



**Centro de Investigación en Alimentación y
Desarrollo, A.C.**

**OPTIMIZACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE BIOETANOL A
PARTIR DE BIOMASA LIGNOCELULÓSICA DE *Jatropha
platyphylla* Mull. CON *Kluyveromyces marxianus***

Por:

IQ. Ramón Guadalupe López López

TESIS APROBADA POR LA

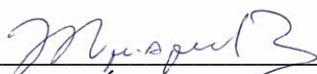
COORDINACIÓN DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA PARA PRODUCTOS AGRÍCOLAS DE
ZONAS TROPICALES Y SUBTROPICALES

Como requisito parcial para obtener el grado de

MAESTRO EN CIENCIAS

APROBACIÓN

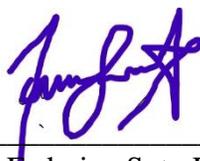
Los miembros del comité designado para la revisión de la tesis de Ramón Guadalupe López López la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestro en Ciencias.



Dr. Miguel Ángel Angulo Escalante
Director de Tesis



Dr. José Basilio Heredia
Integrante del comité de tesis



Dr. Federico Soto Landeros
Integrante del comité de tesis



Dr. Eber Addí Quintana Obregón
Integrante del comité de tesis

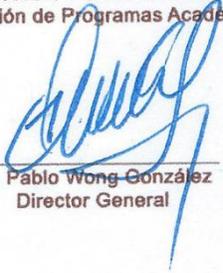
DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

La información generada en la tesis “Optimización de la Producción de Bioetanol a partir de Biomasa de Lignocelulósica de *Jatropha platyphylla* Mull. con *Kluyveromyces marxianus*” es propiedad intelectual del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD). Se permiten y agradecen las citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial del autor Ramón Guadalupe López López, siempre y cuando se dé crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita de quien ocupe la titularidad de la Dirección General del CIAD.

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis, deberá dar los créditos al CIAD, previa autorización escrita del manuscrito en cuestión del director(a) de tesis.



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN
ALIMENTACIÓN Y DESARROLLO, A.C.**
Coordinación de Programas Académicos


Dr. Pablo Wong González
Director General

AGRADECIMIENTOS

Primeramente, me gustaría agradecer al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo económico brindado durante el lapso que duró mi estancia en la maestría, y con esto poder ostentar un título de posgrado.

De la misma forma le agradezco al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C., en especial a la coordinación Culiacán que me acogió como una segunda casa, permitiéndome llegar a mis metas como investigador científico.

Le agradezco al Dr. Miguel Ángel Angulo Escalante primeramente por tener fe en mí, y brindarme recursos y conocimientos esenciales no solo para mi trabajo de investigación sino también para mi formación como científico, de igual manera por desempeñar un admirable papel como mi director de tesis.

A mi asesor Dr. Federico Soto Landeros le agradezco por los conocimientos que me brindó tanto en la ciencia como en la vida, a su disposición y ayuda para el trabajo de campo, y recordarme que nunca es tarde para cumplir tus sueños.

A mis asesores Dr. Eber Addí Quintana Obregón y Dr. José Basilio Heredia por siempre estar ahí cuando tuviera alguna duda y tratar de la manera más amable de brindarme sus conocimientos en el tema, de igual manera de brindarme todo lo que estuviera a su alcance para proseguir con mi trabajo de investigación.

CONTENIDO

APROBACIÓN	2
DECLARACIÓN INSTITUCIONAL	2
AGRADECIMIENTOS	4
CONTENIDO	5
LISTA DE FIGURAS	7
LISTA DE CUADROS	8
RESUMEN	9
ABSTRACT	10
1. INTRODUCCIÓN	11
2. ANTECEDENTES	13
2.1. Recursos Energéticos a Base del Petróleo y su Daño al Ambiente	13
2.2. Biocombustibles: Bioetanol.....	14
2.2.1. Bioetanol de Primera Generación	16
2.2.2. Bioetanol de Segunda Generación	17
2.3. Biomasa Lignocelulósica.....	17
2.3.1. Celulosa.....	18
2.3.2. Hemicelulosa.....	18
2.3.3. Lignina	19
2.4. <i>Jatropha platyphylla</i>	19
2.4.1. Hoja.....	20
2.4.2. Cascarilla del Fruto	21
2.4.3. Material de Poda	21
2.5. Pretratamiento de la Biomasa Lignocelulósica	22
2.6. Aplicaciones Biotecnológicas de las Levaduras.....	23
2.6.1. <i>Kluyveromyces marxianus</i>	26
2.7. Proceso de Producción de Bioetanol Utilizando la Levadura <i>Kluyveromyces</i> <i>marxianus</i>	27
2.7.1. Sustrato	28
2.7.2. Temperatura	29
2.7.3. Potencial de Hidrógeno (pH)	30
2.7.4. Tiempo	31
2.7.5. Agitación.....	31
2.7.6. Resistencia al Etanol	31
2.7.7. Interacción con Compuestos Bioactivos	32
2.7.8. Otros Factores	33
3. PLANTEAMIENTO DE PROBLEMA	34
4. PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN	35

CONTENIDO (Continuación)

5. HIPÓTESIS	36
6. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN	37
7. JUSTIFICACIÓN	38
8. OBJETIVOS	39
8.1. Objetivo General.....	39
8.2. Objetivos Específicos	39
9. MATERIALES Y MÉTODOS	40
9.1. Etapa 1: Proceso de Sacarificación.....	40
9.1.1. Material Vegetal.....	40
9.1.2. Sacarificación.....	40
9.1.3. Concentración de Azúcares Totales.....	41
9.1.4. Concentración de Azúcares Reductores Totales.....	41
9.1.5. Análisis Estadístico.....	41
9.1.6. Fórmulas	42
9.1.6.1. Máxima concentración teórica de azúcares reductores totales.....	42
9.1.6.2. Eficiencia del proceso de hidrólisis.....	42
9.2. Etapa 2: Proceso de Fermentación.....	43
9.2.1. Cepa de Levadura	43
9.2.2. Fermentación.....	43
9.2.3. Concentración de Etanol	44
9.2.4. Unidades Formadoras de Colonias de <i>Kluyveromyces marxianus</i>	44
9.2.5. Análisis Estadístico.....	45
9.2.6. Fórmulas	45
9.2.6.1. Producción de etanol teórica	45
9.2.6.2. Eficiencia de la fermentación.....	46
10. RESULTADOS Y DISCUSIONES	47
10.1 Etapa 1: Proceso de Sacarificación.....	47
10.1.1. Azúcares Totales.....	47
10.1.2. Azúcares Reductores Totales.....	51
10.2. Etapa 2: Proceso de Fermentación.....	55
10.2.1. Producción de Etanol	56
10.2.1.1. Fermentación sin extracción de compuestos bioactivos	56
10.2.1.2. Fermentación con extracción de compuestos bioactivos	59
10.2.2. Unidades Formadoras de Colonias de <i>Kluyveromyces marxianus</i>	61
10.2.2.1. Sin extracción de compuestos bioactivos.....	61
10.2.2.2. Con extracción de compuestos bioactivos	63
11. CONCLUSIONES	66
12. RECOMENDACIONES	67
13. REFERENCIAS	68

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Materias primas utilizadas para la producción de energía a nivel mundial en 2018	13
2	Generación de energía a base de biocombustibles líquidos a nivel mundial en 2018.....	16
3	Composición química de a) Hoja y b) Cascarilla de fruto de <i>J. platyphylla</i>	21
4	Aplicaciones biotecnológicas de las levaduras (Adaptado de Walker, 1998)...	25
5	Gráfica de superficie de azúcares totales.....	50
6	Gráfica de contorno de azúcares totales.....	50
7	Gráfica de superficie de azúcares reductores totales.....	54
8	Gráfica de contorno de azúcares reductores totales.....	54
9	Unidad formadora de colonias de <i>Kluyveromyces marxianus</i> en una dilución 10^{-6} , antes del proceso de fermentación sin la extracción previa de compuestos inhibidores	62
10	Unidad formadora de colonias de <i>Kluyveromyces marxianus</i> en una dilución 10^{-6} , antes del proceso de fermentación con la extracción previa de compuestos inhibidores.....	64
11	Unidad formadora de colonias de <i>Kluyveromyces marxianus</i> , después del proceso de fermentación con la extracción previa de compuestos inhibidores..	65

LISTA DE CUADROS

Cuadros		Página
1	Levadura biotecnológicamente importante (Johnson, 2013a, b).....	24
2	Materias primas lignocelulósicas para la producción de bioetanol utilizando a <i>Kluyveromyces marxianus</i>	29
3	Análisis de varianza para azúcares totales.....	47
4	Análisis de varianza modificado para azúcares totales.....	48
5	Análisis de varianza para azúcares reductores totales.....	51
6	Análisis de varianza modificado para azúcares reductores totales.....	52
7	Variables asignadas a cada corrida experimental.....	56

RESUMEN

La utilización de los combustibles fósiles ha generado problemas ambientales y de salud pública. Una alternativa no fósil para la generación de energía en la industria del transporte, es el bioetanol. La primera generación de bioetanol se produce a partir de fuentes destinadas a la alimentación humana, lo cual suscitó preocupación por el aumento en el precio de los alimentos. Por lo tanto, se propone emplear la biomasa lignocelulósica del cultivo vegetal de *Jatropha platyphylla* como materia prima para la producción de bioetanol de segunda generación utilizando la levadura termotolerante *Kluyveromyces marxianus* CDBB-L-1444. En este estudio se utilizó una metodología de superficie de respuesta (MSR) Box-Behnken para optimizar el proceso de pretratamiento (hidrólisis química) con cinco variables: temperatura (50-100 °C), carga inicial de biomasa (1-5%), tiempo de pretratamiento (30-60 min), tipo de biomasa (hoja, cascarilla o material de poda) y el tipo de reactivo (NaOH o H₂SO₄). Igualmente se planteó una MSR Box-Behnken para optimizar el proceso de fermentación implementando tres variables: temperatura (35-45 °C), la agitación (150-200 rpm) y el tiempo (24-72 h). La máxima concentración de azúcares reductores totales (ART) encontrada en las biomásas de *J. platyphylla* fue de 4.44 g/L a una temperatura de 100 °C, tiempo de 48 min y carga inicial de biomasa de 5%. La biomasa con mayor concentración de azúcares fue la hoja y el tratamiento que liberó más azúcares reductores fue el alcalino con hidróxido de sodio (NaOH) al 3%. La variable tiempo no fue significativa para el modelo propuesto. La máxima concentración de bioetanol resultante de la hoja de *J. platyphylla* hidrolizada fue de 0.154 g/L, y no fue posible realizar la optimización de la fermentación. Sin embargo, al remover los compuestos inhibidores presentes en la hoja y posterior se obtuvo un rendimiento de etanol de 0.9 g/L y la eficiencia de la fermentación fue 59.6%. Por lo tanto, remover los compuestos inhibidores presente en la biomasa de *J. platyphylla* es necesario para desarrollar un modelo de producción de etanol que puede ser redituable y eficiente.

Palabras clave: Bioetanol, *Jatropha platyphylla*, *Kluyveromyces marxianus* CDBB-L-1444, Biomasa lignocelulósica.

ABSTRACT

The exploitation of fossil fuels has led to increased environmental and public health problems. An alternative to gasoline for energy generation in the transportation industry is bioethanol. The first generation of bioethanol is produced from edible materials, increase raising concerns about increased food prices. It is proposed to use lignocellulosic biomass from the *Jatropha platyphylla* plant crop as a feedstock source to produce second-generation bioethanol using the thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus* CDBB-L-1444. A Box-Behnken response surface method (RSM) was used to optimize the pretreatment process (chemical hydrolysis) using five variables: temperature (50-100 °C), initial biomass loading (1-5%), pretreatment time (30-60 minutes), type of biomass (leaf, husk or pruning) and type of chemical reagent (NaOH or H₂SO₄). A Box-Behnken MSR was also proposed to optimize the fermentation process using three variables: temperature (35-45 °C), agitation (150-200 rpm), and time (24-72 h). The maximum concentration of total reducing sugars (ART) found in *J. platyphylla* biomasses was 4.44 g/L at 100 °C, 48 min, and initial biomass load of 5%. The biomass with the highest amount of sugars was leaf, and the chemical reagent that released more reducing sugars was sodium hydroxide (NaOH). It was found that the time variable was not significant for the model. The maximum concentration of bioethanol resulting from hydrolyzed *J. platyphylla* leaf was 0.154 g/L, and it was not possible to optimize the fermentation because only one experimental run produced ethanol. Therefore, the inhibitory compounds present in the *J. platyphylla* leaf were removed, and a fermentation was carried out to evaluate the effect of the inhibitory compounds on ethanol production. In the fermentation carried out after removing the inhibitory compounds, an ethanol yield equal to 0.9 g/L was produced, and the fermentation efficiency was 59.6%. Therefore, it is necessary to remove the inhibitory compounds present in the raw material to have a more profitable and efficient ethanol production model.

Keywords: Bioethanol, *Jatropha platyphylla*, *Kluyveromyces marxianus* CDBB-L-1444, Lignocellulosic biomass.

1. INTRODUCCIÓN

El aumento de la población mundial y las actividades económicas generan una alta demanda de energía. En consecuencia, el suministro de reservas de fuentes fósiles de energía disminuye. La explotación y alto consumo de combustibles fósiles ha aumentado problemas ambientales, iniciando problemas de salud para los seres vivos; además, los recursos energéticos fósiles son limitados (Tahir y Mezori, 2020). La utilización de la energía generada de combustibles fósiles contribuye al calentamiento global y la contaminación ambiental (Yucel y Aksu, 2015). Una alternativa para la generación de energía es el bioetanol. La producción industrial de bioetanol combustible es un proceso bien establecido para la generación de un biocombustible líquido que puede mezclarse con gasolina o usarse como un combustible único, según el tipo de motor (Claassen *et al.*, 1999; Sathendra *et al.*, 2018). El bioetanol de primera generación se produce a partir de materiales con almidón como el maíz, la yuca, el trigo, la soja, etc. y algunos otros materiales ricos en monosacáridos como la caña de azúcar. El bioetanol derivado de la caña de azúcar y el almidón de maíz se han producido a escala industrial (Claassen *et al.*, 1999). Aunque los sustratos utilizados para la producción de bioetanol de primera generación dieron el máximo rendimiento, suscitó preocupación por el aumento de los precios de los alimentos y mostró una demanda desafiante de esos productos (Sathendra *et al.*, 2018). Debido a limitaciones éticas, se utilizaron materiales no comestibles como la biomasa lignocelulósica para la segunda generación de bioetanol (Limayem y Ricke, 2012). La biomasa lignocelulosa es uno de los biopolímeros más abundantes en la tierra, la cual se compone principalmente de tres polímeros: celulosa, hemicelulosa y lignina, que se unen firmemente entre sí, formando una matriz de estructura rígida (Abril y Navarro, 2012). El bioetanol de segunda generación genera un reciclaje en el carbono, ya que el dióxido de carbono emitido después del proceso de combustión de bioetanol es utilizado en la fotosíntesis para el creciente vegetal, y este material vegetal a su vez se puede utilizar para la producción de bioetanol; lo que indica que el bioetanol permanece en un ciclo cerrado de carbono (Yucel y Aksu, 2015). Sin embargo, la estructura compleja de la lignocelulosa requiere un paso de pretratamiento para producir monosacáridos para su mejor aprovechamiento en la fermentación (Kumar *et al.*, 2009).

Jatropha platyphylla Muell. (*Euphorbiaceae*) es una especie de árbol endémico de México y se

localiza en regiones de clima cálido, asociada a la selva baja caducifolia en la costa del pacífico, desde Sinaloa hasta Michoacán. El fruto de *J. platyphylla* es utilizado por los pobladores de comunidades de la sindicatura de Tacuichamona, Culiacán, Sinaloa, México en la elaboración de alimentos tradicionales (Makkar *et al.*, 2011). El producto derivado del consumo del fruto es la cascarilla, mientras que los productos derivados de la cosecha de la planta son las hojas y tallos, y debido a un buen manejo agronómico se genera como residuo la poda. Pero como se mencionó anteriormente la biomasa lignocelulósica como la de *J. platyphylla* no solo cuenta con celulosa, sino que también cuenta con hemicelulosa la cual es un heteropolisácarido conformado por distintos monosacáridos como la xilosa.

La conversión microbiana eficiente de xilosa y glucosa en etanol es esencial para la producción económica de etanol a partir de biomasa lignocelulósica (Jeffries y Jin, 2004). *Saccharomyces cerevisiae* es uno de los microorganismos más exitosos y ampliamente utilizados para la producción de etanol, esta levadura es capaz de producir altas concentraciones de etanol a partir de glucosa, pero no puede utilizar xilosa para el crecimiento y la fermentación de etanol, además no es la especie de levadura más adecuada para cultivos superiores a 40 °C (Della-Bianca y Gombert, 2013; Caspeta *et al.*, 2014). Las levaduras termotolerantes son aquellas que resisten a altas temperaturas ($T \geq 40$ °C) (Koedrich *et al.*, 2008). La producción de bioetanol a alta temperatura tiene el potencial de disminuir los niveles de contaminación, reducir los gastos de energía y agua necesarios para enfriar fermentadores, reducir la entrada de energía involucrada en la destilación y facilitar el uso de vacío para extraer el bioetanol directamente del caldo de fermentación (Madeira-Jr y Gombert, 2018). En consecuencia, es probable que la fermentación a alta temperatura sea mucho más rentable y práctica para la producción de etanol a partir de biomasa lignocelulósica, aunado a esto, las cepas microbianas termotolerantes capaces de producir una cantidad sustancial de etanol tienen una gran demanda para fermentaciones a altas temperaturas (Madeira-Jr y Gombert, 2018). La levadura termotolerante *Kluyveromyces marxianus* es un organismo prometedor porque utiliza xilosa como fuente de carbono (Margaritis y Bajpai, 1982) y puede crecer a temperaturas de 45-52 °C (Banat *et al.*, 1992), con eficiencia de fermentación similar a la de *S. cerevisiae* a 30° C (Abdel-Banat *et al.*, 2010). El objetivo de esta investigación fue maximizar el rendimiento de bioetanol implementando como materia prima la biomasa lignocelulósica del cultivo de *J. platyphylla* utilizando la levadura termotolerante *K. marxianus*.

2. ANTECEDENTES

2.1. Recursos Energéticos a Base del Petróleo y su Daño al Ambiente

La materia prima más utilizada en la actualidad para la producción de energía es el petróleo y sus derivados (Figura 1). Para proveer de energía a los seres humanos es necesario un promedio de 90 millones de barriles de petróleo por día a nivel mundial. El proceso para la formación de petróleo en el medio ambiente es de miles de millones de años y se forma por descomposición anaeróbica de organismos muertos enterrados, existiendo un desbalance entre la generación y el consumo, tiende a su agotamiento (Sivarathnakumara *et al.*, 2019). Actualmente el aumento de la población y su subsecuente producción industrial para satisfacer éste nuevo mercado de demanda energética, requiere de una demanda creciente de energía conllevando en un aumento en el uso de combustibles a base de petróleo. Se estima que en un lapso de 6 años crezca hasta 105 millones de barriles de petróleo a nivel mundial por día (IEA, 2020). El uso de grandes cantidades de energía fósil ha conducido al incremento del calentamiento global y la contaminación ambiental (Tahir y Mezori, 2020).

