



Centro de Investigación Científica de Yucatán A. C.

Posgrado en Ciencias en Energía Renovable

**BIOPROCESO CONSOLIDADO PARA LA
PRODUCCIÓN DE BIOETANOL A PARTIR DE
HARINA DE SEMILLAS DE RAMÓN (*Brosimum
alicastrum*), UTILIZANDO EL AISLADO NATIVO
Trametes hirsuta Bm-2**

Tesis que presenta

M. en C. Edgar Olguin Maciel

En opción al título de

DOCTOR EN CIENCIAS EN ENERGÍA RENOVABLE

Mérida, Yucatán, México

Julio de 2020

AGRADECIMIENTOS

Al Centro de Investigación Científica de Yucatán AC y la Unidad de Energía Renovable, por aceptarme y permitir desarrollar esta investigación en sus instalaciones.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca número 297851.

Al Dr. Alfonso Larqué Saavedra, por brindarme la oportunidad de participar en su línea de investigación y su guía, sin la cual no se hubiera podido concretar este proyecto.

Al Dr. Raúl Tapia Tussell por la dirección y enseñanzas brindadas durante la realización de este trabajo.

A la Dra. Patricia Lappe Oliveras, por sus asesorías durante todo el desarrollo de los experimentos y la redacción de la tesis.

Al Dr. Luis Felipe Barahona Pérez por sus valiosas aportaciones a este trabajo y su apoyo en la redacción del artículo.

A las Dra. Daisy Pérez Brito, Dra. Sara Solís Pereira y Dr. Héctor Ruiz Leza por las sugerencias y observaciones realizadas a este trabajo.

A la IQ. Tanit Toledano Thompson por todo el apoyo prestado a lo largo de este proyecto, en especial con el uso del Microscopio Electrónico de Barrido.

MC. Jorge A. Domínguez Maldonado, por sus aportes y asistencia en el laboratorio con las cuantificaciones en el cromatógrafo de gases y las pruebas con el FT-IR.

Al IQI. Alberto Cortez Velázquez, por su apoyo y consejos en el desarrollo del proyecto.

A la Lic. Silvia Vergara Yoisura por el apoyo brindado durante todo el proyecto.

A la LAE. Arely Bertha Ramírez González por su apoyo con el formato electrónico del documento.

A la Lic. Quim. Irma Leticia Medina Baizabal, por su apoyo con los equipos de destilación.

Al Ing. Leonardo Gus Peltinovich, Ing. Samuel Flores Mena y al Ing. Gabriel Pool Balam del departamento de instrumentación por el apoyo con el diseño y construcción de reactores para el proyecto.

Al MC. Martin Baas López y al Ing. Santiago Duarte Aranda, por su asistencia técnica en las pruebas de CHON y TGA, respectivamente.

ÍNDICE

ÍNDICE DE TABLAS	vi
ÍNDICE DE FIGURAS	vii
INTRODUCCIÓN	1
CAPITULO I ANTECEDENTES	3
1.1. <i>Brosimum alicastrum</i> Sw.....	3
1.1.1. Clasificación y distribución	4
1.1.2. Productividad	4
1.1.3. Composición de la semilla de ramón.....	5
1.2. Bioetanol.....	5
1.2.1. Bioetanol como combustible	7
1.2.2. Producción de bioetanol.....	8
1.2.3. Materias primas para la producción de bioetanol.	9
1.2.3.1. Almidón.....	11
1.2.3.1.1. Características del almidón de harina de semillas de ramón	12
1.2.3.2. Hidrólisis de almidón	13
1.2.3.2.1. Clasificación de amilasas	14
1.2.3.3. Almidón para bioetanol.	15
1.2.4. Procesos para la producción de etanol	16
1.2.4.1. Hidrolisis y fermentación por separado	18
1.2.4.2. Sacarificación y fermentación simultánea	19
1.2.4.3. Sacarificación y co-fermentación simultánea	19
1.2.4.4. Bioproceso consolidado	20
JUSTIFICACIÓN	25
HIPÓTESIS	26
OBJETIVO GENERAL	27
OBJETIVOS ESPECIFICOS	27
CAPITULO II MATERIALES Y MÉTODOS	28
2.1. Materia prima.....	28
2.1.1. Caracterización de la materia prima.....	28
2.2. Material biológico.....	30

2.2.1.	<i>Trametes hirsuta</i> Bm-2.....	30
2.2.2.	<i>Candida tropicalis</i> PL-1	30
2.3.	Evaluación del comportamiento de <i>Trametes hirsuta</i> Bm-2	31
2.3.1.	Ensayos enzimáticos	31
2.3.2.	Tolerancia a etanol.....	32
2.3.3.	Fermentación de diversas de fuentes de carbono.....	32
2.4.	Producción y caracterización parcial del extracto enzimático.....	33
2.4.1.	Producción de extracto enzimático en reactor agitado tipo Airlift.....	33
2.4.1.1.	Efecto del pH y temperatura en la actividad enzimática del extracto crudo.	34
2.5.	Condiciones del bioproceso consolidado (BPC).....	35
2.6.	Condiciones de cultivo en la evaluación de la sinergia fermentativa de <i>T. hirsuta</i> – <i>C. tropicalis</i> PL1.....	35
2.7.	Determinación de la concentración de etanol y glucosa.....	36
CAPITULO III RESULTADOS Y DISCUSION		37
3.1.	Evaluación del comportamiento de <i>Trametes hirsuta</i> Bm-2	37
3.1.1.	Actividad enzimática	37
3.1.2.	Tolerancia a etanol.....	39
3.1.3.	Capacidad fermentativa	40
3.2.	Producción de etanol mediante bioproceso consolidado con <i>T. hirsuta</i> Bm-2.	41
3.2.1.	Co-productos obtenidos en el proceso de producción de bioetanol mediante BPC.	48
3.3.	Producción y caracterización parcial del extracto enzimático de <i>T. hirsuta</i> Bm-2.	50
3.3.1.	Producción de extracto enzimático en sistema de matraz agitado.	50
3.3.2.	Producción de extracto enzimático en un reactor agitado con aire tipo Airlift.	56
3.3.3.	Caracterización parcial del extracto crudo.....	58
3.4.	Efecto sinérgico del uso de <i>Trametes hirsuta</i> Bm-2 y <i>Candida tropicalis</i> PL-1...	60
BIBLIOGRAFÍA.		63
ANEXO		80

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.1. Principales componentes de la semilla de ramón (<i>Brosimum alicastrum</i> Sw.).	5
Tabla 1.2. Principales propiedades del bioetanol y de la gasolina.	8
Tabla 1.3. Principales países productores de bioetanol en 2019.	9
Tabla 1.4. Composición química y propiedades del almidón de harina de semillas de ramón (<i>Brosimum alicastrum</i>) y maíz (<i>Zea mays</i>).	13
Tabla 1.5. Regiones conservadas (letras en rojo) en la secuencia de aminoácidos de la familia α -amilasa.	14
Tabla 1.6. Producción de bioetanol a partir de diferentes fuentes de almidón.	16
Tabla 1.7. Composición química del micelio de <i>Trametes hirsuta</i> .	23
Tabla 2.1. Diferentes condiciones de temperatura, cargas de HSR y pH utilizados para la producción de extractos enzimáticos a nivel matraz.	33
Tabla 2.2 Soluciones amortiguadoras utilizadas para la evaluar el pH óptimo para la actividad enzimática de α -amilasa y lacasa	34
Tabla 3.1. Fermentación de diferentes fuentes de Carbono por <i>T. hirsuta</i> Bm-2.	41
Tabla 3.2. Organismos utilizados para la producción de etanol a partir de almidón mediante BPC.	46

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1. Distribución geográfica del ramón (<i>Brosimum alicastrum</i>).....	4
Figura 1.2. Estructura del almidón: a) amilosa y b) amilopectina	12
Figura 2.1. Producción de extracto enzimático por <i>T. hirsuta</i> Bm-2 en un reactor tipo Airliff de 2 L, utilizando HSR/agua al 5% (p/v) como sustrato.....	34
Figura. 3.1. Prueba de actividad enzimática de la cepa <i>T. hirsuta</i> Bm-2. A) Cuantificación de la actividad α -amilasa y lacasa, B) actividad amilolítica en placa de ELAA incubada a 32°C por 144 h, teñida con lugol en la que se observa un halo claro producto de la hidrólisis del almidón contenido en el medio, C) actividad lacasa en placa de EMA incubada a 32°C por 96 h, en la que se observa la oxidación del reactivo ABTS.....	38
Figura. 3 2. Prueba de tolerancia a etanol de <i>Trametes hirsuta</i> Bm-2 en medio YMA adicionado con 8% de glucosa a 10 días de incubación a 32°C. A) Control sin etanol, B) 10% (v/v), C) 11 % (v/v), D) 12 % (v/v), E) 13 % (v/v) y F) 14 % (v/v) de etanol absoluto. 40	
Figura. 3.3. Producción de etanol a partir de una suspensión de harina de semillas de ramón, <i>Brosimum alicastrum</i> , en un BPC. A) 120 h después de inoculación con 12,14 y 16% p/v, y B) 288 h después de inoculación con 14% p/v.....	42
Figura 3.4. Cargas de HSR (12, 14 y 16% p/v) y concentración de etanol (g) a las 288 h después de inoculación con <i>Trametes hirsuta</i> Bm-2. Los resultados representan la media y desviación estándar de tres mediciones paralelas. ANOVA de una vía. Tukey $\alpha=0.05$..	42
Figura 3.5. Actividad enzimática de la α -amilasa (círculos negros) y lacasa (círculos blancos) durante el BPC producida por <i>Trametes hirsuta</i> Bm-2. Los resultados representan la media y desviación estándar de tres mediciones paralelas.....	43
Figura 3.6. Microscopia electrónica de barrido (MEB) de HSR; A) inicial donde se observa la integridad de la matriz fibroproteica (círculos amarillos) y los abundantes gránulos de almidón (flechas naranjas), B) HSR tratada con extracto de lacasa de <i>Trametes hirsuta</i> Bm-2 y, C) HSR al final del BPC con micelio de <i>Trametes hirsuta</i> Bm-2 (flechas naranjas) a las 288 h de incubación a $32 \pm 2^\circ\text{C}$	44
Figura 3.7. Liberación de glucosa (g/L) durante el BPC con <i>Trametes hirsuta</i> Bm-2. Los resultados representan la media y desviación estándar de tres mediciones paralelas....	45

Figura 3.8. Producción de etanol durante el BPC con la cepa de <i>Trametes hirsuta</i> Bm-2. Los resultados representan la media y desviación estándar de tres mediciones paralelas.....	47
Figure 3.9. Curvas TGA (línea negra) y DTG (línea azul) de HSR, A) inicial y B) HSR 288 h después de inoculación con <i>Trametes hirsuta</i> Bm-2.....	49
Figura 3.10. Espectros FT-IR de harina de semillas de ramón (HSR) control y residual después del BPC con <i>T. hirsuta</i> Bm-2.....	50
Figura 3.11. Efecto de la temperatura, carga de sustrato, y pH en la actividad α -amilasa producida por <i>T. hirsuta</i> Bm-2. A) 32°C, B) 35°C y C) 38°C.....	52
Figura 3.12. Efecto de la temperatura, carga de sustrato, y pH en la actividad lacasa producida por <i>T. hirsuta</i> Bm-2. A) 32°C, B) 35°C y C) 38°C.....	54
Figura 3.13. Producción de enzimas por <i>Trametes hirsuta</i> Bm-2 en medio de HSR/agua al 5% p/v, pH 5.2 y flujo de aire de 3.5 L/min en reactor agitado tipo Airlift. Actividad enzimática α amilasa (círculos negros) y lacasa (círculos blancos).....	57
Figura 3.14. Efecto de temperatura (A y C) y pH (B y D) sobre la α -amilasa y lacasa presentes en el extracto enzimático crudo producido por <i>Trametes hirsuta</i> Bm-2.....	59
Figura 3.15. Hidrolisis de <i>Trametes hirsuta</i> Bm-2 durante 5, 6 y 7 días de incubación(valor inicial) sin agitación a 32°C, 24 y 48 h de hidrolisis enzimática a 32°C y 100 rpm y 48 h de fermentación con <i>Candida tropicalis</i> PL-1 a 32°C sin agitación.....	61

RESUMEN

El bioproceso consolidado (BPC), que integra el pretratamiento biológico, la producción de enzimas, la sacarificación y la fermentación, es una estrategia operativa prometedora para la producción rentable de etanol a partir de biomasa. En este estudio, se evaluó el uso de la cepa nativa *Trametes hirsuta* Bm-2 en la producción de bioetanol en BPC, la producción de extracto enzimático y la sinergia con *Candida tropicalis* PL-1. Se usó harina de semillas de ramón (*Brosimum alicastrum*) (HSR) como sustrato, que contenía 61% de almidón, lo que indica su potencial como materia prima para la producción de bioetanol. *T. hirsuta* Bm-2 produjo α -amilasa y lacasa, y se demostró su capacidad para fermentar los azúcares liberados. En el BPC la cepa *T. hirsuta* Bm-2 produjo etanol a partir de una suspensión de HSR al 14% p/v, alcanzando una concentración de 13 g/L, con lo que se estimó una producción de 123.4 mL/kg de HSR. En el BPC desarrollado, no se necesitaron enzimas externas ni fuentes de nitrógeno para el desarrollo del hongo. Bajo el concepto de biorefinería, se recuperó la biomasa residual de BPC, que presentó un contenido promedio de proteínas del 23%, por lo que puede considerarse en un esquema de alimentación animal, ayudando así a lograr la viabilidad económica de todo el proceso. *T. hirsuta* Bm-2 produjo las enzimas α -amilasa y lacasa bajo diferentes condiciones de temperatura, carga de sustrato y pH. A 32°C se obtuvieron los valores de actividad más altos (210 U/mL de α -amilasa y 4115 U/mL de lacasa). El uso de *Candida tropicalis* PL-1 después de la hidrólisis por parte de *T. hirsuta* Bm-2 mejoró la producción de etanol, aumentando la concentración de etanol en un 30% con respecto a la BPC.

ABSTRACT

Consolidated bioprocessing (CBP), which integrates biological pretreatment, enzyme production, saccharification, and fermentation, is a promising operational strategy for cost-effective ethanol production from biomass. In this study, the use of a native strain of *Trametes hirsuta* (Bm-2) was evaluated in bioethanol production in CBP, enzyme extract production and synergism with *Candida tropicalis* PL-1. Ramon (*Brosimum alicastrum*) seed flour (RF) was used as substrate. RF contained 61% of starch, indicating its potential as a raw material for bioethanol production. *T. hirsuta* Bm-2 extracellularly produced the enzyme α -amylase and its ability to ferment the sugars released was demonstrated. *T. hirsuta* Bm-2 strain was able to produce ethanol in CBP from RF a concentration of 13 g/L was reached, with which a production of 123.4 mL/kg RF was estimated. In the developed CBP, no external enzymes were required or nitrogen sources for the development of the fungus. Under the refinery concept, the residual biomass of CBP was recovered, which presented an average protein content of 23%, so it can be considered in an animal feeding scheme, thereby helping to achieve the economic viability of the entire process of production. *T. hirsuta* Bm-2 was able to produce α -amylase and laccase enzymes under different conditions of temperature, substrate load and pH. In this sense, it was at 32°C that the highest activity values were obtained (210 U/mL α -amylase and 4115 U/mL laccase). The *T. hirsuta* Bm-2 and *Candida tropicalis* PL-1 strains presented a positive synergism, increasing the concentration of ethanol by 30% with respect to CBP.

INTRODUCCIÓN

La introducción del bioetanol en el sector del transporte, es considerada una medida necesaria para reducir la dependencia de la energía fósil por parte de la sociedad moderna. Actualmente, los combustibles fósiles cubren el 90% de la creciente demanda energética. Sin embargo, con la tasa de consumo actual, se calcula que las reservas probadas de petróleo, carbón y gas natural se agoten en los próximos 50, 53 y 134 años, respectivamente. Aunado a esto, su combustión contribuye al calentamiento global debido a las emisiones de gases de efecto invernadero (GEI), causando el cambio climático, el aumento en el nivel del mar, la pérdida de biodiversidad y contaminación ambiental [1–4].

El bioetanol ofrece una solución inmediata al uso de la gasolina, debido a que no se requiere la modificación de la actual infraestructura de transporte. La producción y consumo de bioetanol han sido promovidos a través de subsidios, cambios en la legislación y financiamiento para investigación. En 65 países del mundo se usa bioetanol mezclado con gasolina, en diferentes proporciones, como parte de un programa de descarbonización del transporte. El volumen de etanol adicionado varía desde el 5 hasta 100% dependiendo del país. En promedio en Brasil se utiliza una mezcla al 27.5% de etanol, mientras que Estados Unidos el 10% y en la Unión Europea del 5%, dichas mezclas se refieren como E28, E10 y E5 respectivamente [5–9]. Se estima que el uso generalizado de bioetanol al 10% podría reducir las emisiones de GEI de 12 a 19%, en comparación con el uso de la gasolina sola. Sin embargo, su competitividad como producto de consumo depende en gran medida de la tecnología usada en su proceso de producción [3,10,11].

En los últimos años, el concepto de bioproceso consolidado (BPC) ha surgido como una estrategia eficiente para producir etanol y ácidos orgánicos [12]. El BPC implica la integración de la producción de enzimas, la hidrólisis enzimática y la fermentación utilizando un organismo o un consorcio de éstos en un solo sistema de bioprocesamiento, lo que implica una disminución en los costos de inversión y operación del proceso, así como en las emisiones de CO₂ [13,14].

Debido a que, a la fecha no hay reportes de que una cepa nativa sea capaz de desarrollar un BPC de manera eficiente [11], las investigaciones se han centrado en el desarrollo de microorganismos capaces de realizarlo [15] mediante la modificación genética con el fin de conferirle: 1) a un organismo celulolítico capacidad fermentadora o 2) a un organismo fermentador otorgarle capacidad amilolítica o celulolítica. Sin embargo, esto ha traído consigo

dificultades que incluyen los efectos adversos de la co-expresión de múltiples genes que limitan la expresión de los genes de interés. Así, la búsqueda de organismos nativos capaces de realizar un BPC es esencial y su hallazgo incrementará el número de genes silvestres disponibles para la posible manipulación genética que, en un futuro, permita el desarrollo de un organismo apto para realizar un BPC de forma eficaz [16,17]. Para la realización de este trabajo se usó la cepa nativa *Trametes hirsuta* Bm-2, ya que existen reportes de que especies de este género producen una amplia batería de enzimas, que les confieren la capacidad de hidrolizar y también son de fermentar diversos sustratos [18,19], características necesarias para llevar a cabo un BPC.

La creciente demanda de bioetanol requiere del uso de materias primas alternativas para complementar a los cultivos de caña de azúcar y maíz, con los cuales se producen 90,100 millones de litros, lo que representa más del 86% de la producción total de etanol. El almidón proveniente del maíz, junto con el de papa, trigo y yuca, conforman la principal materia prima para la producción de etanol de primera generación, pero por ser cultivos alimenticios, generan competencia entre la producción de bioetanol y el suministro de alimentos [3,20].

En este contexto, en este trabajo se propone el uso de las semillas del ramón *Brosimum alicastrum*, que contienen más del 61% de almidón. Esta especie forestal es nativa de Mesoamérica y el Caribe, y está ampliamente distribuida en México. En la Península de Yucatán, se encuentran árboles de ramón de manera abundante en prácticamente toda la geografía del estado. Esta especie tiene las características adecuadas para ser considerada un cultivo energético, como son: alta productividad (más de 100 kg de semilla por árbol por año), tolerancia a la sequía, resistencia a plagas y enfermedades, y que, por ser una especie perenne, además juega un papel importante en la captura de carbono y otros servicios ambientales [1,21–24].

El objetivo de este trabajo, fue desarrollar un BPC utilizando harina de semilla de ramón (HSR) como materia prima, y la cepa de *T. hirsuta* Bm-2 como organismo para el proceso de fermentación. Adicionalmente, se estudió la producción del extracto enzimático por parte de la misma cepa y el efecto sinérgico de la levadura *Candida tropicalis* PL-1 con *T. hirsuta* Bm-2 en la fermentación de los azúcares residuales para incrementar la producción de bioetanol de segunda generación.

CAPITULO I ANTECEDENTES

1.1. *Brosimum alicastrum* Sw

Investigaciones antropológicas, indican que *B. alicastrum*, fue uno de los principales sustratos de soporte de los antiguos pueblos mayas, que reconocieron el valor preciso de las plantas de ramón; por ejemplo, observaron que su semilla era muy nutritiva, y que sus cultivos eran más productivos y resistentes a sequías e inundaciones que el maíz y otros cultivos anuales [25]. En la actualidad se encuentran árboles de ramón en prácticamente todos los solares de las familias mayas [22]. La importancia cultural y ancestral del ramón se ha perdido, junto con la de otras plantas que provienen de la selva, debido a que el conocimiento de su uso ancestral no ha sido transmitido a las generaciones actuales [25]. Hoy en día, la semilla del ramón es raramente usada para consumo humano entre la población indígena y mestiza de la Península de Yucatán [21], pero su follaje es ampliamente utilizado como forraje, y en menor medida el árbol de ramón, es empleado como cerca viva, barrera rompe vientos, para la conservación del suelo y control de la erosión, así como para la recuperación de suelos degradados [26].

En 1975, la academia de Ciencias de Estados Unidos incluyó al ramón en la lista de “plantas tropicales sub-explotadas con promisorio valor económico”, pues a cada una de sus partes se le puede dar un uso práctico [25,27]. Por la relevancia que tiene esta especie en el estado de Yucatán, la Comisión Nacional Forestal (CONAFOR) ha definido al ramón como una especie prioritaria para sus programas de conservación y restauración de ecosistemas forestales, y desde 2008, se ha propuesto como objetivo a corto plazo la identificación, conservación y manejo sustentable de su germoplasma. En este mismo sentido, el gobierno de Yucatán (periodo 2012-2018) a través del Programa de Reforestación y Restauración del Ramón estableció como meta la siembra de al menos un millón de estos árboles [28,29].

El 31 de agosto de 2018, se firmó en el Instituto Tecnológico de Chiná, Campeche, el convenio para la creación del Centro Regional para la Conservación y Aprovechamiento del Árbol de Ramón (CENCAR); contribuyendo al desarrollo sustentable del sureste del país. Las instituciones que forman parte de CENCAR son: la Secretaría de Desarrollo Rural del gobierno de Campeche, el Centro de Investigación Científica de Yucatán, el Colegio de Postgraduados Campus Campeche, el Instituto Tecnológico de Conkal, el Instituto Tecnológico de Tizimín, el Instituto Tecnológico de la Zona Maya, el Instituto Tecnológico de la Zona Olmeca, el Instituto Tecnológico de Chiná y el Instituto Tecnológico Superior del Sur del Estado de Yucatán [30].

1.1.1. Clasificación y distribución

Brosimum alicastrum Sw., (nombre común: ramón), es una especie de la familia Moraceae, originaria de Mesoamérica y el Caribe [22,27]. En México se encuentra distribuida en los estados del Golfo de México y el mar Caribe, desde Tamaulipas hasta Quintana Roo; en la costa del Pacífico desde el sur de Sinaloa hasta Chiapas, y en el centro del país se localiza en los estados de San Luis Potosí, Durango, Estado de México, Morelos y Puebla [31–33] (Figura 1.1). Crece de manera silvestre desde México a través de Centroamérica, hasta Colombia, Perú y Venezuela, en las islas del Caribe se halla en Cuba, Jamaica y Trinidad [31].



Figura 1.1. Distribución geográfica del ramón (*Brosimum alicastrum*).

1.1.2. Productividad

En un estudio realizado en el estado de Yucatán se estimó que el promedio de forraje producido por un árbol/año es de 163 kg. Este resultado extrapolado a una plantación comercial con 300 árboles/ha daría una producción estimada de 48.9 t por hectárea. En el mismo estudio se calculó una productividad de 28.6 t de semilla/ha/año, teniendo un rendimiento promedio/árbol al año de 95.5 kg. Estos resultados fueron obtenidos a partir de árboles sin ningún tipo de manejo [22].

1.1.3. Composición de la semilla de ramón

Diversos estudios coinciden en que la cantidad de carbohidratos presentes en la semilla de ramón es de alrededor del 75% del peso seco de la semilla, siendo más del 61% almidón, por lo que es el principal componente de la semilla (Tabla 1.1). Así mismo destaca su alto contenido de proteínas, calcio, potasio, vitaminas A, E, C, y B6 además de la presencia de aminoácidos como: lisina, metionina, cistina, triptófano y treonina entre otros, todos en un contenido menor al 1% p/p [28,29,34].

Tabla 1.1. Principales componentes de la semilla de ramón (*Brosimum alicastrum* Sw.).

Componente	Fuente			
	Barquera [35]	Peters y col. [36]	Lozano y col. [34]	Arévalo y col. [37]
Carbohidratos*	72.25 ^a	--	77.27 ^c	72.80 ^d
Proteína cruda*	12.24 ^a	12.8 ^b	10.87 ^c	10.52 ^d
Fibra*	4.96 ^a	4.6 ^b	5.99 ^c	3.4 ^d
Lípidos*	1.10 ^a	--	--	--
Energía**	347.86 ^a	361 ^b	--	--
Humedad*	5.88 ^a	--	--	8.33 ^d

*g en 100 g de semilla en base seca **kcal en 100 g de semilla en base seca

Otro componente de la semilla de ramón, que ha generado mucho interés, son los compuestos con potencial antioxidante, utilizados para el desarrollo de alimentos funcionales. Ozer y col. [38] mencionan que la semilla de ramón tiene un alto contenido de compuestos fenólicos, en comparación con otras especies, como almendra, nuez y cacahuate. Los ácidos fenólicos identificados fueron: ácido gálico, *p*-hidroxibenzoico, vanillinico, cafeico y cumárico además de un flavonoide (epicatequina), en un rango de concentración de 6.5 a 326.2 $\mu\text{g/g}$, siendo los ácidos *p*-hidroxibenzoico y el cumárico el más y menos abundante, respectivamente. Moo-Huchin y col. [24] reportaron que además de estos compuestos fenólicos, identificaron el ácido clorogénico, como el más predominante en sus muestras. Este ácido es uno de los compuestos activos presente en el café y té.

1.2. Bioetanol

La industria del bioetanol, inició en la década de los 70's del siglo XX, durante la crisis petrolera con el objetivo de reducir la dependencia del combustible fósil, generando beneficios socio-económicos y ambientales [9]. La industria ha madurado y 50 años después el bioetanol

es el biocombustible más importante contribuyendo con el 65% de la producción global de biocombustibles [9,39].

El bioetanol fue introducido en la cadena de suministro de combustible para el transporte con la creación, en 1975, del Programa Nacional de Alcohol (PROALCOOL) por el gobierno de Brasil, con el propósito inicial de estabilizar el precio internacional de la caña de azúcar y disminuir la dependencia petrolera. Para 1979 el gobierno reforzó el programa otorgando un patrocinio para el desarrollo de una flota de vehículos alimentados con etanol [40]. En marzo de 2003, la industria brasileña de autos se revitalizó con la introducción de vehículos de combustible flexible (VCF). Estos vehículos podían usar varias mezclas de etanol/gasolina permitiendo a los consumidores elegir una mezcla, dependiendo de los precios en el mercado [9]. Actualmente, la flota de autos en Brasil es de 30.5 millones de vehículos, de los cuales aproximadamente el 60% corresponde a VCF [9].

En 1990 el gobierno de Estados Unidos de Norteamérica promulgó las enmiendas a la Ley de Aire Claro, que ordenaban la inclusión del 2% p/v de aditivos oxigenantes a la gasolina, señalando como principales opciones al metil ter-butyl éter (MTBE), al etil terbutyl éter (ETBE) y al etanol. Para 1999 se utilizaba principalmente MTBE, con una producción de 21 millones de toneladas a nivel mundial siendo Estados Unidos de Norteamérica el principal productor y mercado de ese compuesto. Una investigación reveló la presencia de dicho compuesto en el ambiente, identificándolo como uno de los contaminantes más abundantes en el agua subterránea, por lo cual algunos estados de ese país, así como algunos países europeos prohibieron su uso. Por esta situación y por otros problemas de contaminación atmosférica, el bioetanol se ha perfilado como la opción más viable como aditivo oxigenante, teniendo como principales cualidades frente al MTBE, el ser renovable, soluble en agua y de baja toxicidad [41,42].

