría en este trabajo.

Agradezco a la Dra. Ma del Carmen Wachter y a la Dra. Maricarmen Quirasco por la revisión de mi trabajo.

Gracias a mi mama y a mi hermana por estar conmigo en todo momento.

Gracias a la familia Alfaro por el apoyo que siempre me han brindado.

A los amigos que recorrieron conmigo este camino y que llenaron mi carrera de momentos especiales.

## ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
ANTECEDENTES	3
Biocombustibles	3
Bioetanol	5
Biomasa rica en lignocelulosa como materia prima para la producción de bioetanol	7
Hojas de agave como fuente de lignocelulosa para la producción de bioetanol	10
Conversión de la lignocelulosa en bioetanol	11
<i>Sacarificación de la lignocelulosa por hidrólisis con ácido</i>	11
<i>Prehidrólisis de la lignocelulosa</i>	15
<i>Sacarificación de la lignocelulosa con enzimas (hidrólisis enzimática)</i>	18
Fermentación de hidrolizados de lignocelulosa	21
Tolerancia de las levaduras al etanol	27
OBJETIVOS	29
Objetivo General	29
Objetivos particulares	29
HIPÓTESIS	29

METODOLOGÍA	30
Preparación de las muestras de agave	31
Determinación del contenido de humedad de las hojas de agave	31
Hidrólisis de los polisacáridos de las hojas de agave	32
<i>Pretratamiento de las hojas de agave</i>	32
<i>Hidrólisis ácida de los polisacáridos de las hojas de agave</i>	32
<i>Hidrólisis ácido-enzimática de los polisacáridos de las hojas de agave</i>	33
Caracterización y cuantificación de los azúcares producidos en la hidrólisis de los polisacáridos de las hojas de agave	34
<i>Cuantificación de azúcares reductores por el método del ácido 3,5-Dinitrosalicílico (DNS)</i>	34
<i>Caracterización de azúcares por cromatografía de líquidos de alta eficiencia (HPLC)</i>	34
<i>Evaluación de rendimientos de hidrólisis de los polisacáridos de las hojas de agave</i>	35
Evaluación de la capacidad de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> y <i>Pichia stipitis</i> para crecer en un medio preparado con glucosa y xilosa como fuentes de carbono	36
<i>Reactivación de las cepas de Saccharomyces cerevisiae y Pichis stipitis</i>	37
<i>Ensayos de fermentación con Saccharomyces cerevisiae y Pichia stipitis en medio con glucosa, en medio con xilosa y en medio mixto (con glucosa y xilosa)</i>	37

Fermentación de los hidrolizados de hojas de agave con <i>Saccharomyces cerevisiae</i> y <i>Pichia stipitis</i>	38
<i>Evaluación del crecimiento de las levaduras durante la fermentación mediante la determinación de la densidad óptica del medio de fermentación</i>	39
<i>Conteo de células viables de Saccharomyces cerevisiae y Pichia stipitis durante la fermentación</i>	40
<i>Evaluación del consumo de azúcares durante la fermentación</i>	41
Cuantificación de Etanol por cromatografía de gases y evaluación de rendimientos en la fermentación	41
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	41
Hidrólisis de los polisacáridos de las hojas de agave	42
Caracterización y cuantificación de azúcares en los hidrolizados	45
Evaluación de la capacidad de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> y <i>Pichia stipitis</i> para crecer en unen medio preparado con glucosa y xilosa como fuentes de carbono	48
Fermentación de hidrolizados de hojas de agave con las levaduras <i>Saccharomyces cerevisiae</i> y <i>Pichia stipitis</i>	54
Cuantificación de Etanol por cromatografía de gases y evaluación de rendimientos en la fermentación	60
CONCLUSIONES	63
RECOMENDACIONES	64
BIBLIOGRAFÍA	65
ANEXOS	68

## RESUMEN

El bioetanol es considerado una alternativa para reemplazar a los combustibles derivados del petróleo, ya que se considera una fuente de energía sustentable y ecológica.

En el presente trabajo se evalúa el potencial de las hojas de agave, un residuo de la industria tequilera, como materia prima para la producción de etanol. Esta transformación es posible al hidrolizar los polisacáridos de este residuo para obtener azúcares simples (principalmente glucosa y xilosa), y después fermentarlos. Ya que *S. cerevisiae* no es capaz de metabolizar la xilosa eficientemente, se involucró a *P. stipitis*, fermentadora de xilosa, para aprovechar la mayoría de los azúcares disponibles e incrementar el rendimiento de etanol.

Al estudiar la hidrólisis de los polisacáridos de las hojas de agave se evaluó el tratamiento ácido con diferentes condiciones de concentración de ácido y tiempo de hidrólisis a 120°C, y el efecto de este tratamiento en una hidrólisis posterior con enzimas celulasas y hemicelulasas. Se evaluó la capacidad de las levaduras *S. cerevisiae* y *P. stipitis* para fermentar la xilosa y su producción de etanol al fermentar los hidrolizados de hojas de agave obtenidos en cultivo mixto e individual.

El rendimiento más alto obtenido fue de 66 gramos de azúcares reductores por 100 gramos de hojas de agave (bs). Este rendimiento se obtuvo al combinar los tratamientos de hidrólisis con ácido y con enzimas. Se encontró que *P. stipitis* fermenta la xilosa, sin embargo su consumo de azúcares es muy lento al compararlo con el de *S. cerevisiae*. Al fermentar los hidrolizados de hojas de agave, El crecimiento de *P. stipitis* se vio inhibido mientras que el de *S. cerevisiae* fue muy bueno. Con *S. cerevisiae* se obtuvo un rendimiento máximo de etanol de 0.48 g/g y una productividad de 1.76 g/Lh, mientras que con *P. stipitis* el rendimiento máximo obtenido fue de 0.25 g/g y su productividad de 0.64 g/Lh.

## INTRODUCCIÓN

El bioetanol es el producto de la fermentación alcohólica de diversos materiales orgánicos a través de la acción de microorganismos. En la actualidad, el bioetanol es considerado como una alternativa viable para reemplazar a los combustibles derivados del petróleo utilizados para el transporte (Nigam, 2002).

A nivel mundial, el bioetanol ha adquirido un gran valor por la posibilidad de ser utilizado como combustible, ya sea puro o mezclado con gasolina, proporcionando una combustión de mejor calidad y más limpia (Hernández, 2007). Además, es una fuente renovable de energía ya que sus emisiones y toxicidad son menores que las del petróleo (Nigam, 2002).

En vista del constante incremento en el precio de petróleo, debido al agotamiento de las reservas y a su creciente demanda, la conversión de la biomasa en bioetanol representa una gran oportunidad de asegurar el abasto energético, reducir la emisión de gases que producen el efecto invernadero y de favorecer la estabilidad en el precio de los combustibles (Chiang *et al.*, 2008). Por otra parte, el aprovechamiento de los residuos agroindustriales para la producción de bioetanol es de gran interés por diversas razones, además de ser una fuente de materia prima renovable y de gran disponibilidad, es de bajo costo (Hernández, 2007), por lo que su conversión eficiente permite reducir los costos en la producción de este combustible (Nigam, 2002)

Las técnicas empleadas para producir bioetanol a partir de residuos están sujetas a limitaciones económicas ya que su precio debe ser competitivo con el de los combustibles derivados del petróleo (Linde *et al.*, 2008), por lo que un reto en la actualidad, es el desarrollar nuevas tecnologías que permitan realizar esta transformación de manera eficiente y económica (Hernández, 2007).

Uno de los residuos agroindustriales que se producen en mayor cantidad en México son las hojas del agave provenientes de la producción de Tequila, la industria tequilera genera cada día cantidades considerables de estos residuos los cuales son desperdiciados por desconocer las alternativas para su uso (Tello, 2001).

Las hojas de agave están constituidas principalmente de lignocelulosa, esto es, una matriz formada de lignina, celulosa y hemicelulosa (Iñiguez *et al.*, 2001). La lignina no es una materia prima para producir bioetanol, por el contrario, la celulosa y la hemicelulosa son polímeros de azúcares de cinco y seis carbonos y son la materia prima para la producción de bioetanol (Kumar *et al.*, 2008).

La conversión de lignocelulosa en bioetanol se realiza en tres etapas, en la primera la celulosa y la hemicelulosa son hidrolizados para obtener azúcares fermentables. En la segunda etapa estos azúcares se fermentan con microorganismos, generalmente levaduras, y finalmente en la tercer etapa el etanol obtenido es purificado (Nigam, 2002).

En la primera parte de este trabajo se evaluaron los rendimientos de azúcares fermentables obtenidos a partir de la hidrólisis de las hojas de agave por hidrólisis ácida y por hidrólisis enzimática. En la hidrólisis con ácido se evaluaron la concentración de ácido y el tiempo de hidrólisis a 121°C. En la hidrólisis enzimática se evaluaron diferentes complejos enzimáticos y el tratamiento de las hojas previo a la hidrólisis con enzimas.

En la segunda etapa se evaluó la capacidad de las levaduras *Saccharomyces cerevisiae* y *Pichia stipitis* para fermentar la xilosa comparando su crecimiento en un medio con este azúcar, con su crecimiento en un medio con glucosa.

Finalmente en la tercer etapa se evaluó el rendimiento de etanol obtenido al realizar la fermentación de los hidrolizados de hojas de agave con un cultivo mixto de *Saccharomyces cerevisiae* y *Pichia stipitis* y se comparó con el rendimiento de etanol de cada levadura al fermentar individualmente el mismo hidrolizado.

## ANTECEDENTES

### Biocombustibles

En la actualidad se conocen diferentes tipos de energía obtenidas a partir de fuentes renovables, una de ellas son los biocombustibles. El término biocombustible se refiere a cualquier combustible, líquido o gas, producido a partir de biomasa (material biológico principalmente vegetal) destinado al sector de transporte como una alternativa a los combustibles derivados del petróleo como el diesel y la gasolina (Demirbas, 2008).

La utilización de biocombustibles tiene algunas ventajas sobre el uso de combustibles derivados del petróleo, ya que se consideran no contaminantes, sustentables y al ser producidos a partir de biomasa, son una fuente de energía renovable e infinita, ya que al producir biomasa para biocombustibles, se reutiliza el CO<sub>2</sub> liberado en su combustión generando un ciclo de CO<sub>2</sub> (Demirbas, 2008).

La importancia en el estudio de los biocombustibles está en el interés en solucionar algunos de los problemas más importantes que se presentan en el mundo actual. En primer lugar, la preocupación por el futuro del abasto energético, ya que como se sabe, las reservas de petróleo son hoy en día un recurso limitado mientras que los requerimientos de energía a nivel global crecen en tasas elevadas (Sánchez y Cardona, 2008).

En segundo lugar está el cambio climático, provocado por la acumulación de dióxido de carbono en la atmósfera, que es producido en gran medida por la expansión del sector de transporte y su efecto se ve reflejado en cambios muy notables en el ecosistema terrestre (Kádár *et al.*, 2004). Por último, la contaminación ambiental producida por la generación de diversos contaminantes provenientes de la combustión de los combustibles fósiles y que tienen un efecto adverso en la salud de las personas.

Entre estos contaminantes se encuentran los óxidos de nitrógeno, el monóxido de carbono, hidrocarburos, partículas, aldehídos, benceno, tolueno, xileno, dióxido de azufre, y metano entre otros (Agarwal, 2007).

Además de los biocombustibles existen otras fuentes de energía renovable así como la energía solar, la energía eólica, la energía geotérmica y la energía hidrotérmica; sin embargo estos tipos de energía tienen la capacidad de generar únicamente energía térmica y eléctrica mientras que el 40% del consumo de energía mundial es en forma de combustibles líquidos, por lo que la investigación para el desarrollo de las tecnologías para la producción de los biocombustibles es de gran importancia (Tan *et al.*, 2008).

Dentro de los biocombustibles líquidos los más importantes se encuentran el bioetanol, el biometanol y el biodiesel. Las principales diferencias entre estos biocombustibles y los combustibles derivados del petróleo es que estos no contienen azufre y contienen niveles mayores de oxígeno que van desde el 10% hasta el 45%. Estas diferencias en su composición además de sus características particulares hace que los biocombustibles tengan propiedades químicas muy diferentes a los combustibles derivados del petróleo y su combustión sea más eficiente y menos contaminante (Demirbas, 2008).

## Bioetanol

El bioetanol o alcohol etílico es un biocombustible líquido que puede ser producido a partir de diferentes tipos de biomasa (material vegetal) mediante diversas tecnologías. Es el biocombustible más producido en el mundo, en la actualidad su producción representa el 94% de la producción total de biocombustibles del mundo (Balat *et al.*, 2008).

Actualmente la gran mayoría del bioetanol producido en el mundo es de primera generación, esto es, que se produce a partir sustratos ricos en azúcar y almidón que a su vez son una fuente importante de alimento como caña de azúcar y el maíz (Balat *et al.*, 2008). Debido a que la utilización de estos sustratos como materia prima para la producción de biocombustibles puede provocar la elevación del su precio como alimentos, su utilización es controvertida (Tan *et al.*, 2008).

A pesar de que la producción de etanol a partir de estas materias primas (caña de azúcar y maíz) se realiza en gran escala, su costo sigue siendo mayor que el de los combustibles de petróleo debido a la enorme inversión que conlleva la producción de biomasa, ya que se debe destinar grandes áreas de terreno para plantación de materia prima y al no utilizarse la totalidad de esta, se siguen generando una gran cantidad de residuos en su producción (Tan *et al.*, 2008).

Ante esta situación, se propone como una alternativa el bioetanol de segunda generación, el cual es producido a partir de biomasa rica en lignocelulosa y que es no comestible como la madera, hojas y residuos agroindustriales, las cuales son de gran abundancia y muy baratas ya que en general son tratados como desechos sin ningún otro interés comercial (Tan *et al.*, 2008). A pesar de este panorama de ventajas que se presenta con el bioetanol de segunda generación, las tecnologías para su producción aún están en desarrollo, por lo que aún no es un combustible competitivo (Kumar *et al.*, 2008).

Además del aprovechamiento de residuos agroindustriales, la producción de bioetanol a partir de este tipo de materias primas (biomasa rica en lignocelulosa) permite reducir la concentración de dióxido de carbono en la atmósfera ya que al crecer las plantas, estas absorben el dióxido de carbono liberado en la combustión, y este será nuevamente utilizado para producir bioetanol convirtiendo todo el proceso en un ciclo en el cual no hay acumulación de dióxido de carbono en la atmósfera (Tan *et al.*, 2008).

La forma más común de utilizar el bioetanol es en una mezcla conocida como E85, esta mezcla contiene 85% de bioetanol y 15% de gasolina, sin embargo también es posible utilizarlo en mezclas con proporciones muy bajas de etanol como el E10 (10% de etanol) (Balat *et al.*, 2008).

La utilización de bioetanol mezclado con gasolina presenta diversas ventajas ya que al tener un mayor contenido de oxígeno (alrededor del 35%) permite que se lleve a cabo una mejor oxidación de los hidrocarburos de la gasolina lo que lleva a una combustión más limpia y eficiente reduciendo la emisión de partículas y de óxidos de nitrógeno. Al utilizarse en formas más concentradas como en E85 y en forma pura en motores de combustión interna, es un combustible más eficiente que la gasolina por tener un calor de vaporización mayor (Sánchez y Cardona, 2008). Sin embargo al utilizar estas mezclas con un mayor contenido de etanol se requiere realizar modificaciones en los motores de los automóviles, mientras que la utilización de E10 no requiere ninguna modificación o modificaciones muy simples (Demirbas, 2008).

La utilización de bioetanol como combustible también presenta algunas desventajas frente a la utilización de gasolina. Tiene una menor densidad energética y es corrosivo hacia algunas partes de los motores. También es miscible en agua, esto es un problema ya que al contener un poco de agua, su combustión deja de ser tan limpia y eficiente. Por último, el bioetanol tiene una presión de vapor menor que la de la gasolina por lo que la ignición de las máquinas a temperaturas muy bajas puede resultar difícil (Balat *et al.*, 2008).

## **Biomasa rica en lignocelulosa como materia prima para la producción de bioetanol**

“Lignocelulosa” es un término genérico que describe a los principales compuestos que constituyen a las plantas; celulosa, hemicelulosa y lignina. Esta materia prima se puede obtener de dos maneras, ya sea cultivando plantas especialmente para este propósito, o utilizando residuos agroindustriales ricos en este material (Knill y Kennedy, 2005). Al ser el principal constituyente de los tejidos vegetales es un material de gran abundancia, reproducible y económico, por lo que es considerada una de las materias primas más atractivas para la producción de bioetanol (Kumar *et al.*, 2008).

La celulosa, componente mayoritario de la lignocelulosa, es un homopolisacárido conformado exclusivamente por unidades de glucosa ( $\beta$ -D-glucopiranosidos) unidas por enlaces glucosídicos  $\beta$ -(1-4). La hemicelulosa, segundo compuesto en abundancia, es un polisacárido conformado por diferentes hexosas como glucosa, manosa, galactosa, y diferentes pentosas como xilosa y arabinosa (Balat *et al.*, 2008).

En la composición de la hemicelulosa, la xilosa es el azúcar predominante, aunque la arabinosa es un también un componente significativo. Su importancia como materia prima para la producción de bioetanol es que al ser ricos en estos dos polisacáridos (celulosa y hemicelulosa), es posible romper o despolimerizar estas cadenas (polisacáridos) y obtener los azúcares (monosacáridos) en forma monomérica para que finalmente sean convertidos en etanol a través de una fermentación con microorganismos (Balat y Balat, 2008).

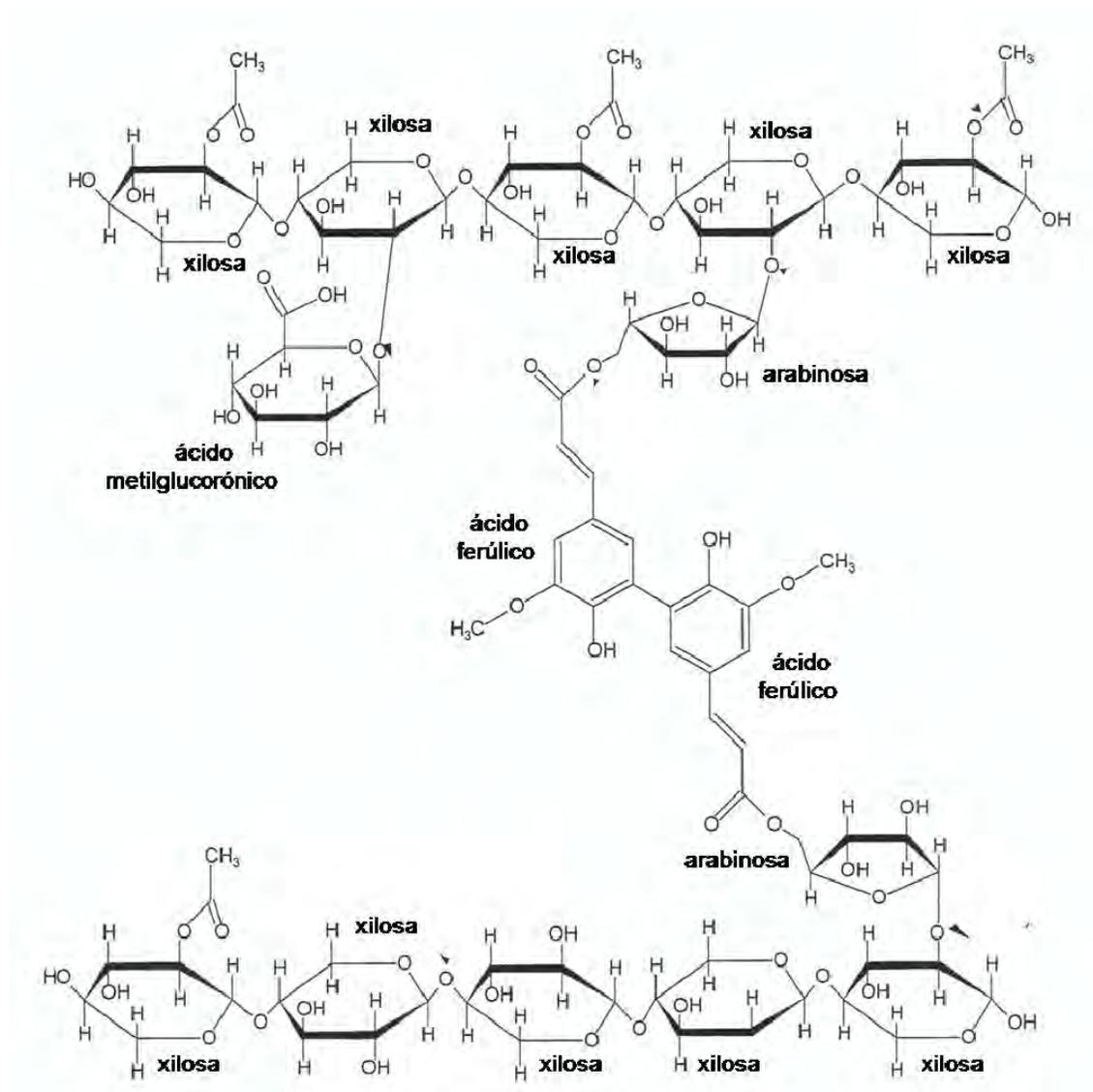


Figura 1. Estructura química de la hemicelulosa (modificado de Wyman et al, 2005).

