



**Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.**

**Posgrado en Ciencias en Energía Renovable**

**SACARIFICACIÓN Y CO-FERMENTACIÓN  
SIMULTÁNEA PARA LA PRODUCCIÓN DE BIOETANOL  
A PARTIR DE HARINA DE SEMILLAS DE *BROSIMUM  
ALICASTRUM*.**

**Tesis que presenta**

Cynthia Lizeth Garza Garza

**En opción al título de**

**MAESTRO EN CIENCIAS EN ENERGÍA RENOVABLE**

Mérida, Yucatán, México

2021

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada no. 714326 para la realización de la presente investigación.

Al Centro de Investigación Científica de Yucatán (CICY) y a la Unidad de Energía Renovable por aceptarme y poner a disposición las instalaciones, equipos e instrumentos para poder realizar y concluir el trabajo.

Al Dr. Raúl Tapia Tussell por aceptarme en su equipo de trabajo, guiarme y siempre impulsarme a mejorar, y por la paciencia mostrada.

A la Dra. Patricia Lappe Oliveras por guiarme y estar al pendiente del desarrollo de la investigación, y, sobre todo, por su amabilidad en responder las dudas y corregirme.

Al Dr. Felipe Barahona por siempre ser solícito con las dudas y por transmitirme y enseñarme sus conocimientos.

A la Dra. Sara Solís por darme la posibilidad de crecer y las observaciones en la investigación.

A la Dra. Daisy Pérez Brito por su disposición de apoyarme en cualquier cosa que necesitara, aconsejarme y el gusto compartido.

Al Dr. Héctor Ruíz por su tiempo y valiosas aportaciones al trabajo.

A la I.Q. Tanit Toledano, por su múltiple ayuda y apoyo cuando lo necesitara para llevar a cabo mis experimentos y por enseñarme el uso de los equipos, muy agradecida.

Al M.C. Jorge Domínguez por su paciencia, consejos de vida, ayuda con el cromatógrafo y por enseñarme a siempre seguir aprendiendo.

Al Dr. Edgar Olguin por ser solícito con lo que necesitara para terminar el trabajo, por la paciencia, conocimientos, pláticas, ayuda e intercambio de opiniones durante la investigación.

A todos mis compañeros de laboratorio por la convivencia y ayuda durante la realización de este trabajo, y a los de la maestría Jorge Fernández, Neshly Rubalcava, Daniel Collins, Dora Medina y David Parra por compartir conmigo durante la estancia más que solo la maestría.

A mis amigos Rosa Licon, Nancy Espinosa, Cinthya Domínguez, Mizael Ortiz, Juan Neávez, Iván Silva y Nito Muñoz por darme ánimos siempre y acompañarme durante este viaje.

## DEDICATORIA

A Dios por permitirme despertar todos los días, darme salud, acompañarme y cuidarme durante este camino, y por la oportunidad de poder concluir esta experiencia y aprender de ella.

A mis padres Arnulfo Garza y Araceli Garza de Garza por siempre desear lo mejor para mí, estar pendiente y por apoyarme durante mis estudios de posgrado, aunque eso signifique partir de la seguridad del hogar. Gracias por dejarme alcanzar mis metas y acompañarme mientras lo hago.

A mis hermanas Janeth y Mariana Garza por siempre estar conmigo y apoyarme.

A mi abuela Francisca Sepúlveda por creer en mí, alentar mi estudio y ser la primera.

A mis padrinos, Federico Lozano y Elizabeth Garza, y abuelos, Arnulfo Garza y Francisca Garza por sus buenas vibras y animarme a seguir adelante.

اختر لي لحظاتك السعيدة شكرا

## ÍNDICE

INTRODUCCIÓN.....	1
CAPÍTULO I.....	3
ANTECEDENTES.....	3
1.1 Biocombustibles.....	3
1.1.2 Bioetanol.....	3
1.1.3 Bioetanol: marco mundial y en México.....	6
1.2 Almidón.....	9
1.2.1 Enzimas amilolíticas.....	11
1.3 Fermentación.....	12
1.4 Tecnologías empleadas para la fermentación.....	14
1.5 Organismos nativos.....	15
1.5.1 Descripción general de hongos y levaduras.....	16
1.6 <i>Brosimum alicastrum</i> .....	20
1.6.1 Distribución y hábitat.....	20
1.6.2 Taxonomía.....	22
1.6.3 Descripción.....	22
1.6.4 Semillas.....	23
1.6.5 Usos.....	25
1.7 Justificación.....	27
1.8 Hipótesis.....	28
1.9 Objetivo general.....	29
1.9.1 Objetivos específicos.....	29
1.10 Estrategia experimental.....	30
CAPÍTULO II.....	31
MATERIALES Y MÉTODOS.....	31
2.1 Materia prima.....	31
2.2 Material biológico.....	31
2.2.1 Reactivación de las levaduras y hongos.....	32
2.2.2 Mantenimiento de las levaduras y hongos.....	32
2.2.3 Conservación de las levaduras y hongos a mediano plazo.....	32
2.2.4 Conservación de las levaduras y hongos a largo plazo.....	32
2.2.5 Crecimiento de las cepas seleccionadas a distintas temperaturas.....	33
2.2.6 Hidrólisis de almidón soluble de las cepas en estudio.....	33

2.2.7 Tolerancia de las cepas en estudio a distintas concentraciones de etanol .....	34
2.2.8 Cinética de crecimiento de los aislados de levaduras en medio GELP .....	34
2.2.8.1 Preparación del inóculo.....	34
2.2.8.2 Cinética de crecimiento.....	35
2.2.8.3 Velocidad máxima de crecimiento y tiempos de duplicación .....	35
2.2.9 Cinética de liberación de azúcares reductores por los aislados <i>Trametes hirsuta</i> Bm-2 y RT-1 .....	36
2.2.9.1 Preparación del inóculo.....	36
2.2.9.2 Dinámica de la hidrólisis enzimática.....	36
2.3 Fermentación.....	37
2.3.1 Preparación del sustrato .....	37
2.3.2 Preparación del inóculo.....	37
2.3.3 Estrategia de SCFS .....	37
2.3.4 Destilación .....	38
2.3.5 Eficiencia del proceso .....	38
2.4 Métodos analíticos .....	38
2.4.1 Determinación de azúcares reductores directos (ARD).....	38
2.4.2 Evaluación de la concentración de azúcares reductores totales por HPLC .....	38
2.4.3 Determinación de la concentración de bioetanol por cromatografía de gases...	39
2.4.4 Análisis estadístico .....	39
CAPÍTULO III.....	40
RESULTADOS .....	40
3.1 Reactivación de los aislados de levaduras y hongos .....	40
3.2 Tolerancia de las cepas bajo estudio a distintas temperaturas.....	42
3.3 Hidrólisis de almidón soluble por los aislados de levaduras y hongos bajo estudio	47
3.4 Tolerancia de los aislados de levaduras y hongos bajo estudio a distintas concentraciones de etanol .....	50
3.5 Curva de crecimiento de los aislados nativos de levaduras en medio GELP.....	54
3.6 Cinética de liberación de azúcares reductores por <i>Trametes hirsuta</i> Bm-2 y RT-1	56
3.7 Estrategias de sacarificación y cofermentación simultánea.....	61
CONCLUSIONES .....	71
PERSPECTIVAS .....	72
BIBLIOGRAFÍA.....	73

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1. Etapas de la producción de bioetanol de distintas generaciones [16, 24]..	6
Figura 1.2 Estructura de la amilosa [32].....	10
Figura 1.3 Estructura de la amilopectina [32].....	10
Figura 1.4 Distribución geográfica de <i>Brosimum alicastrum</i> en México [78].....	21
Figura 1.5 Estrategia experimental propuesta para la producción de bioetanol a partir de harina de semillas de <i>Brosimum alicastrum</i> .....	30
Figura 2.1. Cuadrantes utilizados en la cámara de Neubauer.....	35
Figura 3.1 Reactivación de las levaduras nativas: a) <i>Candida tropicalis</i> ; b) <i>Issatchenkia orientalis</i> 2; c) <i>Hanseniaspora guilliermondii</i> ; d) <i>Meyerozyma guilliermondii</i> .....	40
Figura 3.2 Crecimiento de los aislados de <i>Trametes hirsuta</i> a) Bm-2 y b) RT-1 en PDA.....	41
Figura 3.3 Prueba de competencia intraespecífica de <i>Trametes hirsuta</i> Bm-2 y RT-141	
Figura 3.4 Tolerancia a distintas temperaturas de <i>T. hirsuta</i> Bm-2 en medio de harina de semillas de ramón.....	45
Figura 3.5 Tolerancia a distintas temperaturas de <i>T. hirsuta</i> RT-1 en medio de harina de semillas de ramón.....	45
Figura 3.6 Prueba de hidrólisis de medio de almidón soluble adicionado con base nitrogenada en <i>C. tropicalis</i> PL-1, <i>I. orientalis</i> TL-2, <i>H. guilliermondii</i> TL-3 y <i>M. guilliermondii</i> RSL-3.....	47
Figura 3.7 Hidrólisis de almidón en placa de medio de harina de semilla de ramón incubadas por 4 días a distintas temperaturas por <i>T. hirsuta</i> (a) Bm-2 y (b) RT-1.....	48
Figura 3.8 Hidrólisis del almidón soluble en medio líquido por <i>T. hirsuta</i> RT-1 a 32 °C y a diferentes días de incubación.....	50
Figura 3.9 Tolerancia a etanol de <i>T. hirsuta</i> RT-1.....	53
Figura 3.10 Crecimiento de <i>T. hirsuta</i> RT-1 en una suspensión de harina de semillas de ramón al 14 % (p/v) a) 10 días de inoculado ; b) 30 días de inoculado .....	53
Figura 3.11 Curva de crecimiento de las levaduras nativas en medio GELP a 32 ± 2°C a 130 rpm .....	54
Figura 3.12 Cinética de liberación de azúcares reductores y actividad $\alpha$ -amilasa de <i>T. hirsuta</i> RT-1 en harina de semillas de ramón a 32 °C.....	57
Figura 3.13 Actividad lacasa de <i>T. hirsuta</i> RT-1 y concentración de fenoles en harina de semillas de ramón a 32 °C.....	58
Figura 3.14 Cinética de liberación de azúcares reductores por <i>T. hirsuta</i> Bm-2 en harina de semillas de ramón a 32 °C .....	59

Figura 3.15 Actividad lacasa en harina de semillas de ramón por <i>T. hirsuta</i> Bm-2 a 32 °C .....	60
Figura 3.16 Identificación de carbohidratos en la harina de semillas de ramón hidrolizada por <i>T. hirsuta</i> RT-1.....	61
Figura 3.17 Harina de semillas de ramón agitada a 150 rpm por 24 h a 32 °C .....	62
Figura 3.18 Fermentación de la glucosa presente en el hidrolizado de la harina de semillas de ramón por <i>C. tropicalis</i> PL-1 (rojo) y <i>H. guilliermondii</i> TL-3 (naranja) .....	64
Figura 3.19 Identificación de azúcares durante la fermentación con <i>C. tropicalis</i> PL-166	
Figura 3.20 Identificación de azúcares durante la fermentación con <i>H. guilliermondii</i> TL-3 .....	67
Figura 3.21 Fementación de ARD presentes en la harina de semillas de ramón por <i>Candida tropicalis</i> PL-1 .....	69