En el año 2000, el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA) inició un programa dedicado a la industria del etanol a partir de maíz. Este programa incluyó estudios económicos, políticos y energéticos de diferentes dependencias gubernamentales. Las áreas de investigación científica abordaron la obtención de nuevos productos, con mayor valor además de etanol, el desarrollo de microorganismos capaces de producir etanol a partir de diferentes tipos de biomasa, mejorar los procesos de sacarificación enzimática de la fibra de maíz y en general, incrementar la eficiencia en el proceso de producción del etanol [9].

Para el año 2018 de acuerdo con la Asociación de Combustibles Renovables (ACR) [20] la industria del etanol, en Estados Unidos de Norteamérica, rompió record de producción,

consumo y exportación. En sus 210 plantas ubicadas en 27 estados, se produjeron aproximadamente 61 mil millones de litros.

China es otro país importante en la producción de etanol, en 2017 lanzó una política gubernamental, con el objetivo de implementar una mezcla de etanol/gasolina al 10%. Con este incentivo, se espera que aumenten las plantas productoras de etanol usando yuca, camote y sorgo como sustrato [9].

1.2.1. Bioetanol como combustible

Actualmente la producción de bioetanol ha recibido mucha atención como parte de los esfuerzos o estrategias para prevenir el calentamiento global y extender las reservas energéticas [42]. Del total de etanol producido, el 90-95% se obtiene mediante el proceso de fermentación microbiana y solo el porcentaje restante se produce por reformado de eteno. Aproximadamente el 84% de la producción se consume como combustible en mezclas con gasolina, el resto se usa en la industria química, farmacéutica, cosmética y de bebidas embriagantes [9].

La industria química lo ha identificado como fuente potencial para la producción de diferentes sustancias que hoy en día se obtienen a partir del petróleo como: etileno (146 millones de t/año), propileno (78 millones de t/año), isobutileno (10 millones de t/año), 1,3-butadieno (11.5 millones de t/año), acetaldehído (1.3 millones de t/año), ácido acético (10.4 millones de t/año), acetona (6.7 millones de t/año) y BTX (mezcla de benceno, tolueno y 3 formas de xileno (95 millones de t/año) entre otras [43].

El etanol o alcohol etílico (C_2H_6O) es un líquido transparente con un alto número de octanos y oxígeno por lo que puede ser usado como aditivo o reemplazo de la gasolina en motores de combustión interna. En la Tabla 1.2 se presentan las principales características del bioetanol carburante en comparación con la gasolina.

Actualmente, un gran porcentaje de vehículos no necesita modificaciones para hacer uso de una mezcla hasta E15; sin embargo, por encima de este porcentaje se pueden presentar daños en los vehículos, a excepción de los Vehículos VCF que pueden usar cualquier porcentaje de mezcla. La alta solubilidad del etanol en el agua hace a la mezcla más susceptible de hidratarse, por lo que algunos autores señalan que con el uso de este biocombustible se desprenden otras sustancias contaminantes. Sin embargo, se ha observado que al realizar una buena combustión las emisiones resultantes presentan valores por debajo de los parámetros establecidos en las normas ambientales [44,45]. La molécula

de etanol posee un 34% de oxígeno que es transferido a la mezcla con gasolina lo que reduce la necesidad de oxigenación externa, por lo cual la gasolina es quemada más eficientemente, lo que se traduce en una disminución en la cantidad de litros de combustible fósil utilizado, y por ende menos emisiones de CO₂ [40].

Tabla 1.2. Principales propiedades del bioetanol y de la gasolina.

Parámetro	Bioetanol	Gasolina
Poder calorífico inferior (kJ·L ⁻¹)	28.22	43.5
Densidad (kg·L ⁻¹)	0.79	0.72-0.78
Octanaje RON*	102-130	90-100
Octanaje MON**	8-96	80-92
Relación aire/combustible	9.0	14.5
Temperatura de ignición (°C)	420	220
Solubilidad en agua (% vol)	100	~ 0

*Research Octane Number o Índice de Octano

**Motor Octane Number o Número de Octano del Motor

Fuente: [44].

1.2.2. Producción de bioetanol

A nivel mundial, el etanol es el biocombustible más usado; y se prevé que su producción y consumo se incremente en los próximos años. Este aumento es posible por tres razones: 1) la presión de las políticas gubernamentales por aumentar el porcentaje de etanol en las mezclas con gasolina, 2) el aumento anual de 3.8 ±0.5% en la flota mundial de automóviles y 3) la mayor preocupación mundial por las cuestiones medioambientales [9].

Muchos países como Estados Unidos de Norteamérica, Brasil, China, Canadá y varios miembros de la Unión Europea han establecido compromisos de producción y consumo de etanol como intentos de reducir su dependencia del petróleo [3]. Los principales países productores de bioetanol se enlistan en la Tabla 1.3.

En el caso de México, de acuerdo con algunas estadísticas, la producción de bioetanol representó tan solo el 0.1% del total mundial en 2015, es decir aproximadamente 8 millones de litros [46]. A pesar de que se ha impulsado el uso de los biocombustibles desde 2008 con la promulgación de la ley de Promoción y Desarrollo de los Bioenergéticos, la poca normativa en relación a los precios y el hecho de que PEMEX (Petróleos Mexicanos) sea el único comprador, provocó que las licitaciones en 2009 y 2012 para adquirir etanol para oxigenar las

gasolinas se hayan declarado desiertas por no convenir las condiciones a las empresas que concursaron [47].

Tabla 1.3. Principales países productores de bioetanol en 2019.

País	Producción (millones de litros)	% de la producción mundial
1. Estados Unidos de América	60,040	54%
2. Brasil	32,756	30%
3. Unión Europea	5,472	5%
4. China	3,420	3%
5. India	2,014	1%
6. Tailandia	1,596	2%
7. Canadá	1,900	2%
8. Argentina	1,102	1%
9. Resto del mundo	2,280	2%
Total	110,580	100%

Fuente: [20].

En 2014, PEMEX emitió una tercera licitación para adquirir etanol anhidro, a fin de oxigenar la gasolina en un 5.8% (E6). Como resultado de esta licitación la empresa suscribió contratos con Alcoholera de Zapopan, Bioenergéticos Mexicanos, Productos de Bioenergéticos Mexicanos, Soluciones en Ingeniería Naval Marina y Terrestre, Destiladora del Papaloapan y Fabricación de Alimentos Tenerife, para adquirir un monto entre los 8,000 y 11,570 millones de pesos de etanol, ayudando así a fortalecer la seguridad energética del país mediante el uso de bioenergéticos [48].

En 2016, la Comisión Reguladora de Energía (CRE) y el gobierno de México, aprobaron y publicaron en el Diario Oficial de la Federación la norma NOM-016-CRE-2016; Especificaciones de calidad de los petrolíferos. Con la implementación de esta norma, se permite la venta de la mezcla de etanol anhidro con las gasolinas Magna y Premium en un 5.8%. Sin embargo, la autorización de esta mezcla no incluye a las áreas metropolitanas de la ciudad de México, Guadalajara y Monterrey [49].

1.2.3. Materias primas para la producción de bioetanol.

Una amplia variedad de materias primas puede ser utilizadas para la producción de etanol, pero la búsqueda de las materias primas adecuadas, ha llevado al surgimiento de tres

categorías del biocombustible denominadas: de primera generación que se produce a partir de cultivos ricos en almidón (maíz, trigo, papa, sorgo de grano, etc.) y cultivos con alto contenido de azúcar (caña de azúcar, sorgo dulce y remolacha azucarera), de segunda generación que se basa principalmente en cultivos energéticos y material lignocelulósico (bagazo de caña de azúcar, rastrojo de maíz, paja de arroz, paja de trigo, etc.), y de tercera generación que emplea microalgas (*Chlamydomonas reinhardtii*, *Chlorella vulgaris*, etc.) y macroalgas (*Ulva lactuca*, *Laminaria japonica*, etc.) [3,50].

A pesar de la problemática que representa la producción de combustibles a partir de cultivos alimenticios, que da lugar a la competencia entre la producción de alimentos y el suministro de materias primas para producción de combustibles, hoy en día, más del 60% del etanol producido se basa en almidón. Los cultivos con alto contenido de almidón son utilizados debido a su alta disponibilidad en diferentes regiones geográficas, facilidad de conversión, bajo costo, fácil manejo y sobre todo por su alto rendimiento de etanol. Estos materiales incluyen cereales (60-80% almidón), tubérculos y raíces (60-90% almidón), legumbres (25-50% almidón) y frutos verdes y/o inmaduros (más del 70% de almidón). Algunos ejemplos son sorgo, trigo, yuca, papa, camote y el maíz que es la principal fuente con la que Estados Unidos de Norteamérica produce más del 54% del total mundial de etanol [3,14,50,51]. Las características y cualidades del almidón serán abordadas más adelante.

Las materias primas en la segunda generación de biocombustibles (pastos perennes, plantas acuáticas, residuos agrícolas y forestales y desechos sólidos municipales) superan las limitaciones planteadas para los biocombustibles de primera generación, en cuanto a su disponibilidad y su uso en la alimentación humana. Sin embargo, a pesar del abundante suministro de residuos agrícolas, todavía existen desafíos técnicos importantes para llevar a cabo la producción comercial. Uno de los principales obstáculos para el uso generalizado de la materia lignocelulósica es su recalcitrancia, debido a los altos contenidos de lignina, además de la estructura altamente cristalina de la celulosa y una composición heterogénea de la hemicelulosa.

La biomasa lignocelulósica requiere de pretratamientos severos antes de la hidrólisis enzimática, lo que aumenta el costo de todo el proceso. Recientemente se están utilizando hongos ligninolíticos y sus enzimas (manganeso peroxidasa, ligninoperoxidasa y lacasa) para llevar a cabo la deslignificación de la biomasa. Estos incluyen principalmente a los hongos de la pudrición blanca como *Trametes versicolor*, *Trametes villosa*, *Pleurotus ostreatus*, *Ceriporiopsis subvermispora*, *Cyathus stercoreus* y *Trichoderma reesei*, que atacan la lignina,

sin embargo, el proceso es de larga duración, el costo es alto y la celulosa no se modifica de manera eficiente [52].

Debido a esto y otras problemáticas asociadas a los biocombustibles de segunda generación su participación en la producción mundial de etanol es incipiente. Su contribución en el escenario mundial es inferior al 0.4%, y se estima que para el 2023 apenas se duplique su producción. Hoy en día, el etanol de segunda generación se produce principalmente a partir de residuos de maíz (Estados Unidos de Norteamérica y China) y bagazo de caña de azúcar (Brasil). Con respecto al bioetanol de tercera generación (a partir de algas), éste se encuentra en una etapa inicial confinada principalmente a investigación de laboratorio [9].

1.2.3.1. Almidón

El almidón es el principal carbohidrato en la dieta humana, ya que proporciona entre el 70 y 80% de las calorías consumidas. Tiene distintas aplicaciones en las industrias alimenticia, textil y química, por mencionar algunas; es empleado en la producción de alimentos, adhesivos y recientemente también en la elaboración de biopolímeros [21,53].

Dependiendo de la fuente botánica, el almidón es almacenado en semillas, raíces, tubérculos, tallos, hojas y frutos. Se sintetiza en los cloroplastos y se almacena en los amiloplastos en forma de gránulos, los cuales varían en diámetro, forma y composición, dependiendo de la especie de la planta de la cual proviene [53–55].

El almidón está constituido por dos polímeros de moléculas de D-glucosa, la amilosa con estructura esencialmente lineal con enlaces α -(1,4) y la amilopectina que posee una estructura ramificada con enlaces α -(1,4) y α -(1,6) (Figura 1.2) [56]. Generalmente la proporción de la amilosa es del 20-30% y la de la amilopectina es del 70-80%, y representan del 98 al 99% del total del peso del gránulo de almidón, el resto está constituido por lípidos (fosfolípidos), minerales y proteínas [48]. Diferencias en la proporción de amilosa y amilopectina, y la forma en que están organizadas dentro del gránulo, confieren al almidón una gran variedad en el tamaño (1 a 100 μm de diámetro), forma (poligonal, esférica o lenticular) y propiedades funcionales [57].

Se considera que los gránulos de almidón tienen un núcleo amorfo, compuesto mayormente por amilosa y restos de amilopectina, denominado *hilum*, el cual está rodeado por un patrón concéntrico de anillos de crecimiento, alternando zonas cristalinas y amorfas. Estos anillos

generalmente tienen un espesor de 0.120-0.400 μm . El gránulo de almidón está densamente empaquetado con una densidad de 1.5 g/cm³ [56].

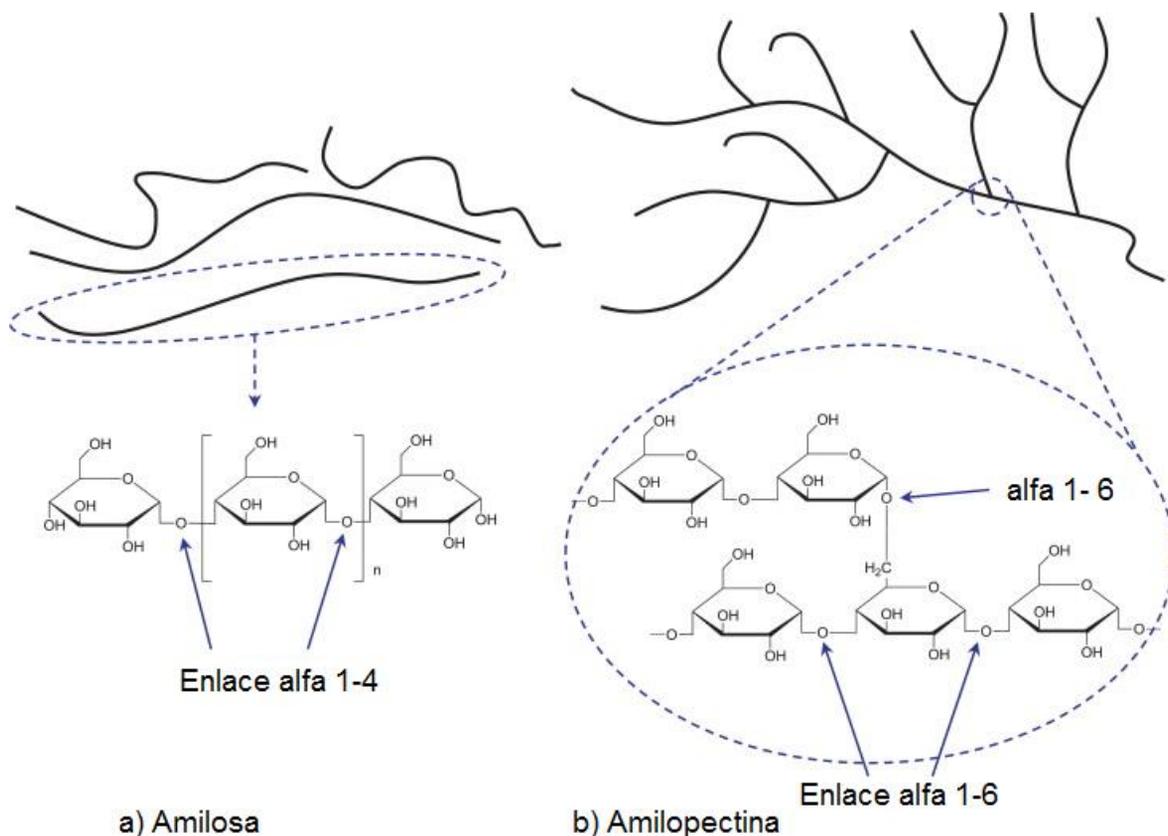


Figura 1.2. Estructura del almidón: a) amilosa y b) amilopectina [58].

El incremento en la demanda de almidón para la alimentación y la manufactura de materiales biodegradables, ha tenido un fuerte impacto en el abasto de este recurso. Por ello, actualmente se investigan fuentes alternativas, no convencionales de este compuesto, las cuales no compitan con el consumo humano y puedan ser usadas como materia prima en diversos procesos. En este sentido, una de estas fuentes no convencionales de almidón podrían ser las semillas de *B. alicastrum*, por su alta disponibilidad en el trópico, su abundante producción (de hasta 100 kg/árbol/año), su alto contenido de almidón (61%) y porque hoy en día, las semillas no son utilizadas en forma predominante en la dieta humana [21,22,59].

1.2.3.1.1. Características del almidón de harina de semillas de ramón

Dado que la principal fuente de almidón para bioetanol es el maíz, es importante señalar que el almidón, obtenido a partir de harina de semillas de ramón posee composición química y propiedades similares como puede observarse en la Tabla 1.4, convirtiéndolo en una buena opción para la producción de etanol.

Tabla 1.4. Composición química y propiedades del almidón de harina de semillas de ramón (*Brosimum alicastrum*) y maíz (*Zea mays*).

Parámetro	Ramón	Maíz
Humedad (%)	7.49	8.14
Cenizas (%)	0.47	0.02
Grasas (%)	0.47	0.49
Proteína (%)	0.12	0.03
Amilosa (%)	25.36	27.33
Amilopectina (%)	74.64	72.67
Relación amilosa/amilopectina	1:2.94	1:2.65
pH	9.1	5.92
Almidón total (%)	92.57	98.86
Temperatura inicial de gelatinización (°C)	82.72	72
Poder de absorción (g agua/g almidón)	17.64	11.04

Fuentes: [21,59].

1.2.3.2. Hidrólisis de almidón

La mayoría de enzimas usadas para la hidrólisis de almidón, pertenecen a una familia clasificada con base a una secuencia de aminoácidos homólogos: la familia amilasa o familia 13-glucosil hidrolasa. Este grupo, comprende aquellas enzimas que poseen las siguientes características:

- a) Actúan sobre enlaces α -glucósidos e hidrolizan el almidón a mono y oligosacáridos.
- b) Poseen una estructura β/α .
- c) Tienen regiones altamente conservadas en su secuencia primaria (Tabla 1.5), que contienen los aminoácidos que forman el sitio catalítico, así como aminoácidos esenciales para su estabilidad [60].

Una gran variedad de industrias como: alimenticia, textil, farmacéutica, química, por mencionar algunas, realizan la hidrólisis del almidón principalmente con amilasas de origen microbiano, las que han desplazado por completo la hidrólisis química. El mayor mercado para las α -amilasas es la producción de almidón hidrolizado [61]. Recientemente se han implementado diferentes estrategias para aumentar la producción de enzimas y disminuir los costos de producción, las que incluyen: el uso de co-cultivos microbianos, optimización de

condiciones de crecimiento de los microorganismos, aplicación de extractos enzimáticos crudos, uso de residuos agroindustriales y/o sustratos de bajo de costo [62].

Tabla 1.5. Regiones conservadas (letras en rojo) en la secuencia de aminoácidos de la familia α -amilasa.

Amilomaltasa	EALGIRIIG D MPIFVAED	LFHLV R IDHFRG	VPVLA E DLGVI	VVYTGT H DNDT
Amilosacarosa	HEAGISAVV D FIFNHTSN	GVDIL R MDAVAF	VFFK S E AIVHP	VNYVRS H DDIG
Ciclodextrinasa	HAKNIKVII D FAPNHTSP	GIDG R MDAVKH	VFTFG E WFLGV	VTFIDN H DTER
Ciclomaltodextrinasa	HDNGIKVIF D AVFNHCGY	DIDGW R LDVANE	AIVG E VWHDA	FNLIGS H DTER
Isoamilasa	HNAGIKVYM D VVYNHTAE	GVDGF R FDLASV	LDLFA E IWHDA	FNLLGS H DTPR
Maltoamilasa	HQKAIRV M LDAVFNHSGY	DIDGW R LDVANE	AYILG E IWEEA	MNLLTS H DTPR
Pululanasa	HERGMYLMV D VVANHMGY	SIDGL R IDTVKH	VYCIG E VLDGD	GTFVEN H DNPR

Fuente: [60].

1.2.3.2.1. Clasificación de amilasas

α -amilasa. Son metaloenzimas que son incapaces de completar su función en ausencia de calcio. Realizan cortes de manera aleatoria en la cadena de carbohidratos hidrolizando los enlaces alfa1,4, pero no pueden hidrolizar los enlaces alfa 1,6, rindiendo productos como maltotriosa y maltosa a partir de la amilosa o maltosa y dextrina limite a partir de la amilopectina. Las α -amilasas se encuentran en plantas, hongos ascomicetos y basidiomicetos y bacterias del género *Bacillus*. La temperatura y el pH óptimos para estas enzimas, puede variar dependiendo de la fuente, pero generalmente tienen mayor actividad entre 30 y 37°C a pH neutro. Sin embargo, algunas tienen máxima actividad a pH tan bajo como 3 o tan alto como 10 y a temperaturas superiores a 100°C. Enzimas de *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus licheniformis*, y *Bacillus subtilis* son de especial importancia desde el punto de vista de la investigación básica y aplicación industrial [54,63,64].

β -amilasa. Esta enzima es sintetizada por algunas especies de bacterias de los generos *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Clostridium* y *Streptomyces* y especies del moho del género *Rhizopus* aunque también se ha encontrado en plantas. Trabajan desde la terminación no reductora, catalizan la hidrólisis del segundo enlace α -(1,4), esta acción se detiene por completo a cuatro unidades de glucosa antes de los puntos de ramificación [64]. La máxima actividad se esta enzima se alcance a un pH de 5 y a una temperatura entre 37 y 57°C [65–67].

γ -amilasa. Estas enzimas son típicamente microbiales, presentes en arqueas, bacterias y hongos, no se encuentra en plantas ni animales. Fue la tercera amilasa

descubierta y se denominó γ -amilasa o también llamada glucoamilasa. Cataliza sucesivamente los enlaces α -(1,4), desde los extremos no reductores, y también actúa sobre los enlaces α -(1,6), produciendo glucosa como producto final. La glucoamilasa es obtenida industrialmente a partir de especies de hongos de los géneros *Aspergillus* y *Rhizopus*, mediante fermentación sumergida, utilizando una variedad de sustratos (almidón y derivados), a temperatura entre 30 y 35°C. Además, especies de bacterias de los géneros *Bacillus* y *Clostridium* la producen de manera natural. Esta amilasa tiene la característica de ser más eficiente en un ambiente ácido teniendo el valor de 3 como pH óptimo [54,63,68].

1.2.3.3. Almidón para bioetanol.

El almidón es una materia prima con altos rendimientos en la producción de etanol, pero se requiere de su hidrólisis para producir alcohol por fermentación. Tradicionalmente la hidrólisis se hacía con ácidos, pero las desventajas ecológicas que presenta este método, comparado con la hidrólisis enzimática, ha hecho que en la actualidad habitualmente se usen enzimas para realizarlo [69].

La despolimerización del almidón es llevada a cabo por la α -amilasa, la cual actúa sobre los enlaces glucosídicos α -(1,4), y por la glucosidasa, la cual rompe los enlaces α -(1,6). La velocidad y la extensión de la hidrólisis varían de acuerdo con el origen botánico del almidón; el grado de susceptibilidad a la amilasa; el tamaño del gránulo, su cristalinidad, porosidad, estructura y grado de integridad; la superficie expuesta y la relación amilosa-amilopectina. Las enzimas atacan más fácilmente las regiones amorfas que las láminas cristalinas. Los almidones gelatinizados son hidrolizados más rápidamente que los almidones nativos y retrogradados [56].

Convencionalmente los procesos industriales para convertir el almidón en oligosacáridos y glucosa tienen una alta demanda energética. En la licuefacción, el almidón primero se gelatiniza y luego se hidroliza a dextrinas y maltosas, mediante una α -amilasa termófila, generalmente de origen bacteriano. El proceso se realiza a altas temperaturas (95-105°C) y a un pH de 6.0-6.5. En la siguiente etapa de sacarificación la suspensión de almidón licuado se enfría, el pH se ajusta a 4.0-5.0, se añade la glucosidasa (glucoamilasa) para hidrolizar las dextrinas a moléculas de maltosa y glucosa y la temperatura se mantiene entre 60-65.5°C [70].

Como ya se mencionó, la principal fuente de almidón para la producción de biocombustible es el maíz, aunque actualmente diferentes sustratos son utilizados para la obtención de

bioetanol. En la Tabla 1.6 se presentan ejemplos de las especies vegetales utilizadas como fuente de almidón, así como su rendimiento.

Tabla 1.6. Producción de bioetanol a partir de diferentes fuentes de almidón.

Fuente de almidón	Producción potencial de bioetanol (L/t)
Maíz	360 ^a -500 ^b
Arroz	484 ^c
Sorgo	480 ^b
Avena	416 ^c
Trigo	340 ^a
Cebada	250 ^a
Ramón	213 ^d
Yuca	180 ^a
Papa	110 ^a

Fuentes: a.[6], b [71], c [45], d [72]

1.2.4. Procesos para la producción de etanol

La fermentación es el proceso realizado por las células para extraer energía de un material de partida, como carbohidratos. Los procesos de fermentación no consumen oxígeno, de ahí el concepto de que la fermentación debe ocurrir en entornos libres de oxígeno. La ausencia total de oxígeno no es requisito estricto para que ocurra la fermentación, pero el oxígeno no está involucrado en las reacciones químicas. Las características de los procesos de fermentación son las siguientes: la energía es producida, el oxígeno no se consume y la relación NADH/NAD⁺ no cambia por el proceso [73].

La fermentación alcohólica es el proceso biológico por el cual los azúcares son convertidos a etanol y dióxido de carbono (CO₂) por una variedad de microorganismos como bacterias, levaduras y hongos. Este proceso ocurre bajo condiciones anaeróbicas y semiaerobias y permite a los microorganismos obtener energía para su crecimiento [74,75].

La ecuación que representa este proceso es:



A pesar de que a nivel estequiométrico, parece una transformación simple, la secuencia de reacciones para degradar la glucosa a dos moléculas de piruvato, y posteriormente, bajo condiciones de anaerobiosis a dos moléculas de alcohol y dos de bióxido de carbono, es un proceso muy complejo; además al mismo tiempo los organismos fermentadores utilizan la glucosa y nutrientes adicionales para reproducirse o para la producción de otros metabolitos como glicerol (aproximadamente 1% p/v) y ácidos orgánicos. Para evaluar esta transformación, se usa el rendimiento biomasa/producto y el rendimiento producto/ substrato [76].

Rendimiento biomasa/substrato ($Y_{x/s}$): es el número de células producida por cantidad de substrato consumido.

Rendimiento producto/sustrato ($Y_{p/s}$): es la cantidad de producto sintetizado por cantidad de substrato consumido.

El rendimiento teórico estequiométrico para la transformación de glucosa en etanol, es de 0.511 g de etanol y 0.489 g de CO_2 por 1 g de glucosa. Este valor fue cuantificado por Gay Lussac. En la realidad, es difícil lograr este rendimiento, porque como se señaló anteriormente, la levadura utiliza la glucosa para la producción de otros metabolitos. El rendimiento experimental varía entre 90% y 95% del teórico, es decir, de 0.469 a 0.485 g/g. Los rendimientos en la industria varían entre 87 y 93% del rendimiento teórico [77].

La ruta de la fermentación es idéntica a la descrita para la glucólisis, excepto que no es catalizada por la enzima lactato-deshidrogenasa, sino realizada en dos etapas enzimáticas. En la primera etapa, el piruvato se descarboxila a acetaldehído y CO_2 por medio de la enzima piruvato-descarboxilasa que no se encuentra en los tejidos animales, esta descarboxilación es esencialmente irreversible. La piruvato-descarboxilasa precisa de Mg^{+3} y posee una coenzima unida íntimamente, el pirofosfato de tiamina. La descarboxilación del piruvato, se produce a través de una serie de intermediarios unidos covalentemente al pirofosfato de tiamina. En la etapa final de la fermentación alcohólica, el acetaldehído se reduce a etanol, el NADH^{H} aporta el potencial de reducción y la reacción es catalizada por la enzima alcohol-deshidrogenasa. El etanol y CO_2 son, por tanto, los productos finales de la fermentación alcohólica [78].