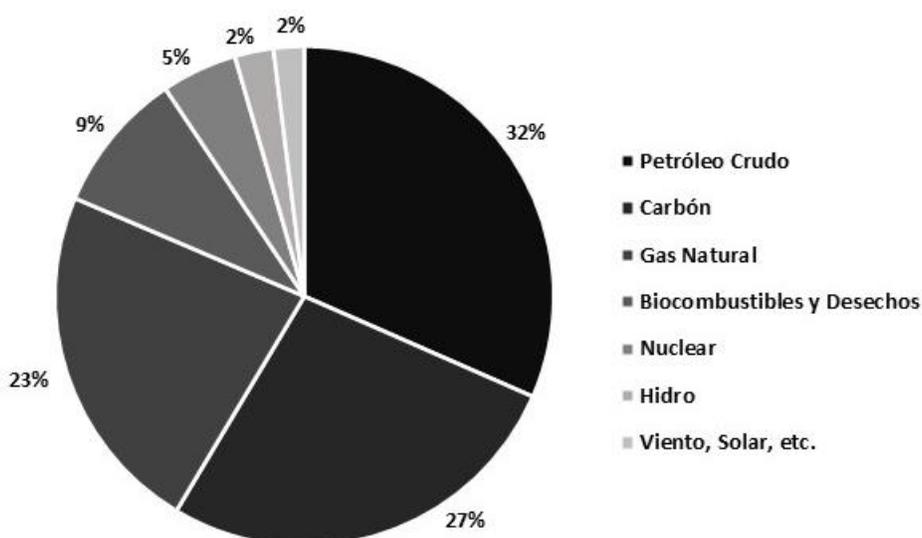


Figura 1. Materias primas utilizadas para la producción de energía a nivel mundial en 2018 (IEA, 2018).

Uno de los derivados del petróleo es la gasolina, la cual se utiliza principalmente para la generación de energía para los medios de transporte. Su demanda aumenta a medida que se incrementa la población, sin embargo, no solo es preocupante el alto consumo de los derivados del petróleo sino también la contaminación obtenida del proceso de combustión (proceso donde se transforma algún combustible en energía y productos derivados). En los productos derivados de la combustión se señala con alto grado de contaminación los gases nocivos para la salud tales como el dióxido de carbono (CO₂), el metano (CH₄) y el óxido nítrico (N₂O) entre otros (Dalena *et al.*, 2019). El 60% del consumo mundial de petróleo se cubre con combustibles no renovables. El 70% de las emisiones de monóxido de carbono (CO) y el 19% de las de dióxido de carbono (CO₂) se deben al sector del transporte (Dalena *et al.* 2019). Es necesario desarrollar y utilizar fuentes renovables alternativas y, por lo tanto, buscar nuevas tecnologías para desarrollar la producción de biocombustibles, con el fin de reducir el costo de generación y aumentar la demanda (de Andrade *et al.*, 2013).

2.2. Biocombustibles: Bioetanol

Las alternativas al uso de petróleo para la generación de energía para los medios de transporte son principalmente el hidrógeno y los alcoholes, donde el hidrógeno parece ser el más prometedor de ellos. El hidrógeno tiene el mayor contenido energético por unidad de peso de todos los combustibles conocidos (142 kJ/g) y, en comparación con los otros gases naturales conocidos, es seguro para el medio ambiente (Dalena *et al.*, 2019). Los inconvenientes en el uso del hidrógeno como recurso energético son los elevados precios de los procesos de purificación y las dificultades en las infraestructuras de almacenamiento y transporte (Dalena *et al.*, 2019). Por ello, ha aumentado la investigación a la generación de alcohol producido a partir de fuentes renovables (bioalcoholes). Actualmente, el metanol y el etanol se consideran combustibles alternativos prometedores, el primero tiene un octanaje mayor a la gasolina y una densidad igual a la mitad en comparación con la gasolina, mientras que el segundo contiene casi un 35% de oxígeno, ausente en la gasolina (Kar y Deveci, 2006). Esto hace que la eficiencia de la combustión del etanol sea aproximadamente un 15% mayor que la de la gasolina (Zabeda *et al.*, 2017; Kar y Deveci, 2006). Aunque 1 L de etanol

proporciona el 66% de la energía aportada por la misma cantidad de gasolina, el primero tiene un octanaje más alto (106-110) que el segundo (87-92) (Zabeda *et al.*, 2017). Además, el etanol tiene una mayor entalpía de evaporación (1177 kJ/kg a 60 °C) en comparación con la gasolina (348 kJ/kg a 60 °C) (Zabeda *et al.*, 2017).

El bioetanol se produce mediante una fermentación de carbohidratos y puede ser utilizado en la combustión puro o mezclado con gasolina según el tipo de motor. El bioetanol nos permite cerrar el ciclo del carbono; el ciclo del carbono comienza cuando se produce la combustión y se libera dióxido de carbono (CO₂), el CO₂ es liberado al ambiente y utilizado por las plantas para realizar el proceso de fotosíntesis, en éste proceso las plantas utilizan el carbono de la molécula de CO₂ como nutriente y libera las partículas de oxígeno (O₂) promoviendo al crecimiento vegetal, estas plantas a su vez pueden ser utilizadas como materia prima en una fermentación para la producción de bioetanol, cerrando el ciclo cuando este bioetanol se utiliza en la combustión (Yucel y Aksu, 2015). Los biocombustibles líquidos presentan un aumento en su importancia en las últimas décadas para la generación de energía (figura 2). Estados Unidos y Brasil son los principales productores de bioetanol a nivel mundial, responsables en conjunto del 83% del total de la producción (Dalena *et al.*, 2019). La elevada producción de bioetanol se debe principalmente a las políticas estatales presentes y pasadas que han favorecido la presencia de los biocombustibles en dichos estados. El bioetanol se puede clasificar según sea el tipo de materia prima que se utiliza para su producción y se clasifica por generaciones.

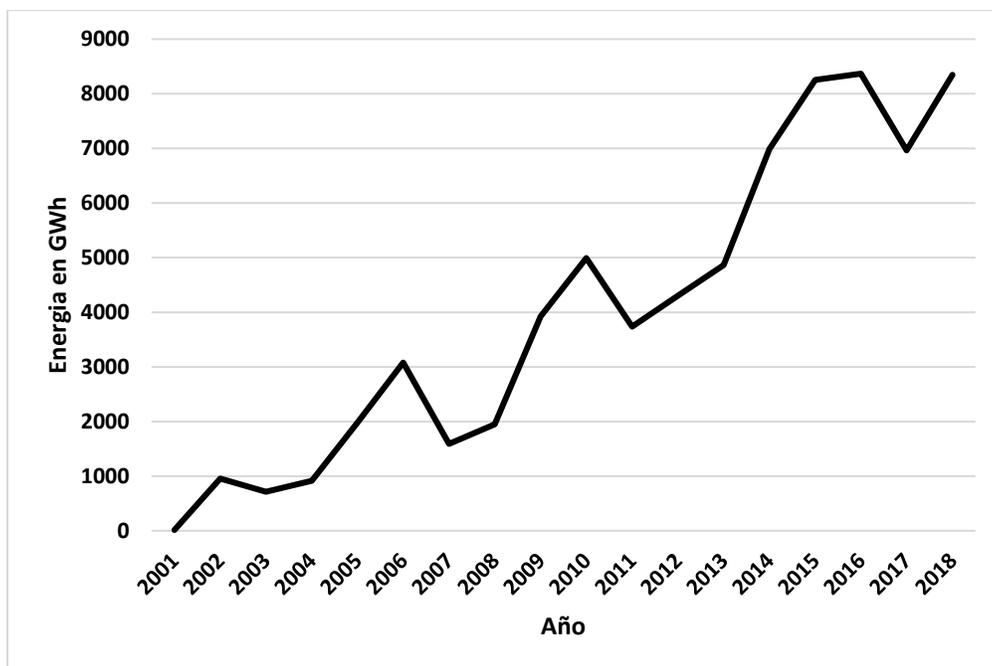


Figura 2. Generación de energía a base de biocombustibles líquidos a nivel mundial en 2018 (IEA, 2018).

2.2.1. Bioetanol de Primera Generación

La primera generación de bioetanol se produce a partir de materiales con almidón como el maíz, la yuca, el trigo, la soja, etc., o con otros sustratos altos en carbohidratos más simples como la caña de azúcar. Solo el bioetanol producido de caña de azúcar y almidón de maíz se han producido a escala industrial (Claassen *et al.*, 1999). Aunque los sustratos utilizados para la producción de bioetanol de primera generación dieron el máximo rendimiento, suscitó preocupación por el aumento de los precios de los alimentos de canasta básica y mostró una demanda desafiante de esos productos (Sathendra *et al.*, 2018). El bioetanol a base de azúcar y almidón obtenido de los recursos comestibles es considerado una alternativa prometedora a la producción de gasolina convencional; sin embargo, por las limitaciones éticas, se han implementado materiales no comestibles como la biomasa lignocelulósica, con la cual se ha desarrollado la segunda generación de bioetanol (Limayem y Ricke, 2012).

2.2.2. Bioetanol de Segunda Generación

Los biocombustibles de segunda generación son combustibles producidos a partir de residuos agrícolas, forestales y cultivos no útiles para alimentación y forraje. Esta biomasa está compuesta por lignocelulosa. La lignocelulosa es el material más abundante en nuestro planeta, es renovable y no es comestible para los humanos; se compone por polímeros de carbohidratos (celulosa y hemicelulosa) y el polímero aromático conocido como lignina, cuyas proporciones en las plantas varían de la siguiente manera: 20-55% de celulosa, 16-85% de hemicelulosa y de 15-40% de lignina, y que se combinan en una matriz molecular, con un contenido relativamente bajo de monosacáridos, proteínas, almidón o aceites (Wang *et al.*, 2015). La materia prima de primera generación para combustibles compite con la biomasa comestible, entonces, la biomasa de segunda generación se ha convertido en una opción más viable para producir biocombustibles y se espera que juegue un papel importante para satisfacer la futura demanda de energía (Bombeck *et al.*, 2017).

2.3. Biomasa Lignocelulósica

En la biomasa vegetal, la celulosa, hemicelulosas y lignina, constituyen en general más del 75% del material vegetal, y están constituidos por polímeros orgánicos de alto peso molecular. La biomasa de origen lignocelulósica, es el material orgánico más abundante en la tierra. Sus fuentes son los bosques, cultivos agrícolas, residuos de cosechas y otros residuos industriales como residuos de la industria de la madera y los tableros, residuos de la industria del papel y el papel reciclado (Abril y Navarro, 2012). Las primeras aplicaciones de la biomasa de origen lignocelulósica fueron como combustible, la construcción y alimento animal fundamentalmente. Hoy, sus aplicaciones son muy amplias y constituyen la base de muchas industrias como la de celulosa y papel, fuente de obtención de productos químicos, materiales de construcción, combustibles líquidos y gaseosos y muchas más. Los materiales lignocelulósicos tienen la ventaja de ser biodegradables, y renovables, siendo el resultado del proceso de fotosíntesis de los vegetales mediante la energía solar (Abril y Navarro, 2012).

2.3.1. Celulosa

Es el homopolisacárido estructural de todo el reino vegetal, es considerado el compuesto orgánico más abundante en la naturaleza y constituye una fuente de glucosa prácticamente inagotable que se renueva de forma continua mediante la fotosíntesis (Abril y Navarro, 2012). Son diversas las investigaciones realizadas para aprovecharlo en la obtención de glucosa. La celulosa es un polímero de cadena lineal, formado por la unión de unidades anhidroglucosa, en cadenas de glucano. Las unidades anhidroglucosa están unidas por enlaces β -(1,4)-glucosídicos (Dalena *et al.* 2019). Puede ser hidrolizada a residuos de D-glucosa por la acción de ácidos como el sulfúrico y el clorhídrico a una temperatura de más de 125 °C, también se han desarrollado métodos enzimáticos aprovechando la celulosa extracelular que sintetizan ciertos microorganismos (Dalena *et al.* 2019).

2.3.2. Hemicelulosa

La hemicelulosa es un grupo muy extenso de polisacáridos con diversos tipos de monómeros (heteropolisacáridos) que se localizan principalmente en la pared celular, es un polímero a base de carbohidratos altamente ramificados compuestos de azúcares, representan del 15 al 25% de la biomasa lignocelulósica (peso seco) y a su vez se une a la lignina por medio de enlaces covalentes (Lee y Lavoie, 2013). La composición química se basa en la unión glucosídica de distintos monosacáridos, sobre todo pentosas (arabinosa y xilosa), hexosas (glucosa, manosa y galactosa), ácidos urónicos (galacturónico y glucurónico) y algunos desoxiazúcares (Valdés-Martínez, 2006). La utilización de los azúcares hemicelulósicos es esencial para la conversión eficiente de los materiales lignocelulósicos a etanol combustible y otros productos de valor agregado mediante procesos de fermentación (Abril y Navarro, 2012).

2.3.3. Lignina

La lignina, el segundo polímero natural más abundante que se encuentra en un 25 a 35% (peso seco) en la biomasa lignocelulósica, se compone principalmente de unidades de fenil-propano (Lavoie *et al.*, 2011). La lignina proporciona una superficie hidrofóbica al agua y una rigidez estructural necesaria para el soporte mecánico, dado que es un compuesto de alta densidad de energía como resultado de los numerosos vínculos carbono-carbono, es muy importante para aplicaciones de bioenergía mediante procesos térmicos (Dalena *et al.* 2019). Aunque podrían usarse como combustible o como fuente de hidrógeno en un proceso de biorrefinería, los monómeros aromáticos de la lignina también podrían ser una fuente muy abundante de compuestos químicos de alto valor que podrían usarse en la industria del plástico, así como adhesivos (Valdés-Martínez, 2006). En ambos casos, los aromáticos de grado industrial se obtienen realmente como productos secundarios del petróleo (Lee y Lavoie, 2013).

Para una mayor eficiencia y eficacia en la producción de energía a base de biomasa vegetal lignocelulósica debe cumplir con adaptación: Los cultivos deben ser adaptables para ser cultivados en tierras no aptas para la producción de alimentos y en áreas geográficas diversas; alta eficiencia: los rendimientos de biomasa deben ser lo suficientemente altos para ser rentable y además el cultivo debe ser capaz de utilizar los nutrientes y recursos de manera eficiente. La biomasa vegetal no debe ser altamente demandante de agua ya que entra en competencia de recursos con los cultivos alimenticios; costos de producción bajos: los costos asociados a la producción del cultivo deben ser competitivos comparados con los costos presentados por las fuentes de energía convencional; y balance energético positivo: la energía que se extraiga del cultivo debe ser mayor a la utilizada para la propia producción de éste, además debe poder mejorar el balance medioambiental en relación a los cultivos tradicionales. Una biomasa vegetal lignocelulósica que puede llegar a cumplir estas condiciones es *J. platyphylla*.

2.4. *Jatropha platyphylla*

El género *Jatropha* pertenece a la familia *Euphorbiaceae* y se caracteriza por ser una de las más

abundantes de México, con 782 especies, siendo la mayoría endémicas. Dentro del género *Jatropha* se encuentra la especie *J. platyphylla*, comúnmente conocida como Bonete. Esta especie es comestible, los nativos de la región suelen consumir su semilla de manera similar al cacahuete o el fruto inmaduro como conservas, que a diferencia de las demás especies del género *Jatropha* no se considera tóxica ya que no contiene ésteres de forbol (Makkar *et al.*, 2011). Son plantas de alta adaptabilidad ya que son capaces de perseverar en condiciones poco favorables como suelos poco fértiles, altas temperaturas y poco suministro de agua. Además, durante la época de sequía, la planta tiende a desfoliarse y resguardar sus suministros en tallo hasta la próxima temporada de lluvias; estas plantas también son fácilmente reproducibles a partir de la germinación de las semillas (Dehgan, 1982).

J. platyphylla es una especie endémica de México y se localiza en regiones de clima cálido, asociada a la Selva Baja Caducifolia (Noguera, 2002), con temperatura media anual de 20 a 29 °C. Las plantas florecen en mayo, junio y julio (Noguera, 2002). Pierde su follaje en una parte del año, lo cual coincide con la temporada de sequía (Makkar *et al.*, 2011). Se encuentra distribuida en la costa del pacífico, desde Sinaloa hasta Michoacán, incluyendo los estados de Nayarit y Jalisco (Standley, 1967). *J. platyphylla* es un árbol o arbusto de 2 a 5 m de alto con tallo casi liso y hojas anchas peltadas, casi orbiculares de 25 a 35 cm (Dehgan, 1982). El fruto presenta 3 semillas de 12 mm de largo (Standley, 1967).

2.4.1. Hoja

Las hojas se encuentran distribuidas en forma alterna (espiral) a lo largo del tallo. Cada hoja mide de 33 a 42 cm de largo y de 35 a 44 cm de ancho. Las hojas de *J. platyphylla*, son más grandes que las reportadas para *J. curcas*. Entre los meses de noviembre a enero se empieza a observar la caída de hojas, resultando en una desnudes muy marcada en las plantas, encontrándose la planta en un estado de reposo invernal o dormancia (Gutiérrez-Pérez, 2011). Esto abre un área de oportunidad para aprovechar esta biomasa como materia prima para obtener un producto de valor agregado como lo es el bioetanol. En la figura 3a se puede observar estudios previos realizados a la biomasa de hoja y tallo en su composición de biopolímero por nuestro grupo de trabajo.

2.4.2. Cascarilla del Fruto

Los frutos son cápsulas drupáceas carnosas, tricarpelar y trilocular pero dehiscentes cuando son secos, ovoides de color verde y van tomando un color café amarilloso cuando maduran. Sus dimensiones son de 4.5 cm de ancho y 4.5 cm de alto, con un peso de 31 a 45 gramos. El peso del fruto de *J. platyphylla* corresponde a 15% de semillas y el 75% de mesocarpio y epicarpio (Gutiérrez-Pérez, 2011). El fruto es comestible y se suele consumir su semilla de manera similar al cacahuate o el fruto verde como conserva (Makkar *et al.*, 2011). Esto abre un área de oportunidad para aprovechar la biomasa obtenida de la cascarilla al consumir solo la semilla como materia prima para obtener un producto de valor agregado como lo es el bioetanol. En la figura 3b se puede observar estudios previos realizados a la biomasa de cascarilla en su composición de biopolímero por nuestro grupo de trabajo.

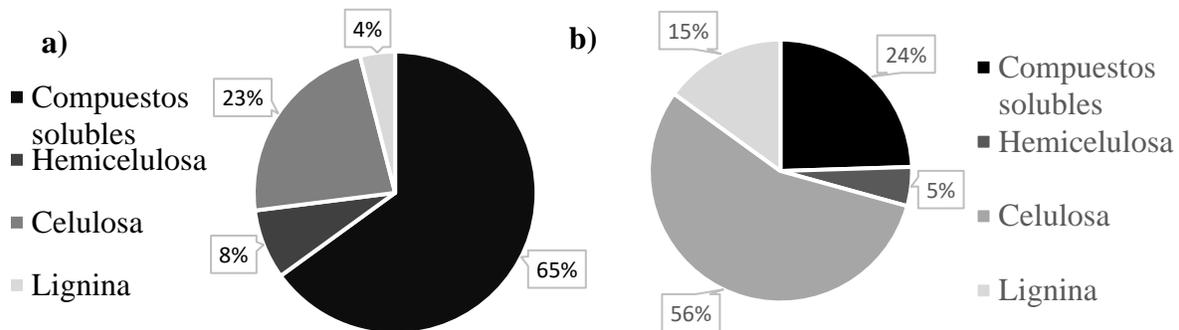


Figura 3. Composición química de a) Hoja y b) Cascarilla de fruto de *J. platyphylla*.

2.4.3. Material de Poda

El tallo de *J. platyphylla* se observó recto sin ramificaciones durante el primer año, mientras que un individuo adulto de 5 metros de alto se caracteriza por presentar un tronco grueso con escasas ramas (Flores, 1999). La poda es necesaria para incrementar el número de ramificaciones en los

tallos, los principales objetivos de la poda son: eliminar las ramas entrecruzadas, enfermas y/o secas; asegurar la penetración de la luz en la copa del árbol y mejorar la fructificación; aumentar el rendimiento de la fruta de calidad; y, gestionar la incidencia de insectos y enfermedades en el huerto (Sharma *et al.*, 2018).