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.1 Producción global de etanol en millones de galones [25] .....	6
Tabla 1.2 Estándares internaciones de mezclas etanol-gasolina [28] .....	7
Tabla 1.3 Aminoácidos presentes en las semillas de <i>Brosimum alicastrum</i> [85] .....	23
Tabla 1.4 Comparación de la composición del almidón encontrado en la semilla de <i>Brosimum alicastrum</i> y en <i>Zea mays</i> [9] .....	25
Tabla 2.1 Organismos y su fuente de aislamiento.....	31
Tabla 3.1 Tolerancia a distintas temperaturas de las levaduras nativas.....	43
Tabla 3.2 Tolerancia de los aislados de levaduras nativas a distintas concentraciones de etanol a 32 °C.....	51
Tabla 3.3 Parámetros cinéticos de los aislados de levaduras en medio GELP a 32 °C a 130 rpm .....	55



## RESUMEN

El uso de fuentes no renovables ha traído como consecuencia el cambio climático global derivado de las emisiones de GEI, especialmente CO<sub>2</sub>, llevando a la búsqueda de combustibles alternativos que no dependan de fuentes fósiles, como el bioetanol. Este biocombustible, puede obtenerse mediante la fermentación de los carbohidratos contenidos en la biomasa, y actualmente alrededor del 60 % de la producción mundial de etanol proviene de materias primas amiláceas, principalmente del maíz. Tomando en consideración el debate originado por el desvío del uso de materias primas destinadas para el consumo humano, hacia la producción de biocombustible (alimento vs. biocombustible), y al hecho de que la industria del bioetanol no ha florecido en México, se propone el uso de las semillas de *Brosimum alicastrum* para la producción de bioetanol, por su contenido de almidón (61-63 %) y porque en la actualidad rara vez son consumidas. El objetivo de esta tesis fue desarrollar una sacarificación y co-fermentación simultánea utilizando el basidiomiceto autóctono, *Trametes hirsuta* Bm-2 o RT-1, para hidrolizar el almidón presente en la harina de semillas de ramón, y la adición de levaduras nativas, *Candida tropicalis* PL-1 y *Hanseniaspora guilliermondii* TL-3, para fermentar los azúcares reductores producidos. Los resultados mostraron que *T. hirsuta* RT-1 fue más eficiente que *T. hirsuta* Bm-2 en la hidrólisis del almidón presente en la harina de semillas de ramón; que una agitación del hidrolizado con el hongo a 150 rpm a  $32 \pm 2$  °C por 24 h aumentó la concentración de azúcares reductores, y que la levadura *Candida tropicalis* PL-1 presentó el mejor desempeño fermentativo produciendo 18.93 g/L de etanol. Si bien, se demostró la viabilidad de la estrategia propuesta es necesario incrementar la hidrólisis del almidón en la suspensión de la harina de semillas de ramón para obtener una mayor concentración de ARD y en consecuencia más etanol.

## ABSTRACT

The use of non-renewable sources has led to a global climate change caused by GHG emissions, especially CO<sub>2</sub>, encouraging the search to produce alternative fuels that don't depend on these resources like bioethanol. This biofuel can be obtained by the fermentation of carbohydrates that are contained in the biomass and currently about 60% of worldwide bioethanol production comes from starchy feedstocks, mainly corn. Taking into account the debate that arises by the diversion of the usage of these raw materials for human consumption towards biofuel production (food vs. fuel), and to the fact that bioethanol industry has not flourished in México, it is proposed the utilization of *Brosimum alicastrum* seeds for bioethanol production, as they contain around 61-63 % of starch and are rarely consumed nowadays. The objective of this thesis, was to develop a simultaneous saccharification and co-fermentation using the indigenous white rot fungus *Trametes hirsuta* Bm-2 or RT-1 to hydrolyze the starch contained in the ramon seed flour, and the addition of native yeasts *Candida tropicalis* PL-1 and *Hanseniaspora guilliermondii* TL-3, to ferment the reducing sugars produced by the fungus. It was found that *Trametes hirsuta* RT-1 was more efficient in hydrolyzing the starch contained in the ramon seed flour, than *Trametes hirsuta* Bm-2; also agitating the hydrolysate with the fungus with 150 rpm for 24 h at 32 ±2 °C enhanced the obtention of reducing sugars, and yeast *Candida tropicalis* PL-1 presented the best fermentation performance producing 18.93 g/L of ethanol; yet that the original idea of the strategy changed to a sequential saccharification and fermentation because *Trametes hirsuta* RT-1 showed low ethanol tolerance and no fermentation capacity over the substrate. Nevertheless, the feasibility of the strategy was demonstrated and improvements still need to be made for incrementing the hydrolysis of the starch contained in the ramon seeds flour for incrementing reducing sugars and in consequence ethanol production.

## INTRODUCCIÓN

La coincidencia en el tiempo de la escasez de petróleo y del calentamiento global ha llevado a la búsqueda de combustibles alternativos que no dependan de fuentes fósiles como el gas natural, carbón y petróleo. Como respuesta a este problema, se han estado utilizando los denominados biocombustibles, los cuales se obtienen a partir de biomasa, con la idea de reemplazar de manera progresiva a los combustibles fósiles líquidos, y así, reducir los gases de efecto invernadero. Aunque en el sector del transporte se espera que el uso de los automóviles eléctricos se incremente, los biocombustibles siguen siendo, hasta ahora, la única alternativa de combustible líquido. Actualmente, los biocombustibles elaborados a escala industrial son el biodiesel y el bioetanol, siendo este último el de mayor presencia en el mercado mundial [1, 2, 3, 4].

México sigue dependiendo principalmente de combustibles fósiles para satisfacer su demanda energética, por lo que necesita diversificar sus fuentes de obtención de energía, reducir el impacto ambiental en su producción y uso, así como priorizar la inversión en energía renovable. Como respuesta a esta problemática, y con la ambición de generar energía independiente de las fuentes fósiles, el congreso mexicano aprobó en el 2008 la Ley de Promoción y Desarrollo de los Bioenergéticos [5] para incentivar el uso de los biocombustibles como el bioetanol y biodiesel. Esta ley sienta el marco regulatorio de los insumos que pueden utilizarse para la producción de biocarburantes, dentro del territorio nacional, ya sean de origen agrícola, forestal, algal o de procesos enzimáticos, para no poner en riesgo la seguridad alimentaria del país [3, 6, 7].

A pesar de que la industria del bioetanol no ha florecido en México, este podría provenir, principalmente, de la caña de azúcar, remolacha azucarera y el sorgo dulce. Recientemente, se ha considerado al bagazo de agave como materia prima potencial para su obtención, por ser un subproducto abundante de la producción de bebidas alcohólicas (pulque) y destiladas de agave (tequila y mezcal) [4, 7].

En la búsqueda de distintas alternativas de materias primas y que no compitan con el uso del suelo agrícola, en esta investigación se propone el uso de la harina de semillas del ramón (*Brosimum alicastrum* Swartz), el cual es un árbol nativo de las regiones mesoamericanas y caribeñas, que en México se localiza en 18 estados, y en Yucatán está distribuido de forma natural en la zona central, sur, oriente y norte. Las semillas de esta especie arbórea poseen un alto contenido de almidón y fueron una fuente importante de alimento para los mayas del periodo

Clásico. Sin embargo, en la República Mexicana y en la Península de Yucatán, no existen reportes de que actualmente se sigan empleando para algún uso específico [8, 9].

Entre algunos estudios previos de la producción de bioetanol utilizando harina de semillas de *B. alicastrum*, está el realizado por Olguin *et al.* (2017) [8]. En esta investigación la harina fue pretratada térmicamente, y adicionada con enzimas amilasa y glucoamilasa comerciales; posteriormente la harina pretratada se empleó como sustrato para la fermentación, y se comparó el desempeño de una cepa comercial de *S. cerevisiae* (Safoeno) con el de la cepa nativa *Candida tropicalis* (aislada de frutos de *B. alicastrum* Swartz) mostrando esta última mejor rendimiento [8, 10]. Posteriormente, Olguin y colaboradores [11] realizaron un bioproceso consolidado (BPC) empleando el mismo sustrato y el hongo nativo *Trametes hirsuta* Bm-2, recolectado en la Península de Yucatán, demostrando el potencial del hongo y de la harina de semillas de ramón para la producción de bioetanol.

Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue realizar una sacarificación y co-fermentación simultánea empleando los hongos *Trametes hirsuta* (Bm-2 y RT-1) autóctonos de la Península de Yucatán y las levaduras nativas *Candida tropicalis* (PL-1), *Issatchenkia orientalis* (TL-2), *Hanseniaspora guilliermondii* (TL-3) y *Meyerozyma guilliermondii* (RSL-3), aisladas del pericarpio, testa y semilla del fruto de *B. alicastrum*, con el fin de mejorar la producción de bioetanol a partir de la harina de semillas del árbol de ramón.

# CAPÍTULO I ANTECEDENTES

## 1.1 Biocombustibles

La actividad humana ha traído como consecuencia la emisión de gases de efecto invernadero (GEI) que han producido cambios ambientales a nivel mundial provocando el cambio climático global (CCG). Entre las principales causas de este deterioro se encuentra el uso de combustibles fósiles, la crisis energética mundial, el cambio en el uso del suelo y la deforestación. Aunado a esto, el aumento en el precio del petróleo ha llevado a la búsqueda de nuevas formas de obtención de energía que sean menos contaminantes y que suplanten progresivamente al petróleo. Con este propósito, se han explotado diferentes fuentes de energía renovable, incluida la biomasa [12].

En energía renovable, el término biomasa se entiende como cualquier tipo de materia orgánica reciente de origen vegetal, animal o microbiano, incluyendo también a la materia orgánica presente en las aguas residuales, lodos de depuradora y residuos sólidos urbanos que no sean plásticos o productos sintéticos [13].

Un ejemplo de biomasa es la de las plantas, la cual es una fuente abundante, renovable y rica en carbohidratos que puede ser transformada por microorganismos en bioenergía; este último término se define como la energía que se obtiene a partir de “materia viva” o derivada de seres vivos. De la biomasa rica en carbohidratos se pueden obtener combustibles líquidos alternativos denominados biocombustibles, y se derivan ya sea de cultivos energéticos (maíz, trigo, caña de azúcar, etc.), residuos agrícolas (rastrojo de maíz, paja del arroz, bagazo de caña de azúcar, entre otros) o biomasa residual (residuos de comida, papel, madera, etc.). Entre estos biocombustibles, se encuentra el bioetanol que, actualmente, es producido a escala industrial en todo el mundo [2, 13, 14].

### 1.1.2 Bioetanol

El etanol puede ser producido utilizando procesos petroquímicos a través de la hidratación de etileno catalizado por un ácido, comúnmente ácido fosfórico; sin embargo, este etanol se emplea para reacciones de síntesis industriales o como solvente, principalmente. Por otro lado, el etanol que se utiliza para bebidas alcohólicas y como combustible se produce mediante fermentación [15].

Se denomina bioetanol, al etanol producido por la fermentación alcohólica de biomasa rica en carbohidratos utilizando microorganismos como bacterias u hongos, y en la que además se obtienen como subproductos CO<sub>2</sub> y pequeñas cantidades de metanol, glicerol, entre otros [1, 2]. El bioetanol puede producirse a partir de cultivos que contengan azúcar o almidón (primera generación), material lignocelulósico (segunda generación), biomasa de microalgas (tercera generación) y microorganismos modificados genéticamente como microalgas, levaduras, hongos y cianobacterias (cuarta generación) [7, 16].