Los microorganismos comúnmente empleados en el proceso de fermentación son las levaduras, entre ellas, *Saccharomyces cerevisiae* es la especie más ampliamente utilizada.

Diversas cepas de esta especie son empleadas en diferentes procesos fermentativos (panificación, vinificación, elaboración de cerveza, etc.). Las características que hacen a esta levadura el principal organismo fermentativo son: alta resistencia a etanol; consumo de grandes cantidades de sustrato en condiciones adversas y tener gran resistencia a compuestos inhibitorios presentes en el medio de cultivo, además de que su manipulación genética se ha desarrollado robustamente. Desafortunadamente, debido a la ausencia de genes adecuados, esta especie no puede metabolizar azúcares de cinco carbonos (pentosas). Esta desventaja, ha inducido a la búsqueda de otros organismos y procesos para llevar a cabo la fermentación de sustratos hemicelulósicos [74,76].

Existen algunos reportes acerca de levaduras que pueden producir y excretar α -amilasa y glucoamilasa, por lo que tienen la capacidad de hidrolizar y fermentar el almidón. Dentro de este grupo están: *Cryptococcus tsukubaensis* (actualmente *Pseudozyma tsukubaensis*), *Filobasidium capsuligenum* (actualmente *Piskurozyma capsuligena*), *Lipomyces kononenkoeae*, *Lipomyces starkeyi*, *Pichia bispora* (actualmente *Wickerhamomyces bisporus*), *Saccharomycopsis capsularis*, *Schwanniomyces castelli* y *Trichosporon pullulans* (actualmente *Guehomyces pullulans*) [75].

Los avances recientes en la producción de bioetanol, se centran principalmente en mejoras tecnológicas para lograr un mayor rendimiento de etanol por unidad de biomasa, la integración de diferentes fases del proceso reduce el costo de capital y hace que la producción de biocombustibles sea más eficiente y económicamente viable. En la literatura, se identifican cuatro configuraciones de proceso para la producción de bioetanol.

1.2.4.1. Hidrolisis y fermentación por separado

El método convencional para la producción de etanol es la hidrólisis y fermentación por separado HFS (SHF, por sus siglas en inglés). En esta configuración, primero se lleva a cabo la hidrólisis enzimática para producir monosacáridos, azúcares que posteriormente son fermentados en otro reactor para producir etanol. Debido a la separación en dos etapas, cada una se realiza bajo condiciones óptimas [64], sin embargo, la excesiva acumulación de azúcares durante la hidrólisis inhibe la actividad enzimática reduciendo la eficiencia del proceso [79–81].

1.2.4.2. Sacarificación y fermentación simultánea

La desventaja presentada en la estrategia HFS llevó al desarrollo de la sacarificación y fermentación simultánea SFS (SSF, por sus siglas en inglés). En este proceso la hidrólisis y la fermentación ocurren en un mismo reactor, reduciendo la inhibición enzimática debido a la presencia de azúcares, ya que los monosacáridos producidos son consumidos inmediatamente por los microorganismos fermentadores [51,80,81]. Con esto, se puede alcanzar tanto una mayor tasa de hidrólisis como mayores concentraciones de etanol comparado con el proceso HFS. Esta estrategia requiere de menos equipos y una operación más simple, además la presencia de etanol en el mosto hace que sea menos susceptible a la contaminación por microorganismos no deseados [51,80–82].

Sin embargo, una desventaja de este método es que las condiciones óptimas de operación para la hidrólisis y la fermentación son diferentes, lo cual implica una dificultad para el control y la optimización del mismo. La hidrólisis enzimática se realiza de forma óptima a temperaturas superiores a los 50°C, mientras que para la mayoría de los microorganismos fermentadores la temperatura óptima para su desempeño está entre 28 y 37°C; de igual forma el pH óptimo para la etapa de hidrólisis y la de fermentación es diferente [51,80,81].

Se ha trabajado en la búsqueda y selección de enzimas y microorganismos adecuados para esta estrategia y una opción promisoría para superar esta dificultad es el uso de levaduras termotolerantes como *Kluyveromyces marxianus* que es una especie promisoría, ya que algunas de sus cepas crecen a temperaturas entre 45 y 52 °C, además poseen la habilidad de utilizar una amplia variedad de azúcares tales como: arabinosa, galactosa, manosa, rafinosa, sacarosa, lactosa y xilosa [83].

1.2.4.3. Sacarificación y co-fermentación simultánea

La sacarificación y co-fermentación simultánea SCFS (SSCF, por sus siglas en inglés) está orientada a la asimilación completa de todos los azúcares liberados durante el pretratamiento y la hidrólisis de la biomasa mediante el uso de cultivos mixtos de levaduras que puedan asimilar tanto las pentosas como las hexosas producidas. Esta estrategia ofrece la ventaja de que, al remover continuamente los productos finales de hidrólisis, los cuales inhiben la actividad de las celulasas y/o glucosidasas, se alcanza una alta productividad de etanol, dando mayor rendimiento que en el proceso SFS. Un inconveniente de este método, es que los organismos que usan hexosas crecen más rápido que los que utilizan pentosas por lo que son inhibidos por la alta concentración de etanol alcanzada. Otra variante para este método es

utilizar un organismo capaz de utilizar azúcares tanto de 5 como de 6 carbonos. Para alcanzar una conversión eficiente a etanol se pueden utilizar levaduras o bacterias modificadas genéticamente para realizar la fermentación tanto de pentosas como de hexosas [51,81,84,85].

1.2.4.4. Bioproceso consolidado

Las tecnologías de producción de etanol muestran una tendencia a la consolidación de los procesos. En los últimos años se ha venido investigando el bioproceso consolidado BPC, conocido inicialmente como conversión microbiana directa CMD (DMC, por sus siglas en inglés). La diferencia clave del BPC con otras estrategias de bioprosesamiento de biomasa, radica en el uso de un solo organismo o un consorcio de ellos para la producción de enzimas, la hidrólisis y la fermentación, las que generalmente se realizan a temperatura ambiente, lo que implica una reducción en los costos de producción [14,51,79,81,86]. Esto viene dado, por la reducción de uso de reactivos químicos, así como el nulo uso de enzimas. Además, la compatibilidad de los procesos hidrolíticos y fermentativos hace que sea requerido un solo reactor, lo que simplifica su operación. De hecho, un análisis comparativo de costos en la producción de etanol, considerando los gastos de inversión, materias primas, servicios públicos y pérdida de rendimiento, dio un costo estimado de US\$ 0.04/gal de etanol producido mediante BPC, en contraste con US\$ 0.19/ gal de etano producido por SCFS [51,79,86].

Aunque el BPC tiene grandes ventajas con respecto a los otros procesos de producción, los largos períodos de fermentación y los escasos rendimientos de biocombustibles, debidos a la formación de diversos subproductos (ácidos orgánicos), la sensibilidad de los microorganismos a los disolventes alcohólicos y el crecimiento limitado en el sobrenadante producto de la hidrólisis, dio como resultado la búsqueda de organismos más robustos, mediante el empleo de estrategias recombinantes, sin embargo, los organismos modificados generalmente tienen problemas relacionados con la tolerancia a solventes, la estabilidad genética y la productividad. Por lo tanto, continúa la búsqueda de organismos nativos capaces de realizar BPC o proporcionar genes que permitan, en un futuro, la modificación o creación de organismos que obtengan mejores rendimientos a escala comercial [79,86].

Estrategias para desarrollo de organismos para BPC

La producción de bioetanol mediante BPC requiere un organismo o consorcio de organismos que sea capaz de: producir un cóctel de enzimas hidrolíticas adecuado, sacarificación rápida de biomasa, la fermentación de múltiples azúcares simples (por ejemplo, glucosa, celobiosa,

xilosa) y la tolerancia a compuestos tóxicos derivados del pretratamiento y productos finales de fermentación. Encontrar o desarrollar este tipo de organismo se puede hacer a través de dos estrategias: nativa y la recombinante [82,87].

Estrategia nativa

La estrategia nativa se centra, en el estudio de organismos con la capacidad natural de producir diferentes enzimas y utilizar diversos sustratos con el objetivo de mejorar el rendimiento de los biocombustibles. Algunas metodologías, para mejorar las capacidades de bioprocesamiento, incluyen: evolución adaptativa o el desarrollo de sistemas de bioprocesamiento y fermentación, así como el continuo aislamiento y caracterización de nuevas cepas con capacidades de realizar BPC [88].

Las cepas nativas propuestas para ser utilizadas en BPC son principalmente cepas de tipo silvestre que de manera general están pobremente caracterizadas. A la fecha, sólo para algunas de ellas se han establecido herramientas de manipulación genética, y son pocos los casos en los que se ha investigado su metabolismo con profundidad. En lo que respecta a los hongos celulolíticos, la mayoría de los esfuerzos de ingeniería genética se han enfocado en aumentar la producción de celulasa, aunque existe un interés creciente en la producción de biocombustibles utilizando dichos organismos. Los candidatos para la estrategia nativa pueden clasificarse en tres grupos: hongos, bacterias que producen y excretan enzimas y bacterias formadoras de celulosomas [89–91].

Se ha explorado el potencial de diversos hongos filamentosos para ser utilizados en la producción directa de bioetanol, entre ellos están especies de los géneros *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Monilia*, *Neurospora*, *Fusarium*, *Trichoderma* y *Mucor* [92].

Fusarium oxysporum está entre las pocas especies que poseen la capacidad enzimática para romper la celulosa y hemicelulosa y simultáneamente realizar la fermentación de azúcares de 5 y 6 carbonos. Esta habilidad, le permite producir etanol a partir de residuos agrícolas y forestales en un solo paso. Se ha obtenido un rendimiento de 109 g de etanol/kg de residuos secos de la producción cervecera pretratados con álcalis [92].

Entre los basidiomicetos, los hongos de la podredumbre café y blanca son los más eficientes degradadores de material lignocelulósico, y juegan un papel importante en el reciclaje del carbono en la naturaleza. La capacidad de estos hongos de producir una variedad de enzimas, que se sintetizan dentro de la célula, y luego son excretadas, es usada para degradar polímeros complejos. Esta capacidad ha sido explotada en un amplio rango de aplicaciones

biotecnológicas desde la producción de papel, pretratamiento de biomasa lignocelulósica para mejorar el rendimiento de azúcares para biocombustibles, así como mejoras en los alimentos y el sector salud [93].

Los hongos de la podredumbre blanca son un grupo heterogéneo, abarcan aproximadamente el 90 % de todos los hongos de la podredumbre de la madera, existiendo alrededor de 10,000 especies, con diferentes capacidades de degradación de biomasa (lignina, celulosa y hemicelulosa, principalmente). Sin embargo, sólo unos cuantos han sido estudiados a fondo. Los más comúnmente investigados están agrupados en 6 familias del *Phylum* Basidiomycota: Phanerochaetaceae (*Phanerochaete chrysosporium*, actualmente *Phanerodontia chrysosporium*), Poliporaceae (*Trametes versicolor* y *Pycnoporus sanguineus*, actualmente *Trametes coccinea*), Marasmiaceae (*Lentinula edodes*), Pleurotaceae (*Pleurotus ostreatus* y *Pleurotus pulmonarius*), Hymenochaetaceae (*Inonotus hispidus* y *Phellinus igniarius*), Ganodermataceae (*Ganoderma lucidum* y *Ganoderma applanatum*), y Meruliaceae (*Bjerkandera adusta*, *Irpex lacteus* y *Phlebia radiata*) [94,95].

De ellas, una de las especies más estudiadas es *P. chrysosporium*, en la que se ha registrado la producción de numerosas enzimas como proteasas, xilanasas, amilasas y otras carbohidrolasas. Recientemente ha sido explorado el potencial de *Flammulina velutipes* en la producción de bioetanol en bioprocesos consolidados con resultados prometedores [96].

En 2011, Okamoto y col. [19] reportaron que el hongo de la pudrición blanca, *Trametes hirsuta* fue capaz de fermentar almidón, fibra de trigo y paja de arroz a etanol, sin que la biomasa requiriera de un pretratamiento ácido o de hidrólisis enzimática.

Trametes hirsuta es una especie de basidiomiceto clasificada en el *Phylum Basidiomycota*, Clase *Agaricomycetes*, Subclase *Insertae sedis*, Orden *Polyporales*. Los basidiomicetos, son reconocidos productores de una extensa batería de enzimas extracelulares, con la capacidad de hidrolizar diferentes sustratos complejos incluido el almidón [72, 11], lo cual los convierte en buenos candidatos para ser utilizados en un bioproceso consolidado [19,97].

Estudios recientes han reportado una alta concentración de proteínas en el micelio seco de *T. hirsuta*, por lo que el uso del subproducto del BPC representa una ventaja adicional de este método o proceso (Tabla 1.7).

Sin embargo, la mayor parte del trabajo en el desarrollo de microorganismos para BPC, a través de la estrategia nativa se ha centrado en bacterias celulolíticas anaerobias. Los

anaerobios celulolíticos nativos, tienen vías de fermentación ramificadas que producen una amplia variedad de productos en la fermentación, además del etanol, lo que reduce el rendimiento de etanol en la fermentación de azúcares. Por lo tanto, el objetivo principal de la estrategia con cepas nativas, es mejorar el rendimiento de etanol, eliminando las rutas ramificadas, además de aumentar la tolerancia al etanol y la utilización de hexosas y pentosas. Sin embargo, hasta la fecha, los organismos descubiertos con la capacidad de realizar BPC, están muy por debajo de las expectativas de una producción eficiente de alcohol.[82,87,89,90].

Tabla 1.7. Composición química del micelio de *Trametes hirsuta*.

Compuesto	Concentración (% base seca)
Proteína	26.0
Grasas	1.15
Carbohidratos	57.87
Cenizas	5.47

Fuente: [98].

Aparentemente, el co-cultivo de dos o más organismos diferentes (consorcio) aprovechando sus capacidades metabólicas específicas, un método prometedor para mejorar la conversión del sustrato y el rendimiento del etanol [89]. Un consorcio microbiano es una asociación de dos o más organismos, que actúan conjuntamente como una comunidad en un sistema complejo, donde todos se benefician de las actividades de los demás [99]. Los consorcios pueden clasificarse en naturales, artificiales y sintéticos. Los consorcios naturales son simbióticos que ocurren en la naturaleza como resultado de la co-evolución, en contraste, los consorcios artificiales y los consorcios sintéticos son sistemas de cultivos mixtos definidos, diferenciándose entre ellos, porque en los consorcios sintéticos se realizan modificaciones genéticas para lograr interacciones específicas entre cepas mixtas [100].

Estrategia recombinante

La estrategia recombinante tiene como objetivo dotar a los organismos fermentadores de la capacidad hidrolítica o a los hidrolíticos dotarlos de capacidad fermentativa. Por lo tanto, antes de diseñar microorganismos para la conversión de biomasa, es importante seleccionar organismos hospedantes con las características deseadas, con énfasis en las cepas que

pueden utilizar sustratos de bajo costo, que tengan resistencia al estrés ambiental y un alto rendimiento del producto deseado [82,87].

Los principales desafíos en la estrategia recombinante incluyen los efectos adversos de la co-expresión de múltiples genes no deseados, la modulación de la expresión de diferentes genes en los niveles apropiados, el plegamiento de proteínas inadecuado, que puede prevenir su secreción, además de una vía de fermentación no adecuada [82,91].

Los recientes avances en el desarrollo de microorganismos modificados, a través de enfoques de ingeniería evolutiva, metabólica y genética han allanado el camino para la utilización de biomasa lignocelulósica como sustrato para producción de biocombustibles. Sin embargo, la conversión de este tipo de biomasa en un sólo paso en biocombustibles y otros productos químicos, es aún un reto por alcanzar. El establecimiento de procesos de fermentación económicamente viables, requiere de un marcado incremento en la concentración de los productos finales, debido a las altas demandas energéticas en las etapas posteriores de recuperación del producto, así como de los costos de capital y producción asociados con los equipos de biorrefinería. Es importante señalar que, para obtener altos rendimientos en la producción de determinados compuestos, mediante la actividad de microorganismos metabólicamente optimizados, es necesario incrementar la carga de la biomasa lignocelulósica en los BPC. Este incremento, ocasionará que las concentraciones de inhibidores de la fermentación, liberados durante el pretratamiento de la materia lignocelulósica alcancen niveles elevados, que pueden afectar al o los microorganismos que realizan el proceso. Por ello para obtener altas concentraciones de los productos deseados, será requisito contar con microorganismos resistentes a los inhibidores. Para obtener este tipo de microorganismos, a partir de cepas celulíticas recombinantes o de cepas nativas, será necesario realizar modificaciones en su sistema de vías metabólicas intracelulares empleando herramientas avanzadas de ingeniería genética, como: vectores, controladores genéticos y enzimas caracterizadas. En un futuro próximo posiblemente se podrán diseñar mediante simulaciones en computadora basadas en datos de los perfiles metabólicos [101].

JUSTIFICACIÓN

El bioetanol es el biocombustible más importante en la actualidad, ya que además de ser considerado limpio, es renovable, por lo que es una opción para sustituir paulatinamente a los combustibles fósiles. Sin embargo, su costo de producción es elevado en comparación con los derivados del petróleo, situación que se ha acentuado con la reciente caída en los precios de los hidrocarburos perdiendo todavía más competitividad en el mercado.

Por ello, para disminuir los costos de producción de bioetanol y mantener la etiqueta de combustible verde, es necesario encontrar materias primas que cumplan con las características de un cultivo energético y establecer métodos de producción de bajo costo, altamente eficientes y dar un manejo adecuado a los residuos generados.

Por todo esto, se propone el uso de la harina de semillas de ramón (*Brosimum alicastrum*), como una materia prima viable para la obtención de bioetanol, ya que no se emplea en la alimentación humana, y es un árbol perenne, por tal razón juega un papel importante en la captura de CO₂. Además, esta especie presenta una amplia y abundante distribución en diferentes regiones del país, y hasta el momento no requiere de insumos para su producción. Para hacer la producción de bioetanol a partir de ramón más eficiente, se plantea la estrategia del bioproceso consolidado, el cual integra en un solo paso la producción de enzimas, la hidrólisis y la fermentación del sustrato, por uno o un grupo de organismos, disminuyendo así el costo de producción del bioetanol.

HIPÓTESIS

La cepa de *Trametes hirsuta* Bm-2 es capaz de producir bioetanol de forma directa a partir de la harina de las semillas de ramón (*Brosimum alicastrum*), debido a su capacidad de sintetizar y excretar enzimas y fermentar carbohidratos.

OBJETIVO GENERAL

Producir bioetanol a partir de harina de semillas de ramón (*Brosimum alicastrum*) en un bioproceso consolidado usando la cepa *Trametes hirsuta* Bm-2.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

- ✓ Determinar la capacidad amilolítica y fermentativa de la cepa de *T. hirsuta* Bm-2.
- ✓ Establecer las condiciones operativas de producción de bioetanol en un bioproceso consolidado (BPC).
- ✓ Caracterizar los subproductos obtenidos en el BPC para producción de bioetanol.
- ✓ Producir y caracterizar parcialmente el extracto enzimático de *T. hirsuta* Bm-2 usando harina de semilla de ramón como sustrato.
- ✓ Evaluar el sinergismo de la cepa de *T. hirsuta* Bm-2 y *Candida tropicalis* PL-1 durante el proceso de fermentación para optimizar la producción de bioetanol.

CAPITULO II MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Materia prima.

La materia prima utilizada en este trabajo fue harina de semillas de *B. alicastrum* (HSR). Las semillas fueron colectadas en diferentes localidades del estado de Yucatán, México, y fueron separadas de los restos del fruto (pericarpio) e impurezas, para posteriormente ser secadas en un horno de convección (Binder, Fed model 115®, Tüttlingen, Alemania) a 70°C por 72 h. Al término del secado se retiraron manualmente las testas de las semillas [21] y se procedió a molerlas en una licuadora comercial (Waring Comercial, Stamford, EUA); la harina obtenida se pasó por tamices de diferentes tamaños de malla (40, 80 y 120), obteniendo partículas con tamaño entre 0.125-0.250 mm.

2.1.1. Caracterización de la materia prima

Humedad. El análisis de la humedad de la HSR se realizó en tres muestras independientes de aproximadamente 0.5 g, utilizando una balanza para humedad (Ohaus modelo MB23, Parsippany, E.U.A.).

Microscopia electrónica de barrido (MEB). La estructura de la HSR recién obtenida y los cambios ocasionados en esta por el bioprocesamiento en ésta, se observaron en un microscopio electrónico de barrido modelo JSM-6360LV, JEOL (Tokio, Japón).

Las muestras de HSR sin tratar se colocaron en tubos metálicos utilizando una cinta adhesiva de doble cara y se recubrieron con una capa de oro de 15 nm y se observó a 20 kV a diferentes aumentos.

Después del bioprocesamiento, las muestras de HSR se fijaron con una solución de glutaraldehído al 2.5% en buffer de fosfato de sodio 0.02 M (pH 7.1) durante 48 h (24 h a temperatura ambiente y 24 h a 4°C). Posteriormente las muestras se sometieron a seis lavados, de 30 minutos en buffer de fosfato de sodio 0.02 M a 4°C, y luego se deshidrataron por inmersión en soluciones de alcohol al 30, 40, 50, 60, 70, 85, 95 y 100% v/v, dos veces durante 30 minutos min. Las muestras se secaron a punto crítico con CO₂ a 1060 mbar y 33°C [102] y se colocaron en la cinta adhesiva de la misma forma descrita en el párrafo anterior.

Análisis elemental (C, H, N y S). La determinación cuantitativa de C, H, N y S se llevó a cabo en un equipo Thermo Scientific Elemental Analyzer Flash 2000 (Thermo Scientific, Waltham, EUA). Las pruebas se realizaron por triplicado y se reportó el valor promedio de las mediciones [103].

FT-IR. Los grupos funcionales en la HSR y los cambios ocurridos luego del BPC, fueron caracterizados mediante espectroscopia FT-IR (infrarrojo con transformada de Fourier) utilizando el equipo Bruker modelo Tensor II (Milton, Canadá), con el accesorio de reflectancia total atenuada (ATR por sus siglas en inglés). Se realizaron 32 barridos con una resolución de 4 cm^{-1} en la región de $500\text{ a }4000\text{ cm}^{-1}$ [104,105].

Análisis termogravimétrico (ATG). La caracterización termal se realizó con el equipo Perkin Elmer TGA 8000 (Waltham, EUA). La curva TG y su forma derivada (DTG) se obtuvieron con muestras de HSR de 10 mg en atmósfera de nitrógeno con un flujo de 10mL/min y una rampa de calentamiento de $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ a partir de 25°C hasta 700°C [1,103].

Contenido de almidón. El contenido de almidón fue calculado de acuerdo con la metodología reportada por Olguin-Maciel y col. [72].

Concentración de proteínas. El contenido de proteína fue determinado de forma indirecta mediante el cálculo $N \times 6.25$ donde:

N = Contenido de nitrógeno total en la muestra

6.25 = Factor de Jones [106,107].

Contenido de compuestos fenólicos totales. La concentración de compuestos fenólicos totales se determinó por el método Folin-Ciocalteu [108] a una longitud de onda de 740 nm, en el equipo Eppendorf BioSpectrometer® basic (Hamburgo, Alemania). La concentración fue expresada como mg/mL de ácido gálico equivalente.

Concentración de azúcares reductores. Los azúcares reductores se cuantificaron mediante el método de Miller [109] con ligeras modificaciones [1]. A 0.1 mL de muestra (utilizando una dilución adecuada) se le adicionaron 0.9 mL de agua destilada y 1.5 mL de ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS). La mezcla se hirvió durante 5 minutos, se disminuyó la temperatura en un baño de agua fría, e inmediatamente se agregaron 7.5 mL de agua destilada. Se leyó la absorbancia a una longitud de onda de 550 nm, en un equipo Eppendorf BioSpectrometer® basic y la concentración se determinó calculando los valores con una curva estándar de glucosa.

2.2. Material biológico

2.2.1. *Trametes hirsuta* Bm-2

La cepa utilizada fue *T. hirsuta* Bm-2, la cual fue aislada y caracterizada por Tapia-Tussell y col. [110]. Para este trabajo la cepa fue mantenida mediante resiembras periódicas en cajas Petri con medio estéril (HSR) consistente en HSR/agua destilada al 16% (p/v).

Preparación del inóculo

En matraces Erlenmeyer de 250 mL se prepararon 100 mL de medio de cultivo de harina de semillas de ramón-extracto de levadura (HSREL; anexo 1A). Los matraces se taparon con torundas de algodón y doble hoja de papel aluminio y se esterilizaron, a presión constante de 0.1 MPa, 121°C por 20 minutos en una autoclave Yamato Sterilizer®, modelo SM510 (Tokio, Japón). Al término de la esterilización, los matraces se enfriaron a temperatura ambiente (25°C) y se inocularon con dos discos de micelio, de 1 cm de diámetro, obtenidos de un cultivo de *T. hirsuta* Bm-2, crecido por 5 días en cajas Petri con medio HSR. Los matraces se incubaron a $32 \pm 2^\circ\text{C}$ y 150 rpm por 6 días. Durante ese período se tomaron muestras (1 mL de sobrenadante) diariamente para evaluar la actividad enzimática. Después de los 6 días de incubación la suspensión de HSR y micelio se homogenizó con un dispersador modelo T18 digital ULTRA-TURRAX®, IKA® (Staufen, Alemania), y fue utilizada como inóculo en los posteriores experimentos.

2.2.2. *Candida tropicalis* PL-1

La levadura utilizada en este trabajo fue *C. tropicalis* PL-1 que fue aislada del pericarpio del fruto del ramón (*B. alicastrum*) e identificada morfológica y molecularmente por Huchin [111]. La levadura crioconservada fue reactivada en medio GELP (glucosa, extracto de levadura, peptona; anexo 1B), y se mantuvo viable mediante resiembras periódicas en medio GELPA (medio GELP adicionado con 20g/L de agar).

Preparación de inóculo

Se preparó medio GELP, y se dispensaron 8 mL en tubos de ensayo de 15 mL, y se esterilizaron, a presión constante de 0.1 MPa, 121°C por 20 minutos en una autoclave Yamato Sterilizer®, modelo SM510. Al término de la esterilización, los tubos se enfriaron a temperatura ambiente (25°C) y se inocularon con 0.5 mL de una suspensión celular obtenida al agregar un 1 mL de agua estéril a un cultivo de 24 h de *Candida tropicalis* PL-1 en placa de GELPA. Los

tubos ya inoculados se incubaron a 30°C en agitación (150 rpm) durante 6 horas en una incubadora rotatoria modelo ZHWY-200D (Zhicheng, Shanghai, China) y posteriormente se realizó el conteo celular en una cámara Neubauer [72].

2.3. Evaluación del comportamiento de *Trametes hirsuta* Bm-2

2.3.1. Ensayos enzimáticos

Actividad α -amilasa

Para estudiar la capacidad de la cepa Bm-2 de sintetizar y excretar enzimas hidrolíticas se inocularon placas de medio de cultivo extracto de levadura-almidón-agar (ELAA; anexo 1C) con un disco de 1 cm de diámetro de micelio, obtenido de un cultivo de *T. hirsuta* Bm-2, crecido 5 días en cajas Petri con medio HSR. Las placas ya inoculadas se incubaron a $32 \pm 2^\circ\text{C}$, y su actividad amilasa se evaluó cada 48 h durante 6 días. Las cajas se cubrieron con solución de lugol (Sigma-Aldrich, San Luis, EUA), con el fin de observar la presencia de halos claros alrededor del micelio, como resultado de la hidrólisis del almidón del medio de cultivo por la α -amilasa excretada por el hongo. [112].

