



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Posgrado en Energía Renovable

“Evaluación del rendimiento de etanol producido por *Kluyveromyces marxianus* y *Saccharomyces cerevisiae* a partir de hidrolizados ácidos y enzimáticos de jugo de hojas de henequén (*Agave fourcroydes* Lem.)”

Tesis que presenta

PABLO ANDRES VILLEGAS SILVA

En opción al título de

MAESTRO EN CIENCIAS EN ENERGÍA RENOVABLE

Mérida, Yucatán. Octubre 2011



## **DECLARACIÓN DE PROPIEDAD**

Declaro que la información contenida en la sección de Materiales y Métodos, los Resultados y Discusión de este documento proviene de las actividades de experimentación realizadas durante el período que se me asignó, para desarrollar mi trabajo de tesis, en los Laboratorios de la Unidad de Energía Renovable del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. y que dicha información le pertenece en términos de la Ley de la Propiedad Industrial, por lo que no me reservo ningún derecho sobre ello.

**Mérida, Yucatán, México.**

**Octubre de 2011**

---

IB. Pablo Andres Villegas Silva



El trabajo de tesis titulado “Evaluación del rendimiento de etanol producido por *Kluyveromyces marxianus* y *Saccharomyces cerevisiae* a partir de hidrolizados ácidos y enzimáticos de jugo de hojas de henequén (*Agave fourcroydes* Lem.)”, fue desarrollado por el estudiante Pablo Andres Villegas Silva en el laboratorio USF15 de la Unidad de Energía Renovable del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., bajo la dirección del Dr. Luis Felipe Barahona Pérez y del Dr. Francisco Alfonso Larqué Saavedra, en el programa de Maestría en Ciencias en Energía Renovable de este Centro.

---

Dr. Oscar A. Moreno Valenzuela  
Director Académico  
Centro de Investigación Científica de Yucatán A.C.



## *Agradecimientos*

*A Dios por prestarme vida, salud y permitirme cumplir este nuevo paso en mi vida.*

*A mi familia, mis abuelos; Miguel y Margarita, mis padres, Zoila y Ricardo, mis tíos, Salvador y Róselá, Marcos y Rebeca, Agripina y Alberto, Javier y Evelyn, mis padrinos; Jesús y Francisca, por su gran apoyo, el ánimo que me brindaron para salir adelante y lograr esta meta, a pesar de la distancia siempre estuvieron pendientes de mí, como olvidarme de mis primos; Ruth, Chavita, Bryan, Misael, Pollo, Alan, Evelyn, Betito y Estefanía.*

*A mis amigos; Alberto, Roberto, Santiago, Limberg, Diana, Igor, Orlando, Alain, Giany, Joana, Isaías, Ángela, Mariza, Ricardo, Christy, Fabiola, Nelly, Ana Laura, Laura, Pablo, Fátima, Harvey, Andrés, Frank, Anita, Adrian Angélica, Arely, Isaura, Patricia, Melisa, Luis, Karla, Nancy, Freddy, Paco, Anahí, Rita, Martin, que a pesar de lo estresante de la maestría siempre hacíamos muy buenas fiestas. Muy especialmente a María Guadalupe Del Rayo Serrano Vázquez por su apoyo en parte del desarrollo experimental.*

*A CONACYT por la beca otorgada número 236091 que me alimentó por dos años.*

*A los increíbles y casi omnipresentes técnicos Tanit Toledano, Jorge Domínguez, Mirbella Cáceres y Miguel Tzec por su apoyo en los laboratorios así como en el manejo de los equipos.*





*A mis maestros: Javier Mijangos, Mascha Smit, Enrique Escobedo, Gonzalo Carrillo, Gonzalo Canche, Luis Ordoñez, Ernesto Martínez, Lilitiana Alzate, Miguel Herrera, Daisy Pérez, Donny Ponce, Ruby Valdez, Blondy Canto, Gerardo Rivera, por todas sus enseñanzas que nos fueron formando y educando a mis amigos y a mí en la Maestría en Energía Renovable, de manera muy especial le agradezco a mis directores de tesis: Dr. Felipe Barahona y Dr. Alfonso Larqué por su guía y comprensión que me brindaron para la elaboración del proyecto.*

*A mis tutores, revisores y directores: M.C. Gerardo Rivera Muñoz, Dra. Blondy Canto Canché, Dra. Patricia Lappe Oliveras, Dra. Daisy Pérez Brito, Dr. Felipe Barahona Pérez, Dr. Alfonso Larqué Saavedra, por su inmensa paciencia y comprensión al revisar el trabajo.*

*A la familia Arjona Canul: Doña Miriam, Don Freddy, María, Antonio (el chaparrito), Miguel, Francisco, por aceptarme como un miembro de su familia y brindarme un hogar, por último para cerrar con broche de oro, de forma muy especial le agradezco a mi amada novia, Ana Laura Arjona Canul por todo su cariño y amor que me ha brindado.*



<b>Índice</b>	<b>Página</b>
Índice	i
Listado de tablas	iv
Listado de figuras	v
RESUMEN	vii
ABSTRACT	ix
INTRODUCCIÓN	1
1. ANTECEDENTES	3
1.1. El Henequén	3
1.2. Taxonomía del henequén	4
1.3. Caracterización agronómica del henequén	5
1.4. Fotosíntesis en los agaves	6
1.5. Carbohidratos	8
1.6. Fructanos en agaves	8
1.7. Función biológica de los fructanos en las plantas	9
1.8. Hidrólisis	9
1.8.1. Hidrólisis enzimática	10
1.8.2. Hidrólisis térmica	11
1.8.3. Hidrólisis termoquímica	11
1.9. Levaduras	11
1.9.1. <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	13
1.9.2. <i>Kluyveromyces marxianus</i>	15
1.9.3. Cinética de crecimiento microbiano	17
1.10. Fermentación de la glucosa	18
1.11. Metabolismo de fructosa	19
2. FUNDAMENTOS DEL PROYECTO	20
2.1. Justificación	20
2.2. Planteamiento del problema	20
2.3. Hipótesis	20

2.4.	Objetivos	21
2.4.1.	Objetivo General	21
2.4.2.	Objetivos específicos	21
3.	MATERIALES Y MÉTODOS	22
3.1.	Reactivos	22
3.2.	Material biológico	22
3.3.	Extracción del jugo de henequén	22
3.4.	Determinación de azúcares reductores	23
3.5.	Determinación de azúcares totales	23
3.6.	Concentración de sólidos solubles (°Brix)	24
3.7.	Hidrólisis	24
3.7.1.	Hidrólisis térmica	24
3.7.2.	Hidrólisis termoquímica	24
3.7.3.	Hidrólisis enzimática	25
3.8.	Curvas de crecimiento	25
3.9.	Preparación del inóculo para las fermentaciones	26
3.10.	Fermentación	26
3.11.	Destilación	27
3.12.	Cuantificación de etanol	27
3.13.	Análisis estadístico	27
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	28
4.1.	Obtención del jugo	28
4.2.	Hidrólisis térmica	29
4.3.	Hidrólisis termoquímica	30
4.4.	Hidrólisis enzimática	32
4.4.1.	Ensayos con estándar de inulina	32
4.4.2.	Hidrólisis enzimática del jugo de henequén	34
4.4.3.	Efecto de la temperatura sobre la liberación de azúcares reductores en el jugo de henequén	35

4.4.4. Efecto de la cantidad de enzima sobre la liberación de azúcares reductores en el jugo de henequén	37
4.5. Curvas de crecimiento	38
4.6. Fermentaciones	42
4.6.1. Consumo de azúcares	42
4.6.2. Determinación de etanol	44
4.6.3. Curva de producción de etanol	46
4.7. Estimados de utilización	48
5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	49
BIBLIOGRAFÍA	51
ANEXOS	58

<b>Listado de tablas</b>	<b>Página</b>
Tabla 1.1. Composición química del jugo de hojas de henequén.	4
Tabla 1.2. Microorganismos productores de inulinasas.	10
Tabla 1.3. Producción de enzimas por diferentes cepas de <i>K. marxianus</i> y su aplicación.	16
Tabla 3.1. Diseño experimental para la hidrólisis termoquímica del jugo.	25
Tabla 4.1. Características de las hojas de henequén.	28
Tabla 4.2. Concentración de azúcares de la hidrólisis térmica a 121°C.	30
Tabla 4.3. Incremento de la concentración de azúcares de los tratamientos de la hidrólisis termoquímica.	31
Tabla 4.4. Ventas de gasolina (L) en Mérida, Yucatán, en los últimos cinco años.	48

<b>Listado de figuras</b>	<b>Página</b>
Figura 1.1. Ejemplos de fructanos.	4
Figura 1.2. Síntesis de malato a partir de CO <sub>2</sub> .	7
Figura 1.3. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> observada en un microscopio de contraste de fases con un aumento de 1000x.	14
Figura 1.4. Decremento de la viabilidad celular de cepas de <i>S. cerevisiae</i> (modificadas línea punteada, no modificadas línea continua) se tomó como 100 % de viabilidad la encontrada al tiempo cero.	14
Figura 1.5. Fermentación de la glucosa a etanol.	18
Figura 1.6. Ruta metabólica de fructosa a piruvato.	19
Figura 3.1. Esquema metodológico para la obtención del jugo de hojas de henequén. A) Corte de las hojas. B) Limpieza y medición de las hojas. C) Proceso de extracción en el molino de tres masas. D) Jugo extraído.	23
Figura 3.2. Equipo de microdestilación.	27
Figura 4.1. Separación del jugo en dos fases. a) fase ligera, b) fase pesada.	30
Figura 4.2. Concentración de azúcares en una solución de inulina al 0.1% (p/v).	32
Figura 4.3. Liberación de azúcares reductores del estándar de inulina (50 g·L <sup>-1</sup> ) en buffer a pH 4.5 en el tratamiento con inulinasa [22.82 unidades] durante 360 minutos a 60°C.	33
Figura 4.4. Liberación de azúcares reductores por acción de una inulinasa [22.82 U], sobre jugo homogenizado (azul) y sin sedimentos (rojo) a una temperatura de 60°C.	34
Figura 4.5. A. Liberación de azúcares reductores en el tratamiento con inulinasa [22.82 U] a temperaturas de 55 y 60 °C a 150 rpm.	35
Figura 4.5. B. Liberación de azúcares reductores en el tratamiento con inulinasa [22.82 U] a una temperatura de 50°C a 150 rpm.	36

Figura 4.6. Efecto de la cantidad de enzima inulinasa sobre la liberación de azúcares reductores a una temperatura de 60°C y 150 rpm.	37
Figura 4.7. Curvas de crecimiento de <i>S. cerevisiae</i> en diferentes hidrolizados.	38
Figura 4.8. Curva de crecimiento de <i>K. marxianus</i> en diferentes hidrolizados.	40
Figura 4.9. Consumo de azúcares reductores por <i>K. marxianus</i> en las fermentaciones de los dos hidrolizados (termoquímico y enzimático) y el jugo crudo homogenizado.	43
Figura 4.10. Consumo de azúcares totales por <i>K. marxianus</i> en las fermentaciones de los dos hidrolizados (termoquímico y enzimático) y el jugo crudo homogenizado.	44
Figura 4.11. Concentración de etanol de los destilados obtenidos a partir de jugo crudo, hidrolizado termoquímico, e hidrolizado enzimático, después de fermentar durante 48h. Letras diferentes indican diferencia significativa (ANOVA simple, prueba de Tuckey HSD, P<0.05).	45
Figura 4.12. Porcentaje de rendimiento de etanol en base al teórico del jugo crudo y de los hidrolizados termoquímicos e hidrolizados enzimáticos, después de fermentar por 48 h. Letras diferentes indican diferencia significativa (ANOVA simple, prueba de Tuckey HSD, P<0.05).	45
Figura 4.13. Análisis del consumo de azúcares reductores y totales, producción de etanol durante la fermentación de matraz terminal del jugo hidrolizado enzimáticamente.	46
Figura 4.14. Rendimiento de etanol medido en cada muestreo durante la fermentación (% del teórico), *concentración de azúcares reductores consumidos en cada período (g·L <sup>-1</sup> ). Letras diferentes indican diferencia significativa (ANOVA simple, prueba de Tuckey HSD, P<0.05).	47



## RESUMEN

Los biocombustibles como el bioetanol, biodiesel y biogás han adquirido una gran relevancia en el mercado de los carburantes, debido a factores como el alza en los precios del petróleo, el impacto ambiental de los gases de efecto invernadero y el agotamiento de los combustibles fósiles.

El etanol es un alcohol que se obtiene por fermentación de azúcares simples o monosacáridos. En la naturaleza los azúcares generalmente constituyen las sustancias de reserva de los tejidos vegetales y forman compuestos complejos como di, tri u oligosacáridos. Actualmente en el mundo existe la tendencia de obtener etanol por fermentación de los azúcares contenidos en productos vegetales; en Brasil se produce a partir de la sacarosa del jugo de la caña de azúcar, y en Estados Unidos a partir del almidón del maíz amarillo. En la península de Yucatán, el henequén ha sido utilizado desde hace siglos para la producción de fibras naturales a partir de sus hojas. Durante el proceso de extracción de la fibra se produce un jugo que contiene altas concentraciones de oligofructanos que se podrían aprovechar para la producción de etanol, y de esta forma utilizar un residuo que actualmente se desecha.

El presente estudio tuvo como objetivo determinar el potencial del jugo de henequén obtenido del desfibrado de las hojas como una fuente de carbohidratos simples, para la producción de etanol.

La primera fase de esta investigación consistió en la evaluación de diversos métodos para realizar la hidrólisis de los azúcares complejos presentes en el jugo. El mejor tratamiento de hidrólisis termoquímica fue el calentamiento a 100°C del jugo adicionado con ácido sulfúrico (concentración de 1 % v/v) durante 30 min, obteniéndose concentraciones de 73.1 y 53.3 g·L<sup>-1</sup> de azúcares totales y reductores, respectivamente. Así mismo, se determinó que el mejor tratamiento de hidrólisis enzimática fue el que se realizó a 60°C, con 5.75 unidades de enzima inulinasa, a un pH de 4.5 y 150 rpm, durante 30 min. Este tratamiento liberó 60.5 y 55.5 g·L<sup>-1</sup> de azúcares totales y reductores respectivamente.

La segunda fase consistió en la evaluación de las levaduras *Sacharomyces cerevisiae* y *Kluyveromyces marxianus* para producir etanol a partir de los hidrolizados. La primera no logró crecer en ningún hidrolizado, esto posiblemente debido a compuestos inhibidores presentes en el jugo, la segunda no presentó complicaciones para crecer en los hidrolizados o en el jugo crudo. En vista de estos resultados la fermentación únicamente

se pudo realizar con *Kluyveromyces marxianus*. La mayor concentración de etanol se obtuvo con la fermentación de los hidrolizados enzimáticos ( $16.5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) obteniendo un rendimiento de 80 % del cálculo teórico. También se determinó que aunque a las 30 h se llega al consumo máximo de azúcares, a las 42 h se alcanza la máxima producción de etanol.

## ABSTRACT

Bioethanol, biodiesel and biogas are biofuels that have acquired great relevance in the fuel market due to factors such as rising oil prices, the environmental impact of greenhouse gases and depletion of fossil fuels.

Ethanol is an alcohol obtained by fermentation of simple sugars or monosaccharides. In Nature, sugars are usually energy storage substances of plant tissues and can form complex compounds such as di, tri or oligosaccharides. Currently, there is a worldwide tendency to produce ethanol by fermentation of sugars contained in plants. In Brazil, ethanol is produced from the sucrose present in sugarcane juice, and in the United States it is produced from yellow corn starch. In the Yucatan peninsula, henequen has been used for the production of natural fibers from its leaves. During the fiber extraction process, a juice with a high concentration of oligofructanes is produced and could be used for ethanol production. This juice is considered a waste and is currently discarded.

The aim of this study was to determine the potential use of henequen juice as a simple carbohydrate source for ethanol production.

The first part of this research was the evaluation of three methods to hydrolyze the complex sugars in the juice. The best treatment was a thermo chemical hydrolysis by heating the juice at 100°C for 30 min with a sulfuric acid solution (1% v/v) to obtain 73.1 and 53.3 g·L<sup>-1</sup> of total and reducing sugars, respectively. The best enzymatic hydrolysis treatment was obtained when the juice was incubated at 60 °C at pH 4.5 and 150 rpm for 30 min with 5.75 units of the enzyme inulinase. This treatment released 60.5 and 55.5 g·L<sup>-1</sup> of total and reducing sugars, respectively.

The second part involved the evaluation of the yeasts *Saccharomyces cerevisiae* and *Kluyveromyces marxianus* to produce ethanol from the hydrolysates. The first yeast failed to grow in any of the hydrolysates and the raw juice, this possibly due to inhibitory compounds present in the juice. The second yeast had no complications to grow in the hydrolysates or raw juice. The alcoholic fermentations were performed only with *Kluyveromyces marxianus*. The highest ethanol concentration was obtained by fermentation of the enzymatic hydrolysates (16.5 g·L<sup>-1</sup>) with 80% of the theoretical yield. It was also found that while maximal consumption of sugars was attained at 30 hours, maximal ethanol production was reached at 42 hours.



## INTRODUCCIÓN

Los biocombustibles son de gran relevancia en el mercado de los carburantes debido a factores como el alza en los precios del petróleo, el impacto ambiental de los gases de efecto invernadero, el agotamiento de los combustibles fósiles y la creciente conciencia social de utilizar productos naturales. Esto ha impulsado la investigación y desarrollo de tecnologías para la producción de biocombustibles como: bioetanol, biodiesel y biogás principalmente, para suplir a las fuentes actuales de combustibles fósiles [1,2].

El etanol es un alcohol que se obtiene por fermentación de azúcares simples o monosacáridos. En la naturaleza estos compuestos por lo general no se presentan en forma simple, sino que forman compuestos complejos, constituidos por la asociación de dos o más moléculas de azúcares simples, y son denominados disacáridos, trisacáridos, oligosacáridos y polisacáridos. La glucosa, fructosa, galactosa, ribosa, manosa, oligofructanos, almidón, son carbohidratos que generalmente se acumulan en los tejidos vegetales constituyendo sustancias estructurales o de reserva de las plantas. Estos compuestos representan una fuente de materia prima para la producción de etanol, sin embargo, debido a su estructura química en ocasiones se requiere del desarrollo de tecnologías y tratamientos previos para hacerlos disponibles para la obtención de etanol por fermentación. Actualmente en Brasil el etanol se obtiene directamente de la fermentación de los azúcares, principalmente sacarosa, del jugo de la caña de azúcar; mientras que en Estados Unidos se obtiene primordialmente a partir del almidón del maíz amarillo, lo que requiere de la hidrólisis previa del almidón para obtener azúcares fermentables. Una de las desventajas de ambos procesos es que sus materias primas son alimentos para el hombre y los animales, lo que representa una limitante en cuanto a su uso y precio. Así, el desarrollo de un mercado de biocombustible como el etanol [3], basado en la utilización de sustratos alimenticios puede considerarse no viable debido a las implicaciones sociales que esto conlleva.

Una alternativa para en la producción de combustibles renovables es la utilización de la biomasa obtenida a partir de plantas que crecen en tierras marginales, no aptas para los cultivos alimenticios, y que no están en conflicto con el abasto de alimentos. Si cultivos de alto rendimiento que requieren insumos mínimos (agua y nutrientes) se pueden cultivar en

estas tierras, la competencia por el uso de suelo se reduce. Las plantas que utilizan el metabolismo ácido de las crasuláceas (CAM, por sus siglas en inglés) tienen bajos requerimientos de agua y son productivas en las regiones semiáridas [4]. El potencial de estas plantas para la producción de biocombustibles ha sido revisado recientemente [5], sin embargo, hay muy poca información sobre la producción de biocombustibles a partir de plantas CAM a escala comercial. Tampoco hay un registro sistemático de la productividad de materia seca a nivel de campo, que es una información crucial para establecer la viabilidad económica y logística de una empresa de biocombustibles. Las especies de agave cultivadas para la obtención de fibra tienen sistemas de producción diferentes a los cultivados para las bebidas, pero ambos son ejemplos de la agricultura a escala comercial que sería relevante para una cadena de producción de bioenergéticos [4]. En México se produce una gran variedad de bebidas fermentadas las cuales se obtienen a partir de diversas plantas con metabolismo CAM. Ejemplo de ellas son: el pulque que se elabora con el aguamiel de varias especies de magueyes pulqueros (*A. salmiana*, *A. mapisaga*, *A. atrovirens*) y el tepache que se obtiene de pulpa y cáscara de piña. Además de estas bebidas alcohólicas se producen las bebidas destiladas de agave o mezcales. De ellas las más reconocidas tanto a nivel nacional como internacional son el tequila (elaborado con *Agave tequilana* W. var. *azul*) y el mezcal con denominación de origen, elaborado con diversas especies de agaves mezcaleros (*A. angustifolia*, *A. potatorum*, *A. inequidens*, *A. maximiliana*) en varios estados y municipios del país. Otro ejemplo de aprovechamiento de los oligofructanos producidos por los agaves es la elaboración de jarabes (también llamados jarabe de agave, jarabe fructosado, jarabe de alta fructosa) que pueden ser utilizados como endulzantes [6].