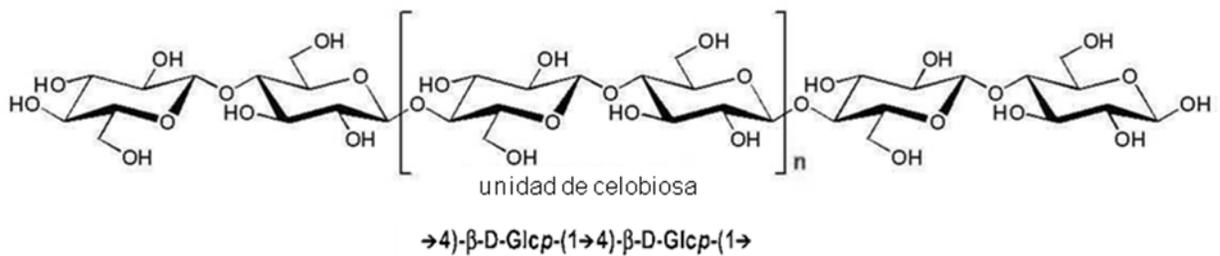
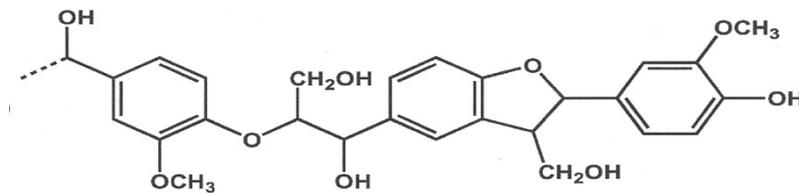


Figura 2. Estructura química de la celulosa (modificado de Knill y Kennedy, 2005)

El tercer compuesto en abundancia en la lignocelulosa es la lignina. Esta es un polímero de unidades aromáticas sustituidas que usualmente está ligada a las fibras de celulosa formando un complejo. Estos complejos, así como las ligninas solas son importantes ya que le dan a las plantas la característica de resistencia a los ataques microbianos y a los agentes químicos. La lignina no tiene ningún interés en el proceso de producción de bioetanol por lo que es un subproducto que puede utilizarse en la generación de electricidad (Balat y Balat, 2008).



*Figura 3. Estructura química de la lignina (Knill y Kennedy, 2005)*

La forma en que estos tres compuestos se acomodan dentro de la lignocelulosa es en forma de una matriz en la que la celulosa actúa como esqueleto principal proporcionando la rigidez del material, mientras que la hemicelulosa constituye las ramificaciones de este esqueleto. La función de la lignina es la de realizar la unión entre estas cadenas (Olsson y Hahn-Hägerdal, 2005).

La lignocelulosa se puede obtener de diversas plantas. Debido a esto, la composición de ésta dependerá del tipo de planta que provenga, así como de la edad y las condiciones de crecimiento de dicha planta. La composición promedio de la lignocelulosa en peso seco es del 40-45% de celulosa, 20-30% de hemicelulosa y 15-25% de lignina (Olsson y Hahn-Hägerdal, 2005).

La conversión de lignocelulosa en bioetanol se lleva a cabo en tres etapas. En la primera se realiza la hidrólisis o despolimerización de los polisacáridos de la lignocelulosa (celulosa y hemicelulosa) obteniendo monosacáridos (principalmente glucosa y xilosa). En la segunda etapa estos azúcares obtenidos de la hidrólisis son convertidos en etanol mediante su fermentación con microorganismos. Finalmente en la tercer etapa se realiza la recuperación y la purificación del etanol producido (Balat y Balat, 2008).

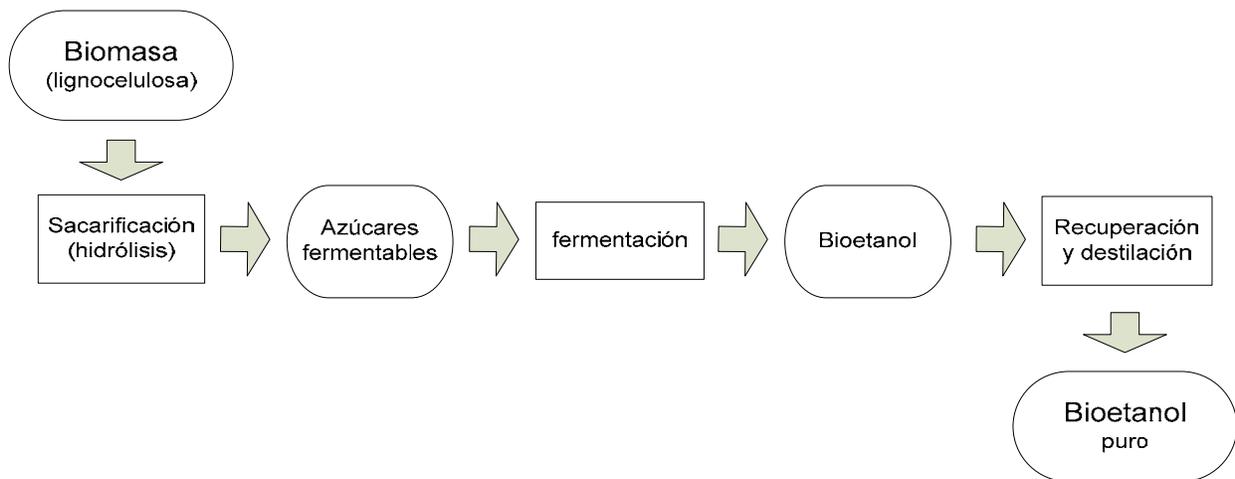


Figura 4. Etapas de la conversión de biomasa en bioetanol (Tan et al., 2008)

### Hojas de agave como fuente de lignocelulosa para la producción de bioetanol

El *Agave tequilana* Weber azul es la materia prima para la producción de tequila. Es una especie cultivada en México, en donde tiene una gran importancia económica por ser la única especie apropiada para la producción de tequila. Pertenece a la familia *Agavaceae* y por su metabolismo se adapta fácilmente a climas áridos y semiáridos. (Iñiguez et al., 2001).

Las hojas de agave provenientes de la producción de tequila, son uno de los residuos agroindustriales que se producen en mayor cantidad en México (González *et al.*, 2005). Estas son dejadas en el campo después de cosechar las cabezas del agave para la producción del tequila. En el año 2008 el total de agaves jimados fue de 1900 kTon y se produjo un total de 874 kTon de hojas de agave (Iñiguez *et al.*, 2001).

Debido a los grandes volúmenes de hojas de agave que son producidos, su disposición se ha convertido en un problema ambiental y económico por lo que es importante el trabajo de investigación acerca de la utilización de este residuo. También se ha propuesto utilizar estos residuos como alimento animal o como materia prima para la elaboración de papel (Iñiguez *et al.*, 2001).

Las hojas de agave están compuestas, en promedio, del 64.8% (bs) de celulosa, el 5.10% (bs) de hemicelulosa y el 15.9% (bs) de lignina. Esta composición puede variar dependiendo de la zona en la que el agave sea cultivado, se ha demostrado que la composición del agave depende de varios factores como la temperatura de cultivo, la humedad y la cantidad de lluvia anual (Iñiguez *et al.*, 2001).

## **Conversión de la lignocelulosa en bioetanol**

### ***Sacarificación de la lignocelulosa por hidrólisis con ácido***

La hidrólisis con ácido o hidrólisis ácida es la tecnología más utilizada y estudiada para la conversión de lignocelulosa en etanol. Existen dos tipos principales de hidrólisis ácida, la hidrólisis con ácidos diluidos (utilizando ácido en concentraciones muy bajas) y la hidrólisis con ácidos concentrados (utilizando ácido en concentraciones altas) (Balat y Balat, 2008).

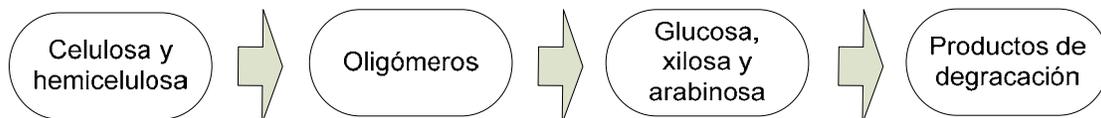
El tratamiento de hidrólisis con ácidos diluidos ha sido desarrollado con éxito, utilizando principalmente ácido sulfúrico debido a su bajo costo y a que es menos corrosivo comparado con el ácido clorhídrico. Utilizando soluciones de ácido sulfúrico en concentraciones de alrededor del 1% y temperaturas de alrededor de 200 °C es posible obtener rendimientos de glucosa del 55 al 60% del valor teórico a partir de diferentes materiales lignocelulósicos. A pesar de esto, debido a las temperaturas elevadas las pentosas provenientes de las hemicelulosas así como algunas hexosas son degradadas rápidamente, esto es una desventaja por dos razones, la primera es la disminución en la cantidad de azúcares fermentables y por lo tanto de etanol producido, y la segunda es la formación de compuestos de degradación de los azúcares que son potenciales inhibidores de la fermentación (Olsson y Hahn-Hägerdal, 2005).

Para disminuir la degradación que sufren los azúcares, la hidrólisis con ácido diluido se puede realizar en dos etapas. En la primera se hidrolizan las cadenas de hemicelulosa en condiciones menos severas, entre 170 y 190 °C, y concentraciones de ácido de 0.5 a 1.2% (p/p). Entonces los sólidos remanentes son separados e hidrolizados en un segundo paso en condiciones un poco más fuertes con temperaturas de 200°C a 230 °C y concentraciones de ácido cercanas al 2.5%. Al haber finalizado las dos etapas de la hidrólisis se pueden tener rendimientos del 50 al 60% de glucosa y alrededor del 90% de los azúcares de la hemicelulosa (Olsson y Hahn-Hägerdal, 2005).

Este tratamiento se basa en numerosos estudios en donde se ha encontrado que la hidrólisis ácida de la lignocelulosa en condiciones moderadas produce principalmente xilosa a partir del xilano dejando la celulosa y la lignina prácticamente sin alteraciones, esto es porque el xilano es más susceptible a la hidrólisis ácida en condiciones suaves (ácido diluido y temperaturas moderadas) debido a su estructura amorfa comparada con la celulosa, la cual necesita tratamientos más severos por su naturaleza cristalina (Balat y Balat, 2008).

En la hidrólisis con ácidos concentrados se obtiene una conversión rápida de los azúcares provenientes de la celulosa y la hemicelulosa con muy poca degradación. Este proceso se realiza a temperaturas menores que el proceso con ácidos diluidos pero utiliza tiempos de reacción más largos. Se utilizan concentraciones de ácido de alrededor del 70 % y temperaturas cercanas a los 50 °C durante 2 a 4 horas (Balat y Balat, 2008). La principal ventaja de este proceso es la posibilidad de obtener rendimientos de azúcares más altos, sin embargo, este proceso tiene varias limitantes como la necesidad de realizar la recuperación del ácido utilizado lo cual es un paso muy caro y altamente demandante de energía, además debido a la naturaleza corrosiva de los ácidos se necesitan aleaciones caras para la construcción de los tanques y los intercambiadores de calor. Estas complicaciones han sido el principal obstáculo para que este proceso pueda ser económicamente realizable y debido a esto se ha perdido un poco el interés en este proceso aunque muchas compañías aún intentan implementarlo en el presente (Olsson y Hahn-Hägerdal, 2005).

Durante la hidrólisis ácida de la celulosa las moléculas de glucosa son liberadas cuando un ión  $H^+$  se integra en el enlace glucosídico de la cadena de celulosa llevando a una ruptura de este enlace mientras una molécula de agua se integra para liberar una glucosa y un ión  $H^+$ . Los oligómeros residuales liberados son hidrolizados posteriormente mediante el mismo mecanismo hasta obtener únicamente moléculas de glucosa. Las regiones amorfas de la celulosa se hidrolizan más rápidamente que las regiones cristalinas, por esto se necesitan condiciones de hidrólisis más severas. Bajo estas condiciones, algunas moléculas de glucosa también son degradadas y forman productos como el hidroximetil furfural, ácido levulínico, ácido fórmico y ácido acético (Wyman *et al.*, 2005).



*Figura 5. Etapas de la hidrólisis de la celulosa y la hemicelulosa*

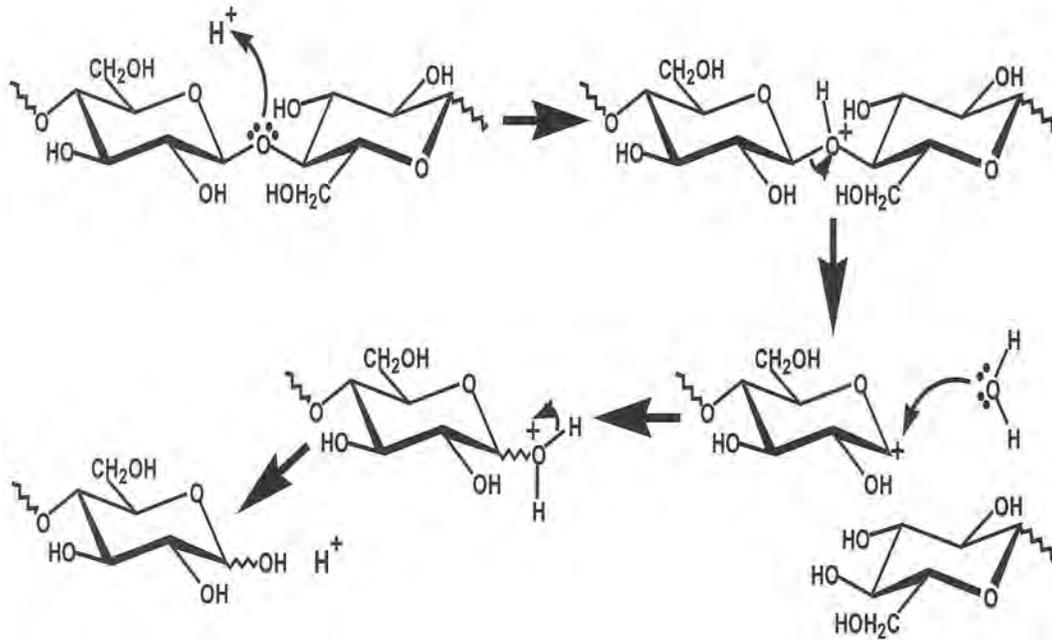


Figura 6. Mecanismos de la hidrólisis ácida de los polisacáridos (Knill y Kennedy, 2005)

La hidrólisis ácida de la hemicelulosa es, en términos simples, similar a la hidrólisis de la celulosa. Sin embargo al tener la hemicelulosa una estructura amorfa, permite que su hidrólisis pueda realizarse en condiciones más suaves (temperatura y concentración de ácido) para liberar a los azúcares que la conforman (Wyman *et al.*, 2005).

En la actualidad el objetivo principal en el estudio de la hidrólisis ácida como tratamiento de la lignocelulosa para la producción de etanol es el de obtener los rendimientos de azúcares más altos y al mismo tiempo minimizar la degradación de estos azúcares durante la hidrólisis para lograr que la hidrólisis ácida pueda ser un tratamiento económicamente viable para su aplicación industrial (Balat y Balat, 2008).

## ***Prehidrólisis de la lignocelulosa***

La primera etapa de la hidrólisis enzimática de la lignocelulosa consiste en la reducción de tamaño del material que se desea hidrolizar, así como de un pretratamiento cuyo objetivo es alterar o remover cualquier componente estructural que dificulte el trabajo de las enzimas y por lo tanto facilitar el ataque de éstas a las cadenas de celulosa y hemicelulosa durante la hidrólisis enzimática. Además de esto, el pretratamiento permite incrementar el área superficial de la celulosa, modificando su cristalinidad y haciéndola más accesible a las enzimas (Olsson y Hahn-Hägerdal, 2005).

El pretratamiento es considerado una etapa determinante para una conversión de lignocelulosa en etanol exitosa ya que un pretratamiento adecuado permitirá mejorar el rendimiento de la hidrólisis, disminuir la degradación de los azúcares obtenidos, evitar la formación de productos inhibidores de la fermentación y por último reducir costos (Balat y Balat, 2008).

Diferentes tipos de pretratamiento han sido propuestos incluyendo tratamientos físicos, fisicoquímicos, químicos y biológicos. De estos tratamientos sobresalen algunos como la prehidrólisis ácida, la prehidrólisis alcalina y la explosión de vapor (Balat y Balat, 2008).

La prehidrólisis de la lignocelulosa con ácido, por lo explicado en el capítulo anterior, funciona también como un pretratamiento para la hidrólisis enzimática ya que en condiciones moderadas (170-190°C, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>0.5-1.2%) es posible recuperar los azúcares obtenidos de la hidrólisis de la hemicelulosa además de los azúcares que se obtengan posteriormente en la hidrólisis enzimática de la celulosa (Balat y Balat, 2008).

Es posible utilizar altas temperaturas (entre 200 y 230 °C) lo cual ayuda a incrementar la digestibilidad de la celulosa aunque se puede tener pérdida de los azúcares generados por su degradación. En general los tratamientos de prehidrólisis

con ácido permiten obtener rendimientos mayores de azúcares a partir de materiales lignocelulósicos (Balat y Balat, 2008).

Una alternativa a la prehidrólisis con ácido es realizar un tratamiento térmico solamente con agua. La mayor ventaja de usar este tratamiento, comparado con el tratamiento con ácido, es que la degradación de los azúcares es mucho menor (Dien *et al.*, 2006).

La explosión de vapor es otro pretratamiento considerado muy atractivo y ha sido aplicado exitosamente a diferentes tipos de materiales lignocelulósicos. Este tratamiento consiste en someter el material lignocelulósico a altas presiones y temperaturas entre 160 y 250°C durante tiempos cortos desde segundos hasta minutos, enseguida de esto la presión se libera y el material explota por la descompresión. Las altas temperaturas promueven la formación de ácidos orgánicos a partir de grupos acetilo presentes en el material y estos ácidos realizan una hidrólisis del material. El resultado de este tratamiento es la hidrólisis parcial de la hemicelulosa y la redistribución de la lignina en la celulosa lo cual aumenta su digestibilidad. Sin embargo, las altas temperaturas utilizadas promueven la degradación de azúcares por lo cual es importante conocer el material lignocelulósico que se desea degradar y con base en esto establecer los parámetros del proceso (Olsson y Hahn-Hägerdal, 2005).

A pesar de que la explosión de vapor ha sido utilizada exitosamente para pretratar maderas duras y residuos agrícolas como la paja, los resultados de este pretratamiento en las maderas suaves no es considerado muy efectivo. Para aumentar la efectividad de la explosión de vapor como pretratamiento para las maderas suaves se utilizan catalizadores como ácido sulfúrico o dióxido de azufre en concentraciones de 0.5-6% (p/p). Esto permite incrementar la digestibilidad de la celulosa, favorecer la hidrólisis de la hemicelulosa y disminuir la degradación de los azúcares. Los rendimientos de azúcares con este pretratamiento llegan a ser de 65-80% (Olsson y Hahn-Hägerdal, 2005).

También se pueden utilizar otros catalizadores como el amoníaco, Se ha encontrado que al calentar la lignocelulosa impregnada de amoníaco líquido en una proporción de 1-2kg de amoníaco por kilogramo de biomasa, y calentando entre 50-90°C alrededor de 30 minutos entre 1 y 2 atm, se logra la descristalización de la celulosa sin remover la lignina presente ni hidrolizar importantemente la hemicelulosa. Este pretratamiento se ha encontrado efectivo en materiales con bajo contenido de lignina y no es muy efectivo en el caso opuesto. La ventaja de este método es la baja degradación de azúcares, sin embargo el costo del amoníaco y la necesidad de su recuperación son una desventaja para este pretratamiento (Olsson y Hahn-Hägerdal, 2005).

Después de realizar la explosión de vapor se obtiene un residuo insoluble el cual es principalmente celulosa y lignina. Las ligninas forman una barrera que evita que las enzimas tengan acceso a la celulosa, además disminuye la acción de las enzimas mediante su adsorción por interacciones no específicas e irreversibles, por lo que se investiga la posibilidad de remover estas ligninas en un tratamiento adicional entre la explosión de vapor y la hidrólisis enzimática (Olsson y Hahn-Hägerdal, 2005).

Finalmente está la prehidrólisis alcalina la cual es un pretratamiento en el que se utilizan temperaturas y presiones más bajas que en la prehidrólisis con ácido y la explosión de vapor, incluso pueden llevarse a cabo en condiciones ambientales aunque requiere de tiempos de reacción más prolongados, desde horas hasta días. Una limitación de este pretratamiento es que la base utilizada se convierte en sales que son irre recuperables (Balat y Balat, 2008).

La característica del pretratamiento alcalino es que puede remover la mayoría de la lignina sin tener ningún efecto negativo importante en la celulosa y la hemicelulosa, incrementando el área superficial interna de la celulosa y disminuyendo su cristalinidad (Balat y Balat, 2008).