La actividad α -amilasa se determinó por el método descrito por Ahmed y col. [113], con ligeras modificaciones [1]. La mezcla para el análisis consistió de 0.5 mL de almidón soluble de papa (1%) (Sigma-Aldrich, San Luis, EUA) en buffer de acetato de sodio 0.1 M (pH 5.0) como sustrato y 0.5 mL de muestra (extracto crudo diluido al 50%). La mezcla se incubó durante 20 min a 40°C, deteniendo la reacción al colocar las muestras a 4°C. La hidrólisis del almidón fue determinada a través de la cuantificación de glucosa producida por el método de DNS de Miller [109]. La cantidad de enzima producida fue expresada como U/mL, definiendo una unidad enzimática como la cantidad de enzima que libera un μmol de azúcares reductores equivalente a glucosa por min bajo las condiciones del ensayo.

Actividad lacasa

Placas de medio extracto de malta-agar al 2% (EMA: anexo 1D), se inocularon con un disco de micelio de 5 días de crecimiento de 1 cm de diámetro, obtenido de un cultivo de *T. hirsuta* Bm-2, crecido 5 días en cajas Petri con medio HSR, y se incubaron a $32 \pm 2^\circ\text{C}$ por 4 días. Un resultado positivo está dado por la formación de un halo verde alrededor del micelio por acción de la enzima lacasa oxidando el reactivo ABTS [110].

La actividad lacasa se midió por oxidación de ABTS (ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6 sulfónico). La mezcla de reacción contenía 100 μ L de buffer de acetato de sodio 1 M (pH 4.5) y 100 μ L de ABTS (5 mM), 100 μ L de agua destilada y 100 μ L de extracto crudo en diluciones 1/100 y 1/1000, para un volumen total de reacción de 1 mL. La mezcla se incubó a 40°C durante 20 min. La oxidación del ABTS se midió por el incremento de la absorbancia a 420 nm [114]. Una unidad de enzima (U) es definida como la cantidad de enzima necesaria para oxidar 1 μ mol de ABTS por min bajo las condiciones del ensayo. La cantidad de enzima producida fue expresada como U/mL. Una unidad de enzima (U) es definida como la cantidad de enzima necesaria para oxidar 1 μ mol de ABTS por min bajo las condiciones del ensayo. La cantidad de enzima producida fue expresada como U/mL.

2.3.2. Tolerancia a etanol

La tolerancia a etanol fue evaluada en placas de medio extracto de levadura-malta-agar suplementado con 8% de glucosa (p/p) (YMA: anexo 1E). El medio se esterilizó, se dejó enfriar a 45-50°C e inmediatamente se añadió el volumen requerido de etanol absoluto tibio para tener concentraciones de 6 a 14% (v/v) con incrementos seriales de 1%. Cada una de las placas se inoculó con un disco de micelio de 1 cm de diámetro, y se incubaron a $32 \pm 2^\circ\text{C}$. La evaluación se realizó después de 10 días de incubación [115].

2.3.3. Fermentación de diversas de fuentes de carbono

Para determinar la capacidad fermentativa de *T. hirsuta* Bm-2 se siguió la metodología de Yarrow [116]. En tubos de ensaye de 150 x 120mm y con tapa de rosca se dispensaron 2mL del medio basal de Wickerham (anexo 1F) y se les agregó un tubo de Durham (50 x 6 mm) de forma invertida. Los tubos se esterilizaron (120°C, 20 min, 0.1 MPa); ya fríos se les adicionó asepticamente 1 mL de la solución acuosa de la fuente de carbono (6% p/v esterilizada por microfiltración). Los carbohidratos probados fueron xilosa, fructosa, rafinosa, sacarosa, maltosa, galactosa, glucosa y almidón. Es importante mencionar que para la rafinosa la solución se preparó al doble de la concentración (12% p/v). En el caso del almidón soluble, que no es posible esterilizar por microfiltración, se preparó una solución acusa al 0.5% y 2 mL de ésta se dispensaron en tubos de ensaye conteniendo el tubo de Durham, se esterilizaron y ya fríos se les adicionó 1 mL de medio basal de Wickerham con doble de concentración sus componentes. Cada tubo se inoculó con un cuadro de 0.5 mm² de micelio de un cultivo de *T. hirsuta* Bm-2 en HSR de 5 días de crecimiento y se incubaron a 36°C sin agitación.

2.4. Producción y caracterización parcial del extracto enzimático

En matraces Erlenmeyer de 250 mL se agregaron 100 mL de una suspensión HSR/agua destilada, con diferentes porcentajes de carga y valores de pH los que se detallan en la Tabla 2.1. Luego de ajustar el pH con una solución 1M de HCl los matraces se taparon con torundas de algodón y doble hoja de papel aluminio y se esterilizaron, a presión constante de 0.1 MPa, 121°C por 20 minutos. Al término de la esterilización, las mezclas se enfriaron a temperatura ambiente (25°C) y se inocularon con dos discos de micelio de 1 cm de diámetro. La incubación se llevó a cabo a 150 rpm. Se tomaron muestras de un mL cada 24 h, por 4 días, para medir la actividad α -amilasa y lacasa.

Tabla 2.1. Diferentes condiciones de temperatura, cargas de HSR y pH utilizados para la producción de extractos enzimáticos a nivel matraz.

Temperatura °C	Carga de HSR %	pH
32, 35 y 38	2	4.5
		5.0
		5.5
	5	4.5
		5.0
		5.5
	8	4.5
		5.0
		5.5

2.4.1. Producción de extracto enzimático en reactor agitado tipo Airlift

Se utilizó un biorreactor agitado por aire tipo Airlift de 2L (Marca SEV, Puebla, México) (Figura 2.1) con objeto de aumentar el volumen de producción de las enzimas. El biorreactor se esterilizó (120°C, 20 min, 0.1 MPa) y ya frío se le agregaron 1.2 L de medio estéril HSR/agua al 5% p/v y 0.5 mL de antiespumante y se inoculó con 1 disco de micelio de 1 cm de diámetro de *T. hirsuta* por cada 50 mL de medio (24 discos en total). La aireación se realizó con una bomba de aire modelo AC-9602 (Resun, Longgang, China), a razón de 4 L/min, el cual fue inyectado a través de un filtro de politetrafluoroetileno estéril de 0,2 μ m de tamaño de poro. El cultivo se realizó durante 5 días (28°C), al término de los cuales la biomasa fúngica se separó

por filtración y la parte líquida se tomó como extracto crudo, el que se almacenó a 4°C para su análisis posterior. El experimento se realizó dos veces.



Figura 2.1. Producción de extracto enzimático por *T. hirsuta* Bm-2 en un reactor tipo Airliff de 2 L, utilizando HSR/agua al 5% (p/v) como sustrato.

2.4.1.1. Efecto del pH y temperatura en la actividad enzimática del extracto crudo.

Para determinar el pH óptimo para la actividad de las α -amilasa y lacasa se evaluaron valores en un rango de 4 a 6. Un mL de extracto enzimático se mezcló con 1 mL de las diferentes soluciones amortiguadoras y se mantuvieron a una temperatura de 25°C durante 4 h al término de las cuales se midió la actividad enzimática. Las soluciones amortiguadoras utilizadas se describen en la Tabla 2.2 [117].

Tabla 2.2 Soluciones amortiguadoras utilizadas para la evaluar el pH óptimo para la actividad enzimática de α -amilasa y lacasa

Solución amortiguadora	pH				
	4.0	4.5			
Ácido cítrico-fosfato	4.0	4.5			
Acetato de sodio-ácido acético		4.5	5.0		
Ácido cítrico-citrato de sodio			5.0	5.5	
Fosfatos				5.5	6.0

Para investigar el efecto de la temperatura y determinar las mejores condiciones de operación para ambas enzimas, se incubó una mezcla de 1 mL de extracto crudo y 1 mL de solución amortiguadora de fosfatos 0.1 M (pH 7) a diferentes temperaturas (25, 30, 35, 40, 45, 50, 65 y 80°C) durante 3.5 h. Posteriormente se determinaron las actividades amilasa y lacasa como se describe en la sección de ensayos enzimáticos [117,118].

2.5. Condiciones del bioproceso consolidado (BPC).

Los experimentos de BPC se realizaron en matraces Erlenmeyer de 250 mL, con 100 mL de una suspensión de HSR/agua destilada con diferentes porcentajes de carga (10, 12, 14, 16, 18 y 20% p/v). Los matraces se taparon con torundas de algodón y doble hoja de papel aluminio y se esterilizaron. Los matraces se enfriaron a temperatura ambiente (25°C) y a cada uno se le agregó 1 mL de inóculo de *T. hirsuta* Bm-2, y se incubaron a 32 ± 2°C durante 12 días sin agitación en una cámara de secado (Binder, Fed model 115®, Tuttlingen, Alemania). En una primera evaluación se determinó la mejor carga de HSR, en términos de mayor rendimiento de etanol por gramo de HSR, mediante un análisis de varianza (ANOVA) de una vía y prueba de medias de Tukey $\alpha=0.05$, utilizando el software SPSS 16 © SPSS Inc (IBM, Armonk, EUA). Se tomaron muestras al final de BPC y fueron destiladas siguiendo la metodología que se describe en el siguiente inciso.

En una segunda etapa, se procedió a repetir el experimento, con una carga del 14% de HSR p/v, monitoreando diferentes parámetros (liberación de glucosa, producción de etanol y evaluación de la actividad enzimática) tomando muestras del sobrenadante periódicamente (48, 96, 144, 192, 240 y 288 h).

Al final del BPC, el micelio se retiró del matraz y se lavó con agua destilada tres veces. La fracción líquida y la HSR residual se separaron por filtración al vacío. El líquido recuperado se almacenó a 4°C para su posterior análisis. Tanto el micelio recuperado como el HSR residual se secaron a 70°C hasta un peso constante y se trituraron y tamizaron en una malla No. 40 [119]. Se determinó el contenido de almidón [72] en el residuo de HSR y el contenido de proteína [106,107] tanto en el residuo de HSR como en el micelio producido durante el BPC.

2.6. Condiciones de cultivo en la evaluación de la sinergia fermentativa de *T. hirsuta*-*C. tropicalis* PL1.

Los experimentos se llevaron a cabo en matraces Erlenmeyer de 250 mL, que contenían 100 mL de una suspensión de HSR/agua destilada al 14% p/v, tapados con torunda de algodón y

doble hoja de papel aluminio, los que se esterilizaron bajo las condiciones ya señaladas. A los matraces enfriados a temperatura ambiente (25°C) se les agregó 1 mL de inóculo de *T. hirsuta* Bm-2, y se incubaron a $32 \pm 2^\circ\text{C}$ sin agitación. Una vez determinada la cinética de crecimiento y producción de α -amilasa por parte del hongo en pruebas previas en este mismo trabajo, se estableció el retiro del micelio del hongo a los 5, 6 y 7 días de incubación, cambiando a incubar los matraces con agitación (100 rpm) a la misma temperatura por 48 h para promover la actividad enzimática. Pasados los dos días de incubación se inocularon los matraces con 4 mL (4% v/v) del inóculo de *C. tropicalis* PL-1, con una concentración de 3.46×10^7 cel/mL, y se incubaron en condiciones estacionarias por dos días, realizando muestreos de la concentración de etanol y glucosa cada 12 horas. El producto de la fermentación se centrifugó a 4000 rpm por 10 min, y el sobrenadante fue colectado para su destilación [72]. Se tomaron 25 mL del sobrenadante y se le añadieron 25 mL de agua destilada; esta mezcla se transfirió a un matraz de bola de 100 mL de capacidad y se le agregaron 8 perlas de ebullición. La destilación se realizó a 95°C hasta recuperar un volumen de 25 mL [120]. Todos los experimentos se realizaron por triplicado.

2.7. Determinación de la concentración de etanol y glucosa.

Todas las muestras tomadas durante el desarrollo del BPC se filtraron con membranas estériles de 0.2 μm y analizadas para cuantificar glucosa y etanol mediante HPLC (1260 Infinity II, Agilent, Santa Clara, CA, USA). Se utilizó una columna Metacarb 87 H de 300 x 7.8 mm (Agilent, Santa Clara, CA, USA) bajo las condiciones siguientes: se utilizó H_2SO_4 (0.005 M) como fase móvil, con un flujo de 0.7 mL/min, y una temperatura de la columna de 60°C. El volumen inyectado fue de 20 μl por muestra. Las concentraciones de azúcares y etanol se determinaron según las curvas de calibración de estos compuestos puros [121].

Para la determinación del etanol en la evaluación de las cargas de HSR para el BPC y las muestras fermentadas por la levadura *C. tropicalis* PL-1, se utilizó un cromatógrafo de gases Perkin Elmer (Waltham, MA, USA), equipado con un detector de ionización de flama (FID por sus siglas en inglés) y columna capilar EC-WAX (300 m x 0.32 mm \varnothing). El gas acarreador fue nitrógeno a 7 psi y 80 mL/min. La temperatura del inyector fue de 150°C y la temperatura del FID fue de 200°C. El volumen de muestra inyectado fue de 1 μL . Un estándar externo de etanol puro fue usado para la cuantificación de alcohol en las muestras [72].

CAPITULO III RESULTADOS Y DISCUSION

3.1. Evaluación del comportamiento de *Trametes hirsuta* Bm-2

3.1.1. Actividad enzimática

En un primer acercamiento se evaluó la capacidad de la cepa *Trametes hirsuta* Bm-2 de producir α -amilasa, enzima utilizada en la hidrólisis del almidón, así mismo se estudió la producción de la enzima lacasa, la cual está asociada a los Basidiomicetos, grupo de hongos reconocido como el más relevante en la producción de esta enzima [122].

Cuando las placas con medio ELAA se inundaron con solución lugol, se observaron halos claros alrededor del micelio de *T. hirsuta* Bm-2 desde las primeras 48 horas hasta las 144 h, Figura 3.1B, donde se observa una placa teñida con lugol, con una zona de hidrólisis, debido a la secreción de la α -amilasa.

La α -amilasa es producida por diferentes microorganismos, pero comercialmente el género *Bacillus* es considerado como la principal fuente de esta enzima. En el caso de los hongos, los reportes están limitados a pocas especies, mayormente de los géneros *Aspergillus* y *Penicillium* [123]. En el caso de los basidiomicetos hay pocos reportes sobre la producción de esta enzima, dado que principalmente se les usa por su reconocida capacidad de producción de enzimas ligninolíticas. Sin embargo, es importante señalar que la producción de enzimas está influenciada por los componentes del medio; en el caso de la α -amilasa, su síntesis es inducida por la presencia de almidón o sus productos de hidrólisis como dextrinas y maltosa [124,125], compuestos que se encuentran en la HSR.

En la Figura 3.1C, se observa un halo verde oscuro alrededor del micelio de *T. hirsuta* Bm-2, como resultado de la oxidación del indicador ABTS. La coloración alrededor del micelio, indica la excreción y actividad de la enzima lacasa, concordando con lo mencionado en trabajos previos donde se utilizó la misma cepa [108,110] *T. hirsuta* pertenece a un grupo de basidiomicetos causantes de la pudrición blanca, los cuales poseen la habilidad de romper biomasa lignocelulósica, debido a la producción de dos sistemas enzimáticos: (1) un sistema hidrolítico el cual produce celulasas y hemicelulasas las cuales degradan polisacáridos; y (2) un sistema ligninolítico el cual degrada lignina y anillos fenólicos, y que sintetiza las enzimas manganeso peroxidasas, ligninoperoxidasas y lacasas [126].

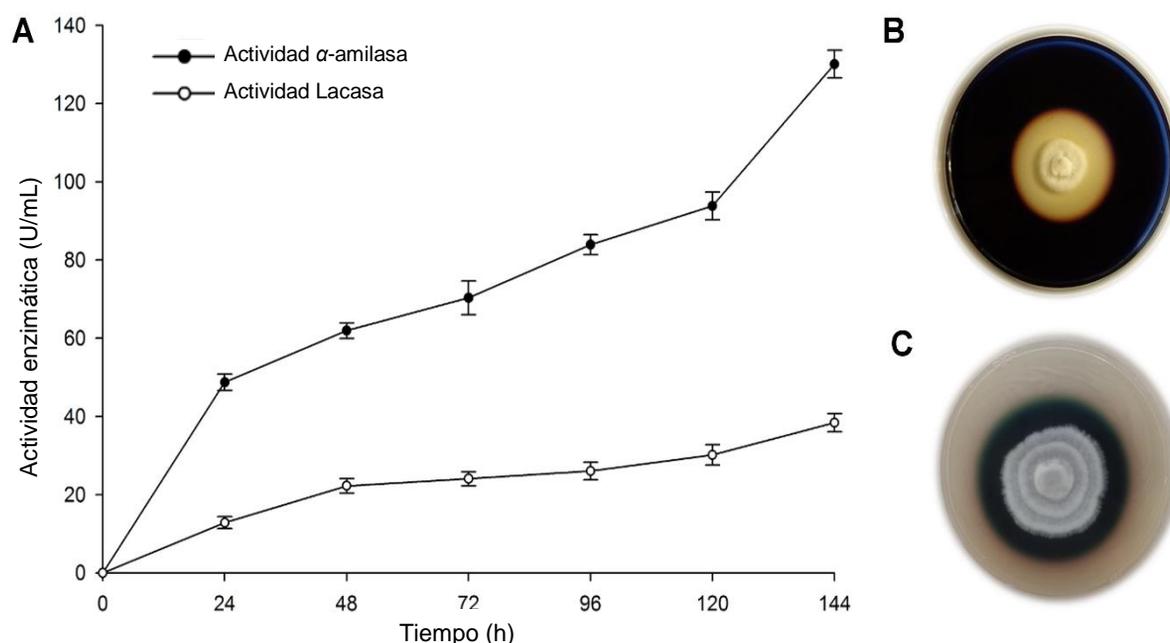


Figura. 3.1. Prueba de actividad enzimática de la cepa *T. hirsuta* Bm-2. A) Cuantificación de la actividad α -amilasa y lacasa, B) actividad amilolítica en placa de ELAA incubada a 32°C por 144 h, teñida con lugol en la que se observa un halo claro producto de la hidrólisis del almidón contenido en el medio, C) actividad lacasa en placa de EMA incubada a 32°C por 96 h, en la que se observa la oxidación del reactivo ABTS.

Además, se cuantificó la actividad de las enzimas α -amilasa y lacasa. La Figura 3.1A muestra los perfiles de la actividad enzimática durante el cultivo de *T. hirsuta* Bm-2. La producción de α -amilasa alcanzó su nivel máximo a las 144 h de crecimiento, con una concentración de 135 U/mL. Este tiempo de producción concuerda con Pervez y col. [127] quienes mencionaron que los hongos, producen las amilasas en el período de 3 a 7 días (72 y 168 h respectivamente) de incubación. Hay pocos reportes de producción de amilasa por basidiomicetos; Han y col. [128] encontraron una actividad enzimática de 267 U/g en *Ganoderma lucidum*, mientras que Okamoto y col.[19] y Vasina y col. [129] determinaron la capacidad amilolítica de *T. hirsuta*. La comparación de los niveles de actividad amilasa se hace difícil debido a las diferentes metodologías usadas para determinar dicha actividad, diversas formas de expresar la concentración de la enzima y las distintas formas de definir una unidad enzimática [124].

La capacidad de *T. hirsuta* Bm-2 de producir α -amilasa y excretarla al medio, contribuye a la producción de etanol en un BPC a partir de almidón, con la ventaja de reducir los costos derivados del precio de las enzimas comerciales, así como disminuir de la energía requerida

en el proceso, dado que la enzima muestra actividad en el mismo rango de temperatura de crecimiento del hongo que en este caso fue de $32 \pm 2^\circ\text{C}$.

La cuantificación de la actividad lacasa tuvo un valor de 40 U/mL (Figura 3.1A). Este valor es bajo, si consideramos la habilidad de los basidiomicetos causantes de la pudrición blanca para producir esta enzima, como ya se mencionó. Sin embargo, se debe considerar que el medio para preparar el inóculo utilizado en este estudio es rico en almidón, el cual induce la producción de α -amilasa, mientras que la producción de lacasas, es inducida por compuestos aromáticos, como fenoles, asociados a la lignina, como fue comprobado por Tapia-Tussell y col [110] y Zapata-Castillo y col. [130] quienes obtuvieron actividades de 2543.7 y 2496 U/mL después de 144 y 96 horas de cultivo, respectivamente, en presencia de ácido ferúlico, vanillina y guaiacol y fibra de trigo, mientras que con bajas concentraciones de este tipo de compuestos obtuvieron una baja actividad lacasa, con valores de 234.7 y 178 U/mL respectivamente.

3.1.2. Tolerancia a etanol.

Durante el proceso de fermentación, el etanol producido puede inhibir el crecimiento y viabilidad de los microorganismos, alterando la membrana celular, así como las proteínas receptoras asociadas a ella. [131,132]. La mayoría de los estudios de la tolerancia de etanol, se han llevado a cabo utilizando levaduras. Sin embargo, hay evidencia del efecto del etanol sobre otros grupos de hongos, Paschos y col. [133] mencionan que en *Phanerochaete crisosporium* el etanol produce cambios en la morfología de su pared celular; y que una concentración de 0.5-2 v/v de dicho alcohol disminuye la secreción de celulasas por *Trichoderma reesei*. Una alta tolerancia al etanol es deseable para lograr alcanzar altas concentraciones de etanol. En la Figura 3.2 se observa el crecimiento de *T. hirsuta* Bm-2 en placas de YMA adicionado con 8% de glucosa y con concentraciones de 0, 10, 11, 12, 13 y 14% (v/v) de etanol a los 10 días después de haberlo inoculado. *T. hirsuta* Bm-2 fue capaz de crecer en la concentración del 10% (v/v), cubriendo el total de la superficie de la placa a los 5 o 6 días de incubación, al igual que el control sin etanol. En las placas C (11%) y D (12%) se observa que el micelio del hongo cubrió parcialmente la superficie de las placas, 7.5 y 6 cm de diámetro, respectivamente, mientras que en la placa E (13%) y F (14%) el crecimiento fue incipiente o nulo respectivamente. Estos resultados son similares a los obtenidos por Okamura y col. [134] quienes reportaron el crecimiento del basidiomiceto *P. crisosporium* en concentraciones de 12.2% (v/v) de etanol. Este nivel de tolerancia de *T. hirsuta* es comparable

al obtenido con cepas de *Saccharomyces cerevisiae*, la cual es la levadura más tolerante a etanol que se conoce (concentraciones de 15% v/v) [135,136].

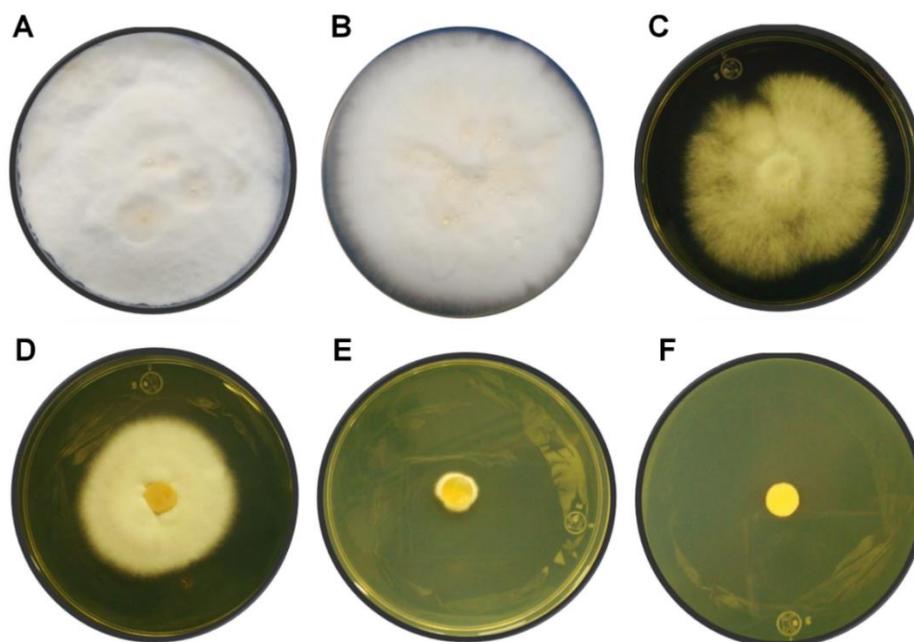


Figura. 3 2. Prueba de tolerancia a etanol de *Trametes hirsuta* Bm-2 en medio YMA adicionado con 8% de glucosa a 10 días de incubación a 32°C. A) Control sin etanol, B) 10% (v/v), C) 11 % (v/v), D) 12 % (v/v), E) 13 % (v/v) y F) 14 % (v/v) de etanol absoluto.

3.1.3. Capacidad fermentativa

Los resultados no pudieron ser determinados conforme a la metodología prevista, ya que el resultado positivo, consiste en observar el desplazamiento del medio de fermentación dentro del tubo de Durham y detectar la presencia de burbujas de CO₂ en el tubo de fermentación. Debido al gran crecimiento de *T. hirsuta* Bm-2, no fue posible hacer las observaciones mencionadas ya que el micelio cubrió toda la superficie del tubo de Durham y la del tubo de ensaye. No obstante, el crecimiento vigoroso del hongo sobre todos los sustratos brindó información de su capacidad de asimilarlos y en cuanto a la capacidad fermentativa quedó manifestada al momento de abrir los tubos, ya que se percibió la liberación de gases en todas las muestras. Estos resultados (Tabla 3.1), concuerdan con los obtenidos por Okamoto y col. [18,137] quienes en sendos trabajos determinaron la capacidad de asimilación y fermentación de diferentes fuentes de carbono (manosa, fructosa, galactosa, sacarosa, maltosa, celobiosa, glucosa y xilosa) por parte de los basidiomicetos: *Peniophora cinerea*, *Trametes suaveolens*

y *Trametes versicolor*. En ambos estudios se utilizó el medio T (anexo 1G), para el crecimiento de los hongos, en el cual la glucosa se sustituyó por las diferentes fuentes de carbono.

Tabla 3.1. Fermentación de diferentes fuentes de Carbono por *T. hirsuta* Bm-2.

Fuente de Carbono	Fermentación
Glucosa	+
Galactosa	+
Fructosa	+
Xilosa	+
Sacarosa	+
Maltosa	+
Almidón	+
Rafinosa	+

+ positivo, - negativo.

A las 96 h de incubación, en los tubos de fermentación en cultivo sumergido (condiciones anaeróbicas) no se observó crecimiento del hongo, por lo que se procedió a extraer el micelio del medio y colocarlo en la pared del tubo sobre la superficie del líquido de fermentación, bajo condiciones aerobias, con lo cual se promovió el crecimiento rápido del micelio desde las primeras 12 horas, lo que indicó que *T. hirsuta* Bm-2 es capaz de mantenerse latente sumergido en el medio, pero no es capaz de crecer en ausencia de oxígeno.

3.2. Producción de etanol mediante bioproceso consolidado con *T. hirsuta* Bm-2.

La evaluación de las cargas de HSR en el rango de 10 a 20% (p/v), demostró que el hongo es capaz de crecer en todas las concentraciones probadas, sin embargo, a partir del 16% de carga, se observó una disminución en la velocidad de crecimiento tomando de 192 a 216 h después de la inoculación para cubrir con micelio la totalidad de la superficie del medio de cultivo. En el caso de la concentración del 10% el hongo no creció adecuadamente debido a la consistencia acuosa del medio, y a la concentración del 12% (p/v), creció rápidamente las primeras horas, pero su crecimiento se detuvo entre las 120 y 144 h, después de ser inoculados, este crecimiento pudo deberse a la disponibilidad de azúcares presente en la fase acuosa de la superficie. Tomando esto en consideración sólo se evaluaron hasta el final del BCP (288 h) los porcentajes de carga de 12, 14 y 16 (Figura 3.3A). En estas cargas, el hongo

cubrió la superficie del medio de cultivo entre las 120 y 144 h, y a partir de este tiempo se apreció la formación de una fase acuosa por debajo del micelio. (Figura 3.3B)



Figura. 3.3. Producción de etanol a partir de una suspensión de harina de semillas de ramón, *Brosimum alicastrum*, en un BPC. A) 120 h después de inoculación con 12, 14 y 16% p/v, y B) 288 h después de inoculación con 14% p/v.