En la península de Yucatán, las hojas del henequén (*Agave fourcroydes* L.) se utilizan en la producción de fibras naturales. Durante el proceso de extracción de la fibra se produce un jugo que contiene polisacáridos, los cuales se podrían aprovechar para la producción de etanol [7] y de esta forma utilizar un residuo que actualmente se desecha. En el presente trabajo se evaluaron tres tipos de hidrólisis del jugo de las hojas de henequén y se estudió el comportamiento de las levaduras *Saccharomyces cerevisiae* y *Kluyveromyces marxianus* para producir etanol a partir de los hidrolizados. Los resultados demostraron que la levadura *Kluyveromyces marxianus* tiene mayor potencial para continuar los estudios de obtención de etanol a partir del jugo de henequén.

# CAPÍTULO I

## ANTECEDENTES

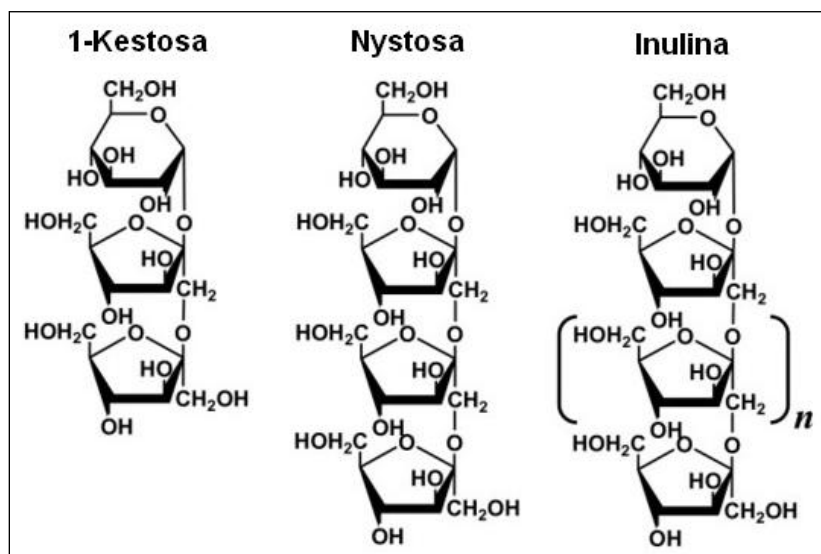
### 1.1. El Henequén

En la región de Yucatán, el henequén (*Agave fourcroydes* Lem.) es una planta que actualmente está siendo evaluada para determinar su potencial en la producción de etanol. Esta planta pertenece a la familia Agavaceae, es cultivada en las regiones del norte de la península, y ha sido utilizada desde hace siglos por los mayas para obtener fibras naturales a partir de sus hojas. A principios de 1900 este cultivo contribuyó de manera importante en la economía de la región, pero su explotación industrial comenzó a declinar a mediados de la década de los 70's con el advenimiento de las fibras sintéticas. El principal producto del henequén es la fibra que se obtiene de sus hojas y que ha sido utilizada de manera tradicional para la fabricación de sogas, cordeles, sacos, alfombras, etc. Hoy en día, la fibra del henequén sigue siendo una de las fibras naturales de mayor calidad, además de constituir un cultivo productivo en áreas áridas y semiáridas [8].

Actualmente, la producción de fibra es de 5000 toneladas, cifra semejante a la registrada en 2005. Para lograr esta producción aproximadamente 250 millones de hojas son procesadas, obteniéndose como subproducto alrededor de 75 millones de litros de jugo de henequén cuya composición química se presenta en la tabla 1.1 [7]. El jugo es rico en azúcares simples y oligofruktanos. En la mayoría de los agaves las fuentes de reserva son fructanos, algunos se muestran en la figura 1.1. Robertfroid [9] señala que se han encontrado fructanos en plantas (principalmente en el filo angiospermas, pero también en familias de mono y dicotiledóneas, así como en la familia *Agavaceae*), hongos (principalmente en especies de *Aspergillus*) y bacterias (*Streptococcus mutans*, *Pseudomonadaceae*, *Enterobacteraceae*, *Streptococcaceae*, *Bacillaceae* y *Actinomycetaceae*). Ancona-Escalante [10] reporta que la mejor fuente para obtener fructanos en henequén es la piña de plantas adultas. En dichos tejidos se encuentra la mayor cantidad de azúcares así como un mayor grado de polimerización. Sin embargo, no descarta la presencia de los mismos compuestos en las hojas de la planta.

**Tabla 1.1. Composición química del jugo de hojas de henequén [7].**

pH	4.5
Sólidos totales (g·L <sup>-1</sup> )	86.2
Sólidos solubles (°Bx)	10.6
Fibra cruda (g·L <sup>-1</sup> )	10.1
Cenizas (g·L <sup>-1</sup> )	6.25
Azúcares totales (g·L <sup>-1</sup> )	69.43
Azúcares reductores (g·L <sup>-1</sup> )	27.7
Acidez total (g·L <sup>-1</sup> como ácido cítrico)	16.5
Calcio (mg·L <sup>-1</sup> como CaCO <sub>3</sub> )	9100
Magnesio (g·L <sup>-1</sup> como MgCO <sub>3</sub> )	1700
Fosfatos (mg·L <sup>-1</sup> como PO <sub>4</sub> <sup>-2</sup> )	17.1
Sulfatos (mg·L <sup>-1</sup> como SO <sub>4</sub> <sup>-2</sup> )	5200
Nitrógeno Total (mg·L <sup>-1</sup> )	985



**Figura 1.1. Ejemplos de fructanos [10].**

## 1.2. Taxonomía del henequén

La clasificación taxonómica del henequén es la siguiente [11].

Familia: *Agavaceae*.

Género: *Agave*.

Subgénero: *Euagave*.

Especie: *fourcroydes*.



### 1.3. Caracterización agronómica del henequén

- Raíz: Las raíces crecen de una forma radial muy extendida (1.5 m), son duras, fibrosas y miden unos 3 mm de diámetro.
- Rizoma: Es un tallo subterráneo, en cuyo ápice (extremo superior) hay una yema que al emerger produce una nueva planta conocida como vástago. Estos vástagos son producidos asexualmente y se mantienen unidos a la planta madre hasta que son cortados para emplearse en la siembra de nuevas plantaciones. Esta forma de propagación es la más común. El rizoma es succulento, escamoso y de color verde cuando se expone a la luz. Al brotar mide de 7 a 8 mm y se va engrosando a medida que crece, hasta alcanzar 1.5 cm en la punta terminal.
- Tallo: Tiene un diámetro de entre 20 y 30 cm, se presenta oculto por las hojas y mide de 1 a 1.7 m de altura.
- Hojas: las hojas crecen en forma de roseta, son de color verde-grisáceo. Son duras, carnosas, muy fibrosas, lanceoladas y ligeramente cóncavas. Son redondeadas en la base. Miden 6 cm de grosor por 11 cm de ancho y pueden llegar a longitudes de hasta 150 cm del tallo hasta la punta. Estas presentan una espina terminal cónica de unos 3 cm de largo, la cual es de color café oscuro, brillante cuando la hoja acaba de brotar, y se torna opaca cuando envejece. En los bordes tienen de 40 a 45 pequeñas espinas laterales que llegan a medir 1 mm de ancho por 3 mm de largo [11].
- Ciclo de vida: El ciclo de vida del henequén puede ser de 15 a 20 años, sin embargo su duración depende de la producción de un determinado número de hojas.
- Inflorescencia: Al final de su vida el henequén produce un escapo bulbífero que crece rápidamente y llega a medir de 5 a 6 metros de alto, con 18 o 20 umbelas laterales en la mitad superior del tallo.

- Flor: Las flores son grandes, amarillo-verdosas protándricas (el desarrollo y madurez de los estambres ocurre antes que los carpelos) [12] presentan un perianto tubular de color verde, seis estambres insertos en el tubo, largas antenas filamentosas versátiles amarillas con ovario inferior, pistilo elongado y estigma con tres lóbulos. Las dimensiones de los órganos florales varían de acuerdo al tamaño de la planta y del escapo, así como de la fase en que se encuentre la flor.
- Fruto: El fruto es una cápsula dehiscente de color verde, que se torna negro cuando madura; contiene semillas de color negro, aplanadas de forma más o menos triangular, con un lado redondeado. Las semillas no fertilizadas son de color blanco y de menor tamaño.
- Bulbillos: Debajo del péndulo floral se localizan las yemas, que al desprenderse del fruto dan origen a las plantas de origen asexual.

#### **1.4. Fotosíntesis en los agaves**

Sin duda, la clave para producir alcohol a partir de los agaves es la alta cantidad de azúcares que acumulan como producto de la fotosíntesis. En la naturaleza las plantas pueden tener tres rutas fotosintéticas: C3, C4 y CAM (metabolismo del ácido crasuláceo). Las tres rutas son similares en cuanto a la captación de luz (fase luminosa), sin embargo la asimilación del carbono (fase oscura) es diferente entre cada ruta. En las plantas C3 la enzima responsable de la asimilación de  $\text{CO}_2$  es la ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa-oxigenasa (RuBisCO), donde el  $\text{CO}_2$  es llevado directamente al ciclo de Calvin y el producto final es el 3-fosfogliceraldehído, el cual puede tener diversos destinos como la producción de carbohidratos [13]. Las plantas con metabolismo C4 emplean dos enzimas, la fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEP carboxilasa) y la RuBisCO, las cuales están separadas por una barrera física. En esta ruta el  $\text{CO}_2$  es almacenado en forma de malato por la PEP carboxilasa, posteriormente el  $\text{CO}_2$  es liberado a otro compartimiento de la célula donde es llevado al ciclo de Calvin. Esta ruta es muy eficiente, ya que evita que la RuBisCO fije  $\text{O}_2$  (oxígeno) en vez de  $\text{CO}_2$ , pues es una enzima que tiene actividad de carboxilasa-oxigenasa.

Los agaves utilizan la ruta fotosintética CAM, la cual es similar a la C4, pero la diferencia principal consiste en que la RuBisCO y la PEP carboxilasa están separadas no por una barrera física, sino por el tiempo. Las plantas CAM absorben el CO<sub>2</sub> por la noche por medio de la PEP carboxilasa y realizan la fotosíntesis durante el día utilizando a la RuBisCO. Dado que las plantas CAM fijan el CO<sub>2</sub> en forma de malato durante la noche, que es cuando la temperatura desciende, la pérdida de agua por evapotranspiración es mínima. El malato se acumula en el tejido parenquimático de almacenamiento, el cual cuenta con grandes vacuolas. Por esta constitución anatómica, una gran parte de las plantas CAM son suculentas y tienen una gran cantidad de parénquima hídrico, a fin de almacenar agua y malato [13]. Durante la noche se acumula el malato, lo cual provoca la acidificación de los tejidos parenquimáticos de reserva, mientras que en el día, el malato es transformado en azúcares. Esta es la causa por la que las hojas de las plantas CAM son agrias por la mañana y dulces en la tarde [14]. En esta ruta, el aceptor del CO<sub>2</sub> para su posterior fijación en malato es el fosfoenolpiruvato (PEP). El PEP sufre una carboxilación por la enzima PEP carboxilasa convirtiéndolo en oxalacetato, proceso que sucede generalmente en las noches. El oxalacetato reacciona con el CO<sub>2</sub> y mediante el empleo de una molécula de NADPH se convierte en malato, como se muestra en la figura 1.2. [15].

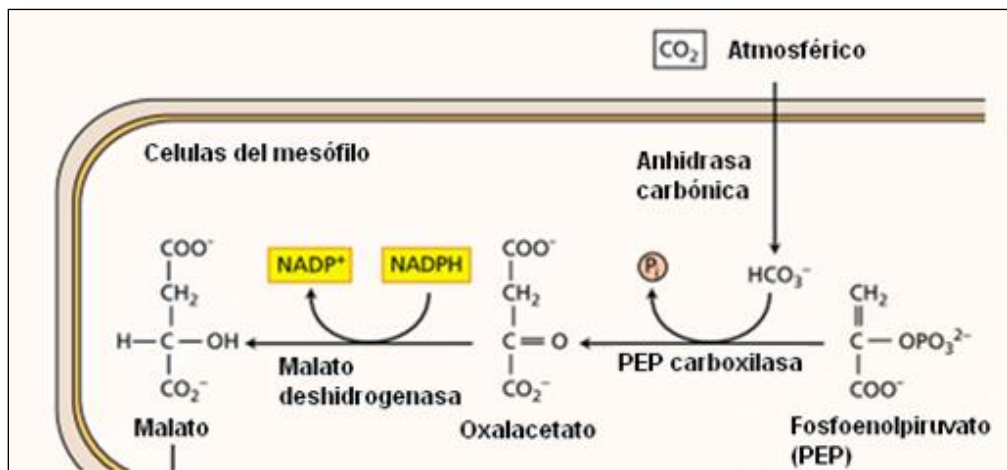


Figura 1.2. Síntesis de malato a partir de CO<sub>2</sub> [16].

Una vez incorporado el malato, es descarboxilado durante el día y el CO<sub>2</sub> es incorporado por medio del ciclo de Calvin, donde se sintetizan los precursores para la síntesis de

carbohidratos como fructosa, glucosa, sacarosa u otros más complejos como los fructanos por medio de varias reacciones enzimáticas en el interior de las células [14].

## 1.5. Carbohidratos

Los carbohidratos son conocidos generalmente como azúcares y son muy abundantes en la naturaleza. La mayoría de estos proceden de plantas y algunos otros de origen animal. Los azúcares y el almidón de los alimentos, la celulosa en la madera, el papel y el algodón, son carbohidratos casi puros. Los carbohidratos modificados forman parte del recubrimiento de las células, otros son parte de los ácidos nucleicos y otros se utilizan como medicamentos [17]. Los carbohidratos tienen un sabor dulce pero algunos pueden no tenerlo. La importancia para los seres vivos radica en que se utilizan como fuente o reserva de energía o para formar estructuras complejas. Los carbohidratos se clasifican en azúcares simples y complejos; los simples también llamados monosacáridos, como la glucosa y la fructosa son los más sencillos; en cambio los disacáridos, oligosacáridos y polisacáridos, están compuestos por dos o más monosacáridos unidos por enlaces glicosídicos y forman azúcares como la sacarosa, maltosa y lactosa. Algunos más complejos son la celulosa y el almidón, los cuales sí son hidrolizables [17].

## 1.6. Fructanos en agaves

Los estudios de López *et al.* [18] señalan que los principales carbohidratos de almacenamiento en los tallos de los agaves son fructanos, oligómeros o polímeros con residuos  $\beta$ -fructofuranosilo, solubles en agua, sintetizados a partir de la sacarosa presente en la vacuola. Funcionan como moléculas almacenadoras de energía, que están involucradas en el desarrollo vegetativo y en el proceso de osmorregulación de estas plantas. Los fructanos representan el 60% del total de los carbohidratos solubles presentes en todas las especies de agaves. Se clasifican de acuerdo a su grado de polimerización (GP) que va de 3-60 o más. Los de bajo GP (<10) son los fructo oligosacáridos, y los de alto GP (>10) son las inulinas [19]. La inulina es un fructano con enlaces  $\beta$  (2 $\rightarrow$ 1), y constituye el carbohidrato de reserva de *A. tequilana*, *A. americana*, *A. mapisaga*, *A. atrovirens* y *A. salmiana*. Las especies de agaves presentan diferencias en

cuanto a la distribución de otros carbohidratos solubles como sacarosa, fructosa y glucosa, lo que se debe a las características ambientales que prevalecen en las regiones en donde son cultivadas [20].

Oligofructanos es el nombre empleado para designar a los polímeros de fructosa (hasta 10 unidades) unidas en la posición  $\beta$  (2 $\rightarrow$ 1), además pueden contener ramificaciones unidas por enlaces  $\beta$  (2 $\rightarrow$ 6). La función fisiológica de estos compuestos en los tejidos vegetales aún está en discusión, pero su papel como carbohidrato de reserva es la más aceptada. Sin embargo, se han observado funciones específicas de estas moléculas en distintas especies vegetales. Los oligofructanos presente en los agaves como el *A. tequilana* Weber variedad azul o *A. fourcroydes* Lem. se hidrolizan mediante calentamiento produciendo principalmente monosacáridos como la fructosa y la glucosa (70-90 %), disacáridos y trisacáridos (30 a 10%) [21]. La fructosa y glucosa son azúcares reductores que pueden ser utilizados por diversos organismos para producir alcohol por un proceso de fermentación.

### **1.7. Función biológica de los fructanos en las plantas**

A pesar de importantes avances en la comprensión del metabolismo de los fructanos, la función fisiológica exacta es aún un tema de debate. Su papel se define como reserva a largo plazo de carbohidratos almacenados en los órganos subterráneos, como sistema de hibernación, y tiene otras funciones como la crioprotección y la regulación osmótica, lo que permite el crecimiento y la supervivencia en condiciones de escasez de agua por sequía, o por temperaturas bajas (4°C) [21]. Durante la sequía, los fructanos así como la glucosa, la fructosa, la sacarosa, se encuentran en las raíces y en las hojas. Por otro lado, se demostró que interactúa directamente con los lípidos de membrana en el secado por congelación, preservando las membranas en una fase líquida-cristalina a temperatura ambiente, y evita una transición de fase y las fugas de soluto durante la rehidratación [9].

### **1.8. Hidrólisis**

Hidrólisis es el proceso en el cual un compuesto químico reacciona con agua. Este tipo de reacción se da en los polímeros con el fin de degradarlos a moléculas más simples. La

degradación del polímero es catalizada generalmente por un ácido o base, sin embargo también existen complejos biológicos (enzimas) que realizan esa función.

### 1.8.1. Hidrólisis enzimática

Para la producción de bioetanol no es posible fermentar directamente los fructanos, debido a que las levaduras no son capaces de asimilarlos, un paso previo es la hidrólisis con el fin de romper los enlaces glucosídicos y obtener jarabes de fructosa. Esta reacción puede llevarse a cabo mediante el empleo de catalizadores ácidos o biocatalizadores. La hidrólisis enzimática es un proceso muy específico, eficiente y algo más cara, debido al costo de la enzima, en comparación con un proceso convencional de hidrólisis ácida [22]. Existen microorganismos que tiene la capacidad de hidrolizar los fructanos y poder aprovechar los monosacáridos de los cuales está compuesta. En la tabla 1.2. Se muestran algunos que se han reportado [23].

**Tabla 1.2. Microorganismos productores de inulinasas [23].**

<b>Inulinasas</b>	<b>microorganismo productor</b>	<b>Tipo de cultivo</b>
Exoenzima	<i>Cryptococcus aureus</i> G7a	Cultivo líquido
Exoenzima	<i>Cryptococcus aureus</i> G7a	Fermentación en estado sólido
Exoenzima	<i>Pichia guilliermondii</i>	Cultivo líquido
Exoenzima	Mutante M-30 <i>Pichia guilliermondii</i>	Cultivo líquido
Exoenzima	Mutante M-30 <i>Pichia guilliermondii</i>	Fermentación en estado sólido
Exoenzima	<i>Kluyveromyces marxianus</i> (A1 y A2)	Cultivo líquido
Exoenzima	<i>Kluyveromyces marxianus</i> ATCC 16045	Cultivo líquido
Exoenzima	<i>Kluyveromyces</i> sp. Y-85	Cultivo líquido
Exoenzima	<i>Kluyveromyces marxianus</i> YS-1	Cultivo líquido
Endoenzima	<i>Penicillium</i> sp. NT-88	Cultivo líquido
Exoenzima	<i>Aspergillus niger</i> NK-126	Cultivo líquido
Exoenzima	<i>Streptomyces</i> sp. GNDU 1	Cultivo líquido
Exoenzima	<i>Staphulococcus</i> sp	Fermentación en estado sólido

Se ha estudiado la fermentación directa de extractos de alcachofa a etanol con especies de levaduras productoras de inulinasas como *Kluyveromyces fragilis*, *Kluyveromyces marxianus* y *Saccharomyces rosei*. Este proceso también se ha evaluado utilizando dos pasos, la hidrólisis enzimática del extracto para obtener azúcares simples y su posterior

fermentación para obtener etanol [24]. La inulinasa es una  $\beta$ -fructanohidrolasa (EC 3.2.1.7) que es una glicoproteína extracelular producida por varias levaduras y hongos filamentosos. Esta enzima rompe los enlaces fructofuranosídicos  $\beta$  (2 $\rightarrow$ 1) y  $\beta$  (2 $\rightarrow$ 6), y cataliza la hidrólisis de la inulina en unidades de fructosa [24]. La hidrólisis total de los fructanos produce, además de fructosa, de 5 a 6% de moléculas de glucosa que se encuentran en los extremos de la cadena. Se ha sugerido usar a los fructanos como fuente para la obtención comercial de fructosa de alta pureza [25].

### **1.8.2. Hidrólisis térmica**

Se ha demostrado que la inulina pierde estabilidad o puede hidrolizarse a temperaturas superiores a los 90 °C, produciendo principalmente oligofructanos y algunas moléculas de fructosa y glucosa. La hidrólisis térmica es un método sencillo pero con bajos rendimientos debido a que no llega a transformar completamente la inulina en monosacáridos [21].

### **1.8.3. Hidrólisis termoquímica**

La fructosa se puede obtener por hidrólisis de inulina con ácido y temperaturas altas (superiores a 90 °C), se degrada con facilidad a pH bajo entre 2-5 y el proceso ocasiona la coloración del hidrolizado y la formación de subproductos en forma de anhídridos de fructosa [26].

## **1.9. Levaduras**

El término levadura deriva del latín “levere” que significa levantar o crecer, o del griego “zestos” que significa hervir. Estos términos se asocian con las características que representan la fermentación de la cerveza y del pan llevada a cabo por estos microorganismos [27]. Las levaduras son hongos eucariotas unicelulares, la mayoría perteneciente a los ascomicetos, aunque también hay en el filo de los basidiomicetos.