## ***Sacarificación de la lignocelulosa con enzimas (hidrólisis enzimática)***

La hidrólisis con enzimas es una alternativa para realizar la sacarificación de la lignocelulosa, en general es un proceso lento ya que el trabajo de las enzimas está limitado por diversas características del sustrato como el contenido de hemicelulosa y lignina, el área superficial y la cristalinidad de la celulosa. Se considera esencial realizar un buen pretratamiento o prehidrólisis del material lignocelulósico ya que sin éste, los rendimientos de hidrólisis son muy bajos (alrededor del 20%) (Balat *et al.*, 2008).

El costo de los procesos enzimáticos de hidrólisis es menor, comparado con los procesos que involucran tratamientos ácidos o alcalinos, ya que se llevan a cabo a temperaturas alrededor de los 50 °C y a pH alrededor de 5 sin tener el problema de utilizar reactivos corrosivos. También produce rendimientos de hidrólisis más altos. Sin embargo tienen la desventaja de que el costo de los complejos enzimáticos es muy alto, sin embargo, se espera que su costo sea cada vez menor y así lograr que estos procesos sean económicamente factibles (Balat y Balat, 2008).

Diversos parámetros influyen en la conversión enzimática de la lignocelulosa, parámetros físicos como el pH, la temperatura, la adsorción, parámetros químicos como el nitrógeno, el fósforo, y la presencia de compuestos fenólicos y otros compuestos que pueden tener un efecto inhibitorio hacia las enzimas (Kumar *et al.*, 2008), y finalmente parámetros estructurales del sustrato lignocelulósico que se está hidrolizando, dichos parámetros son el contenido de lignina y hemicelulosa, el área superficial y la cristalinidad de la celulosa (Balat y Balat, 2008).

Un elemento importante en la hidrólisis enzimática de los polisacáridos es la cantidad de lignina presente. Según el mecanismo de ataque de las enzimas, éstas se unen al sustrato por adsorción formando un complejo enzima-sustrato. Se ha demostrado que las enzimas celulasas también se unen permanentemente a la lignina formando complejos enzima-lignina, lo cual reduce la cantidad de enzima disponible para actuar en la celulosa. (Wyman *et al.*, 2005).

La conversión de celulosa en glucosas es llevada a cabo por tres grupos de enzimas; endoglucanasas, celobiohidrolasas (exoglucanasas) y  $\beta$ -glucosidasas. Las endoglucanasas catalizan la ruptura de los enlaces internos de la cadena de celulosa al azar, mientras que las celobiohidrolasas catalizan la ruptura de enlaces a partir de los extremos de la cadena. Las  $\beta$ -glucosidasas solo utilizan como sustrato celooligosacáridos y celobiosas para liberar monómeros de glucosa (Kumar *et al.*, 2008).

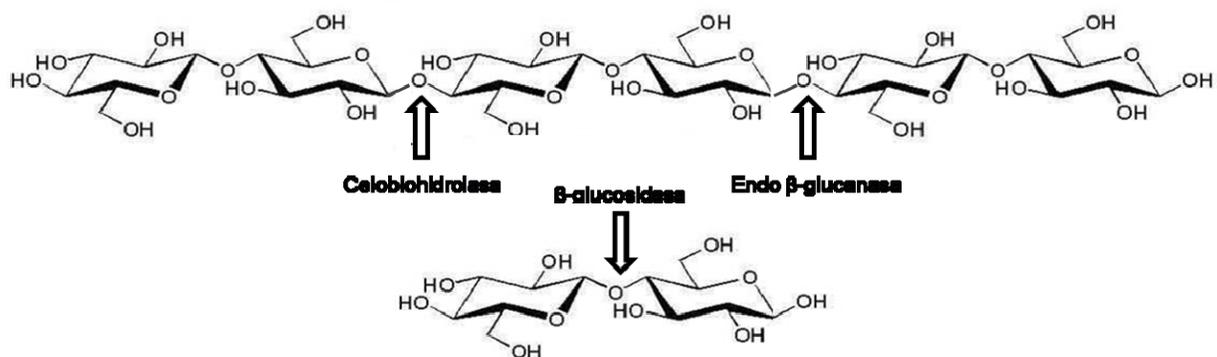


Figura 7. Hidrólisis enzimática de la celulosa (modificado de Wyman *et al.*, 2005).

La complejidad de la estructura de la hemicelulosa hace de la hidrólisis enzimática un proceso de mayor complejidad comparado con el de la celulosa, requiriendo un mayor grado de coordinación entre las enzimas involucradas. Una gran mayoría de los trabajos de investigación sobre hemicelulasas se enfocan en la acción de las xilanasas ya que el xilano, debido a la complejidad estructural, es más complicado que otros polisacáridos de las plantas (Wyman *et al.*, 2005).

Las principales enzimas que participan en la degradación del xilano son la endo-1,4- $\beta$ -xilanasas,  $\beta$ -xilosidasa,  $\alpha$ -glucoronidasa,  $\alpha$ -L-arabinofuranosidasa y acetil-xilano esterasa. Los principales productos obtenidos con la acción de estas enzimas son xilobiosa, xilotriosa, y residuos de 2-4 xilosil sustituidos (Wyman *et al.*, 2005).

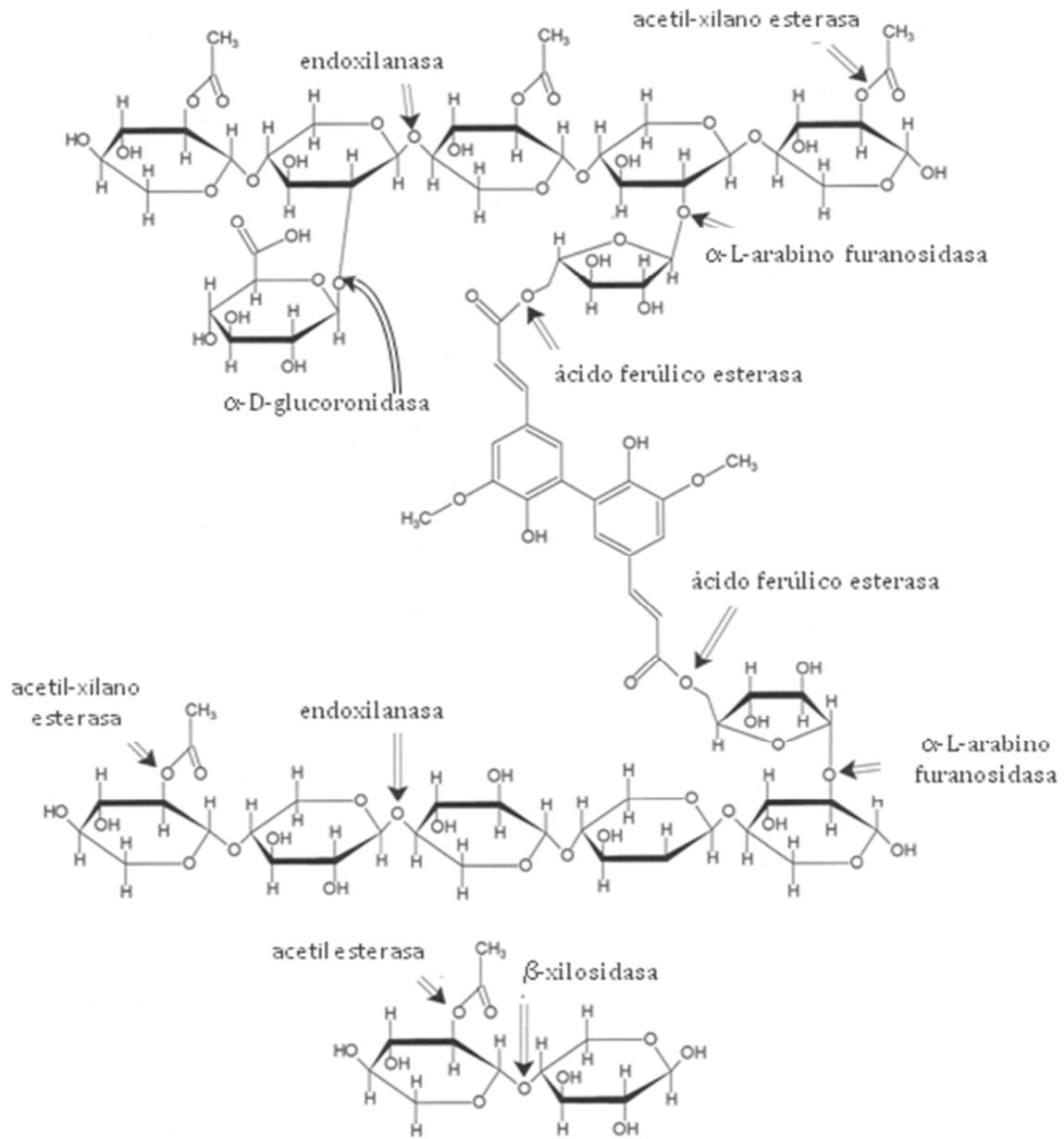


Figura 8. Hidrólisis enzimática de la hemicelulosa (modificado de Wyman *et al.*, 2005).

En la degradación de los glucomananos y los galactomananos están involucradas las enzimas β-manasa y la β-manosidasa, y los productos principales de su acción son la manobiosa, la manotriosa y varios oligosacáridos (Wyman *et al.*, 2005).

## Fermentación de hidrolizados de lignocelulosa

Una vez que se han obtenido azúcares a partir de la hidrólisis del material lignocelulósico se lleva a cabo la fermentación de estos azúcares. La fermentación es un proceso biológico en el cual los azúcares son convertidos en etanol por la acción de microorganismos principalmente levaduras (Demirbas, 2008).

Debido a que los hidrolizados de lignocelulosa contienen no solamente la glucosa proveniente de la celulosa, sino también una mezcla de varios monosacáridos como xilosa, manosa, galactosa, arabinosa o algunos oligosacáridos provenientes de la hemicelulosa, de los cuales la xilosa es el más abundante, es importante que en la fermentación estos azúcares también sean convertidos en etanol para incrementar la eficiencia del proceso de conversión de lignocelulosa en etanol (Balat y Balat, 2008).

Al tener una mezcla de azúcares en los hidrolizados de lignocelulosa en los cuales la glucosa y la xilosa son los azúcares más abundantes, se requiere un microorganismo capaz de fermentar ambos azúcares o utilizar un cultivo mixto en el que una levadura fermentadora de glucosa se cultive junto a una levadura fermentadora de xilosa (Taniguchi *et al.*, 1997).

*Pichia stipitis* es una de las levaduras que mejor fermenta la xilosa, sin embargo su tasa de fermentación de glucosa es menor que la de los microorganismos fermentadores de glucosa como *Saccharomyces cerevisiae* y *Zymomonas mobilis*. Además se ha encontrado que el desempeño durante la fermentación de las levaduras fermentadoras de xilosa depende significativamente del nivel de oxigenación del medio de cultivo. Por lo tanto se puede considerar el nivel de oxígeno un parámetro importante para la obtención de un buen rendimiento de etanol a partir de una mezcla de glucosa y xilosa con un cultivo mixto de *Saccharomyces cerevisiae* y *Pichia stipitis* (Taniguchi *et al.*, 1997).

Durante la fermentación, la glucosa es metabolizada a través de la glucólisis donde una molécula de glucosa es metabolizada para producir dos moléculas de piruvato. En condiciones anaeróbicas el piruvato se reduce a etanol mientras se libera  $\text{CO}_2$ . El rendimiento teórico de etanol es de 0.511 y el de  $\text{CO}_2$  de 0.489 según la estequiometría de la reacción  $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 \longrightarrow 2\text{C}_2\text{H}_5\text{OH} + 2\text{CO}_2$  (Bai *et al.*, 2008).

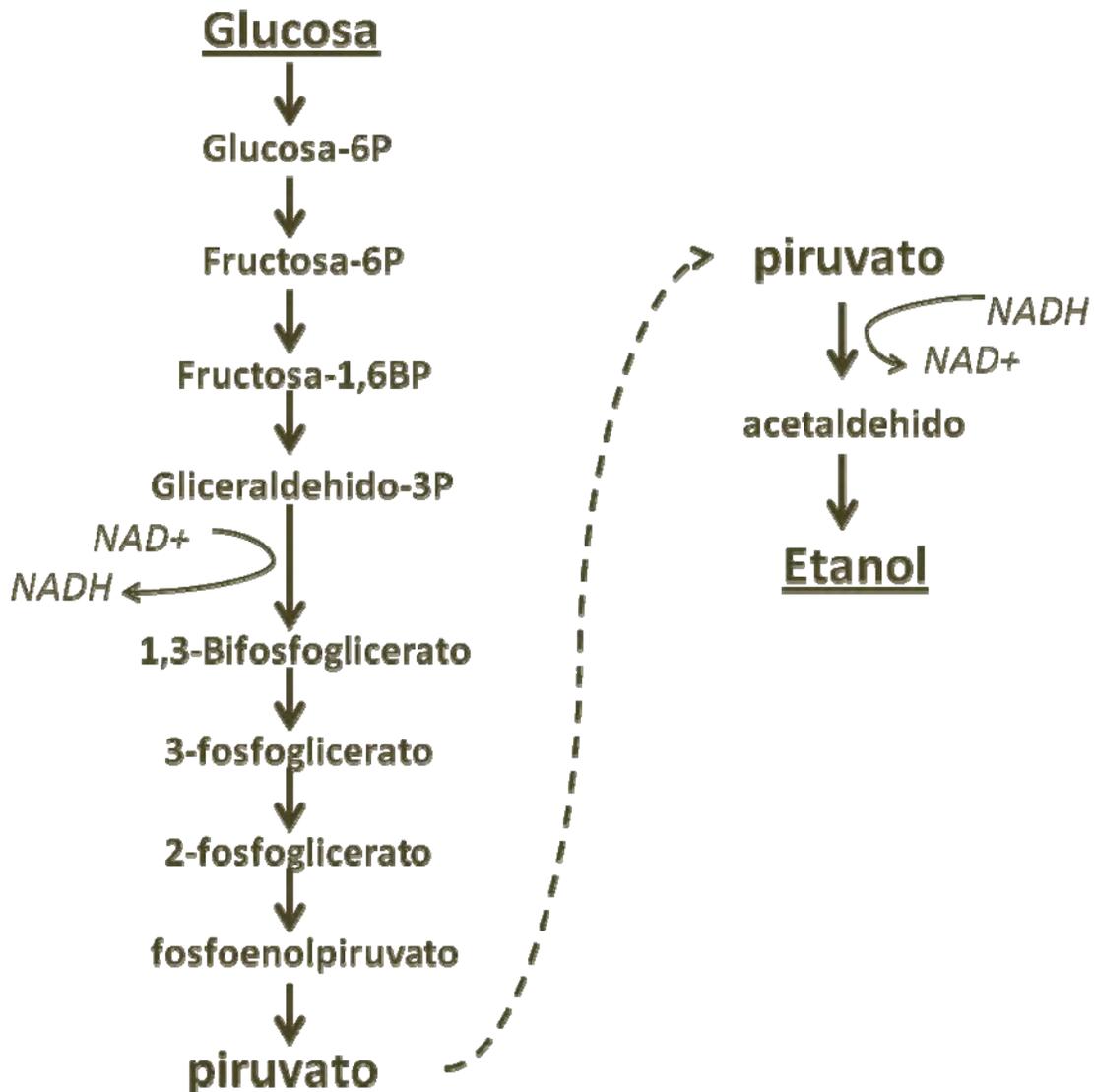


Figura 9. Ruta para el metabolismo de la glucosa (modificado de Hahn-Hägerdal *et al.*, 1994)

*Saccharomyces cerevisiae* es uno de los microorganismos que mejor fermentan la glucosa y es una de las levaduras más efectivas para producir bioetanol, ya que su utilización tiene ciertas ventajas como su alta productividad de etanol a partir de hexosas y su alta tolerancia al etanol y a otros compuestos inhibidores que se forman durante la hidrólisis ácida de la lignocelulosa. Sin embargo las cepas silvestres de esta levadura no pueden utilizar pentosas, como la xilosa y la arabinosa, ni oligosacáridos provenientes de la celulosa, lo cual es una desventaja en la fermentación de los hidrolizados de lignocelulosa. Existen cepas de *Saccharomyces cerevisiae* capaces de fermentar la xilosa pero se requiere de modificaciones genéticas en su metabolismo para incrementar su consumo de xilosa y obtener altos rendimientos de etanol (Balat y Balat, 2008).

Entre las levaduras fermentadoras de xilosa *Pichia stipitis* es una de las más estudiadas para fines de aplicación industrial, ya que se ha encontrado que fermenta la xilosa rápidamente con rendimientos altos de etanol. Además no tiene ningún requerimiento de vitaminas para fermentar este azúcar y es capaz de fermentar otros azúcares incluyendo la celobiosa (Nigam, 2001). La estequiometría de la reacción es  $3C_5H_{10}O_5 \longrightarrow 5C_2H_5OH + 5CO_2$ , en base a esta el rendimiento teórico de etanol es de 0.511 y el de  $CO_2$  de 0.489 (Bai *et al.*, 2008).

Esta levadura metaboliza la xilosa mediante la conversión de la xilosa en xilitol utilizando la enzima xilosa reductasa, seguido de la conversión del xilitol en xilulosa utilizando la enzima xilitol deshidrogenasa. Otras levaduras capaces de metabolizar la xilosa son *Candida sheatae* y *Candida parapsilosis* y lo hacen utilizando esta misma vía (Balat y Balat, 2008).

A pesar de que estas levaduras tienen la capacidad de metabolizar la xilosa, su tasa de producción de etanol a partir de glucosa es al menos cinco veces menor que la de *Saccharomyces cerevisiae*, además, su cultivo requiere de oxígeno y su tolerancia al etanol es de 2 a 4 veces menor que para *Saccharomyces cerevisiae* (Sánchez y Cardona, 2008).

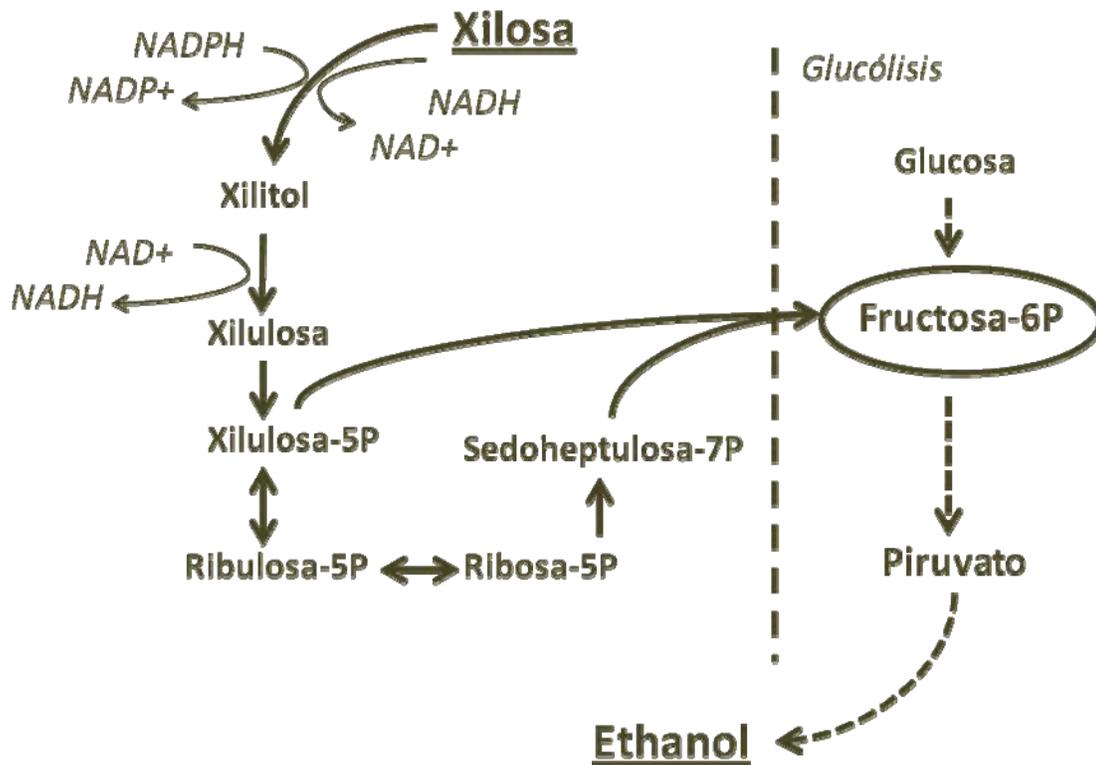


Figura 10. Ruta de metabolismo de la xilosa (modificado de Hahn-Hägerdal et al, 1994)

Otros microorganismos estudiados para la producción de etanol, son *Escherichia coli*, *Klebsiella oxytoca* y *Zymomonas mobilis*, de estos *Zymomonas mobilis* es el más estudiado ya que se considera que posee algunas características que lo harían un microorganismo fermentador superior a *S.cerevisiae*, debido a que en una fermentación *Z. mobilis* produce menos biomasa y destina una mayor cantidad de carbono para producir etanol. El inconveniente de *Z. mobilis* es que, al igual que *Saccharomyces cerevisiae*, no puede fermentar la xilosa (Bai et al., 2008).