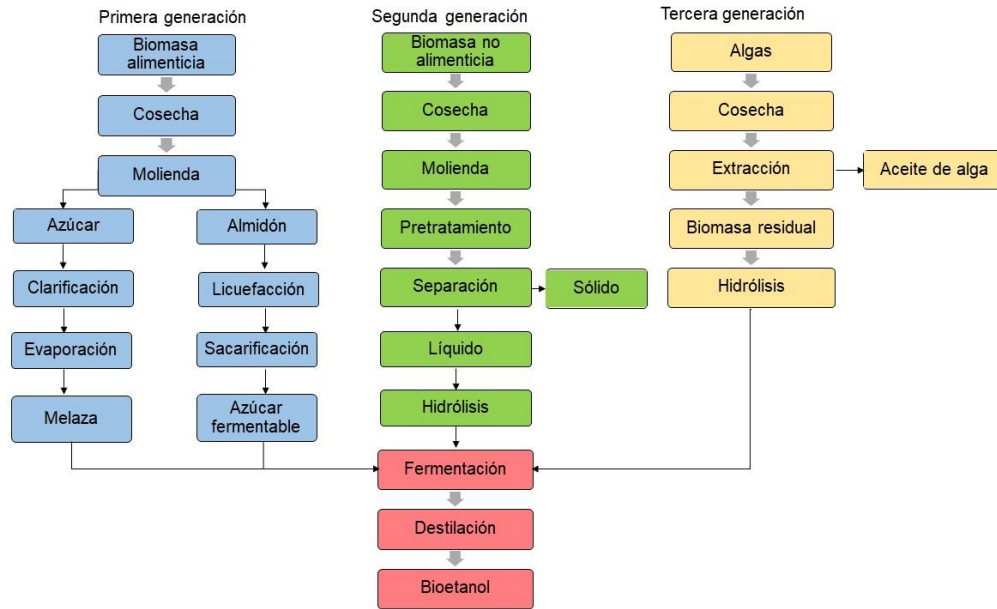
En los procesos de primera generación, el bioetanol se obtiene a partir de cultivos agrícolas que contienen azúcares simples fermentables (como en la caña de azúcar o la remolacha azucarera) o polisacáridos como el almidón (como el presente en los cereales y la yuca), y que están destinados a la alimentación. En el primer caso, los azúcares pueden ser fermentados directamente, mientras que en el segundo se requiere de una etapa de hidrólisis para obtener azúcares fermentables, los cuales son transformados en etanol y CO<sub>2</sub> con la enzima alcohol deshidrogenasa [14]. La tecnología utilizada en los biocombustibles de primera generación es bien conocida, por lo que existe poca incertidumbre relacionada a los procesos, materias primas y mercados [17]. Sin embargo, se presentan problemas como el alto costo de la materia prima, la gran cantidad de tierra, agua y fertilizantes requeridos para los cultivos, y principalmente el debate ético “alimento vs. combustible” [14, 16, 17].

Los biocombustibles de segunda generación, a diferencia de los primeros, proceden de una amplia gama de materias primas que no son cultivos alimenticios, y que no están limitados a biomasa lignocelulósica no comestible de las plantas. Ejemplos de esto son los pastos, aserrín, maderas de bajo costo, residuos agrícolas y municipales, entre otros. Esta materia orgánica está formada principalmente por lignina, celulosa y hemicelulosa, siendo las dos últimas, las que pueden ser convertidas a azúcares por medio de procesos termoquímicos o hidrólisis. Generalmente, para producir el bioetanol de segunda generación se requiere de 4 pasos: (1) pretratamiento; (2) hidrólisis; (3) fermentación y (4) destilación. Aunque la cantidad de biomasa lignocelulósica es abundante y de bajo costo, presenta desventajas como el alto precio de las enzimas empleadas en el proceso y las bajas concentraciones y rendimientos de bioetanol. Igualmente, la rentabilidad de estos biocombustibles aún está en desarrollo debido a la dificultad de la recolección, almacenamiento e hidrólisis de la biomasa, y la liberación de distintos tipos de azúcares, como las pentosas, que necesitan ser fermentados por microorganismos que podrían requerir modificaciones genéticas [16, 18, 19, 20, 21].

Para la producción de biocombustibles de tercera generación se emplea materia prima acuática, como los pastos marinos, algas y microalgas que pueden vivir en agua dulce o salada. A partir de las algas se puede producir una gran cantidad de biocombustibles como: biodiesel, turbosina, metano, butanol y bioetanol; en el caso del último, su producción se basa en la conversión de los carbohidratos contenidos en la biomasa marina (almidón, celulosa, entre otros) a azúcares fermentables. El biocombustible de tercera generación es prometedor debido a que se tiene una gran productividad de biomasa por área, alto contenido de polisacáridos, captación de CO<sub>2</sub> y a la no competencia por el uso del suelo arable y agua fresca [21]. Particularmente, la producción de bioetanol con microalgas es más simple que con biomasa lignocelulósica, porque no se requiere del pretratamiento químico o enzimático para romper los biopolímeros de lignocelulosa a azúcares fermentables. Sin embargo, una de las mayores desventajas es la gran cantidad de fósforo y nitrógeno que necesitan las microalgas para crecer [16, 18, 22].

Los biocombustibles de cuarta generación siguen en fase temprana de desarrollo, pero utilizan microorganismos modificados genéticamente como hongos, levaduras, cianobacterias, microalgas o cultivos transformados para capturar más CO<sub>2</sub> del ambiente en comparación con el que emiten. También, estos biocombustibles pueden obtenerse mediante el diseño de microorganismos fotosintéticos para producir celdas fotobiológicas solares, la combinación de la producción de combustible fotovoltaico y microbiano o la síntesis de células u organelos específicos para la obtención de biocombustibles y/o compuestos químicos de alto valor [16, 23].

En la figura 1.1 [16, 24] se presenta un diagrama general de los procesos para la producción de bioetanol de las primeras tres generaciones.



**Figura 1.1.** Etapas de la producción de bioetanol de distintas generaciones [16, 24]

### 1.1.3 Bioetanol: marco mundial y en México

La producción de bioetanol se basa principalmente en cultivos de caña de azúcar y maíz, seguidos de trigo, remolacha azucarera y sorgo. Los dos países que lideran la producción de este biocombustible son Estados Unidos de América (con un 54%) y Brasil (30%), cuyas principales materias primas son el maíz y la caña de azúcar, respectivamente, produciendo en conjunto el 84% del bioetanol de todo el mundo [16, 25].

En la tabla 1.1 se muestra la producción global de etanol de los años 2014- 2019, según los datos de la “Renewable Fuels Association” [25].

**Tabla 1.1** Producción global de etanol en millones de galones [25]

Región	2014	2015	2016	2017	2018	2019	% producción mundial
<b>Estados Unidos</b>	14,313	14,807	15,413	15,936	16,061	15,800	54%
<b>Brasil</b>	6,760	7,200	6,760	6,860	7,920	8,620	30%
<b>Unión Europea</b>	1445	1387	1377	1,400	1,430	1,440	5%
<b>China</b>	635	813	845	860	1,050	900	3%
<b>Canadá</b>	510	436	436	470	480	500	2%
<b>India</b>	85	195	275	210	400	530	2%
<b>Tailandia</b>	310	334	322	370	390	420	1%
<b>Argentina</b>	160	211	264	290	290	290	1%
<b>Resto del mundo</b>	865	391	490	414	549	600	2%



El uso principal del bioetanol es como combustible para vehículos motorizados, ya sea en su forma hidratada (95% etanol y 5% agua) para automóviles que solamente utilicen etanol y en climas cálidos como en Brasil, o como etanol anhidro (100% etanol) el cual puede mezclarse en distintas proporciones con la gasolina (E5-E85) [14, 15]. Asimismo, puede usarse como materia prima para producir el aditivo etil-ter-butyl-éter (ETBE) el cual, al combinarse con la gasolina, eleva el nivel de oxigenación reduciendo las emisiones de monóxido de carbono y hollín [14, 26].

Los vehículos que pueden alternar el uso de bioetanol (en mezcla o puro) y la gasolina, se conocen como “flex fuel”. En Brasil estos automóviles son capaces de emplear en su forma pura la gasolina o bioetanol, así como cualquier mezcla de ambos; por otro lado, en Estados Unidos de América pueden emplear desde 100% gasolina hasta 15% de gasolina con 85% de bioetanol (mezcla E85) [15, 27].

A nivel mundial se han establecido varios estándares para la mezcla de bioetanol con gasolina, por ejemplo, la EPA (Agencia de Protección del Medio Ambiente) de Estados Unidos de América permite que se utilice la mezcla E15 o E85 si se cuenta con vehículos “flex fuel”; Brasil cuenta con un parque vehicular que utiliza 100% de bioetanol como combustible, y en Dinamarca y Suecia se utilizan mezclas E10 y E75, respectivamente [28]. En la tabla 1.2 se muestran las distintas mezclas utilizadas en diferentes países según el Instituto Mexicano de Petróleo (IMP) [28].

**Tabla 1.2** Estándares internacionales de mezclas etanol-gasolina [28]

	<b>Estándar</b>	<b>País</b>
<b>E5</b>	Mezcla al 5% de etanol y 95% de gasolina	EUA
<b>E6</b>	Mezcla al 5.8% de etanol y 94.2% de gasolina	México
<b>E10</b>	Mezcla al 10% de etanol y 90% de gasolina	EUA, Dinamarca, UE, México
<b>E20</b>	Mezcla al 20% de etanol y 80% de gasolina	Brasil
<b>E25</b>	Mezcla al 25% de etanol y 75% de gasolina	Brasil
<b>E75</b>	Mezcla al 75% de etanol y 25% de gasolina	Suecia
<b>E85</b>	Mezcla al 85% de etanol y 15% de gasolina	EUA
<b>E100</b>	Etanol al 100%	Brasil

En el marco nacional, en el año 2008, se promulgó la “Ley de promoción y desarrollo de bioenergéticos” [5] que abrió la puerta al desarrollo de energías limpias y renovables con la finalidad de garantizar la seguridad energética sin poner en riesgo el sector alimenticio del país, y favorecer el desarrollo social en el área rural. Con esta nueva ley el gobierno mexicano desarrolló iniciativas que no se concretaron, como la implementación de las mezclas E2 en las áreas metropolitanas de Guadalajara para el año 2010, y en 2012 para Monterrey y Cd. de México, lugares que tiene un alto consumo y contaminación asociada a los combustibles de transporte [7, 28].

Más adelante, en 2016 se aprobó la Norma Oficial Mexicana NOM-016-CRE2016 “Especificaciones de calidad de los petrolíferos” [29], donde se especifica que el volumen máximo permitido de etanol en mezcla con gasolina es de 5.8% v/v, y la prohibición de la mezcla en diferentes ciudades del país: Cd. de México, Monterrey y Guadalajara. Posteriormente, en 2017 se modificó la norma permitiendo un volumen máximo de 10% de etanol, mientras que la prohibición en las ciudades mencionadas sigue vigente [28].