Normalmente son ovals esféricos o casi cilíndricas y su división es casi siempre por gemación. En dicho proceso, la nueva célula (hija) se forma como un pequeño bulto en la célula madre y va creciendo hasta que se separa de ella. Algunas levaduras poseen reproducción sexual por conjugación en la que se fusionan dos células. La célula resultante es un cigoto verdadero y de él emergen esporas sexuales por reducción meiótica. Cuando se reproducen sexualmente generan ascas y ascosporas, o basidios y basidiosporas, las cuales no quedan confinadas dentro de un cuerpo fructífero [28].

- **Hábitat:** Las levaduras prosperan típicamente en hábitat con azúcar, tales como frutos, flores y cortezas de los árboles. También, pueden habitar en sustratos no azucarados como las levaduras basidiomicetes descubiertas en lagos de la Antártica. Un gran número de levaduras viven como simbioses con animales, especialmente insectos, siendo éstos sus principales vectores de dispersión; algunas pueden ser patógenas [29]. Las levaduras generalmente forman colonias de colores blanco-crema, amarillo principalmente con texturas lisas y algunas rugosas.
- **Metabolismo:** Las levaduras son microorganismos facultativos, lo cual les permite crecer tanto en condiciones aerobias como anaerobias. La diferencia radica en el metabolismo que desarrollan según las condiciones en las que estén, en ambientes aerobios obtendrán energía oxidando a los azúcares en  $\text{CO}_2$  y agua con lo cual producirán gran cantidad de biomasa. Bajo condiciones anaerobias tienden a fermentar los azúcares, es decir, reducen los mismos a etanol,  $\text{CO}_2$  y energía, sin embargo con un rendimiento menor ya que el 75% de la energía producida se pierde en forma de calor. El tipo de metabolismo que las levaduras llevan a cabo depende de su especie y de las condiciones en que se desarrollan. A bajas concentraciones de glucosa (menos del 1%) y en presencia de aireación las levaduras llevan a cabo el metabolismo aerobio, sin embargo a altas concentraciones de glucosa y aun en presencia de oxígeno llevan a cabo el metabolismo fermentativo [30].



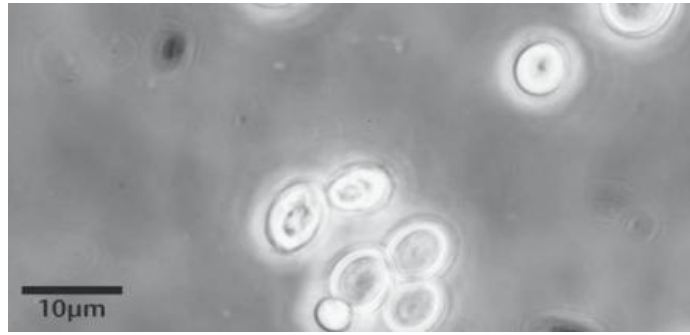
- Fisiología: La mayoría de las levaduras son mesófilas porque su crecimiento óptimo está entre los 20 y 25°C, sin embargo algunas pueden crecer a 4°C (sicrófilas) y otras toleran temperaturas elevadas (termófilas > 55°C), lo que depende del hábitat del que fueron aisladas [28]. Su pH óptimo de crecimiento se encuentra entre 4.5-6.5, aunque algunas especies pueden crecer a pH de 3.0 y otras a valores superiores de 8.0 [27].

Las levaduras representan un grupo muy importante de microorganismos productores de vinos y licores, principalmente la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, Además de ésta, hay otros muchos géneros y especies que pueden llevar a cabo la fermentación alcohólica como por ejemplo *Kluyveromyces marxianus* [31].

### 1.9.1. *Saccharomyces cerevisiae*

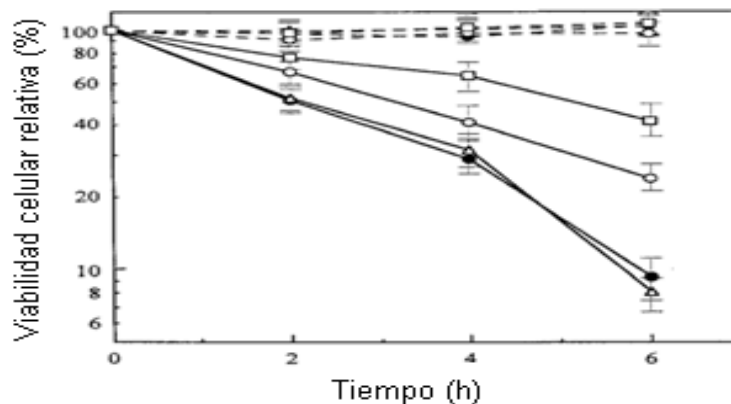
*Saccharomyces cerevisiae* es la levadura fermentador por excelencia debido a su capacidad de generar dióxido de carbono y etanol a partir de sustratos azucarados. Es utilizada industrialmente en la fabricación de pan, cerveza y vino [32]. *S. cerevisiae* es una levadura que presenta un ciclo de vida complejo y que puede estabilizarse en una fase haploide (n) o diploide (2n). En ambas fases se puede reproducir vegetativamente produciendo blastosporas haploides o diploides; en estas últimas, en presencia de condiciones adversas, se realiza la conjugación de esporas de signo opuesto dando origen a un asca con ascosporas.

*S. cerevisiae* presenta células globosas, subglobosas, ovaladas a elongadas, generalmente están aisladas, en pares o en racimos pequeños y en forma de pseudomicelio o este es muy rudimentario (Figura. 1.3). Las colonias son de color crema, de textura butirosa, de superficie lisa, plana y brillante pero en ocasiones puede ser levantada, pleada y opaca. *S. cerevisiae* es la especie responsable de la fermentación de jugo de frutas, aunque otras especies del complejo *Saccharomyces sensu stricto* como son *S. bayanus*, *S. paradoxus* o *S. pastorianus* pueden encontrarse en estos sustratos, pero no son las más adecuadas para realizar la fermentación del sustrato. *S. cerevisiae* tiene la capacidad de fermentar eficientemente glucosa, fructosa, sacarosa [28,31].



**Figura 1.3. *Saccharomyces cerevisiae* observada en un microscopio de contraste de fases con un aumento de 1000x [31].**

Cientos de genes han sido asociados con la tolerancia al etanol, esto implica un amplio espectro de categorías funcionales como biosíntesis de proteínas, metabolismo de aminoácidos, metabolismo de nucleótidos, el transporte, ciclo celular y de crecimiento, metabolismo de lípidos así como organización de la membrana y pared de celular [33]. Se han vinculado múltiples caracteres así como su localización genómica (*loci*) al estrés por etanol. La evolución de la ingeniería genética es un enfoque común para mejorar el rendimiento microbiano, utilizando varios tipos de métodos de mutagénesis y recombinación o intercambio de genes para la selección de fenotipos deseables [34,35]. En el estudio reportado por Kajiwara *et al* [36] demuestran que las cepas modificadas de *S. cerevisiae* tuvieron un mayor tiempo de vida (Fig. 1.4); las mutantes y las cepas silvestres fueron expuestas a un medio con 15 % (v/v) de alcohol.



**Figura 1.4. Decremento de la viabilidad celular de cepas de *S. cerevisiae* (modificadas línea punteada, no modificadas línea continua). Se tomó como 100 % de viabilidad la encontrada al tiempo cero [36].**

### 1.9.2. *Kluyveromyces marxianus*

Es una especie que se caracteriza por presentar colonias de color crema a crema marrón, en ocasiones con pigmentación rosa debido a la producción de pulquerrimina. Presenta células globosas, elipsoidales a cilíndricas que pueden estar aisladas, en pares o formando cadenas. Bajo determinadas condiciones puede formarseudomicelio rudimentario o muy ramificado. Las ascas se forman por conjugación de células haploides o por conjugación de la célula madre y su brote, o directamente a partir de células diploides, y contienen de 1 a 4 ascosporas esféricas, elipsoidales o reniformes.

Es un especie que comúnmente se encuentra en productos lácteos aunque también ha sido aislada de plantas, de cerveza de sorgo, de mostos de *Agave angustifolia*, de *A. salmiana* y de *A. fourcroydes*. *Kluyveromyces marxianus* se ha aislado de una gran variedad de hábitats debido a su versatilidad metabólica y alto grado de polimorfismo intraespecífico [37]. Además, se investigó la capacidad fisiológica y bioquímica de esta especie relacionada con la represión catabólica [38], la sensibilidad hacia diversas toxinas y la inhibición de su crecimiento por ácidos grasos [39].

Esta especie fermenta activamente glucosa, sacarosa y rafinosa, en forma tardía galactosa e inulina, y la lactosa puede o no fermentarla dependiendo de la cepa. Algunas de sus características distintivas son su termotolerancia, su capacidad de producir inulinasas y pectinasas, y su rápido crecimiento. Estas características, principalmente su capacidad de fermentar azúcares como lactosa e inulina y de ser termotolerante, hacen a esta especie atractiva para ser utilizada en la producción de etanol a partir de sustratos baratos.

La producción de etanol a temperaturas elevadas ha recibido mucha atención debido a los ahorros potenciales que podrían obtenerse por evaporación continua a presión reducida del etanol en el mosto, se ha reportado que *K. marxianus* puede producir alcohol a temperaturas superiores a 40°C [40]. Sin embargo, el aumento de la temperatura tiene un efecto negativo en la producción de etanol y también reduce la viabilidad de las células [41].

Como consecuencia, ha surgido un amplio interés biotecnológico en esta especie, como por ejemplo la producción de: enzimas (Tabla 1.3), proteína unicelulares, compuestos aromáticos, de etanol (incluyendo los procesos de fermentación-sacarificación a alta temperatura simultánea), de bioingredientes; la reducción del contenido de lactosa en los productos alimenticios está relacionada con la producción de lactasas y galactosidasas; biorremediación. El desarrollo de nuevas aplicaciones biotecnológicas de *K. marxianus* se debe a las ventajas que tiene en comparación con otras especies de levaduras como son su capacidad de crecer en una amplia variedad de sustratos [42].

En la década de los 70, se publicaron diversos trabajos sobre el efecto de diversos factores (pH, concentración de etanol y de azúcares) sobre la cinética de crecimiento de *K. marxianus* [43,44] como un reflejo del interés en el uso de esta especie para aplicaciones industriales.

**Tabla 1.3 Producción de enzimas por diferentes cepas de *K. marxianus* y su aplicación.**

Cepa	Enzima	Aplicación
<i>K. fragilis</i> ATCC 12424 <i>K. marxianus</i> CBS 6397 <i>K. marxianus</i> CBS6556	Inulinasa	Producción de jarabe fructosado a partir de inulina [45,46,47,48].
<i>K. fragilis</i> <i>K. marxianus</i> NCYC 111 <i>K. marxianus</i> ATCC 10022 <i>K. marxianus</i> IMB3 <i>K. marxianus</i> CBS 6556	$\beta$ -galactosidasa	Reducción de lactosa en alimentos [49,50,51,52,53].
<i>K. fragilis</i> ATCC 12424	$\beta$ -glucosidasa	Hidrólisis de materiales celulósicos [54,55].
<i>K. marxianus</i> CCT 3172	Endopoligalacturonasas	Reducción de viscosidad en productos procesados de frutos [56].
<i>K. marxianus</i>	Proteínas fosfatasas	Modificación de las cualidades de caseína en la elaboración de quesos [57].
<i>K. marxianus</i>	Carboxipeptidasas	Reduce el sabor amargo en alimentos con proteína [58].

### 1.9.3. Cinética de crecimiento microbiano

La cinética de crecimiento microbiano es el aumento de biomasa de la célula individual, ya que al alcanzar su máximo crecimiento la célula se divide para dar origen a una nueva célula, de esta forma se multiplica y aumenta la población. El crecimiento es una fase en el ciclo de vida de todo organismo, en el desarrollo microbiano, hay cuatro fases principales en su crecimiento.

- **Fase de latencia:** Es el tiempo necesario para la adaptación de los microorganismos a un nuevo sustrato. Durante este período los microorganismos se encuentran en estado latente, aumentan su actividad metabólica y producen enzimas para utilizar las sustancias presentes en el nuevo sustrato.
- **Fase exponencial:** Durante esta fase los microorganismos inician su duplicación, la velocidad de crecimiento es máxima, pero ésta se ve afectada por diversos factores abióticos como fusión osmótica, concentración del sustrato, oxígeno, temperatura, pH, etc. [59].
- **Fase estacionaria:** En esta fase el crecimiento exponencial se detiene, debido a que hay escasez o agotamiento de los nutrientes esenciales y/o acumulación de algunos productos de desecho como metabolitos secundarios, enzimas autocatalíticas que al alcanzar cierta concentración pueden inhibir el crecimiento exponencial del microorganismo. Hay un crecimiento desequilibrado debido a que los componentes microbianos (ADN, ARN, proteínas, etc.) se sintetizan a tasas diferentes. Sin embargo, los microorganismos están fisiológicamente activos y realizan funciones celulares incluyendo el metabolismo bioenergético y algunos procesos biosintéticos. Se produce una estabilización entre el número de células que se multiplican y las que mueren por lo que la población se mantiene estable.
- **Fase de muerte:** Después del período estacionario, los microorganismos entran en una fase de decadencia y comienzan a morir más rápidamente que la producción de células nuevas, si acaso se producen algunas. Una gran variedad

de condiciones contribuyen, pero las más importantes son el agotamiento de nutrientes esenciales y la acumulación de productos tóxicos [60].

### 1.10. Fermentación de la glucosa

El proceso de fermentación de la glucosa es un balance interno entre compuestos reducidos y oxidados en ausencia de oxígeno, donde compuestos orgánicos toman el papel de aceptores de electrones. Una fermentación típica resulta en la formación de compuestos carbonados más reducidos ( $\text{CO}_2$ ) que los compuestos originales (azúcares). A partir de estas reacciones es como los microorganismos fermentadores obtienen energía, como se muestra en la figura 1.5 [61].

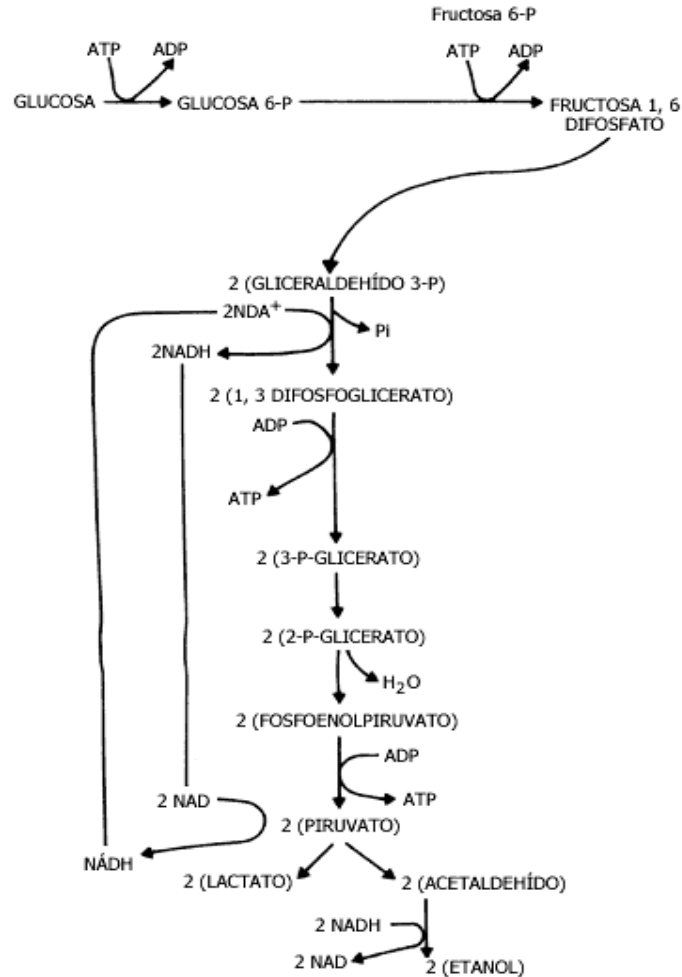


Figura 1.5. Fermentación de glucosa a etanol [61].

## 1.11. Metabolismo de fructosa

El metabolismo de la fructosa es la ruta por la cual los microorganismos pueden asimilar este carbohidrato, e integrarlo al metabolismo de la glucosa para aprovecharlo como una fuente de energía [62]. Para la asimilación de la fructosa no existe ningún metabolismo específico como es el caso de la glucosa (glucólisis). Existen enzimas que transforman la fructosa a fructosa-1-fosfato o fructosa-6-fosfato para que pueda entrar al metabolismo de la glucosa. En la figura 1.6 se muestra de forma simplificada la ruta y las enzimas que intervienen.

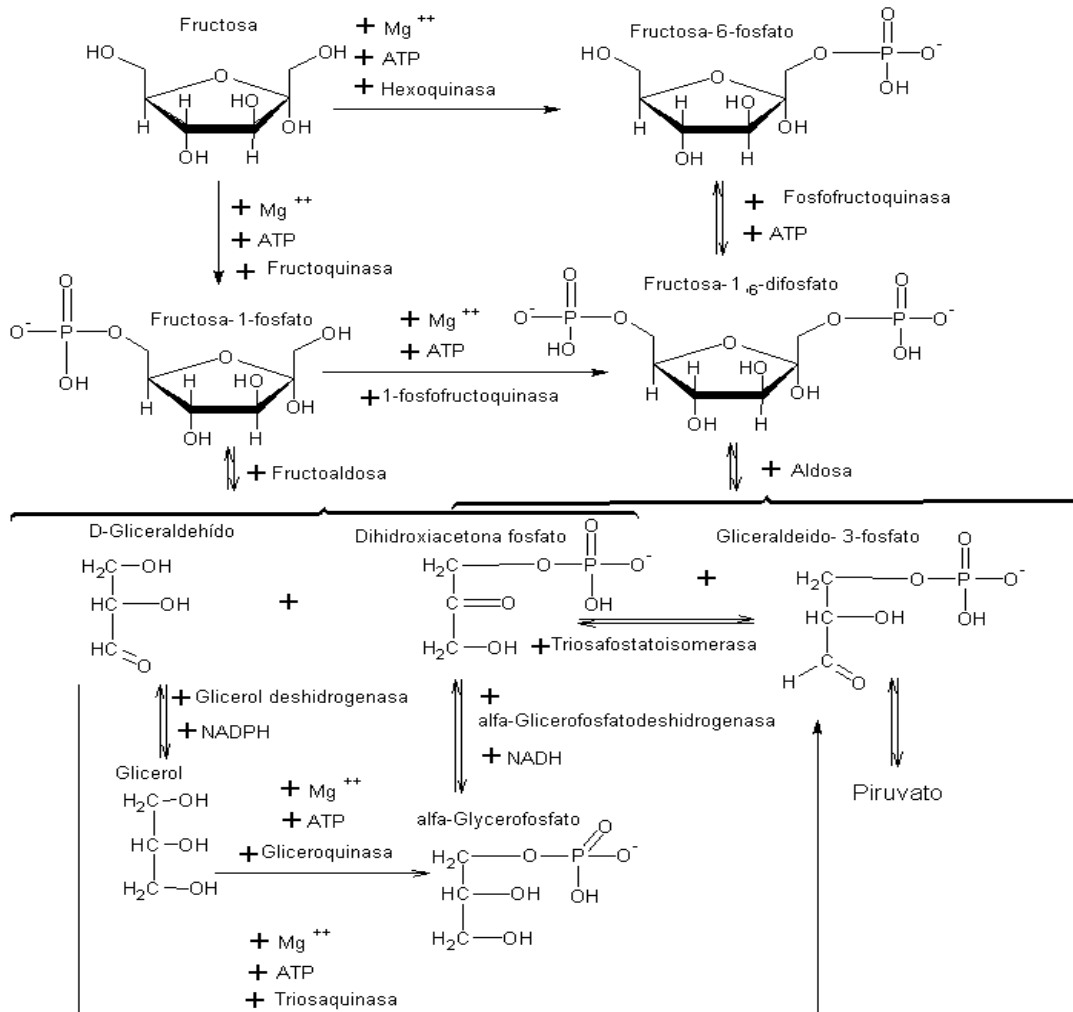


Figura 1.6. Ruta metabólica de fructosa a piruvato [62].

## **CAPÍTULO II**

### **FUNDAMENTOS DEL PROYECTO**

#### **2.1. Justificación**

Debido al inminente agotamiento de los combustibles fósiles, es necesaria una alternativa renovable que supla a estos carburantes. En Yucatán una actividad con importancia tanto económica como cultural es la obtención de fibras naturales a partir de las hojas de henequén. Como subproducto de este proceso se obtiene un jugo con un alto contenido de oligofructanos que actualmente es desechado en su totalidad y podría ser utilizado como fuente de carbono para la obtención de etanol. En este trabajo se realizaron estudios preliminares de obtención de etanol a partir de hidrolizados termoquímicos y enzimáticos del jugo de hojas de henequén con el fin de explorar la utilidad de este residuo.

#### **2.2. Planteamiento del problema**

Actualmente no existe una metodología que permita aprovechar el jugo que se genera de la raspa de las hojas. En estudios anteriores se obtuvieron rendimientos bajos de etanol a partir de mezclas de jugo de henequén y melazas, lo que pudo deberse a las bajas concentraciones de azúcares reductores, a hidrólisis deficientes o al uso de cepas de levaduras con bajo rendimiento en la producción de etanol, impidiendo el aprovechamiento adecuado de este subproducto, y a partir del cual es posible generar una cantidad suficiente de biocombustible que actualmente tiene una alta demanda. Mediante un estudio más detallado y modificación de las diferentes etapas del proceso se podrán alcanzar rendimientos más altos en la producción de etanol.