Durante la fermentación, además de producir etanol y  $CO_2$ , se producen otros subproductos como el glicerol que se produce en niveles de 1% (w/v), ácidos orgánicos y alcoholes superiores. La producción de estos subproductos, así como la producción de células nuevas y la acumulación de etanol en el medio provocan que la levadura pueda sufrir estrés. Otro tipo de estrés puede ser provocado por la deficiencia de nutrientes, alta temperatura y por contaminación del medio producida por compuestos

provenientes de la degradación de los azúcares durante la hidrólisis de la lignocelulosa. Todos estos factores pueden tener como efecto la disminución en el rendimiento del etanol producido (Bai *et al.*, 2008).

En el caso de los hidrolizados de agave, una fermentación eficiente depende de la cantidad de estos compuestos presentes en los hidrolizados la cual a su vez, depende del material hidrolizado y del método de hidrólisis, ya que existe una gran variedad de compuestos tóxicos generados durante la hidrólisis de los materiales lignocelulósicos. Estos compuestos inhibidores se pueden clasificar en tres grupos: ácidos débiles, derivados del furano y compuestos fenólicos (Palmqvist y Hahn-Hägerdal, 2000).

Por lo tanto un factor importante que se debe considerar es el microorganismo seleccionado para realizar la fermentación, ya que cada microorganismo presentará una tolerancia diferente a cada compuesto inhibidor (Palmqvist y Hahn-Hägerdal, 2000). Los diferentes compuestos inhibidores encontrados en los hidrolizados de materiales lignocelulósicos se pueden agrupar dependiendo de su origen. Un primer grupo incluye compuestos liberados durante la hidrólisis y los pretratamientos, compuestos tales como el ácido acético, terpenos, alcoholes y compuesto aromáticos como los taninos (Olsson y Hahn-Hägerdal, 1996).

Un segundo grupo de compuestos inhibidores incluye compuestos producidos durante la hidrólisis debido a la degradación de los azúcares, compuesto como el furfural, hidroximetil furfural, ácido levulínico, ácido fórmico, entre otros (Olsson y Hahn-Hägerdal, 1996). Un tercer grupo incluye a los compuestos producidos por la degradación de la lignina, en este grupo están incluidos una gran variedad de compuestos poliaromáticos (Olsson y Hahn-Hägerdal, 1996). Finalmente están los compuestos inhibidores producidos durante el proceso de fermentación como el etanol, el ácido acético, el glicerol y el ácido láctico (Olsson y Hahn-Hägerdal, 1996).

De todos estos compuestos se considera que aquellos con un efecto inhibitorio más importante son el ácido acético y los productos de la degradación de la lignina (Olsson y Hahn-Hägerdal, 1996).

El ácido acético se forma a partir de la hidrólisis de los monosacáridos liberados durante la hidrólisis de la porción hemicelulósica de la lignocelulosa. Su efecto inhibitorio es dependiente del pH del medio, en el pH óptimo para la fermentación con levaduras (pH 4 – 5) el ácido acético se encuentra en su forma no disociada. Esta condición le permite penetrar la membrana celular y llegar al citoplasma celular donde se disocia, al tener el citoplasma un pH mayor, resultando en una disminución del pH intracelular lo cual trae como resultado que el gradiente de protones de la membrana no se pueda mantener y como resultado ocurre un desacoplamiento entre la producción de energía y los sistemas de transporte que dependen del gradiente de protones (Hahn-Hägerdal *et al.*, 1994).

Para reducir el efecto negativo que tienen estos compuestos en la fermentación se han propuesto diversos tratamientos que permiten reducir la concentración de estos compuestos inhibidores e incrementar la fermentabilidad de estos hidrolizados. Dentro de los métodos propuestos existen métodos biológicos, como tratamientos con enzimas o tratamientos con hongos como *Trichoderma reesei* con los cuales se remueven diversos compuestos inhibidores (Palmqvist y Hahn-Hägerdal, 2000).

También existen métodos físicos como la extracción de los compuestos inhibidores con solventes orgánicos, y métodos químicos como la adición de bases para incrementar el pH seguido de la adición de un ácido para reajustar el pH original permitiendo en el proceso la precipitación de los compuestos tóxicos (Palmqvist y Hahn-Hägerdal, 2000).

## Tolerancia de las levaduras al etanol

Cuando las células están expuestas al etanol responden ajustando su metabolismo. No solamente se inhibe el crecimiento de las células y la producción de etanol, sino también se produce en la célula un estado de inestabilidad por la respuesta tardía de las células de levadura a la inhibición al etanol. Los mecanismos de la inhibición por etanol aún no son muy claros en muchos aspectos, especialmente a nivel genético (Bai *et al.*, 2008).

A pesar de que existen muchas discrepancias entre los diferentes estudios realizados acerca de la inhibición por etanol, es comúnmente aceptado que las membranas de algunos organelos y de las células mismas son el principal sitio de ataque del etanol. Los ácidos grasos, especialmente los insaturados como los ácidos oleico y palmitoleico, son componentes esenciales de la membrana y contrarrestan la inhibición por etanol incrementando la fluidez de la membrana en compensación de la pérdida de fluidez provocada por el etanol (Bai *et al.*, 2008).

La inhibición del crecimiento de las levaduras varía con la concentración del etanol y la temperatura, mientras que la temperatura disminuye, aumenta la tolerancia al etanol. La mayoría de los microorganismos no pueden tolerar concentraciones de etanol superiores a los 100 g/L (Balat y Balat, 2009). Para *Pichia stipitis*, la concentración máxima antes de que ocurra una inhibición total en su crecimiento es de 65 g/L a 25°C, mientras que algunas cepas de *Saccharomyces cerevisiae*, como en la del sake, a concentraciones de etanol de 120 g/L la actividad celular aún no se ha inhibido por completo (Hahn-Hägerdal *et al.*, 1994).

Se ha sugerido que el efecto inhibitorio del etanol se debe a una acumulación de acetaldehído y acetato, a cambios en la membrana celular, y al efecto osmótico del etanol en la célula (Hahn-Hägerdal *et al.*, 1994).

A concentraciones de acetaldehído superiores a 0.5 mM se inhiben las funciones celulares debido a la reacción de este con grupos amino. Ya que el etanol es producido y reasimilado durante la fermentación de la xilosa, el efecto inhibitorio está relacionado con el efecto del acetaldehído (Hahn-Hägerdal *et al.*, 1994).

Durante la oxidación del etanol se forman NADH y acetaldehído lo que conduce a un desbalance redox. La vía más común es por la cual la enzima aldehído deshidrogenasa convierte el acetaldehído en acetato mientras que reduce el NAD<sup>+</sup>. El acetato es acumulado, excretado o puede ser oxidado a través del ciclo de los ácidos tricarboxílicos (Hahn-Hägerdal *et al.*, 1994).

El etanol también tiene efecto en la funcionalidad de la membrana, éste se asocia a la fase polar por lo que repele agua de las membranas. Este efecto depende en gran medida de la composición del medio (Hahn-Hägerdal *et al.*, 1994).

El curso de este trabajo de investigación está dirigido hacia la evaluación del potencial de las hojas de agave, un residuo agroindustrial importante en México, para ser utilizado como materia prima para la producción de bioetanol. Partiendo de las tecnologías de hidrólisis utilizadas en diferentes sustratos lignocelulósicos, es posible valorar su aplicación para ser adaptadas en base a las características de las hojas de agave en particular. Asimismo, es importante trabajar en la búsqueda de microorganismos que además de fermentar la glucosa, tengan la capacidad de convertir eficientemente la xilosa en etanol, y que puedan adaptarse a las condiciones de fermentación en los hidrolizados de lignocelulosa.

## OBJETIVOS

### Objetivo General

Evaluar el potencial de las hojas de *Agave tequilana* Weber para ser utilizadas como materia prima para la producción de bioetanol

### Objetivos particulares

Evaluar el rendimiento de azúcares fermentables obtenidos a partir de la hidrólisis de las hojas de agave realizada por dos métodos de hidrólisis distintos; hidrólisis ácida e hidrólisis enzimática.

Determinar el rendimiento de etanol obtenido al fermentar los hidrolizados de las hojas de agave con un cultivo mixto de *Saccharomyces cerevisiae* y *Pichia stipitis*.

Comparar el rendimiento de etanol obtenido a partir de la fermentación de los hidrolizados de agave con el cultivo mixto con el rendimiento de etanol obtenido con el de cada levadura individualmente en los mismos hidrolizados.

Determinar si se consume la xilosa en la fermentación de los hidrolizados de hojas de agave con el cultivo mixto.

## HIPÓTESIS

Al realizar la hidrólisis de las hojas de agave se obtendrá un sustrato con una mezcla de azúcares en el cual, la glucosa y la xilosa serán los más abundantes, entonces, al realizar la fermentación de este sustrato con un cultivo mixto de *Saccharomyces cerevisiae* y *Pichia stipitis* se consumirán estos dos azúcares y se obtendrá un rendimiento de etanol superior al que se puede obtener al realizar la fermentación individualmente con cada levadura.

## METODOLOGÍA

En la Figura 11 se esquematiza el trabajo realizado y la metodología utilizada.

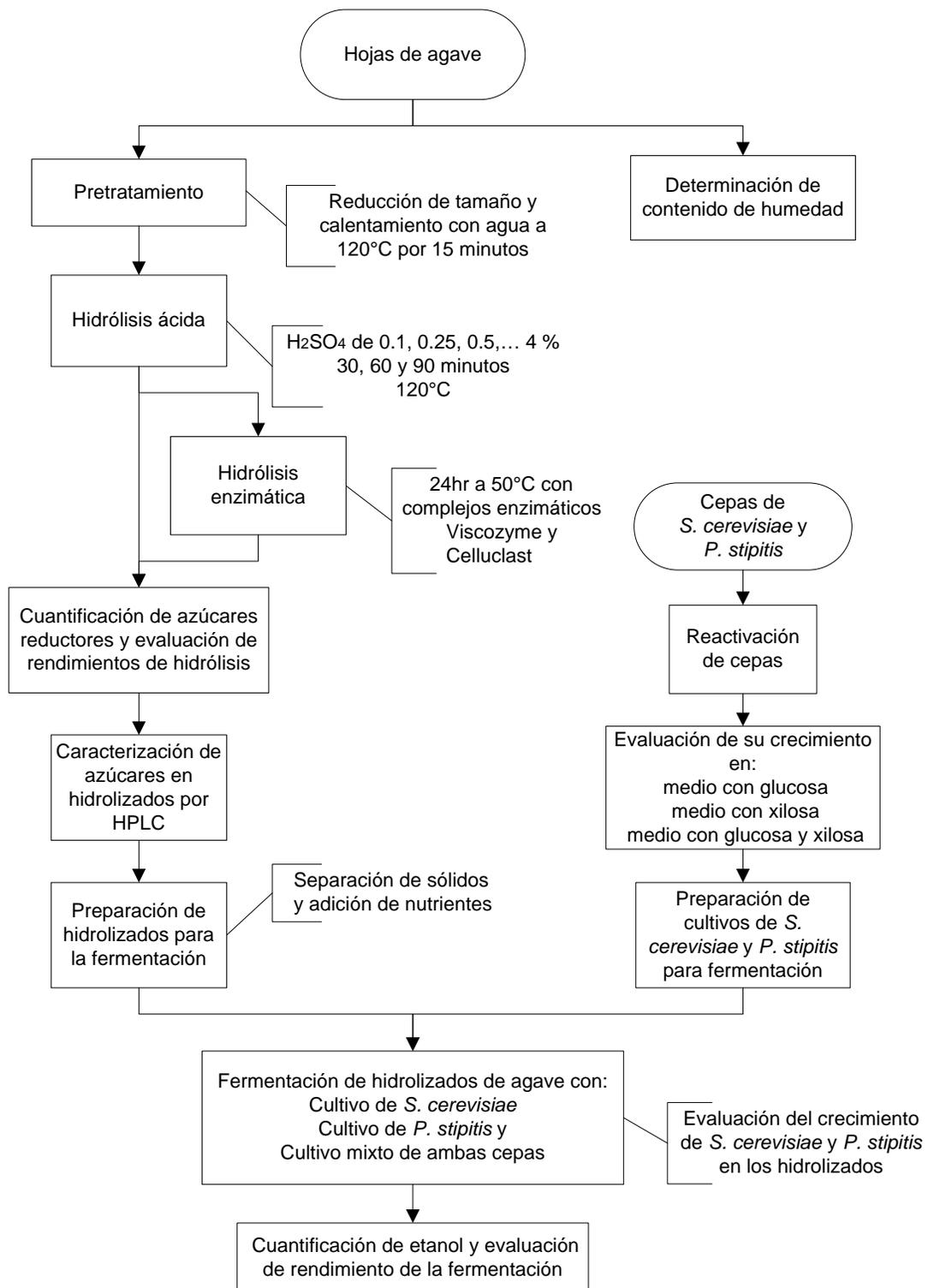


Figura 11. Esquema de trabajo y metodología utilizada

## **Preparación de las muestras de agave**

Se trabajó con hojas de *Agave tequilana* Weber de León Guanajuato. Las hojas se almacenaron en hielo durante 24 horas hasta su llegada al laboratorio en donde se almacenaron a -18°C. Se desconoce la edad exacta de la planta de agave de la cual se obtuvieron las muestras utilizadas, se estima entre 6 y 8 años.

Una vez en el laboratorio, las hojas de agave se seccionaron hasta obtener fragmentos de 0.5 cm por lado. Una vez seccionadas las hojas, los fragmentos obtenidos homogeneizaron en un solo recipiente. Los fragmentos se almacenaron a -18 °C hasta ser utilizados. Para este estudio se utilizaron solamente tres cuartas partes de cada hoja, la base y el cuerpo de las hojas, se descartaron las puntas.

## **Determinación del contenido de humedad de las hojas de agave**

Se tomó una muestra de los fragmentos de agave cortado para determinar el contenido de humedad promedio de las hojas de agave, este parámetro se determinó por el método de secado en estufa. Por quintuplicado se pesaron 25 gramos de agave en un pesafiltros a peso constante (secado en una estufa a 100°C durante 24 horas y posteriormente enfriado en un desecador durante 4 horas), se registró el peso exacto de la muestra de agave y del pesafiltros. Los pesafiltros con la muestra de agave se introdujeron en una estufa a 100 °C durante 24 horas, posteriormente se dejaron enfriar en un desecador durante 4 horas y se pesaron nuevamente.

El contenido de humedad del agave se determinó calculando la diferencia de peso en porcentaje (gramos de humedad/100 gramos de hojas de agave) entre la muestra de agave seco agave húmedo y de la muestra de agave una vez seca.

## **Hidrólisis de los polisacáridos de las hojas de agave**

### ***Pretratamiento de las hojas de agave***

Se pesaron 66 muestras de agave de 40 gramos y se colocaron en matraces Erlenmeyer de 125 mL de capacidad, a cada matraz con agave se le adicionaron 40 mL de agua destilada (1mL de agua destilada por 1g de agave(bh) ). Los matraces se taparon y se introdujeron en un autoclave en donde se calentaron a 120 °C durante 15 minutos. Se utilizó un autoclave HIRAYAMA. Concluido el tratamiento térmico los matraces con las muestras de agave pretratadas se enfriaron y se almacenaron en refrigeración.

### ***Hidrólisis ácida de los polisacáridos de las hojas de agave***

Se realizó la hidrólisis ácida de las hojas de agave (pretratadas) con ácido sulfúrico diluido a 120 °C. Se prepararon tres lotes de muestras de agave. En cada lote se probaron las concentraciones de ácido sulfúrico de 0.1, 0.25, 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5 y 4 % (v/v). La duración del tratamiento térmico fue diferente para cada uno de los tres lotes, se probaron los tiempos de hidrólisis de 30, 60 y 90 minutos. Cada ensayo se realizó por triplicado.

Para ajustar las concentraciones de ácido para la hidrólisis a cada matraz con la muestra de agave pretratada se le adicionó ácido sulfúrico concentrado (98%) en la cantidad necesaria para obtener las concentraciones deseadas para la hidrólisis. La cantidad de ácido sulfúrico 98% adicionada se determinó considerando el agua adicionada a las muestras de agave en el pretratamiento y el agua propia de las hojas de agave según el valor obtenido en la determinación de humedad.

El calentamiento de las muestras se realizó en un autoclave a 120 °C. Finalizado el tratamiento térmico se evaluó el rendimiento de la hidrólisis cuantificando los azúcares reductores producidos con el tratamiento ácido utilizando el método del ácido dinitrosalicílico o método de DNS (anexo). El rendimiento de hidrólisis se determinó

como los gramos de azúcares reductores obtenidos en 100 gramos de hojas de agave secas.

### ***Hidrólisis ácido-enzimática de los polisacáridos de las hojas de agave***

El tratamiento ácido enzimático de las hojas de agave consistió en dos etapas; La primera consistió en una prehidrólisis con ácido de las hojas de agave, y en la segunda se realizó el tratamiento con enzimas. La prehidrólisis con ácido se realizó como se describe en el capítulo anterior utilizando las concentraciones de ácido sulfúrico de 0.1, 0.25, 0.5, 1 y 1.5 % (v/v) y un control sin ácido. Se realizaron dos lotes de hidrolizados, el primero se hidrolizó durante 30 minutos y el segundo durante 60. La hidrólisis se realizó a 120 °C.

Una vez realizados los tratamientos de hidrólisis de los residuos de agave, éstos se enfriaron en un baño de agua con hielo, entonces se ajustó el pH de cada hidrolizado a un valor de 5.5 con una solución de hidróxido de sodio concentrada. Se utilizó este pH por ser el óptimo de trabajo de las enzimas.

A cada muestra de agave prehidrolizado se le adicionó un complejo de enzimas celulasas marca Celluclast y un complejo de enzimas celulasas y hemicelulasas marca Viscozyme. Cada complejo se adicionó en una concentración de 1mL por cada 100 gramos de hojas de agave (bs). Una vez adicionadas las enzimas los matraces se colocaron en incubación durante 24 horas a 120 rpm. La incubación se realizó a 50 °C ya que esta es la temperatura óptima de trabajo para las enzimas.

Terminado el periodo de incubación las muestras se almacenaron en refrigeración durante un periodo de 24 horas hasta que la materia sólida se asentara, entonces se tomó una muestra del sobrenadante y se realizó la cuantificación de los azúcares reductores producidos en la hidrólisis.

## **Caracterización y cuantificación de azúcares producidos en la hidrólisis de los polisacáridos de las hojas de agave**

### ***Cuantificación de azúcares reductores por el método del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS)***

La cuantificación de los azúcares producidos durante la hidrólisis se llevó a cabo mediante el método del ácido dinitrosalicílico (Mollet, 1996). Para realizar la cuantificación se coloca en un tubo de ensayo una alícuota de 1mL de la muestra con azúcares reductores que se desea analizar, a esta muestra se le adicionó 1mL de reactivo de ácido dinitrosalicílico (DNS). A continuación los tubos con la muestra y el reactivo se introdujeron en un baño maría en ebullición y se dejaron calentar durante 5 minutos, pasado este tiempo los tubos se introdujeron en un baño con hielo para detener la reacción. A cada tubo se le adicionaron 10 mL de agua destilada y se determinó la absorbancia de cada muestra a 540 nm frente a un blanco de la misma reacción preparado con agua destilada en lugar de la muestra. El valor de absorbancia determinado debe entrar en el rango entre 0.1 y 1.2, de lo contrario, se realizó la dilución adecuada de la muestra. La determinación se realizó en un espectrofotómetro GBC y se utilizó el software CINTRAL.

### ***Caracterización de azúcares en los hidrolizados de hojas de agave por cromatografía de líquidos de alta eficiencia ( HPLC)***

Se utilizó una bomba PERKIN ELMER Binary LC pump 250 con un detector de índice de refracción PERKIN ELMER series 200 y un integrador PE NELSON model 1022. Se utilizó una columna (CH) phenomenex P/NO 00G-4378-E0. Se utilizó una fase de acetonitrilo y agua en proporción de 80:20 a un flujo de 1 mL/min. Se utilizaron reactivos grado HPLC.

La preparación de las muestras se realizó el mismo día de su inyección en el cromatógrafo de líquidos. Para la determinación se tomaron 2 mL de cada muestra centrifugaron a 10,000 rpm durante 10 minutos a 4 °C, una vez centrifugadas las muestras se filtraron utilizando microfiltros millipore de tamaño de poro de 45 μm. Las muestras filtradas se depositaron en microtubos eppendorf de capacidad de 2 mL y se almacenaron en refrigeración hasta ser inyectadas en el cromatógrafo.

### ***Evaluación de rendimientos de hidrólisis de los polisacáridos de las hojas de agave***

Al realizar la cuantificación de azúcares reductores en los hidrolizados de hojas de agave por el método de DNS se obtiene la concentración de azúcares reductores en gramos de azúcares reductores por litros de muestra. A partir de este dato determinó el rendimiento de la hidrólisis expresado en gramos de azúcares reductores obtenidos de la hidrólisis de 100 gramos de agave en base seca.