A pesar de que México es un país petrolero, la mitad de su gasolina es importada debido a la limitación en su capacidad de refinamiento y falta de inversión. Actualmente, no se cuenta con cultivos energéticos destinados a la producción de bioetanol, sin embargo, las potenciales materias primas son la caña de azúcar, seguido del sorgo dulce y remolacha azucarera; se estima que de 270 t de caña de azúcar/ ha se obtendrá un rendimiento de 22.950 L de bioetanol/ ha y que con 7 t de sorgo dulce/ ha se podrán producir hasta 2.800 L de bioetanol/ ha [7, 28].

Existen programas en el país, como el “Programa Nacional de la Agroindustria Azucarera” (PRONAC) cuya política es la diversificación de la actividad para ofrecer variedad de productos bioenergéticos derivados de la caña de azúcar. Asimismo, el “Inventario Nacional de Energías Renovables en México” (INERE) y el “Atlas Nacional de Zonas Factibles” estiman que el país cuenta con 95 millones de toneladas de biomasa residual, en forma de cultivos especializados de caña de azúcar y sorgo, que podrían ser usados como insumos para la producción de bioetanol [28].

El uso de bioetanol como aditivo de la gasolina aún sigue estancado, pero si se sustituyeran los aditivos metil-ter-butil-éter (MTBE) y ter-amil-metil-éter (TAME) por 6% de bioetanol (E6) se reducirían las emisiones de los vehículos de gasolina y se desarrollaría la industria de combustibles renovables en nuestro país. Asimismo, el potencial estimado de producción de bioetanol en México es de aproximadamente 30 millones m<sup>3</sup> por año, 244 veces más que los

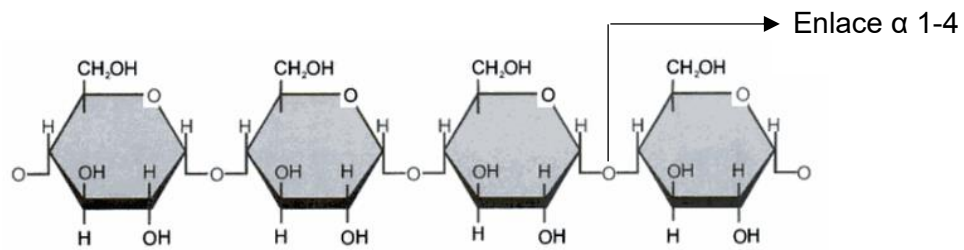
123,000 m<sup>3</sup> reportados por PEMEX para la introducción de 5.8% de bioetanol (E6) en la gasolina Magna [7].

Algunos aspectos que se deben considerar para el desarrollo de la industria del bioetanol en México son la competitividad del precio ofertado y la protección del mercado nacional porque si el bioetanol es utilizado como oxigenante en la gasolina, la producción nacional no podría cubrir la demanda de etanol, por otro lado, la nueva disposición de la “Comisión Federal de Mejora Regulatoria” (COFEMER) permite la importación de gasolinas con 10% de etanol, generando incertidumbre para el desarrollo de la industria lo que implica la necesidad de una garantía de que al menos parte del contenido de etanol en mezcla con la gasolina sea producido en el país [28].

## **1.2 Almidón**

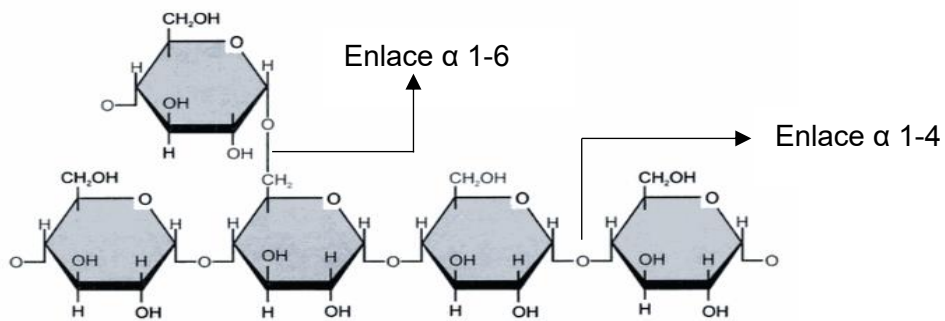
El almidón es un polisacárido de reserva en la mayoría de las plantas y se sintetiza en los amiloplastos en forma de gránulos. Dependiendo de la fuente botánica su diámetro varía de 1  $\mu\text{m}$  hasta 100  $\mu\text{m}$ , así como su forma, tamaño, morfología y composición. Estos gránulos son semicristalinos, y se componen principalmente por monómeros de D-glucosa ordenados en 2 formas básicas: la amilosa y amilopectina, las cuales, dependiendo del origen de la biomasa se puede encontrar de 10-25% de amilosa y 75-90% de amilopectina en el almidón [14, 30, 31].

La amilosa es esencialmente un polímero lineal de aproximadamente 200-2000 moléculas de glucosas unidas mediante un enlace  $\alpha$  1-4, figura 1.2, adoptando una conformación helicoidal. Algunas moléculas de amilosa pueden presentar ramificaciones que se unen a la cadena principal mediante un enlace  $\alpha$  1-6, representando solamente el 0.3 a 0.5% del total de enlaces; la longitud de estas ramificaciones es corta, además de encontrarse muy espaciadas permitiéndole a la molécula de amilosa actuar como un polímero lineal [31, 32, 33].



**Figura 1.2** Estructura de la amilosa [32]

La amilopectina es un polisacárido compuesto de moléculas de glucosa unidas por enlaces  $\alpha$  1-4. Este polisacárido presenta una gran cantidad de ramificaciones que se enlazan a la cadena principal mediante uniones  $\alpha$  1-6, figura 1.3; los puntos de enlace de estas ramificaciones representan del 4-5% del total de enlaces. Las cadenas de amilopectina contienen entre 10,000-20,000 moléculas de glucosa, siendo más grandes que la amilosa [32, 33].



**Figura 1.3** Estructura de la amilopectina [32]

Los gránulos de almidón se describen como semicristalinos debido a que poseen regiones cristalinas y amorfas. Las zonas cristalinas se dan por el ordenamiento de la amilopectina, mientras que las amorfas por las regiones ramificadas de la amilopectina y amilosa. Sin embargo, cuando el almidón tiene un gran contenido de amilosa, esta contribuye significativamente a la cristalinidad del gránulo [31, 33, 34].

Para poder obtener el azúcar fermentable: glucosa, el almidón debe pasar por 2 etapas: la licuefacción (incluye la gelatinización) que consiste en la hidrólisis parcial del almidón a dextrinas, y la sacarificación donde las dextrinas se convierten en glucosa [35].

La gelatinización, comprende la desorganización irreversible de la estructura semicristalina de los gránulos de almidón a un estado amorfo con poca o ninguna despolimerización en presencia de

calor (75-90 °C) y altas cantidades de agua, haciéndolos más accesibles para la degradación enzimática. Por lo tanto, es una etapa importante de la licuefacción para la obtención de productos como maltodextrinas, glucosa y, posteriormente, alcohol [33, 34, 35, 36, 37].

Anteriormente, para hidrolizar al almidón se prefería el uso de ácidos inorgánicos; sin embargo, este ha sido reemplazado por el uso de enzimas, ya que permiten un mayor control y especificidad en la reacción, mejor estabilidad en los productos obtenidos, menores requerimientos de energía y la eliminación de la neutralización de los ácidos, haciendo al proceso más económico y con mejores rendimientos [30].

### **1.2.1 Enzimas amilolíticas**

En la naturaleza existen fuentes importantes de energía como el almidón, como consecuencia, muchos microorganismos, plantas y animales han evolucionado para producir una combinación de enzimas amilolíticas que hidrolizan el enlace  $\alpha$ - glucosídico de la amilosa y amilopectina. Estas proteínas son metaloenzimas que requieren de iones de calcio para su actividad, integridad estructural y estabilidad. La familia amilasa se divide en 5 grupos: endoamilasas, exoamilasas, enzimas desramificantes, transferasas y amilomaltasas. No obstante, las enzimas amilolíticas más importantes para la industria son la  $\alpha$ - amilasa (endoamilasa),  $\beta$ - amilasa,  $\alpha$ - glucosidasa y glucoamilasa (exoamilasas) [30, 38].

Las endoamilasas como la  $\alpha$ - amilasa hidrolizan los enlaces internos  $\alpha$  1-4 de la molécula de almidón de manera aleatoria, pero sin romper aquellos que se encuentran cerca de las zonas de ramificación  $\alpha$  1-6. Como productos de la actividad de las endoamilasas se obtienen  $\alpha$  oligosacáridos de longitud variable y dextrinas (polisacáridos más pequeños que el almidón) [30, 39].

Las exoamilasas catalizan la ruptura de los enlaces  $\alpha$  1-4 y  $\alpha$  1-6 de los extremos no reductores de la amilosa y amilopectina dando como resultado productos finales cortos. La  $\beta$ - amilasa remueve unidades de maltosa de forma secuencial hidrolizando los enlaces  $\alpha$  1-4, deteniéndose cerca de los enlaces de ramificación  $\alpha$  1-6. Por otro lado, la  $\alpha$ - glucosidasa y glucoamilasa tienen la capacidad de hidrolizar los dos tipos de enlace, la diferencia entre ellas radica en que la primera prefiere como sustrato maltodextrinas, y la segunda actúa sobre polisacáridos de cadena larga. Como producto de la acción de las exoamilasas se obtienen  $\beta$ -D maltosa ( $\beta$ -amilasa),  $\beta$ -D glucosa (glucoamilasa) y  $\alpha$ - D glucosa ( $\alpha$ - glucosidasa) [30, 39].

Para la producción de bioetanol se requiere de la hidrólisis del almidón, por lo tanto, en la primera etapa de este proceso conocido como licuefacción se utiliza la  $\alpha$ -amilasa para obtener el disacárido maltosa y oligosacáridos como maltoriosas y dextrinas. Posteriormente, en la segunda etapa llamada sacarificación, se utilizan enzimas como la  $\beta$ -amilasa, glucosidasa y/o glucoamilasa para obtener finalmente  $\beta$ -D maltosa,  $\alpha$ -D glucosa y  $\beta$ -D glucosa, respectivamente [16, 30].

Las enzimas amilolíticas pueden obtenerse de los microorganismos como bacterias, levaduras y hongos; sin embargo, la principal fuente proviene de las bacterias y hongos de los géneros *Bacillus* y *Aspergillus*, respectivamente. Por ejemplo, las  $\alpha$ -amilasas más usadas en la industria provienen de *Bacillus licheniformis*, *Bacillus amyloliquefaciens* y *Aspergillus oryzae*; enzimas como la glucoamilasa se obtienen de *Aspergillus niger*, *Rhizopus* sp. o del género *Penicillium* [30, 38].

### 1.3 Fermentación

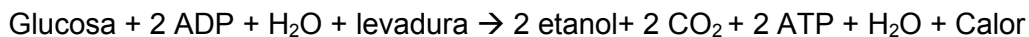
La palabra fermentación (del latino *fermentare*, que significa ebullición) se utilizó antiguamente para describir la ebullición aparente que se observaba en los mostos de uva durante la fabricación de los vinos por la formación de burbujas y movimiento del líquido, como resultado de la liberación de CO<sub>2</sub>. Sin embargo, este concepto ha cambiado a través del tiempo y actualmente, se encuentran dos criterios para definir un proceso fermentativo: el bioquímico y microbiológico [35].