#### **2.3. Hipótesis**

A partir de la hidrólisis enzimática de los oligofructanos presentes en el jugo de henequén se espera obtener una mayor concentración de azúcares fermentables sin que se



produzcan compuestos inhibidores. Así mismo, utilizando la levadura *K. marxianus*, que se considera es autóctona del jugo de henequén, se espera que realice la asimilación y fermentación de los azúcares reductores de manera más rápida y eficiente, incrementando el rendimiento en la producción de etanol.

## **2.4. Objetivos**

### **2.4.1. Objetivo General**

Evaluar el rendimiento en la producción de etanol por fermentación de hidrolizados ácidos y enzimáticos de jugo de las hojas de henequén (*Agave fourcroydes* Lem) con las levaduras *Kluyveromyces marxianus* y *Saccharomyces cerevisiae*

### **2.4.2. Objetivos específicos**

- Determinar cual proceso de hidrólisis (térmica, termoquímica o enzimática) libera mayor cantidad de azúcares reductores en el jugo del henequén.
- Evaluar el crecimiento de *K. marxianus* y *S. cerevisiae* en hidrolizados de jugo de henequén.
- Evaluar el consumo de azúcares reductores y su conversión a etanol por *K. marxianus* y *S. cerevisiae* durante el proceso de fermentación del hidrolizado que libere más azúcares reductores del jugo de henequén.
- Determinar los rendimientos de etanol.

## CAPÍTULO III

### MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. Reactivos

Los reactivos utilizados fueron químicamente puros (grado analítico). La inulina en su presentación en polvo de 500 g fue donada por la empresa Iidea (Tlaquepaque, Jalisco, México), fue obtenida de *Agave tequilana* Weber variedad. Azul y se vende como fibra soluble para consumo humano (grado alimenticio). La inulinasa (marca Sigma-Aldrich) obtenida de *Aspergillus niger*, con una actividad declarada de 2000 U·mL<sup>-1</sup> (Díaz *et al* [22]) definen la unidad enzimática como la cantidad de enzima necesaria para liberar un µg de azúcar reductor por minuto a 50 °C) y una densidad de 1.13 g·cm<sup>-3</sup>.

#### 3.2. Material biológico

La cepa *K. marxianus* fue aislada de la base de las hojas de henequén siguiendo los procedimientos de la microbiología clásica y fue caracterizada por pruebas fenotípicas y moleculares [63]. La cepa comercial de *S. cerevisiae* utilizada fue marca Safoeno (Safmex S.A. de C.V., México) utilizada en la producción de vinos. Ambas levaduras se cultivaron en medio GELPA (glucosa 20 g·L<sup>-1</sup>, extracto de levadura 5 g·L<sup>-1</sup>, peptona alcalina 10 g·L<sup>-1</sup> y agar 20 g·L<sup>-1</sup>), a 30 ± 2 °C en oscuridad; los cultivos se almacenaron a 4 °C.

#### 3.3. Extracción del jugo de henequén

Las hojas se colectaron de una planta de henequén crecida en los jardines del CICY, se realizaron 4 colectas conforme se avanzó con el trabajo experimental. Con el jugo obtenido en la primera colecta se realizaron los tratamientos de hidrólisis termoquímica y parte de la enzimática. Con el jugo de la segunda colecta se terminó el tratamiento de hidrólisis enzimática y se realizaron las curvas de crecimiento de las levaduras. El jugo del tercer corte se empleó para las fermentaciones de los hidrolizados termoquímico y enzimático, y para el jugo crudo. El jugo de la cuarta colecta sirvió para realizar la

fermentación con seguimiento de la producción de etanol (fermentación de matraz terminal). Previamente se realizó un corte del cual no se reportan las características de las hojas y cuyo jugo sirvió para realizar los tratamientos de hidrólisis térmica y el primer tratamiento de hidrólisis termoquímica. Las hojas se cortaron, lavaron y secaron correctamente, posteriormente cada una se pasó dos veces por un molino de tres masas (de fabricación local, Bufete de Ingeniería de Yucatán SA de CV) y se prensaron para extraer su jugo, el que después se filtró. Las muestras se homogenizaron y almacenaron en un congelador hasta su análisis. La metodología del corte de hojas hasta la extracción y homogenización de jugo se muestra en la figura 3.1.



**Figura 3.1. Esquema metodológico para la obtención del jugo de hojas de henequén. A) Corte de las hojas. B) Limpieza y medición de las hojas. C) Proceso de extracción en el molino de tres masas. D) Jugo extraído.**

### **3.4. Determinación de azúcares reductores**

El contenido de azúcares reductores se determinó mediante el método del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) [64], utilizando glucosa como estándar para la curva de calibración, según el Anexo 1.

### **3.5. Determinación de azúcares totales**

El contenido de azúcares totales se determinó por el método del fenol sulfúrico [65], utilizando sacarosa como estándar para la curva de calibración según el Anexo 1.

### **3.6. Concentración de sólidos solubles (°Brix)**

Se midieron en las muestras de diferentes fases del proceso (jugo de hojas antes de hidrólisis, jugo hidrolizado ácido, jugo hidrolizado enzimático, y durante las fermentaciones), con un refractómetro portátil (marca Cole-Parmer, modelo FG103/113, USA).

### **3.7. Hidrólisis**

El hidrolizado del jugo de hojas de henequén se realizó por tres métodos: hidrólisis térmica, termoquímica y enzimática y se compararon las concentraciones de azúcares liberados.

#### **3.7.1. Hidrólisis térmica**

La hidrólisis térmica del jugo de hojas de henequén se llevó a cabo en matraces Erlenmeyer de 125 mL con 80 mL de muestra. En este proceso se evaluaron dos tiempos: 15 y 60 minutos en autoclave con una temperatura de 121 °C y 15 lb·pulg<sup>-2</sup>, como referencia se utilizó jugo sin hidrolizar (o jugo crudo).

#### **3.7.2. Hidrólisis termoquímica**

La hidrólisis termoquímica del jugo de hojas de henequén se llevó a cabo en matraces Erlenmeyer de 125 mL con 80 mL de muestra. Se utilizaron tres concentraciones de ácido sulfúrico 0, 1 y 5 % v/v (la prueba con el 0% se utilizó para ver únicamente los efectos de la temperatura y tiempo). Se probaron temperaturas de 60 y 100 °C, y tiempos de 15 y 30 minutos. Como referencia se utilizó jugo crudo el cual no fue sometido al tratamiento. A continuación se resumen los tratamientos realizados.

**Tabla 3.1. Diseño experimental para la hidrólisis termoquímica del jugo.**

Tratamiento	Temperatura (°C)	Tiempo de calentamiento (min)	Concentración de ácido (%v/v)
1	60	15	0
2	60	15	1
3	60	15	5
4	60	30	0
5	60	30	1
6	60	30	5
7	100	15	0
8	100	15	1
9	100	15	5
10	100	30	0
11	100	30	1
12	100	30	5

### 3.7.3. Hidrólisis enzimática

Se realizaron ensayos preliminares con el estándar de inulina a una temperatura de 60 °C, agregando 22.82 U de enzima y durante 180 minutos para corroborar la actividad enzimática. Posteriormente, se realizaron ensayos enzimáticos en matraces Erlenmeyer de 25 mL con 5 mL de jugo crudo, a un pH de 4.5 [22]. Se probaron temperaturas de 50, 55 y 60 °C y las reacciones se iniciaron agregando 22.82 U de enzima. Se muestrearon 100 µL a los tiempos de 0, 10, 30, 60, 90, 120, 150 minutos a los que se les determinó la concentración de azúcares reductores.

Posteriormente, se evaluaron diferentes concentraciones de enzima: 22.82, 11.47 y 5.75 unidades a la temperatura de 60°C.

### 3.8. Curvas de crecimiento

Se realizaron curvas de crecimiento para las cepas *S. cerevisiae* y *K. marxianus*, en los mejores tratamientos de cada tipo de hidrólisis (térmica, termoquímica y enzimática, en base a la cantidad de azúcares reductores liberados). Los experimentos se realizaron en matraces Erlenmeyer de 250 mL con 100 mL de jugo hidrolizado ajustado a un pH de 4.5 y una concentración de sólidos solubles de 6°Brix. Se adicionó sulfato de amonio (1.5 g·L<sup>-1</sup>) como fuente de nitrógeno [66]. La concentración celular utilizada como inóculo fue de

$3 \times 10^7$  cel·mL<sup>-1</sup> [7]. Se incubaron los matraces a una temperatura de  $30 \pm 2$  °C y se mantuvieron en agitación a 150 rpm. Se tomaron muestras a las 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24 y 32 h.

### **3.9. Preparación del inóculo para las fermentaciones**

El inóculo para las fermentaciones se preparó en un volumen de medio correspondiente al 10% en relación al volumen a fermentar, con una concentración inicial del inóculo de  $3 \times 10^7$  cel·mL<sup>-1</sup> de levaduras y se adicionó sulfato de amonio (1.5 g·L<sup>-1</sup>) como fuente de nitrógeno. Los matraces se incubaron en agitación a una temperatura de  $30 \pm 2$  °C, por el tiempo determinado según la curva de crecimiento de cada microorganismo.

### **3.10. Fermentación**

El proceso de fermentación se realizó en matraces Erlenmeyer de 250 mL con 200 mL de sustrato (incluyendo el inóculo). Se utilizaron como sustratos los jugos de hojas de henequén hidrolizados por tratamientos termoquímico, enzimático y como referencia se empleo el jugo crudo. A cada matraz se le adicionó sulfato de amonio como fuente de nitrógeno a una concentración de 1.5 g·L<sup>-1</sup> [66]. El pH se ajustó con una solución de NaOH al 50% hasta un valor de 4.5. Se tomaron muestras de 6 mL cada 12 h para la medición de la concentración de sólidos solubles, azúcares reductores y totales. De forma similar se realizó una fermentación final usando como sustrato jugo hidrolizado enzimáticamente, pero en este caso se realizo el método de matraz terminal. Se prepararon 27 matraces de 250 mL con 180 mL de jugo hidrolizado, a los que se adicionó un 10 % (del volumen total de 200 mL) de inóculo (20 mL), se utilizaron tres matraces para cada toma de muestra durante los tiempos 0, 6, 12, 18, 24, 36, 42 y 48 h. De cada matraz se tomaron 6 mL para los análisis de azúcares reductores y totales, 50 mL para la destilación y aproximadamente 45 mL del material sedimentado para la determinación de biomasa.

### 3.11. Destilación

Para el proceso de destilación, 25 mL del fermentado se mezclaron con 25 mL de agua destilada; el volumen resultante se transfirió a un matraz bola de 100 mL con 8 perlas de ebullición y se procedió a destilarlo a 100°C hasta obtener un volumen de 25 mL (figura 3.2).



Figura 3.2. Equipo de microdestilación.

### 3.12. Cuantificación de etanol

A los destilados obtenidos de cada una de las fermentaciones se le determinó su contenido de etanol mediante el método de dicromato de potasio (Anexo 1) [67].

### 3.13. Análisis estadístico

Para los análisis de Anova se utilizó el programa estadístico Statgraphics v.15 Centurión (Statpoint Technologies Inc., Warrenton, VA. USA). Todos los experimentos se realizaron por triplicado. Para los análisis se utilizó un valor P de 95% (el valor P es el nivel de significancia utilizado para la comparación de los resultados en los análisis estadísticos).

## CAPÍTULO IV

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 4.1. Obtención del jugo

En las primeras dos colectas se procesaron 4 hojas; durante la tercera y cuarta colecta se procesaron 8 hojas. En la tabla 4.1 se muestran los promedios de las características de las hojas. Se obtuvieron 3.11, 3.55, 7.05 y 6.70 L de jugo respectivamente. El jugo obtenido fue de color verde esmeralda; éste se filtró para eliminar los sólidos en suspensión. La concentración de sólidos solubles fue en promedio 10 °Brix muy similar a lo reportado por Cáceres-Farfán *et al* [7], sin embargo la cuarta recolecta fue de 14 °Brix lo cual indica que a pesar de ser un volumen menor de jugo, en comparación al tercer corte, es probable que contenga mayor cantidad de azúcar.

En las primeras dos colectas se procesaron 4 hojas, durante la tercera y cuarta 8 hojas. En la tabla 4.1 se muestran los promedios de las características de las hojas. Se obtuvieron 3.11, 3.55, 7.05 y 6.70 L de jugo respectivamente. El jugo obtenido fue de un color verde esmeralda, mismo que se filtró para eliminar lo sólidos en suspensión. La concentración de sólidos solubles en las muestras de jugo obtenidas en los cuatro muestreos fue de 10, 10.4, 9.5 y 14 °Brix, obteniéndose un valor promedio de 10 °Brix, cifra muy similar a la reportada por Cáceres-Farfán *et al* [7]. Sin embargo es importante resaltar que existe una diferencia en la concentración de sólidos solubles en el jugo dependiendo de la fecha de la colecta (ver tabla 4.1).

**Tabla 4.1. Características de las hojas de henequén.**

Fecha de muestreo	Longitud (cm)	DE*	Ancho (cm)	DE*	Peso (Kg)	DE*	Volumen de jugo**(L hoja <sup>-1</sup> )	CSS*** (°Brix)
15/Jun/10	109.50	±4.80	13.63	±0.95	1.09	±0.06	0.78	10.00
05/Nov/10	117.75	±6.29	14.88	±0.30	1.29	±0.22	0.89	10.40
10/Ene/11	119.38	±3.66	13.75	±1.03	1.29	±0.11	0.88	9.50
06/Jun/11	121.50	±2.45	14.36	±0.60	1.21	±0.08	0.84	14.00

\*Desviación estándar; \*\* El volumen del jugo corresponde al volumen total obtenido dividido entre el número de hojas; \*\*\*Los valores de concentración de sólidos solubles se evaluaron en el volumen total de jugo obtenido por lo que corresponde a un sólo valor.



Para 2010 CONAGUA reportó que la temporada de lluvias en Mérida, Yucatán inició a partir del 15 de mayo, mientras que en 2011 inició el 3 de junio, por lo que la última colecta se realizó en plena temporada de sequía. Es posible que esta condición haya propiciado el aumento de la concentración de sólidos solubles. Aunado a esto, en los meses de abril y mayo del 2011 se registraron las temperaturas más altas en la región. Ancona-Escalante y García-Albornoz [10,68] mencionan que durante la época de sequía hay una mayor concentración de azúcares totales tanto en piña como en hojas, que podrían tener un papel como osmorreguladores para evitar la pérdida de agua. Lo que explicaría el incremento de la concentración de sólidos solubles con igual volumen de jugo. Todos los jugos ya homogenizados se mantuvieron en congelación a  $-4^{\circ}\text{C}$ .

#### **4.2. Hidrólisis térmica**

Al descongelar las muestras hidrolizadas por tratamiento térmico, se observó la formación de dos fases en el sobrenadante, una fase ligera de color verde cristalino y una fase pesada de color verde opaco (Fig. 4.1). Se analizaron las fases por separado para determinar la concentración de azúcares totales y reductores después de los tratamientos de hidrólisis. No se encontró diferencia significativa entre la concentración de azúcares presente en ambas fases por lo que únicamente se utilizó para posteriores análisis el jugo homogenizado.

Los resultados de la hidrólisis térmica se presentan en la Tabla 4.2. El análisis de varianza (Anexo 2) indicó que el mejor tratamiento es el calentamiento a  $121^{\circ}\text{C}$  por 15 min, liberando la mayor cantidad de azúcares reductores (un aumento del 41.8% con respecto al inicio). Al proporcionar un mayor tiempo de calentamiento se observó un descenso en la concentración de azúcares, esto puede deberse a una degradación de los mismos por efecto del calor y la presión.

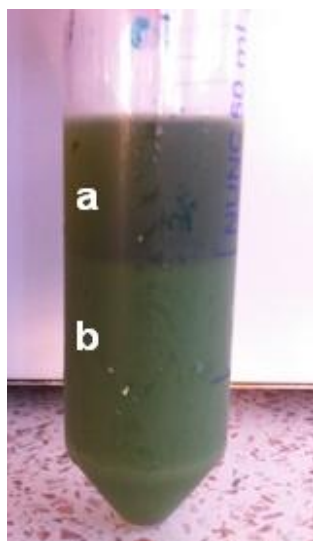


Figura 4.1. Separación del jugo en dos fases. a) fase ligera, b) fase pesada.

Tabla 4.2. Concentración de azúcares después de la hidrólisis térmica a 121°C.

Tiempo de calentamiento (min)	AR (g·L <sup>-1</sup> )	DE*	AT (g·L <sup>-1</sup> )	DE*
0	25.68 <sup>a</sup>	±1.71	64.59 <sup>a</sup>	±1.85
15	36.44 <sup>b</sup>	±1.23	60.56 <sup>a</sup>	±4.26
60	28.94 <sup>c</sup>	±1.17	46.04 <sup>b</sup>	±1.99

Los superíndices con la misma letra indican que no hay diferencia significativa entre los tratamientos según el análisis ANOVA (comparación de medias TUKEY LDS con un nivel de confianza del 95 %). \*Desviación estándar.

### 4.3. Hidrólisis Termoquímica

Gómez-Ayala *et al* [69] en un trabajo previo utilizaron H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 1% a 100°C para obtener un mosto fermentable rico en fructosa y glucosa a partir de la piña de *Agave americanae*. Tomando como base estos datos, se realizaron una serie de experimentos estudiando dos niveles de concentración de ácido (1 y 5%), dos niveles de temperatura (60 y 100°C) y dos niveles de tiempo de calentamiento (15 y 30 minutos). Para poder comparar los tratamientos, se calculó el porcentaje de incremento de azúcares con base a la cantidad inicial presente en el jugo crudo (control) y se realizó un análisis estadístico (Anexo 3). Estos resultados, junto con las concentraciones obtenidas, se presentan en la Tabla 4.3. Los valores de azúcares reductores presentan una mayor diferencia entre tratamientos. En el caso de azúcares totales sólo se definen dos grupos con diferencias significativas.

**Tabla 4.3. Incremento de la concentración de azúcares de los tratamientos de la hidrólisis termoquímica.**

Tratamiento	Temperatura (°C)	Tiempo de calentamiento (min)	Conc. ácido (%v/v)	AR (g·L <sup>-1</sup> )	DE**	Aumento AR (%)	AT (g·L <sup>-1</sup> )	DE**	Aumento AT (%)
*Control	-	-	-	20.37 <sup>a</sup>	±0.39	-	51.65 <sup>a</sup>	±3.53	-
1	60	15	0	18.69 <sup>a</sup>	±1.20	-8.25 <sup>***</sup>	52.64 <sup>a</sup>	±3.53	1.92
2	60	15	1	24.72 <sup>b</sup>	±2.58	21.34	51.18 <sup>a</sup>	±3.24	-0.90
3	60	15	5	37.75 <sup>c</sup>	±1.05	85.32	47.78 <sup>a</sup>	±7.42	-7.49
*Control	-	-	-	40.47 <sup>d</sup>	±1.46	-	61.67 <sup>b</sup>	±3.90	-
4	60	30	0	43.04 <sup>d</sup>	±0.75	6.35	59.07 <sup>b</sup>	±3.49	-4.21
5	60	30	1	53.85 <sup>e</sup>	±1.83	33.06	61.05 <sup>b</sup>	±3.04	-1.00
6	60	30	5	73.77 <sup>f</sup>	±1.70	82.27	61.98 <sup>b</sup>	±2.64	0.51
*Control	-	-	-	40.75 <sup>d</sup>	±0.60	-	58.98 <sup>b</sup>	±4.51	-
7	100	15	0	40.68 <sup>d</sup>	±1.25	-0.18	60.56 <sup>b</sup>	±2.45	2.68
8	100	15	1	65.18 <sup>g</sup>	±2.30	59.94	57.86 <sup>b</sup>	±3.78	-1.90
9	100	15	5	74.01 <sup>f</sup>	±1.49	81.61	56.75 <sup>b</sup>	±3.14	-3.78
*Control	-	-	-	39.52 <sup>d</sup>	±0.84	-	58.51 <sup>b</sup>	±4.70	-
10	100	30	0	39.76 <sup>d</sup>	±1.06	0.61	55.61 <sup>b</sup>	±3.00	-4.96
11	100	30	1	73.13 <sup>f</sup>	±3.29	85.05	53.34 <sup>b</sup>	±3.61	-8.84
12	100	30	5	73.60 <sup>f</sup>	±1.41	86.23	54.67 <sup>b</sup>	±5.20	-6.56

\*Como control se utilizó jugo crudo homogéneo sin ningún tratamiento. Los superíndices con la misma letra indican que no hay diferencia significativa entre los tratamientos según el análisis ANOVA (comparación de medias TUKEY LDS con un nivel de confianza del 95 %).

\*\*Desviación estándar. \*\*\*Valores de porcentaje negativos indican decremento.

Los tratamientos 3, 6, 9 y 12 en los que se utilizó 5% de ácido y el tratamiento 11 en el que se empleó 1% de ácido fueron los cinco tratamientos en los que se obtuvo más del 80% de incremento en la concentración de azúcares. El tratamiento 3 utiliza menor tiempo de calentamiento y menor temperatura lo que reduce el consumo de energía, aunque se emplea una mayor cantidad de ácido. El tratamiento 11 a pesar de utilizar mayor temperatura y tiempo consume cuatro veces menos ácido. Es necesario realizar un análisis más preciso de la influencia de estas variables (costo, agresividad química, etc.) para poder determinar el mejor tratamiento. Por otro lado, Karimi *et al* [70] resaltan la importancia de utilizar ácidos diluidos (0-1%), bajas presiones (10 y 35 Bar) y tiempos de retención cortos (3-10 min) en los procesos de hidrólisis de bagazo de arroz para evitar la degradación de los azúcares a compuestos no deseados como furfurales e hidroximetilfurfurales (HMF), los cuales son los principales compuestos que se forman al degradarse pentosas y hexosas respectivamente.