El cálculo se realizó utilizando la ecuación siguiente:

$$\left( \frac{\text{mg de azúcares reductores}}{\text{mL de muestra}} \right) \times \frac{\text{mL de muestra}}{1000 \frac{\text{mg}}{\text{g}}} \times \frac{\text{Dilución}}{\text{g hojas de agave (bs)}} \times 100$$

El resultado de esta ecuación es el rendimiento de la hidrólisis expresado como los gramos de azúcares reductores obtenidos de la hidrólisis de 100 gramos de hojas de agave (bs)

## **Evaluación de la capacidad de *Saccharomyces cerevisiae* y *Pichia stipitis* para crecer en un medio preparado con glucosa y xilosa como fuentes de carbono**

Se evaluó la capacidad de las levaduras *Saccharomyces cerevisiae* y *Pichia stipitis* para fermentar dos azúcares distintos, glucosa y xilosa. El crecimiento de cada levadura se evaluó individualmente en tres medios distintos, uno con glucosa como fuente de carbono, otro con xilosa, y otro con una mezcla de los dos en concentraciones iguales. Las fermentaciones se realizaron en condiciones anaeróbicas.

Se utilizó un medio de cultivo preparado con extracto de levadura al 1% (p/v), peptona de soya al 2% (p/v) y azúcar al 2% (p/v). Este medio se preparó en un matraz de 500 mL (matraz A) disolviendo 6 gramos de peptona de soya y 3 gramos de extracto de levadura en 200 mL de agua destilada. En otro matraz (B) por separado se disolvieron 6 gramos de azúcar en 100 mL de agua destilada. Los dos matraces se taparon y esterilizaron a 121 °C durante 15 minutos. Los dos matraces se enfriaron a temperatura ambiente y una vez fríos se mezcló su contenido.

Para preparar el medio con glucosa se disolvieron 6 gramos de glucosa en el matraz B. Para preparar el medio con xilosa se disolvieron 6 gramos de xilosa en el matraz B. Para preparar el medio mixto se disolvieron 3 gramos de glucosa y 3 gramos de xilosa en el matraz B.

Para evaluar el crecimiento de las levaduras durante la fermentación se determinaron tres parámetros: el incremento de la densidad óptica del medio, el conteo de células viables de levadura y el consumo de azúcares. Para determinar estos parámetros se realizó un muestreo a lo largo de la fermentación realizándose cada dos horas durante las primeras doce horas de fermentación, y después cada 24 horas contadas a partir del tiempo de inicio de la fermentación. El muestreo se realizó hasta que se consumió el total de los azúcares fermentables en el medio o hasta que la actividad de los microorganismos se detuvo.

### ***Reactivación de las cepas de Saccharomyces cerevisiae y Pichia stipitis***

Para realizar la fermentación se utilizó una cepa de *Saccharomyces cerevisiae* aislada durante la producción de tequila y la cepa de *Pichia stipitis* ATCC 58785. Para reactivar las dos cepas se realizó un cultivo de cada una en medio YPD a 28°C durante 12 horas con agitación a 120 rpm. Una vez crecidas las cepas se tomó una asada de cada cultivo y se sembró en un agar inclinado de PDA (Papa-Dextrosa acidificado) acidificado con una solución de ácido tartárico al 10% (p/v) en el cual, se incubaron a 28°C durante 24 horas, pasado este tiempo los cultivos se guardaron en refrigeración a 4°C hasta ser utilizados. A partir de estos cultivos se prepararon los cultivos iniciadores de la fermentación.

### ***Ensayos de fermentación con Saccharomyces cerevisiae y Pichia stipitis en medio con glucosa, en medio con xilosa y en medio mixto (con glucosa y xilosa)***

Para realizar la fermentación se preparó un cultivo iniciador de cada levadura en 100 mL de medio YPD. Cada cultivo se preparó inoculando el medio YPD con tres asadas de los cultivos de cada cepa crecidos en agar inclinado PDA. Una vez inoculados los medios se incubaron a 28°C durante 12 horas con agitación de 120 rpm.

Para iniciar la fermentación se inocularon 300 mL de cada medio (de glucosa, xilosa y mixto) con 30 mL de cultivo iniciador, se inocularon los tres medios con cada levadura (tres medios con *Saccharomyces cerevisiae* y tres medios con *Pichia stipitis*). Una vez inoculados los medios se tomó una muestra de 5 mL en un vial estéril para evaluar los parámetros de crecimiento y los matraces tapados se colocaron en incubación a 28 °C sin agitación.

Después de inocular los medios se tomó una muestra de 5 mL de cada medio inoculado, las muestras se recolectaron en viales estériles. Estas muestras tomadas al momento de la inoculación de los medios corresponden al tiempo cero (t<sub>0</sub>) o inicio de la fermentación. A partir de este momento se tomó una muestra de cada medio cada dos

horas durante las primeras 12 horas de fermentación, a partir de este momento se tomó una muestra cada veinticuatro horas a partir del tiempo cero. A cada una de las muestras tomadas se le determinaron los parámetros de crecimiento, densidad óptica, conteo de células viables y azúcares reductores.

### **Fermentación de los hidrolizados de hojas de agave con *Saccharomyces cerevisiae* y *Pichia stipitis***

Para realizar los ensayos de fermentación utilizaron dos hidrolizados de hojas de agave preparados a partir de los métodos de hidrólisis con los cuales se obtuvieron los rendimientos de azúcares reductores más altos. La hidrólisis se realizó conforme a la metodología descrita en el capítulo correspondiente. Después de haber realizado el tratamiento de hidrólisis de los residuos de agave, los hidrolizados se mantuvieron en reposo a 4 °C durante 24 horas para permitir el asentamiento de los sólidos presentes en los hidrolizados, una vez precipitados los sólidos en los hidrolizados estos se decantaron en recipientes estériles.

En tres matraces estériles de 500 mL se vertieron 225 mL de hidrolizado. A cada matraz con hidrolizado se le adicionaron 75 mL de una solución estéril de nutrientes con extracto de levadura al 8 % (p/v) y peptona de soya al 4 % (p/v). El volumen final de los hidrolizados fue de 300 mL y la concentración final de estos compuestos fue de 2 y 1 % (p/v) respectivamente.

Cada matraz se inoculó a partir de un cultivo iniciador de levadura, el primero se inoculó con *Saccharomyces cerevisiae*, el segundo con *Pichia stipitis* y el tercero se inoculó con las dos.

Cada cultivo iniciador se preparó en un medio con 50 mL del hidrolizado de agave y 50 mL de medio YPD. Este medio se inoculó con tres asadas del cultivo puro de levadura y se colocó en incubación a 28°C durante 12 horas con agitación a 120 rpm. Se preparó un cultivo iniciador de *Saccharomyces cerevisiae* y uno de *Pichia stipitis*.

Una vez transcurrido el periodo de incubación de los cultivos iniciadores se inocularon los hidrolizados de agave. Para esto se tomó una alícuota de 30 mL del cultivo iniciador en un tubo de centrifuga estéril, esta alícuota se centrifugó a 1300 rpm durante 5 minutos a 4°C para separar las células del medio, una vez centrifugada la muestra el sobrenadante se descartó. Se tomaron 15 mL de hidrolizado del matraz de fermentación y con en este se resuspendió el paquete de células. Una vez resuspendidas, el hidrolizado se devolvió al matraz de fermentación. De esta manera se inocularon el medio para *Saccharomyces cerevisiae* y el medio para *Pichia stipitis*. El medio para la fermentación mixta se inoculó con el paquete de células obtenido al centrifugar 15 mL del cultivo iniciador de *Saccharomyces cerevisiae* y 15 mL del cultivo iniciador de *Pichia stipitis*.

Despues de inocular los medios se colocaron en incubación a 28°C sin agitación. Se tomó una muestra de 5 mL del medio de fermentación cada 12 horas a partir del momento de la inoculación, a partir de estas muestras se realizó el conteo de células viables de levadura durante la fermentación, se evaluó el consumo de los azúcares en el hidrolizado y se cuantificó el etanol producido.

### ***Evaluación del crecimiento de las levaduras durante la fermentación mediante la determinación de la densidad óptica del medio de fermentación***

La densidad óptica de los medios de fermentación se determinó en un espectrofotómetro a 600 nm. La lectura se realizó directamente en la muestra, en caso de que el valor de absorbancia registrado fuera mayor a 1.2 la muestra se diluyó con agua destilada hasta que su valor de absorbancia estuviera dentro del intervalo de 0.1 a 1.2 de absorbancia. Como blanco se utilizó agua destilada. Con los valores de absorbancia obtenidos se realizó una grafica con el tiempo de fermentación en el eje de las abscisas y las absorbancias registradas en el eje de las ordenadas. Para determinar el valor gráfico de absorbancia de las muestras que se diluyeron, los valores de absorbancia obtenidos se multiplicaron por el número de veces que se diluyeron.

### **Conteo de células viables de *Saccharomyces cerevisiae* y *Pichia stipitis* durante la fermentación**

Para realizar el conteo de células se utilizó el método de conteo de células por dispersión en placa: En una caja de Petri con agar PDA se vierten 100  $\mu$ L de una muestra del medio de fermentación. A continuación con la ayuda de un asa de vidrio estéril en forma de "L" los 100  $\mu$ L de medio se extienden uniformemente en toda la superficie del agar. A continuación las cajas de Petri con agar y muestra se incuban a 28°C durante 24 horas, después de esto se cuenta el número de colonias que se observan en la placa. Este método establece que un resultado válido es cuando se cuentan entre 25 y 250 colonias por caja, para esto se realizan varias diluciones de la muestra de la cual se desean contar las levaduras presente y se siembra todas en las placa con agar PD. Las diluciones de las muestras se realizan con agua peptonada tomando 1 mL de la muestra que se desea diluir y colocándolo en un tubo de ensayo con 9 mL de agua peptonada, de esta manera cada dilución se realizó en un orden de 10.

Después de 24 horas de incubación se realizó el conteo de células en cada placa de agar, tomando en cuenta aquella en la que el número de colonias esté entre 25 y 250. Una vez contado el número de colonias se calcula el número de colonias en un mililitro del medio tomando en cuenta el volumen de la alícuota sembrada en la placa y el factor de dilución que corresponde al número de veces que se diluyó la muestra diez veces.

$$\text{UFC/mL} = \text{número de colonias} \times 10^{\text{número de diluciones}}$$

Una vez obtenidos los datos del conteo de células viables de levadura se trazó una grafica de unidades formadoras de colonias de levadura por mL de medio (UFC/mL) en el eje de las ordenadas, contra tiempo de fermentación.

### ***Evaluación del consumo de azúcares durante la fermentación***

A partir de las muestras tomadas durante la fermentación se cuantificaron los azúcares en el medio. Esta determinación se realizó por el método de cuantificación de azúcares reductores o DNS explicado anteriormente. Para el análisis se utilizaron 2 mL de muestra y se colocaron en microtubos Eppendorf para centrifuga de 2 mL. Las muestras se centrifugaron a 13,000 rpm y 4°C durante 5 minutos. Una vez centrifugadas se tomó el sobrenadante para el análisis.

Para el análisis se construyó una gráfica de concentración de azúcares en el medio como variable dependiente contra el tiempo de fermentación (variable independiente).

### **Cuantificación de etanol por cromatografía de gases y evaluación de rendimientos en la fermentación**

Se utilizó un cromatógrafo de gases Agilent Technologies 6890N con un inyector Agilent Technologies 7683. Se utilizó una columna INNOWAX JW19091N-133 de dimensiones de 30.0m x 250 µm x 0.25 µm. El software utilizado fue Chemstation Plus. Para el análisis se utilizó una rampa de temperaturas en la columna de 1 minuto a 80°C y 3 minutos a 150 °C con una rapidez de calentamiento de 15 °C/min, el tiempo total de análisis fue de 8.67 minutos. El inyector se utilizó a 222°C, 10.70 PSI y flujo de 64.7 mL/min. La temperatura del detector fue de 275°C con un flujo de H<sub>2</sub> de 40.0mL/min y un flujo de aire de 400 mL/min.

Para preparar las muestras que se inyectaron en el cromatógrafo de gases se destilaron 30 mL del medio de fermentación con un equipo de destilación simple, una vez destiladas las muestras se filtraron con una malla Millipore de 0.45 µm. Cada muestra se analizó por triplicado. El rendimiento de etanol de la fermentación se determinó como el cociente de los gramos de etanol producidos en la fermentación entre los gramos de azúcares consumidos por el cultivo utilizado.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Hidrólisis de los polisacáridos de las hojas de agave

Se determinó la cantidad de azúcares reductores obtenidos a partir de diferentes métodos de hidrólisis de las hojas de agave. Los resultados se expresan como rendimiento calculado en gramos de azúcares reductores obtenidos en 100 gramos de hojas de agave secas. El contenido de sólidos determinado en las hojas de agave de 24.5 % (g/g), en base a este dato se realizó el cálculo de rendimiento.

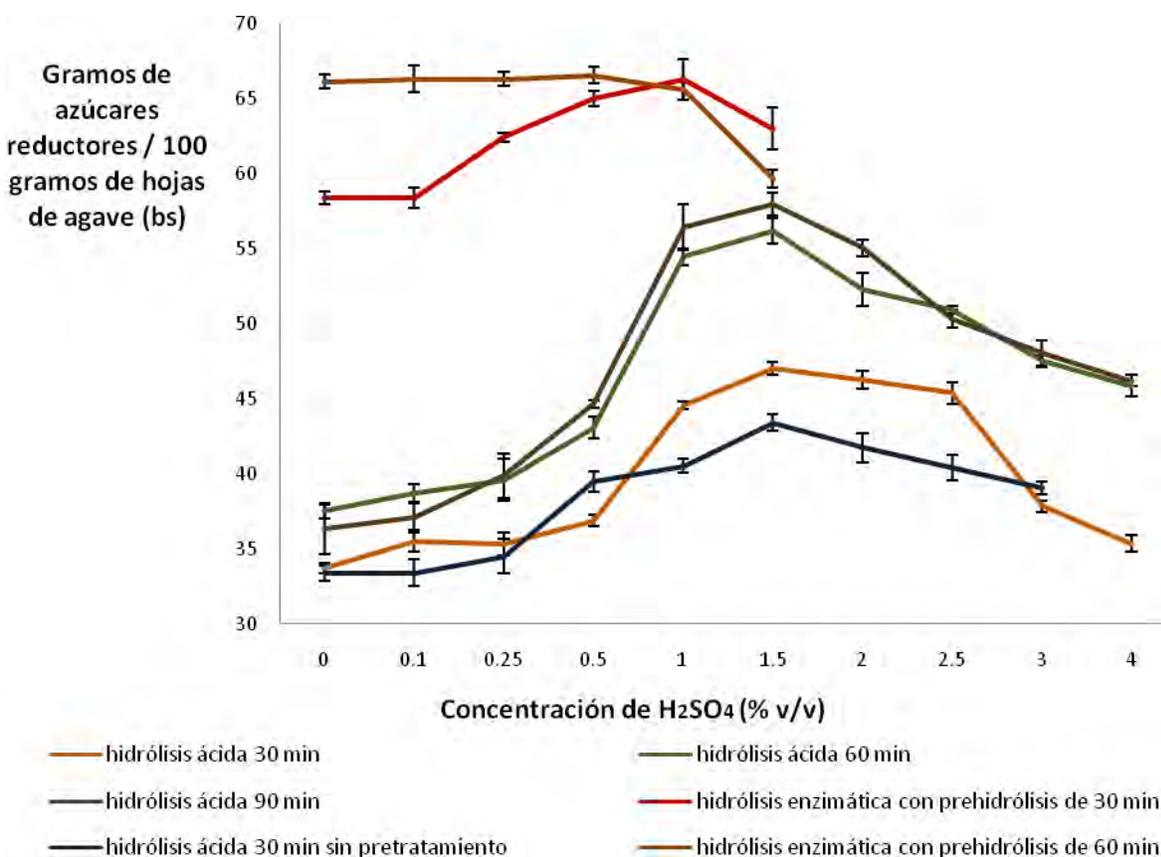


Figura 12. Rendimientos de hidrólisis ácida y acido-enzimática (con prehidrólisis con ácido) de las hojas de agave. La hidrólisis ácida y la prehidrólisis ácida se realizaron a 120 °C. El pretratamiento se realizó con agua a 120 °C durante 15 minutos. La hidrólisis enzimática se realizó con una mezcla de los complejos enzimáticos Viscozyme y Celluclast durante 24 horas a 50 °C.

En la Figura 12 se observa el rendimiento de la hidrólisis de las hojas de agave de cada uno de los métodos de hidrólisis evaluados. En las curvas correspondientes a los tratamientos de hidrólisis con ácido durante 30, 60 y 90 minutos se observa el rendimiento se incrementa conforme aumenta la concentración de ácido utilizada desde 0.1% hasta 1.5% en donde se llega al rendimiento máximo. Al aumentar la concentración de ácido, los rendimientos obtenidos son cada vez menores. En éstos tres casos, es mayor incremento en el rendimiento sucede entre las concentraciones de ácido de 0.5% a 1%. Además, el rendimiento obtenido con  $H_2SO_4$  al 1% en los tres casos es muy similar al rendimiento máximo obtenido utilizando  $H_2SO_4$  al 1.5%.

Al aumentar el tiempo de hidrólisis los rendimientos también se incrementan. Al comparar los rendimientos entre las series de hidrólisis ácida con 30 y 60 minutos, se registra un incremento en los rendimientos de casi el 10%. Ésto mismo se observa entre las series de 60 y 90 minutos, sin embargo, en éste caso el incremento en los rendimientos es menor, tan solo el 2%. Con base en éstas observaciones, bajo las condiciones de hidrólisis estudiadas (acidez y temperatura), el tiempo óptimo de hidrólisis es de 60 minutos.

En las series de la hidrólisis ácida de 30 minutos, se observa que se obtienen rendimientos más altos cuando se lleva a cabo un pretratamiento de las hojas de agave. Ésto explica la importancia del realizar pretratamiento para tener procesos de hidrólisis más eficientes.

En la misma gráfica (Figura 12) se representan los rendimientos de la hidrólisis ácido-enzimática (hidrólisis enzimática con prehidrólisis ácida). En las dos series se observa que los rendimientos de la hidrólisis ácido-enzimática son mejores que los obtenidos con la hidrólisis con ácido. Además, las concentraciones de ácido utilizadas son menores lo que disminuye el gasto en reactivos considerablemente.

En el tratamiento ácido-enzimático con prehidrólisis de 30 minutos se obtiene un rendimiento máximo al utilizar una concentración de ácido de 1%. Al incrementar la concentración de ácido a 1.5% el rendimiento disminuye considerablemente (disminuye

en un 3%). Ésto mismo se observa al realizar la prehidrólisis de 60 minutos, aunque en este caso, la disminución en el rendimiento al utilizar una concentración de 1.5 % es aún mayor (disminuye en un 6%).

La realización de prehidrólisis durante 60 minutos, permite alcanzar el rendimiento máximo de hidrólisis utilizando concentraciones de ácido desde 0.1% hasta 0.5%, lo cual no sucede en la prehidrólisis de 30 minutos. En éste caso, el rendimiento máximo solo se alcanza al utilizar una concentración de ácido de 1%. Al utilizar concentraciones de ácido muy bajas (0% y 0.1%) en la prehidrólisis, los hidrolizados obtenidos tuvieron una gran turbidez y un gran número de sólidos en suspensión, lo cual hizo difícil su manipulación posterior para llevar a cabo la fermentación.

Los resultados obtenidos hacen evidente que la hidrólisis ácido-enzimática es un mejor tratamiento para las hojas de agave ya que permite obtener rendimientos mayores que los tratamientos de hidrólisis con ácido. También es importante que en parte de la hidrólisis ácida se utilice concentraciones de ácido mayor a 0.25% ya que esto permite tener hidrolizados más limpios. Así mismo es importante realizar un pretratamiento de las hojas de agave ya que facilita la hidrólisis lo cual permite la obtención de mejores rendimientos.

## Caracterización y cuantificación de azúcares en los hidrolizados de hojas de agave

Para realizar la caracterización de azúcares se escogieron dos hidrolizados de hojas de agave con los cuales se obtuvo el máximo rendimiento de azúcares reductores. Los dos hidrolizados escogidos fueron obtenidos a partir de la hidrólisis ácido-enzimática, el primero hidrolizado, *hidrolizado HA1E*, prehidrolizado durante 30 minutos con ácido sulfúrico al 1%, y el segundo hidrolizado, *hidrolizado HA0.25E*, prehidrolizado durante 60 minutos con ácido sulfúrico al 0.25%. En ambos casos se llevó a cabo el pretratamiento de las hojas de agave.