La determinación de etanol en estas tres cargas, permitió conocer que, estadísticamente, en la carga del 14% (p/v) hubo una mejor conversión de la HSR en etanol, produciendo 0.091 g de EtOH/g de HSR (Figura 3.4), por lo cual, se decidió usar esta concentración para llevar a cabo todos los análisis propuestos. El crecimiento del hongo se hizo hasta las 288 h, debido a que, en todas las pruebas preliminares a partir de este tiempo, el hongo comenzaba a crecer por las paredes y consumía el azúcar del medio sin aumento de la concentración de etanol.

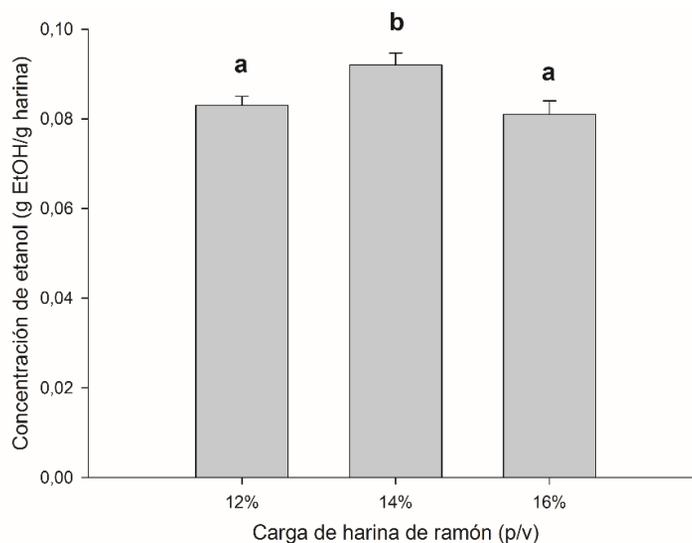


Figura 3.4. Cargas de HSR (12, 14 y 16% p/v) y concentración de etanol (g) a las 288 h después de inoculación con *Trametes hirsuta* Bm-2. Los resultados representan la media y desviación estándar de tres mediciones paralelas. ANOVA de una vía. Tukey $\alpha=0.05$.

La figura 3.5 muestra el perfil de la actividad α -amilasa durante el desarrollo del BPC. La actividad se incrementó paulatinamente hasta las 192 h de la inoculación, que fue cuando se presentó la mayor actividad (193.85 U/mL) para luego decrecer lentamente hacia el final del proceso: Dicha disminución en la actividad α -amilasa puede estar asociada a la formación y/o liberación de compuestos por la cepa *T. hirsuta* Bm-2 al medio de fermentación como algunos azúcares, fenoles, ácidos orgánicos entre otros, los cuales al interactuar con la enzima pueden reducir su actividad, o a su posible desnaturalización, como lo mencionan Sánchez y col [124]. La presencia de etanol en el medio de fermentación también puede influir en la caída de la actividad, sin embargo, pese a que este compuesto de manera general se considera un inhibidor, en algunos casos y con algunas enzimas tiene un efecto positivo, como ocurre con la β -glucosidasa [133].

Otro factor relacionado con el decremento de la actividad de la enzima se puede atribuir a la disminución del almidón, lo cual afecta la inducción de su producción. El pH es otro parámetro que afecta de manera importante la actividad enzimática, sin embargo, en este caso, el pH fue monitoreado durante el BPC teniendo un valor constante de 5.1, por lo que no se le pudo atribuir ningún efecto sobre la actividad enzimática.

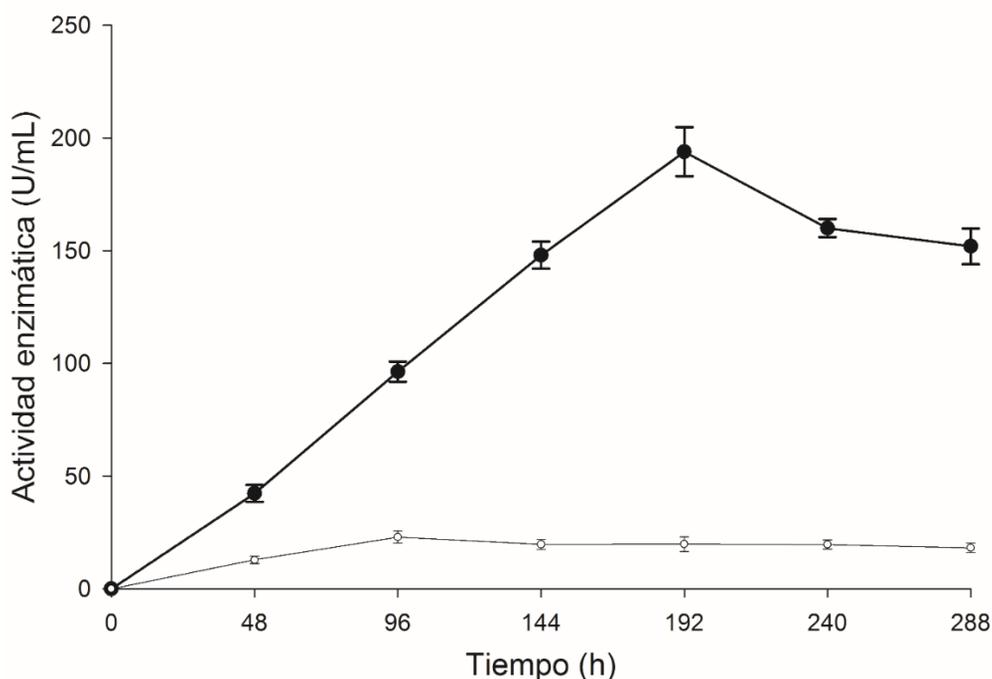


Figura 3.5. Actividad enzimática de la α -amilasa (círculos negros) y lacasa (círculos blancos) durante el BPC producida por *Trametes hirsuta* Bm-2. Los resultados representan la media y desviación estándar de tres mediciones paralelas.

En el perfil de la actividad lacasa (Figura 3.5), se puede observar que a las 96 h de inoculación se alcanzan 20 U/mL y a partir de ahí se mantiene constante hasta el final del BPC. A pesar de que la enzima lacasa no está asociada con la hidrólisis del almidón juega un papel importante en la despolimerización de la matriz fibroproteica en la que están inmersos los gránulos de almidón en la HSR (Figura 3.6A). Esto se comprobó, al realizar un experimento paralelo, evaluando un extracto purificado de lacasa [130], el cual fue aplicado a una suspensión de HSR/agua destilada al 20% p/v bajo las siguientes condiciones: 40°C, 48 h, 150 rpm, pH 5.1, 300 U de lacasa/g de HSR. Al realizar la microscopia electrónica de barrido de la HSR tratada con el extracto purificado de lacasa, se observó una fragmentación de la matriz fibroproteica (Figura 3.6B) a diferencia de la compactación en el estado inicial de la HSR (Figura 3.6A), permitiendo con esto la liberación de los gránulos de almidón hacia el medio de cultivo exponiéndolos a la acción de la α -amilasa. En la misma Figura 3.6B se observa que la enzima lacasa no tuvo ningún efecto sobre los gránulos de almidón, los cuales permanecieron intactos y al realizar un análisis cuantitativo de los azúcares reductores al inicio y final del experimento, se encontró que no hubo cambios en la concentración de azúcares manteniéndose a 4 g/L.

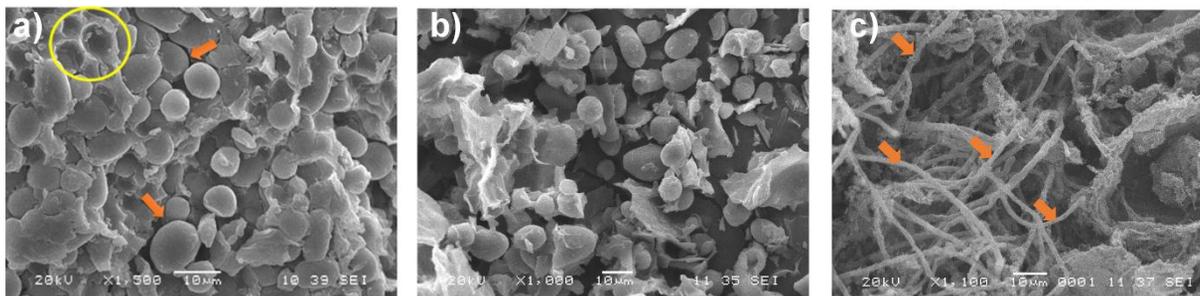


Figura 3.6. Microscopia electrónica de barrido (MEB) de HSR; A) inicial donde se observa la integridad de la matriz fibroproteica (círculos amarillos) y los abundantes gránulos de almidón (flechas naranjas), B) HSR tratada con extracto de lacasa de *Trametes hirsuta* Bm-2 y, C) HSR al final del BPC con micelio de *Trametes hirsuta* Bm-2 (flechas naranjas) a las 288 h de incubación a $32 \pm 2^\circ\text{C}$.

En la Figura 3.6C, se observa la presencia de micelio de *T. hirsuta* Bm-2 (flechas naranja) y pocos gránulos de almidón al final del BPC, esto indica una sinergia entre ambas enzimas, esta acción sincrónica de las enzimas lacasa y amilasa ha sido recientemente reportada por Avanthi y col. [138], quienes usaron estas enzimas junto con celulasas, en la producción de etanol a partir de residuos sólidos municipales.

El perfil de producción de glucosa (Figura 3.7) tuvo una tendencia similar al perfil de la actividad α -amilasa, teniendo su pico más alto de concentración (33.39 g/L) a los 8 días del

BPC y disminuyendo a 20.81 g/L para el final del experimento. La concentración final de glucosa en el medio, sugiere la necesidad de implementar una estrategia adicional, como el uso de una levadura fermentadora adecuada para transformar los azúcares residuales en etanol, mejorando así el rendimiento del BPC.

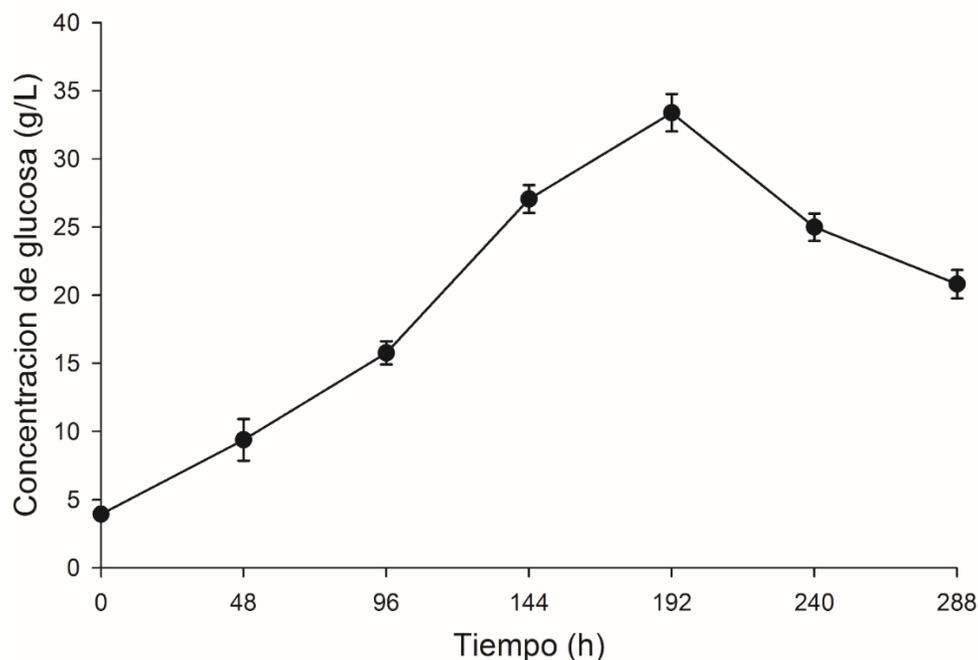


Figura 3.7. Liberación de glucosa (g/L) durante el BPC con *Trametes hirsuta* Bm-2. Los resultados representan la media y desviación estándar de tres mediciones paralelas.

Pocos microorganismos nativos convierten directamente el almidón en etanol. Algunos ejemplos de trabajos realizados en la búsqueda de la producción directa de etanol por un solo organismo, se resumen en la Tabla 3.2.

Saccharomyces cerevisiae es el microorganismo más utilizado para fermentar, debido a su alta producción de etanol, alta tolerancia a inhibidores y la ventaja de ser un organismo con bioseguridad 1.

Cepas de *S. cerevisiae* que carecen de la capacidad de degradar almidón, han sido modificadas genéticamente para expresar los genes que codifican para amilasas. Sin embargo, el uso de cepas recombinantes incrementa el costo de producción, ya que los riesgos biológicos que conlleva el uso de estos organismos, requieren de atender rigurosas regulaciones sanitarias para evitar su escape al medio ambiente [14].

Tabla 3.2. Organismos utilizados para la producción de etanol a partir de almidón mediante BPC.

Sustrato	Organismo	Etanol (g/L)	Tiempo de fermentación	Ref.
Almidón de maíz	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> Mnu1	9.03	240 h	[139]
Almidón de maíz + glucosa	<i>S. cerevisiae</i> Y294[AteA-GlaA]	45.77	144 h	[140]
Almidón de maíz + glucosa	<i>S. cerevisiae</i> Y294 [GlaA-AteA]	45.85	144 h	[140]
Almidón soluble	<i>Scheffersomyces shehatae</i> JCM 18690	9.2	240 h	[14]
Almidón	<i>Trametes hirsuta</i>	9.1	96 h	[19]
Harina de semillas de ramón	<i>Trametes hirsuta</i> Bm-2	13	288 h	En este estudio

Los primeros tres ejemplos señalados en la Tabla 3.1, se refieren a cepas de *S. cerevisiae* modificadas para expresar enzimas amilolíticas, lo cual les permite alcanzar altos rendimientos de etanol en un corto tiempo, especialmente las cepas Y294, la cuales alcanzaron una concentración de 45.77 y 45.85 g/L respectivamente en 144 h, lo que representa una ventaja con respecto a las cepas nativas, que generalmente requieren de largos periodos de incubación. Sin embargo, es importante señalar que este resultado se obtuvo bajo condiciones controladas y con un medio sintético que contenía almidón como fuente de carbono.

Scheffersomyces shehatae JCM 18690 es una cepa nativa que posee la capacidad de producir amilasas, de tolerar altas concentraciones de etanol y con buena capacidad fermentativa, por lo que los autores sugieren que es una cepa adecuada para la producción de etanol en un BPC utilizando almidón como fuente de carbono. A pesar de estas características, en un primer experimento *S. shehatae* JCM 18690 sólo hidrolizó el 60% del almidón soluble presente en el medio luego de 10 días de cultivo, esto probablemente por una baja actividad enzimática o por las condiciones de cultivo, que los autores mencionan podrían ser resueltas en trabajos futuros.

Okamoto y col. [19] describen la capacidad de *T. hirsuta* de hidrolizar y fermentar almidón. En contraste, con este trabajo, dichos autores usaron el medio sintético (T) en el que la fuente de carbono (glucosa) fue reemplazada por almidón soluble. En el presente estudio se usó HSR al 14%, una materia prima cruda compleja para la producción de etanol, el que se produjo a partir de las 48 h hasta las 288 h después de la inoculación del sustrato con *T. hirsuta* Bm-2, cuando se alcanzó una concentración de 13g/L (Figura 3.8). Con base en estos resultados se

estimó una producción de 123.44 mL de etanol por kg de HSR en base seca. Este valor representa el 57.95% de la producción reportada por *Candida tropicalis* PL-1, una cepa nativa aislada del mismo fruto de ramón, que produjo 213 mL/kg y el 84.35% al compararlo con la cepa de *S. cerevisiae* safoeno® que produjo 147 mL, ambos resultados se obtuvieron al implementar una estrategia de hidrólisis y fermentación separadas utilizando HSR como sustrato [72].

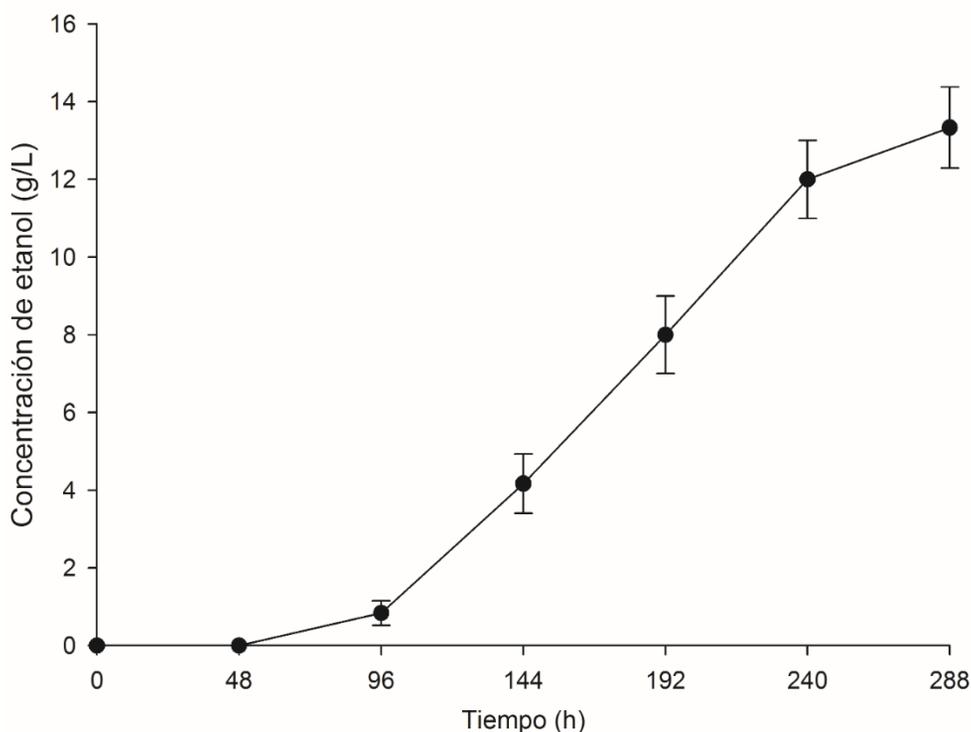


Figura 3.8. Producción de etanol durante el BPC con la cepa de *Trametes hirsuta* Bm-2. Los resultados representan la media y desviación estándar de tres mediciones paralelas.

A pesar del bajo contenido de etanol obtenido, se debe considerar que este BPC presenta varias ventajas como: no se requirió la adición de enzimas externas; sólo se utilizó un organismo para realizar para la hidrólisis y fermentación de la materia prima; que el proceso se efectuó a $32 \pm 2^\circ\text{C}$ en un solo reactor: no se requirió una fuente adicional de nitrógeno para el crecimiento del hongo: y no se utilizó ningún inductor enzimático o solución amortiguadora para mantener el pH, el que de forma natural osciló entre 5 y 5.5, siendo este adecuado para el crecimiento del hongo por lo que no fue necesario el ajuste inicial de este parámetro. Todos estos aspectos permiten disminuir los costos del proceso.

3.2.1. Co-productos obtenidos en el proceso de producción de bioetanol mediante BPC.

Al finalizar el BPC se recuperó la HSR residual cuya composición química se comparó con la de la HSR inicial, se observaron ligeros cambios en el contenido de almidón ya que se incrementó de 61 a 63%. Este puede deberse, a que al realizarse el BPC en condiciones estacionarias, las enzimas sólo tuvieron actividad en la fase acuosa y en la interface semisólida de la suspensión, sin permear hasta el fondo del matraz, lo que ocasionó que el almidón en el fondo de matraz permaneciera intacto y al disminuir los otros componentes de la HSR por la acción de *T. hirsuta* Bm-2 el porcentaje de almidón aumentara.

Por el contrario, la proteína tuvo un incremento de alrededor del 40% pues aumento de 12.75 a 17.46%, lo que puede atribuirse a que fragmentos de micelio de *T. hirsuta* Bm-2, que es rico en proteínas, quedaron intercalados en la HSR como puede observarse en la Figura 3.6C, aunque también puede deberse a remanentes de las enzimas liberadas por el hongo.

El análisis TGA reveló algunos cambios ocurrido durante el BPC (Figura 3.9). Para llevar a cabo el análisis se plantearon 3 etapas. Etapa I, comprendió las temperaturas de 20 a 140°C, donde ocurre principalmente la evaporación de agua y compuestos volátiles. En la Etapa II (140 a 340°C), se lleva a cabo la descomposición de los carbohidratos [141]. La presencia de un doble hombro en la curva DTG de la HSR residual indica una hidrólisis parcial de las cadenas de amilosa/amilopectina durante el BPC [142]. En la etapa III (340 a 700°C) las sustancias con alto peso molecular, como polisacáridos, proteínas, lípidos son degradadas. En esta etapa, el efecto de las enzimas producidas por el hongo que degradaron la matriz fibroproteica, se pudo observar, ya que el hombro que estaba presente en la HSR inicial desapareció entre los 400 y 500°C en la curva DGT de la HSR al final de BPC, lo que coincide con la fragmentación de la matriz fibroproteica de la HSR observada con microscopia electrónica de barrido (Figura3.6B).

Los espectros infrarrojos (FTIR) de la HSR inicial y del BPC se muestran en la Figura 3.10. Ambos espectros tienen un patrón similar de bandas de absorción. Las bandas entre los 3700 y 3000 cm^{-1} pueden ser atribuidas a la combinación de las vibraciones del estiramiento de los enlaces N-H de las proteínas, y los enlaces H-O-H de las moléculas de agua [103,143]. Específicamente el pico de 3650 cm^{-1} está asociado con el estiramiento del enlace N-H de las proteínas, y el incremento en la intensidad de esta banda, en la HSR residual concuerda con el incremento del contenido de proteína en la HSR residual descrito anteriormente.

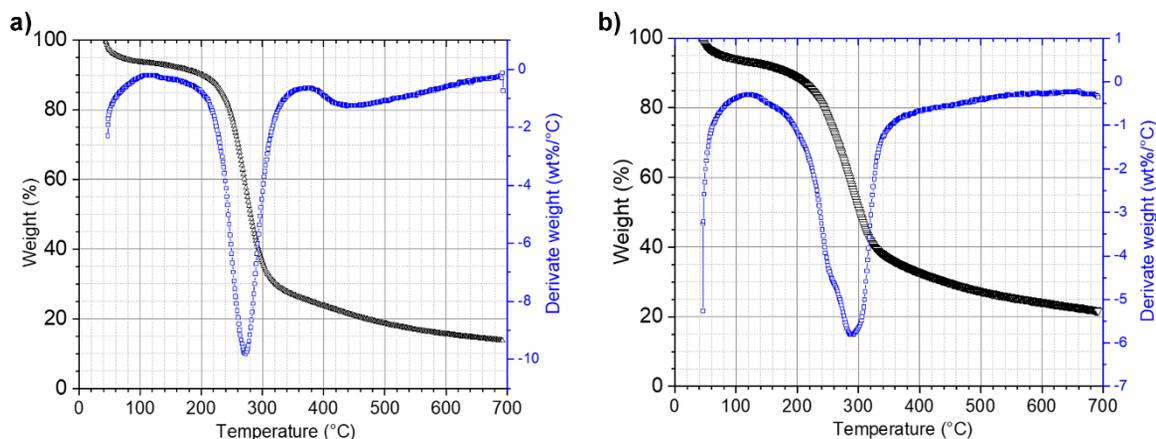


Figure 3.9. Curvas TGA (línea negra) y DTG (línea azul) de HSR, A) inicial y B) HSR 288 h después de inoculación con *Trametes hirsuta* Bm-2.

Ambos espectros muestran un pico amplio en la región de 3350 cm^{-1} . Esta banda está asociada con grupos hidroxilos de fibra insoluble, en HSR residual, este pico muestra una disminución en la intensidad de esta banda con respecto a la HSR control indicando la degradación de compuestos que poseen este grupo funcional, como pueden ser fenoles, celulosa y almidón. Las diferencias en la intensidad de las bandas de 2800 y 3000 cm^{-1} pueden ser atribuidas a variaciones en la cantidad y estructura de amilosa y amilopectina [144], lo que concuerda con lo observado en el análisis TGA. La menor intensidad en esta región en la HSR inicial se puede asociar a la baja exposición de los grupos $-\text{CH}$ de la amilosa y amilopectina, debido al grado de compactación del propio gránulo de almidón y al recubrimiento por parte de la matriz fibroproteica de la HSR inicial. De igual manera se observó la disminución de la intensidad del pico en 1600 cm^{-1} , el cual está asociado con diferentes grupos funcionales como: amidas, grupos carboxilos, enlaces aromáticos $\text{C}=\text{C}$, lignina y aminoácidos [104,145]

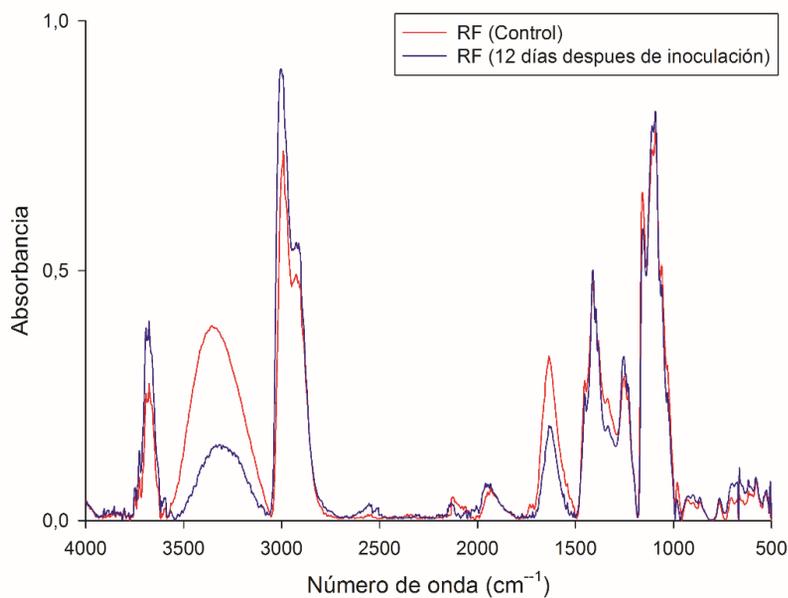


Figura 3.10. Espectros FT-IR de harina de semillas de ramón (HSR) control y residual después del BPC con *T. hirsuta* Bm-2.

En lo que respecta al micelio producido por *T. hirsuta* Bm-2 durante el BPC, se produjo 10% de micelio con respecto a la HSR usada, es decir de cada 100 g de HSR utilizada se produjeron 10 g de micelio seco. Al analizar el contenido de proteína del micelio, se encontró que poseía un 29%. Este residuo, en conjunto con la HSR residual recuperada (30%) puede funcionar como un complemento en la alimentación animal, debido a su alto contenido de proteínas. Además, de que una vez establecidas las metodologías apropiadas de recuperación de compuestos de alto valor agregado como fenoles, enzimas y ácidos orgánicos, producidos durante el BPC por parte de *T. hirsuta* Bm-2, la metodología aquí propuesta presentará diversas ventajas competitivas para permitir una producción sustentable de etanol a partir de HSR mediante un BPC.