#### 4.4. Hidrólisis enzimática

##### 4.4.1. Ensayos con estándar de inulina

Para determinar la cantidad de azúcares que están presentes en una solución de inulina, se disolvió 1 g de inulina en 1 L de agua destilada y se realizó la determinación de azúcares reductores y totales. Los resultados se muestran en la figura 4.2.

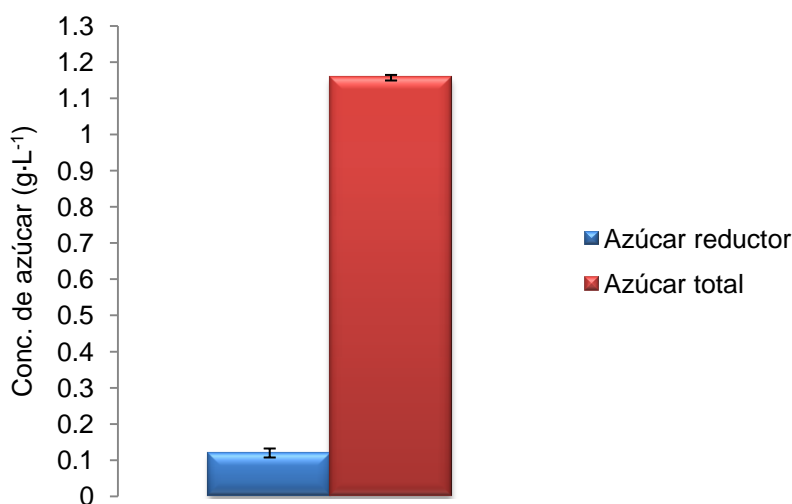
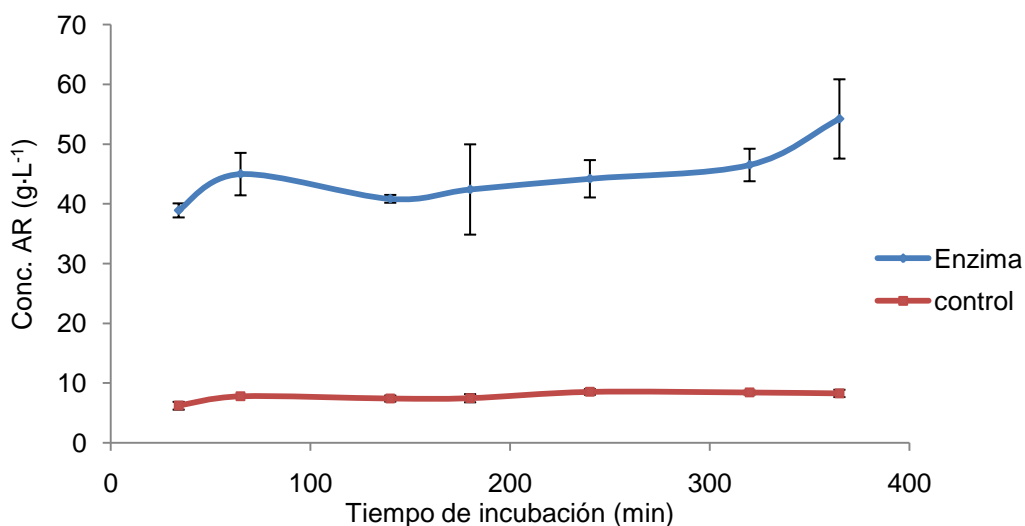


Figura 4.2. Concentración de azúcares en una solución de inulina al 0.1% (p/v).

Se puede observar que la concentración de azúcares reductores en la solución es mínima ( $0.1196 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ), ya que la gran mayoría se encuentra aún en la forma de oligofruktanos. Al realizar el análisis de azúcares totales, se libera los azúcares de la muestra y es cuando se obtiene un valor de  $1.1566 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  de azúcares totales, valor que, tomando en cuenta la exactitud de la técnica, es aproximado a la concentración del estándar que se preparó, lo que nos indica que por este método se logra hidrolizar casi toda la inulina.

Para corroborar si la inulinasa aún tenía actividad, se preparó una solución de inulina al 5% (p/v) en un buffer de acetato de potasio a pH 4.5 y se incubó a  $60^\circ\text{C}$  durante 6h con una cantidad de 22.82 unidades de esta enzima [22]. En la figura 4.3 se aprecia la liberación de azúcares reductores del estándar de inulina cuando se aplica la enzima.



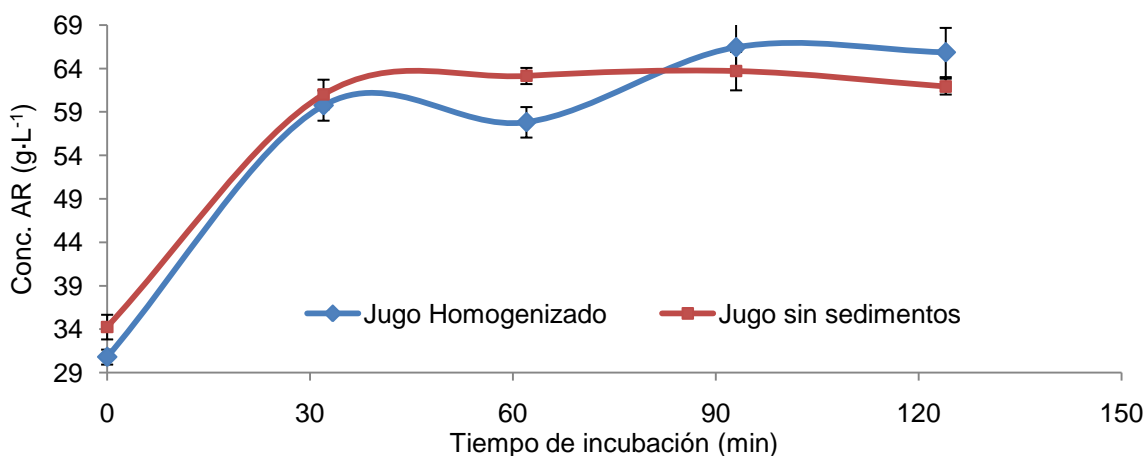
**Figura 4.3. Liberación de azúcares reductores del estándar de inulina ( $50 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) en buffer a pH 4.5 en el tratamiento con inulinasa [22.82 unidades] durante 360 minutos a  $60^\circ\text{C}$ .**

Aunque no se reporta la concentración de azúcares reductores al tiempo 0, se puede observar que la hidrólisis de la inulina ocurre en los primeros 60 min de incubación que es cuando la concentración de azúcares reductores se aproxima a los  $50 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ . Después se mantiene constante hasta los 320 minutos, tiempo al cual se observa un ligero aumento de la misma hasta alcanzar  $54.21 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  a los 360 minutos. Es posible que este aumento se

deba a un error de análisis. Este experimento permitió determinar que un tiempo de 60 minutos es adecuado para la hidrólisis de la inulina.

#### 4.4.2. Hidrólisis enzimática del jugo de henequén

El primer ensayo con jugo de henequén se realizó a una temperatura de 60°C, con 22.82 U de enzima utilizando el sobrenadante del jugo crudo centrifugado (sin sedimentos) y jugo homogenizado. Este experimento se realizó para saber si los sólidos presentes en el jugo afectarían el desempeño de la enzima. Los resultados se muestran en la figura 4.4. Se demostró que la enzima se comporta de igual forma en ambos casos, liberando ligeramente más azúcares en el jugo crudo homogenizado.



**Figura 4.4. Liberación de azúcares reductores por acción de una inulinasa [22.82 U], sobre jugo homogenizado (azul) y sin sedimentos (rojo) a una temperatura de 60°C.**

Esto presenta la ventaja de que el jugo no tiene que ser centrifugado para realizar la hidrólisis enzimática. Al inicio del experimento se tiene una concentración de azúcares reductores de entre 30 y 33 g·L<sup>-1</sup> debido a la presencia de azúcares simples (glucosa y fructosa) en el jugo. Durante los siguientes 30 minutos se observa un incremento de la concentración de azúcares reductores debido a la hidrólisis de los fructanos presentes en el jugo llegando a una concentración máxima de aproximadamente 60 g·L<sup>-1</sup> y se mantiene constante hasta el final del experimento.

#### 4.4.3. Efecto de la temperatura sobre la liberación de azúcares reductores en el jugo de henequén

Con base a las recomendaciones de las hojas de seguridad enviadas por el fabricante de la enzima y lo reportado por Díaz *et al* y Rocha *et al* [22,71] quienes trabajaron con la misma enzima, se realizaron ensayos con tres temperaturas con el fin de determinar la más adecuada para llevar a cabo la hidrólisis enzimática.

En este estudio se evaluaron temperaturas de 50, 55 y 60 °C a 150 rpm. Debido a que los ensayos enzimáticos se realizaron con dos lotes de jugo diferentes (Ver capítulo 3.3.), los resultados de los ensayos a temperaturas de 55 y 60 °C se muestran en la figura 4.5. A., y los resultados del experimento a la temperatura de 50°C se muestran en la figura 4.5.B.

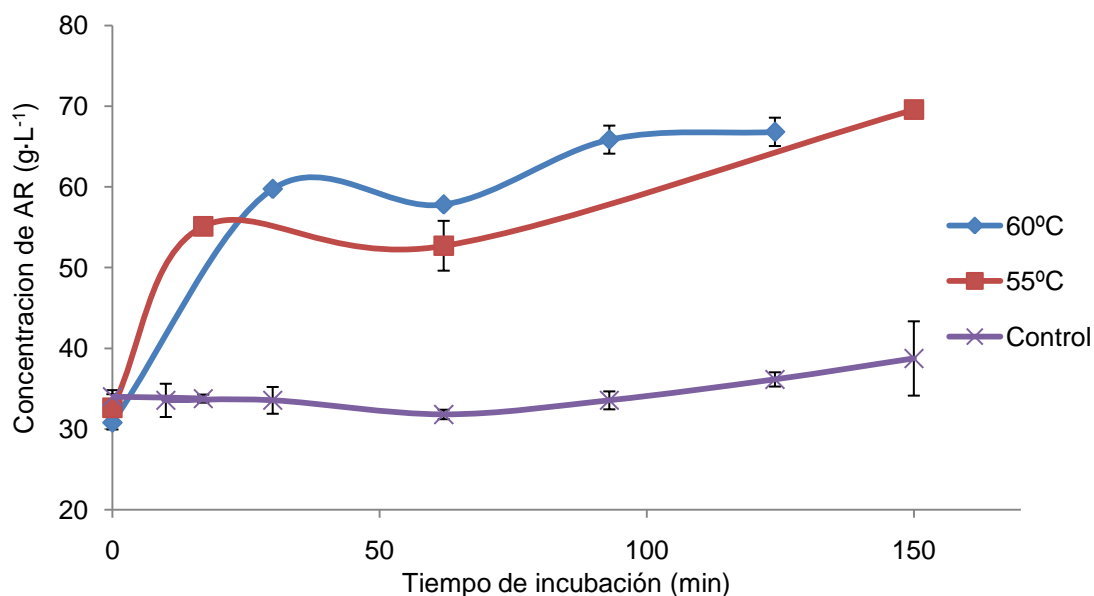
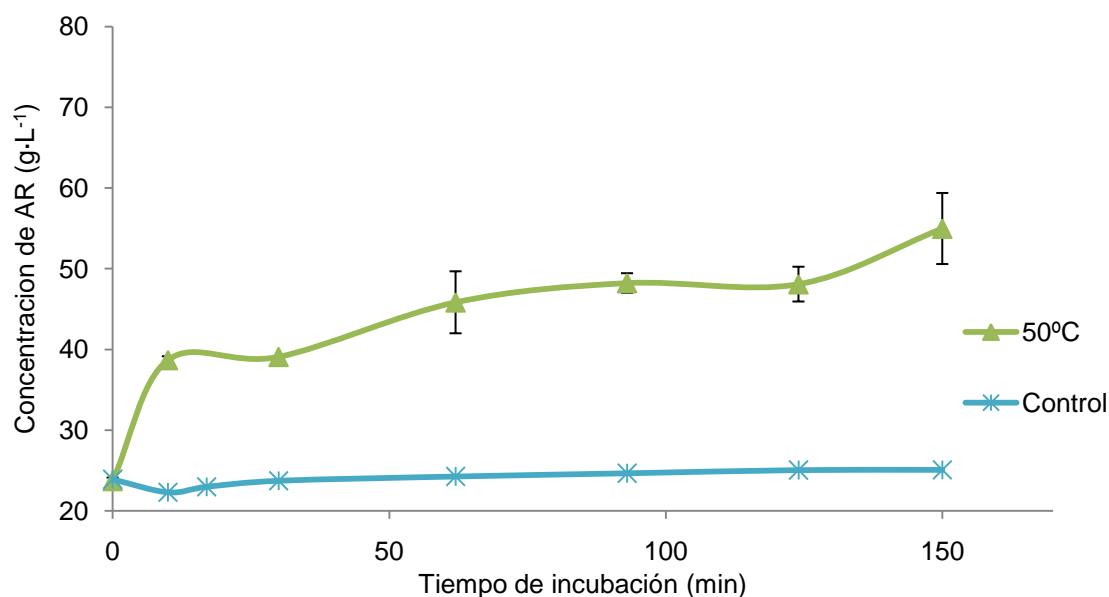


Figura 4.5. A. Liberación de azúcares reductores en el tratamiento con inulinasa [22.82 U] a temperaturas de 55 y 60 °C a 150 rpm.



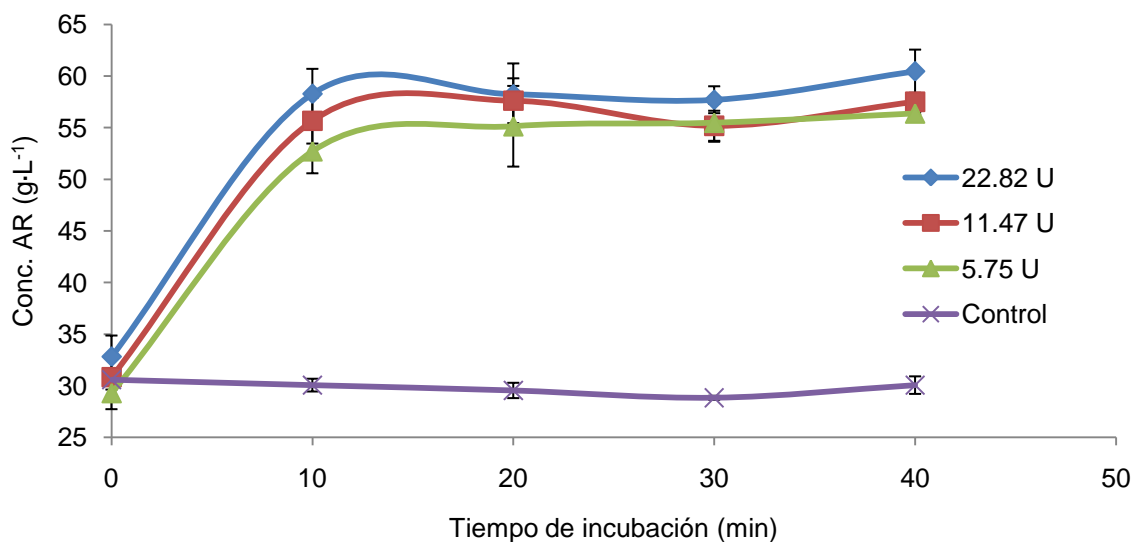
**Figura 4.5. B. Liberación de azúcares reductores en el tratamiento con inulinasa [22.82 U] a una temperatura de 50°C a 150 rpm.**

En el tratamiento a 60°C durante los 30 primeros minutos se liberó el 80% de los azúcares; luego se fueron liberando lentamente hasta llegar al 100% (36.01 g·L<sup>-1</sup>) a las 2 h aproximadamente, que sumado a los azúcares reductores que ya estaban originalmente en el jugo, da un total de 66.8 g·L<sup>-1</sup>. A los 62 minutos se presentó una baja de la concentración de los azúcares, posteriormente continuó aumentando hasta el máximo obtenido, el cual se mantuvo constante. Es necesario realizar una repetición del experimento para corroborar este fenómeno. En el caso del tratamiento a 55°C, se presentó una velocidad más rápida de liberación de azúcares reductores, ya que el 60% de los azúcares fueron liberados en 17 minutos. Nuevamente se presentó el fenómeno de disminución de la concentración de los azúcares para posteriormente aumentar lentamente hasta llegar al 100% (34.88 g·L<sup>-1</sup>), que aunado a los azúcares reductores que ya estaban en el jugo da un total de 67.51 g·L<sup>-1</sup>. Con el tratamiento a 50°C, se alcanza a liberar el 49% de los azúcares a los 30 minutos, luego la liberación ocurre lentamente hasta alcanzar el 100% (31.28 g·L<sup>-1</sup>), que aunado a los azúcares reductores que ya estaban en el jugo da un total de 54.97 g·L<sup>-1</sup>. En el control no se observó una liberación de azúcares importante.



#### 4.4.4. Efecto de la cantidad de enzima sobre la liberación azúcares reductores en el jugo de henequén

En el apartado anterior se observó que con las condiciones utilizadas en todos los tratamientos se libera una cantidad similar de azúcares reductores ( $34 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  en promedio). La diferencia en las concentraciones finales de azúcares reductores se debe a que el jugo ya viene con una cierta concentración de azúcares libres (antes de la aplicación de la enzima), por lo tanto, aunque la enzima libere la misma cantidad de azúcares, las concentraciones finales pueden ser diferentes. Como siguiente paso, se estudió el efecto que tiene la cantidad de enzima en la producción de azúcares reductores. Para ello, se utilizaron diferentes cantidades de enzima: 22.82, 11.47 y 5.75 U, a la temperatura de  $60^\circ\text{C}$  y 150 rpm. Los resultados se muestran en la figura 4.6.



**Figura 4.6. Efecto de la cantidad de enzima inulinasa sobre la liberación de azúcares reductores a una temperatura de  $60^\circ\text{C}$  y 150 rpm.**

Los tres ensayos presentaron la misma tendencia en cuanto a la cantidad de azúcares reductores liberados. A los 10 minutos se obtiene la mayor liberación de azúcares reductores luego presentó una tendencia constante. Para experimentos posteriores se decidió utilizar la menor cantidad de enzima (5.75 U) ya que la liberación de azúcares fue similar.

#### 4.5. Curvas de crecimiento

Se realizaron curvas de crecimiento de las levaduras *S. cerevisiae* (Fig. 4.7) y *K. marxianus* (Fig. 4.8), utilizando como sustrato los hidrolizados que se mencionan a continuación:

- De la hidrólisis térmica: calentamiento en autoclave a 121°C, 15 lb-pulg<sup>2</sup>, por 15 minutos.
- De la hidrólisis termoquímica: ácido sulfúrico al 1% con calentamiento a 100 °C durante 30 minutos.
- De la hidrólisis enzimática: a una temperatura de 60°C por 30 minutos a 150 rpm usando una cantidad de enzima de 5.75 U.
- Por último se realizó una curva con jugo crudo homogenizado, en este caso únicamente para *K. marxianus* ya que se observó que era la única que crece en los hidrolizados del jugo de henequén.

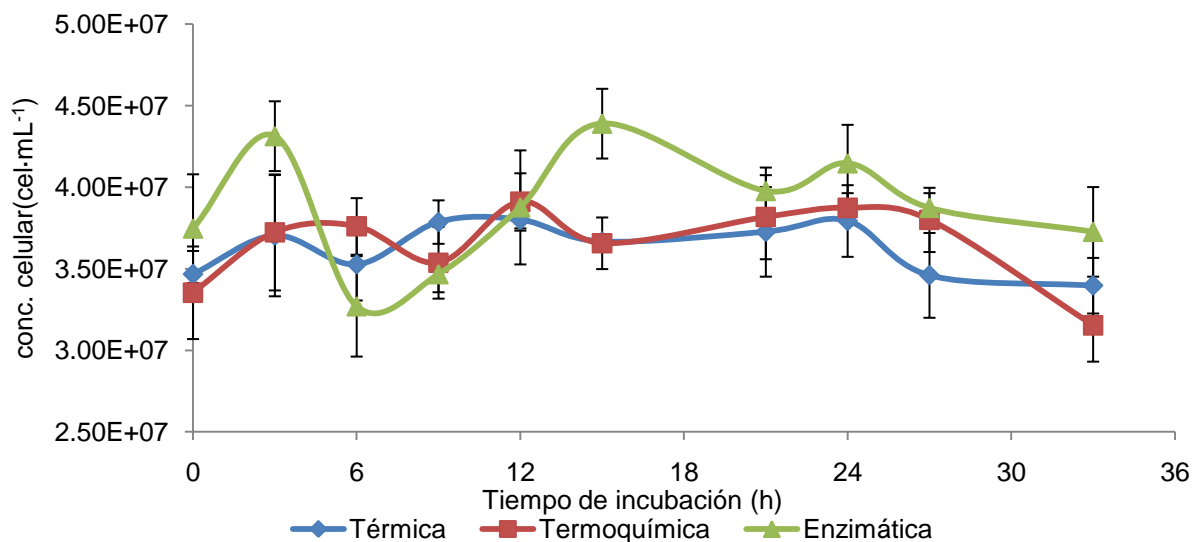


Figura 4.7. Curvas de crecimiento de *S. cerevisiae* en diferentes hidrolizados.