Desde el punto de vista microbiológico y de la mayoría de los bioprocesos industriales, la fermentación es cualquier proceso de bioconversión, o, —en el sentido laxo— aquel proceso por el cual los microorganismos o sus enzimas transforman sustancias orgánicas en ausencia o presencia de oxígeno para producir biomasa o metabolitos [35, 40].

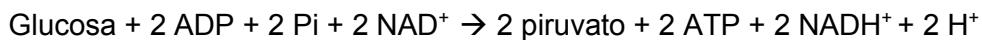
Por el otro lado, desde el punto de vista bioquímico y en sentido estricto, una fermentación se define como el proceso en el cual se llevan a cabo reacciones de óxido/reducción balanceadas, donde la oxidación de un compuesto orgánico intermediario está acoplada a la reducción de otro compuesto orgánico intermediario. La fermentación se produce en condiciones anaerobias o de microaerofilia —sin el uso del sistema transportador de electrones—, y como resultado se obtiene un compuesto orgánico más reducido (que el compuesto orgánico donador de electrones original) y otro compuesto orgánico más oxidado [40].

Una gran cantidad de microorganismos en la naturaleza poseen capacidad fermentativa y la obtención de biocombustibles como el etanol, hidrógeno y metano, son los productos finales reducidos de la conversión de compuestos orgánicos, en condiciones anaerobias, mediante fermentación [40].

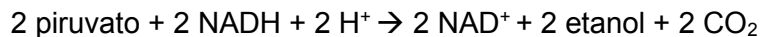
Para producir bioetanol a partir de la conversión de azúcares o almidón se pueden utilizar bacterias, hongos y levaduras; de estas últimas, la especie más utilizada es *Saccharomyces cerevisiae* [41]. La reacción que tiene lugar para transformar la glucosa (hexosa) a etanol se resume en la siguiente ecuación [16, 40, 42]:



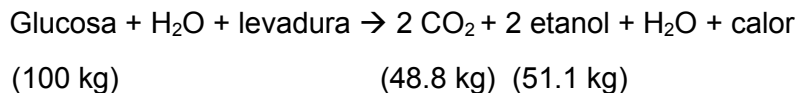
La principal ruta metabólica involucrada en la fermentación es la glucólisis (Embden-Meyerhof-Parnas o EMP), por la cual una molécula de glucosa es metabolizada para producir 2 moléculas de piruvato [41, 43]:



Los ATP generados durante la glucólisis son usados por la levadura para reacciones de biosíntesis, y es la única fuente de energía que se obtiene durante el proceso fermentativo. Posteriormente, y en condiciones anaerobias, el piruvato es descarboxilado (por la enzima piruvato descarboxilasa) a acetaldehído junto con la liberación de CO<sub>2</sub> y finalmente reducido a etanol por la enzima alcohol deshidrogenasa (ADH). Durante estas etapas finales, el NAD<sup>+</sup> se regenera para mantener el potencial redox de la célula y la glucólisis [41, 43]:



La conversión teórica (estequiométrica) de glucosa a etanol es la siguiente [42]:



Sin embargo, en las fermentaciones industriales, los mejores rendimientos de etanol representan del 90-95% del valor teórico, debido a que un porcentaje se destina a la síntesis de biomasa celular y de metabolitos (subproductos) como glicerol, compuestos aromáticos, entre otros [42, 43].

## 1.4 Tecnologías empleadas para la fermentación

Después de la obtención de los azúcares fermentables, a partir de almidón, se procede a la conversión de estos a bioetanol, para lo cual pueden emplearse distintas tecnologías [22]:

- Hidrólisis y fermentación separada (HFS): es la forma convencional donde la hidrólisis de la biomasa y la fermentación de los azúcares se realiza en reactores separados. En este método, el hidrolizado obtenido del primer reactor fluye al segundo donde se realizará la conversión a etanol [22]. La ventaja de realizar la hidrólisis y fermentación separada es que cada proceso se realiza según sus condiciones óptimas. Sin embargo, la gran acumulación de azúcar puede inhibir la actividad enzimática reduciendo la producción de etanol [22, 44].

- Sacarificación y fermentación simultánea (SFS): la hidrólisis y la fermentación de la biomasa se realizan en el mismo reactor bajo condiciones constantes [22]. La función clave en la SFS, es que, a medida que se van liberando los azúcares de la biomasa se convierten rápidamente a bioetanol, disminuyendo su acumulación, lo que evita la inhibición por glucosa en el medio [44]. Algunos beneficios que presenta este método son la facilidad de operación, menor requerimiento de equipo y riesgo de contaminación debido a la presencia de etanol en el medio. No obstante, el principal inconveniente de este método es encontrar los parámetros óptimos de trabajo para que las enzimas hidrolíticas y microorganismos fermentativos actúen al mismo tiempo [44].

- Sacarificación y cofermentación simultánea (SCFS): El prefijo “co-”, etimológicamente, significa unión o compañía [45], comúnmente se utiliza este término para hacer referencia a la fermentación de hexosas y pentosas al mismo tiempo por dos microorganismos diferentes [40] o cultivos mixtos de levaduras; otra variante puede referirse al uso de un microorganismo que asimile estos dos tipos de azúcares [44].

Las ventajas de la SCFS son el bajo costo, menor tiempo de operación y riesgo de contaminación, además de mejor producción y rendimiento de bioetanol comparado con la SFS [44, 46]. No obstante, al igual que la SFS el mayor inconveniente es el ajuste de las condiciones de operación (pH y temperatura, principalmente) para el óptimo crecimiento y desempeño de los microorganismos [22].

- Bioproceso consolidado (BPC): también conocido como conversión microbiana directa (CMD), integra todas las reacciones que se requieren para la transformación de la biomasa a etanol; una comunidad microbiana o un solo microorganismo realiza la producción de enzimas, la hidrólisis enzimática y fermentación en un solo paso. Algunas de las ventajas de este proceso es que no



se requiere capital o costos operacionales para la producción enzimática; además de que es compatible con la fermentación [44]. Sin embargo, se encuentra en las primeras etapas de desarrollo debido a que encontrar las condiciones óptimas para todos los pasos en un solo reactor sigue siendo desafiante. Se espera que, una vez resuelto el problema, este proceso se consolide a través del tiempo y se tenga una manera rentable y efectiva de convertir la biomasa en etanol [22].

### **1.5 Organismos nativos**

Existe una gran diversidad de levaduras, cuya selectividad nutricional en el metabolismo de diferentes fuentes de carbono, hace que se encuentren en nichos particulares; además, pueden presentar una gran especialización según el hábitat donde se desarrollen [47]. Su función en la cadena alimenticia es como descomponedores, sin embargo, pueden asumir distintos roles en el mundo natural, y están distribuidas en todos los biomas de la tierra. Las levaduras pueden encontrarse en distintos hábitats que en términos generales son la atmósfera (estratosfera), acuáticos (océanos, acuíferos debajo del océano, permafrost, ríos y lagos) o terrestres (superficies y suelo). Asimismo, forman asociaciones con virus, bacterias, algas, plantas vasculares, otros hongos, y casi cualquier tipo de animal. En las plantas, pueden encontrarse en los frutos, flores, tallos, exudado de hojas, raíces y troncos de los árboles permitiéndoles asociarse con los insectos, que utilizan a las plantas como alimentos o sitios de reproducción [48].

Desde hace cientos de años, las levaduras se han asociado a diferentes actividades humanas como los procesos fermentativos para la obtención de bebidas y alimentos. En estas fermentaciones —generalmente espontáneas— se involucra una gran variedad de especies de levaduras en las que suele dominar *Saccharomyces cerevisiae*. No obstante, en la industria de bioetanol, esta levadura se confronta a distintos retos que no se encuentran en las fermentaciones alimenticias y alcohólicas, lo que conlleva a la búsqueda de especies no convencionales (no pertenecientes al género *Saccharomyces*) [49].

Las especies no convencionales son muy diversas y poseen características relevantes para la industria del bioetanol como su capacidad de utilizar sustratos complejos y su tolerancia al estrés osmótico, térmico y concentraciones de etanol [49].

Una especie nativa se define como aquella que se encuentra dentro de un área de distribución natural (histórica o actual) formando parte de las comunidades bióticas propias de la zona. Estas especies están adaptadas a las condiciones locales en las que se desarrollan y mantienen relaciones evolutivas y ecológicas con otras especies [50].

En las levaduras, una levadura nativa o autóctona es aquella que se desarrolla y persiste en un hábitat, permitiendo su aislamiento de ese entorno en grandes cantidades repetidas veces [48]. En una revisión realizada por Mohd *et al.* en donde se examinan distintas levaduras utilizadas en la producción sustentable de bioetanol, se menciona que las levaduras “silvestres” son las mayores productoras de etanol, pudiendo ser incluso más eficientes en los procesos industriales que las levaduras comerciales [47].

En el presente trabajo de investigación se utilizarán 4 especies de levaduras no convencionales y nativas aisladas a partir de frutos y semillas de *Brosimum alicastrum* Swartz [10]. Dichas levaduras se seleccionaron por presentar capacidad amilolítica parcial y son las siguientes:

- *Candida tropicalis* (PL-1) aislada del pericarpio de los frutos del ramón recolectados de Holpechén, Campeche.
- *Issatchenkia orientalis* (TL-2) y *Hanseniaspora guilliermondii* (TL-3) aisladas de la testa de semillas del ramón recolectadas de Holpechén, Campeche.
- *Meyerozyma guilliermondii* (RSL-3) aislada del endospermo de las semillas del ramón recolectados en Mérida, Yucatán.

Asimismo, se utilizarán las cepas nativas Bm-2 y RT-1 del basidiomiceto *Trametes hirsuta*, ambas aisladas como saprobio en madera en descomposición en Yucatán, México, y la segunda de la planta *Acalypha gaumeri* en el municipio de Tinum, Yucatán.

### **1.5.1 Descripción general de hongos y levaduras**

Actualmente, todos los seres vivos del planeta se encuentran clasificados en 3 dominios: arqueas y bacterias (procariotas) y eucariotes; de este último, se desprenden y discuten aún los 5 reinos, que en términos generales se distinguen como el reino de las plantas, animales, alveolados, *stramenopiles* y hongos [51]; del último con la ayuda de la biología molecular, se compararon las secuencias del RNA 18S y se definieron los siguientes grupos de hongos: quitridiomicetos, zigomicetos, glomeromicetos, ascomicetos y basidiomicetos [52].

Los hongos, es un grupo muy diverso de organismos, e incluye a las setas, mohos y levaduras. Se estima que pueden existir hasta 1.5 millones de especies de hongos, pero actualmente solo

se conocen alrededor de 100,000 especies [52]. Estos organismos son generalmente de vida libre y saprobia (se alimentan de materia orgánica en descomposición), aunque pueden encontrarse también como parásitos o simbioses de plantas y causando enfermedades en animales, entre ellos, el ser humano [51, 52].

Los hongos prosperan en todo tipo de hábitats; en el suelo abundan en las capas más superficiales, hasta una profundidad de 15 cm —debido a su metabolismo aeróbico—, y también pueden encontrarse en la superficie de ríos, lagos y mares. Algunos hongos tienen la capacidad de crecer en condiciones semianaerobias, en consecuencia, pueden crecer a mayor profundidad [51, 52]. Asimismo, pueden vivir en un amplio rango de temperaturas que van desde 0°C hasta 65°C, no requieren de tanta humedad, son más resistentes a pH ácidos y a altas presiones osmóticas, permitiéndoles crecer en soluciones con exceso de sales o azúcares [51].