La poda es esencial en los árboles de hoja caduca como es el caso de *J. platyphylla*, que dan frutos en brotes de un año. Por ello, se requiere que el 50% de los brotes se poden cada año para obtener un rendimiento regular. La poda se realiza mediante el desmoche o el aclareo del árbol (Sharma *et al.*, 2018). Esto abre un área de oportunidad para aprovechar esta biomasa como materia prima para obtener un producto de valor agregado como lo es el bioetanol.

2.5. Pretratamiento de la Biomasa Lignocelulósica

El objetivo de un pretratamiento de la biomasa es prepararla para una fermentación más eficiente y conversión de celulosa y hemicelulosa en bioetanol. Actualmente existen cuatro procesos de pretratamientos y son: físico, químico, fisicoquímico y biológico (Dalena *et al.*, 2019), cada uno con sus ventajas y desventajas. La elección de un método de pretratamiento depende principalmente de las propiedades físico-químicas del material lignocelulósico y es fundamental para una hidrólisis óptima y exitosa, en consecuencia, para transformar las unidades de polímero lignocelulósico en unidades monoméricas de azúcares simples. La eficacia global del proceso de pretratamiento está correlacionada con un buen equilibrio entre la baja formación de inhibidores y la alta conveniencia del sustrato. La disrupción de la pared celular, la solubilización de la lignina, la reducción de la cristalinidad de la celulosa, el acortamiento de la longitud de la cadena de celulosa y la formación de productos de degradación de los azúcares (por ejemplo, ácido acético, hidroximetilfurfural y furfural) son algunos de los efectos que los pretratamientos pueden causar en la biomasa (Dalena *et al.*, 2019). El objetivo de cualquier pretratamiento se caracteriza por varios criterios: reducir el grado de polimerización de la cadena lignocelulósica, preservar las fracciones de pentosa (hemicelulosa), minimizar la formación de productos de degradación que inhiben el crecimiento del microorganismo fermentador, minimizar las demandas de energía y minimizar el costo de producción (Láinez *et al.*, 2019). El pretratamiento químico emplea ácidos, bases y agentes

oxidantes. El pretratamiento más utilizado es el ácido sulfúrico (H₂SO₄) diluido. Dependiendo del agente químico utilizado, el pretratamiento puede tener diferentes efectos sobre los componentes estructurales de la lignocelulosa. El pretratamiento con bases, ozono y peróxidos son más eficaces en la ruptura de la lignina, mientras que el pretratamiento con ácidos diluidos es más eficiente en la solubilización de la hemicelulosa (Galbe y Zacchi, 2002).

2.6. Aplicaciones Biotecnológicas de las Levaduras

Las levaduras han sido utilizadas para elaborar pan, cerveza y vino desde la antigüedad. Pasteur reconoció su papel en la fermentación, y los primeros cultivos puros de levadura de cerveza y vino fueron obtenidos por Hansen y Müller-Thurgau, respectivamente, a finales del siglo XIX. Desde entonces, la aplicación de promotor de levadura se ha convertido en una práctica modelo en la fermentación industrial no solo para productos comestibles, sino también para una amplia variedad de otros productos elaborados por levaduras. Los procesos de fermentación tradicionales son llevados a cabo por *Saccharomyces cerevisiae*, para muchos, su nombre es sinónimo de levaduras. Contrario a la creencia, aproximadamente la mitad de las especies de levaduras no pueden fermentar, pero muchos de estas han ganado importancia en la biotecnología (Nurcholis *et al.*, 2020).

Las levaduras conforman un grupo de hongos de estructura unicelular que se reproducen por gemación y pueden clasificarse en Ascomicetos (por ejemplo, *Saccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Candida*) o Basidiomicetos (por ejemplo, *Malassezia*, *Cryptococcus*, *Rhodotorula*). De todas las especies de levadura, solo una docena se usan a escala industrial, y se ha probado que entre 70 y 80 especies a escala de laboratorio tienen atributos para su aplicación en la biotecnología (Kurtzman *et al.*, 2011; Deak, 2009). En el Cuadro 1 se enlistan otras especies de levadura de importancia biotecnológica más allá de los alimentos tradicionales.

Los nutrientes más importantes para las levaduras son los carbohidratos que sirven como fuente de carbono y energía. La utilización de almidón como sustrato es de particular interés para la producción industrial de biomasa de levadura a partir de desechos agrícolas con almidón, por ejemplo, desechos en las cosechas de maíz, yuca, trigo, sorgo, cebada, entre otros (Demiray *et al.*,

2019). Otras posibles fuentes de carbono para las levaduras son los hidrocarburos, ya que varias especies son capaces de crecer en estos compuestos (Deak, 2008).

Cuadro 1: Levadura biotecnológicamente importante (Johnson, 2013a, b)

Ascomicetos	Basidiomicetos
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Rhodotorula spp.</i>
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	<i>Rhodospiridium spp.</i>
<i>Kluyveromyces lactis</i>	<i>Trichosporon spp.</i>
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	<i>Xanthophyllomyces dendrorhous</i>
<i>Schwanniomyces occidentalis</i>	<i>Cryptococcus spp.</i>
<i>Lipomyces spp.</i>	<i>Phaffia rhodozyma</i>
<i>Saccharomycopsis spp.</i>	
<i>Debaryomyces hansenii</i>	
<i>Ogataea polymorpha</i>	
<i>Komagataella pastoris</i>	
<i>Scheffersomyces stipitis</i>	
<i>Pichia spp.</i>	
<i>Yarrowia lipolytica</i>	
<i>Candida spp.</i>	
<i>Blastobotrys adenivorans</i>	

Las levaduras desempeñan diversas funciones en la producción de alimentos y bebidas fermentadas tradicionales, también tienen una amplia importancia industrial en el ámbito científico, médico y agrícola. En la figura cuatro podemos observar las áreas de aplicación biotecnológica de las levaduras. Las aplicaciones modernas de levaduras implican la producción de bioetanol combustible, proteína de células individuales (PUC) para su uso alimentario, alimentos y forrajes para animales, enzimas industriales y metabolitos de bajo peso molecular. Las levaduras se implementan para la expresión de biocatalizadores de proteínas y vías de múltiples enzimas para la síntesis de productos químicos finos y compuestos de bajo peso molecular de importancia medicinal y nutricional (Barnett y Barnett, 2011).

Además, un importante papel en la agricultura y el medio ambiente como agentes de biocontrol, biorremediación y como indicadores de calidad ambiental, debido a la capacidad de varias especies de levadura para crecer en una amplia diversidad de sustratos, incluidas moléculas aromáticas,

alcanos, compuestos lipídicos, aminos, entre otros; tienen la capacidad de convertir sustancias nocivas a derivados inocuos (Branduardi y Porro, 2012; Johnson y Echavarri-Erasun, 2011).

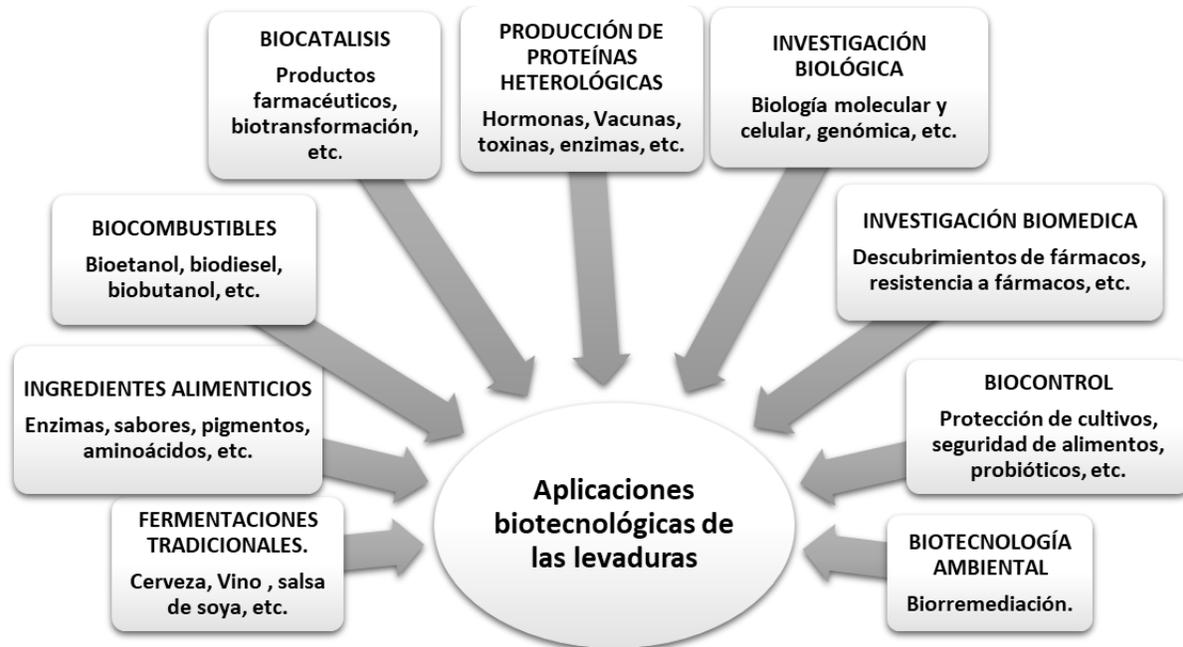


Figura 4. Aplicaciones biotecnológicas de las levaduras (Adaptado de Walker, 1998).

Una de las aplicaciones de la levadura es en la producción de bioetanol combustible. El bioetanol puede ser un sustituto de la gasolina para la generación de energía. Además, el uso de una levadura termotolerante tiene algunas ventajas en la fermentación con respecto a la levadura convencional (*S. cerevisiae*). Las levaduras resistentes a altas temperaturas son conocidas como levaduras termotolerantes, no obstante, no existe un valor absoluto de temperatura, los límites a partir de los cuales se consideran levaduras termotolerantes varían. Las levaduras termotolerantes son aquellas que tienen un crecimiento máximo en un rango de temperatura entre 37 a 45 °C (Banat *et al.*, 1992), sin embargo, también se definen a las levaduras termotolerantes como aquellas capaces de crecer a temperatura igual o mayor a 40 °C (Koedrith *et al.*, 2008).

La producción de bioetanol a alta temperatura tiene algunas ventajas, entre las que están: 1) disminuir los niveles de contaminación (producción de bioetanol combustible se lleva a cabo sin asepsia completa); 2) reducir los gastos de energía y agua necesarios para enfriar fermentadores a gran escala; 3) reducir la entrada de energía involucrada en la destilación (que es la operación para

separar el bioetanol del caldo fermentado); 4) facilitar el uso de vacío para extraer el bioetanol directamente del caldo de fermentación y, en consecuencia, disminuir la inhibición ejercida sobre el microbio productor (Madeira-Jr y Gomberta, 2018).

La mayoría de las cepas de *Saccharomyces cerevisiae* que se producen ampliamente en la fermentación industrial se pueden desarrollar a 37 °C, mientras que el crecimiento en un entorno similar de *Saccharomyces bayanus* está limitado a 30-35 °C. El rango de levaduras conocidas capaces de crecer por encima de 40 °C es limitado. La mayoría de las levaduras termotolerantes capaces de crecer a temperaturas superiores a 40 °C pertenecen a *Kluyveromyces marxianus*. Otros ejemplos de levaduras termotolerantes, además de las mencionadas, son *H. polymorpha* (Escalante *et al.*, 1990), *P. pastoris* (Rodríguez *et al.*, 2000) y *K. fragilis* (Hari *et al.*, 2001). Las cepas de *Kluyveromyces* son notables por alcanzar temperaturas relativamente altas. Sin embargo, las temperaturas superiores a 50 °C suelen ser letales para las células de levadura (Deak, 2008; Starmer y Lachance, 2011).

2.6.1. *Kluyveromyces marxianus*

Kluyveromyces marxianus es una levadura homotálica (que se autofertiliza) y pertenece a la clase hemiascomiceta. Está filogenéticamente relacionada con la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Puede asimilar la lactosa, lo cual es poco común en las levaduras, *S. cerevisiae* no tiene esta cualidad. *K. marxianus* posee algunas ventajas con respecto a *S. cerevisiae*, incluida la capacidad intrínseca para la fermentación de inulina y termotolerancia (Fonseca *et al.*, 2008).

Kluyveromyces marxianus fue descrita por primera vez en 1888 por E. C. Hansen, que en ese tiempo se conocía como *Saccharomyces marxianus* en honor a Marx, la persona que por primera vez aisló esta levadura a partir de las uvas (*Vitis vinifera*). Las hojas podridas de Henequén (*Agave fourcroydes*) y las aguas residuales de una fábrica de azúcar conforman otros hábitats en los que se aisló las cepas de *S. marxianus*. En 1939, se conocía que la inulina es fermentada por *S. marxianus* (Lodder y Kreger-van Rij, 1952). Debido a la diferencia en la morfología de esporas y ascas; la capacidad de fermentar y oxidar diferentes carbohidratos; y la hibridación entre cepas, fue necesario reclasificar las especies *S. fragilis*, *S. marxianus* y *S. lactis* en un nuevo taxón con

respecto a las verdaderas levaduras *Saccharomyces* (van der Walt, 1970). En 1956, se implementó el nuevo género *Kluyveromyces*, cuya primera especie fue *Kluyveromyces polysporus* (van der Walt, 1956). Más tarde, se descubrió que *K. polysporus* tenía propiedades muy similares a las especies *S. fragilis*, *S. marxianus* y *S. lactis* y, por lo tanto, todas fueron reclasificadas en el género *Kluyveromyces*. Los hábitats adicionales de los que se aislaron las cepas de *K. marxianus* incluyen cerveza, leche de vaca, expectoración asmática y harina de maíz (van der Walt, 1970). *K. marxianus* es un microorganismo reconocido como seguro ya que se han llevado a cabo estudios con esta especie para la producción de materiales útiles en industrias alimenticia (Beniwal *et al.*, 2017). El desarrollo de aplicaciones en la industria de *K. marxianus* se ha producido por las ventajas que tiene a comparación de otras levaduras; se puede desarrollar en una amplia gama de sustratos y a temperaturas más altas de lo convencional (mayores a 35 °C), sus tasas de crecimiento específicas más altas y la menor tendencia a producir bioetanol cuando se expone al exceso de azúcar (Rouwenhorst *et al.*, 1988; Steensma *et al.*, 1988; Bellaver *et al.*, 2004). Un punto clave en su utilidad biotecnológica es que se debe tener en cuenta que los individuos han sido aislados de muchos hábitats. Esto implica que la diversidad metabólica es amplia y, por lo tanto, las aplicaciones biotecnológicas potenciales de las cepas de *K. marxianus* son variadas, como los ejemplos que se encuentran a continuación.

2.7. Proceso de Producción de Bioetanol Utilizando la Levadura *Kluyveromyces marxianus*

Se han utilizado diferentes estrategias de proceso para la producción de bioetanol con *K. marxianus*: cultivos discontinuos con altas concentraciones de sustrato (Barron *et al.*, 1996), producción discontinua alimentada (Gough *et al.*, 1998), sistema continuo (Love *et al.*, 1998), biorreactores de reciclaje de membrana (Tin y Mawson, 1993), fermentación en dos etapas (Banat *et al.*, 1996), inmovilización con la enzima β -galactosidasa (Hahn-Hägerdal, 1985), células inmovilizadas con alginato de calcio (Ferguson *et al.*, 1998), células inmovilizadas en perlas de criogel de alcohol vinílico (Gough *et al.*, 1998), o en Kissiris, una espuma de vidrio mineral derivada de lava (Love *et al.*, 1998), cultivos discontinuos alimentados por extracción (Jones *et al.*, 1993), procesos simultáneos de sacarificación y fermentación con agregado enzimas (Ballesteros

et al., 2002) o mediante la clonación de genes de celulasa heteróloga (Hong *et al.*, 2007), y el uso de cultivos mixtos (Ward *et al.*, 1995). El bioetanol combustible se puede clasificar según sea el tipo de sustrato que utilice para la fermentación.

2.7.1. Sustrato

La conversión microbiana eficiente de xilosa y glucosa en bioetanol es necesaria para la producción económica de bioetanol a partir de biomasa lignocelulósica (Jeffries y Jin, 2004). *Saccharomyces cerevisiae* es uno de los microorganismos más exitosos y ampliamente utilizados para la producción de bioetanol, puede producir altas concentraciones de bioetanol a partir de glucosa, pero no puede utilizar xilosa para el crecimiento y la fermentación de bioetanol debido a la falta de una vía catabólica activa para la xilosa. Además, esta especie de levadura más adecuada para cultivos superiores a 40 °C (Della-Bianca y Gombert, 2013; Caspeta *et al.*, 2014). La conversión de xilosa en bioetanol por *K. marxianus* ya se reportó hace tiempo (Margaritis y Bajpai, 1982).

La concentración inicial de sustrato es un parámetro importante, porque tiene el efecto directo sobre la tasa de fermentación y las células microbianas. En la mayoría de los casos la tasa de fermentación aumentará con el incremento de la concentración de sustrato inicial hasta cierto nivel. Pero una concentración de sustrato excesiva saturará la capacidad de absorción de las células microbianas, lo que conducirá a una velocidad constante de fermentación. En la fermentación discontinua es posible generar una mayor productividad y rendimiento de etanol a una concentración de sustrato inicial más alta, pero lleva más tiempo de fermentación, lo que conlleva a un aumento del costo de producción (Zabed *et al.*, 2014). En el Cuadro 2 se muestran algunas materias primas que se han utilizado para la producción de bioetanol, de igual manera se incluyen los máximos rendimientos de bioetanol reportados para estos sustratos.

Cuadro 2: Materias primas lignocelulósicas para la producción de bioetanol utilizando a *Kluyveromyces marxianus*

Materia prima	Rendimiento máximo de bioetanol	Referencia
Madera de palma	22.9 g/L	Sathendra <i>et al.</i> , 2018
Hojas de <i>Agave salimiana</i>	24.15 g/L	Láinez <i>et al.</i> , 2019
Paja de trigo	3.1 g/L	Sandoval-Nuñez <i>et al.</i> , 2018
Bagazo de caña	9 g/L	Sandoval-Nuñez <i>et al.</i> , 2018
Mezquite (<i>Prosopis juliflora</i>)	21.45 g/L	Sivarathnakumara <i>et al.</i> , 2019
Sorgo blanco y rojo (<i>Sorghum bicolor</i>)	24.35 g/L	Ahmed el-imam <i>et al.</i> , 2019
<i>Poplar nigra</i>	19 g/L	Ballesteros <i>et al.</i> , 2004
<i>Eucalyptus globulus</i>	17 g/L	Ballesteros <i>et al.</i> , 2004
Paja de trigo	18.1 g/L	Ballesteros <i>et al.</i> , 2004
Bagazo de sorgo (<i>Sorghum sp.</i>)	16.2 g/L	Ballesteros <i>et al.</i> , 2004
<i>Brassica carinata</i>	19 g/L	Ballesteros <i>et al.</i> , 2004
Cáscara de granada	7.2 g/L	Demiray <i>et al.</i> , 2019
Mazorcas de maíz	15.03 g/L	Du <i>et al.</i> , 2019
Mazorcas de maíz	52 g/L	Du <i>et al.</i> , 2020
Racimos de frutos vacías de aceite de palma	34.39 g/L	Sukhang <i>et al.</i> , 2019
<i>Quercus aegilops</i>	6.93 g/L	Tahir y Mezeri, 2020

2.7.2. Temperatura

La temperatura es otro factor importante durante la fermentación, tiene un impacto vital en el proceso y la producción de bioetanol. La producción de bioetanol depende de la temperatura de fermentación y, en cierta medida, su concentración aumenta con el aumento de la temperatura (Zabed *et al.*, 2014). A altas temperaturas se reducen costos, y además se podría obtener mediante la evaporación continua de bioetanol del caldo de fermentación a presiones bajas. Además del ahorro de energía debido a la reducción de los costos de enfriamiento, las tasas de sacarificación y fermentación son más altas, la eliminación continua de bioetanol y contaminación es reducida (Banat *et al.*, 1998). *K. marxianus* produce alcohol a temperaturas superiores a 40 °C y que tiene una temperatura de crecimiento máxima de 47 °C (Anderson *et al.*, 1986), 49 °C (Hughes *et al.*, 1984), o incluso 52 °C (Banat *et al.*, 1992). Se ha calculado que un aumento de 5 °C en la temperatura de fermentación puede reducir en gran medida el costo de producción de bioetanol

combustible al reducir la energía de enfriamiento y sería aproximadamente \$ 30,000 USD / año para una planta de bioetanol a escala de 30 ML (Abdel-Banat *et al.*, 2010).