3.3. Producción y caracterización parcial del extracto enzimático de *T. hirsuta* Bm-2.

3.3.1. Producción de extracto enzimático en sistema de matraz agitado.

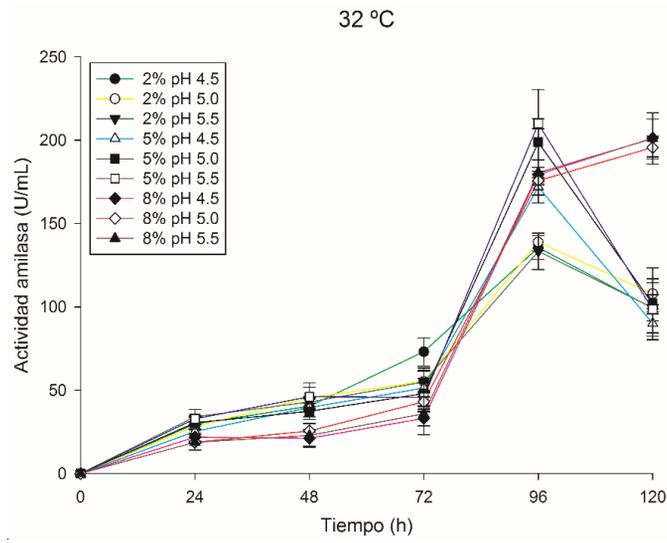
La producción de enzimas se ve fuertemente influenciada por diversos parámetros como temperatura, pH, así como por los componentes del sustrato. En las Figuras 3.11 y 3.12 se muestran los efectos de diferentes condiciones de temperatura, carga de HSR y pH, en la actividad α -amilasa y lacasa producida por la cepa *T. hirsuta* Bm-2.

En la Figura 3.11 se presentan los resultados obtenidos en los diversos bioensayos realizados para cuantificar la actividad α -amilasa. Se observa que en todas las condiciones propuestas se obtuvo actividad enzimática. Sin embargo, existe una marcada diferencia entre los valores más altos obtenidos a 32°C donde se alcanzó una actividad de 210 U/mL (5% HSR, pH 5.5), mientras que a 35°C el valor más alto fue de 135 U/mL (8% HSR, pH 5.0) y a 38°C no fue superior a 90 U/mL. Por lo observado podemos afirmar que el parámetro que mayor efecto tuvo en la producción de la α -amilasa fue la temperatura, lo cual está estrechamente relacionado con la temperatura óptima para el crecimiento del organismo productor de la enzima [146]. En este contexto, todos los experimentos realizados en el presente trabajo indicaron que la temperatura de $32 \pm 2^\circ\text{C}$ es la óptima para el desarrollo de *T. hirsuta* Bm-2.

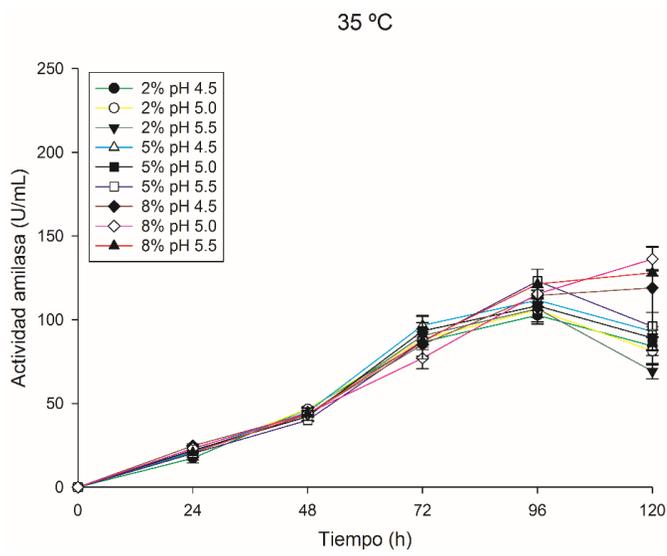
El segundo parámetro que mayor impacto tuvo en la producción α -amilasa, fue la carga de HSR. En las gráficas A, B y C (Figura 3.11) se observa un comportamiento similar en cada una de las cargas (2, 5 y 8%) en los tres valores de pH. Tanto para la carga de 2 y 5% el pico más alto de actividad fue a las 96 h de incubación, mientras que para la carga de 8%, se observó que la actividad siguió en aumento hasta las 120 h, y la cuantificación de la actividad enzimática en este tiempo fue similar a los valores registrados a las 144 h para luego disminuir a las 168 h (datos no mostrados). El aumento en la carga de sustrato disminuye la velocidad de reacción en los primeros días, esto podría deberse a la saturación de los sitios activos de la enzima por las moléculas de sustrato [146].

El periodo de incubación obtenido en este trabajo concuerda con lo reportado por Ayansina y col. [146] quienes en un estudio realizado con las bacterias *Bacillus cereus*, *B. subtilis* y *B. pumilis* y los hongos *A. niger* y *A. flavus* encontraron que los picos de máxima actividad amilasa para las bacterias fueron en los días 3 (55.6 U/mL), 4 (39.4 U/mL) y 3 (44.6 U/mL) respectivamente, mientras que para los hongos fue en el sexto (80.2 U/mL) y cuarto día (66.1 U/mL) al utilizar almidón soluble como sustrato en concentraciones de 0.1 a 0.6%. De igual forma, Dar y col. [147] mencionaron que *Penicillium chrysogenum* tuvo su máxima producción de amilasa al día 6 de incubación, alcanzando 550 U/mL en condiciones óptimas (pH 6, 30°C en solución amortiguadora acetato 0.1 M). En trabajos realizados fermentación en estado sólido (SSF, por sus siglas en inglés) se reportó que *A. fumigatus* NTCC 1222 alcanzó su mayor producción de enzima (341.7 U/mL) en el sexto día bajo condiciones óptimas (35°C, pH 6, solución nutritiva salina y extracto de carne como fuente de nitrógeno) [148], mientras que Kwatia y col. [149] obtuvieron 30.95 U/mL con *A. niger* al cuarto días de incubación en condiciones óptimas, (49.5°C, pH 5.95) utilizando residuos de *Dioscorea* sp. como sustrato.

A)



B)



C)

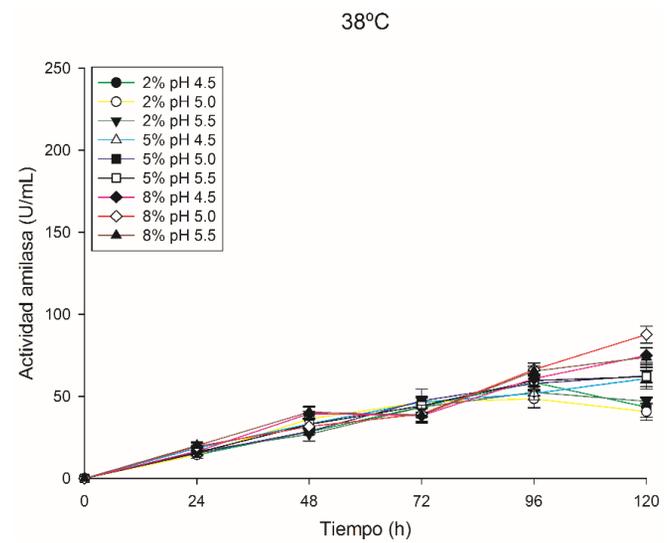


Figura 3.11. Efecto de la temperatura, carga de sustrato, y pH en la actividad α -amilasa producida por *T. hirsuta* Bm-2. A) 32°C, B) 35°C y C) 38°C.

De manera general, el periodo de incubación en la producción de amilasa va de los 3 a 6 días (72 y 144 h), y el nivel de producción de la enzima depende del origen y tipo del microorganismo empleado, así como de los componentes del sustrato utilizado. En el caso del sustrato es importante señalar que aunque los sustratos sintéticos presentan la ventaja de ser específicos para la producción enzimática su alto costo los hace menos competitivos, mientras que los sustratos complejos, como residuos agroindustriales, presentan una ventaja competitiva dado su bajo costo y que por su naturaleza compleja pueden poseer diversos promotores que estimulan la producción no sólo de una enzima en particular sino de un complejo enzimático que pueda ser usado en diferentes procesos industriales [113,146,150]. En el caso de este estudio, la HSR utilizada como sustrato para la producción del extracto enzimático, presenta una variedad de compuestos, que estimularon a *T. hirsuta* Bm-2 a producir otras enzimas, como lacasa, además de la α -amilasa lo que también comprobaron Zhang y col. [151].

Los valores de la actividad α -amilasa alcanzados por *T. hirsuta* Bm-2 son menores a los reportados para *P. chrysogenum*, o equiparables y en algunos casos superiores a los registrados para especies de *Penicillium*, *Aspergillus* y *Bacillus* que son los géneros más reconocidos en la producción de este tipo de enzimas. Cabe destacar que en este trabajo no se utilizó ningún medio sintético, ni fuente de nitrógeno externa, ni soluciones amortiguadoras para el mantenimiento del pH y desarrollo del hongo, ya que los valores de pH de 4.0, 4.5 y 5.0, probados no mostraron efecto sobre la producción de la α -amilasa, por lo que el ajuste pudiera omitirse, pues de manera natural, al hacer las diferentes mezclas HSR/agua destilada los valores de pH que resultan varían de 5.1 a 5.4, siendo este el rango adecuado para el crecimiento de la cepa *T. hirsuta* Bm-2.

Con los resultados obtenidos en este punto restaría por realizar una optimización de los parámetros, que permitieran aumentar la concentración de la enzima y probar diversos métodos de purificación ya que la enzima α -amilasa es empleada en diferentes procesos industriales constituyendo aproximadamente el 25% del mercado mundial de enzimas [152]. De igual forma, el extracto enzimático puede ser utilizado en la hidrólisis de sustratos complejos debido a la presencia de diferentes enzimas que actúan de manera sinérgica como ya se demostró en este mismo trabajo.

En la Figura 3.12 se puede observar que los mayores valores de actividad lacasa se presentaron a 32°C, como ocurrió con la α -amilasa, sin embargo, en este caso no hubo una diferencia tan pronunciada con respecto a los valores obtenidos a 35 y 38°C.

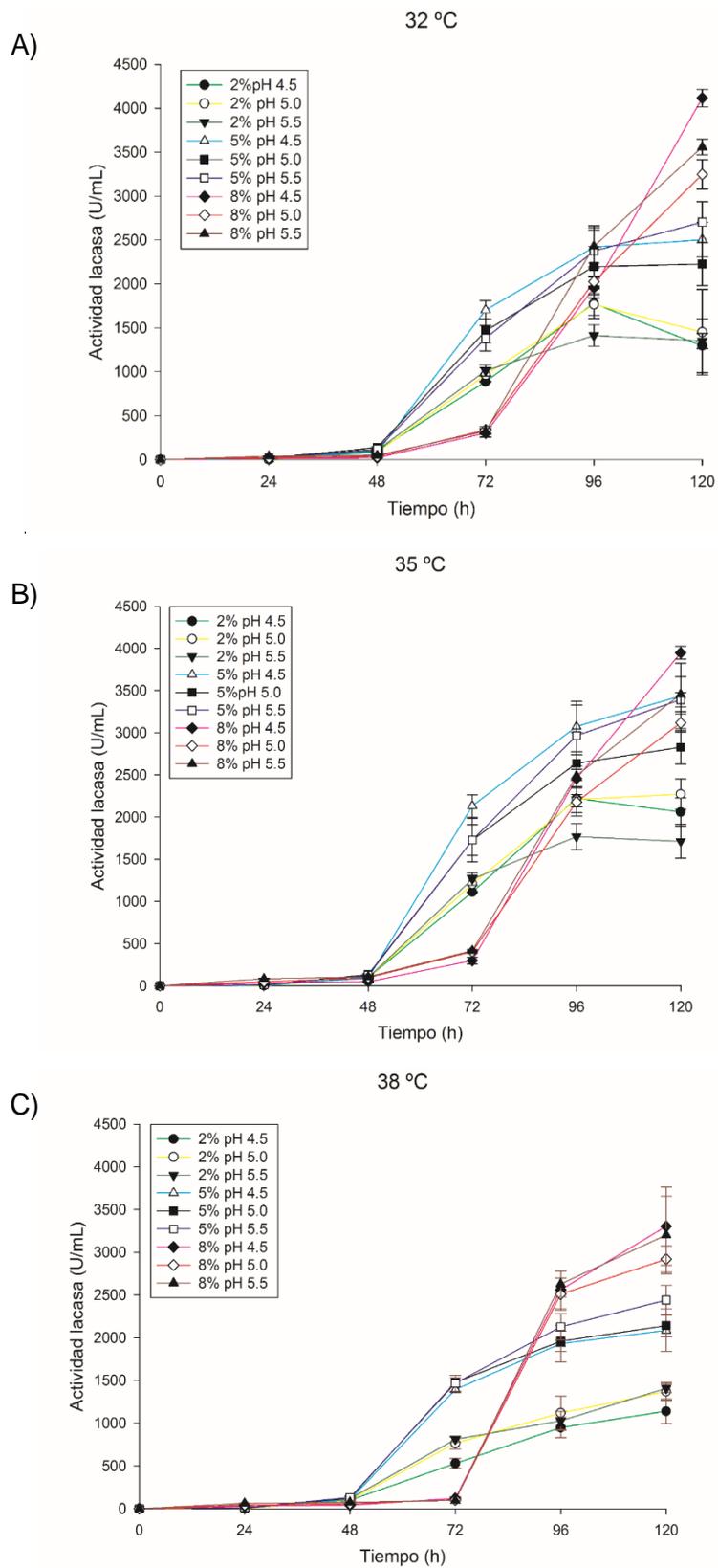


Figura 3.12. Efecto de la temperatura, carga de sustrato, y pH en la actividad lacasa producida por *T. hirsuta* Bm-2. A) 32°C, B) 35°C y C) 38°C.

De igual manera que para el caso de la actividad α -amilasa, la carga de HSR utilizada fue el segundo parámetro que mayor efecto tuvo en la cinética de actividad de la enzima, ya que para las cargas de 2 y 5% se observaron incrementos en la actividad lacasa a partir de las 48 h, mientras que para la carga de 8% dicho aumento se dio a partir de las 72 h y hasta las 120 h de incubación, cuando se obtuvieron los valores más altos de actividad a 32, 35 y 38°C, con valores de 4115, 3949 y 3305 U/mL, respectivamente. En el caso de la actividad lacasa hubo una tendencia en cuanto al pH, óptimo, ya que los 3 valores máximos de actividad lacasa se obtuvieron a pH 4.5, lo que coincide con los resultados obtenidos anteriormente por Zapata-Castillo [153] al utilizar la misma cepa.

De manera general, las condiciones óptimas de temperatura, periodo de incubación, pH y requerimientos nutricionales para la producción de la lacasa pueden diferir ampliamente entre una cepa y otra arrojando resultados muy diversos, incluso para la misma cepa al realizar modificaciones a dichos parámetros y/o adaptaciones a los organismos productores.

En este sentido, observamos que durante la producción del extracto enzimático se obtuvo una actividad de 210 U/mL (α -amilasa) lo que representó un incremento del 55% aproximadamente, con respecto a lo obtenido en la preparación del inóculo para el BPC. Aún más significativo resultó el aumento en la actividad de la lacasa, que pasó de 40 U/mL a 4000 U/mL, valor que es 100 veces mayor y que se alcanzó bajo las condiciones de 32°C, 8%, pH 4.5 y 120 h de incubación).

Es de señalarse, que en todos los experimentos se usaron subcultivos de la misma cepa, y el mismo sustrato, sin embargo, los resultados obtenidos tan discrepantes obtenidos en la producción de lacasa, se pueden atribuir a una respuesta a un estrés nutricional, ya que, al realizar un cambio drástico en las condiciones de crecimiento del organismo, se desencadena una serie de sucesos a nivel genético que llevan a la activación de genes, que para el caso de *T. hirsuta* Bm-2 Tapia-Tussell y col. [108] reportaron dos genes que intervienen para la producción de lacasa, mientras que Vasina y col. [129] reportaron al menos 5 genes codificando para la enzima lacasa.

En los subcultivos de *T. hirsuta* Bm-2 se notó una disminución en la velocidad de crecimiento. Generalmente a un disco de un cm de diámetro, le tomaba 5 días en promedio cubrir totalmente la superficie de una caja Petri de 10 cm de diámetro, sin embargo, con el paso del tiempo y las resiembras periódicas, el vigor de la cepa disminuyó, por lo que se requirieron de 6 a 7 días para cubrir la superficie de la placa, por lo que se decidió crecer el hongo en un medio sintético salino (YMPG: anexo 1G), carente de la fuente de carbono. En el centro de la

placa se incubó un disco de 1 cm de diámetro y se incubó a $32 \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 72 h y de este crecimiento se tomó un disco y se repitió la operación. Posteriormente se volvieron a hacer los subcultivos en placas de HSR/agua al 14% p/v y con esto se realizaron los experimentos del extracto.

Se ha reportado que el incremento en la producción de enzima lacasa se logra mediante la modificación de la relación carbono-nitrógeno en el medio de cultivo [154]. La expresión de la lacasa se da a nivel transcripcional y también puede ser regulada por estrés oxidativo y choque térmico [155]. Se logró una expresión de lacasa en *C. neoformans* mediante la supresión de glucosa [156], estos resultados coinciden con el trabajo de van Muster y col. [157] quienes reportan que al exponer a *A. niger* a una supresión de carbón, ocurrieron una serie de eventos transcripcionales, que llevaron a la secreción de proteínas con roles en la sacarificación de la lignocelulosa después de 6 horas de incubación en el sustrato.

3.3.2. Producción de extracto enzimático en un reactor agitado con aire tipo Airlift.

Para aumentar el volumen de producción de las enzimas, y observar si los resultados obtenidos en matraz se podrían reproducir a mayor escala, se utilizó un reactor agitado con aire tipo Airlift. Las condiciones se seleccionaron con base en los resultados obtenidos para la producción de la α -amilasa, ya que el almidón es el principal componente de la HSR, y uno de los objetivos de este estudio. Se trabajó con una temperatura de $32 \pm 2^{\circ}\text{C}$, una carga de 5% (p/v), con 96 h de incubación. En el caso del pH, al haber determinado que este parámetro no tenía un efecto importante, se utilizó el pH presente en la suspensión (5.2).

Debido al vigoroso crecimiento de *T. hirsuta* Bm-2 desde las primeras horas, además de que la HSR se depositó en el fondo del reactor, obstruyendo el flujo del aire, fue necesario utilizar la potencia total de la bomba peristáltica (240L/h).

Al finalizar las 96 h de incubación, se separó el sobrenadante del micelio del hongo, encontrando que a diferencia del 10% de micelio producido con la carga del 5% en los matraces agitados, aquí el crecimiento del hongo representó el 30% de la HSR usada. Esto concuerda con Madadi y col. [93] quienes al aumentar la cantidad de oxígeno y facilitar el intercambio de CO_2 , aumentaron el rendimiento de biomasa y redujeron el tiempo de incubación en *Pleurotus eryngii* de igual forma Kim y col.[158] encontraron una

mayor producción de biomasa micelial de *Paecilomyces sinclairii* a una tasa de aireación de 3.5 L/min.

En la Figura 3.13, se pueden observar que las cinéticas de actividad α -amilasa y lacasa, muestran una tendencia similar a lo detectado a nivel matraz. Sin embargo, en ambos casos se obtuvieron valores inferiores de actividad. Para el caso de la actividad α -amilasa hubo una disminución del 42% aproximadamente al pasar de una actividad de 210 U/mL en el sistema de matraz agitado, a un valor de 120 U/mL y en el caso de la actividad lacasa igualmente se presentó una disminución cercana al 68% disminuyendo de 4115 a 1305 U/mL. Esta disminución de la actividad para ambas enzimas en el reactor difiere de lo obtenido por Shahryari y col. [117] quienes al comparar los resultados obtenidos en un reactor de columna aireado con los obtenidos en matraces agitados detectaron un incremento de 39 y 2.3% en la producción de amilasa y xylanasa con el hongo *Neurospora intermedia* respectivamente, atribuyendo estos resultados a que una apropiada aireación pudo mejorar la interacción liquido-gas y la transferencia de masa.

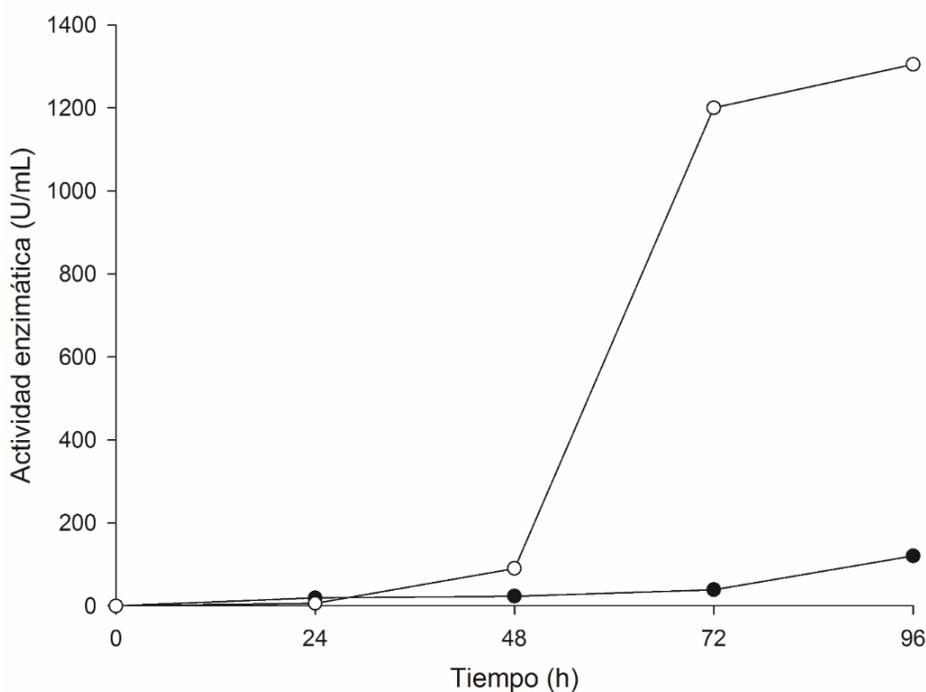


Figura 3.13. Producción de enzimas por *Trametes hirsuta* Bm-2 en medio de HSR/agua al 5% p/v, pH 5.2 y flujo de aire de 3.5 L/min en reactor agitado tipo Airlift. Actividad enzimática α amilasa (círculos negros) y lacasa (círculos blancos).

3.3.3. Caracterización parcial del extracto crudo

Temperatura

El efecto de la variación de la temperatura sobre la actividad enzimática α -amilasa del extracto enzimático, se observa en la Figura 3.14A, donde hay un comportamiento similar en la actividad a los 25 y 45°C teniendo como óptima los 35°C. A los 50°C existe un ligero declive de la actividad α -amilasa, que se hace más pronunciado a los 65 y 80°C. Estos resultados concuerdan con lo reportado como temperaturas óptimas para enzimas de *Streptomyces* (37°C) [159] y para *Bacillus* sp. *B. cereus* y *B. pumilus* (40°C) [146,159], mientras que para *A. niger*, *A. flavus* y *B. subtilis*, se determinó que la temperatura óptima era 50°C [146]. Sin embargo, en un estudio realizado con *Bacillus licheniformis* AT70 la temperatura optima reportada fue 60°C, reduciéndose la actividad por debajo y por encima de esta [152].

Ayantade y col. [146] encontraron que la actividad α -amilasa de *B. subtilis* fue fuertemente inhibida a 70°C, lo que probablemente se debió a la desnaturalización de la proteína; sin embargo, en este trabajo encontramos que a los 80°C en el extracto enzimático permanece un remanente de actividad de 55 U/mL, lo que le confiere una ventaja ya que muchos procesos industriales que emplean la hidrólisis del almidón utilizan temperaturas altas, aunado a esto, cabe señalar que este extracto no fue adicionado con calcio, que podría otorgarle mayor estabilidad térmica.

En la actividad de la enzima lacasa, la temperatura tuvo mayor influencia. En la Figura 3.14C, se puede observar que a 45°C se obtuvo una actividad de 1022 U/mL, la que decayó drásticamente a los 50°C (585 U/mL) y a 40°C se redujo la actividad en un 11.5% aproximadamente (903 U/mL). Estos resultados difieren de los obtenidos por Zapata-Castillo y col [130] quienes encontraron un rango óptimo de temperatura de 40 a 60°C para la enzima lacasa de la misma cepa *T. hirsuta* Bm-2. Esta diferencia puede estar dada por la estabilidad que le confiere el proceso de purificación del extracto realizada por Zapata y col [130] y su recuperación en solución amortiguadora de fosfatos pH 5, lo que pudo haberle conferido mayor estabilidad a la enzima.

Al igual que con la enzima amilasa, la temperatura óptima para la lacasa difiere, dependiendo del origen de la enzima, así encontramos temperaturas óptimas desde 25°C hasta 50 y 60°C en *P. ostreatus* y *T. modesta* respectivamente. Luego de este valor, diversos autores reportan una rápida disminución de la actividad enzimática asociada a la desnaturalización de las proteínas [130,154,160].

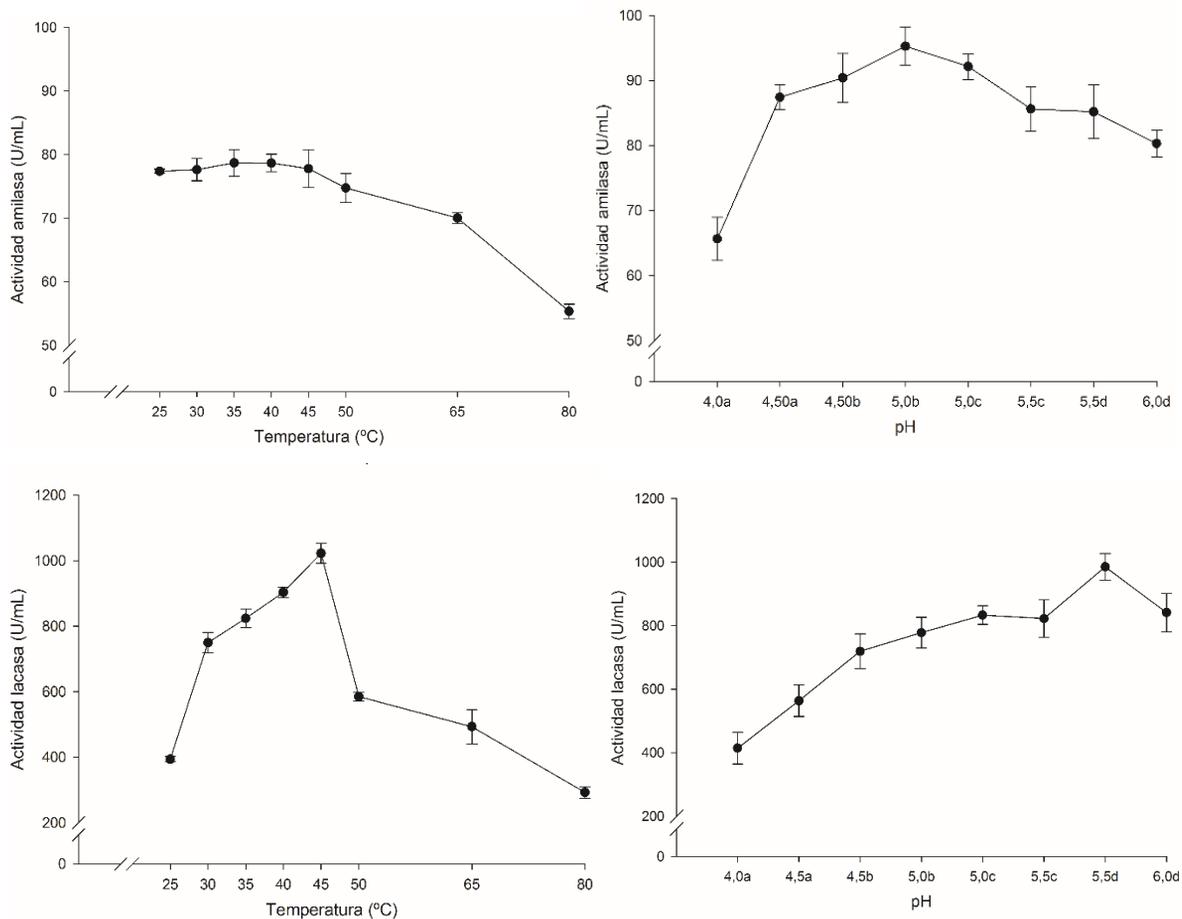


Figura 3.14. Efecto de temperatura (A y C) y pH (B y D) sobre la α -amilasa y lacasa presentes en el extracto enzimático crudo producido por *Trametes hirsuta* Bm-2.

pH

En la Figura 3.14B, podemos observar que en el rango de pH entre 4.5 y 5.5, la actividad α -amilasa es similar (alrededor de 90 U/mL), teniendo su valor más alto a pH 5 (acetato de sodio-ácido acético) con una actividad de 95.28 U/mL. Estos resultados difieren ligeramente a los reportados por Ayansina y col. [146] quienes reportaron un pH óptimo de 6 para *A. niger* (53.5 U/mL) y *A. flavus* (65.4 U/mL), mientras que para *B. cereus* (51.7 U/mL) y *B. pumilus* (44.6 U/mL) el óptimo fue de 6.5 y para *B. subtilis* (56.1 U/mL) de 7. Así mismo los valores de pH donde hubo menor actividad fueron de 4 (*B. pumilus*, 9.8 U/mL) y 8 (*A. niger* 8.8 U/mL). sin embargo para *Bacillus licheniformis* AT70 Afrishan y col. [152] señalan que el pH 8 es óptimo para la actividad α -amilasa.