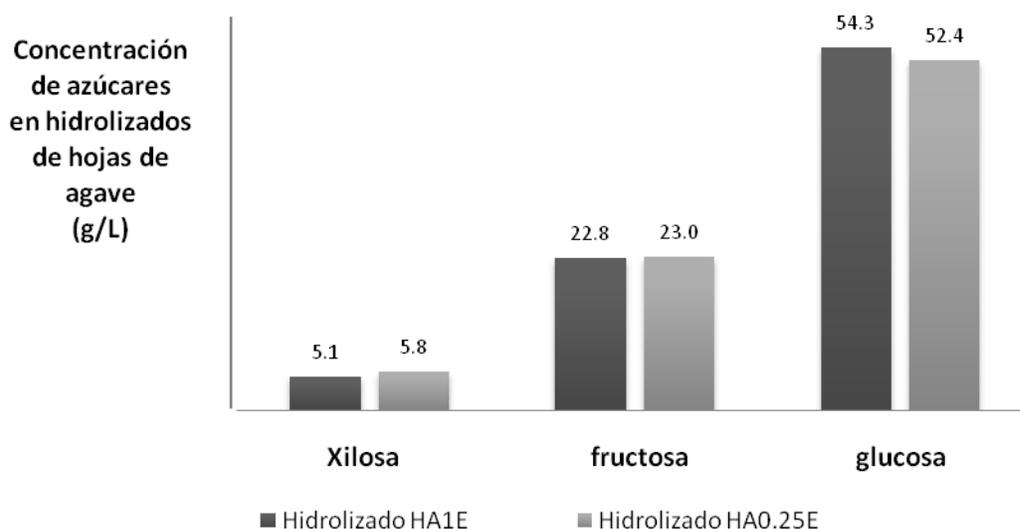


Figura 13. Concentraciones de xilosa, fructosa y glucosa, en los hidrolizados de hojas de agave HA1E y HA0.25E, cuantificados por HPLC. Los resultados se expresan en gramos de azúcar por litro de hidrolizado.

Como se observa en la Figura 13, la composición de los dos hidrolizados analizados es muy similar. La concentración total de azúcares fermentables determinada en los dos hidrolizados es de 82 gramos por litro para el *hidrolizado HA1E* y de 81 gramos por litro para el *hidrolizado HA0.25E*.

Los azúcares encontrados en los hidrolizados son glucosa, fructosa y xilosa. De estos, la glucosa es el azúcar predominante. Su concentración representa el 65% del total de azúcares encontrados. El segundo azúcar más abundante es la fructosa que representa el 28% del total de azúcares presentes. Finalmente la xilosa encontrada en concentraciones de 7% del total de azúcares en los hidrolizados.

Al inicio del experimento se esperaba que al realizar la hidrólisis de las hojas de agave se obtuvieran principalmente glucosa y xilosa, sin embargo en los resultados obtenidos la xilosa se encuentra en concentraciones muy bajas. Contrariamente a lo que se esperaba, la fructosa se encuentra en cantidades muy grandes. A pesar de que se esperaba encontrar un poco de este azúcar proveniente de los restos de polifruktanos en las hojas de agave, no se esperaba que su presencia fuera tan importante en los hidrolizados.

Al comparar el dato de concentración de azúcares fermentables cuantificados por cromatografía de líquidos de alta eficiencia (HPLC) de 82 g/L con el dato de concentración de azúcares reductores cuantificados por el método del ácido 3,5-Dinitrosalicílico (DNS) de 100 g/L se encontró una diferencia en los resultados de 18 g/L, esta diferencia se puede deber principalmente a la inexactitud del método de DNS ya que al utilizar este método es posible tener interferencias por algunos compuestos presentes en los hidrolizados que den un falso resultado.

Al comparar los resultados obtenidos con estudios de hidrólisis realizados con otros materiales lignocelulósicos encontramos que el porcentaje de azúcares obtenidos a partir de la hidólisis es alto. Es importante señalar que no es posible realizar una comparación muy estricta entre estos estudios ya que tanto la biomasa utilizada, así como las condiciones de hidrólisis son diferentes en cada trabajo. En el estudio de la hidrólisis ácida de la paja de trigo (Linde *et al.*, 2008), eucalipto (Vieira *et al.*, 2007) y bagazo de caña (Aguilar *et al.*, 2002), se han reportado concentraciones de azúcares fermentables de 14 g/L, 17 g/L y 24.6 g/L respectivamente en los hidrolizados. Una característica común en éstos tres procesos es que para realizar la hidrólisis se

utilizaron relaciones de 1g de material a hidrolizar por 20 mL de solución ácida. Esto ocasiona que los azúcares obtenidos estén en baja concentración y que sea necesario incluir en sus procesos la concentración de los sustratos obtenidos. En éste estudio se utilizó una relación de sustrato-solución ácida de 1g de material a hidrolizar por 7 mL de solución ácida y se obtuvo un hidrolizado con una concentración de azúcares fermentables de 82 g/L.

En la caracterización azúcares de los hidrolizados en los trabajos mencionados se ha encontrado que el azúcar mayoritario en todos los casos es la xilosa. En el hidrolizado de eucalipto se reportan concentraciones de 15.2 g/L de xilosa y 1.65 g/L de glucosa (Vieira *et al.*, 2007), para el hidrolizado de bagazo de caña de 21.6 g/L de xilosa y 3.0 g/L de glucosa (Aguilar *et al.*, 2002). Esto mismo se ha reportado en la hidrólisis de la paja de trigo (Linde *et al.*, 2008), y para el “swithgrass” (Chiang *et al.*, 2008). Con los hidrolizados de hojas de agave ocurre lo opuesto, siendo la glucosa el azúcar mayoritario. Una razón por lo que esto puede ocurrir ser el tipo de biomasa que se está utilizando, ya que al comparar el contenido de celulosa y hemicelulosa en los sustratos reportados en estos estudios se encuentra que tienen un contenido de hemicelulosa al menos cuatro veces mayor que las hojas de agave, y a su vez, un contenido menor de celulosa.

Otra razón puede ser el tipo de tratamiento de hidrólisis, ya que en los cuatro casos mencionados, el tratamiento de hidrólisis ha sido solamente con ácido. En el caso de la hidrólisis de la fibra de maíz realizada con tratamiento ácido-enzimático (Dien *et al.*, 2006), se ha reportado la hidrólisis del 82% del glucano y el 48% del xilano presentes en este sustrato. Al igual que en presente trabajo, la liberación de glucosa en el proceso de hidrólisis es mayor que la reportada en los tratamientos ácidos en los estudios mencionados anteriormente por lo que la utilización de enzimas puede ser una clave para obtener mayores rendimientos de azúcares en estos procesos.

## Evaluación de la capacidad de *Saccharomyces cerevisiae* y *Pichia stipitis* para crecer en un medio preparado con glucosa y xilosa como fuentes de carbono

En las fermentaciones realizadas con *Saccharomyces cerevisiae* se encontró que su crecimiento fue diferente en cada medio. En la Figura 14, se representan gráficamente los valores obtenidos del incremento en la densidad óptica del medio de fermentación lo cual se atribuye el incremento en el número de células de la levadura.

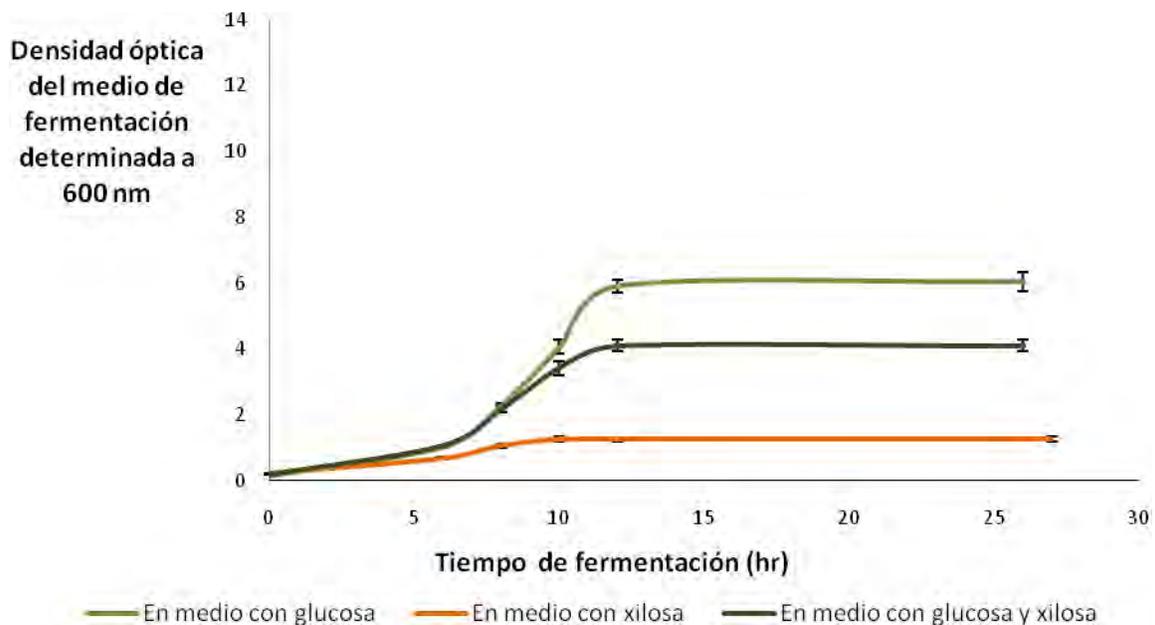


Figura 14. Incremento en la densidad óptica del medio de fermentación con la levadura *Saccharomyces cerevisiae* en medios preparados con diferentes fuentes de carbono a 28°C en condiciones anaeróbicas

Ya que el medio preparado con glucosa se puede considerar como un medio ideal para el crecimiento de las levaduras, el crecimiento observado en este medio puede utilizarse como patrón para evaluar el crecimiento de las levaduras en los otros medios.

Como se observa en la Figura 14, *S. cerevisiae* tiene un crecimiento muy limitado en el medio con xilosa si se compara con su crecimiento en el medio preparado con glucosa. En ésta gráfica el incremento en la densidad óptica del cultivo

de *S. cerevisiae* en el medio con xilosa se observa como una línea constante. Al realizar el conteo de células para comprobar su viabilidad, se encuentra que esta levadura está activa ya que el número de células viables se mantiene constante aún a las 55 horas de fermentación como se observa en la Figura 15.

También se observa que el incremento en la cantidad de células viables al inicio de la fermentación en el medio con xilosa es limitado así como la cantidad de células viables a lo largo del resto de la fermentación al realizar la comparación de la cantidad de células viables durante la fermentación en el medio con glucosa. Este resultado refleja que la capacidad de *S. cerevisiae* para fermentar la xilosa es muy limitada.

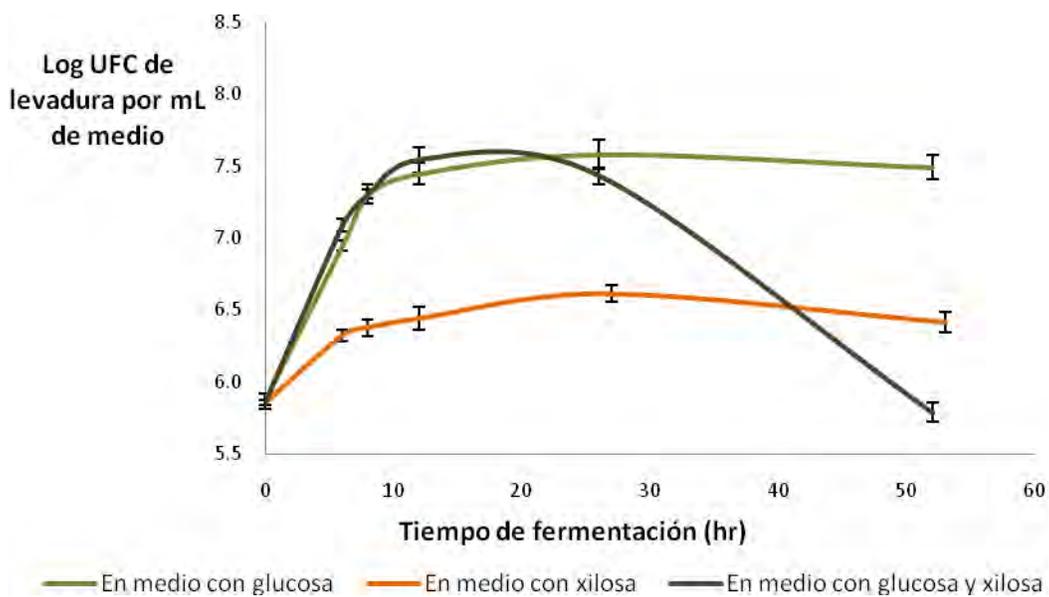


Figura 15. Conteo de células viables de *Saccharomyces cerevisiae* durante la fermentación en medios preparados con diferentes fuentes de carbono a 28°C en condiciones anaeróbicas determinado por el método de dispersión en placa

Esto se confirma al revisar las gráficas correspondientes al crecimiento de *S. cerevisiae* en el medio mixto (con glucosa y xilosa) en la que el incremento en la densidad óptica del medio sigue la misma tendencia que en el medio con glucosa, sin embargo su crecimiento en el medio mixto alcanza la fase estacionaria al llegar a un valor cercano a la mitad de la fase exponencial en el crecimiento con glucosa, es decir que al fermentar en este medio se produce casi la mitad de biomasa de la que se

produce en la fermentación de la glucosa. Esto significa que la fermentación ha llegado a una fase estacionaria cuando se ha consumido la glucosa utilizable y el único azúcar disponible es la xilosa.

Al evaluar el crecimiento de *P. stipitis* con los mismos parámetros (densidad óptica y conteo de células viables) en los tres medios de cultivo, se observa que en los tres casos la cinética de su crecimiento es muy similar, por lo que se puede decir que metaboliza los tres azúcares con la misma facilidad. Una observación importante es que en ninguna de las tres fermentaciones con *P. stipitis* se observa una cinética de crecimiento como en el caso de *S. cerevisiae* en el que las fases de crecimiento (adaptación, exponencial y estacionaria) están muy marcadas, por el contrario, es difícil distinguir con claridad cuando termina cada etapa y comienza la siguiente.

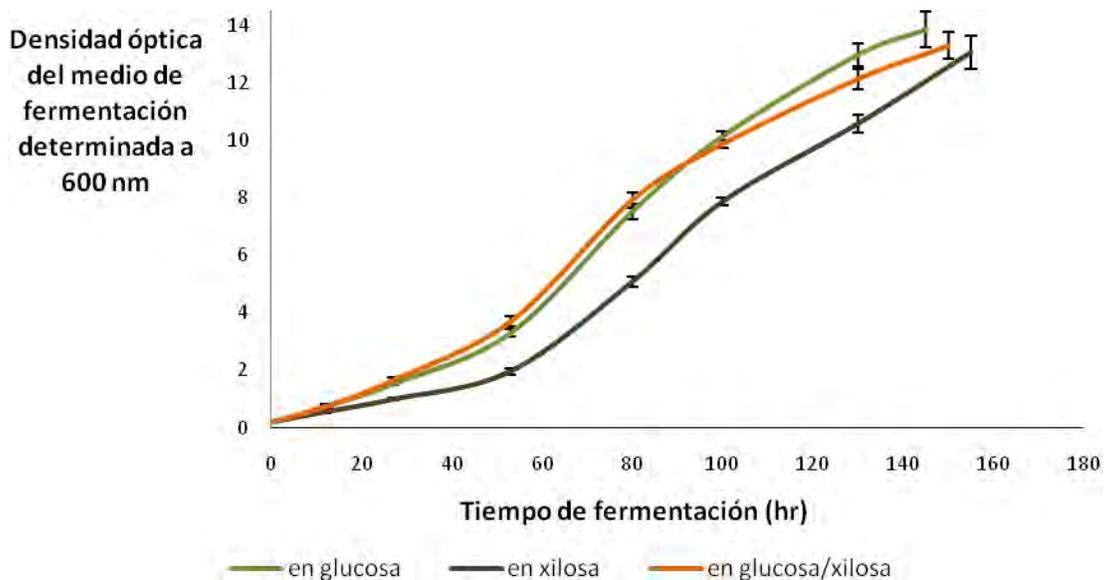


Figura 16. Incremento en la densidad óptica del medio de fermentación con la levadura *Pichia stipitis* en medios preparados con diferentes fuentes de carbono a 28°C en condiciones anaeróbicas

En la Figura 16 se encuentra la misma tendencia en las tres gráficas trazadas, esto parece indicar que la fermentación de la glucosa y de la xilosa es realizada simultáneamente por *P. stipitis* ya que de no ser así, la gráfica correspondiente a la fermentación del medio mixto presentaría una tendencia diauxica en la que se consume inicialmente un solo azúcar hasta que se agota y el crecimiento del microorganismo entra en una fase estacionaria y de adaptación para comenzar a consumir el siguiente sustrato.

En la Figura 17 se representa gráficamente el incremento de la células de levadura de *P. stipitis* a lo largo de la fermentación, lo que se observa es que el valor máximo de células se alcanza alrededor de las 100 horas de fermentación mientras que en la fermentación con *S. cerevisiae* el valor máximo se alcanza alrededor de las 12 horas de fermentación. Esto es un claro indicador de la rapidez con la que ambas levaduras metabolizan los azúcares disponibles ya que los valores máximos de UFC se alcanzan cuando la totalidad del sustrato ha sido consumida.

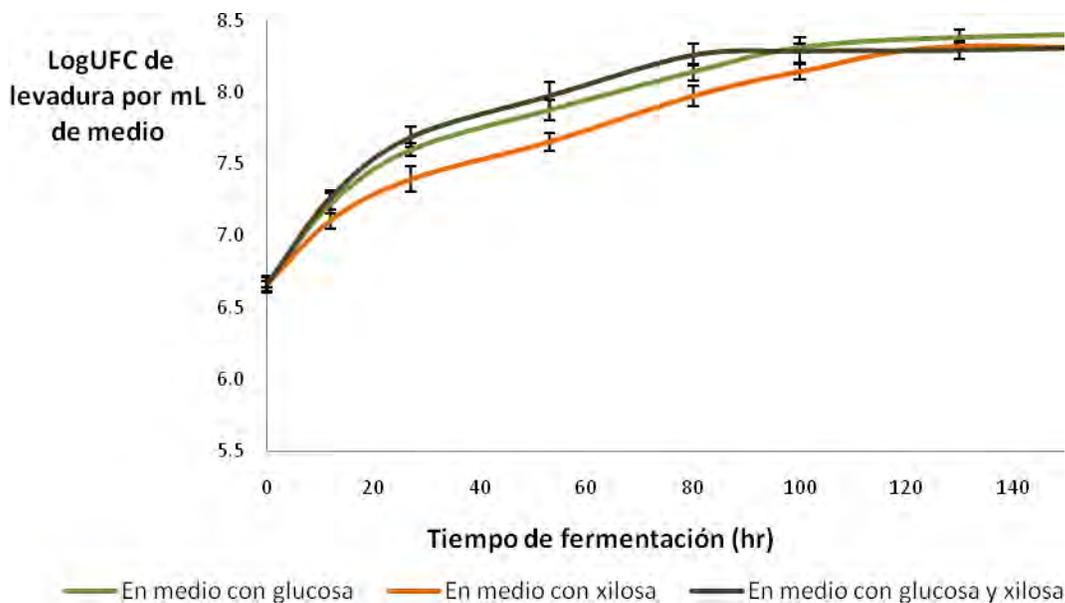


Figura 17. Conteo de células viables de *Pichia stipitis* durante la fermentación en medios preparados con diferentes fuentes de carbono a 28°C en condiciones anaeróbicas determinado por el método de dispersión en placa

Es evidente que la rapidez con la que *P. stipitis* metaboliza los azúcares es considerablemente menor que la rapidez con la que lo hace *S. cerevisiae*. En el caso de *P. stipitis*, esto representa una desventaja para la producción de bioetanol ya que entre varios factores deseables en los microorganismos fermentadores, la rapidez con la que llevan a cabo la transformación de los sustratos en productos es un factor muy importante.

En la Figura 18 se muestra el consumo de azúcares de *P. stipitis* y de *S. cerevisiae* durante la fermentación de los distintos medios estudiados. Como se puede observar, el consumo de xilosa de *S. cerevisiae* es muy poco, sin embargo consume la totalidad de la glucosa con gran rapidez. En el caso de *P. stipitis* se observa que consumió los dos azúcares en su totalidad y en el mismo tiempo.