Estos organismos, a diferencia de las plantas, son heterótrofos, porque requieren de sustancias de carbono orgánicas como alimento, y además se denominan quimiorganotróficos debido a que obtienen su energía mediante la oxidación de compuestos orgánicos [51]. Para poder alimentarse, los hongos secretan enzimas extracelulares al medio que digieren los compuestos orgánicos complejos a sus monómeros constituyentes, que después serán absorbidos [52].

Su principal característica morfológica es su crecimiento micelial que está formado por una red de tubos delgados denominados hifas (10-100  $\mu\text{m}$ ) las cuales están rodeadas por una pared celular compuesta por glucanos, glicoproteínas y quitina (uniones de N-acetilglucosamina), esta última siendo la diferencia entre los hongos y las plantas y algas [52].

La mayoría de los hongos puede reproducirse asexual o sexualmente en cuyos procesos se da la formación de esporas. La función principal de las esporas es la dispersión del hongo, una vez que estas se encuentren en un medio apropiado germinan para formar el tubo germinativo que se alarga hasta convertirse en una hifa, la cual se ramificará y desarrollará hasta formar un nuevo organismo. En contraste con los hongos que desarrollan micelio, las levaduras pertenecen a los grupos ascomicetos y basidiomicetos, y se definen como organismos unicelulares que se reproducen asexualmente por gemación o fisión, y no presenta estados sexuales dentro o sobre un cuerpo fructífero [51, 53]. A continuación, se describen las especies de hongos que serán utilizadas en el trabajo de investigación:

***Candida tropicalis***: es una levadura ascomicete, cuyo estado sexual a la fecha no se conoce. Tiene una gran distribución en ambientes marinos tropicales y subtropicales y ha sido aislada de agua de mar, sedimentos oceánicos, intestino de peces marinos, mangle, algas marinas y camarón. Asimismo, se ha encontrado en suelo, hidrocarburos y alimentos (aceite vegetal, sakura-miso, kefir, col agria, melaza, dátiles y levadura forrajera); en el proceso fermentativo del ácido cítrico y a partir de muestras clínicas (heces, infección bronquial, interdigital y de mano, sangre) [54, 55].

Tiene aplicaciones industriales para la producción de ácidos dicarboxílicos de cadena larga y xilitol, así como en la bioabsorción de cadmio y plomo [54]. En 1970, Nakamura, reportó la producción de glucoamilasa por *C. tropicalis* [56]; en 2006, Jamai y colaboradores, reportaron la conversión de almidón pretratado con  $\alpha$ -amilasa a bioetanol utilizando esta levadura libre e inmovilizada en el medio [57]; posteriormente, Olguin *et al.* [8] utilizaron un proceso de hidrólisis y fermentación separada (HFS) en harina de ramón, en el cual se comparó el desempeño de una cepa comercial de *S. cerevisiae* con el de una cepa nativa *C. tropicalis* (PL-1, aislada de frutos de *B. alicastrum*) mostrando esta última el mejor rendimiento, ya que, fermentó el 98.8% de los azúcares reductores a las 48 h, y generó 31% más bioetanol que la cepa comercial; debido a la capacidad de *C. tropicalis* de sintetizar la enzima glucoamilasa, lo que permitió la degradación de las dextrinas producidas en la hidrólisis, obteniéndose una fermentación más eficiente. Además, el género *Candida* posee la capacidad de fermentar las pentosas a etanol [47].

***Issatchenkia orientalis***: es una levadura ascomicete ampliamente distribuida en la naturaleza. Se ha aislado de suelo, jugos de frutas y bayas, productos fermentados (sake, champagne, cerveza de jengibre o de té, mosto de cerveza, mezcal, pulque), levadura de cerveza o de panificación, muestras clínicas (sangre, esputo, heces) [58, 59, 60].

Aunque es común encontrarla en productos agrícolas y comida no es considerada un microorganismo causante de su deterioro. Esta especie ha sido aislada de muestras clínicas de humanos y animales por lo que es considerada un patógeno, en vez, de una especie saprobia transitoria [58]. El nivel de bioseguridad de esta especie es 1, según la ATCC (American Type Culture Collection) quienes toman como base la publicación de "Bioseguridad en laboratorios microbiológicos y biomédicos" del Centro de Control y Prevención de Enfermedades (CDC, por sus siglas en inglés) y del Instituto Nacional de Salud del departamento de salud y servicios humanos de Estados Unidos de América [61].

En el 2012 Yuangsaard *et al.*, obtuvieron a partir de salchicha de cerdo fermentada, un aislamiento de *P. kudriavzevii* (actualmente sinónimo de *I. orientalis*). Esta levadura fue utilizada para fermentar hidrolizado de almidón de yuca adicionado con 18% de glucosa, 0.05% (NH<sub>4</sub>SO<sub>4</sub>), 0.09% extracto de levadura, 0.05% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> y MgSO<sub>4</sub> • 7 H<sub>2</sub>O con un pH de 5, y a 40 °C para la obtención de bioetanol. La concentración máxima de bioetanol (7.86% [p/v]) se alcanzó a las 24h con una productividad de 3.28 g/L/h y un rendimiento de 85.4% [62].

***Hanseniaspora guilliermondii***: es una levadura ascomicete cuyo estado asexual es *Kloeckera apis*. Esta especie tiene una amplia distribución. Se ha encontrado asociada a frutas (uvas para vino, dátiles), plantas, insectos, diversos mostos fermentados, jugo de uva, aceitunas negras procesadas, tomates fermentados. La cepa tipo fue aislada de una uña infectada, y aunque esta especie es capaz de crecer a 37°C, a la fecha no se tienen reportes de otras cepas aisladas de material clínico. Generalmente, esta especie se presenta al inicio de la fermentación de vino y de granos de cacao influyendo en su perfil aromático por la síntesis de compuestos aromáticos como la acetoina y ésteres de acetato que han sido probados como saborizantes de alimentos y bebidas [63].

Esta especie puede fermentar mosto de uva y tolerar una concentración de máxima de alcohol del 5%. En 1992, Zironi *et al.*, realizaron un estudio en el que cuantificaron los metabolitos secundarios en vino por cultivos puros, mixtos y secuenciales de *S. cerevisiae*, *K. apiculata* y *H. guilliermondii*. En cultivo puro *H. guilliermondii* produjo 4.26% de etanol mientras que *S. cerevisiae* 9.52%, esto debido a que *H. guilliermondii* produce mayor cantidad de acetoina y 2,3-butanodiol y menos alcoholes superiores que *S. cerevisiae* [64]. Esta especie no ha sido reportada con capacidad amilolítica.

***Meyerozyma guilliermondii***: es una levadura ascomicete cuyo anamorfo es *Candida guilliermondii*. Presenta una distribución cosmopolita y es posible encontrarla como saprobio en ambientes naturales o como patógeno oportunista de humanos y animales. Ha sido aislada de suelos, lagos, hojas de plantas, frutos (uvas, naranjas y bayas), alimentos (pozol, jugo de uva, leche ácida), avispas, excremento de insectos, plantas de fermentación, muestras clínicas de animales y del hombre (úlceras, sangre, esputo, riñón, semen, infección pulmonar y bronquial); ha sido utilizada como inóculo para producir un vino de arroz y sake [65].

Esta especie ha sido estudiada debido a su importancia clínica, control biológico e interés biotecnológico. En un estudio realizado por, Acourene y Ammouche en 2011 se registró que *C. guilliermondii* produjo α-amilasa en fermentación sumergida siendo el medio un factor

determinante en la regulación de la producción de la enzima. La mejor producción ( $2304.19 \pm 31.08 \mu\text{mol/l/min}$ ) se presentó a las 72h de fermentación a  $30^{\circ}\text{C}$ , pH inicial de 6, concentración de azúcar de 15 g/L, contenido de almidón de 5 g/L, concentración de extracto de levadura o urea de 5 g/L y fosfato de potasio de 6 g/L [66].

***Trametes hirsuta***: el género *Trametes* pertenece a los hongos de la podredumbre blanca, los cuales tienen la capacidad de degradar la lignina presente en la madera, además de una gran variedad de contaminantes ambientales, con estructura similar a la lignina, debido a la producción de enzimas lignolíticas como lacasa, lignina y Mn peroxidasa [67,68]. *Trametes hirsuta* es un basidiomiceto que puede desarrollarse como un organismo solitario o agrupado de manera superpuesta en madera muerta o en árboles perennifolios (especialmente hayas) por lo que puede considerarse saprobio o parásito. Es posible encontrarlo a lo largo del año gracias a su naturaleza coriácea [69, 70].

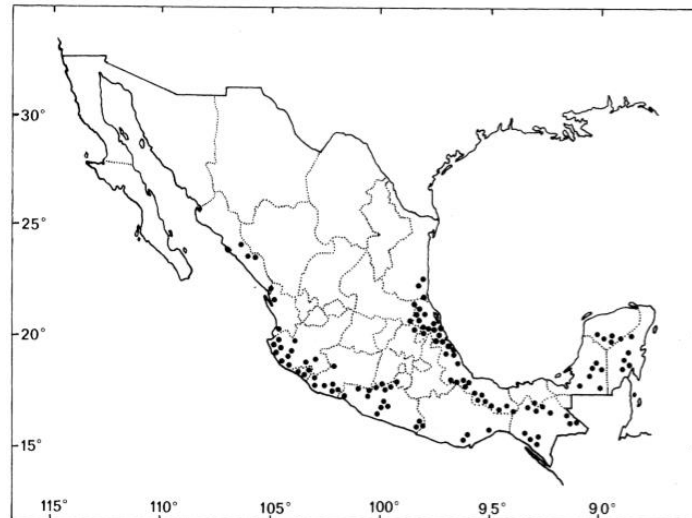
Se ha reportado que esta especie produce lacasas y Mn- peroxidasa, además de celulasas y celobiosa deshidrogenasa [68]. En 2010, Okamoto *et al.*, demostraron la capacidad de *T. hirsuta* de producir etanol a partir de diversas hexosas como glucosa, manosa, celobiosa y maltosa, y de fermentar directamente almidón, salvado de trigo y paja de arroz, sin someterlos a un pretratamiento de hidrólisis ácida o enzimática convirtiéndolo en un prospecto para bioproceso consolidado [71]. Asimismo, se demostró el potencial de la cepa *T. hirsuta* Bm-2 para la biodegradación de vinaza, el colorante textil carmín índigo y producción de fenoles gracias a su capacidad de sintetizar lacasas [72, 73, 74]; también Olguin- Maciel *et al.*, en 2019, desarrollaron un bioproceso consolidado con *T. hirsuta* Bm-2, en el cual se demostró su competencia en la producción de bioetanol a partir de harina de semillas de ramón, y su potencial en la industria de biocombustibles [11].

## **1.6 *Brosimum alicastrum***

### **1.6.1 Distribución y hábitat**

El nombre científico *Brosimum alicastrum*, proviene del griego “brosimos” que significa comestible. Este árbol recibe más de 50 nombres en diversas lenguas indígenas de las distintas regiones donde crece, siendo los más comunes: ojite, ojoche, capomo, entre otros. En México y Guatemala es comúnmente conocido como ramón, nombre derivado del verbo “ramonear”, que hace referencia al consumo de las hojas y semillas por el ganado y otros animales domésticos [9, 75].