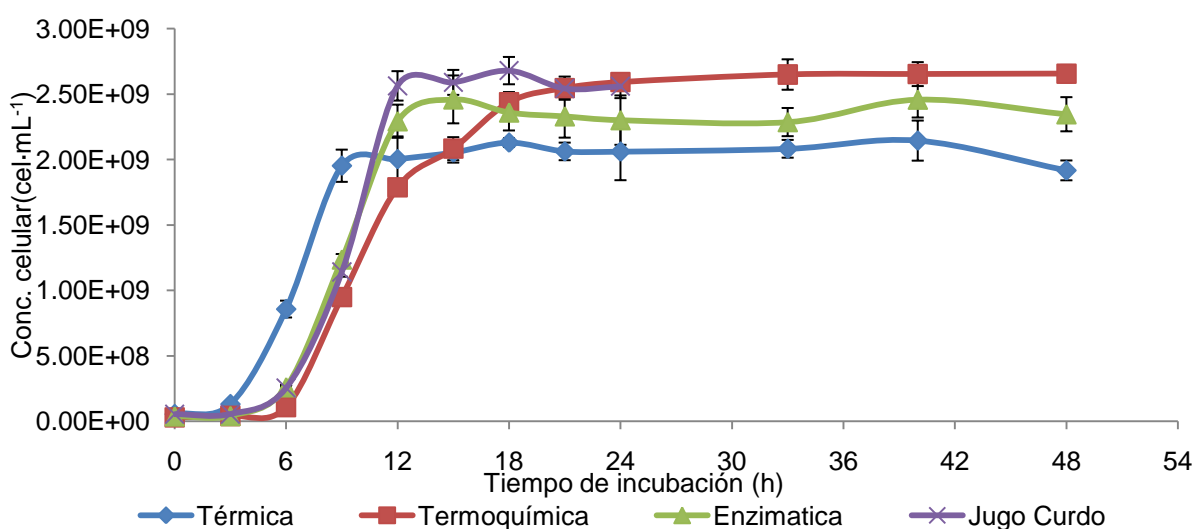
En la figura 4.7 se puede observar que la levadura *S. cerevisiae* no aumentó significativamente su concentración celular durante el tiempo de incubación. También se observó que pasadas las 24 h de incubación, en los hidrolizados empezaron a proliferar bacterias, lo cual nos indica que la levadura no logró adaptarse y crecer en los hidrolizados de jugo de henequén.

Esto podría deberse a que el jugo puede contener compuestos que inhiben el crecimiento de *S. cerevisiae*, tales como saponinas, triterpenoides glicosilados y alcaloides esteroideos. Cira *et al* [72], evaluaron cepas de *S. cerevisiae* silvestres y genéticamente modificadas con el gen de la tomatinasa de *Fusarium oxysporum*, la cual es una enzima que hidroliza la  $\alpha$ -tomatina, una saponina de tipo glicoalcaloide esteroideal. En base a sus resultados, estos autores concluyeron que las levaduras recombinantes lograron crecer en jugo de agave y fermentarlo porque removieron las saponinas presentes, mientras que la cepa no recombinante no logró desarrollarse en ese sustrato. Algo similar podría estar sucediendo en el presente trabajo en cuanto a la falta de crecimiento de la *S. cerevisiae*. Al ser una levadura comercial enfocada a la producción de cerveza o vino, no cuenta con las enzimas necesarias para degradar los compuestos inhibidores presentes en el jugo de henequén.

En trabajos relacionados, Larqué *et al* [73] publicaron una patente (MX 219235) donde utilizando la levadura *S. cerevisiae* llevaron a cabo una fermentación alcohólica, y la principal diferencia radica en los tiempos de calentamiento en autoclave (de 5 a 7 h para las piñas y de 75 a 90 minutos para el jugo de hojas de henequén). Es probable que los tiempos empleados en la patente fueran suficientes para lograr la degradación de saponinas en el jugo, permitiendo el crecimiento de *S. cerevisiae*. En el presente estudio, el tiempo máximo de hidrólisis en autoclave fue de 15 min, el cual podría ser insuficiente para hidrolizar dichos compuestos.

Otros autores como Fiore *et al* [74] compararon especies de *S. cerevisiae* aisladas de mostos de *A. tequilana*, *A. cupreata* y *Aglianico vulture* (uva roja). Los resultados mostraron que todas las cepas aisladas de agaves tienen mayor resistencia a las concentraciones de SO<sub>2</sub> y que las levaduras No-*Saccharomyces* de agave fueron más resistentes al etanol. También resaltan que la cepa de *S. cerevisiae* procedente de

mostos de uva, al ser introducidas a un sustrato ajeno (de donde no fue aislada) no presenta actividad de  $\beta$ -glucosidasa. En contraste, las cepas *S. cerevisiae* procedentes de mostos de agave al ser introducidas en sustratos diferentes de donde fueron aisladas, si presentan actividad enzimática en la mayoría de los casos. Los autores resaltan que la biodiversidad encontrada a nivel de cepa confirma la importancia de determinar el potencial de las levaduras silvestres en la producción industrial de bebidas como el tequila, el vino y la cerveza, donde la tendencia esta cada vez más dirigida a la selección y el uso de levaduras específicas para producciones específicas.



**Figura 4.8. Curvas de crecimiento de *K. marxianus* en diferentes hidrolizados.**

En la figura 4.8 se pueden observar las cinéticas de crecimiento de la levadura *K. marxianus* en los diferentes hidrolizados. En todos los casos la concentración celular del inóculo fue de  $3 \times 10^7$  cel·mL<sup>-1</sup> (Ver capítulo 3.8). A continuación se explica cada curva de crecimiento de los hidrolizados:

- Hidrolizado térmico: La fase lag tuvo una duración de 3 h, seguida por una fase de crecimiento exponencial de 6 h, finalmente la fase estacionaria se mantuvo constante llegando a una densidad celular de  $2 \times 10^9$  cel·mL<sup>-1</sup>.

- Hidrolizado termoquímico: La fase lag duró 6 h, seguida por la fase de crecimiento exponencial de 6 h, posterior a ello sigue incrementado su población durante 6 h aunque de forma lenta, seguido por último de la fase estacionaria, y manteniéndose constante, llegando a una densidad celular de  $2.5 \times 10^9$  cel·mL<sup>-1</sup>.
- Hidrolizado enzimático: Se observó una fase lag de 6 h, seguida por 6 h de fase exponencial y por último la fase estacionaria; se obtuvo una densidad celular de  $2.3 \times 10^9$  cel·mL<sup>-1</sup>.
- Jugo crudo: Se observó una fase lag de 6 h, seguida por 6 h de fase exponencial y por último la fase estacionaria; se obtuvo una densidad celular de  $2.5 \times 10^9$  cel·mL<sup>-1</sup>.

En las curvas de crecimiento no se presentan los datos de la fase de muerte debido a que la curva de crecimiento en el jugo hidrolizado térmicamente (primer experimento de curvas de crecimiento) se extendió hasta 150 h y no se observó muerte celular. Sin embargo, cabe aclarar que dentro de los objetivos del trabajo no es relevante determinar la fase de muerte del microorganismo.

A diferencia de *S. cerevisiae*, la cepa *K. marxianus* no presentó ninguna complicación durante el tiempo de incubación en los hidrolizados. Es probable que *K. marxianus* al ser una levadura autóctona del henequén ya esté adaptada a los compuestos presentes y sea capaz de producir las enzimas necesarias para su sobrevivencia, lo cual facilitó su desarrollo en todos los hidrolizados del jugo de henequén así como en el jugo crudo. A partir de sus resultados, Tzec Gamboa [75] concluyó que los aislados autóctonos del jugo y hojas de henequén mostraron una mejor adaptación al mosto que un aislado alóctono de *S. cerevisiae* evaluado, el cual requirió del triple del tiempo para adaptarse a las condiciones de temperatura, pH y los nutrientes del mosto.

Es importante considerar que *K. marxianus* es una especie predominante durante la fermentación espontánea de mostos de henequén [76] y también ha sido identificada por autores como Escalante-Minakata y Verdugo *et al* [77,78] como la responsable de realizar la fermentación de los mostos de *A. salmiana*, en los que no se ha detectado la presencia

de *S. cerevisiae*. Por lo general la presencia de *S. cerevisiae* en mostos de agave se debe a la introducción y adaptación de esta levadura.

Cáceres *et al.* [7] demostraron que la levadura *S. cerevisiae* puede crecer en mezclas de jugo de henequén y melaza, lo que indica que al estar diluidos los componentes del jugo ya no tienen efecto negativo sobre ella; además puede crecer a expensas de la melaza que es un sustrato idóneo para *S. cerevisiae*.

La levadura *S. cerevisiae* comercial que se empleó en el presente trabajo fue aislada de vino, lo que puede explicar que no está adaptada al jugo de henequén, sustrato que contiene una gran cantidad de sustancias tóxicas e inhibitorias para ella.

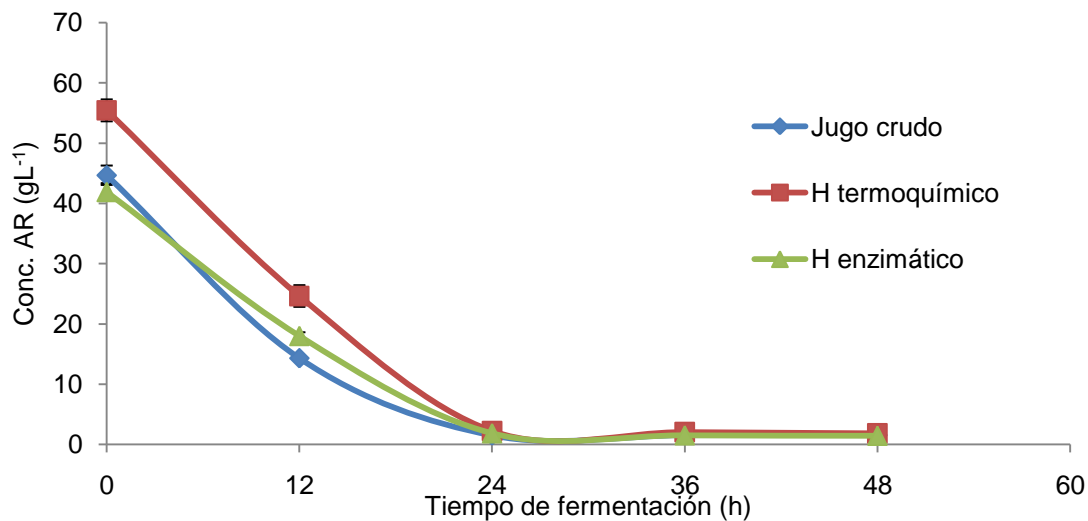
Actualmente en el mundo existe la tendencia de realizar las fermentaciones de los diversos sustratos con cepas aisladas de las fermentaciones espontáneas de dichos sustratos, ya que estas estarán adaptadas al sistema y no requerirán de una fase previa de adaptación al mismo, o ésta será muy corta.

## **4.6. Fermentaciones**

### **4.6.1. Consumo de azúcares**

Habiendo determinado que los hidrolizados termoquímicos y enzimáticos son los que liberan las mayores cantidades de azúcares reductores (73.13 y 56.36 g·L<sup>-1</sup> respectivamente) y que la levadura *K. marxianus* es la única que logró crecer en ellos, se decidió utilizar estos sustratos para realizar las fermentaciones alcohólicas. La primera fermentación se llevó a cabo con un hidrolizado enzimático.

Se determinó que el rendimiento de etanol más alto (80 % del teórico) se produce a las 48 h de fermentación (y se mantiene hasta las 72 h) aunque el consumo máximo de azúcares fermentables se obtuvo a las 24 h. A partir de estos datos las siguientes fermentaciones se llevaron a cabo durante 48 h. En ellas se empleó el jugo crudo (sin ningún tratamiento, como control) y los hidrolizados termoquímicos. En la figura 4.9 se muestra el perfil de consumo de azúcares reductores durante las fermentaciones.



**Figura 4.9. Consumo de azúcares reductores por *K. marxianus* en las fermentaciones de los hidrolizados (termoquímico y enzimático) y el jugo crudo homogenizado.**

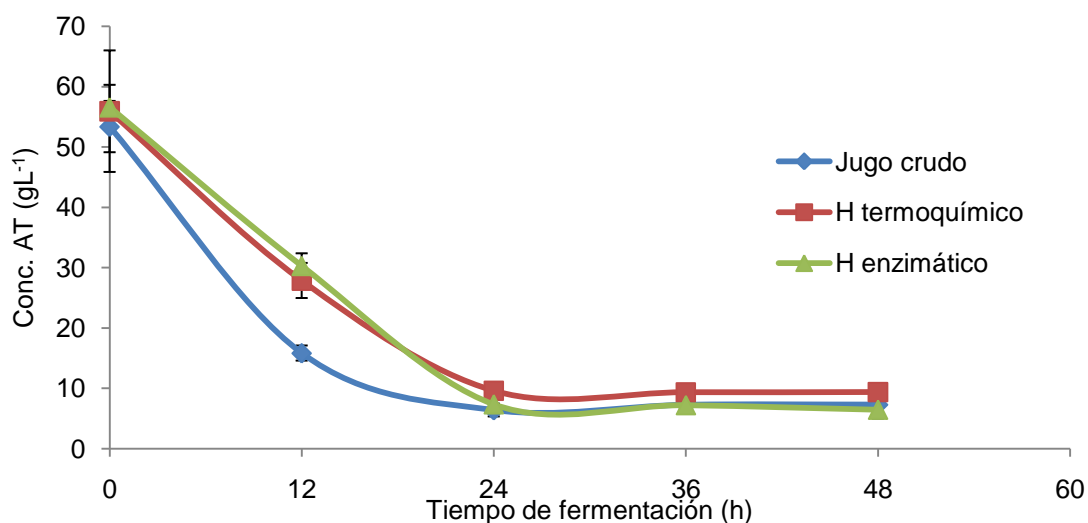
Los patrones de consumo de azúcares reductores por la levadura *K. marxianus* son similares en las tres fermentaciones. Aunque al principio de la fermentación tienen diferentes concentraciones de azúcares reductores, en todos los casos, a las 24 h llegan a ser entre 2 y 3 g·L<sup>-1</sup> que es la cantidad mínima que se mantiene constante hasta concluir la fermentación a las 48 h. Esto indica que los microorganismos ya no están consumiendo azúcares.

Diversos autores como Shen *et al* [79] y Laopaiboon *et al* [80] demostraron que a pesar de obtener rendimientos de etanol del 70 al 90% al final de la fermentación del jugo de sorgo dulce, quedan azúcares residuales que no se fermentaron. Las concentraciones de éstos oscilan entre 1.1 y 3 g·L<sup>-1</sup>. En ambos reportes consideraron que las cantidades de azúcares residuales no son significativas y no los identificaron.

En un estudio realizado por Breisha [66] se logró consumir el 100% de los azúcares presentes en el sustrato (una concentración de 35 % de sacarosa), por medio de una metodología de fermentación donde se agregó del 3 al 6 % de inóculo, aireación durante las primeras 12 h de fermentación y adición de tiamina y nitrógeno al medio, logrando

producir una concentración de etanol del 16% (v/v) lo cual representa el máximo teórico que pueden producir la levaduras [66].

En la figura 4.10 se muestran las curvas de consumo de los azúcares totales durante las 48 h de fermentación. De forma similar a los reductores, el consumo de AT termina a las 24 h de fermentación, al final se mantienen concentraciones entre 7 y 10 g·L<sup>-1</sup> de AT.

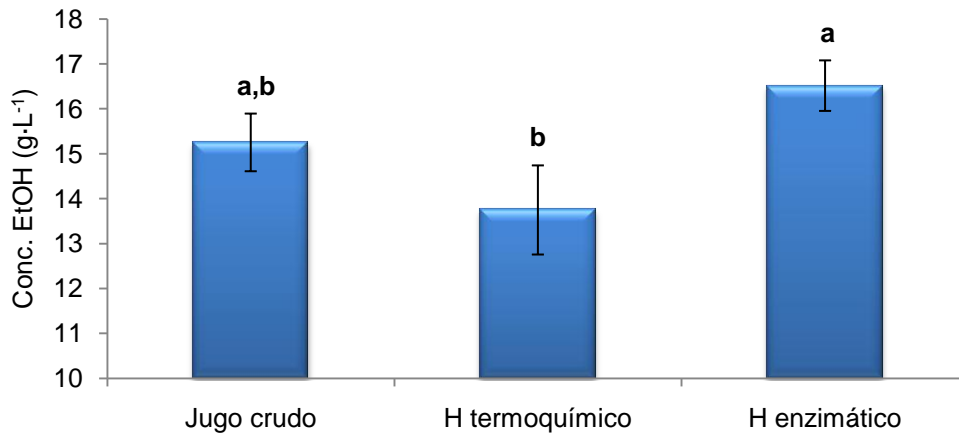


**Figura 4.10. Consumo de azúcares totales por la cepa *K. marxianus* en las fermentaciones de los hidrolizados (térmico y enzimático) y el jugo crudo homogenizado.**

#### 4.6.2. Determinación de etanol

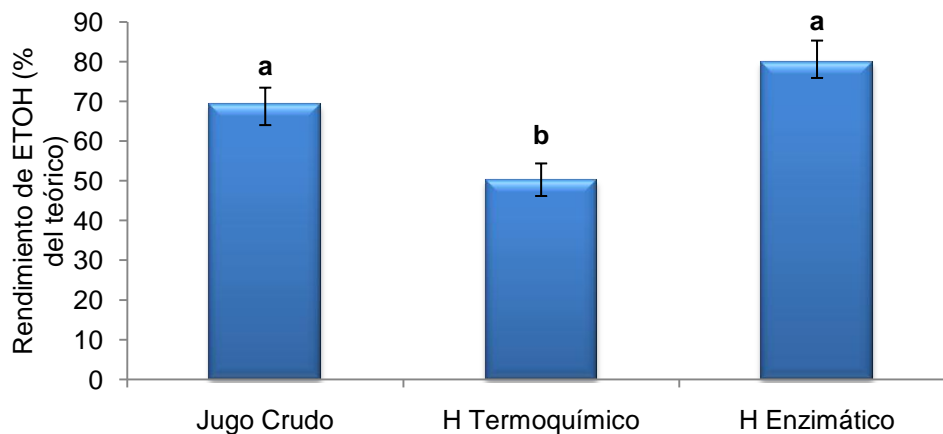
La figura 4.11 muestra la concentración de etanol en los destilados obtenidos de las fermentaciones con los diferentes sustratos (15.25, 13.74 y 16.51 g·L<sup>-1</sup> para el jugo crudo, hidrolizado termoquímico e hidrolizado enzimático, respectivamente).





**Figura 4.11. Concentración de etanol de los destilados obtenidos a partir de jugo crudo, hidrolizado termoquímico, e hidrolizado enzimático, después de fermentar durante 48h. Letras diferentes indican diferencia significativa (ANOVA simple, prueba de Tuckey HSD,  $P < 0.05$ )**

El análisis estadístico (Anexo 4) demostró que el hidrolizado termoquímico obtuvo una menor concentración de etanol comparado con el hidrolizado enzimático. En la figura 4.12 se presenta el rendimiento de etanol en base al teórico de las fermentaciones de los dos hidrolizados y del jugo crudo (sin tratamiento).

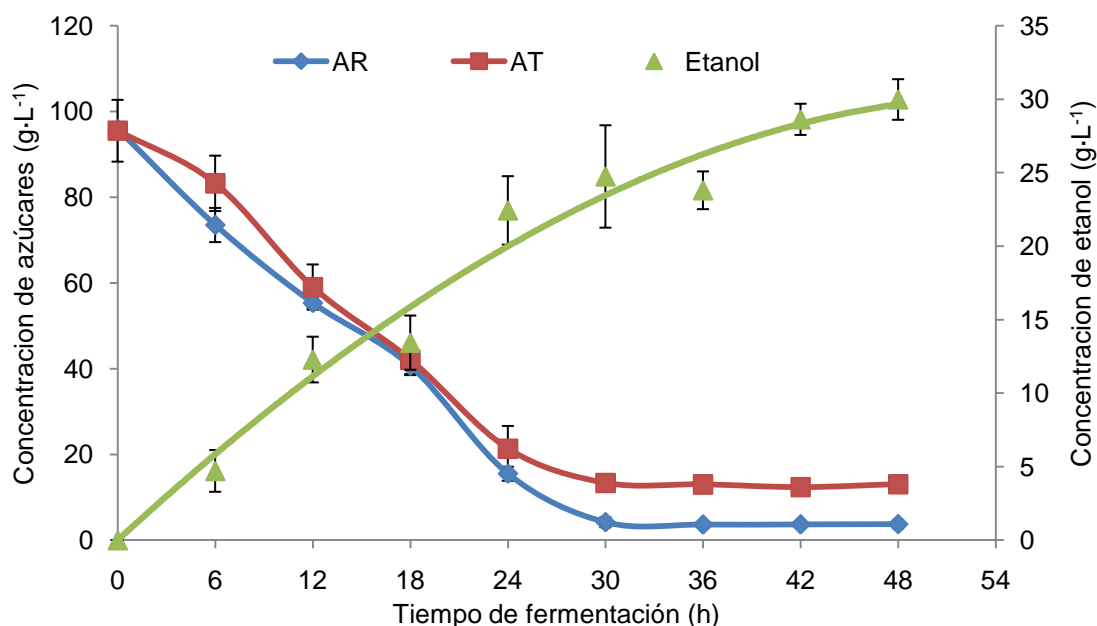


**Figura 4.12. Porcentaje de rendimiento de etanol en base al teórico del jugo crudo y de los hidrolizados termoquímicos e hidrolizados enzimáticos, después de fermentar por 48 h. Letras diferentes indican diferencia significativa (ANOVA simple, prueba de Tuckey HSD,  $P < 0.05$ )**

Se puede observar que las fermentaciones con el hidrolizado enzimático, termoquímico y el jugo sin tratamiento presentaron rendimientos de etanol en base al teórico de: 80.04, 50.30 y 69.35 % respectivamente, siendo la hidrólisis enzimática y el jugo crudo estadísticamente iguales (Anexo 5). Tzec-Gamboa [75] obtuvo un rendimiento de etanol del 81.21% del teórico cuando fermentó mosto de piñas de henequén con *K. marxianus*.