Si la temperatura de fermentación aumenta de 30 °C a 40 °C, el costo de enfriamiento se reduce hasta en un 65%. En consecuencia, la fermentación a alta temperatura puede ser más rentable y práctica en la producción de bioetanol a partir de biomasa lignocelulósica (Abdel-Banat *et al.*, 2010). La levadura termotolerante *Kluyveromyces marxianus* es un organismo particularmente prometedor porque utiliza xilosa como fuente de carbono y puede crecer a temperaturas tan altas como 45-52 °C, a las cuales su eficiencia de fermentación es similar a la de *S. cerevisiae* a 30 °C (Abdel-Banat *et al.*, 2010).

Aunque *K. marxianus* tiene una productividad alta de etanol a 45 °C durante la etapa temprana de fermentación, se observa un atraso de la fermentación debido a algunos inhibidores. Se estudiaron las respuestas al estrés de *K. marxianus* durante la fermentación a alta temperatura, lo cual estimuló la respiración mitocondrial, pero reprimió el ciclo del ácido tricarboxílico (TCA). El grado de insaturación de ácidos grasos también se redujo para adaptarse a altas temperaturas. La levadura también produjo más ergosterol para lidiar con el estrés del etanol (Fu *et al.*, 2019).

2.7.3. Potencial de Hidrógeno (pH)

Una mejor producción de bioetanol a través del proceso de fermentación se puede obtener controlando el pH porque uno de los factores clave para la producción de bioetanol y tiene influencia directa en los organismos y en sus procesos celulares (Madeira-Jr y Gomberta, 2018). En general, las concentraciones de iones hidronio (H^+) en el caldo de fermentación pueden modificar la carga total de la membrana plasmática influyendo en la permeabilidad de algunos nutrientes esenciales en las células (Pirselova *et al.*, 1993). En algunas de las fermentaciones el valor del pH es ajustado como variable fija (no se prueba su efecto), mientras que en otras se busca probar si existe diferencia entre los niveles de pH. Se ha reportado que *K. marxianus* creció a pH 2.5 y esta capacidad fue independiente de la temperatura, en el rango de 30 °C a 45 °C (Madeira-Jr y Gomberta, 2018).

2.7.4. Tiempo

Un tiempo de fermentación corto provoca un deficiente desarrollo de las levaduras y provoca una fermentación ineficiente, esto se puede deber al tiempo que tarde la fase de adaptación de las levaduras al medio. Sin embargo, un largo tiempo de fermentación provoca un efecto tóxico en el crecimiento microbiano, especialmente en modo discontinuo debido a la alta concentración de etanol en el caldo fermentado. Además, se requiere más tiempo para completar la fermentación a una temperatura más baja, aunque el rendimiento de etanol es el más bajo (Zabed *et al.*, 2014). En la mayoría de las investigaciones el tiempo de fermentación no es un valor el cual se fije antes de la experimentación, sino que se va observando cómo se comporta la producción de bioetanol con respecto al tiempo y se busca encontrar un máximo.

2.7.5. Agitación

La agitación es otro factor a considerar para obtener mejores rendimientos de bioetanol durante el proceso fermentación, esto permite aumentar la permeabilidad de los nutrientes del caldo de fermentación al interior de las células y, eliminar el etanol del interior de la célula hacia el caldo de fermentación (Madeira-Jr y Gomberta, 2018). La agitación también promueve al consumo de azúcar y disminuye la inhibición del etanol en las células. La velocidad de agitación útil va de 150 a 200 rpm para las células de levadura en fermentación. Sin embargo, el exceso de velocidad, velocidades superiores a 200 rpm de agitación no son adecuadas para la producción de etanol debido a las actividades metabólicas limitadas de las células (Liu y Shen, 2008).

2.7.6. Resistencia al Etanol

K. marxianus tiene una menor resistencia al bioetanol comparando con *S. cerevisiae*, y esto se ha

relacionado con la actividad de la ATPasa de membrana plasmática (Rosa y Sa-Correia, 1992). Mientras que en otro estudio se evaluó la tolerancia al etanol de algunas cepas, teniendo como resultado que la tolerancia de todas las especies parecía disminuir proporcionalmente al igual que la temperatura, pero las cepas de *Kluyveromyces* fueron más termotolerantes que *Saccharomyces*, lo que a su vez puede producir mayores rendimientos de bioetanol. Se ha observado que las proteínas y los metabolitos de las vías de carbono y la traducción eran menos abundantes en las primeras horas del estrés por etanol. Sin embargo, la concentración de algunos aminoácidos y trehalosa aumentó a las 8 y 12 h bajo estrés de etanol, lo que indica una respuesta adaptativa (Alvim *et al.*, 2019).

2.7.7. Interacción con Compuestos Bioactivos

En una fermentación con material vegetal como materia prima y fuente de biomasa lignocelulósica, hay algunos sustratos que pueden ser bioactivos, y estos pueden interferir en el crecimiento microbiano. Las materias primas pretratadas en un proceso de sacarificación podrían contener incluso compuestos inhibidores, como saponinas, furanos, fenólicos, entre otros (Láinez *et al.*, 2019). Concentraciones finales de etanol son ligeramente más altas con *K. marxianus* que con *S. cerevisiae*, utilizando como sustrato hojas de *Agave salmiana*, las cuales son ricas en algunos compuestos bioactivos, este comportamiento podría atribuirse a la adaptación natural de *K. marxianus* a altas concentraciones de inhibidores (Láinez *et al.*, 2019). En el caso de *K. marxianus* se probó como se ve inhibido su desarrollo con saponinas extraídas de las hojas de *Agave durangensis* y *Agave salmiana*, se observó una recuperación en el crecimiento, porque esta levadura muestra actividad de saponinasa, la cual es la hidrólisis de saponina (Alcázar *et al.*, 2017). En un ensayo utilizando jugo de hojas de Henequén (*Agave fourcroydes*) se demostró que la levadura *S. cerevisiae* no creció en ninguno de los hidrolizados (pretratamiento), mientras que *K. marxianus* pudo crecer y fermentar este sustrato (Villegas-Silva *et al.*, 2014).

2.7.8. Otros Factores

El nitrógeno es un elemento importante para el proceso fermentación, aumenta la tolerancia y el rendimiento del etanol. La producción de etanol disminuye en la deficiencia de nitrógeno (Yamaoka *et al.*, 2014). Los iones minerales tienen un papel fundamental en la supervivencia celular y la productividad del etanol, ya que protegen las células de levadura de varios factores de estrés. Entre las sales minerales, las más importantes para la fermentación son Mg^{2+} , Zn^{2+} , Ca^{2+} y K^+ (Kirk y Doelle, 1992; Pejin *et al.*, 2015; Rees y Stewart 1997; Zhao *et al.*, 2009). En un estudio donde se usó de la cáscara de granada para la producción de bioetanol con *Kluyveromyces marxianus*, se evaluó el efecto de diferentes fuentes de nitrógeno (extracto de levadura, peptona y $(NH_4)_2SO_4$), y de diferentes sales minerales (K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Zn^{2+}) en la producción de bioetanol, dando como resultado un aumento en el rendimiento de bioetanol cuando se utilizaron las fuentes orgánicas de nitrógeno (extracto de levadura y peptona) y cualquiera de las sales minerales (Demiray *et al.*, 2019).

3. PLANTEAMIENTO DE PROBLEMA

Los combustibles derivados del petróleo son las materias primas más utilizadas en actualidad para la producción de energía. El proceso de transformación del combustible a energía conlleva la liberación de gases contaminantes al medio ambiente promoviendo el calentamiento global y la proliferación de enfermedades respiratorias. Los combustibles derivados del petróleo son recursos no renovables y en algún momento se agotarán, entonces se requiere de alternativas a la demanda de energéticos. El bioetanol se ha planteado como un buen sustituto de la gasolina en la generación de energía en la industria del transporte, la agencia internacional de energía proyecta que los biocombustibles podrían cubrir el 27% de los combustibles para transporte a nivel mundial para 2050. La producción de bioetanol de primera generación a base de recursos comestibles (maíz, caña, etc.) es una práctica poco ética ya que eleva los precios de los alimentos, se plantea entonces desarrollar bioetanol de segunda generación a base de biomasa lignocelulósica al no ser un recurso comestible y ser uno de los biopolímeros más abundantes de la tierra. En este caso se usaron los subproductos vegetales de la planta *J. platyphylla* como materia prima para la producción de bioetanol, con la finalidad de contribuir al conocimiento en la elaboración de biocombustibles utilizando distintos tipos de biomásas lignocelulósicas, que se producen en cultivos establecidos en suelos con baja demanda en el consumo de agua y adaptados al ciclo natural del agua.

4. PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN

1. ¿Cuáles son las variables del proceso de sacarificación química que maximizan la concentración de azúcares a partir de biomasa lignocelulósica de *J. platyphylla*?
2. ¿Cuáles son las variables del proceso de fermentación que maximizan la eficiencia en la fermentación y cuál será la máxima eficiencia de fermentación a partir de biomasa lignocelulósica de *J. platyphylla* utilizando a la levadura *K. marxianus*?

5. HIPÓTESIS

1. Temperaturas entre 50-100 °C, tiempo de proceso entre 30-60 min y carga inicial de biomasa 1 a 5%, generarán un aumento significativo en la concentración de azúcares liberadas de biomasa lignocelulósica de *J. platyphylla*.
2. Temperaturas entre 35-45 °C, agitación entre 100-200 rpm y tiempo de proceso entre 24-72 h, promoverán a la levadura *K. marxianus* a tener una mayor eficiencia en la fermentación a partir de biomasa lignocelulósica de *J. platyphylla* y se espera una eficiencia de la fermentación de por lo menos 50%.

6. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

Se realizó una investigación experimental en el Laboratorio de Toxicología del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (Coordinación Culiacán).

- Recolección y tratamiento de las muestras de hoja, cascarilla y materia de poda del cultivo vegetal de *Jatropha platyphylla*.
- Evaluación de contenido de azúcares reductores totales y azúcares totales de las distintas biomásas lignocelulósicas de *J. platyphylla*.
- Análisis del efecto de la hidrólisis químico-térmica en la liberación de azúcares en las distintas biomásas lignocelulósicas de *J. platyphylla*.
- Evaluación e identificación de la biomasa lignocelulósica de *J. platyphylla* con mayor concentración de azúcares.
- Evaluación del proceso de fermentación en la obtención de etanol utilizando la biomasa lignocelulósica de *J. platyphylla* con mayor concentración de azúcares.

7. JUSTIFICACIÓN

No existe antecedente encontrado donde se utilice la biomasa lignocelulósica de *J. platyphylla* para la generación de bioetanol de segunda generación. Es necesario generar información de la optimización de la fermentación y la sacarificación de la biomasa lignocelulósica de *J. platyphylla*, para desarrollar un producto de valor agregado, como lo es el bioetanol, aplicar el conocimiento sobre el uso de la levadura termotolerante *K. marxianus*. Asimismo, el beneficio ambiental se plantea cuando este trabajo de investigación logre apoyar en la generación de bioetanol a escala industrial, lo cual pasará cuando la producción de bioetanol sea más redituable económicamente con respecto al refinamiento del petróleo.

8. OBJETIVOS

8.1. Objetivo General

Optimizar los procesos de sacarificación química y fermentación utilizando como materia prima la biomasa lignocelulósica (hoja, material de poda o cascarilla) de *J. platyphylla* para alcanzar el máximo rendimiento de bioetanol en el proceso global utilizando la levadura termotolerante *Kluyveromyces marxianus*.

8.2. Objetivos Específicos

1. Establecer las condiciones óptimas del proceso de sacarificación química utilizando la biomasa lignocelulósica de *J. platyphylla* (hoja, material de poda y cascarilla), para obtener la máxima concentración de azúcares.
2. Analizar el efecto de las distintas variables de proceso de fermentación en la obtención de bioetanol, utilizando como fuente de sustrato la materia prima con mejor cualidad del cultivo de *J. platyphylla* con *K. marxianus*.

9. MATERIALES Y MÉTODOS

9.1. Etapa 1: Proceso de Sacarificación

9.1.1. Material Vegetal

Muestras de hojas, cascarilla del fruto y material de poda de *J. platyphylla* del Ejido de la Campana en Culiacán, Sinaloa, México (24°59'35.5"N 107°34'24.6"W) fueron transferidas al laboratorio de Biorecursos ubicado en el Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD), a las cuales se les retiraron material de suelo y posteriormente se secaron a temperatura ambiente durante dos semanas. Una vez seca la biomasa se molió por 5 min en un molino universal (IKA M20, Wilmington, NC), teniendo como resultado una harina homogénea de cada biomasa, listas para su utilización.

9.1.2. Sacarificación

En un recipiente de plástico con tapadera y volumen de 50 mL se introdujo la harina de biomasa (hoja, cascarilla o material de poda) y se añadió una solución de ácido sulfúrico (H_2SO_4) al 3%, otro lote fue tratado con hidróxido de sodio (NaOH) al 3%. En ambos tratamientos se alcanzó una concentración sólido/ líquido del 1, 3 o 5%. Los recipientes fueron puestos a baño maría a la temperatura de 50, 75 o 100 °C (Wang *et al.*, 2015). En este proceso los factores que se estudiaron fueron la temperatura de 50-100 °C, el tiempo de 30-60 min y la dilución de la biomasa 1-5%, fijando la concentración del agente químico a 3% (v/v), buscando la máxima concentración de azúcares reductores totales y azúcares totales. Una vez transcurrido el tiempo de reacción (30, 45 o 60 min), se procedió a separar por filtración el sobrenadante con filtros de papel, se tomó una muestra del sobrenadante para realizar los análisis de concentración de las azúcares reductores totales y azúcares totales.

9.1.3. Concentración de Azúcares Totales

La concentración de azúcares totales se determinó mediante el ensayo Fenol - Ácido sulfúrico con el método propuesto por Dubois *et al.* (1956), con algunas modificaciones. Se mezclaron 2 mL del hidrolizado de *J. platyphylla* y 2 mL de fenol al 5% en un tubo de ensayo. La mezcla se colocó en baño de agua fría y se le añadió 5 mL de ácido sulfúrico (H₂SO₄) concentrado, se dejó reposar por 15 min. Posteriormente, se midió la absorbancia a 490 nm en un espectrofotómetro (Unico S-2150, Dayton, NY) UV-visible. La cuantificación de azúcares totales se realizó mediante una curva estándar de glucosa (0.5 a 10 mg/mL) y los resultados se expresaron en mg de azúcares totales por mL de muestra (mg AT/ mL).

9.1.4. Concentración de Azúcares Reductores Totales

La concentración de azúcares reductores totales se determinó mediante el ensayo DNS y se empleó el método propuesto por Miller (1959) con algunas modificaciones. Se mezclaron 1 mL de muestra y 1 mL de reactivo DNS. La mezcla se colocó en baño maría a 100 °C por 5 min. Después fueron enfriados por un baño de hielo hasta alcanzar temperatura ambiente y se añadieron 10 mL de agua destilada. Posteriormente, se midió la absorbancia a 540 nm (Unico S-2150, Dayton, NY) UV-visible. La cuantificación de azúcares reductores totales se realizó mediante una curva estándar de glucosa (0.1 a 3 mg/mL) y los resultados se expresaron en mg de azúcares reductores totales por mL de muestra (mg ART/ mL).

9.1.5. Análisis Estadístico

Un diseño experimental de superficie de respuesta Box-Behnken fue aplicado para evaluar el efecto de la temperatura (50-100 °C), carga inicial de biomasa (1-5%) y el tiempo de pretratamiento (30-

60 min) en la hidrólisis química. Como factores categóricos se adicionaron el tipo de biomasa (hoja, cascarilla o material de poda) y el tipo de reactivo (NaOH al 3% o H₂SO₄ al 3%). Teniendo como variables dependientes (respuestas) a la concentración de azúcares reductores totales y azúcares totales. Se utilizó el software Minitab 18 para hacer este diseño experimental y analizar el experimento, dando como resultado un total de 90 corridas experimentales. Para encontrar la condición óptima para el proceso se utilizó la herramienta matemática “optimizador de respuesta” buscando una deseabilidad cercana a la unidad y para observar el comportamiento de los factores se utilizaron los gráficos de superficie de respuesta.

9.1.6. Fórmulas

9.1.6.1. Máxima concentración teórica de azúcares reductores totales. La máxima concentración teórica de azúcares reductores totales se obtuvo utilizando la conversión de celulosa en glucosa (Dowe y Mcmillan, 2008):

$$ART_T = \frac{1.111 f \text{ Biomasa}}{\text{Volumen}}$$

Donde ART_T es la máxima concentración de azúcares reductores totales que se pueden obtener de la biomasa en g/L; 1.111 es el factor que convierte la celulosa en el equivalente de glucosa; *f* es la fracción de celulosa contenida en el material lignocelulósico (g/g); Biomasa es la biomasa seca antes de la sacarificación (g); Volumen es el volumen de trabajo en L. El valor *f* se obtuvo de estudios previos realizados a la biomasa de hoja en su composición de biopolímero (sección 2.4.1).

9.1.6.2. Eficiencia del proceso de hidrólisis. La eficiencia del proceso de hidrólisis se calculó con las siguiente fórmula (Dowe y Mcmillan, 2008):

$$\text{Eficiencia hidrólisis} = \frac{\text{ART}_R}{\text{ART}_T} \times 100$$

Donde *Eficiencia hidrólisis* es la recuperación de azúcares del hidrólisis químico-térmica calculada en porcentaje (%); ART_R es la concentración de azúcares reductores totales liberados en el proceso de hidrólisis en la muestra (g/L), y ART_T es la máxima concentración de azúcares reductores totales que se pueden obtener de la biomasa (g/L).

9.2. Etapa 2: Proceso de Fermentación

9.2.1. Cepa de Levadura

La levadura *Kluyveromyces marxianus* CDBB-L-1444 fue proporcionado por el Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del I.P.N. de la Colección Nacional de Cepas Microbianas y Cultivos Celulares. La levadura se activó en caldo PDA durante 48 h a una temperatura de 26 °C, posteriormente se inhibió el crecimiento manteniéndola en refrigeración, y así se mantuvo lista para su posterior uso.