El ramón es un árbol nativo del sureste de México y gran parte de Centroamérica, extendiéndose hasta el estado de Acre en Brasil y región occidental de las islas caribeñas de Jamaica, Cuba y Trinidad [75, 76]. En México se localiza en 18 estados: desde Sinaloa hasta Chiapas (en la vertiente del Pacífico), de Tamaulipas hasta Quintana Roo (en la vertiente del Golfo de México y del Mar Caribe) [76, 77]; en la figura 1.4, se observa la distribución del árbol del ramón en el territorio mexicano [78].



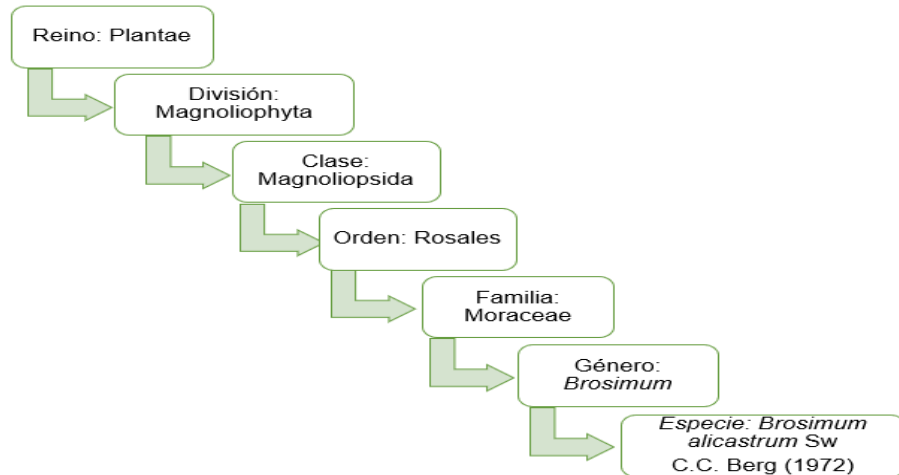
**Figura 1.4** Distribución geográfica de *Brosimum alicastrum* en México [78]

*Brosimum alicastrum* crece de manera silvestre en áreas de clima cálido, semicálido, tropical y templado, en un intervalo altitudinal de 10 a 1600 m. Se desarrolla preferentemente en suelos fértiles, aunque también puede crecer en terrenos abarrancados de naturaleza caliza con tiempos cortos de luz solar, declives escarpados o laderas calizas. Esta especie puede encontrarse en regiones con temperatura media anual que fluctúan entre 18 a 27°C, es tolerante a la sequía y puede desarrollarse en lugares con distinta precipitación anual desde 600 hasta 4000 mm, como en los estados de Tamaulipas y Tabasco, respectivamente. La razón es su adaptabilidad a suelos arcillosos, profundos e inundables durante la época de lluvia, así como suelos pedregosos y someros con pH que varían de 6.8 hasta 8.2 [76, 79, 80, 81]

En Yucatán tiene una distribución natural en la parte central, sur y oriente del estado formando parte de la selva baja subcaducifolia y selva mediana subcaducifolia y además es una de las pocas especies arbóreas que crecen en los suelos pobres del norte de Yucatán [10].

### 1.6.2 Taxonomía

De acuerdo con el “Global Biodiversity Information Facility” (GBIF) la clasificación taxonómica del ramón es la siguiente [82]:



### 1.6.3 Descripción

Es una especie perennifolia con una altura promedio de 20 a 30 m, sin embargo, en las selvas de Tabasco, Chiapas y Guatemala llega a tener una altura máxima de 45 m, mientras que en Yucatán solo alcanza entre 15 y 22 m como máximo [79, 80].

Presenta una copa piramidal, densa e irregular; hojas ovado-lanceoladas, ovaladas o elípticas de color verde brillante en el haz y grisáceo por el envés, que se acomodan de manera alternada [79].

El tronco es erecto y cilíndrico, de corteza escamosa y suave cuyo color va del gris claro al gris pardo, en ocasiones café; produce látex blanco y dulce en abundancia cuando se le hacen incisiones [79, 80].

Generalmente el árbol florece de octubre a febrero; sin embargo, en Veracruz lo hace de enero a mayo, y en la Península de Yucatán de enero a junio. El desarrollo de los frutos se produce una vez al año, generalmente de marzo a mayo, pero en Yucatán se da de abril a septiembre; esta etapa sólo se presenta cuando los árboles alcanzan los 20 m de altura [79]. Los frutos son bayas redondeadas, carnosas, de 1-2 cm de diámetro, de color verde amarillento a anaranjado o rojo cuando maduran, tienen un olor y sabor dulce, y en la superficie presentan escamas color blanco [78, 79, 83]. Los frutos contienen una semilla que mide de 9 a 13 mm de largo por 16 a 20 mm



de ancho y son ovaladas, aplanadas en los extremos y cubiertas por una testa color moreno claro [79, 83].

#### 1.6.4 Semillas

El árbol de ramón puede producir 95.5 kg de semilla/árbol/año, representando una producción anual de 28.6 t en una plantación comercial de 300 árboles/ha o 19.1 t con 200 árboles/ha [84].

La harina que se obtiene de las semillas contiene aproximadamente 11% de proteínas, y es una fuente importante de: aminoácidos como el triptófano (deficiente en las dietas a base de maíz), de fibra, minerales (calcio, hierro, zinc y sodio), vitamina A y del complejo B (ácido fólico, B1 y B2); y contiene 1.5% de grasas y 75% de carbohidratos de los cuales, aproximadamente el 63% es almidón [8, 9, 75, 78, 85].

En la Tabla 1.3 se muestran los aminoácidos presentes en las semillas del árbol de ramón [78] y en la tabla 1.4 la comparación de la composición del almidón de *B. alicastrum* y maíz obtenida de un estudio realizado por Pérez Pacheco y colaboradores en 2013 [9].

**Tabla 1.3** Aminoácidos presentes en las semillas de *Brosimum alicastrum* [85]

Aminoácido	Cantidad (g) por 100 g de muestra
<b>Leucina</b>	0.57
<b>Valina</b>	0.37
<b>Isoleucina</b>	0.28
<b>Fenilalanina</b>	0.36
<b>Lisina</b>	0.22
<b>Treonina</b>	0.30
<b>Triptófano</b>	1.12
<b>Histidina</b>	0.22
<b>Metionina</b>	0.05
<b>Arginina</b>	0.49
<b>Ácido aspártico</b>	1.18
<b>Prolina</b>	0.50
<b>Cisteína</b>	0.03
<b>Serina</b>	0.40
<b>Glicina</b>	0.32
<b>Tirosina</b>	0.25
<b>Alanina</b>	0.29
<b>Ácido glutámico</b>	0.89

**Tabla 1.4** Comparación de la composición del almidón encontrado en la semilla de *Brosimum alicastrum* y en *Zea mays* [9]

Composición del almidón	<i>Brosimum alicastrum</i>	<i>Zea mays</i>
<b>Amilosa (%)</b>	25.36 ± 2.37	27.33 ± 0.56
<b>Amilopectina (%)</b>	74.64 ± 2.37	72.67 ± 0.56
<b>Almidón total (%)</b>	92.57 ± 2.89	98.86 ± 0.47

### 1.6.5 Usos

*Brosimum alicastrum* es uno de los pocos árboles tropicales del que se pueden utilizar todas sus partes. Las semillas y el follaje, los cuales pueden ser usados, sobre todo en épocas de sequía, como alimento para el ganado porcino, caprino, bovino y equino. Con la madera se fabrican mangos de herramientas y muebles baratos, o se emplea como combustible; la corteza en infusión se utiliza como tónico para tratar dolores de pecho y asma. El látex puede ser empleado como sustituto de leche y calmante del asma; la pulpa del fruto es comestible, y las semillas hervidas pueden comerse solas, con maíz, miel o plátano y cuando estas son molidas y tostadas se utilizan como sustituto del café o para elaborar pan o una especie de tortilla [75, 78, 81].

Desde el punto de vista ecológico, el ramón favorece la regeneración de otras especies arbóreas ya que coexiste con ellas debajo del dosel y actúa como un sumidero de CO<sub>2</sub>; ayuda a la conservación del suelo y control de la erosión, y sirve como barrera rompevientos. También puede utilizarse para recuperar los suelos que han sido degradados por el desmonte. Por otro lado, las ramas, hojas, flores, frutos, semillas y retoños del ramón sirven como fuente de alimento para una gran diversidad de animales como loros, pericos, monos, jabalís, entre otros [79, 81, 86].

Aunque el ramón es una especie tropical con un alto potencial, en la actualidad está subutilizado [81]. En Yucatán, esta especie crece en los huertos familiares mayas de las comunidades rurales, así como en parques, jardines y áreas verdes de la ciudad como árbol de ornato y sombra [10].

Se han encontrado especímenes de *B. alicastrum* en la mayoría de las zonas arqueológicas de la Península de Yucatán y de los estados de Chiapas y Tabasco, en México, así como en Guatemala y Honduras [81]. De acuerdo con Pérez Pacheco, [9] las semillas de ramón fueron una fuente importante de alimento para los mayas del periodo Clásico; sus frutos

eran recolectados para ser consumidos crudos o para preparar jugos y/o mermeladas, y las semillas se molían y mezclaban con maíz para elaborar tortillas. Sin embargo, hoy en día en México no hay reportes de que las semillas de ramón se empleen para algún uso particular. En la Península de Yucatán, el consumo de la semilla de ramón es infrecuente por lo que se propone como una fuente no convencional de almidón.

## 1.7 Justificación

En la búsqueda de la disminución de los gases de efecto invernadero que contribuyen al cambio climático, y de la creciente demanda energética, se buscan alternativas de combustibles líquidos que no provengan de fuentes fósiles. Una opción para esta problemática, que tiene presencia en el mercado mundial, es el bioetanol.

El principal método de obtención del bioetanol es a través de microorganismos, como las levaduras, que llevan a cabo un proceso fermentativo donde los azúcares son transformados a etanol. En la búsqueda de alternativas de materias primas que no compitan con su uso como alimento, y que sean cultivables en el territorio nacional, sobre todo en la Península de Yucatán, se propone el uso de harina de las semillas de *B. alicastrum* debido a su alto contenido de almidón (61-63%), a su crecimiento natural en la Península de Yucatán y otros estados de México, además de que actualmente rara vez son consumidas.

El estudio de la viabilidad de la harina de semillas del ramón para la producción de bioetanol ya ha sido investigado, por lo que el objetivo de esta tesis fue una SCFS empleando los hongos *Trametes hirsuta* Bm-2 y RT-1 autóctonos de la Península de Yucatán y las levaduras nativas *Candida tropicalis* PL-1, *Issatchenkia orientalis* TL-2, *Hanseniaspora guilliermondii* TL-3 y *Meyerozyma guilliermondii* RSL-3, aisladas del fruto de *B. alicastrum*; con el propósito de aumentar la hidrólisis de la harina del ramón, y obtener un mayor rendimiento de bioetanol; así como también contribuir a la conservación de esta especie arbórea por su importancia ecológica y valor cultural en la Península de Yucatán.