Varios estudios revelan que los hongos requieren de un pH ligeramente ácido mientras que las bacterias requieren de un pH neutro o ligeramente alcalino para su óptimo crecimiento, y la síntesis y secreción de α -amilasa y su estabilidad [152].

En la Figura 3.14D, se observa que la actividad lacasa, a diferencia de lo observado para la actividad α -amilasa, no tuvo un rango de pH donde se desempeñara de manera óptima, sino que solo fue en el pH 5.5 (solución amortiguadora de fosfatos), donde mostró los valores más altos, lo que difiere con Zapata-Castillo y col. [130], quienes encontraron un pH óptimo en el rango de 4.0 a 4.5, sin embargo, el comportamiento de *T. hirsuta* Bm-2 es similar en ambos trabajos en el sentido que en valores menores y mayores del punto óptimo, la actividad decayo de manera importante.

El pH óptimo para la enzima lacasa tiene un rango entre 2 y 9, dependiendo del organismo que la sintetiza y del sustrato utilizado. Las enzimas de origen fúngico son generalmente estables en pH ácido mientras que las lacasas provenientes de bacterias tienen un mayor rango de tolerancia al pH prefiriendo un valor neutro a ligeramente alcalino, como el caso de la bacteria *Bacillus* sp. PC-3 cuyo valor óptimo de pH es 7 [130,161].

3.4. Efecto sinérgico del uso de *Trametes hirsuta* Bm-2 y *Candida tropicalis* PL-1.

En la figura 3.15 se puede observar que en los días 5 y 6 de incubación inicial de *T. hirsuta* Bm-2 en HSR al 14% p/v, se alcanzó la misma cantidad de azúcares reductores (31.66 g/L) mientras que el séptimo día se produjeron 35.83 g/L. Sin embargo, como puede apreciarse en la misma gráfica, esta variación no tuvo mayor efecto al término de la hidrólisis enzimática de 48 h ni en la producción de etanol, ya que se obtuvieron rendimientos similares de 14.5, 17 y 15.5g/L de etanol, para los periodos de incubación inicial de 5, 6 y 7 días respectivamente. Por lo que, para disminuir el tiempo del proceso podría suprimirse 24 h de hidrolisis y emplear 6 días de incubación de *T. hirsuta* Bm-2, lo que permitiría disminuir 48 h el proceso con respecto al BPC con un incremento del 30% en la concentración final de bioetanol.

Al hacer el retiro de la masa de micelio del hongo, quedan restos de micelio en la suspensión de HSR, como se observa en la Figura 3.6C, sin embargo, durante la hidrolisis (48 h) y la fermentación (36 h) no hubo un crecimiento aparente del hongo, esto concuerda con las pruebas preliminares en este estudio que indican que al disminuir la viscosidad de la suspensión de HSR el hongo no crece satisfactoriamente esto debido probablemente a la limitación de oxígeno.

En trabajos previos, se reportó un co-cultivo para producir bioetanol a partir de aguas residuales textiles utilizando *Bacillus subtilis* y *S. cerevisiae*. El mejor rendimiento de etanol se obtuvo cuando *B. subtilis* fue inoculado y dejado crecer 24 h para posteriormente inocular *S. cerevisiae*, alcanzando una concentración de 5.8 g/L [162]. De igual forma Pietrzak y col.

[163] obtuvieron su mayor valor de etanol 4.5 g/L al inocular *Candida utilis* después de 24 h de inoculado *A. oryzae* en jugo de maíz. En otros casos, la inoculación simultanea fue más efectiva, como lo describen Farías y col [164] quienes al inocular simultáneamente *S cerevisiae* y *Scheffersomyces. stipitis* en una mezcla de melazas y bagazo hidrolizado de caña lograron un incremento considerable en la concentración de etanol, alcanzando 49.2 g/L.

Con antecedentes y pruebas realizadas en esta investigación, se hace evidente la necesidad de agitar al menos 24 h de agitación del sustrato, para que las enzimas producidas por el hongo entren en contacto con todo el sustrato que se deposita en el fondo del matraz. De igual forma el proceso fermentativo se vio detenido a las 48 h, no obstante, la presencia de alrededor de 15 g/L de azúcares libres. Esto podría mejorarse al disminuir la viscosidad de la suspensión o al adicionar una fuente de nitrógeno que estimule el desarrollo de la levadura y por consiguiente prolongue el período de fermentación teniendo como resultado final un incremento en la producción y rendimiento de etanol [165].

El co-cultivo de organismos amilolíticos y fermentativos muestra un gran potencial en la producción de etanol, además se ha usado en la producción de cocteles enzimáticos con resultados promisorios [166,167]

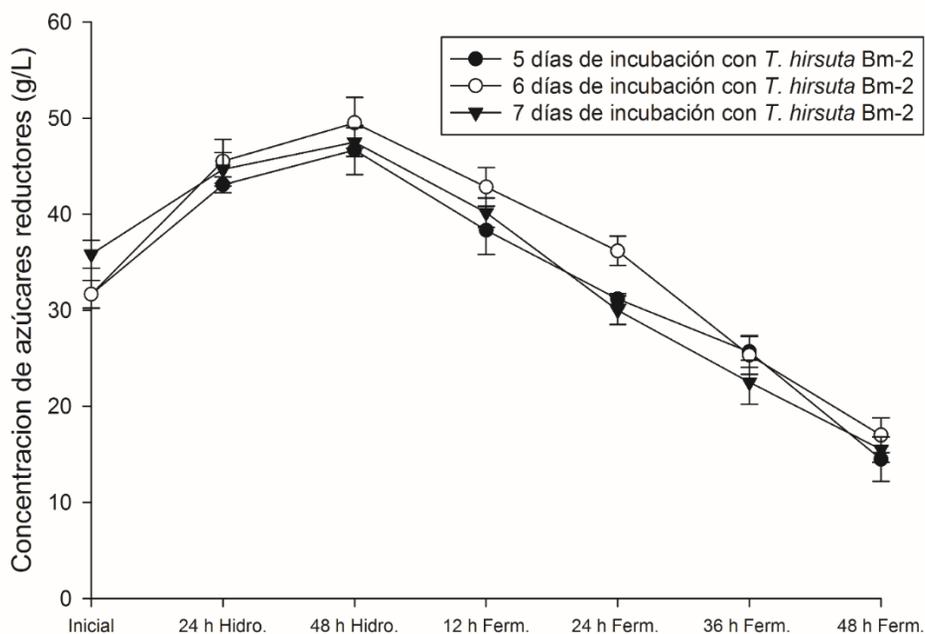


Figura 3.15. Hidrolisis de *Trametes hirsuta* Bm-2 durante 5, 6 y 7 días de incubación(valor inicial) sin agitación a 32°C, 24 y 48 h de hidrolisis enzimática a 32°C y 100 rpm y 48 h de fermentación con *Candida tropicalis* PL-1 a 32°C sin agitación.

CONCLUSIONES

En este estudio se demostró que la cepa nativa *Trametes hirsuta* Bm-2 produjo y excretó α -amilasa. Esta característica le permitió a la cepa hidrolizar el almidón presente en la harina de semillas de ramón (HSR) y también fue demostrada su capacidad de fermentar los azúcares liberados durante la hidrólisis.

La cepa *T. hirsuta* Bm-2 fue capaz de producir etanol en un bioproceso consolidado (BPC) a partir de harina de semillas de ramón (HSR), sin usar enzimas externas ni fuentes de nitrógeno para el desarrollo del hongo. La concentración obtenida de 13 g/L, permitió estimar una producción de 123.4 mL/kg HSR.

Bajo el concepto de refinería, fue recuperada la biomasa residual del BPC, con un contenido promedio de proteína del 23%, por lo que puede ser considerada en un esquema de alimentación animal, coadyuvando con ello a alcanzar la viabilidad económica de todo el proceso de producción.

T. hirsuta Bm-2 fue capaz de producir enzimas α -amilasa y lacasa en diferentes condiciones de temperatura, carga de sustrato y pH. El factor que más influencia tuvo en la producción de las enzimas fue la temperatura seguida de la carga de sustrato.

El uso de la cepa *Candida tropicalis* PL-1 en una fermentación secuencial con *T. hirsuta* Bm-2 aumento la producción de bioetanol en un 30% con respecto al BPC y se logró disminuir 48 h el tiempo del proceso.

BIBLIOGRAFÍA.

- [1] Olguin-Maciel, E., Larqué-Saavedra, A., Lappe-Oliveras, P. E., Barahona-Pérez, L. F., Alzate-Gaviria, L., Chablé-Villacis, R., Domínguez-Maldonado, J., Pacheco-Catalán, D., Ruíz, H. A., and Tapia-Tussell, R., (2019), Consolidated Bioprocess for Bioethanol Production from Raw Flour of *Brosimum alicastrum* Seeds Using the Native Strain of *Trametes Hirsuta* Bm-2, *Microorganisms*, 7(11), 483.
- [2] Kan, S., Chen, B., and Chen, G., (2019), Worldwide Energy Use across Global Supply Chains: Decoupled from Economic Growth?, *Appl. Energy*, 250, 1235-45.
- [3] Zabed, H., Sahu, J. N., Suely, A., Boyce, A. N., and Faruq, G., (2017), Bioethanol Production from Renewable Sources: Current Perspectives and Technological Progress, *Renew. Sustain. Energy Rev.* doi:10.1016/j.rser.2016.12.076.
- [4] Zhao, W., Zhao, F., Zhang, S., Gong, Q., and Chen, G., (2019), Ethanol Production by Simultaneous Saccharification and Cofermentation of Pretreated Corn Stalk, *J. Basic Microbiol.*, doi:10.1002/jobm.201900117.
- [5] Anderson, S. T., (2012), The Demand for Ethanol as a Gasoline Substitute, *J. Environ. Econ. Manage.*, 63(2).
- [6] Balat, M., Balat, H., and Öz, C., (2008), Progress in Bioethanol Processing, *Prog. energy Combust. Sci.*, 34(5), 151-68.
- [7] Naresh, M., Rajarathinam, K., Senniyappan, R., Moorthy, T., and Kumar, R., (2018), Choice of Pretreatment Technology for Sustainable Production of Bioethanol from Lignocellulosic Biomass: Bottle Necks and Recommendations, *Waste and Biomass Valorization*. doi:10.1007/s12649-017-0177-6 .
- [8] Manochio, C., Andrade, B. R., Rodriguez, R. P., and Moraes, B. S., (2017), Ethanol from Biomass: A Comparative Overview, *Renew. Sustain. Energy Rev.*, 80, 743-55.
- [9] Sydney, E. B., Letti, L. A. J., Karp, S. G., Sydney, A. C. N., de Souza Vandenberghe, L. P., de Carvalho, J. C., Woiciechowski, A. L., Medeiros, A. B. P., Soccol, V. T., and Soccol, C. R., (2019), Current Analysis and Future Perspective of Reduction in Worldwide Greenhouse Gases Emissions by Using First and Second Generation Bioethanol in the Transportation Sector, *Bioresour. Technol. Reports*, 7:100234.

- [10] Bhatia, L., Johri, S., and Ahmad, R., (2012), An Economic and Ecological Perspective of Ethanol Production from Renewable Agro Waste: A Review, *Amb Express*, 2, 1-19.
- [11] Gronchi, N., Favaro, L., Cagnin, L., Brojanigo, S., Pizzocchero, V., Basaglia, M., and Casella, S., (2019), Novel Yeast Strains for the Efficient Saccharification and Fermentation of Starchy By-Products to Bioethanol, *Energies*, 12(4).
- [12] Kanta, H., Chunbao, S., and Wensheng, X., (2017), Biological Pretreatment of Lignocellulosic Biomass for Biofuels and Bioproducts : An Overview, *Waste Biomass Valor.* doi:10.1007/s12649-017-0059-y.
- [13] Moreno-Garcia, L., Adjallé, K., Barnabé, S., and Raghavan, G. S. V, (2017), Microalgae Biomass Production for a Biorefinery System : Recent Advances and the Way towards Sustainability, *Renew. Sustain. Energy Rev.* doi:10.1016/j.rser.2017.03.024.
- [14] Tanimura, A., Kikukawa, M., Yamaguchi, S., Kishino, S., Ogawa, J., and Shima, J., (2015), Direct Ethanol Production from Starch Using a Natural Isolate, *Scheffersomyces shehatae*: Toward Consolidated Bioprocessing, *Sci. Rep.*, 5:9593.
- [15] Lynd, L. R., Zyl, W. H. Van, McBride, J. E., and Laser, M., (2005), Consolidated Bioprocessing of Cellulosic Biomass: An Update, *Current Opinion Bioetchnol.* doi:10.1016/j.copbio.2005.08.009.
- [16] Ali, S. S., Nugent, B., Mullins, E., and Doohan, F. M., (2016), Fungal - Mediated Consolidated Bioprocessing: The Potential of *Fusarium oxysporum* for the Lignocellulosic Ethanol Industry,” *AMB Express*. doi:10.1186/s13568-016-0185-0.
- [17] Dey, P., and Saggi, S. K., (2016), An Innovative Approach towards Economic Bio-Ethanol Production from Starchy and Ligno-Cellulosic Biomass through Simultaneous Saccharification and Fermentation (SSF), *Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci.* 5(5), 870–877.
- [18] Okamoto, K., Imashiro, K., and Akizawa, Y., (2010), Production of Ethanol by the White-Rot Basidiomycetes *Peniophora cinerea* and *Trametes suaveolens*, *Biotechnol. Lett.* doi:10.1007/s10529-010-0243-7.
- [19] Okamoto, K., Nitta, Y., Maekawa, N., and Yanase, H., (2011), Direct Ethanol Production from Starch , Wheat Bran and Rice Straw by the White Rot Fungus *Trametes hirsuta*, *Enzyme Microb. Technol.*, 48(3), 273–277.

- [20] Koehler, N., Mccaherty, J., Wilson, C., Cooper, G., Baker, R., Markham, S., Ricketts, M., and Keiser, K., (2019), Ethanol Industry Outlook RFA.
- [21] Pérez-Pacheco, E., Moo-Huchin, V. M., Estrada-León, R. J., Ortiz-Fernández, A., May-Hernández, L. H., Ríos-Soberanis, C. R., and Betancur-Ancona, D., (2014), Isolation and Characterization of Starch Obtained from *Brosimum alicastrum* Swartz Seeds, *Carbohydr. Polym.*, 101, 920–927.
- [22] Hernández-González, O., Vergara-Yoisura, S. and Larqué-Saavedra, A., (2014), Studies on the Productivity of *Brosimum alicastrum* a Tropical Tree Used for Animal Feed in the Yucatan Peninsula, *Bothalia Journal*, 44(6), 70–81.
- [23] Hernández-González, O., Yoisura-Vergara, S., and Saavedra-Larqué, A., (2014), “Primeras Etapas de Crecimiento de *Brosimum alicastrum* Sw. En Yucatán,” *Rev. Mex. Ciencias For.*, 6(27), 28–48.
- [24] Moo-Huchin, V. M., Canto-Pinto, J. C., Cuevas-Glory, L. F., Sauri-Duch, E., Pérez-Pacheco, E., and Betancur-Ancona, D., (2019), Effect of Extraction Solvent on the Phenolic Compounds Content and Antioxidant Activity of Ramon Nut (*Brosimum alicastrum*),” *Chem. Pap.*, 73(7), 1647–1657.
- [25] Meiners, M., Sánchez, C., and de Blois, S., (2009), El Ramón: Fruto de Nuestra Cultura y Raíz Para La Conservación, *Biodiversitas*, 87, 7–10.
- [26] Sáenz, R. J. T., Muñoz, F. H. J., and Rueda, S. A., (2011), *Especies Promisorias de Clima Templado Para Plantaciones Forestales Comerciales En Michoacán. Libro Técnico Núm. 10*, SAGARPA-INIFAP-CIRPAC-Campo Experimental Uruapan. Uruapan, Michoacán, México.
- [27] Orantes, C., Caballero, A., and Velázquez, M. A., (2012), Aprovechamiento Del Árbol Nativo *Brosimum alicastrum* Swartz (Moraceae) En La Selva Zoque Chiapas, México (1433189174), *Lacandonia*, 6(1), 71–82.
- [28] Gillespie, A. R., Bocanegra-Ferguson, D. M., and Jimenez-Osornio, J. J., (2004), The Propagation of Ramon (*Brosimum alicastrum* Sw.; Moraceae) in Mayan Homegardens of the Yucatan Peninsula of Mexico, *New For.*, 27(1), 25–38.
- [29] “Yucatán | ¿Sabías Que El Árbol de Ramón Es Un Aliado Contra El Hambre y El Cambio Climático?” [Online]. Available: <https://sipse.com/novedades-yucatan/ramon-el-arbol->

aliado-contra-hambre-y-cambio-climatico-196151.html. [Accessed: 27-Feb-2020].

- [30] “CENCAR” [Online]. Available: <http://www.cencar.com.mx/comite-ejecutivo-cencar/>. [Accessed: 27-Feb-2020].
- [31] Pennington, T. D., (2005), *Árboles Tropicales de México: Manual Para La Identificación de Las Principales Especies*, UNAM. México, D.F.
- [32] López, A. V., Hernández, J. I. V., and Alcalá, V. M. C., (2003), Zonas Ecológicas de *Brosimum alicastrum* Sw. En La Costa Del Pacífico Mexicano, Madera y bosques, 9(1), 27–53.
- [33] “Flora: Península de Yucatán” [Online]. Available: https://www.cicy.mx/sitios/flora-digital/ficha_virtual.php?especie=1835. [Accessed: 27-Feb-2020].
- [34] Lozano, O., Shimada, A. S., and Avila, E., (1978), Valor Alimenticio de La Semilla Del Ramón (*Brosimum alicastrum*) Para El Pollo y El Cerdo, Rev. Mex. Ciencias Pecu., (34), 100–104.
- [35] Barquera Bibiano, Z., (2014), Obtencion de Etanol a Partir de Semillas de Ramon (*Brosimum alicastrum*), Tesis de Maestría. Centro de Investigación Científica de Yucatán AC. México.
- [36] Peters, C. M., and Pardo-Tejeda, E., (1982), *Brosimum alicastrum* (Moraceae): Uses and Potential in Mexico, Econ. Bot., 36(2), 166–175.
- [37] Arévalo, A., and Bressani, R., (2013), Respuesta Glicémica de La Semilla de Ramón (*Brosimum alicastrum*) En Mujeres de 16 a 25 Años de Edad, Residentes de La Ciudad Capital, Guatemala, Revista, 25, 66–71.
- [38] Ozer, H. K., (2017), Phenolic Compositions and Antioxidant Activities of Maya Nut (*Brosimum alicastrum*): Comparison with Commercial Nuts, Int. J. Food Prop., 20(11), 2772–2781.
- [39] Sadhukhan, J., Martinez-Hernandez, E., Amezcua-Allieri, M. A., Aburto, J., and S, J. A. H., (2019), Reports Economic and Environmental Impact Evaluation of Various Biomass Feedstock for Bioethanol Production and Correlations to Lignocellulosic Composition,” Bioresour. Technol. Reports, 7:100230.
- [40] T. Schepers and L. Olson. (2007). Biofuels, Springer. New York.

- [41] Sarris, D., and Papanikolaou, S., (2015), Biotechnological Production of Ethanol: Biochemistry, Processes and Technologies, Eng. In Life Sciences, doi:10.1002/elsc.201400199.
- [42] Endo, A., Nakamura, T., Ando, A., Tokuyasu, K., and Shima, J., (2008), Genome-Wide Screening of the Genes Required for Tolerance to Vanillin, Which Is a Potential Inhibitor of Bioethanol Fermentation, in *Saccharomyces cerevisiae*, *Biotechnol. Biofuels*, 1(1), 3.
- [43] Kuhz, H., Kuenz, A., Prüße, U., Willke, T., and Vorlop, K.-D., (2017), Products Components: Alcohols. En *Biorefineries*, Kuhz, H., Kuenz, A. (Ed). Springer, Cham, 339–372.
- [44] BNDES, C., (2008). Bioetanol de Caña de Azúcar. Energía Para El Desarrollo Sostenible. Resumen Ejecutivo. FAO and CEPAL.
- [45] Szulczyk, K. R., Mccarl, B. A., and Cornforth, G., (2010), Market Penetration of Ethanol, *Renew. Sustain. Energy Rev.* 14, 394–403.
- [46] “(No Title)” [Online]. Available: <https://www.bp.com/content/dam/bp/business-sites/en/global/corporate/pdfs/energy-economics/statistical-review/bp-stats-review-2019-renewable-energy.pdf>. [Accessed: 28-Feb-2020].
- [47] *Análisis y Propuesta Para La Introducción de Etanol Anhidro En Las Gasolinas Que Comercializa Pemex.*
- [48] “Pemex Informa Resultados de Licitación Para Adquisición de Etanol - Oil & Gas Magazine” [Online]. Available: <https://oilandgasmagazine.com.mx/2015/03/pemex-informa-resultados-de-licitacion-para-adquisicion-de-etanol/>. [Accessed: 28-Feb-2020].
- [49] Ruiz, H. A., Martínez, A., and Vermerris, W., (2016), Bioenergy Potential, Energy Crops, and Biofuel Production in Mexico, *BioEnergy Res.*, 7–10.
- [50] Jambo, S. A., Abdulla, R., Mohd Azhar, S. H., Marbawi, H., Gansau, J. A., and Ravindra, P., (2016), A Review on Third Generation Bioethanol Feedstock, *Renew. Sustain. Energy Rev.*, 65, 756–769.
- [51] Vohra, M., Manwar, J., Manmode, R., Padgilwar, S., and Patil, S., (2014), Bioethanol Production: Feedstock and Current Technologies, *J. Environ. Chem. Eng.* doi.org/10.1016/j.jece.2013.10.013.

- [52] Fillat, Ú., Ibarra, D., Eugenio, E., Moreno, A. D., Tom, E., and Mart, R., (2017), Laccases as a Potential Tool for the Efficient Conversion of Lignocellulosic Biomass : A Review, *Fermentation*. doi:10.3390/fermentation3020017.
- [53] Ai, Y., and Jane, J., (2015), Gelatinization and Rheological Properties of Starch, *Starch-Stärke*, 67(3–4), 213–224.
- [54] Bertolini, A., (2009), *Starches: Characterization, Properties, and Applications*, CRC Press.
- [55] Prieto, J., Rubio, C., Gonzales, A., and Ramirez, C., (2009), Degradación Física Del Almidón de Cebada (*Hordeum sativum* Jess). Correlación Entre La Gelatinización y El Tamaño de Gránulos. Centro de Investigaciones Químicas. Universidad Autónoma Del Estado de Hidalgo-México,” *Multiciencias*, 9(2), 115–125.
- [56] Copeland, L., Blazek, J., Salman, H., and Tang, M. C., (2009), Form and Functionality of Starch, *Food Hydrocoll.*, 23(6), 1527–1534.
- [57] Wang, S., and Copeland, L., (2013), Molecular Disassembly of Starch Granules during Gelatinization and Its Effect on Starch Digestibility: A Review, *Food Funct.*, 4(11), 1564–1580.
- [58] Xie, F., Pollet, E., Halley, P. J., and Avérous, L., (2013), Starch-Based Nano-Biocomposites, *Prog. Polym. Sci.*, 38(10–11), 1590–1628.
- [59] Moo-Huchin, V. M., Cabrera-Sierra, M. J., Estrada-León, R. J., Ríos-Soberanis, C. R., Betancur-Ancona, D., Chel-Guerrero, L., Ortiz-Fernández, A., Estrada-Mota, I. A., and Pérez-Pacheco, E., (2015), Determination of Some Physicochemical and Rheological Characteristics of Starch Obtained from *Brosimum alicastrum* Swartz Seeds, *Food Hydrocoll.*, 45, 48–54.
- [60] Maarel, M. J. E. C. Van Der, and Veen, B. Van Der, (2002), Properties and Applications of Starch-Converting Enzymes of the α -Amylase Family, *J. Biotechnol.* 94, 137–155.
- [61] Gupta, R., Gigras, P., Mohapatra, H., and Goswami, V. K., (2003), Microbial α -amylases : A Biotechnological Perspective, *Process Biochem.* doi:10.1016/S0032-9592(03)00053-0.
- [62] Ahmed, S. A., Mostafa, F. A., Helmy, W. A., and Abdel-Naby, M. A., (2017), Improvement of Bacterial α -Amylase Production and Application Using Two Steps

Statistical Factorial Design, *Biocatal. Agric. Biotechnol.*, 10, 224–233.

- [63] Muralikrishna, G., and Nirmala, M., (2005), Cereal α -Amylases-an Overview, *Carbohydrate polymer* 60(2), 163–173.
- [64] Saranraj, P., & Stella, D. (2013) “Fungal Amylase - A Review, *Int J Microbiol Res*, 4(2), 203-211.
- [65] Kocabay, S., Çetinkaya, S., Akkaya, B., and Yenidünya, A. F., (2016), Characterization of Thermostable β -Amylase Isozymes from *Lactobacillus Fermentum*, *Int. J. Biol. Macromol.*, 93, 195–202.
- [66] Das, R., and Kayastha, A. M., (2019), Enzymatic Hydrolysis of Native Granular Starches by a New β -Amylase from Peanut (*Arachis hypogaea*), *Food Chem.*, 276, 583–590.
- [67] Brar, K. K., Agrawal, D., Chadha, B. S., and Lee, H., (2018), Evaluating Novel Fungal Secretomes for Efficient Saccharification and Fermentation of Composite Sugars Derived From Hydrolysate and Molasses Into Ethanol, *Bioresour. Technol.* doi: 10.1016/j.biortech.2018.11.004
- [68] Marín-Navarro, J., and Polaina, J., (2011), Glucoamylases: Structural and Biotechnological Aspects, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 89(5), 1267–1273.
- [69] Sanchez, O. J., and Cardona, C. A., (2008), Trends in Biotechnological Production of Fuel Ethanol from Different Feedstocks, *Bioresour. Technol.*, 99(13), 5270–5295.
- [70] Xu, Q.-S., Yan, Y.-S., and Feng, J.-X., (2016), Efficient Hydrolysis of Raw Starch and Ethanol Fermentation: A Novel Raw Starch-Digesting Glucoamylase from *Penicillium Oxalicum*, *Biotechnol. Biofuels*, 9(1), 216.
- [71] Prikhodko, D., & Rybchynsky, R. (2009). *Agribusiness handbook: wheat flour. Agribusiness Handbooks. Rome, Italy: FAO.*
- [72] Olguin-Maciel, E., Larqué-Saavedra, A., Pérez-Brito, D., Barahona-Pérez, L. F., Alzate-Gaviria, L., Toledano-Thompson, T., Lappe-Oliveras, P. E., Huchin-Poot, E. G., and Tapia-Tussell, R., (2017), *Brosimum alicastrum* as a Novel Starch Source for Bioethanol Production, *Energies*. 10(10).
- [73] Godbey, W. T., (2014), *An Introduction to Biotechnology: The Science, Technology and Medical Applications*, Elsevier.