9.2.2. Fermentación

La preparación de los medios de cultivo se realizó con el método de Demiray *et al.* (2019) brevemente: se inoculó *Kluyveromyces marxianus* (CDBB-L-1444) en un matraz Erlenmeyer de 250 mL con válvulas “Airlock”, el volumen del medio de caldo nutritivo fue de 90 mL. El caldo nutritivo utilizado fue el producto resultante de la condición óptima de sacarificación (Etapa 1) adicionado con sales minerales (fosfato monopotásico= 1g/L, sulfato de magnesio= 0.5 g/L, cloruro

de calcio= 0.1 g/L y sulfato de zinc= 0.05 g/L) y fuentes de nitrógeno orgánicas (peptona= 5 g/L y extracto de levadura= 3 g/L). En este proceso los factores que fueron evaluados son la temperatura de 35-45 °C, la agitación de 150-200 rpm y el tiempo de proceso de 24-72 h. El inóculo inicial fue de 2 mL de caldo PDA con levadura en todos los tratamientos. Las variables de respuesta evaluadas en este proceso fueron la concentración de etanol y concentración de levadura.

9.2.3. Concentración de Etanol

Una muestra de 35 mL del caldo de fermentado fue concentrada con rotavapor (Buchi R-215, Canadá). La concentración de etanol se determinó mediante el ensayo dicromato de potasio, y se empleó el método propuesto por Williams y Reese (1950) con algunas modificaciones. Se mezclaron 1 mL de muestra del condensado, 2 mL de solución de dicromato de potasio y se agitó. La mezcla se dejó reposar por 10 min y se agregaron 5 mL de agua destilada. Posteriormente, se midió la absorbancia a 585 nm (Unico S-2150, Dayton, NY) UV-visible. La cuantificación de bioetanol se realizó mediante una curva estándar de etanol (0.1 a 3%) y los resultados se expresaron en porcentaje presente en la muestra.

9.2.4. Unidades Formadoras de Colonias de *Kluyveromyces marxianus*

Las unidades formadoras de colonias de *Kluyveromyces marxianus* se determinó mediante el ensayo de vaciado en placa y se empleó el método propuesto por Pepper y Gerba, (2014) con algunas modificaciones. Se realizaron diluciones del caldo de fermentado hasta 10^{-3} , en cada caja Petri se vació 1 mL de alícuota, se añadió agar PDA a 45 °C, y se dejó solidificar, e inculo a 27 °C por 4 d. Posteriormente, se observaron las cajas Petri después para ver el crecimiento de la levadura. La cuantificación de levaduras se expresó en unidades formadoras de colonias por mililitro de caldo de fermentado (UFC/mL), se tomaron en cuenta aquellas diluciones que tuvieron como resultado de 30 a 300 UFC.

9.2.5. Análisis Estadístico

Un diseño experimental de superficie de respuesta de Box-Behnken fue utilizado para evaluar el efecto de la temperatura (35-45 °C), la agitación (150-200 rpm) y el tiempo (24-72 h) en el proceso de fermentación. Teniendo como variable dependiente (respuesta) a la concentración de etanol, la concentración de azúcares reductoras y las unidades formadoras de colonias de *Kluyveromyces marxianus*. Se utilizó el software Minitab 18 para hacer el diseño experimental y analizar el experimento, dando como resultado un total de 15 corridas experimentales. Para encontrar la condición óptima para el proceso se utilizó la herramienta matemática “optimizador de respuesta” buscando una deseabilidad cercana a la unidad.

9.2.6. Fórmulas

9.2.6.1. Producción de etanol teórica. La fermentación del etanol a partir del azúcar se simplifica en base a la siguiente reacción:



Por la estequiometría por un mol de glucosa ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$) se producen dos moles de etanol ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$), tomando en cuenta que la masa molar de la glucosa es 180 g/mol y la masa molar del etanol es 46 g/mol tenemos lo siguiente:

$$\frac{2 \text{ mol Etanol}}{\text{mol Glucosa}} = \frac{2 \text{ mol} \times 46 \frac{\text{g}}{\text{mol}} \text{ Etanol}}{\text{mol} \times 180 \frac{\text{g}}{\text{mol}} \text{ Glucosa}} = 0.511 \frac{\text{g Etanol}}{\text{g Glucosa}}$$

Por lo tanto, obtenemos que por un gramo de glucosa teóricamente se producen 0.511 gramos de etanol. La glucosa al ser un monosacárido es clasificada como una azúcar reductora total (ART).

$$\text{Producción de etanol teórica} = 0.511 \frac{\text{g etanol}}{\text{g ART}} \times \text{ART}_R \frac{\text{g ART}}{\text{L caldo}}$$

Donde ART_R es la concentración de azúcares reductores totales liberados en el proceso de hidrólisis en la muestra (g/L).

9.2.6.2. Eficiencia de la fermentación.

$$\text{Eficiencia}_{\text{fermentación}} = \frac{\text{PRODUCCIÓN ETANOL REAL}}{\text{PRODUCCIÓN ETANOL TEORICO}} \times 100$$

10. RESULTADOS Y DISCUSIONES

10.1 Etapa 1: Proceso de Sacarificación

Esta etapa se dividió en dos secciones, por lo que se plantean dos diseños experimentales diferentes. La primera sección es referente a las azúcares totales (AT), mientras que la segunda sección es para los azúcares reductores totales (ART). En ambas secciones se tienen modelos con dos variables categóricas y tres variables de proceso, por lo cual en un inicio se planteó el diseño de metodología de superficie de respuesta (MSR) Box–Behnken, dando como resultado un total de 90 corridas experimentales. El diseño MSR Box–Behnken se utilizó en este caso por ser el diseño que propuso menos corridas experimentales, al no contar con puntos axiales, favoreciendo esto a una menor demanda de tiempo y dinero en la etapa experimental.

10.1.1. Azúcares Totales

El modelo evaluado para la respuesta de azúcares totales, de acuerdo al análisis de varianza realizado tiene un ajuste del 92.87%, mientras que el coeficiente de correlación ajustado es de 90.38% (dato obtenido del programa MINITAB 18).

Cuadro 3: Análisis de Varianza para azúcares totales

Fuente	GL	SC Sec.	Contribución	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Modelo	23	13260	92.87%	13260	576.52	37.36	0
Lineal	6	11763.1	82.38%	11763.1	1960.51	127.06	0
Temperatura	1	3379.9	23.67%	3379.9	3379.89	219.04	0
Tiempo	1	43.1	0.30%	43.1	43.14	2.8	0.099
Carga inicial	1	7021	49.17%	7021	7021	455.02	0
Biomasa	2	826.1	5.79%	826.1	413.06	26.77	0
Reactivo	1	492.9	3.45%	492.9	492.92	31.95	0

Cuadrado	3	240.4	1.68%	240.4	80.12	5.19	0.003
Temperatura*Temperatura	1	203.1	1.42%	199.2	199.24	12.91	0.001
Tiempo*Tiempo	1	16.7	0.12%	13.9	13.88	0.9	0.346
Carga inicial*Carga inicial	1	20.6	0.14%	20.6	20.56	1.33	0.253
Interacción de 2 factores	14	1256.5	8.80%	1256.5	89.75	5.82	0
Temperatura*Tiempo	1	11.4	0.08%	11.4	11.41	0.74	0.393
Temperatura* Carga inicial	1	469.9	3.29%	469.9	469.94	30.46	0
Temperatura*Biomasa	2	27.5	0.19%	27.5	13.73	0.89	0.416
Temperatura*Reactivo	1	161.4	1.13%	161.4	161.41	10.46	0.002
Tiempo* Carga inicial	1	1	0.01%	1	0.97	0.06	0.803
Tiempo*Biomasa	2	20.4	0.14%	20.4	10.22	0.66	0.519
Tiempo*Reactivo	1	8.1	0.06%	8.1	8.11	0.53	0.471
Carga inicial *Biomasa	2	276.6	1.94%	276.6	138.3	8.96	0
Carga inicial *Reactivo	1	131.1	0.92%	131.1	131.12	8.5	0.005
Biomasa*Reactivo	2	149	1.04%	149	74.52	4.83	0.011
Error	66	1018.4	7.13%	1018.4	15.43		
Falta de ajuste	54	794.3	5.56%	794.3	14.71	0.79	0.737
Error puro	12	224.1	1.57%	224.1	18.67		
Total	89	14278.3	100.00%				

Números en color rojo indica que la variable no tiene significancia en el modelo ($\alpha=0.05$).

En el modelo de las cinco variables no tiene significancia el tiempo, sus interacciones ni su contribución al término cuadrático al contar con una $\alpha > 0.05$ (Cuadro 3). Esto concuerda con estudios previos, donde el pretratamiento con H₂SO₄ diluido en cascarilla de *Jatropha curcas* el factor tiempo no era significativo en el modelo estadístico (García *et al.*, 2014; Marasabessy *et al.*, 2012). En la Cuadro 4 se presenta el ANOVA excluyendo las variables que no fueron significativas.

Cuadro 4: Análisis de Varianza modificado para azúcares totales

Fuente	GL	SC Sec.	Contribución	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Modelo	13	13111.2	91.83%	13111.2	1008.55	65.67	0
Lineal	5	11719.9	82.08%	11719.9	2343.99	152.63	0
Temperatura	1	3379.9	23.67%	3379.9	3379.89	220.08	0
Carga inicial	1	7021	49.17%	7021	7021	457.17	0
Biomasa	2	826.1	5.79%	826.1	413.06	26.9	0

Reactivo	1	492.9	3.45%	492.9	492.92	32.1	0
Cuadrado	1	203.1	1.42%	203.1	203.1	13.22	0.001
Temperatura*Temperatura	1	203.1	1.42%	203.1	203.1	13.22	0.001
Interacción de 2 factores	7	1188.1	8.32%	1188.1	169.73	11.05	0
Temperatura* Carga inicial	1	469.9	3.29%	469.9	469.94	30.6	0
Temperatura*Reactivo	1	161.4	1.13%	161.4	161.41	10.51	0.002
Carga inicial *Biomasa	2	276.6	1.94%	276.6	138.3	9.01	0
Carga inicial *Reactivo	1	131.1	0.92%	131.1	131.12	8.54	0.005
Biomasa*Reactivo	2	149	1.04%	149	74.52	4.85	0.01
Error	76	1167.2	8.17%	1167.2	15.36		
Falta de ajuste	64	943.1	6.61%	943.1	14.74	0.79	0.74
Error puro	12	224.1	1.57%	224.1	18.67		
Total	89	14278.3	100.00%				

Números en color rojo indica que la variable no tiene significancia en el modelo ($\alpha=0.05$).

En la Cuadro 4 observamos que el modelo se ajusta en un 91.83%, por lo cual la correlación del modelo con respecto a los datos no fue afectada, mientras que el coeficiente de correlación ajustado es de 90.43% (dato obtenido del programa MINITAB 18). Con el modelo ajustado, se utilizó la herramienta de optimizador de respuesta para maximizar, y la respuesta máxima de azúcares totales fue 56.05 mg/mL con una deseabilidad compuesta de 0.9664. La máxima respuesta de azúcares totales se dio en la biomasa de hoja con hidróxido de sodio (NaOH) al 3%, a una temperatura de 100 °C y una carga inicial de biomasa de 5%. Los agentes químicos utilizados en la hidrólisis fueron hidróxido de sodio al 3% y ácido sulfúrico al 3%, siendo NaOH el que presentó una mejor liberación de azúcares. En investigaciones anteriores se ha demostrado que con NaOH solubiliza la lignina hasta un 50% más que con H₂SO₄ aplicado a cascarilla de *J. curcas* (Visser *et al.*, 2012). De igual manera se reportó que el NaOH redujo hasta un 10.22% el contenido de lignina presente en la biomasa de racimos de frutos vacíos de la palma aceitera a diferencia del H₂SO₄ que no tuvo ningún efecto (Sukhang *et al.*, 2019). El tiempo al no contar con significancia en el modelo se fijó a 30 min.

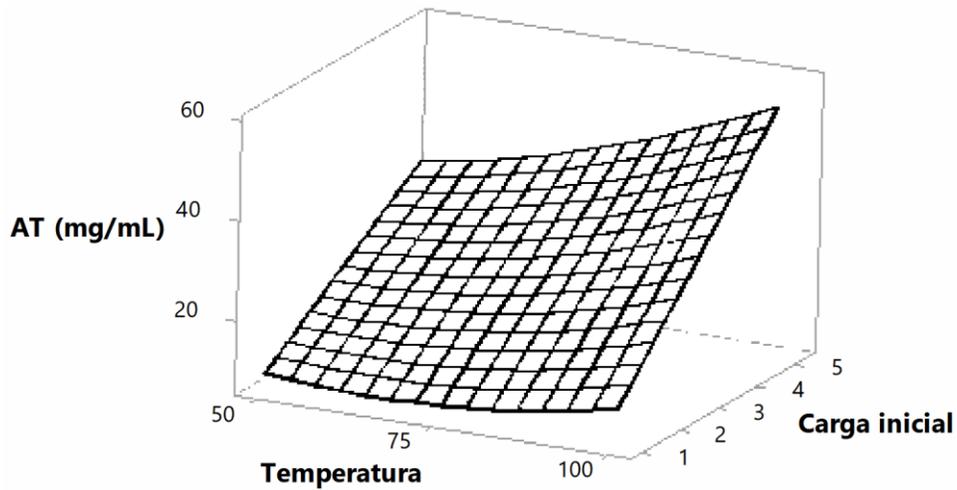


Figura 5. Gráfica de superficie de azúcares totales.

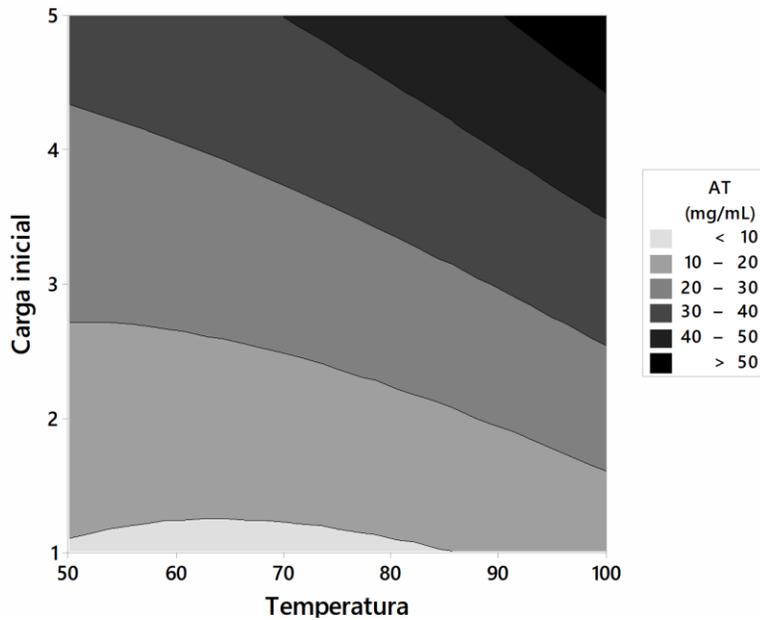


Figura 6. Gráfica de contorno de azúcares totales.

En las Figuras 5 y 6 se observa gráficamente cómo se comporta la respuesta con respecto a las variables de proceso, la máxima concentración de azúcares totales se dio a los máximos valores que podían tomar las variables, no se contemplaron mayores concentraciones en la carga inicial debido a que las mezclas mayores a 5% se presentaban muy heterogéneas y llegó hasta un posible punto de saturación, el máximo nivel de la temperatura fue 100 °C debido a que la técnica de calentamiento fue a baño maría.

10.1.2. Azúcares Reductores Totales

En la Cuadro 5 se reporta el análisis de varianza (ANOVA) resultante para los azúcares reductores totales.

Cuadro 5: Análisis de Varianza para azúcares reductores totales

Fuente	GL	SC Sec.	Contribución	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Modelo	23	82.2167	87.33%	82.2167	3.5746	19.77	0
Lineal	6	52.2016	55.45%	52.2016	8.7003	48.13	0
Temperatura	1	4.4447	4.72%	4.4447	4.4447	24.59	0
Tiempo	1	0	0.00%	0	0	0	0.997
Carga inicial	1	14.0847	14.96%	14.0847	14.0847	77.92	0
Biomasa	2	6.5246	6.93%	6.5246	3.2623	18.05	0
Reactivo	1	27.1477	28.84%	27.1477	27.1477	150.18	0
Cuadrado	3	0.2353	0.25%	0.2353	0.0784	0.43	0.729
Temperatura*Temperatura	1	0	0.00%	0	0	0	0.998
Tiempo*Tiempo	1	0.1549	0.16%	0.1374	0.1374	0.76	0.387
Carga inicial*Carga inicial	1	0.0804	0.09%	0.0804	0.0804	0.44	0.507
Interacción de 2 factores	14	29.7797	31.63%	29.7797	2.1271	11.77	0
Temperatura*Tiempo	1	0.001	0.00%	0.001	0.001	0.01	0.941
Temperatura*Carga inicial	1	0.8793	0.93%	0.8793	0.8793	4.86	0.031
Temperatura*Biomasa	2	0.6155	0.65%	0.6155	0.3078	1.7	0.19
Temperatura*Reactivo	1	1.6604	1.76%	1.6604	1.6604	9.19	0.003
Tiempo*Carga inicial	1	0.0375	0.04%	0.0375	0.0375	0.21	0.65
Tiempo*Biomasa	2	0.2334	0.25%	0.2334	0.1167	0.65	0.528
Tiempo*Reactivo	1	0.0111	0.01%	0.0111	0.0111	0.06	0.805
Carga inicial*Biomasa	2	3.9754	4.22%	3.9754	1.9877	11	0
Carga inicial*Reactivo	1	12.9274	13.73%	12.9274	12.9274	71.51	0
Biomasa*Reactivo	2	9.4386	10.03%	9.4386	4.7193	26.11	0
Error	66	11.9306	12.67%	11.9306	0.1808		
Falta de ajuste	54	9.579	10.17%	9.579	0.1774	0.91	0.624
Error puro	12	2.3516	2.50%	2.3516	0.196		
Total	89	94.1473	100.00%				

Números en color rojo indica que la variable no tiene significancia en el modelo ($\alpha=0.05$).

El modelo evaluado para la respuesta de azúcares reductores totales, de acuerdo al análisis de varianza realizado tiene un ajuste del 87.33%, mientras que el coeficiente de correlación ajustado es de 82.91% (dato obtenido del programa MINITAB 18). De igual manera que en la sección anterior el tiempo no es significativo para este modelo.

Cuadro 6: Análisis de Varianza modificado para azúcares reductores totales

Fuente	GL	SC Sec.	Contribución	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Modelo	12	81.0828	86.12%	81.0828	6.7569	39.82	0
Lineal	5	52.2016	55.45%	52.2016	10.4403	61.53	0
Temperatura	1	4.4447	4.72%	4.4447	4.4447	26.2	0
Carga inicial	1	14.0847	14.96%	14.0847	14.0847	83.01	0
Biomasa	2	6.5246	6.93%	6.5246	3.2623	19.23	0
Reactivo	1	27.1477	28.84%	27.1477	27.1477	160	0
Interacción de 2 factores	7	28.8812	30.68%	28.8812	4.1259	24.32	0
Temperatura*Carga inicial	1	0.8793	0.93%	0.8793	0.8793	5.18	0.026
Temperatura*Reactivo	1	1.6604	1.76%	1.6604	1.6604	9.79	0.002
Carga inicial*Biomasa	2	3.9754	4.22%	3.9754	1.9877	11.72	0
Carga inicial*Reactivo	1	12.9274	13.73%	12.9274	12.9274	76.19	0
Biomasa*Reactivo	2	9.4386	10.03%	9.4386	4.7193	27.81	0
Error	77	13.0645	13.88%	13.0645	0.1697		
Falta de ajuste	65	10.7129	11.38%	10.7129	0.1648	0.84	0.69
Error puro	12	2.3516	2.50%	2.3516	0.196		
Total	89	94.1473	100.00%				

Números en color rojo indica que la variable no tiene significancia en el modelo ($\alpha=0.05$).