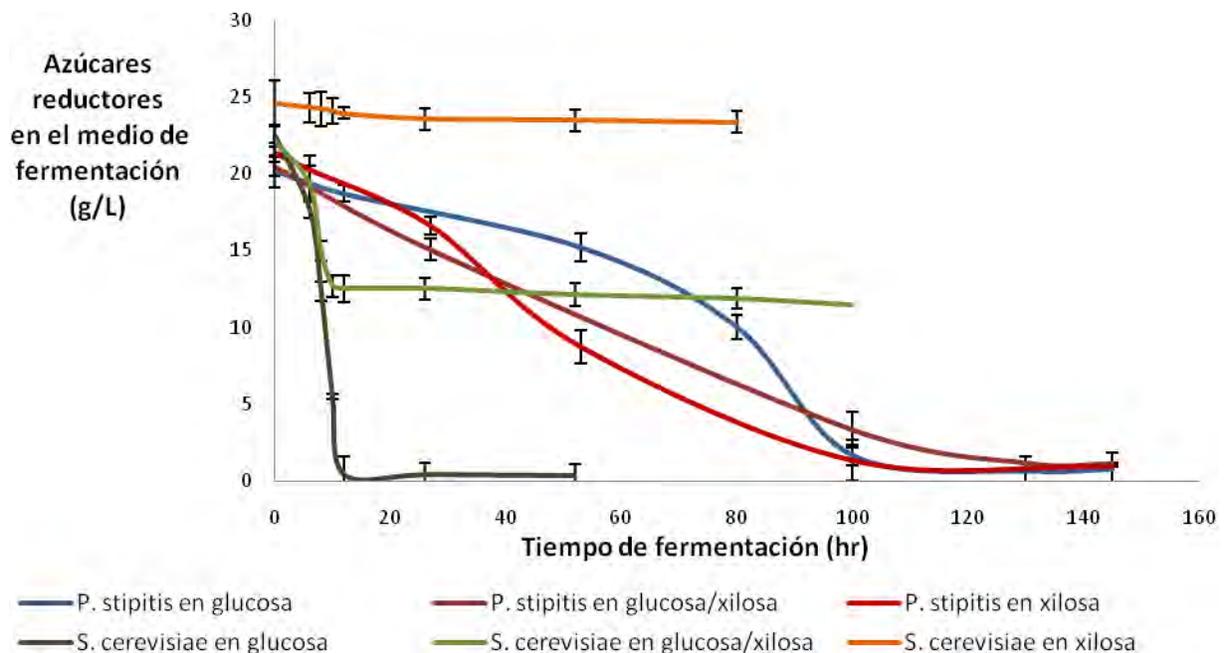


Figura 18. Consumo de azúcares de *Saccharomyces cerevisiae* y *Pichia stipitis* durante la fermentación de medios preparados con diferentes fuentes de carbono a 28°C en condiciones anaeróbicas determinado por el método del ácido dinictosalícílico (DNS) para la cuantificación de azúcares reductores.

Al observar los resultados mostrados sobre el metabolismo de la glucosa y la xilosa con *S. cerevisiae* y *P. stipitis* se encuentra que éstos coinciden con la información reportada en la literatura consultada (Taniguchi *et al.*, 1997). *S. cerevisiae* consume la glucosa más rápido que *P. stipitis*, y por el contrario no consume la xilosa. Por otro lado *P. stipitis* tiene la capacidad de fermentar la glucosa y la xilosa indistintamente aunque su consumo es lento.

Un factor importante es la cantidad de sustrato que cada microorganismo destina hacia la producción de biomasa. Al realizar una comparación de la cantidad de biomasa producida durante las fermentaciones, se observa que *P. stipitis* se produce casi el doble de la cantidad de biomasa producida con *S. cerevisiae*, esto también representa una desventaja para *P. stipitis* como microorganismo fermentador ya que es deseable un microorganismo que produzca menos biomasa y más etanol durante la fermentación.

En la Tabla 1 se muestran los valores biomasa producida en función de la cantidad de sustrato ( $Y_{x/s}$ ) determinados para *S. cerevisiae* y *P. stipitis*. Durante las fermentaciones realizadas. En éstos valores se muestra que *P. stipitis* tiene una mayor producción de biomasa que *S. cerevisiae* con la misma cantidad de sustrato.

Tabla 1. Rendimientos de biomasa en función del sustrato consumido determinados para *S. cerevisiae* y *P. stipitis* durante las fermentaciones en medio de glucosa, xilosa y mixto (glucosa y xilosa)

<b>Ensayo</b>	<b><math>Y_{x/s}</math> (UFCx10<sup>9</sup>/g)</b>
<i>S. cerevisiae</i> en glucosa	1.69
<i>S. cerevisiae</i> en medio mixto	3.59
<i>S. cerevisiae</i> en xilosa	2.97
<i>P. stipitis</i> en glucosa	13.20
<i>P. stipitis</i> en medio mixto	12.50
<i>P. stipitis</i> en xilosa	9.97

## **Fermentación de hidrolizados de hojas de agave con las levaduras *Saccharomyces cerevisiae* y *Pichia stipitis***

Al realizar la fermentación de los hidrolizados de hojas de agave con los cultivos de *S. cerevisiae*, *P. stipitis* y el cultivo mixto (con las dos levaduras) se encontró que la participación de ambas levaduras al utilizar el cultivo mixto es desigual. Los resultados sugieren que *S. cerevisiae* es la levadura que domina la fermentación y es el microorganismo que consume los azúcares.

Como se observa en la Figura 19, *S. cerevisiae* tiene un buen crecimiento en los hidrolizados de agave ya que incrementa rápidamente su biomasa y consume la totalidad de los azúcares disponibles, excepto la xilosa, en 20 horas (Figura 20). Esta misma cinética se observa al utilizar el cultivo mixto (de *S. cerevisiae* y *P. stipitis*) en donde la totalidad de los azúcares son consumidos a las 20 horas de fermentación, sin embargo en éste caso, el incremento de biomasa no ocurre en la misma magnitud que ocurre en el caso del cultivo de *S. cerevisiae*, sino que para el cultivo mixto, el incremento de biomasa es tan solo la mitad del observado en el cultivo de *S. cerevisiae* a pesar de que se parte de un número de células mayor al utilizar el cultivo mixto.

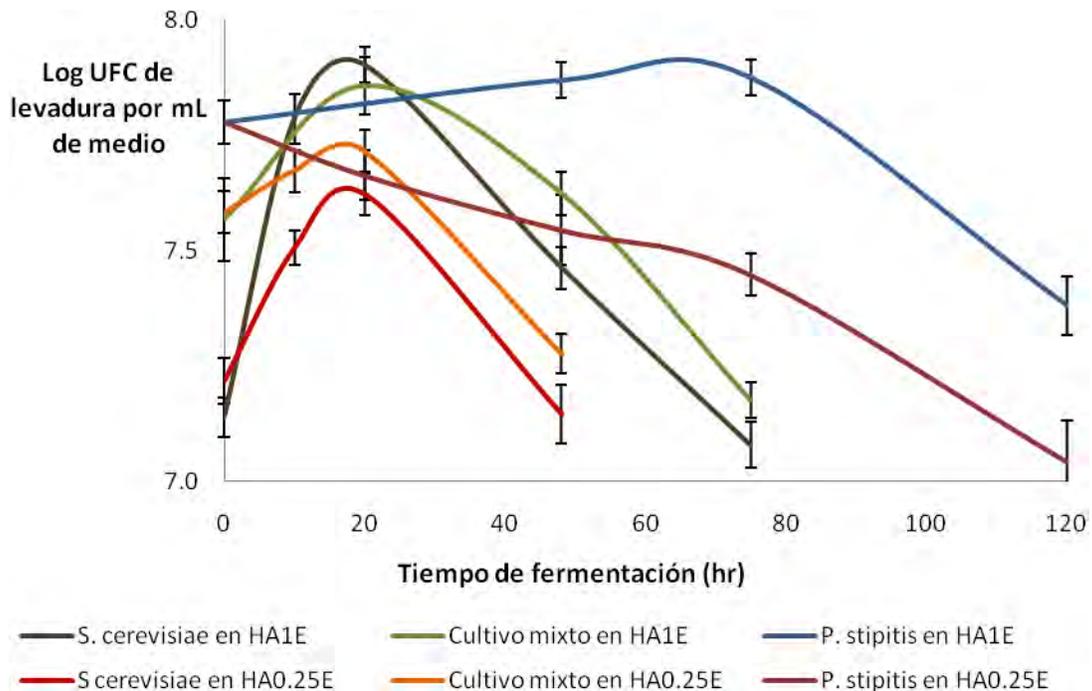


Figura 19. Conteo de células viables de *Saccharomyces cerevisiae* y *Pichia stipitis* durante la fermentación individuales y mixtas en hidrolizados de hojas de agave HA1E a 28°C en condiciones anaeróbicas determinado por el método de dispersión en placa.

La explicación a esta diferencia en incremento de biomasa se encuentra al analizar el crecimiento de *P. stipitis* en los hidrolizados HA1E y HA0.25E en donde el conteo de células no se incrementa a lo largo de toda la fermentación. Esto es un claro indicador de que el crecimiento de *P. stipitis* es inhibido por el hidrolizado de agave, ya que a pesar de saber que su crecimiento es mucho más lento que el de *S. cerevisiae* en un medio preparado, en el hidrolizado de hojas de agave es nulo.

Al comparar la actividad de *P. stipitis* en los dos hidrolizados de agave encontramos que a pesar de que en ninguno de los dos logra realizar una fermentación exitosa, su actividad es diferente en cada hidrolizado. En la Figura 19 se observa que al crecer en el hidrolizado HA1E la cantidad de células viables de *P. stipitis* se mantiene constante durante las primeras 80 horas de fermentación, y llegado este tiempo comienza a disminuir (entra en fase de muerte). En este punto de la fermentación *P. stipitis* tan solo ha consumido el 35 % de los azúcares disponibles (Figura 20).

En el hidrolizado HA0.25E la cantidad de células viables comienza a decrecer desde el inicio de la fermentación (Figura 19), esto significa que el hidrolizado HA0.25E tiene un efecto de inhibición en el metabolismo de *P. stipitis* mayor que el efecto inhibitor del hidrolizado HA1E.

Este efecto de inhibición puede ser provocado por algunos compuestos provenientes de la degradación de azúcares y ligninas durante la hidrólisis con ácido. La razón por la que este efecto sea mayor hacia *P. stipitis* es, como se explicó en la parte de antecedentes, que las cepas de *S. cerevisiae* se caracterizan por tener una mayor tolerancia hacia estos compuestos inhibidores. La razón por la que el efecto de inhibición del hidrolizado HA0.25E es mayor que el del hidrolizado HA1E puede ser el tiempo de prehidrólisis que fue de 60 min para HA0.25E y de 30 min para HA1E, lo que se ve reflejado en una mayor degradación de compuestos.

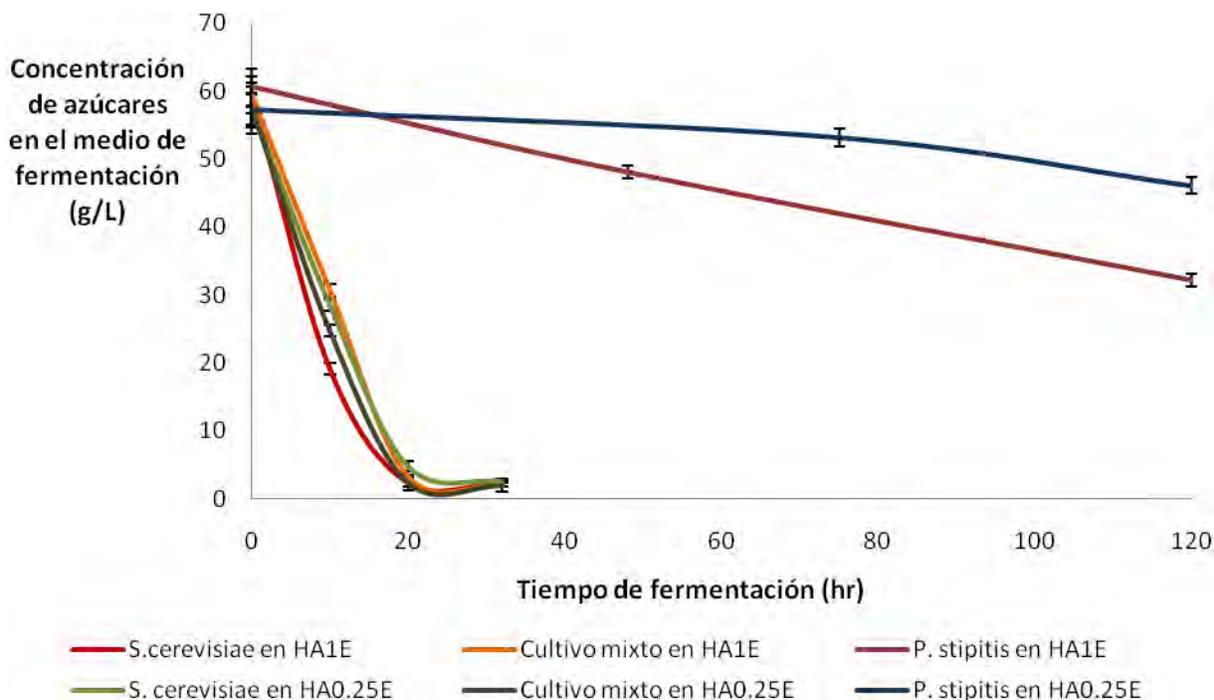


Figura 20. Consumo de azúcares durante la fermentación del hidrolizado de hojas de agave HA1E y HA0.25E a 28°C en condiciones anaeróbicas. Las fermentaciones se realizaron con cultivos de *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia stipitis* y con cultivo mixto. Las determinaciones se realizaron por cromatografía de líquidos de alta eficiencia (HPLC)

A pesar de que *S. cerevisiae* presenta una cinética similar al fermentar los dos hidrolizados, el conteo de células en el hidrolizado HA1E alcanzó un valor mayor que el conteo en el hidrolizado HA0.25E a pesar de que en ambos cultivos se partió del mismo número de células. Esto significa que posiblemente también exista un efecto de inhibición en *S. cerevisiae* el cual es mayor en el hidrolizado HA0.25E. Sin embargo el desempeño de *S. cerevisiae* al crecer en los dos hidrolizados es muy bueno ya que la fermentación es realizada completamente y en un tiempo corto, por lo que de haber un efecto inhibitorio la adaptabilidad de *S. cerevisiae* observada es muy buena.

Al analizar el consumo de cada cultivo, de cada azúcar específico en las Figuras 21, 22 y 23, encontramos que en las fermentaciones con *S. cerevisiae* la glucosa y la fructosa son consumidos simultáneamente, mientras que la xilosa no es consumida aún después de agotarse por completo la glucosa y la fructosa. En cambio en la fermentaciones con *P. stiptis* se observa que esta levadura comienza por consumir la glucosa exclusivamente, y después de 120 horas de fermentación aún no ha terminado de consumir este azúcar y por lo tanto la fructosa y la xilosa permanecen intactos.

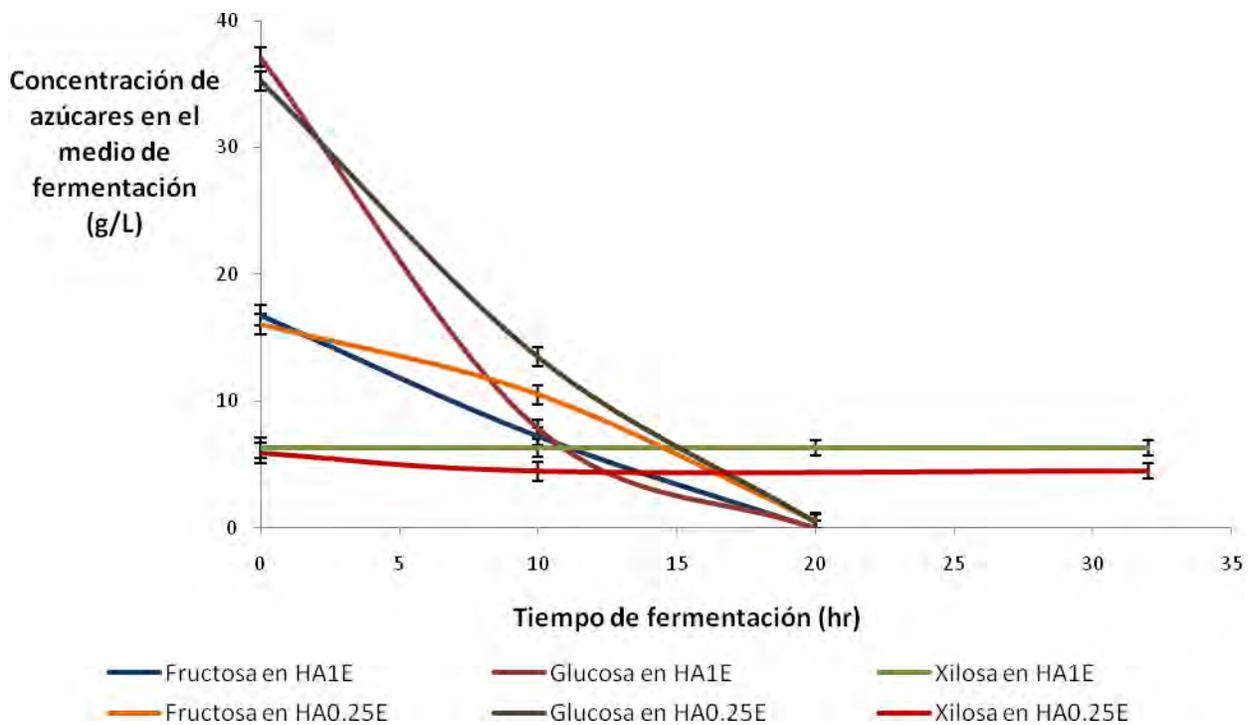


Figura 21. Consumo de azúcares durante la fermentación de los hidrolizados de hojas de agave HA1E y HA0.25E a 28°C en condiciones anaeróbicas con *S. cerevisiae*.

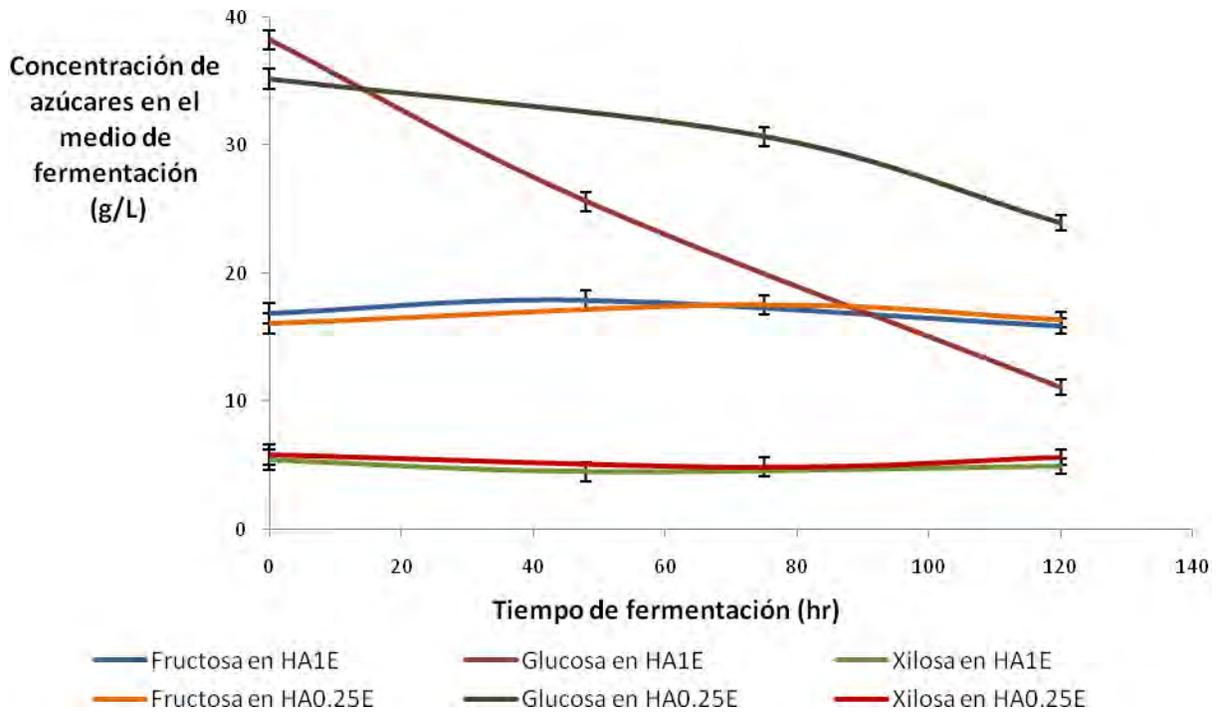


Figura 22. Consumo de azúcares durante la fermentación de los hidrolizados de hojas de agave HA1E y HA0.25E a 28°C en condiciones anaeróbicas con *P. stipitis*

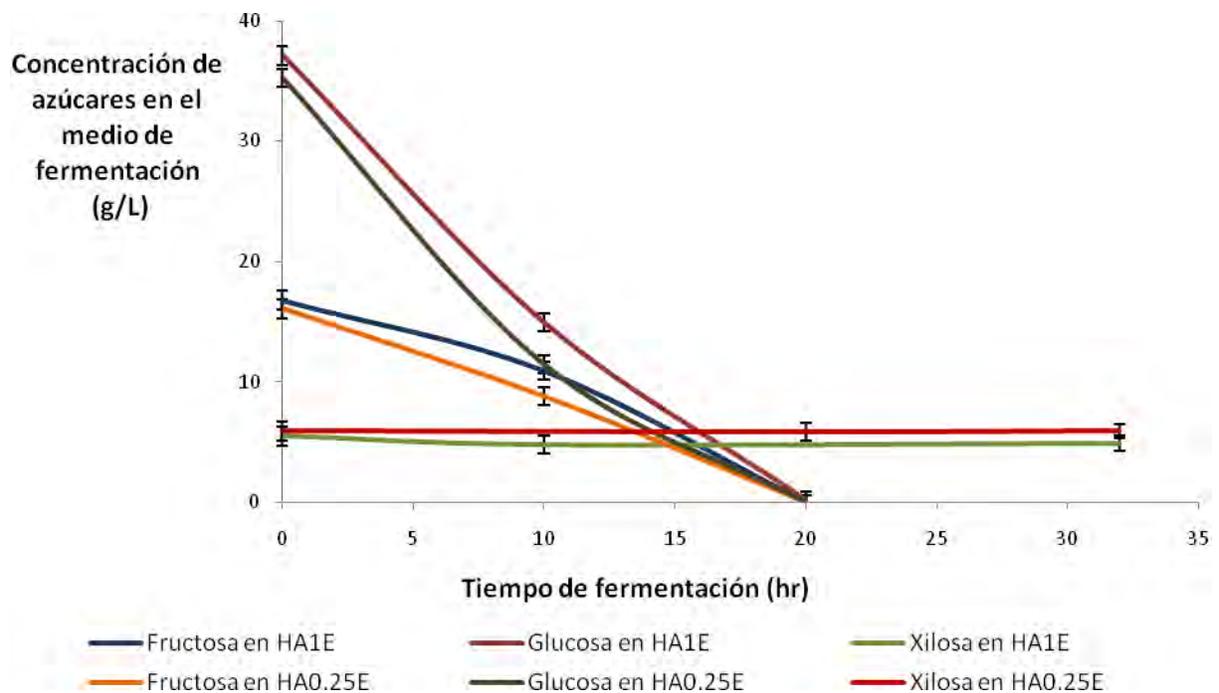


Figura 23. Consumo de azúcares durante la fermentación de los hidrolizados de hojas de agave HA1E y HA0.25E a 28°C en condiciones anaeróbicas con cultivo mixto de *S. cerevisiae* y *P. stipitis*

Estas observaciones son una indicación de que el cultivo mixto utilizado no es el adecuado, ya que la cepa de *P. stipitis* utilizada se encuentra en desventaja en la fermentación por lo que es necesario utilizar una cepa con una capacidad mayor de adaptación a este tipo de medios (hidrolizados de hojas de agave), ya que a pesar de tener la capacidad de consumir la xilosa la inhibición del medio evita que realice la fermentación.