#### 4.6.3. Curva de producción de etanol

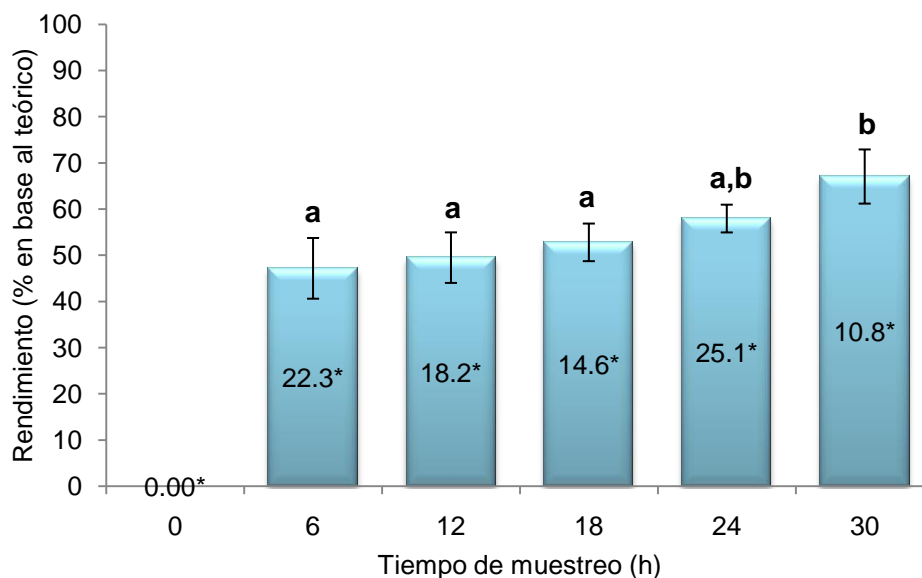
Se llevó a cabo una fermentación para poder determinar el aumento de la concentración de etanol durante la misma. Para ello, se utilizó jugo del cuarto corte, el cual tuvo una mayor concentración de sólidos solubles en comparación a las otras muestras previamente evaluadas (Tabla 4.1). En la figura 4.13 se observa que la concentración promedio inicial de azúcares, tanto reductores como totales, es de  $95 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  después de la hidrólisis enzimática. Después de 30 h, se obtuvieron concentraciones promedio de  $4.1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  de azúcares reductores y de  $13 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  de azúcares totales, manteniéndose constantes hasta el final de la fermentación.



**Figura 4.13. Análisis del consumo de azúcares reductores y totales, producción de etanol durante la fermentación de matraz terminal del jugo hidrolizado enzimáticamente.**

Es importante considerar que el jugo utilizado en este experimento presentó una alta concentración de sólidos solubles (14°Brix) con respecto a los jugos colectados anteriormente, de la misma manera, presentó mayores concentraciones de azúcares reductores y totales (46.2 y 110.2 g·L<sup>-1</sup> respectivamente) lo que dio como resultado una mayor cantidad de azúcares después de la hidrólisis. A las 6 h de fermentación (primer muestreo) se observó una concentración de etanol de 4.7 g·L<sup>-1</sup> la cual fue aumentando hasta 29.98 g·L<sup>-1</sup> a las 48 h, siendo la concentración más alta de etanol obtenida en este trabajo. Como se observa en la figura 4.13, los azúcares fueron consumidos casi en su totalidad a las 30 h pero el etanol se siguió produciendo hasta las 42 h, esto podría deberse al tiempo que le toma a la levadura transformar los azúcares a etanol, o ser un efecto de acumulación de sustrato por la levadura, la cual al no tenerlo en el medio podría estar consumiendo sus reservas.

Al final de la fermentación se obtuvo un rendimiento del 63.77% del teórico. Este resultado es más bajo que el obtenido en las fermentaciones del apartado anterior, siendo la concentración inicial de los azúcares el único parámetro diferente. Con los valores del consumo de azúcares reductores y de la producción de etanol, se calculó el % de rendimiento del teórico para cada período de muestreo.



**Figura 4.14. Rendimiento de etanol medido en cada muestreo durante la fermentación (% del teórico), \*concentración de azúcares reductores consumidos en cada período (g·L<sup>-1</sup>). Letras diferentes indican diferencia significativa (ANOVA simple, prueba de Tuckey HSD, P<0.05)**

En la Figura 4.14 se puede observar que durante el período en el cual ocurre el mayor consumo de azúcares (30 h), el rendimiento de etanol es del 47 % en base al teórico, el cual estadísticamente se mantiene constante (Anexo 6).

#### 4.7. Estimados de utilización

Se realizó un estimado de la cantidad de etanol que se podría producir bajo las condiciones estudiadas. Según lo reportado por Cáceres-Farfán *et al* [7], anualmente se procesan 250 millones de hojas de henequén y considerando que en este trabajo se obtuvo en promedio 0.750 L de jugo por hoja, se producirían 187.5 millones de L de jugo. Se estima que bajo las mejores condiciones de fermentación se podría producir 0.038 L de etanol a partir de 1 L de jugo. Con estos valores se calcula que se podrían producir 7, 125, 000 L de etanol por año.

En la tabla 4.4 se observa la tendencia que han presentado las ventas de gasolinas (Magna y Premium) durante de los últimos cinco años (2006-2010). A este nivel de consumo, el etanol producido sólo representa el 0.55% del volumen de combustibles tipo gasolina que se consumirían en la ciudad de Mérida, Yucatán, en el año 2010.

**Tabla 4.4. Ventas de gasolina (L) en Mérida, Yucatán, en los últimos cinco años [81].**

Ventas de gasolinas en Mérida (L)	Años				
	2006	2007	2008	2009	2010
Gasolina total	1,123,710,469	1,231,095,460	1,314,417,543	1,248,644,852	1,277,806,589
Magna	908,730,461	1,036,553,638	1,155,022,768	1,137,007,513	1,179,980,843
Premium	214,980,008	194,541,822	159,394,775	111,637,339	97,825,746
Crecimiento total respecto al año anterior		9.56%	6.77%	-5.00%	2.34%
Crecimiento Magna		14.07%	11.43%	-1.56%	3.78%
Crecimiento Premium		-9.51%	-18.07%	-29.96%	-12.37%

## CAPÍTULO V

### CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

#### Conclusiones

El aumento de azúcares reductores, en comparación a sus respectivos controles, fue de 42.8% en la hidrólisis térmica, 85.1% en la hidrólisis termoquímica y de 89% en la hidrólisis enzimática. Debido a que en los experimentos se trabajaron jugos de lotes diferentes resulta más sencilla la comparación en porcentajes para reportar estos resultados. Las ventajas de utilizar un tratamiento enzimático para liberar azúcares radican en las condiciones relativamente suaves utilizadas en el proceso.

La cepa comercial de *S. cerevisiae* (Safoeno) no es la indicada para llevar a cabo la fermentación del jugo de las hojas de henequén debido a que los compuestos presentes en el jugo inhiben su crecimiento y por lo tanto no puede fermentar los azúcares del jugo. En cambio, la cepa de *K. marxianus* aislada originalmente de la base de las hojas del henequén, mostró características adecuadas para ser utilizada en el proceso de fermentación ya que presenta una alta tolerancia a los compuestos tóxicos presentes en el jugo, así como un rendimiento de alcohol similar al reportado en bibliografía.

La cepa *K. marxianus* empleada en este trabajo pudo consumir hasta el 96 % de los azúcares reductores presentes en los hidrolizados (termoquímico y enzimático) y en el jugo crudo.

El mayor rendimiento de etanol en base al teórico fue del 80 %, obtenido de la fermentación del hidrolizado enzimático.

## Recomendaciones

Se requiere llevar a cabo un análisis de la variación del contenido de azúcares en el jugo de las hojas durante las épocas de sequía y lluvias para predecir los rendimientos de alcohol.

Así como en este trabajo se comprobó que la cepa *K. marxianus* es mejor que la cepa comercial de *S. cerevisiae* (Safoeno), se requieren más estudios con diferentes cepas que hayan sido preferentemente aisladas de mostos de agaves para obtener mayores rendimientos de etanol.

Para mejorar el rendimiento de etanol a partir del jugo de henequén, se requiere saber bajo qué condiciones de fermentación el consumo de azúcares por *K. marxianus* produce principalmente etanol. Se requieren estudios de cuantificación de consumo de azúcares, producción de etanol, CO<sub>2</sub> y biomasa.

## BIBLIOGRAFÍA

1. M. Balat; H. Balat, Recent trends in global production and utilization of bio-ethanol fuel, *Appl. Energ.* 86, 2273-2282, 2009.
2. T. Dalgaard; U. Jørgensen; J. E. Olesen; E. S. Jensen; E. S. Kristensen, Looking at Biofuels and Bioenergy, *Sci.* 312, 1743-1744, 2006.
3. R. Purwadi; T. Brandberg; M. Taherzadeh, A Possible Industrial Solution to Ferment Lignocellulosic Hydrolyzate to Ethanol: Continuous Cultivation with Flocculating Yeast, *IJMS* 8, 920-932, 2007.
4. S. C. Davis; F. G. Dohleman; S. P. Long, The global potential for Agave as a biofuel feedstock, *GCB Bioenergy* 3, 68-78, 2011.
5. A. M. Borland; H. Griffiths; J. Hartwell; J. A. C. Smith, Exploiting the potential of plants with crassulacean acid metabolism for bioenergy production on marginal lands, *J. Exp. Bot.* 60, 2879-2896, 2009.
6. A. Magdub-Méndez; A. Larqué-Saavedra; L. Hernández-Terrones; L. A. Rendón-Salcido, El jarabe de henequén, *Rev. Fitotec. Mex* 30, 463-467, 2007.
7. M. Cáceres-Farfán; P. Lappe; A. Larqué-Saavedra; A. Magdub-Méndez; L. Barahona-Pérez, Ethanol production from henequen (*Agave fourcroydes* Lem.) juice and molasses by a mixture of two yeasts, *Bioresour. Technol.* 99, 9036-9039, 2008.
8. A. Eastmond; J. Herrera; M. Robert, *La Biotecnología aplicada al Henequén: Alternativas para el Futuro.* , en *Centro de Investigación Científica de Yucatán.* 2000: México. p. 106.
9. M. B. Roberfroid, Inulin-Type Fructans: Functional Food Ingredients, *J. Nutr.* 137, 2493S-2502, 2007.
10. W. d. R. Ancona Escalante, Cuantificación de fructanos en hojas y tallos de *Agave fourcroydes* Lem., Licenciatura, Instituto Tecnológico de Mérida, México, 2007.
11. H. S. Gentry, *Agaves of continental North America*, University of Arizona Press, Arizona, 1982, 670.
12. N. P. Moreno; M. Escamilla, *Glosario botánico ilustrado*, Instituto Nacional de Investigaciones Sobre Recursos Bióticos, México, 1984, 300.
13. D. Achá; F. Fontúrbel, Las plantas C3, C4 y CAM, *Rev. Est. Biol.* 1, 28-33, 2000.
14. C. Smith; E. Wood, *Biosíntesis*, Addison Wesley Longman, México, 1998, 226.

15. B. Azcón; M. Talón, *Fisiología y bioquímica vegetal*, Interamericana McGraw-Hill, Madrid, 1993,
16. L. Taiz; E. Zeiger, *Plant Physiology*, Sinauer Associates, Incorporated, USA, 2002, 690.
17. J. McMurry, *Química Orgánica*, Thomson, México, 2000, 1030.
18. M. G. Lopez; N. A. Mancilla-Margalli; G. Mendoza-Diaz, Molecular Structures of Fructans from *Agave tequilana* Weber var. azul, *J. Agric. Food Chem.* 51, 7835-7840, 2003.
19. R. I. Ortiz-Basurto; G. Pourcelly; T. Doco; P. Williams; M. Dornier; M.-P. Belleville, Analysis of the Main Components of the Aguamiel Produced by the Maguey-Pulquero (*Agave mapisaga*) throughout the Harvest Period, *J. Agric. Food Chem.* 56, 3682-3687, 2008.
20. N. A. Mancilla-Margalli; M. G. López, Water-Soluble Carbohydrates and Fructan Structure Patterns from *Agave* and *Dasyilirion* Species, *J. Agric. Food Chem.* 54, 7832-7839, 2006.
21. I. A. Franck; L. D. Leenheer, *Inulin*, en *Polysaccharides and Polyamides in the Food Industry: Properties, Production, and Patents*, A. Steinbüchel; S. K. Rhee, Editors. Wiley VCH: Germany. 2005, 1, p. 283-315.
22. E. G. Díaz; R. Catana; B. S. Ferreira; S. Luque; P. Fernandes; J. M. S. Cabral, Towards the development of a membrane reactor for enzymatic inulin hydrolysis, *J. Membr. Sci.* 273, 152-158, 2006.
23. Z. Chi; Z. Chi; T. Zhang; G. Liu; L. Yue, Inulinase-expressing microorganisms and applications of inulinases, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 82, 211-220, 2009.
24. K. Ohta; S. Hamada; T. Nakamura, Production of high concentrations of ethanol from inulin by simultaneous saccharification and fermentation using *Aspergillus niger* and *Saccharomyces cerevisiae*, *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 729-733, 1993.
25. S. Badui, *Química de los alimentos*, Alhambra, México D.F, 1993, 648.
26. P. K. Gill; R. K. Manhas; P. Singh, Comparative analysis of thermostability of extracellular inulinase activity from *Aspergillus fumigatus* with commercially available (Novozyme) inulinase, *Bioresour. Technol.* 97, 355-358, 2006.
27. H. J. Phaff; H. Phaff; M. W. Miller; E. M. Mrak, *The life of yeasts*, Harvard University Press, 1978, 341.



28. C. P. Kurtzman; J. W. Fell, *The yeasts, a taxonomic study*, Elsevier, Amsterdam, 1998,
29. M. T. Madigan; J. M. Martinko; J. Parker; T. D. Brock, *Brock biología de los microorganismos*, Prentice Hall, Madrid, 1997, 986.
30. J. M. Mesas; M. T. Alegre, El papel de los microorganismos en la elaboración del vino, *Cienc. Tecnol Aliment. 2*, 174-183, 1999.
31. K. C. Fugelsang; C. G. Edwards, *Yeasts*, Springer US, 2007, 3-28.
32. M. Cayetano; A. Molina, Evaluación del extracto de remolacha azucarera (*Beta vulgaris*) como sustrato para el crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* en condiciones anaeróbicas con fines de producción de etanol, Licenciatura, Instituto Tecnológico de Sonora, México, 2008.
33. A. P. Gasch; P. T. Spellman; C. M. Kao; O. Carmel-Harel; M. B. Eisen; G. Storz; D. Botstein; P. O. Brown, Genomic Expression Programs in the Response of Yeast Cells to Environmental Changes, *Mol. Biol. Cell* 11, 4241-4257, 2000.
34. M. Ma; Z. Liu, Mechanisms of ethanol tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 87, 829-845, 2010.
35. Z. Liu, Genomic adaptation of ethanologenic yeast to biomass conversion inhibitors, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 73, 27-36, 2006.
36. S. Kajiwara; K. Suga; H. Sone; K. Nakamura, Improved ethanol tolerance of *Saccharomyces cerevisiae* strains by increases in fatty acid unsaturation via metabolic engineering, *Biotechnol. Lett.* 22, 1839-1843, 2000.
37. C. P. Kurtzman; J. W. Fell; T. Boekhout, *The Yeasts: A Taxonomic Study*, Elsevier Science & Technology, USA, 2011, 2354.
38. P. Eraso; J. M. Gancedo, Catabolite repression in yeasts is not associated with low levels of cAMP, *Eur. J. Biochem.* 141, 195-198, 1984.
39. C. A. Viegas; M. F. Rosa; I. Sa-Correia; J. M. Novais, Inhibition of Yeast Growth by Octanoic and Decanoic Acids Produced during Ethanolic Fermentation, *Appl. Environ. Microbiol.* 55, 21-28, 1989.
40. D. B. Hughes; N. J. Tudroszen; C. J. Moye, The effect of temperature on the kinetics of ethanol production by a thermotolerant strain of *Kluyveromyces marxianus*, *Biotechnol. Lett.* 6, 1-6, 1984.
41. P. J. Anderson; K. McNeil; K. Watson, High-Efficiency Carbohydrate Fermentation to Ethanol at Temperatures above 40°C by *Kluyveromyces marxianus* var.

- marxianus* Isolated from Sugar Mills, *Appl. Environ. Microbiol.* 54, 1314-1320, 1986.
42. G. Fonseca; E. Heinzle; C. Wittmann; A. Gombert, The yeast *Kluyveromyces marxianus* and its biotechnological potential, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 79, 339-354, 2008.
  43. A. Margaritis; P. Bajpai, Direct Fermentation of D-Xylose to Ethanol by *Kluyveromyces marxianus* Strains, *Appl. Environ. Microbiol.* 44, 1039-1041, 1982.
  44. A. Margaritis; P. Bajpai, Effect of Sugar Concentration in Jerusalem Artichoke Extract on *Kluyveromyces marxianus* Growth and Ethanol Production, *Appl. Environ. Microbiol.* 45, 723-725, 1983.
  45. R. J. Rouwenhorst; M. Hensing; J. Verbakel; W. A. Scheffers; J. P. van Duken, Structure and properties of the extracellular inulinase of *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556, *Appl. Environ. Microbiol.* 56, 3337-3345, 1990.
  46. R. J. Rouwenhorst; W. S. Ritmeester; W. A. Scheffers; J. P. Van Dijken, Localization of inulinase and invertase in *Kluyveromyces* species, *Appl. Environ. Microbiol.* 56, 3329-3336, 1990.
  47. R. J. Rouwenhorst; L. E. Visser; A. A. Van Der Baan; W. A. Scheffers; J. P. Van Dijken, Production, Distribution, and Kinetic Properties of Inulinase in Continuous Cultures of *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556, *Appl. Environ. Microbiol.* 54, 1131-1137, 1988.
  48. W. E. Workman; D. F. Day, The cell wall-associated inulinase of *Kluyveromyces fragilis*, *Antonie Van Leeuwenhoek* 50, 349-353, 1984.
  49. M. Bacci Júnior; C. Siqueira; S. Antoniazzi; J. Ueta, Location of the  $\beta$ -galactosidase of the yeast *Kluyveromyces marxianus* var. *marxianus* ATCC 10022, *Antonie Van Leeuwenhoek* 69, 357-361, 1996.
  50. D. Brady; R. Marchant; L. Mchale; M. Anthony, Isolation and partial characterization of  $\beta$ -galactosidase activity produced by a thermotolerant strain of *Kluyveromyces marxianus* during growth on lactose containing media, *Enzyme Microb. Technol.* 17, 696-699, 1995.
  51. J. A. Goncalves; F. J. Castillo, Partial Purification and Characterization of  $\beta$ -D-Galactosidase from *Kluyveromyces marxianus*, *J. Dairy Sci.* 65, 2088-2094, 1982.