En el ANOVA resultante (Cuadro 6) se observa que el nuevo ajuste del modelo cuenta con un 86.12%, por lo cual la correlación del modelo no se vio muy afectada después de remover los términos que no fueron significativos, mientras que el coeficiente de correlación ajustado es de 83.96% (dato obtenido del programa MINITAB 18), este mejoró un poco con respecto el modelo que contenía a factores no significativos (82.91%.) En este caso como en los anteriores análisis de varianza la falta de ajuste no es significativa para el modelo, esto quiere decir que no se puede concluir que el modelo no ajusta adecuadamente a los datos.

La máxima respuesta de azúcares totales se obtuvo de la biomasa de hoja con hidróxido de sodio

(NaOH) al 3% a 100 °C y una carga inicial de materia prima de 5%. El tiempo se fijó a 48 min, comparando con el tiempo necesario en la respuesta de azúcares totales que fue 30 min, para la respuesta de azúcares reductores debe ser un tiempo mayor debido a que el proceso de hidrólisis comienza cuando la celulosa y la hemicelulosa comienzan a ser liberadas por la lignina y en un paso siguiente es necesario más tiempo para que los mono-, di-, tri- y oligosacáridos sean liberados de los polímeros (celulosa y hemicelulosa) (Valdés-Martínez, 2006). Confirmando el ajuste del modelo, se utilizó la herramienta de optimizador de respuesta y la respuesta máxima de azúcares reductores totales fue 4.44 mg/mL con una deseabilidad compuesta de 0.959, y equivale a 91.49 mg/g de masa seca de hoja, esta concentración es mayor a lo reportado en biomasa de paja de maíz con 32.31 mg/g (Wang *et al.*, 2015) y en madera de palma con 52.65 mg/g (Sathendra *et al.*, 2018), pero es menor a lo reportado en cáscara de granada con 197.1 mg/g (Demiray *et al.*, 2019) y en tallo de algodón en adición de una etapa de hidrólisis enzimática con 241 mg/g (Kamran *et al.*, 2020). En el caso donde fue menor la concentración de azúcares no se utilizó NaOH en la hidrólisis química, se ha reportado que NaOH solubilizó la lignina hasta un 50% más que el H₂SO₄ en cascarilla de *Jatropha curcas* (Visser *et al.*, 2012). En la Figura 5 se presenta la gráfica de superficie, mientras que en la Figura 6 se presenta la gráfica de contornos. Para observar la eficiencia del proceso de hidrólisis es necesario comparar la máxima concentración de azúcares reductores totales teórica (sección 9.1.6) con la concentración resultante real.

$$ART_T = \frac{1.111 * 0.23 \frac{g}{g} * 1g}{0.02 L} = 12.7765 g/L$$

Por lo cual, la máxima concentración de azúcares reductores totales que se puede obtener posterior a la sacarificación es 12.7765 g/L.

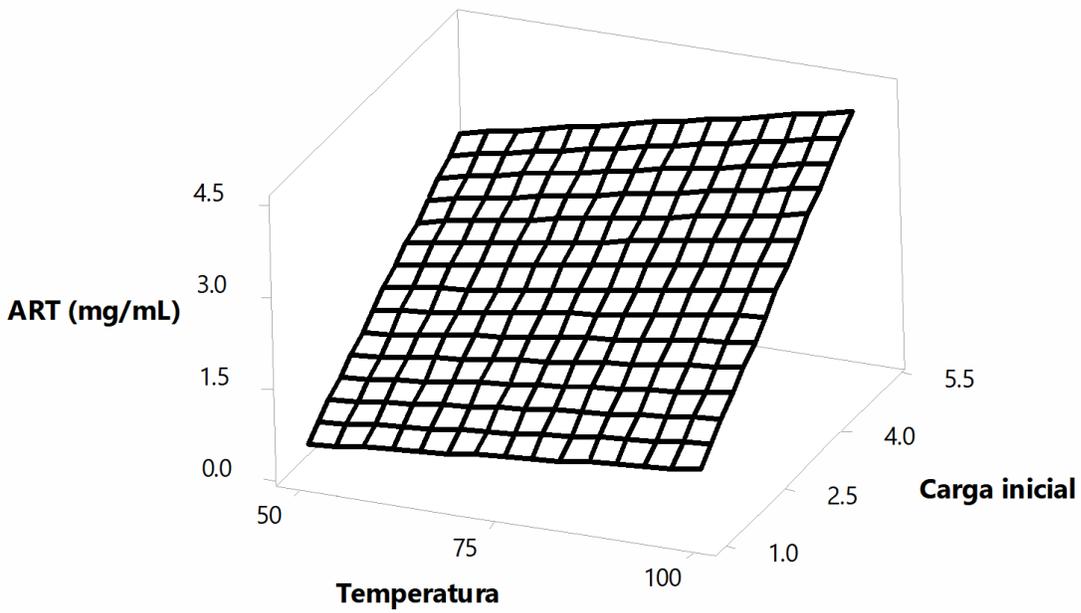


Figura 7. Gráfica de superficie de azúcares reductores totales.

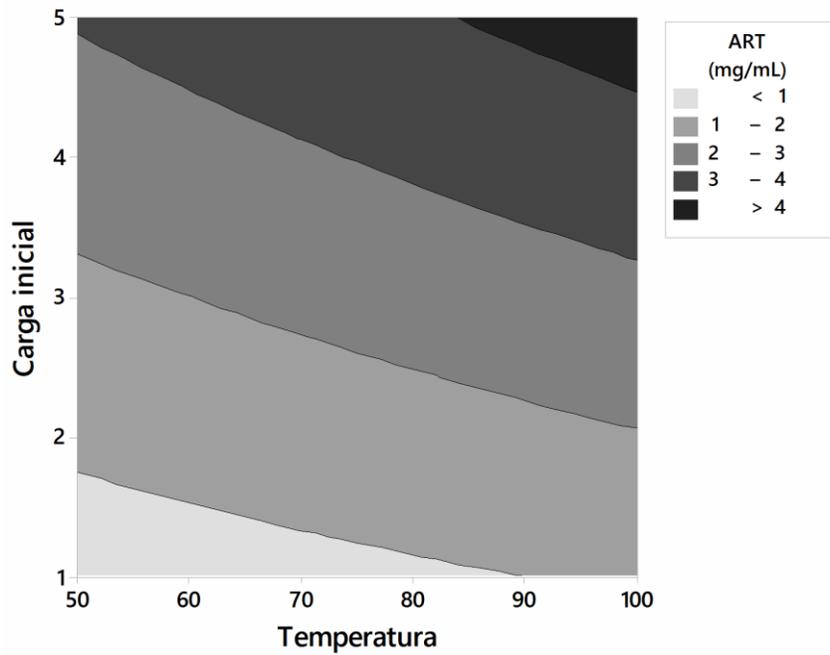


Figura 8. Gráfica de contorno de azúcares reductores totales.

Se calculó la eficiencia del proceso de hidrólisis:

$$\text{Eficiencia hidrólisis} = \frac{4.44 \text{ g/L}}{12.7765 \text{ g/L}} \times 100 = 34.75\%$$

Aunque no hay estudios previos en *J. platyphylla*, la eficiencia de la hidrólisis de este estudio se encuentra en el rango de lo reportado en el pretratamiento alcalino y sacarificación enzimática de la biomasa de *Agave atrovirens*, con valores en el rango del 12-58% (Hernández-Salas *et al.*, 2009). En *Agave americana* se reportó eficiencias de hidrólisis en el rango de 53-68%, sometiendo previamente la biomasa a tres tipos de pretratamientos como ácido diluido, alcalino y sulfito (Yang y Pan, 2012), siendo los resultados del presente trabajo inferiores a estos resultados. En investigaciones realizadas sobre *A. tequilana*, se estudió el efecto del pretratamiento ácido (1-3% de ácido sulfúrico) y la hidrólisis enzimática (celulasa y b-glucosidasa) en el bagazo de agave (Saucedo-Luna *et al.*, 2011). Los autores reportaron conversiones de sacarificación de 43 a 67% y azúcares fermentables de hasta 41 g/L. También se ha evaluado el efecto de diferentes combinaciones de H₂SO₄ (1-4%), temperatura (115-130 °C), tiempo de permanencia (30-90 min), carga sólida (5% p/v) y, sacarificación enzimática en el bagazo de *A. tequilana* (Rijal *et al.*, 2016). Los autores reportaron conversiones teóricas del 69% con concentraciones de glucosa de 267.9 mg/g. Cabe destacar que las concentraciones de azúcares y la eficiencia de la hidrólisis en el presente trabajo están por debajo de algunos trabajos presentados como referencia, pero todos estos autores utilizaron hidrólisis enzimática o la combinación de la hidrólisis química con la enzimática para mejorar la eficiencia de la hidrólisis.

10.2 Etapa 2: Proceso de Fermentación

La etapa 2 se dividió en dos secciones según su variable de respuesta: producción de etanol y unidades formadoras de colonias de *Kluyveromyces marxianus*. Como resultado en ambas secciones tenemos modelos con tres variables de proceso (temperatura, agitación y tiempo), dando como resultado un total de 15 corridas experimentales (Cuadro 7). El diseño MSR Box–Behnken se utilizó al ser el que requiere menor número de corridas experimentales, al no contar con puntos axiales, favoreciendo esto a una menor demanda de tiempo y dinero en la etapa experimental. En

este proceso la variable tiempo fue de 24 a 72 h dependiendo de cada corrida, los cual mostró una demanda desafiante de equipos y de tiempo.

Cuadro 7. Variables asignadas a cada corrida experimental (Minitab 18)

Número de corrida	Temperatura (°C)	Tiempo (h)	Agitación (rpm)
1	35	24	150
2	45	24	150
3	35	72	150
4	45	72	150
5	35	48	100
6	45	48	100
7	35	48	200
8	45	48	200
9	40	24	100
10	40	72	100
11	40	24	200
12	40	72	200
13	40	48	150
14	40	48	150
15	40	48	150

10.2.1. Producción de Etanol

10.2.1.1. Fermentación sin extracción de compuestos bioactivos. Se calculó la producción de etanol teórica para compararla con la concentración de etanol real que obtuvimos en esta etapa.

$$\text{Producción de etanol teorica} = 0.511 \frac{\text{g etanol}}{\text{g ART}} \times 4.44 \frac{\text{g ART}}{\text{L caldo}} = 2.27 \frac{\text{g etanol}}{\text{L caldo}}$$

Donde 4.44 g/L representa el valor máximo de azúcares reductores totales encontrado en la sección 10.1.2. En el caso de la producción real de etanol resultante de la fermentación solo una corrida

experimental fue capaz de producir etanol (corrida #3), por lo cual no fue posible implementar el análisis estadístico planteado, esta corrida experimental contó con las condiciones de temperatura igual a 35 °C, agitación de 150 rpm y un tiempo de 72 h, esta produjo una concentración de 0.195 mL/L (0.154 g/L). Tomando en cuenta este resultado podemos calcular la eficiencia de la fermentación:

$$Eficiencia_{fermentación} = \frac{0.154 \text{ g/L}}{2.27 \text{ g/L}} \times 100 = 6.78\%$$

Se obtuvo una concentración de azúcares reductores totales de 4.44 mg/mL equivalentes a 91.49 mg por gramo de masa seca y en la fermentación se produjo 0.154 g/L de etanol. Comparando con el trabajo realizado en madera de palma esta concentración de azúcares reductoras es mayor de 52.65 mg/g, pero la producción de etanol de este trabajo fue de 22.9 g/L (Sathendra *et al.*, 2018), reportando así una menor concentración de azúcares reductores totales, pero una mayor producción de etanol.

La concentración máxima de etanol (0.154 g/L) y la eficiencia de la fermentación (6.78%) se encuentra muy por debajo de la reportado en cáscara de granada, *Agave tequilana*, y bagazo de manzana (Demiray *et al.*, 2019; Saucedo-Luna *et al.*, 2011; Rodrigues *et al.*, 2016), esto puede deberse a posibles inhibidores resultantes del proceso de hidrólisis y/o bioactivos presentes en la materia prima. Estos compuestos derivados del pretratamiento de la lignocelulosa en hidrolizados incluyen ácidos débiles (ácido fórmico y ácido acético), derivados de furano y compuestos fenólicos, individual o en conjunto pueden llegar a afectar el crecimiento de la levadura, la producción de etanol e incluso llegar matar a toda la levadura presente en la fermentación (Kim *et al.*, 2015). En la hoja de *J. platyphylla* se ha reportado la presencia de alcaloides, terpenos, flavonoides, entre otros y por lo menos un par de estos compuestos se han reportado con actividad antifúngica (Leyva-Acuña *et al.*, 2020; Sabandar *et al.*, 2013).

La hipótesis número dos, “temperaturas entre 35-45 °C, agitación entre 100-200 rpm y tiempo de proceso entre 24-72 h, promoverán a la levadura *Kluyveromyces marxianus* a tener una mayor eficiencia en la fermentación a partir de biomasa lignocelulósica de *J. platyphylla* y se espera una eficiencia de la fermentación de por lo menos 50%”, se rechaza debido a que es posible que algunos

de los compuestos bioactivos presentes en hoja de *J. platyphylla* inhiban el desarrollo óptimo de la levadura.

Previamente se ha reportado que *Kluyveromyces marxianus* es termotolerante y resistente a compuestos inhibitorios presentes en las materias primas. Sin embargo, no fue el caso en este estudio, donde si hay inhibición por bioactivos de la hoja de *J. platyphylla*. Se ha investigado la capacidad de dos diferentes tipos de cepas de la levadura *K. marxianus* (SLP1 y OFF1) en la producción de etanol en presencia de inhibidores a partir de hidrolizados de bagazo de caña de azúcar y paja de trigo, dando como resultado que la cepa SLP1 fue la más eficiente para la producción de etanol en ambos hidrolizados, mientras que la cepa OFF1 tuvo una concentración de etanol por debajo de la producida por la cepa SLP1 (Sandoval-Núñez *et al.*, 2018). En un ensayo utilizando jugo de hojas de Henequén (*Agave fourcroydes*) se demostró que la levadura *S. cerevisiae* no creció en ninguno de los hidrolizados, mientras que *K. marxianus* pudo crecer y fermentar este sustrato (Villegas-Silva *et al.*, 2014). Esto se debe a la presencia de compuestos inhibidores en el jugo de henequén, ya que las plantas de agave producen saponinas con actividad inhibidora, cabe mencionar que en esta investigación que *K. marxianus* se aisló de la base de las hojas de henequén.

Se reportó que las producciones de etanol fueron más altas con *K. marxianus* OFF1 que con *S. cerevisiae* RED, utilizando como sustrato hojas de *Agave salmiana*, (uno de los agaves con mayor contenido de compuestos inhibidores del crecimiento celular), este comportamiento podría atribuirse a la adaptación natural de *K. marxianus* a altas concentraciones de inhibidores ya que fueron aislados del mosto de fermentación del mezcal de *A. cupreata* y *A. salmiana* (Láinez *et al.*, 2019). Asimismo, *K. marxianus* SLP1 mostró actividad de saponinasa (capacidad para hidrolizar saponinas) al mostrar una recuperación en el crecimiento celular pasado un tiempo en la fermentación, ya que se estudió como se ve afectado su desarrollo con saponinas extraídas de las hojas de *Agave durangensis* y *Agave salmiana*, (Alcázar *et al.*, 2017). Por lo que la tolerancia hacia los compuestos inhibidores depende principalmente de donde se aisló cada cepa de levadura, en nuestro caso se utilizó la cepa CDBB-L-1444, resultando con una mala tolerancia hacia los compuestos inhibidores que contiene y/o se producen en la hidrólisis de la hoja de *J. platyphylla*. A manera de confirmar si realmente son los compuestos presentes en la hoja de *J. platyphylla* son los responsables de inhibir las funciones metabólicas de la levadura y la nula producción de etanol es necesario realizar una extracción de estos compuestos.

10.2.1.2. Fermentación con extracción de compuestos bioactivos. Antes de utilizar la biomasa de hoja de *J. platyphylla* en el pretratamiento químico y poder hidrolizar los polisacáridos fue sometida a un proceso de extracción con solvente para remover los compuestos bioactivos (entre ellos compuestos inhibidores) en el proceso de fermentación. Se pesaron 50 g de harina de hoja de *J. platyphylla* y se mezclaron con etanol grado analítico (FAGALAB, México) en una relación (1:10) con agitación por 72 h a 20 °C (cada 24 h se filtró y resuspendió la biomasa en etanol, realizando una triple extracción). La muestra se filtró y la biomasa pasó a una estufa a 75 °C hasta obtener una harina completamente seca. Una vez obtenida la biomasa de hoja completamente seca se implementó la hidrólisis química utilizando los valores encontrados en el punto óptimo. Cabe destacar que la concentración de azúcares reductores totales resultante del proceso de hidrólisis química fue menor (2.95 mg/mL) comparado con la concentración resultante del hidrolizado al cual no se le extrajeron los compuestos bioactivos (4.44 mg/mL).

Algunos de los inhibidores pueden eliminarse mediante la desintoxicación de la biomasa lignocelulósica, por ejemplo, la eficiencia de eliminación de los inhibidores de la fermentación en un hidrolizado lignocelulósico por electrodiálisis (ED). El proceso de ED mostró la alta eficacia para eliminar el ácido acético y los compuestos fenólicos totales en el hidrolizado sin pérdida de azúcares fermentables. Sin embargo, la mayor parte del 5-hidroximetilfurfural y furfural permaneció en el hidrolizado después de la DE (Lee *et al.*, 2013). De la misma manera, se ha realizado la eliminación de compuestos inhibitorios del hidrolizado antes de la fermentación para eliminar los compuestos inhibidores como los compuestos fenólicos, el furfural y el 5-hidroximetil furfural (Tahir y Mezeri, 2020). Esto se realizó con la sobresaturación de hidróxido de calcio Ca(OH)_2 en el hidrolizado para aumentar su pH (9-12) y posteriormente se neutralizó con H_2SO_4 , teniendo como resultado la eliminación del 55.7% del furfural y del 57.8% del 5-hidroximetil furfural. Pero la desintoxicación de la biomasa lignocelulósica no debe considerarse la mejor opción ya que se ha reportado la pérdida de azúcares después del proceso de extracción de inhibidores, lo cual lleva al aumento de los costos de producción de bioetanol (Lee *et al.*, 2013). Esto concuerda con nuestra investigación donde se observa que el solvente que utilizamos no solo arrastró compuestos inhibidores si no también azúcares reductores totales, ya que hubo una pérdida de azúcares reductores totales de una concentración de 4.44 g/L se redujo a una concentración de 2.95 g/L.

Se calculó la producción de etanol teórica:

$$\text{Producción de etanol teórica} = 0.511 \frac{\text{g etanol}}{\text{g ART}} \times 2.95 \frac{\text{g ART}}{\text{L caldo}} = 1.51 \frac{\text{g etanol}}{\text{L caldo}}$$

En el caso de la producción real de etanol resultante la fermentación contó con las condiciones de temperatura igual a 40 °C, agitación de 100 rpm y un tiempo de 72 h; esta produjo una concentración de 1.14 mL/L (0.9 g/L). Tomando en cuenta este resultado se calculó la eficiencia de la fermentación:

$$\text{Eficiencia}_{\text{fermentación}} = \frac{P. \text{ETANOL REAL}}{P. \text{ETANOL TEÓRICO}} \times 100 = \frac{0.9 \text{ g/L}}{1.51 \text{ g/L}} \times 100 = 59.6\%$$

Previamente ha reportado la fermentación de hidrolizados de biomasa de *A. atrovirens* sometida a una hidrólisis química-enzimática usando a *S. cerevisiae* (Hernández-Salas *et al.* 2009). Estos autores reportaron una concentración de azúcares reductores de 19-56 g/L, incubando los experimentos a 30 °C durante 48 h. Se reportaron concentraciones de etanol de 4.7 a 12.9 g/L, equivalentes a una eficiencia de fermentación en el rango de 11-33%. Se reportó una concentración máxima de etanol de 24.9 g/L y una eficiencia en la fermentación máxima de 60.66% utilizando como materia prima el bagazo de manzana pretratado químicamente (ácida-básica) bajo las condiciones de 40 °C con una agitación de 150 rpm durante 72 h (Rodrigues *et al.*, 2016).