En el caso opuesto, a pesar de que *S. cerevisiae* presentó una buena adaptación al crecer en los hidrolizados de hojas de agave, esta levadura no puede consumir la xilosa tras haber consumido el resto de los azúcares. Como se ha mencionado previamente en el capítulo 2 (antecedentes), la modificación genética de este microorganismo para incrementar su capacidad para metabolizar la xilosa es una buena alternativa lo que permitiría aprovechar la capacidad de adaptación de esta levadura observada en este estudio.

## Cuantificación de Etanol por cromatografía de gases y evaluación de rendimientos en la fermentación

En la cuantificación del etanol producido por cada cultivo en los hidrolizados de hojas de agave se encontró que tanto en los hidrolizados HA1E y HA0.25E los cultivos de *S. cerevisiae* y los cultivos mixtos (*S. cerevisiae* y *P. stipitis*) tienen un rendimiento de producción de etanol muy bueno. En la Tabla 2 se presentan los datos de la concentración final de etanol en cada medio de fermentación y el rendimiento final de etanol determinado en función del azúcar consumido.

Tabla 2. Concentración final de etanol producido en las fermentaciones de hidrolizados de hojas de agave con cultivos de *S. cerevisiae*, *P. stipitis* y cultivo mixto, y rendimientos de producción de etanol de cada cultivo

Ensayo	Concentración final de etanol (g/L)	$Y^P/S$ (g/g)	$Y^X/S$ (g/g)	$Y^P/X$ (g/g)	Productividad [etanol]/tiempo (g/Lh)
<i>S. cerevisiae</i> en HA1E	34.76	0.45	0.09	5.11	1.74
<i>P. stipitis</i> en HA1E	12.71	0.25	0.17	1.50	0.64
Cultivo mixto en HA1E	34.41	0.45	0.07	6.18	1.72
<i>S. cerevisiae</i> en HA0.25E	39.59	0.48	0.05	9.47	1.76
<i>P. stipitis</i> en HA0.25E	6.91	0.20	0.12	1.69	0.35
Cultivo mixto en HA0.25E	34.33	0.48	0.05	9.24	1.72

Por el contrario los rendimientos de etanol con el cultivo de *P. stipitis* son muy bajos, además de considerar que no consumió todos los azúcares disponibles por lo que el rendimiento se determinó a las 150 horas de fermentación, una vez que el conteo de células viables de este cultivo se encontró considerablemente disminuido.

Al comparar los valores de rendimiento de etanol obtenidos se encuentra que los rendimientos de los cultivos de *S. cerevisiae* y el mixto son muy buenos. El rendimiento teórico máximo para fermentación es de 0.51 gramos de etanol / gramos de azúcar. Los valores obtenidos son de 0.45 gramos de etanol / gramos de azúcar con estos dos cultivos en el hidrolizado HA1E y de 0.48 gramos de etanol / gramos de azúcar en el hidrolizado HA0.25E. Los rendimientos obtenidos coinciden con los valores reportados en la literatura para las fermentaciones de hidrolizados de lignocelulosa con *S. cerevisiae* (Olsson y Hahn-Hägerdal, 1996), en este estudio se reporta un rendimiento para esta levadura de 0.48 gramos de etanol / gramos de azúcar. Como se discutió en el capítulo anterior, la actividad de las levaduras en el cultivo mixto es dominada por la levadura *S. cerevisiae* por lo que el rendimiento de etanol reportado para este cultivo se le atribuye a esta levadura.

En la Figura 19 se observa que la cantidad de biomasa producida durante la fermentación es menor en el hidrolizado HA0.25E que en el HA1E, además el tiempo en el que se consumió la totalidad de los azúcares (excepto la xilosa) es el mismo. Esto explica que en la fermentación del hidrolizado HA0.25 el rendimiento de etanol obtenido sea un poco mayor que en el hidrolizado HA1E ya que en primero se consumió la misma cantidad de azúcares y produjo menos biomasa en la fermentación. Esto se confirma al observar los valores de  $Y_{x/s}$  en la tabla 1.

Los rendimientos de etanol ( $Y_{p/s}$ ) obtenidos con los cultivos de *P. stipitis* en los dos hidrolizados, 0.25 en el hidrolizado HA1E y 0.19 en el hidrolizado HA0.25E, son muy bajos al compararlos con el valor máximo teórico de rendimiento (0.51 gramos de etanol / gramos de azúcar) y con los con los cultivos de *S. cerevisiae* de 0.45 y 0.48 gramos de etanol / gramos de azúcar. A pesar de esto, su desempeño se encuentra dentro de los parámetros reportados para esta levadura, en donde se reportan rendimientos de 0.21-0.44 gramos de etanol / gramos de azúcar (Olsson y Hahn-Hägerdal, 1996).

Por último, al evaluar la productividad de etanol determinada para cada cultivo (Tabla 2) encontramos que *S. cerevisiae* tiene una mayor capacidad para producir etanol que *P. stipitis*, lo que la hace un microorganismo superior para la producción de etanol ya que además de producir etanol con un rendimiento alto, lo hace rápidamente. El valor de productividad de *S. cerevisiae* en fermentaciones de hidrolizados de lignocelulosa es de 1.5 g/Lh (Olsson y Hahn-Hägerdal, 1996). El valor obtenido en este trabajo es un poco más alto de 1.7 g/Lh.

Es importante comparar éstos valores de rendimiento y productividad para *S. cerevisiae* con los valores reportados para otro microorganismos utilizados para este propósito. Dentro de estos microorganismos se menciona a *Zymomonas mobilis*, con este se han reportado valores productividad de 3.5 g/Lh. Por otro lado, también se ha estudiado la fermentación de hidrolizados de lignocelulosa con *Pachysolen tannophilus*, *Kluyveromyces marxianus*, y *Escherichia coli*. Los dos primeros producen etanol con rendimientos bajos comparados con los obtenidos con *S. cerevisiae* en este trabajo (0.12-0.29 y 0.24-0.30 gramos de etanol / gramos de azúcar). Con el tercero, se han reportado rendimientos de 0.36-0.51 gramos de etanol / gramos de azúcar respectivamente, sin embargo tiene la desventaja de que da rendimientos muy bajos (0.03 a 0.67 gramos de etanol / gramos de azúcar) (Kádár *et al.*, 2004) y (Olsson y Hahn-Hägerdal, 1996).

## CONCLUSIONES

Los tratamientos ácido-enzimáticos son más eficientes que los tratamientos ácidos para la hidrólisis de los polisacáridos de las hojas de agave, a partir de estos se obtuvieron rendimientos de 66 gramos de azúcares reductores por 100 gramos de hojas de agave (bs)

Este rendimiento máximo se obtuvo realizando una prehidrólisis con ácido en concentraciones de 0.1 a 1% durante 60 minutos a 120 °C seguido de un tratamiento con enzimas durante 24 hrs.

El pretratamiento de las hojas de agave es una etapa importante para facilitar la hidrólisis e incrementar los rendimientos de azúcares obtenidos.

Los azúcares encontrados en los hidrolizados de hojas de agave son glucosa en 53 g/L, fructosa en 23 g/L y xilosa en 6 g/L.

*S. cerevisiae* se adaptó bien al fermentar los hidrolizados de agave y logró metabolizar la totalidad de los azúcares disponibles (excepto la xilosa) con un rendimiento de 0.48 g/g y una productividad de 1.7 g/Lh por lo que es un buen microorganismo para este propósito.

*Pichia stipitis* tuvo un desempeño deficiente ya que su adaptabilidad hacia los hidrolizados de agave es muy baja y su rendimiento de 0.25 g/g y productividad de 0.64 g/Lh son muy bajos.

Las hojas de agave son una buena fuente de biomasa para la producción de bioetanol ya que a partir de su hidrólisis se obtienen sustratos con una gran cantidad de azúcares y además, estos hidrolizados son fermentables.

La utilización de un cultivo mixto de *S. cerevisiae* y *P. stipitis* no tuvo un buen resultado ya que no se logró fermentar la xilosa.

## RECOMENDACIONES

Para proponer la utilización de las hojas de agave es importante el estudiar el método de hidrólisis propuesto en agaves de diferentes regiones ya que la composición de la fibra de las hojas de agave puede hacer que los métodos de hidrólisis varíen dependiendo de las condiciones ambientales en las que el agave sea cultivado.

También es importante considerar la posible aplicación de este estudio a otro para la bioconversión de las hojas de los agaves provenientes de la producción del mezcal que al igual que las hojas del agave pueden ser una materia prima potencial para la producción de bioetanol además de ser una alternativa para el aprovechamiento de estos residuos.

Dado que el propósito de este trabajo es realizar una evaluación de las hojas de agave como posible fuente de biomasa para la producción de etanol, es posible optimizar los métodos de hidrólisis propuestos, para esto es necesario realizar ensayos de hidrólisis nuevos utilizando como base los hallazgos mostrados en este trabajo.

Ya que el objetivo que se planteó en éste trabajo fue el de utilizar fermentar todos los azúcares disponibles en los hidrolizados de agave (especialmente la xilosa), es importante buscar microorganismos que puedan fermentar éste azúcar y que tengan la capacidad de adaptarse mejor a estos medios de cultivo y que produzcan etanol con rendimientos más altos.

Por último, se puede considerar el trabajo con microorganismos modificados genéticamente, ya que esto permitiría aprovechar las cualidades de un microorganismo para crear uno nuevo con capacidades mejoradas para los fines propuestos. En este caso es importante mejorar la capacidad de *S. cerevisiae* para consumir xilosa ya que se encontró que es un microorganismo que puede producir etanol con buenos rendimientos además de tener una gran adaptabilidad a los hidrolizados de agave.

## BIBLIOGRAFÍA

Agarwal, A.K. (2007) Biofuels (alcohols and biodiesel) applications as fuels for internal combustion engines. *Progress in energy and combustion science* 33:233-271

Aguilar, R., Ramírez, J.A., Garrote, G., Vázquez, M. (2002) Kinetic study of the acid hydrolysis of sugar cane bagasse. *Journal of Food Engineering* 55:309-318

Balat, M., Balat, H., Öz, C. (2008) Progress in bioethanol processing: Progress in Energy and combustion science 34:551-573

Bai, F.W., Anderson, W. A., Moo-Young, M. (2008) Ethanol fermentation technologies from sugar and starch feedstocks. *Biotechnology advances* 26:89-105

Chiang, S., Berger, A., Shonnard, D. (2008) Kinetic characterization for dilute sulfuric acid hydrolysis of timber varieties and switchgrass. *Bioresource Technology* 99:3855-3863

Demirbas, A. (2008) Biofuels sources, biofuel policy, biofuel economy and global biofuel projections. *Energy conversion and management* 49:2106-2116

Demirbas, A. (2009) Biofuels securing the planet's future energy needs. *Energy conversion and management* 50:2239-2249

Dien, B.S., Li, X.-L., Iten, L. B., Jordan, D. B., Nichols, N. N., O'Bryan, P. J., Cotta, M. A. (2006) Enzymatic saccharification of hot-water pretreated corn fiber for production of monosaccharides. *Enzyme and Microbial Technology* 39:1137-1144

González, Y., González, O., Hungaray, J. (2005) Potencial del bagazo de agave tequilero para la producción de bioplímeros y carbohidrasas por bacterias celulolíticas y para la obtención de compuestos fenólicos. *e-Gnosis* 3 (14):1-18

Hahn-Hägerdal, B., Jeppsson, H., Skoog, K., Prior, B.A. (1994) Biochemistry and physiology of xylose fermentation by yeasts. *Enzyme and Microbial Technology* 16:933-941

Hernández, M. (2007) Tendencias actuales en la producción de bioetanol. Facultad de ingeniería Universidad Rafael Landívar. Boletín electrónico no. 8

Iñiguez, G., Díaz, R., Sanjuan, R., Anzaldo, J., Rowell, R. (2001) Utilization of by-products from the tequila industry. Part 2: potential value of *Agave tequilana* Weber azul leaves. *Bioresource technology* 77:101-108

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

Knill, C.J y Kennedy, J.F. (2005) Cellulosic biomass derived products. En, *Polysaccharides structural diversity and functional versatility*. Dumitriu, S. New York, Marcel Dekker. pp. 940, 938

Kumar, R., Singh, S., Singh, Om V. (2008) Bioconversion of lignocellulosic biomass: biochemical and molecular perspectives. *J Ind Microbiol Biotechnol* 35:377-391

Linde, E., Jakobsson, E., Galbe, M., Zacchi, G. (2008) Steam pretreatment of dilute H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-impregnated wheat straw and SSF with low yeast end enzyme loadings for bioethanol production. *Biomass and Bioenergy* 32:326-332

Nigam, J. (2001) Ethanol production from wheat straw hemicellulose hydrolysate by *Pichia stipitis*. *Journal of Biotechnology* 87:17-27

Nigam, J. (2002) Bioconversion of water-hyacinth (*Eichhornia crassipes*) hemicellulose acid hydrolysate to motor fuel ethanol by xilose-fermentating yeast. *Journal of Biothechnology* 97:107-116

Mollet, L. (1996) Handbook of food analysis, Vol 1. Marcel Dekker, Inc. New York, pp. 542,,543, 548, 557-560, 565

Olsson, L. y Hahn-Hägerdal, B. (1996) Fermentation of lignocellulosic hydrolysates for ethanol production. *Enzyme and microbial technology* 18:312-331

Palmqvist, E. y Hahn-Hägerdal, B. (2000) Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. I: inhibition and detoxification. *Bioresource Technology* 74:17-24

Sánchez, O. y Cardona, C. (2008) Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks. *Bioresource Technology* 99:5270-5295

Taniguchi, M., Tohma, T., Itaya, T., Fujii, M. (1997) Ethanol production from a mixture of glucosa and xylose by co-culture of *Pichia stipitis* and a respiratory-deficient mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of fermentation and bioengineering* 83:364-370

Tan, K. T., Lee, K. T., Mohames, A. R. (2008) Role of energy policy in renewable energy accomplishment: The case of second-generation bioethanol. *Energy Policy* 36:3360-3365

Tello, A. (2001) Usos del bagazo de agave. *Gaceta universitaria UDG*. <http://gaceta.udg.mx>

Vieira, E., Jackson de Moraes, G., Andrade, J., Batista, J. (2007) Optimization of acid hydrolysis from the hemicellulosic fraction of *Eucalyptus grandis* residue using response surface methodology. *Bioresource Technology* 98:422-428

Wyman, C.E., Decker, S.R., Himmel, M.E., Brady, J.W., Skopec, C.E., Vikari, L. (2005) Hydrolysis of cellulose and Hemicellulose. En *Polysaccharides structural diversity and functional versatility*. Dumitriu, S. New York, Marcel Dekker. pp. 1017

## ANEXO

**Cálculo realizado para determinar la cantidad de ácido sulfúrico 98% a adicionar a las muestras de agave pretratadas para obtener las concentraciones de ácido deseadas para realizar la hidrólisis.**

Se utilizó la ecuación mostrada a continuación para determinar la cantidad de ácido sulfúrico a adicionar:

$$\left[ g \text{ agave} \times \left( \frac{\% \text{ humedad de agave}}{100} \right) \right] + mL \text{ H}_2\text{O} \text{ adicionada} = mL \text{ de H}_2\text{O} \text{ en muestra}$$

$$mL \text{ de H}_2\text{SO}_4 \text{ 98\% a adicionar} = \frac{(Conc. \text{ de H}_2\text{SO}_4 \text{ desecada})(mL \text{ de H}_2\text{O} \text{ total})}{* 98\%}$$

\* = concentración de ácido sulfúrico concentrado

### **Realización de curva patrón para cuantificación de azúcares reductores por el método de DNS**

Para realizar la cuantificación se realiza una curva patrón con el azúcar que se desea cuantificar. Se deben preparar al menos cinco puntos de esta curva que correspondan a las concentraciones de 0.2 a 2 miligramos de azúcar por mililitro de muestra. Una vez preparadas las soluciones se toma una alícuota de cada solución y se realiza la reacción con el reactivo de DNS de igual manera que se realiza con las muestras. Una vez preparadas las muestras se determinó su absorbancia a 540 nm con un espectrofotómetro ...

Con los datos obtenidos de la curva patrón se realiza la regresión lineal de la curva y se obtiene la ecuación siguiente:

$$\text{Absorbancia de la muestra} = m \left( \frac{mg \text{ de glucosa}}{mL} \right) - \text{ord. al origen}$$

Esta ecuación permite relacionar los valores de absorbancia obtenidos en la reacción de DNS con la concentración de azúcares reductores de una muestra. Para esto se despeja la variable independiente de la ecuación (concentración de azúcares) y se sustituyeron los valores de absorbancia obtenidos en las muestras que se desea analizar.

El reactivo DNS se prepara disolviendo 1g de ácido 3,5-dinitrosalicílico en 50 mL de agua destilada, se adicionan 20 mL de sosa 2 N y se disuelve muy bien. Una vez disuelto se adicionan 30 g de tartrato doble de sodio y potasio y se disuelve bien. Este reactivo se afora a 100 mL con agua destilada y se almacena en frasco ámbar protegida de CO<sub>2</sub>.

### **Realización de curva patrón para cuantificación de fructosa, glucosa y xilosa por método de HPLC**

Para realizar la cuantificación de los azúcares se realizaron curvas patrón para cada azúcar que se midió, una de glucosa, una de xilosa y una de fructosa. Se utilizaron cinco puntos para realizar cada curva patrón, estos cinco puntos correspondientes a las concentraciones de azúcar de 50, 35, 25, 1 y 5 g/L.

Para preparar las soluciones estándar correspondientes a los puntos de la curva patrón se partió de una solución estándar al 10 g/L de cada azúcar (glucosa, xilosa y fructosa), estas soluciones se prepararon pesando exactamente 10 gramos de cada azúcar en un matraz aforado de 100 mL. Una vez pesados los tres azúcares se adicionó agua desionizada hasta llegar a la marca del aforo del matraz. A partir de esta solución estándar se realizaron las diluciones necesarias para obtener las concentraciones deseadas mencionadas anteriormente. El agua desionizada se filtro utilizando una membrana millipore de tamaño de poro de 0.45 nm antes de ser utilizada para preparar las soluciones.

## **Preparación de medio PDA (Papa-Dextrosa acidificado)**

El medio de Papa-Dextrosa acidificado se preparó disolviendo 3.9g de medio preparado deshidratado en 100mL de agua destilada seguido de su esterilización a 121°C por 15 minutos, una vez estéril se dejó enfriar hasta 50°C y se adicionaron 1.4 mL de una solución de ácido tartárico al 10%(p/v). Después de mezclar bien se vertieron 10 mL de agar en tubos de ensayo con taparrosca estériles de capacidad de 25 mL, se dejó enfriar el agar manteniendo los tubos con una inclinación de 25° con respecto a la horizontal.