52. R. R. Mahoney; T. A. Nickerson; J. R. Whitaker, Selection of Strain, Growth Conditions, and Extraction Procedures for Optimum Production of Lactase from *Kluyveromyces fragilis*, *J. Dairy Sci.* 58, 1620-1629, 1975.
53. D. B. G. Martins; C. G. de Souza Jr; D. A. Simões; M. A. de Morais Jr, The  $\beta$ -Galactosidase Activity in *Kluyveromyces marxianus* CBS6556 Decreases by High Concentrations of Galactose, *Curr. Microbiol.* 44, 379-382, 2002.
54. A. Raynal; M. Guerineau, Cloning and expression of the structural gene for  $\beta$ -glucosidase of *Kluyveromyces fragilis* in *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae*, *Molecular and General Genetics MGG* 195, 108-115, 1984.
55. M. Leclerc; P. Chemardin; A. Arnaud; R. Ratomahenina; P. Galzy; C. Gerbaud; A. Raynal; M. Guerineau, Comparison of the Properties of the Purified Beta-Glucosidase from the Transformed Strain of *Saccharomyces cerevisiae* TYKF2 with that of the Donor Strain *Kluyveromyces fragilis* Y610, *Biotechnol. Appl. Biochem.* 9, 410-422, 1987.
56. J. Jia; A. Wheals, Endopolygalacturonase genes and enzymes from *Saccharomyces cerevisiae* and *Kluyveromyces marxianus*, *Curr. Genet.* 38, 264-270, 2000.
57. P. Jolivet; E. Bergeron; H. Benyair; J.-C. Meunier, Characterization of major protein phosphatases from selected species of *Kluyveromyces*. Comparison with protein phosphatases from *Yarrowia lipolytica*, *Can. J. Microbiol.* 47, 861-870, 2001.
58. -Zavala; Y. Mercado-Flores - ; L. Villa-Tanaca, Purification and characterization of a serine carboxypeptidase from *Kluyveromyces marxianus*, *Int. J. Food Microbiol.* 91, 245-252, 2004.
59. A. Pumarola; A. Busquets, *Microbiología y parasitología médica*, Masson, España, 1995, 916.
60. H. H. M. Villafañe, *Microbiología básica para el área de la salud y afines.*, Universidad de Antioquia, 2008, 300.
61. C. M. Drapcho; N. Phu Nhuan; T. H. Walker, *Biofuels Engineering Process Technology*, McGraw-Hill, New York, 2008,
62. R. H. Herman; D. Zakim, Fructose Metabolism: V. Catalytically Coupled Reactions, *Am. J. Clin. Nutr.* 21, 778-780, 1968.
63. D. Pérez-Brito; R. Tapia-Tussell; A. Quijano-Ramayo; A. Larqué-Saavedra; P. Lappe, Molecular Characterization of *Kluyveromyces marxianus* Strains Isolated

- from *Agave fourcroydes* (Lem.) in Yucatan, Mexico, *Mol. Biotechnol.* 37, 181-186, 2007.
64. G. L. Miller, Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar, *Anal. Chem.* 31, 426-428, 1959.
  65. M. DuBois; K. A. Gilles; J. K. Hamilton; P. A. Rebers; F. Smith, Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances, *Anal. Chem.* 28, 350-356, 1956.
  66. G. Z. Breisha, Production of 16% ethanol from 35% sucrose, *Biomass Bioenerg* 34, 1243-1249, 2010.
  67. M. B. Williams; H. D. Reese, Colorimetric Determination of Ethyl Alcohol, *Anal. Chem.* 22, 1556-1561, 1950.
  68. M. A. García-Albornoz, Determinación y caracterización de fructanos provenientes de Henequén (*Agave fourcroydes* Lem.), Maestría, Centro de Investigación Científica de Yucatán A.C, México, 2006.
  69. R. d. C. Gómez Ayala; C. Jacques; J. A. Ramírez de León. *Extracción de la inulina y azúcares del agave con métodos químicos.* in *V Congreso regional en ciencias de los alimentos.* 2003. Monterrey.
  70. K. Karimi; S. Kheradmandinia; M. J. Taherzadeh, Conversion of rice straw to sugars by dilute-acid hydrolysis, *Biomass Bioenerg* 30, 247-253, 2006.
  71. J. R. Rocha; R. Catana; B. S. Ferreira; J. M. S. Cabral; P. Fernandes, Design and characterisation of an enzyme system for inulin hydrolysis, *Food Chem.* 95, 77-82, 2006.
  72. L. Cira; G. González; J. Torres; C. Pelayo; M. Gutiérrez; J. Ramírez, Heterologous expression of *Fusarium oxysporum* tomatinase in *Saccharomyces cerevisiae* increases its resistance to saponins and improves ethanol production during the fermentation of *Agave tequilana* Weber var. azul and *Agave salmiana* must., *Antonie Van Leeuwenhoek* 93, 259-266, 2008.
  73. A. Larqué; A. Magdub; M. Cáceres, Mexico MX 219235, 2004.
  74. C. Fiore; J. Arrizon; A. Gschaedler; J. Flores; P. Romano, Comparison between Yeasts from Grape and Agave Musts for Traits of Technological interest, *World J. Microbiol. Biotechnol.* 21, 1141-1147, 2005.

75. M. d. C. Tzec Gamboa, Evaluación de levaduras aisladas de mostos de henequén (*Agave fourcroydes*) para la producción de una bebida alcoholica, Maestría, Centro de Investigación Científica de Yucatán, Mérida, 2006.
76. P. Lappe-Oliveras; R. Moreno-Terrazas; J. Arrizón-Gaviño; T. Herrera-Suárez; A. García-Mendoza; A. Gschaedler-Mathis, Yeasts associated with the production of Mexican alcoholic nondistilled and distilled Agave beverages, *FEMS Yeast Res.* 8, 1037-1052, 2008.
77. P. Escalante-Minakata; H. P. Blaschek; A. P. Barba de la Rosa; L. Santos; A. De León-Rodríguez, Identification of yeast and bacteria involved in the mezcal fermentation of *Agave salmiana*, *Lett. Appl. Microbiol.* 46, 626-630, 2008.
78. A. Verdugo Valdez; L. Segura Garcia; M. Kirchmayr; P. Ramírez Rodríguez; A. González Esquinca; R. Coria; A. Gschaedler Mathis, Yeast communities associated with artisanal mezcal fermentations from *Agave salmiana*, *Antonie Van Leeuwenhoek* 1-10, 2011.
79. F. Shen; R. Liu; T. Wang, Effects of Temperature, pH, Agitation and Particles Stuffing Rate on Fermentation of Sorghum Stalk Juice to Ethanol, *Energy Source Part A* 31, 646-656, 2009.
80. L. Laopaiboon; P. Thanonkeo; P. Jaisil; P. Laopaiboon, Ethanol production from sweet sorghum juice in batch and fed-batch fermentations by *Saccharomyces cerevisiae*, *World J. Microbiol. Biotechnol.* 23, 1497-1501, 2007.
81. Pemex, *Estadísticas de ventas de petrolíferos*, en *Secretaría de Energía*. 2010, Sistema de Informacion Energetica.

## ANEXOS

### Anexo 1. Análisis de azúcares reductores, totales y etanol

#### Azúcares reductores

La curva de calibración de azúcares reductores se obtuvo graficando el promedio de las absorbancias (de tres repeticiones) y las concentraciones probadas. Se utilizó glucosa como estándar.

#### Preparación del reactivo de DNS y determinación de azúcares reductores.

##### Reactivo de DNS

Se requieren los siguientes reactivos en su orden respectivo:

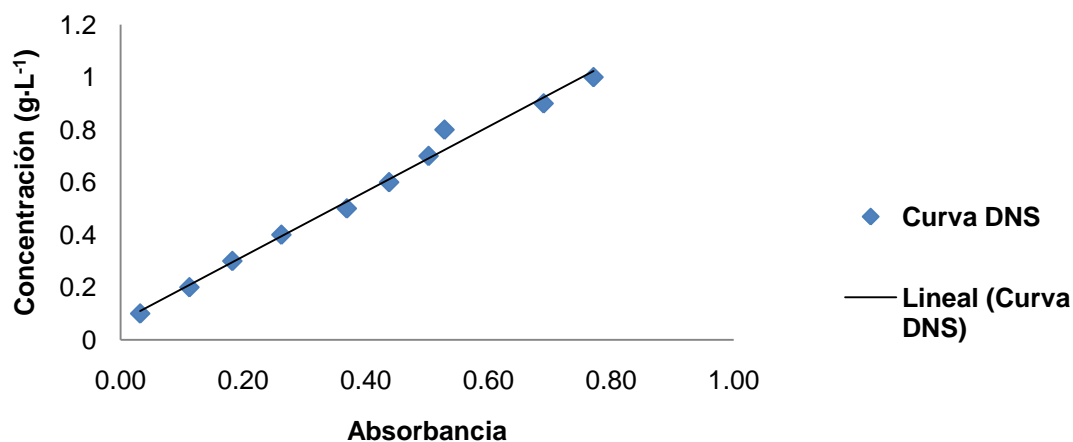
- Tartrato de sodio y potasio  $200 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$
- Fenol  $2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$
- Meta bisulfito de sodio  $0.5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$
- Hidróxido de sodio  $10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$
- DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico)  $10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$

Disolver los reactivos en 600 mL de agua destilada, al final agregar el DNS poco a poco hasta lograr una completa disolución, aforar a un litro.

Para determinar los azúcares reductores se añaden 1.5 mL de la solución DNS a 0.5 mL de la solución problema (jugo crudo homogenizado o jugo hidrolizado), se agita y se coloca en un baño María a punto de ebullición durante 15 minutos, se enfría a temperatura ambiente y se agregan 8 mL de agua destilada, se agita y se lee en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 550 nm. Esto se realiza por triplicado. La cantidad de azúcares reductores se obtiene al comparar la el promedio de las lecturas absorbancia obtenidas con una curva de calibración. Curva de calibración de dextrosa: Se obtiene al graficar la absorbancia de soluciones de dextrosa con un rango de concentración  $0.1$  a  $1.0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  contra concentración.

**Tabla A 1. Absorbancias de las muestras a 550 nm.**

Conc. (g·L <sup>-1</sup> )	R1	R2	R3	Absorbancia promedio
0.1	0.035	0.031	0.03	0.03
0.2	0.116	0.113	0.108	0.11
0.3	0.191	0.182	0.174	0.18
0.4	0.276	0.252	0.259	0.26
0.5	0.351	0.383	0.373	0.37
0.6	0.446	0.436	0.432	0.44
0.7	0.526	0.491	0.49	0.50
0.8	0.502	0.509	0.574	0.53
0.9	0.697	0.66	0.713	0.69
1	0.813	0.7	0.801	0.77



**Figura A 1. Curva de calibración de azúcares reductores a 550 nm.**

La curva de calibración de azúcares reductores tuvo un nivel de significancia  $R^2 = 0.9902$  y su regresión lineal presentó la ecuación . Esta ecuación se utilizó para determinar la concentración de azúcares reductores de las muestras.

## Azúcares totales

La curva de calibración de azúcares totales se obtuvo graficando el promedio de las absorbancias (de tres repeticiones) y las concentraciones probadas. Se utilizó sacarosa como estándar.

## Determinación de azúcares totales por el método del fenol-sulfúrico

Se requieren los siguientes reactivos:

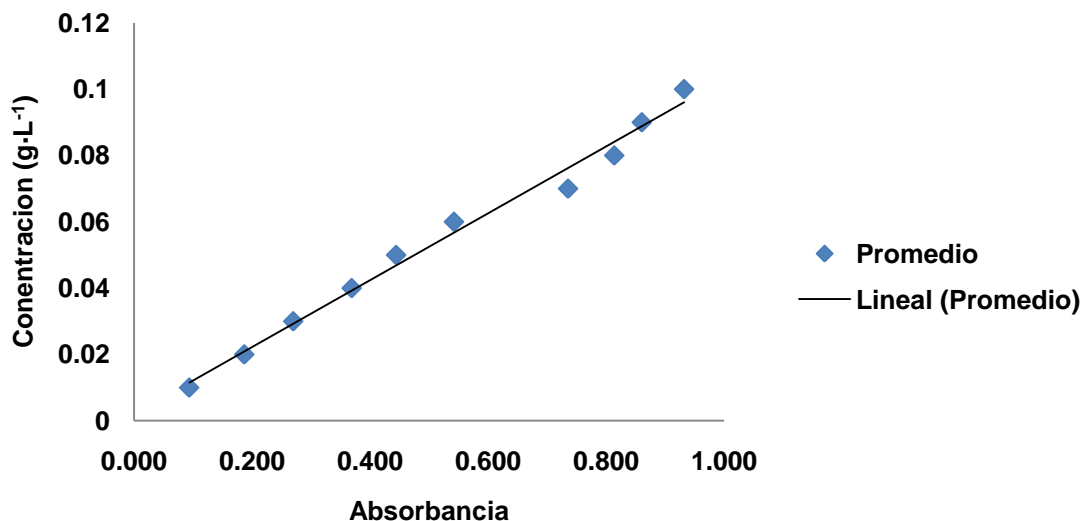
- Ácido sulfúrico concentrado (97.5 %)
- Solución de fenol (5 %)

A 1 mL de solución problema (jugo crudo homogenizado o jugo hidrolizado) se adiciona 1 mL de solución de fenol al 5%, y posteriormente se agregan 5mL de ácido sulfúrico concentrado. Se homogeniza la muestra (puede utilizarse un vortrex), se deja enfriar por 10 minutos y se coloca en un baño de agua fría, se lee en un espectrómetro a una longitud de onda de 490 nm. Esto se realiza por triplicado. La cantidad de azúcares totales se obtiene al comparar el promedio de las lecturas absorbancia obtenidas con una curva de calibración. Curva de calibración de sacarosa: Se obtiene al graficar la absorbancia de soluciones de sacarosa con un rango de concentración 0.01 a 0.1 g·L<sup>-1</sup> contra concentración.

**Tabla A 2. Absorbancias de las muestras a 490 nm.**

Conc. (g·L <sup>-1</sup> )	R1	R2	R3	Absorbancia promedio
0.01	0.088	0.094	0.099	0.094
0.02	0.179	0.197	0.185	0.187
0.03	0.296	0.233	0.281	0.270
0.04	0.38	0.326	0.401	0.369
0.05	0.455	0.445	0.433	0.444
0.06	0.561	0.553	0.513	0.542
0.07	0.732	0.738	0.737	0.736
0.08	0.829	0.808	0.805	0.814
0.09	0.853	0.895	0.834	0.861
0.1	0.936	0.951	0.910	0.932





**Figura A 2. Curva de calibración de azúcares totales a 490.**

La curva de calibración de azúcares totales tuvo un nivel de significancia  $R^2 = 0.9882$  y su regresión lineal presentó la ecuación . Esta ecuación se utilizó para determinar la concentración de azúcares totales de las muestras.

### **Etanol**

La curva de calibración de etanol se obtuvo graficando el promedio de las absorbancias (de tres repeticiones) y las concentraciones probadas. Se utilizó etanol anhidro como estándar.

### **Preparación del reactivo de dicromato de potasio y determinación de etanol.**

Reactivos

- Dicromato de potasio             $36.76 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$
- Ácido sulfúrico                     $325 \text{ mL}$

Se diluye el ácido sulfúrico en 400 mL de agua destilada, se deja enfriar y se agrega el dicromato diluido en 200 mL de agua destilada, se afora a un litro.

A 1 mL de muestra se agregan 2 mL de solución de dicromato de potasio y se agita, se deja reposar durante 10 minutos, se agregan 5 mL de agua destilada, se agita y se lee en espectrofotómetro a 585 nm (por triplicado).

La cantidad de etanol presente en la muestra se obtiene al comparar el promedio de las lecturas absorbancia obtenidas con una curva de calibración de etano. Curva de calibración de etanol: Se obtiene al graficar la absorbancia de soluciones de etanol con un rango de concentración 2 a 20 g·L<sup>-1</sup> contra concentración. La densidad del etanol es de 0.789 g·mL<sup>-1</sup>.

La curva que se utilizo como estándar para la determinación de etanol fue proporcionada por el técnico, Tanit Toledano. La curva de calibración de etanol tuvo un nivel de significancia  $R^2= 0.9857$  y su regresión lineal presentó la ecuación  $y = 18.75x$ . Esta ecuación se utilizó para determinar la concentración de etanol en las muestras.

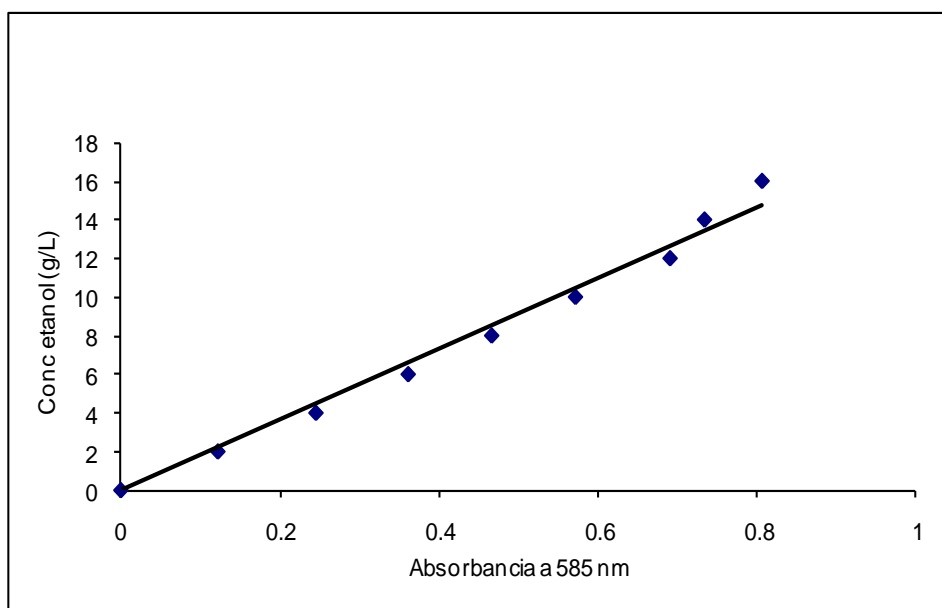


Figura A 3. Curva de calibración de etanol a 585 nm.

## Anexo 2. ANOVA de los tratamientos térmicos

Se analizaron mediante ANOVA (análisis de varianza) las concentraciones de azúcares reductores de los tres tratamientos de térmicos.

Tabla A 3. Análisis de varianza de azúcares reductores.

Factores de variabilidad	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F calculada	F tablas (0.05)
Tratamientos	8.0000	529.6142	66.2018	43.7579	2.0650
Error	18.0000	27.2324	1.5129		
Total	26.0000	556.8466			

Si la F calculada es superior a la de tablas, se rechaza la hipótesis, esto significa que al menos hay un tratamiento que es significativamente diferente, para determinarlo se aplica el método de comparación de medias de Tukey.

## Anexo 3. ANOVA de los tratamientos termoquímicos.

Tabla A 4. Análisis de varianza de azúcares reductores.

Fuentes de variabilidad	Grados de libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrados medios	F calculada	F de Tablas (0.05)
Tratamientos	11.000	40152.747	3650.250	992.350	1.980
Error	96.000	353.125	3.678		
Total	107.000	40505.872			

Si la F calculada es superior a la de tablas, se rechaza la hipótesis, esto significa que al menos hay un tratamiento que es significativamente diferente, para determinarlo se aplica el método de comparación de medias de Tukey.

## Anexo 4. ANOVA de los destilados de las fermentaciones.

Tabla ANOVA

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	11.52	2	5.758	10.09	0.0120
Intra grupos	3.424	6	0.5707		
Total (Corr.)	14.94	8			

Tabla de Análisis ANOVA para el etanol destilado de las muestras fermentadas. La razón F es más alta que el valor P esto indica que al menos un tratamiento es diferente a los demás.

### Pruebas de Múltiple Rangos

Método: 95.0 porcentaje Tukey HSD

	Casos	Media	Grupos Homogéneos
A.TQ	3	13.75	X
A.JC	3	15.25	XX
A.ENZ	3	16.51	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
A.JC - A.ENZ		-1.263	1.893
A.JC - A.TQ		1.504	1.893
A.ENZ - A.TQ	*	2.767	1.893

\* indica una diferencia significativa.

Tabla de pruebas de rangos múltiples muestra que hay diferencia significativa entre los destilados de las fermentaciones del hidrolizado enzimático e hidrolizado termoquímico.

### Anexo 5. ANOVA de los rendimientos de etanol en base al teórico en las fermentaciones de los hidrolizados y el jugo crudo.

**Tabla ANOVA**

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	1362.	2	680.8	33.01	0.0006
Intra grupos	123.7	6	20.62		
Total (Corr.)	1485.	8			

Tabla de Análisis ANOVA para el cálculo del rendimiento en base al teórico de las muestras fermentadas. La razón F es más alta que el valor P esto indica que al menos un tratamiento es diferente a los demás.

Método: 95.0 porcentaje Tukey HSD

	Casos	Media	Grupos Homogéneos
A.H Termoquímico	3	50.31	X
A.Jugo Crudo	3	69.36	X
A.H Enzimático	3	80.04	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
A.Jugo Crudo - A.H Termoquímico	*	19.05	11.38
A.Jugo Crudo - A.H Enzimático		-10.69	11.38
A.H Termoquímico - A.H Enzimático	*	-29.74	11.38

\* indica una diferencia significativa.

Tabla de pruebas de rangos múltiples muestra que hay diferencia significativa entre los rendimientos de etanol en base al teórico del jugo crudo con respecto al hidrolizado termoquímico, así como del hidrolizado termoquímico y el hidrolizado enzimático.

**Anexo 6. ANOVA de los rendimientos de etanol en base al teórico en la fermentación del hidrolizado enzimático durante los períodos de muestreo.**

**Tabla ANOVA**

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	751.1	4	187.8	7.05	0.0058
Intra grupos	266.2	10	26.62		
Total (Corr.)	1017.	14			

Tabla de Análisis ANOVA para el cálculo del rendimiento en base al teórico de la fermentación del hidrolizado enzimático durante los períodos de muestreo. La razón F es más alta que el valor P esto indica que al menos un tratamiento es diferente a los demás.

**Pruebas de Múltiple Rangos**

Método: 95.0 porcentaje Tukey HSD

	Casos	Media	Grupos Homogéneos
A.Seis h	3	47.15	X
A.Doce h	3	49.46	X
A.Dieciocho h	3	52.78	X
A.Veinticuatro h	3	57.93	XX
A.Treinta h	3	67.03	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
A.Seis h - A.Doce h		-2.312	13.86
A.Seis h - A.Dieciocho h		-5.627	13.86
A.Seis h - A.Veinticuatro h		-10.78	13.86
A.Seis h - A.Treinta h	*	-19.88	13.86
A.Doce h - A.Dieciocho h		-3.315	13.86
A.Doce h - A.Veinticuatro h		-8.466	13.86
A.Doce h - A.Treinta h	*	-17.56	13.86
A.Dieciocho h - A.Veinticuatro h		-5.151	13.86
A.Dieciocho h - A.Treinta h	*	-14.25	13.86
A.Veinticuatro h - A.Treinta h		-9.098	13.86

\* indica una diferencia significativa.

La tabla de pruebas de rangos múltiples muestra que hay diferencia significativa entre los rendimientos de etanol en base al teórico de la fermentación del hidrolizado enzimático durante los períodos de muestreo.