La eficiencia de la fermentación en este trabajo fue mayor después de extraer los compuestos inhibidores, reportando en este trabajo una eficiencia del 59.6%, la cual es mayor a las eficiencias reportadas en los trabajos mencionados anteriormente.

La eficiencia en la fermentación registrada en este trabajo fue menor que las reportadas en la fermentación de hidrolizados de *A. tequilana* utilizando *Pichia caribbica* a 30 °C y 100 rpm (Saucedo-Luna *et al.*, 2011). La producción máxima de etanol fue 18.31 g/L después de 48 h en lo que corresponde a una eficiencia de fermentación del 87%. Se reportó la concentración de etanol

máxima de 7.2 g/L y una eficiencia en la fermentación máxima de 83.1%, en la fermentación de cáscara de granada adicionada con sales minerales y nitrógeno orgánico utilizando como levadura *K. marxianus* (Demiray *et al.*, 2019). En este trabajo se realizó previamente una hidrólisis química con H₂SO₄ al 1%, incubando los experimentos a 30 °C con una agitación de 100 rpm durante 24 h. De igual manera utilizando como materia prima para obtención de etanol al jugo de remolacha adicionada con 1 g/L de (NH₄)₂HPO₄ y 1 g/L de MgSO₄·7 H₂O. Se reportó una eficiencia en la fermentación de 80% incubando los experimentos a 35 °C durante 96 h (Dziugan *et al.*, 2013).

Las diferencias en las eficiencias de fermentación entre este trabajo y los mencionados anteriormente pueden atribuirse a la etapa de hidrólisis utilizada y las diferencias en los parámetros de fermentación, como la temperatura, la agitación y la suplementación de nutrientes. En los trabajos citados las etapas de hidrólisis para maximizar la concentración de azúcares reductores totales fueron hidrólisis enzimáticas, combinación química-enzimática, químicas ácidas a diferencia de la utilizada en este trabajo que fue química básica. Mientras que los parámetros en las investigaciones de referencia estuvieron con valores de agitación entre 50 a 150 rpm, temperatura entre 30 °C a 40 °C, tiempos de proceso entre 24 a 96 h y algunos con adición de nutrientes.

Con base a los resultados obtenidos en esta investigación podemos observar que el rendimiento máximo de etanol una vez extraído los compuestos inhibitorios (0.9 g/L), parecería estar muy por debajo a lo reportado en otras investigaciones (Cuadro 2), pero la concentración de azúcares reductores totales en un inicio de la fermentación era baja (2.95 g/L). Por lo cual la eficiencia de la fermentación se vuelve un parámetro importante, ya que con este se puede encontrar una relación directa de la concentración de azúcares reductores totales y su influencia en la producción de etanol.

10.2.2. Unidades Formadoras de Colonias de *Kluyveromyces marxianus*

10.2.2.1. Sin extracción de compuestos bioactivos. Las concentraciones de levaduras se obtuvieron mediante la técnica de vaciado en placa (Pepper y Gerba, 2014) y como resultados se tiene, que antes de inocular los caldos a fermentar sin la extracción previa de compuestos inhibidores, se tenía una concentración promedio de 42 unidades formadoras de colonias (UFC) por cada mililitro de inóculo en una dilución de 10⁻⁶ (Figura 9). Por lo que la concentración de levaduras que tuvo el

caldo una vez iniciada la fermentación fue de un promedio de 84 millones de UFC (el inóculo inicial fue de 2 mL).



Figura 9. Unidad formadora de colonias de *Kluyveromyces marxianus* en una dilución 10^{-6} , antes del proceso de fermentación sin la extracción previa de compuestos inhibidores.

Posterior al proceso de fermentación de la misma manera se realizó la técnica de vaciado en placa para observar las unidades formadoras de colonias de *Kluyveromyces marxianus* una vez detenida la fermentación; como resultado no se detectó presencia de alguna unidad formadora de colonias (Pepper y Gerba, 2014).

Como se mencionó con anterioridad en la sección 10.2.1, de todas las corridas experimentales solo la número 3 (Temperatura= 35 °C, agitación= 150 rpm y tiempo= 72 horas) fue la que produjo etanol (0.154 g/L), pero de la misma manera que las otras corridas experimentales no se observaron presencia de UFC posterior a la fermentación. Esto puede deberse al estrés oxidativo y posterior muerte celular que tuvo la levadura por los agentes inhibidores resultantes del proceso de hidrólisis química. Se ha informado que compuestos inhibidores como el ácido acético, el furfural y el fenol están relacionados con el estado redox dentro de las células, lo que induce la generación de especies reactivas de oxígeno (ERO) (Kim *et al.*, 2015). En condiciones fisiológicas normales, la generación y eliminación de ERO mantienen el equilibrio para evitar daños celulares (Herrero *et al.*, 2008).

Los niveles elevados de ERO no solo dañan las proteínas, sino que también provocan la peroxidación de lípidos en las membranas celulares. Tales daños afectan a numerosos procesos celulares, lo que lleva a una mal función celular o a la muerte celular (Gervais *et al.*, 2003).

10.2.2.2. Con extracción de compuestos bioactivos. Como resultados se tiene que antes de inocular los caldos a fermentar con la extracción previa de compuesto inhibidores, se tenía una concentración promedio de 46 unidades formadoras de colonias (UFC) por cada mililitro de inóculo en una dilución de 10^{-6} (Figura 10). Por lo que la concentración de levaduras que tuvo el caldo una vez iniciada la fermentación fue de un promedio de 92 millones de UFC (el inóculo inicial fue de 2 mL).



Figura 10. Unidad formadora de colonias de *Kluyveromyces marxianus* en una dilución 10^{-6} , antes del proceso de fermentación con la extracción previa de compuestos inhibidores.

Posterior al proceso de fermentación de la misma manera se realizó la técnica de vaciado en placa para observar las unidades formadoras de colonias de *Kluyveromyces marxianus* una vez detenida

la fermentación; como resultado podemos observar (Figura 11) que no se detectó presencia de alguna unidad formadora de colonias (Pepper y Gerba, 2014).

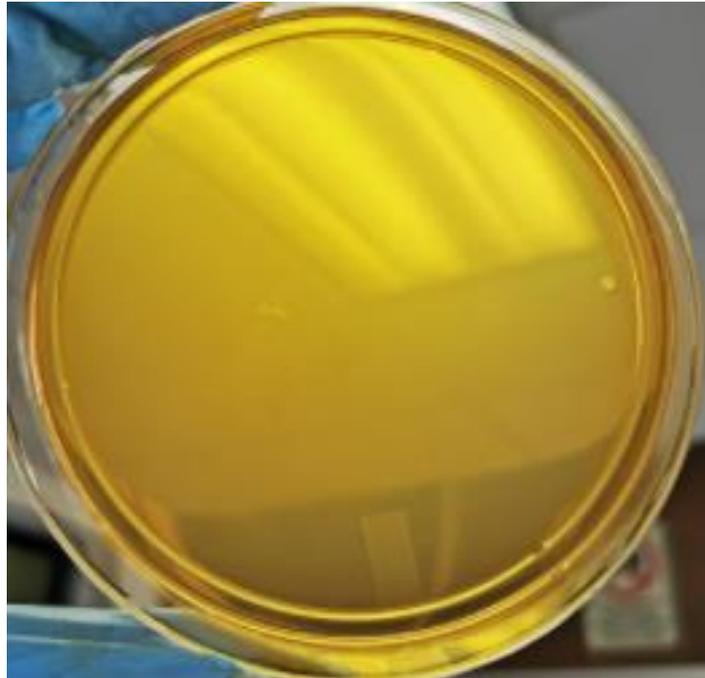


Figura 11. Unidad formadora de colonias de *Kluyveromyces marxianus*, después del proceso de fermentación con la extracción previa de compuestos inhibidores.

En esta corrida experimental (temperatura= 40 °C, agitación= 100 rpm y tiempo= 72 h) se produjo un rendimiento de etanol del 0.9 g/L con una eficiencia en la fermentación del 59.6%, pero en cuanto a la concentración de levaduras no se observaron presencia de UFC posterior a la fermentación. Explicado desde el punto de vista del crecimiento celular de la levadura, desde la fase de crecimiento exponencial hasta la fase estacionaria se producen metabolitos secundarios. Uno de los metabolitos secundarios principales en la fermentación es el etanol, la acumulación de metabolitos secundarios y la falta de nutrientes en el ambiente generan la fase de muerte celular en el crecimiento celular. El etanol es uno de los principales factores de estrés al que se enfrenta la célula de levadura durante la fermentación, ya que el aumento de la concentración de etanol inhibe la viabilidad y el crecimiento de la levadura (Madeira-Jr y Gomberta, 2018). El incremento de la concentración de etanol durante la fermentación afecta la fluidez de la membrana plasmática y da

como resultado la pérdida del equilibrio iónico y cambios en la composición de la membrana celular (Teixeira *et al.*, 2009).

11. CONCLUSIONES

La máxima concentración de azúcares reductores totales encontrada después en las biomásas de la hidrólisis de *J. platyphylla* fue de 4.44 g/L sin extracción de bioactivos, encontrado en el punto óptimo en temperatura de 100 °C, tiempo de 48 min, carga inicial de biomasa de 5%. La biomasa hidrolizada con mayor cantidad de azúcares fue la hoja y el agente químico que liberó más azúcares reductores fue el hidróxido de sodio (NaOH). La variable tiempo, su término cuadrático y sus interacciones no fueron significativas para el modelo ($\alpha > 0.05$). Una vez realizada la extracción de bioactivos, la concentración de azúcares reductores totales disminuyó a 2.95 g/L, esto debido a que la extracción no solo arrastró los compuestos inhibitorios de la hoja, sino que también arrastró azúcares fermentables.

La máxima concentración de bioetanol resultante de hoja de *J. platyphylla* sin extracción de bioactivos fue de 0.154 g/L. Cabe resaltar que solo una corrida experimental fue la que produjo etanol, bajo las condiciones de temperatura de 35 °C, agitación de 150 rpm y tiempo de 72 h. La deficiente fermentación y la baja concentración de bioetanol se adjudican a la presencia de compuestos inhibitorios nativos de la hoja de *J. platyphylla* y aquellos que se formaron en el proceso de hidrólisis. En la fermentación con extracción de bioactivos se obtuvo un rendimiento de bioetanol igual a 0.9 g/L, y la eficiencia de la fermentación fue de 59.6%, siendo superior a las expectativas iniciales. Por lo tanto, es necesario remover los compuestos inhibidores presente en la materia prima para tener un modelo de producción de etanol más redituable y eficiente. La eficiencia de la fermentación se vuelve un parámetro importante, ya que con este se puede encontrar una relación directa de la concentración de azúcares reductores totales y su influencia en la producción de etanol. La biomasa de *J. platyphylla* no es recomendada para una producción a gran escala de bioetanol debido a que una estimación con los resultados obtenidos da como resultado que 100 kg de hoja solo producirían 2.277 L de bioetanol. No resulta práctico utilizar la hoja de *J. platyphylla* hidrolizada químicamente para la producción de bioetanol se segunda generación.

12. RECOMENDACIONES

Realizar un estudio de los posibles compuestos bioactivos presentes en la hoja de *J. platyphylla* antes y después del proceso de hidrólisis química, con la finalidad de ver el incremento de los compuestos inhibitorios.

Evaluar el efecto de una etapa de hidrólisis enzimática en combinación de la hidrólisis química para ver el aumento de los azúcares reductores totales.

13. REFERENCIAS

- Abdel-Banat, B.M.A., Hoshida, H., Ano, A., Nonklang, S. y Akada, R. 2010. High-temperature fermentation: how can processes for ethanol production at high temperatures become superior to the traditional process using mesophilic yeast? *Applied Microbiology and Biotechnology*. 85: 861-867.
- Abril, A. y Navarro, E.A. 2012. Etanol a partir de biomasa lignocelulósica. Aleta Ediciones. España. ISBN: 978-84-15225-50-8. 101 páginas.
- Ahmed El-Imam, A.M., Greethamc, D., Duc, C. y Dyera, P.S. 2019. The development of a biorefining strategy for the production of biofuel from *sorghum milling* waste. *Biochemical Engineering Journal*. 150: 107288.
- Alcázar, M., Kind, T., Gschaedler, A., Silveria, M., Arrizon, J., Fiehn, O., Vallejo, A., Higuera, I., y Lugo, E. 2017. Effect of steroidal saponins from *Agave* on the polysaccharide cell wall composition of *Saccharomyces cerevisiae* and *Kluyveromyces marxianus*. *Food Science and Technology*. 77: 430-439.
- Alvim, M.C.T., Vital, C.E., Barros, E., Vieira, N.M., da Silveira, F.A., Balbino, T.R., Diniz, R.H.S., Brito, A.F., Bazzolli, D.M.S de Oliveira, H.J. y da Silveira, W.B. 2019. Ethanol stress responses of *Kluyveromyces marxianus* CCT 7735 revealed by proteomic and metabolomic analyses. *Antonie van Leeuwenhoek*. 112(6): 827-845.
- Anderson, P.J., McNeil, K. y Watson, K. 1986. High-efficiency carbohydrate fermentation to ethanol at temperatures above 40°C by *Kluyveromyces marxianus var. marxianus* isolated from sugar mills. *Applied and Environmental Microbiology*. 51: 1314-1320.
- Ballesteros, M., Oliva, J.M., Manzanares, P., Negro, M.J. y Ballesteros, I. 2002. Ethanol production from paper material using a simultaneous saccharification and fermentation system in a fedbatch basis. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 18: 559-561.
- Ballesteros, M., Oliva, J.M., Negro, M.J., Manzanares, P. y Ballesteros, I. 2004. Ethanol from lignocellulosic materials by a simultaneous saccharification and fermentation process (SFS) with *Kluyveromyces marxianus* CECT 10875. *Process Biochemistry*. 39: 1843-1848.
- Banat, I.M., Nigam, P. y Marchant, R. 1992. Isolation of thermotolerant, fermentative yeasts growing at 52 °C and producing ethanol at 45 °C and 50 °C. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 8: 259-263.
- Banat, I.M., Nigam, P., Singh, D., Marchant, R. y McHale, A.P. 1998. Ethanol production at elevated temperatures and alcohol concentrations: Part I - Yeasts in general. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 14: 809-821.
- Banat, I.M., Singh, D. y Marchant, R. 1996. The use of a thermotolerant fermentative *Kluyveromyces marxianus* IMB3 yeast strain for ethanol production. *Acta. Biotechnology*. 16: 215-223.
- Barnett, J.A. y Barnett, L. 2011. *Yeast Research: A Historical Overview*. ASM Press. Primera edición. Washington, D.C. 379 pp.
- Barron, N., Marchant, R., McHale, L. y McHale, A.P. 1996. Ethanol production from cellulose at

45 °C using a batch-fed system containing alginate-immobilized *Kluyveromyces marxianus* IMB3. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 12: 103-104.

- Bellaver, L.H., de Carvalho, N.M.B., Abrahão-Neto, J. y Gombert, A.K. 2004. Ethanol formation and enzyme activities around glucose-6-phosphate in *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556 exposed to glucose or lactose excess. FEMS Yeast Research. 4: 691-698
- Beniwal, A., Saini, P., Kokkiligadda, A. y Vij, S. 2017. Physiological growth and galactose utilization by dairy yeast *Kluyveromyces marxianus* in mixed sugars and whey during fermentation. 3 Biotechnology. 7(5): 349.
- Bombeck, P.L., Khatri, V., Meddeb-Mouelhi, F., Montplaisir, D., Richel, A. y Beauregard, M. 2017. Predicting the most appropriate wood biomass for selected industrial applications: Comparison of wood, pulping, and enzymatic treatments using fluorescent-tagged carbohydrate-binding modules. Biotechnology Biofuels. 10: 1-14.
- Branduardi, P. y Porro, D. 2012. Yeast Biotechnology, En: Horst Feldmann (Ed). Yeast: Molecular and Cell Biology. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. Second Edition. Weinheim, Alemania. 464 pp.
- Caspeta, L., Chen, Y., Ghiaci, P., Feizi, A., Buskov, S., Hallström, B.M., Petranovic, D. y Nielsen, J. 2014. Altered sterol composition renders yeast thermotolerant. Science. 346: 75-78.
- Claassen, P.A.M., Lier, J.B.V., Contreras, A.M.L., Niel, E.W.J.V., Sijtsma, L., Stams, A.J.M., Vries, S.S.D. y Weusthuis, R.A. 1999. Utilisation of biomass for the supply of energy carriers. Applied Microbiology and Biotechnology. 52: 741-755.
- Dalena, F., Senatore, A., Iulianelli, A., Di Paola, L., Basile, M., y Basile, A. 2019. Ethanol from Biomass: Future and Perspectives. In: Basile, A., Iulianelli, A., Dalena, F. y Veziroğlu, T.N. (eds). Ethanol. Chapter 2. Science and Engineering. 25-59 pp.
- de Andrade, R.R., Maugeri Filho, F., Maciel Filho, R. y da Costa, A.C. 2013. Kinetics of ethanol production from sugarcane bagasse enzymatic hydrolysate concentrated with molasses under cell recycle. Bioresource Technology. 130: 351-359.
- Deak, T. 2008. Handbook of Food Spoilage Yeasts. CRC Press. Second edition. Florida, Estados Unidos. 352 Pages.
- Deak, T. 2009. Ecology and biodiversity of yeasts with potential value in biotechnology. En: T. Satyanarayana, G. Kunze (Eds). Yeast biotechnology: Diversity and Application. Springer Science + Business Media B.V. Luxemburgo. 51-168 pp.
- Dehgan, B. 1982. Novel *jatrophas* for Florida landscapes. Proceedings of the Florida State Horticultural Society. 95: 277-280.
- Della-Bianca, B.E. y Gombert, A.K. 2013. Stress tolerance and growth physiology of yeast strains from the Brazilian fuel ethanol industry. Antonie Leeuwenhoek. 104: 1083-1095.
- Demiray, E., Karatay, S.E. y Dönmez, G. 2019. Efficient bioethanol production from pomegranate peels by newly isolated *Kluyveromyces marxianus*. Energy sources. 42: 709-718 pp.
- Dowe, J. y Mcmillan, N. 2008. SSF Experimental Protocols-Lignocellulosic Biomass Hydrolysis and Fermentation Laboratory. National Renewable Energy Laboratory. 510: 42630.
- Du, C., Li, Y., Zhao, X., Pei, X., Yuan, W., Bai, F. y Jiang, Y. 2019. The production of ethanol from lignocellulosic biomass by *Kluyveromyces marxianus* CICC 1727-5 and *Spathaspora*

- passalidarum* ATCC MYA-4345. Applied Microbiology and Biotechnology. 103(6): 2845-2855.
- Du, C., Li, Y., Zong, H., Yuan, T., Yuan, W. y Jiang, Y. 2020. Production of bioethanol and xylitol from non-detoxified corn cob via a two-stage fermentation strategy. Bioresource Technology. 310(3): 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123427>
- Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, K.A., Rebers, P.A., y Smith, F. 1956. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. Analytical Chemistry. 28(3): 350-356
- Dziugan, P., Balcerek, M., Pielech-Przybylska, K. y Patelski, P. 2013. Evaluation of the fermentation of high gravity thick sugar beet juice worts for efficient bioethanol production. Biotechnology for Biofuels. 6(158): 2-11.
- Escalante, J., Caminal, G. y de Mas, C. 1990. Biomass production by a thermotolerant yeast: *Hansenula polymorpha*. Journal of Chemical Technology & Biotechnology. 48(1): 61-70.
- Ferguson, P., Mulholland, H., Barron, N., Brady, D. y McHale, A.P. 1998. Sucrose-supplemented distillery spent-wash as a medium for production of ethanol at 45 °C by free and alginate-immobilized preparations of *Kluyveromyces marxianus* IMB3. Bioprocess Engineering. 18: 257-259
- Flores E. 1999. Flora Silvestre de Sinaloa, su fenología y relación ecológica. Guía Ecológica. 16p.
- Fonseca, G.G., Heinzle, E., Wittmann, C. y Gombert, A.K. 2008. The yeast *Kluyveromyces marxianus* and its biotechnological potential. Applied Microbiology and Biotechnology. 79: 339-354.
- Fu, X., Li, P., Zhang, L. y Li, S. 2019. Understanding the stress responses of *Kluyveromyces marxianus* after an arrest during high-temperature ethanol fermentation based on integration of RNA-Seq and metabolite data. Applied Microbiology and Biotechnology. 103: 2715-2729.
- Galbe, M. y Zacchi, G. 2002. A review of the production of ethanol from softwood. Applied Microbiology and Biotechnology. 59(6): 618-628.
- García, A., Cara, C., Moya, M., Rapado, J., Puls, J., Castro, E., y Martínez, C. 2014. Dilute sulphuric acid pretreatment and enzymatic hydrolysis of *Jatropha curcas* fruit shells for ethanol production. Industrial Crops and Products. 53: 148-153.
- Gervais, P., Martínez de Marañón, I., Evrard, C., Ferret, E. y Moundanga, S. 2003. Cell volume changes during rapid temperature shifts. Journal Biotechnology. 102: 269-279.
- Gough, S., Barron, N., Zubov, A.L., Lozinsky, V.I. y McHale, A.P. 1998. Production of ethanol from molasses at 45 °C using *Kluyveromyces marxianus* IMB3 immobilized in calcium alginate gels and poly (vinyl alcohol) cryogel. Bioprocess Engineering. 19: 87-90.
- Gutiérrez-Pérez, M.L. 2011. Fenología de *Jatropha platyphylla* Müell y composición nutricional de su fruto (tesis de maestría). Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. Sinaloa, México.
- Hahn-Hägerdal, B. 1985. Comparison between immobilized *Kluyveromyces fragilis* and *Saccharomyces cerevisiae* coimmobilized with b-galactosidase, with respect to continuous ethanol production from concentrated whey permeate. Biotechnology and Bioengineering. 27: 914-916.