- [74] Canilha, L., Chandel, A. K., Suzane dos Santos Milessi, T., Antunes, F. A. F., Luiz da Costa Freitas, W., das Graças Almeida Felipe, M., and da Silva, S. S., (2012), Bioconversion of Sugarcane Biomass into Ethanol: An Overview about Composition, Pretreatment Methods, Detoxification of Hydrolysates, Enzymatic Saccharification, and Ethanol Fermentation, *Biomed Res. Int.* doi.org/10.1155/2012/989572.
- [75] Lin, Y., and Tanaka, S., (2006), Ethanol Fermentation from Biomass Resources: Current State and Prospects, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 69(6), 627–642.
- [76] Bai, F. W., Anderson, W. A., and Moo-Young, M., (2008), Ethanol Fermentation Technologies from Sugar and Starch Feedstocks, *Biotechnol. Adv.*, 26(1), 89–105.
- [77] Vázquez, H. J., & Dacosta, O. (2007). Fermentación alcohólica: Una opción para la producción de energía renovable a partir de desechos agrícolas, *Ingeniería, investigación y tecnología*, 8(4), 249-259.
- [78] Nelson, D. L., and Cox, M. M., 2004, *Lehninger Principles of Biochemistry Lecture Notebook*, Macmillan.
- [79] Parisutham, V., Hyun, T., and Kuk, S., (2014), Feasibilities of Consolidated Bioprocessing Microbes : From Pretreatment to Biofuel Production, *Bioresour. Technol.*, 161, 431–440.
- [80] Dahnum, D., Octavia, S., Triwahyuni, E., and Nurdin, M., (2015), Comparison of SHF and SSF Processes Using Enzyme and Dry Yeast for Optimization of Bioethanol Production from Empty Fruit Bunch, *Energy Procedia*, 68,107–116.
- [81] Devarapalli, M., and Atiyeh, H. K., (2015), A Review of Conversion Processes for Bioethanol Production with a Focus on Syngas Fermentation, *Biofuel Research J.* 7, 268–280.
- [82] Fan, Z., (2014), Consolidated Bioprocessing for Ethanol Production, En *Biorefineries*, , 141–160. Elsevier.
- [83] Kurtzman, C., Fell, J. W., and Boekhout, T., (2011), *The Yeasts: A Taxonomic Study*, Elsevier.
- [84] Koppram, R., Nielsen, F., Albers, E., Lambert, A., Wännström, S., Welin, L., Zacchi, G., and Olsson, L., (2013), Simultaneous Saccharification and Co-Fermentation for Bioethanol Production Using Corncobs at Lab , PDU and Demo Scales, *Biofuels*, 6(1),

2–11.

- [85] Bhatia, L., and Johri, S., (2015), Optimization of Simultaneous Saccharification and Fermentation Parameters for Sustainable Ethanol Production from Sugarcane Bagasse by *Pachysolen tannophilus* MTCC 1077, Sugar Tech. doi:10.1007/s12355-015-0418-6.
- [86] Mbaneme-Smith, V., and Chinn, M. S., (2015), Consolidated Bioprocessing for Biofuel Production: Recent Advances, Energy Emiss. Control Technol., 3, 23.
- [87] Ábrego, U., Chen, Z., and Wan, C., (2017), Consolidated Bioprocessing Systems for Cellulosic Biofuel Production, En Advances in Bioenergy, 2, 143–182.
- [88] Jouzani, G. S., and Taherzadeh, M. J., (2015), Advances in Consolidated Bioprocessing Systems for Bioethanol and Butanol Production from Biomass: A Comprehensive Review, Biofuels Research J. 2(1), 152–195.
- [89] Olson, D. G., McBride, J. E., Shaw, A. J., and Lynd, L. R., (2012), Recent Progress in Consolidated Bioprocessing, Curr. Opin. Biotechnol., 23(3), 396–405.
- [90] Zuroff, T. R., Xiques, S. B., and Curtis, W. R., 2013, “Consortia-Mediated Bioprocessing of Cellulose to Ethanol with a Symbiotic *Clostridium phytofermentans*/Yeast Co-Culture, Biotechnol. Biofuels, 6(1), 59.
- [91] Nagarajan, D., Lee, D.-J., and Chang, J.-S., (2019), Recent Insights into Consolidated Bioprocessing for Lignocellulosic Biohydrogen Production, Int. J. Hydrogen Energy, 44(28), 14362–14379.
- [92] Hasunuma, T., Okazaki, F., Okai, N., Hara, K. Y., Ishii, J., and Kondo, A., (2013), A Review of Enzymes and Microbes for Lignocellulosic Biorefinery and the Possibility of Their Application to Consolidated Bioprocessing Technology, Bioresour. Technol., 135, 513–522.
- [93] Madadi, M., and Abbas, A., (2017), Lignin Degradation by Fungal Pretreatment: A Review, J. Plant Pathol. Microbiol, 8(2), 1–6.
- [94] Peralta, R. M., da Silva, B. P., Côrrea, R. C. G., Kato, C. G., Seixas, F. A. V., & Bracht, A. (2017). Enzymes from basidiomycetes—peculiar and efficient tools for biotechnology. En Biotechnology of microbial enzymes (119-149). Academic Press.
- [95] Tuomela, M., and Hatakka, A., (2011), Oxidative Fungal Enzymes for Bioremediation.

Comput Biol: 183–196.

- [96] Maehara, T., Ichinose, H., Furukawa, T., Ogasawara, W., and Eastwood, D., (2013), Ethanol Production from High Cellulose Concentration by the Basidiomycete Fungus *Flammulina velutipes*, *Fungal Biol.*, 117(3), 220–226.
- [97] Elisashvili, V., and Kachlishvili, E., (2009), Physiological Regulation of Laccase and Manganese Peroxidase Production by White-Rot Basidiomycetes, *J. Biotechnol.*, 144(1), 37–42.
- [98] Ma, R., Yang, R., Liu, X., Chen, Z., Yang, C., and Wang, S., (2015), Chemical Composition and Immunomodulatory Activity of Mycelia of the Hairy Bracket Mushroom, *Trametes hirsuta* (Higher Basidiomycetes), *Int. J. Med. Mushrooms*, 17(3).
- [99] Liu, J., Shi, P., Ahmad, S., Yin, C., Liu, X., Liu, Y., Zhang, H., and Xu, Q., (2019), Co - Culture of *Bacillus Coagulans* and *Candida Utilis* Efficiently Treats *Lactobacillus* Fermentation Wastewater, *AMB Express*. 9(15).
- [100] Bernstein, H. C., Paulson, S. D., and Carlson, R. P., (2012), Synthetic *Escherichia coli* Consortia Engineered for Syntrophy Demonstrate Enhanced Biomass Productivity, *J. Biotechnol.*, 157(1), 159–166.
- [101] Hasunuma, T., and Kondo, A., (2012), Consolidated Bioprocessing and Simultaneous Saccharification and Fermentation of Lignocellulose to Ethanol with Thermotolerant Yeast Strains, *Process Biochem.*, 47(9), 1287–1294.
- [102] Alves, E., Lucas, G. C., Pozza, E. A., and de Carvalho Alves, M., (2013), Scanning Electron Microscopy for Fungal Sample Examination, *Laboratory Protocols in Fungal Biology*, Springer, 133–150.
- [103] Escobar, B., Pérez-Salcedo, K. Y., Alonso-Lemus, I. L., Pacheco, D., and Barbosa, R., (2017), N-Doped Porous Carbon from Sargassum Spp. as Metal-Free Electrocatalysts for Oxygen Reduction Reaction in Alkaline Media, *Int. J. Hydrogen Energy*, 42(51), 30274–30283.
- [104] Silva, T. A. L., Zamora, H. D. Z., Varão, L. H. R., Prado, N. S., Baffi, M. A., and Pasquini, D., (2018), Effect of Steam Explosion Pretreatment Catalysed by Organic Acid and Alkali on Chemical and Structural Properties and Enzymatic Hydrolysis of Sugarcane Bagasse, *Waste biomass valorization*, 9(11), 2191–2201.

- [105] Tapia-Tussell, R., Avila-Arias, J., Domínguez Maldonado, J., Valero, D., Olguin-Maciel, E., Pérez-Brito, D., & Alzate-Gaviria, L. (2018). Biological Pretreatment of Mexican Caribbean Macroalgae Consortia using Bm-2 strain (*Trametes hirsuta*) and its Enzymatic Broth to improve Biomethane Potential. *Energies*, 11(3), 494.
- [106] Mariotti, F., Tomé, D., and Mirand, P. P., (2008), Converting Nitrogen into Protein—beyond 6.25 and Jones' Factors, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 48(2), 177–184.
- [107] Jones, D. B., (1941), Factors for Converting Percentages of Nitrogen in Foods and Feeds into Percentages of Protein. US Dept. of Agr. Cir. No. 83, 22 Pp, SI. Rev.
- [108] Tapia-Tussell, R., Pérez-brito, D., Torres-calzada, C., Cortés-velázquez, A., Alzate-gaviria, L., Chablé-Villacís, R., and Solís-pereira, S., (2015), Laccase Gene Expression and Vinasse Biodegradation by *Trametes hirsuta* Strain Bm-2, *Molecules*, 20(8) 15147–15157.
- [109] Miller, G. L., 1959, "Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar," *Anal. Chem.*, 31(3), 426–428.
- [110] Tapia-Tussell, R., Pérez-Brito, D., Rojas-Herrera, R., Cortes-Velazquez, A., Rivera-Muñoz, G., and Solis-Pereira, S., (2011), New Laccase-Producing Fungi Isolates with Biotechnological Potential in Dye Decolorization, *African J. Biotechnol.*, 10(50).
- [111] Huchin-Poot, E. G., (2015), Aislamiento de la microbiota del fruto del ramon *Brosimum alicastrum* para su uso en la producción de etanol. Tesis de Maestría. Centro de Investigación Científica de Yucatan, AC. México.
- [112] Favaro, L., Viktor, M. J., Rose, S. H., Viljoen-bloom, M., Zyl, W. H. Van, Basaglia, M., Cagnin, L., and Casella, S., (2015), Consolidated Bioprocessing of Starchy Substrates Into Ethanol by Industrial *Saccharomyces cerevisiae* Strains Secreting Fungal Amylases, *Biotechnol. Bioeng.* 112(9), 1751–1760.
- [113] Ahmed, S. A., Mostafa, F. A., and Ouis, M. A., (2018), Enhancement Stability and Catalytic Activity of Immobilized α -Amylase Using Bioactive Phospho-Silicate Glass as a Novel Inorganic Support, *Int. J. Biol. Macromol.*, 112, 371–382.
- [114] Johannes, C., and Majcherczyk, A., (2000), Natural Mediators in the Oxidation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by Laccase Mediator Systems, *Appl. Environ. Microbiol.*, 66(2), 524–528.

- [115] Lachance, M.-A., (1995), Yeast Communities in a Natural Tequila Fermentation, *Antonie Van Leeuwenhoek*, 68(2), 151–160.
- [116] Yarrow, D., (1998), Methods for the Isolation, Maintenance and Identification of Yeasts, *The Yeasts*, Elsevier, pp. 77–100.
- [117] Shahryari, Z., Fazaelpoor, M. H., Ghasemi, Y., Lennartsson, P. R., and Taherzadeh, M. J., (2019), Amylase and Xylanase from Edible Fungus *Neurospora intermedia*: Production and Characterization, *Molecules*, 24(4), 1–14.
- [118] Guillaume, A., Thorigné, A., Carré, Y., Vinh, J., and Levavasseur, L., (2019), Contribution of Proteases and Cellulases Produced by Solid - State Fermentation to the Improvement of Corn Ethanol Production, *Bioresour. Bioprocess.* 6(1), 7.
- [119] Kirsch, L. de S., de Macedo, A. J. P., and Teixeira, M. F. S., (2016), Production of Mycelial Biomass by the Amazonian Edible Mushroom *Pleurotus albidus*,” *Brazilian J. Microbiol.* 47(3), 658-664.
- [120] Villegas-Silva, P. A., Toledano-Thompson, T., Canto-Canché, B. B., Larqué-Saavedra, A., & Barahona-Pérez, L. F. (2014). Hydrolysis of *Agave fourcroydes* Lemaire (henequen) leaf juice and fermentation with *Kluyveromyces marxianus* for ethanol production. *BMC biotechnology*, 14(1), 14.
- [121] Pino, M. S., Rodríguez-Jasso, R. M., Michelin, M., and Ruiz, H. A., (2019), Enhancement and Modeling of Enzymatic Hydrolysis on Cellulose from Agave Bagasse Hydrothermally Pretreated in a Horizontal Bioreactor, *Carbohydr. Polym.*, 211, 349–359.
- [122] Fillat, Ú., Martín-Sampedro, R., Ibarra, D., Macaya, D., Martín, J. A., and Eugenio, M. E., (2017), Potential of the New Endophytic Fungus *Hormonema* sp. CECT-13092 for Improving Processes in Lignocellulosic Biorefineries: Biofuel Production and Cellulosic Pulp Manufacture, *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 92(5), 997–1005.
- [123] Souza, P. M. de, (2010), Application of Microbial α -Amylase in Industry-A Review, *Brazilian J. Microbiol.*, 41(4), 850–861.
- [124] Blanco, A. S., Durive, O. P., Pérez, S. B., Montes, Z. D., and Guerra, N. P., (2016), Simultaneous Production of Amylases and Proteases by *Bacillus Subtilis* in Brewery Wastes, *Brazilian J. Microbiol.*, 47(3), 665–674.

- [125] Aruna, A., Nagavalli, M., Girijashankar, V., Ponamgi, S. P. D., Swathisree, V., and Venkateswar Rao, L., (2015), Direct Bioethanol Production by Amylolytic Yeast *Candida albicans*,” Lett. Appl. Microbiol., 60(3), 229–236.
- [126] Castoldi, R., Bracht, A., Rodriguez, G., Morais, D., Luciano, M., Carvalho, R., Correa, G., Aparecida, R., Fátima, R. De, Muniz, P., Lourdes, M. De, Moraes, T. De, Giatti, C., Souza, M. De, and Marina, R., (2014), Biological Pretreatment of Eucalyptus Grandis Sawdust with White-Rot Fungi: Study of Degradation Patterns and Saccharification Kinetics, Chem. Eng. J., 258, 240–246.
- [127] Pervez, S., Aman, A., Iqbal, S., Siddiqui, N. N., Ali, S., and Qader, U., (2014), Saccharification and Liquefaction of Cassava Starch: An Alternative Source for the Production of Bioethanol Using Amylolytic Enzymes by Double Fermentation Process BMC biotechnology, 14(1), 49.
- [128] Han, J. R., An, C. H., and Yuan, J. M., (2005), Solid-State Fermentation of Cornmeal with the Basidiomycete *Ganoderma lucidum* for Degrading Starch and Upgrading Nutritional Value., Journal of applied microbiology, 99(4), 910-915.
- [129] Vasina, D. V, Mustafaev, O. N., Moiseenko, K. V, Sadovskaya, N. S., Glazunova, O. A., Tyurin, A. A., Fedorova, T. V, Pavlov, A. R., Tyazhelova, T. V, and Goldenkova-Pavlova, I. V, (2015), The *Trametes hirsuta* 072 Laccase Multigene Family: Genes Identification and Transcriptional Analysis under Copper Ions Induction, Biochimie, 116, 154–164.
- [130] Zapata-Castillo, P., Villalonga-Santana, M. D. L., Tamayo-Cortés, J., Rivera-Muñoz, G., and Solís-Pereira, S., (2012), Purification and Characterization of Laccase from *Trametes hirsuta* Bm-2 and Its Contribution to Dye and Effluent Decolorization, African Journal of Biotechnology, 11(15), 3603-3611.
- [131] Wang, J., Suzuki, T., Dohra, H., Takigami, S., Kako, H., Soga, A., Kamei, I., Mori, T., Kawagishi, H., and Hirai, H., (2016), Analysis of Ethanol Fermentation Mechanism of Ethanol Producing White-Rot Fungus *Phlebia* Sp . MG-60 by RNA-Seq, BMC Genomics, 17(1), 616.
- [132] Xu, Y., Li, J., Zhang, M., and Wang, D., (2018), Modified Simultaneous Saccharification and Fermentation to Enhance Bioethanol Titters and Yields, Fuel, 215, 647–654.
- [133] Paschos, T., Xiros, C., and Christakopoulos, P., (2015), Ethanol Effect on Metabolic Activity of the Ethalogenic Fungus *Fusarium oxysporum*, BMC biotechnology, 15(1), 15.

- [134] Okamura, T., Ogata, T., Minamoto, N., Takeno, T., Noda, H., Fukuda, S., and Ohsugi, M., (2001), Characteristics of Wine Produced by Mushroom Fermentation, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 65(7), 1596–1600.
- [135] Radecka, D., Mukherjee, V., Mateo, R. Q., Stojiljkovic, M., Foulquié-Moreno, M. R., and Thevelein, J. M., (2015), Looking beyond *Saccharomyces*: The Potential of Non-Conventional Yeast Species for Desirable Traits in Bioethanol Fermentation, *FEMS Yeast Res.*, 15(6).
- [136] Mukherjee, V., Radecka, D., Aerts, G., Verstrepen, K. J., Lievens, B., and Thevelein, J. M., (2017), Phenotypic Landscape of Non-Conventional Yeast Species for Different Stress Tolerance Traits Desirable in Bioethanol Fermentation, *Biotechnol. Biofuels*, 10(1), 216.
- [137] Okamoto, K., Uchii, A., Kanawaku, R., and Yanase, H., (2014), Bioconversion of Xylose, Hexoses and Biomass to Ethanol by a New Isolate of the White Rot Basidiomycete *Trametes versicolor*,” *Springerplus*, 3(1), 121.
- [138] Avanthi, A., and Mohan, S. V., (2019), Single Pot Bioprocessing For Ethanol Production from Biogenic Municipal Solid Waste, *Bioresour. Technol.* 283, 159-167.
- [139] Viktor, M. J., Rose, S. H., Zyl, W. H. Van, and Viljoen-bloom, M., 2013, “Raw Starch Conversion by *Saccharomyces Cerevisiae* Expressing *Aspergillus Tubingensis* Amylases. *Biotechnology for biofuels*, 6(1), 167.
- [140] Sakwa, L., Cripwell, R. A., and Rose, S. H., (2018), Consolidated Bioprocessing of Raw Starch with *Saccharomyces Cerevisiae* Strains Expressing Fungal Alpha-Amylase and Glucoamylase Combinations, *FEMS yeast research*, 18(7).
- [141] Díaz, A., Bomben, R., Dini, C., Viña, S. Z., García, M. A., Ponzi, M., and Comelli, N., (2019), *Jerusalem artichoke* Tuber Flour as a Wheat Flour Substitute for Biscuit Elaboration, *LWT*, 108, 361-369.
- [142] Lemos, P. V. F., Barbosa, L. S., Ramos, I. G., Coelho, R. E., and Druzian, J. I., (2019), Characterization of Amylose and Amylopectin Fractions Separated from Potato, Banana, Corn, and Cassava Starches, *Int. J. Biol. Macromol.*, 132, 32–42.
- [143] Long, G., Ji, Y., Pan, H., Sun, Z., Li, Y., and Qin, G., (2015), Characterization of Thermal Denaturation Structure and Morphology of Soy Glycinin by FTIR and SEM, *Int. J. food*

Prop., 18(4), 763–774.

- [144] Pelissari, F. M., Andrade-Mahecha, M. M., do Amaral Sobral, P. J., and Menegalli, F. C., (2013), Comparative Study on the Properties of Flour and Starch Films of Plantain Bananas (*Musa paradisiaca*), *Food Hydrocoll.*, 30(2), 681–690.
- [145] Gupta, B. S., Jelle, B. P., and Gao, T., (2015), Application of ATR-FTIR Spectroscopy to Compare the Cell Materials of Wood Decay Fungi with Wood Mould Fungi, *Int. J. Spectrosc.*, *International Journal of Spectroscopy*. doi.org/10.1155/2015/521938
- [146] Ayansina, A. D. V., Adelaja, A. O., and Mohammed, S. S. D., (2017), Characterization of Amylase from Some *Aspergillus* and *Bacillus* Species Associated with Cassava Waste Peels, *Adv. Microbiol.*, 07(04), 280–292.
- [147] Dar, G. H., Kamili, A. N., Nazir, R., Bandh, S. A., Jan, T. R., and Chishti, M. Z., (2015), Enhanced Production of α -Amylase by *Penicillium Chrysogenum* in Liquid Culture by Modifying the Process Parameters, *Microb. Pathog.*, 88, 10–15.
- [148] Singh, S., Singh, S., Bali, V., Sharma, L., and Mangla, J., (2014), Production of Fungal Amylases Using Cheap , Readily Available Agriresidues , for Potential Application in Textile Industry, *BioMed Res. Int.*, 2014.
- [149] Kwatia, S., Pearl, V., and Ofosu, I. W., (2017), Optimization of Amylase Production by *Aspergillus Niger* Cultivated on Yam Peels in Solid State Fermentation Using Response Surface Methodology, *African Journal of Biochemistry*, 11(07), 34–42.
- [150] Gopinath, S. C. B., Anbu, P., Arshad, M. K., Lakshmi Priya, T., Voon, C. H., Hashim, U., and Chinni, S. V., (2017), Biotechnological Processes in Microbial Amylase Production,” *Biomed Res. Int.*, 2017.
- [151] Zhang, J., Cui, J. H., Yin, T., Sun, L., and Li, G., (2013), Activated Effect of Lignin on α -Amylase, *Food Chem.*, 141(3), 2229–2237.
- [152] Afrisham, S., Badoei-Dalfard, A., Namaki-Shoushtari, A., and Karami, Z., (2016), Characterization of a Thermostable, CaCl_2 -Activated and Raw-Starch Hydrolyzing Alpha-Amylase from *Bacillus licheniformis* AT70: Production under Solid State Fermentation by Utilizing Agricultural Wastes, *J. Mol. Catal. B Enzym.*, 132, 98–106.
- [153] Zapata-Castillo, P., Villalonga-Santana, L., Islas-Flores, I., Rivera-Muñoz, G., Ancona-Escalante, W., and Solís-Pereira, S., (2015), Synergistic Action of Laccases from

Trametes hirsuta Bm2 Improves Decolourization of Indigo Carmine, Lett. Appl. Microbiol., 61(3), 252–258.

- [154] Shekher, R., Sehgal, S., Kamthania, M., and Kumar, A., (2011), Laccase: Microbial Sources, Production, Purification, and Potential Biotechnological Applications, Enzyme Res., 2011.
- [155] Yang, J., Li, W., Ng, T. B., Deng, X., Lin, J., and Ye, X., (2017), Laccases : Production , Expression Regulation , and Applications in Pharmaceutical Biodegradation, Fron. Microbiol., 8(5), 832.
- [156] Piscitelli, A., Giardina, P., Lettera, V., Pezzella, C., Sannia, G., and Faraco, V., (2011), Induction and Transcriptional Regulation of Laccases in Fungi, Curr. Genomics, 12(2), 104–112.
- [157] van Munster, J. M., Daly, P., Delmas, S., Pullan, S. T., Blythe, M. J., Malla, S., Kokolski, M., Noltorp, E. C. M., Wennberg, K., and Fetherston, R., (2014), The Role of Carbon Starvation in the Induction of Enzymes That Degrade Plant-Derived Carbohydrates in *Aspergillus niger*, Fungal Genet. Biol., 72, 34–47.
- [158] Kim, S. W., Hwang, H. J., Xu, C. P., Choi, J. W., and Yun, J. W., (2003), Effect of Aeration and Agitation on the Production of Mycelial Biomass and Exopolysaccharides in an Entomopathogenic Fungus *Paecilomyces sinclairii*, Lett. Appl. Microbiol., 36(5), 321–326.
- [159] John, J., (2017), Amylases-Bioprocess and Potential Applications: A Review, Int. J. Bioinforma. Biol. Sci., 5(2), 41–50.
- [160] El-Batal, A. I., Elkenawy, N. M., Yassin, A. S., and Amin, M. A., (2015), Laccase Production by *Pleurotus ostreatus* and Its Application in Synthesis of Gold Nanoparticles, Biotechnol. Reports, 5, 31-39.
- [161] Sharma, V., Ayothiraman, S., and Dhakshinamoorthy, V., (2019), Production of Highly Thermo-Tolerant Laccase from Novel Thermophilic Bacterium *Bacillus* sp. PC-3 and Its Application in Functionalization of Chitosan Film, J. Biosci. Bioeng., 127(6), 672–678.
- [162] Tantipaibulvut, S., Pinisakul, A., Rattanachaisit, P., Klatin, K., Onsriprai, B., and Boonyaratsiri, K., (2015), Ethanol Production from Desizing Wastewater Using Co-Culture of *Bacillus subtilis* and *Saccharomyces cerevisiae*, *Energy Procedia*. 79. 1001-

1007.

- [163] Pietrzak, W., and Kawa-Rygielska, J., (2019), Backset Valorization in Dry-Grind Ethanol Process by Co-Culture of Edible Filamentous Fungi and Fodder Yeast, *J. Clean. Prod.*, 220, 376–385.
- [164] Farias, D., and Maugeri Filho, F., (2019), Co-Culture Strategy for Improved 2G Bioethanol Production Using a Mixture of Sugarcane Molasses and Bagasse Hydrolysate as Substrate, *Biochem. Eng. J.*, 147, 29–38.
- [165] Mishra, S. K., and Chandra, R., (2016), Waste Potatoes as an Alternative Source for the Production of Bioethanol by Co-Culture of *Saccharomyces cerevisiae* and *Aspergillus niger*. *Int. J. of Curr. Res.*, 8(5), 30139-30142.
- [166] Zhao, X., Yi, S., and Li, H., (2019), The Optimized Co-Cultivation System of *Penicillium oxalicum* 16 and *Trichoderma reesei* RUT-C30 Achieved a High Yield of Hydrolase Applied in Second-Generation Bioethanol Production, *Renew. Energy*, 136, 1028–1035.
- [167] Sperandio, G. B., Ximenes, E., and Filho, F., (2019), International Biodeterioration & Biodegradation Fungal Co-Cultures in the Lignocellulosic Biorefinery Context: A Review, *Int. Biodeterior. Biodegrad.*, 142(12), 109–123.

ANEXO

Medios de cultivo

Anexo 1A. Harina de semillas de ramón-extracto de levadura (HSREL)

Reactivo	Cantidad
Extracto de levadura	4 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.5 g
K ₂ HPO ₄	1.0 g
HSR	15.0 g
Agua	1000 mL

Anexo 1B. GELP (glucosa-extracto de levadura-peptona)

Reactivo	Cantidad
Glucosa	20.0 g
Extracto de levadura	5.0 g
Peptona de caseína	10.0 g
Agua	1000 mL

Anexo 1C. Extracto de levadura-almidón-agar (ELAA)

Reactivo	Cantidad
extracto de levadura	4g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.5g
K ₂ HPO ₄	1g
agar	20g
almidón soluble	15g
Agua	1000 mL

Anexo 1D. Malta-agar al 2% (EMA)

Reactivo	Cantidad
Extracto de malta	20g
Agar	20g
Agua	1000 mL

Anexo 1E. Extracto de levadura-malta-agar (YMA)

Reactivo	Cantidad
Glucosa	10g
Extracto de levadura	3g
Extracto de malta	3g
Peptona	5g
Agar	20g
Agua	1000 mL

Anexo 1F. Medio basal Wickerham

Reactivo	Cantidad
Extracto de levadura	4.5
Peptona	7.5
Agua	1000 mL

Anexo 1G. YMPG

Reactivo	Cantidad
Glucosa	10.0 g
Extracto de malta	10.0 g
Peptona	2.0 g
Extracto de levadura	2.0 g
K ₂ HPO ₄	2.0 g
MgSOH ₂ O	1.0 g
Tiamina	0.001 g
Agar	20.0 g
Agua	1000 mL