- Hari, K.S., Janardhan R.T. y Chowdary, G.V. 2001. Simultaneous saccharification and fermentation of lignocellulosic wastes to ethanol using thermotolerant yeast. *Bioresource Technology*. 77: 193-196.
- Hernández-Salas, J.M., Villa-Ramírez, M.S., Veloz-Rendón J.S., Rivera-Hernández, K.N., González-César, R., Plascencia-Espinosa, M. y Trejo-Estrada, S.R. 2009. Comparative hydrolysis and fermentation of sugarcane and agave bagasse, *Bioresource Technology*. 100: 1238-1245.
- Herrero, E., Ros, J., Bellí, G. y Cabiscol, E. 2008. Redox control and oxidative stress in yeast cells. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1780: 1217-1235.
- Hong, J., Wang, Y., Kumagai, H. y Tamaki, H. 2007. Construction of thermotolerant yeast expressing thermostable cellulase genes. *Journal of Biotechnology*. 130: 114-123.
- Hughes, D.B., Tudrosaen, N.J. y Moye, C.J. 1984. The effect of temperature on the kinetics of ethanol production by a thermotolerant strain of *Kluyveromyces marxianus*. *Biotechnology Letters*. 6: 1-6.
- International Energy Agency. 2018. <https://www.iea.org>
- Jeffries, T.W. y Jin, Y.S. 2004. Metabolic engineering for improved fermentation of pentoses by yeasts. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 63: 495-509.
- Johnson, E.A. 2013a. Biotechnology of non-*Saccharomyces* yeasts—the ascomycetes. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 97: 503-517.
- Johnson, E.A. 2013b. Biotechnology of non-*Saccharomyces* yeasts—the basidiomycetes. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 97: 7563-7577.
- Johnson, E.A. y Echavarri-Erasun, C. 2011. Yeast Biotechnology, En: Kurtzman, P.C., Fell, J.W., Boekhout, T. (Eds). *The Yeasts, a Taxonomic Study*. Elsevier B.V. Amsterdam. 21-45 pp.
- Jones, T.D., Havard, J.M. y Daugulis, A.J. 1993. Ethanol production from lactose by extractive fermentation. *Biotechnology Letters*. 15: 871-876.
- Kar, Y. y Deveci, H. 2006. Importance of P-series fuels for flexible-fuel vehicles (FFVs) and alternative fuels. *Energy Sources*. 28(10): 909-921.
- Kamran, M., El-Sayed, S., Tae, H.K., y Xiangkai, L. 2020. Enhanced ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae* fermentation post acidic and alkali chemical pretreatments of cotton stalk lignocellulose. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 147: 1-9. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2019.104869>
- Kim S.K., Jin Y.S., Choi I.G., Park Y.C. y Seo J.H. 2015. Enhanced tolerance of *Saccharomyces cerevisiae* to multiple lignocellulose-derived inhibitors through modulation of spermidine contents. *Metabolic Engineering*. 29: 46-55.
- Kirk, L.A., y Doelle, H. W. 1992. The effects of potassium and chloride ions on the ethanolic fermentation of sucrose by *Zymomonas mobilis* 2716. *Applied Microbiology and Biotechnology* 37:88-93.
- Koedrith, P., Dubois, E., Scherens, B., Jacobs, E., Boonchird, C. y Messenguy, F. 2008. Identification and characterization of a thermotolerant yeast strain isolated from banana leaves. *Science Asia*. 34: 147-152.
- Kumar, P., Barrett, D.M., Delwiche, M.J. y Stroeve, P. 2009. Methods for pretreatment of

- lignocellulosic biomass for efficient hydrolysis and biofuel production. *Industrial & Engineering Chemistry Research*. 48(8): 3713-3729.
- Kurtzman, P.C., Fell, J.W. y Boekhout, T. 2011. *The Yeasts, a Taxonomic Study*. Elsevier B.V. Fifth edition. Amsterdam. 2354 pp.
- Láinez, M., Ruiz, H.A., Arellano-Plaza, M. y Martínez-Hernández, S. 2019. Bioethanol production from enzymatic hydrolysates of *Agave salmiana* leaves comparing *S. cerevisiae* and *K. marxianus*. *Renewable Energy*. 138: 1127-1133.
- Lavoie, J.M., Beauchet, R., Berberi, V. y Chornet, M. 2011. Biorefining lignocellulosic biomass via the feedstock impregnation rapid and sequential steam treatment. En: Bernardes M. (ed.). *Biofuel's Engineering Process Technology*. Intech publishing, Croatia. 685-714 pp.
- Lee, H.J., Lim, W.S. y Lee, J.W. 2013. Improvement of ethanol fermentation from lignocellulosic hydrolysates by the removal of inhibitors. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*. 19: 2010-2015.
- Lee, R.A. y Lavoie, J-M. 2013. From first- to third-generation biofuels: Challenges of producing a commodity from a biomass of increasing complexity. *Animal Frontiers*. 3: 6-11.
- Leyva-Acuña, M.A., Quintana-Obregón, E.A., Soto-Landeros, F., Baez-Parra, K.M., Montes-Ávila, J. y Angulo-Escalante M.A. 2020. Actividad antifúngica de alcaloides del extracto metanólico de *Jatropha platyphylla* contra *Aspergillus parasiticus*. *Biotecnia*. 22(3): 100-107.
- Limayem, A. y Ricke, S.C. 2012. Lignocellulosic biomass for bioethanol production: current perspectives, potential issues and future prospects. *Progress in Energy and Combustion Science*. 38: 449-467.
- Liu, R. y Shen, F. 2008. Impacts of main factors on bioethanol fermentation from stalk juice of sweet sorghum by immobilized *Saccharomyces cerevisiae* (CICC 1308). *Bioresource Technology*. 99(4): 847-854.
- Lodder, J. y Kreger-van Rij, N.J.W. 1952. *The yeasts: a taxonomic study*. Amsterdam: North-Holland Publishing Company. First edition. New York. 713 pp.
- Love, G., Gough, S., Brady, D., Barron, N., Nigam, P., Singh, D., Marchant, R. y McHale, A.P. 1998. Continuous ethanol fermentation at 45 °C using *Kluyveromyces marxianus* IMB3. Immobilized in calcium alginate and kissiris. *Bioprocess Engineering*. 18: 187-189.
- Madeira-Jr, J.V. y Gomberta, A.K. 2018. Towards high-temperature fuel ethanol production using *Kluyveromyces marxianus*: On the search for plug-in strains for the Brazilian sugarcanebased biorefinery. *Biomass and Bioenergy*. 119: 217-228.
- Makkar, H., Kumar, V., Oyeleye, O., Akinleye, A., Angulo-Escalante, M.A. y Becker, K. 2011. *Jatropha platyphylla*, a new non-toxic *Jatropha* species: Physical properties and chemical constituents including toxic and antinutritional factors of seeds. *Food Chemistry*. 125(1): 63-71.
- Marasabessy, A., Kootstra, A.M.J., Sanders, J.P.M., y Weusthuis, R.A. 2012. Dilute H₂SO₄ catalyzed hydrothermal pretreatment to enhance enzymatic digestibility of *Jatropha curcas* fruit hull for ethanol fermentation. *International Journal of Energy and Environmental Engineering*. 3(15): 1-11.
- Margaritis, A. y Bajpai, P. 1982. Direct fermentation of D-xylose to ethanol by *Kluyveromyces*

- marxianus* strains. Applied Microbiology and Biotechnology. 44: 1039–1041.
- Miller, G.L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Analytical Chemistry 31: 426-428
- Noguera, F., Vega, J., García, A. y Quesada, M. 2002. Historia Natural de Chamela. UNAM. México. 114 pp.
- Nurcholis, M., Lertwattanasakul, N., Rodrussamee, N., Kosaka, T., Murata, M., y Yamada1, M. 2020. Integration of comprehensive data and biotechnological tools for industrial applications of *Kluyveromyces marxianus*. Applied Microbiology and Biotechnology. 104: 475-488.
- Pepper, I.L. y Gerba, C.P. 2014. Chapter 10: Cultural Methods. In: Environmental Microbiology. Third edition. 195-212 pp.
- Pejin, J.D., Mojović, L.V., Pejin, D.J., Kocić-Tanackov, S.D., Savić, D.S., Nikolić, S.B. y Djukić-Vuković, A.P. 2015. Bioethanol production from triticale by simultaneous saccharification and fermentation with magnesium or calcium ions addition. Fuel. 142: 58-64.
- Pirselova, K., Smogrovicov, D. y Balaz, S. 1993. Fermentation of starch to ethanol by a co-culture of *Saccharomycopsis fibuligera* and *Saccharomyces cerevisiae*. World Journal of Microbiology & Biotechnology. 9(3): 338-341.
- Rees, E.M. R. y Stewart, G.G. 1997. The effects of increased magnesium and calcium concentrations on yeast fermentation performance in high gravity worts. Journal of the Institute of Brewing. 103: 287-291.
- Rijal, D., Vancov, T., McIntosh, S., Ashwath, N. y Stanley, G.A. 2016. Process options for conversion of *Agave tequilana* leaves into bioethanol. Industrial Crops and Products. 84: 263-272.
- Rodrigues, T.H.S., De Barros, E.M., De Sá Brígido, J. y Gonçalves, L.R.B. 2016. The bioconversion of pretreated cashew apple bagasse into ethanol by SHF and SSF processes. Applied Biochemistry and Biotechnology. 178: 1167-1183.
- Rodríguez, E., Mullaney, E.J. y Lei, X.G. 2000. Expression of the *Aspergillus fumigatus* phytase gene in *Pichia pastoris* and characterization of the recombinant enzyme. Biochimica et Biophysica Acta. Res. Commun. 268(2): 373-378.
- Rosa, F.M. y Sa-Correia, I. 1992. Ethanol tolerance and activity of plasma membrane ATPase in *Kluyveromyces marxianus* and *Saccharomyces cerevisiae*. Enzyme and Microbial Technology. 14: 23-27.
- Rouwenhorst, R.J., Visser, L.E., van der Baan, A.A., Scheffers, W.A. y van Dijken, J.P. 1988. Production, distribution, and kinetic properties of inulinase in continuous culture of *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556. Applied Microbiology and Biotechnology. 54: 1131-1137.
- Sabandar, C., Ahmat, N., Jaafar, F. y Sahidin, I. 2013. Medicinal property, phytochemistry and pharmacology of several *Jatropha* species (*Euphorbiaceae*): A review. Phytochemistry. 85: 7-29.
- Sandoval-Nuñez, D., Arellano-Plaza, M., Gschaedler, A., Arrizon, J. y Amaya-Delgado, L. 2018. A comparative study of lignocellulosic ethanol productivities by *Kluyveromyces marxianus* and *Saccharomyces cerevisiae*. Clean Technologies and Environmental Policy. 20: 1491-

1499.

- Sathendra, E.R., Baskar, G., Praveenkumar, R. y Gnansounou, E., 2018. Bioethanol Production from Palm wood using *Trichoderma reesei* and *Kluyveromyces marxianus*. *Bioresource Technology*. 271: 345-352.
- Saucedo-Luna, J., Castro-Montoya, A.J., Martinez-Pacheco, M.M. Sosa- Aguirre, C.R. y Campos-Garcia, J. 2011. Efficient chemical and enzymatic saccharification of the lignocellulosic residue from *Agave tequilana* bagasse to produce ethanol by *Pichia caribbica*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 38: 725-732
- Sharma, S., Barman. K., Siddiqui. M.W. y Nath. V. 2018. Chapter 10 - Training and Pruning for Improved Postharvest Fruit Quality. *Preharvest Modulation of Postharvest Fruit and Vegetable Quality*. 257-276 pp.
- Sivarathnakumara, S., Jayamuthunagai, J., Baskare, G., Praveenkumard, R., Selvakumaric, I.A.E. y Bharathirajac, B. 2019. Bioethanol production from woody stem *Prosopis juliflora* using thermo tolerant yeast *Kluyveromyces marxianus* and its kinetics studies. *Bioresource Technology*. 293: 1-7. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.122060>
- Standley, P.C. 1967. *Trees and shrubs of Mexico*. United States National Herbarium, Washington D.C. 23: 635-639.
- Starmer, W.T. y Lachance, M.A. 2011. *Yeast Ecology*, En: Kurtzman, P.C., Fell, J.W., Boekhout, T. (Eds). *The Yeasts, a Taxonomic Study*. Elsevier B.V. Amsterdam. 65-87 pp.
- Steensma, H.Y., de Jongh, F.C.M. y Linnekamp, M. 1988. The use of electrophoretic karyotypes in the classification of yeasts: *Kluyveromyces marxianus* and *K. lactis*. *Current Genetics*. 14: 311-317.
- Sukhang, S., Choojit, S., Reungpeerakul, T., y Sangwichien, C. 2019. Bioethanol production from oil palm empty fruit bunch with SSF and SHF processes using *Kluyveromyces marxianus* yeast. *Cellulose*. 27: 301-314.
- Tahir, B. y Mezori, H.A. 2020. Bioethanol production from *Quercus aegilops* using *Pichia stipitis* and *Kluyveromyces marxianus*. *Biomass Conversion and Biorefinery*. <https://doi.org/10.1007/s13399-020-00704-2>
- Teixeira, M.C., Raposo, L., Mira, N.P., Lourenço, A.B. y Sá-Correia, I. 2009. Genome-wide identification of *Saccharomyces cerevisiae* genes required for maximal tolerance to ethanol, *Applied and Environmental Microbiology*. 18: 5761-5772.
- Tin, C.S.F. y Mawson, A.J. 1993. Ethanol production from whey in a membrane recycle bioreactor. *Process Biochemistry*. 28: 217-221.
- Valdés-Martínez, S.E. 2006. Hidratos de carbono. En: Badui S. (ed). *Química de los alimentos*. Pearson Educación de México, S.A. de C.V. México. 29-119 pp.
- van der Walt, J.P. 1956. *Kluyveromyces*- a new yeast genus of the *Endomycetales*. *Antonie van Leeuwenhoek*. 22: 265-272.
- van der Walt, J.P. 1970. *Kluyveromyces*. En: Lodder J (ed). *The yeasts: a taxonomic study*. Amsterdam: North-Holland Publishing Company. New York. 316-378 pp.
- Villegas-Silva, P.A., Toledano-Thompson, T., Canto-Canché, B.B., Larqué-Saavedra, A. y Barahona-Pérez, L.F. 2014. Hydrolysis of *Agave fourcroydes* Lemaire (henequen) leaf juice

and fermentation with *Kluyveromyces marxianus* for ethanol production. *Biotechnology*. 14(14): 1-10.

- Visser, E.M., Filho, D.O., Tótola, M.R., Martins, M.A. y Guimares, V.M. 2012. Simultaneous saccharification and fermentation (SSF) of *Jatropha curcas* shells: utilization of co-products from the biodiesel production process. *Bioprocess and Biosystems Engineering*. 35: 801-807.
- Walker, G.M. 1998. *Yeast physiology and biotechnology*. Wiley. First edition. New York. 362 pp.
- Wang, P., Chang, J., Yin, Q., Wang, E., Zhu, Q., Song, A., y Lu, F. 2015. Effects of thermochemical pretreatment plus microbial fermentation and enzymatic hydrolysis on saccharification and lignocellulose degradation of corn straw. *Bioresource Technology* 194: 165-171.
- Ward, C., Nolan, A.M., O'Hanlon, F., McAree, T., Barron, N., McHale, L. y McHale, A.P. 1995. Production of ethanol at 45 °C on starch containing media by mixed cultures of the thermotolerant, ethanol-producing yeast *Kluyveromyces marxianus* IMB3 and the thermophilic filamentous fungus *Talaromyces emersonii* CBS 813.70. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 43: 408-411.
- Williams, M.B. y Reese, H.D. 1950. Colorimetric determination of ethyl alcohol. *Analytical Chemistry*. 22: 1556-1561.
- Yamaoka, C., Kurita, O. y Kubo, T. 2014. Improved ethanol tolerance of *Saccharomyces cerevisiae* in mixed cultures with *Kluyveromyces lactis* on high-sugar fermentation. *Microbiological Research*. 169(12): 907-914.
- Yang, Q. y Pan, X. 2012. Pretreatment of *Agave americana* stalk for enzymatic saccharification. *Bioresource Technology*. 126: 336-340.
- Yucel, H.G. y Aksu, Z. 2015. Ethanol fermentation characteristics of *Pichia stipitis* yeast from sugar beet pulp hydrolysate: Use of new detoxification methods. *Fuel*. 158: 793-799.
- Zabed, H., Faruq, G., Sahu, J.N., Azirun, M.S., Hashim, R. y Boyce, A.M. 2014. Bioethanol production from fermentable sugar juice. *The Scientific World Journal*. 2014: 1-11.
- Zabeda, H., Sahuc, J.N., Suely, A., Boyce, A.N. y Faruq, G. 2017. Bioethanol production from renewable sources: current perspectives and technological progress. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 71: 475-501.
- Zhao, X.Q., Xue, C., Ge, X.M., Yuan, W.J., Wang, J.Y. y Bai, F.W. 2009. Impact of zinc supplementation on the improvement of ethanol tolerance and yield of self-flocculating yeast in continuous ethanol fermentation. *Journal of Biotechnology*. 139(1): 55-60