## **1.8 Hipótesis**

La combinación de hongos autóctonos de la Península de Yucatán y levaduras nativas aisladas de frutos de *B. alicastrum*, en un proceso de sacarificación y co-fermentación simultánea de harina de semillas de ramón, incrementará los rendimientos en la producción de bioetanol.

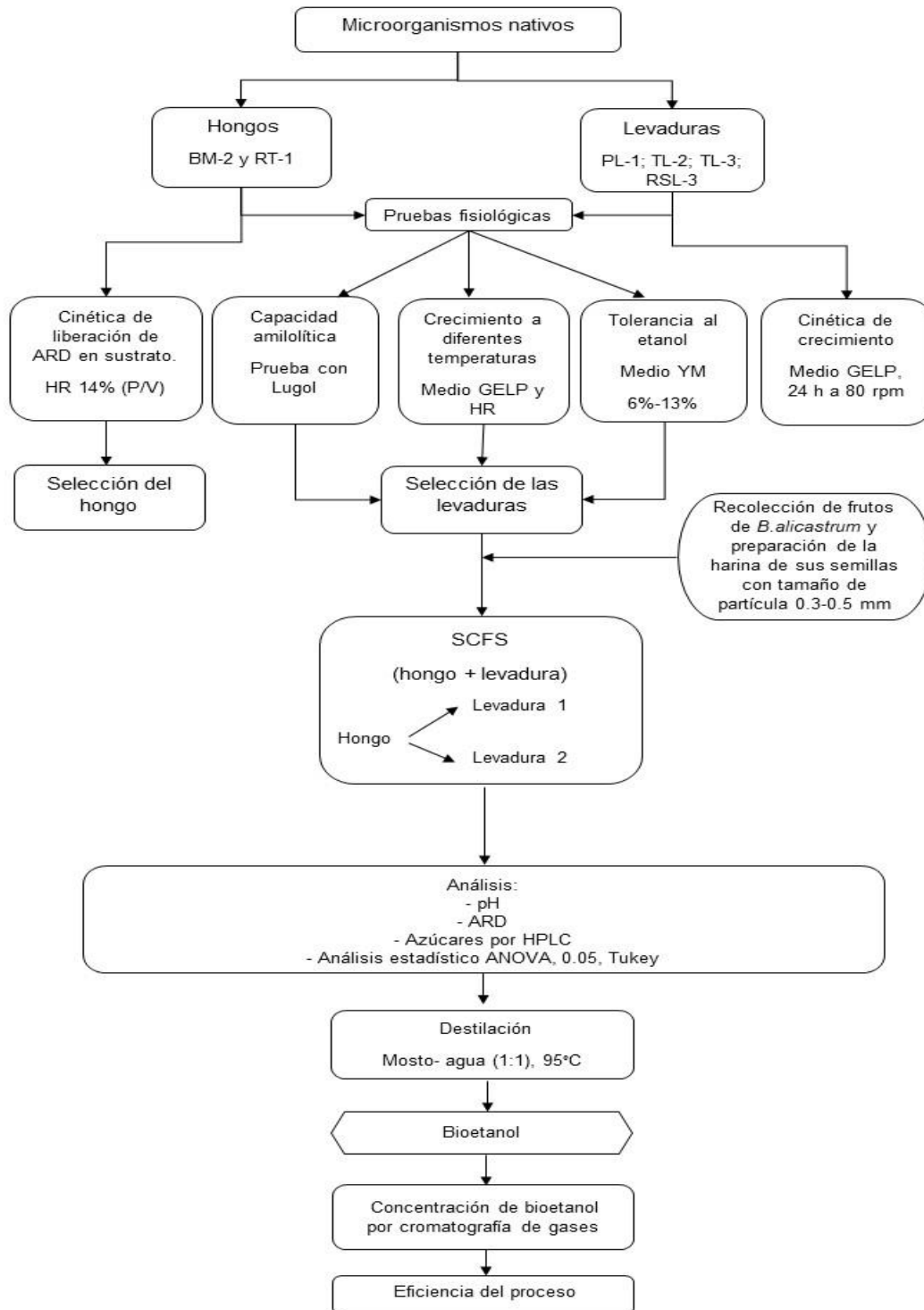
## **1.9 Objetivo general**

Desarrollar un proceso de sacarificación y co-fermentación simultánea de una suspensión de harina de semillas de *B. alicastrum* utilizando microorganismos nativos para aumentar la producción de bioetanol.

### **1.9.1 Objetivos específicos**

1. Determinar la viabilidad, capacidad amilolítica, tolerancia a diferentes temperaturas y concentraciones de etanol, del basidiomiceto autóctono de la Península de Yucatán *Trametes hirsuta* RT-1 y Bm-2, y de las levaduras nativas *Candida tropicalis* PL-1, *Issatchenkia orientalis* TL-2, *Hanseniaspora guilliermondii* TL-3, *Meyerozyma guilliermondii* RSL-3.
2. Evaluar la liberación de azúcares reductores por la actividad amilolítica de *Trametes hirsuta* RT-1 y Bm-2 sobre la suspensión de harina de semillas de ramón.
3. Realizar la SCFS con diferentes combinaciones de organismos.
4. Evaluar la eficiencia del proceso con base en la producción de bioetanol.

## 1.10 Estrategia experimental



**Figura 1.5** Estrategia experimental propuesta para la producción de bioetanol a partir de harina de semillas de *Brosimum alicastrum*

## CAPÍTULO II

### MATERIALES Y MÉTODOS

#### 2.1 Materia prima

Los frutos maduros del árbol de ramón (de color amarillo a naranja) se recolectaron en la época de fructificación (de abril a septiembre), y la semilla se obtuvo al remover manualmente el pericarpio y la testa de estos. Posteriormente, las semillas se secaron en un horno convencional (Binder, Fed Modelo 115®, Tuttlingen, Alemania) a 70°C por 72 h hasta presentar un peso constante y posteriormente, se colocaron en un desecador hasta el momento de la molienda [9]. Para la molienda se usó una licuadora industrial (Waring Commercial, Blender 51BL30, Pensilvania, EUA) y para el cribado tamices de 500 y 300 µm para obtener la harina con un tamaño de partícula en el rango de 300-500 µm. La harina se almacenó en bolsas de polietileno con cierre para impedir la entrada de humedad a la materia prima [9, 87]. El contenido de humedad de la semilla se calculó utilizando la siguiente fórmula [87]:

$$\text{Contenido de humedad (\%)} = \frac{\text{Peso original} - \text{Peso tras secado en estufa}}{\text{Peso original}} \times 100$$

#### 2.2 Material biológico

Las cepas de hongos utilizadas en la investigación se obtuvieron del banco de cepas de la Unidad de Energía Renovable del Centro de Investigación Científica de Yucatán y las levaduras de la “Colección de cultivos microbianos” del Laboratorio C006 del Instituto de Biología de la UNAM (tabla 2.1).

**Tabla 2.1** Organismos y su fuente de aislamiento

Levaduras	Fuente de aislamiento
<i>Candida tropicalis</i> PL-1	Pericarpio de los frutos de ramón recolectadas en Holpechén, Campeche
<i>Issatchenkia orientalis</i> TL-2	Testa de las semillas de ramón recolectadas en Holpechén, Campeche
<i>Hanseniaspora guilliermondii</i> TL-3	Testa de las semillas de ramón recolectadas en Holpechén, Campeche
<i>Meyerozyma guilliermondii</i> RSL-3	Endospermo de las semillas de ramón recolectadas en Mérida, Yucatán.
Hongos	Fuente de Aislamiento
<i>Trametes hirsuta</i> RT-1	<i>Acalypha gaumeri</i> , en Tinum, Yucatán.
<i>Trametes hirsuta</i> Bm-2	Madera en descomposición en Yucatán, México.



### **2.2.1 Reactivación de las levaduras y hongos**

Las levaduras se reactivaron en medio de enriquecimiento Glucosa-extracto de levadura-peptona [(GELP), Anexo 12], en tubos de ensayo con 10 mL de medio y se incubaron a 35 °C hasta observar crecimiento (turbidez). Posteriormente, se sembraron en placas Petri con medio Agar glucosa-extracto de levadura-peptona [(GELPA), Anexo 11] e incubaron a la misma temperatura [88].

Los hongos se reactivaron tomando un pellet conservado a -80 °C, que se colocó en el centro de una placa Petri con medio Agar-papa-dextrosa [(PDA), Anexo 13] y se incubaron a 35 °C [89].

### **2.2.2 Mantenimiento de las levaduras y hongos**

Las levaduras se mantuvieron en agua destilada a 4 °C durante todo el estudio, a partir de las placas Petri con medio GELPA de 24 h incubadas a 32 °C (2.2.1), se recolectaron las células y se transfirieron con un asa bacteriológica a tubos de ensayo con taparroca con 9 mL de agua destilada estéril (2 por levadura) hasta la obtención de una suspensión cargada que se conservó a 4 °C [90].

Las cepas de hongo se mantuvieron por transferencia periódica en placa Petri. Para esto, se inocularon discos agar micelio, de 1.1 cm de diámetro, en placas de PDA que se incubaron a 32 °C y al quinto día de crecimiento se refrigeraron a 4 °C [91, 92].

### **2.2.3 Conservación de las levaduras y hongos a mediano plazo**

Para cada aislado de levadura se realizó la metodología descrita en el inciso 2.2.2.

Los hongos fueron conservados en tubos de ensayo con 9 mL de agua agar al 0.02%; para esto, de un cultivo de 5 días se cortaron bloques de 1mm<sup>3</sup> los cuales se añadieron al tubo de ensayo, posteriormente, la solución se conservó a 4 °C [89].

### **2.2.4 Conservación de las levaduras y hongos a largo plazo**

Para cada aislado de levadura, a partir de un cultivo de 24 h en medio GELPA, se cosechó el paquete celular y se transfirió a un criovial de 2 mL, el cual contenía 800 µL de medio GELP y 200 µL de glicerol (20% v/v), previamente esterilizados. Los crioviales se etiquetaron debidamente, y se ordenaron en una criocaja que fue enfriada por 8 min a 4 °C, por otros 8 min a -20 °C y, por último, se guardaron en un ultracongelador a -80 °C [91].

Cada cepa de hongo se creció en medio Papa Dextrosa (Anexo 14) en matraces Erlenmeyer con agitación de 150 rpm hasta la formación de pellets, los cuales se transfirieron a crioviales de 2 mL con 800  $\mu$ L de medio Papa Dextrosa y 200  $\mu$ L de glicerol (20% v/v), previamente esterilizados. Los crioviales se etiquetaron y se colocaron en una criocaja que fue enfriada por 2-12 h a 4 °C, por 30-120 min a -20 °C y, por último, se guardaron en un ultracongelador a -80 °C [89, 93].

### **2.2.5 Crecimiento de las cepas seleccionadas a distintas temperaturas**

En el caso de las levaduras, el crecimiento en diferentes temperaturas se realizó siguiendo la metodología de Kurtzman *et al.* [88] para determinar el crecimiento a 32, 37, 40, 42 y 45 °C. Para ello, cada uno de los aislados de levadura se inoculó por asada en un tubo con medio GELP que se incubó a 32 °C hasta que se observó crecimiento por turbidez. Posteriormente, de este tubo se tomó una asada que se inoculó en otro tubo de ensayo con GELP que se incubó en la siguiente temperatura, y así sucesivamente.

Para los hongos el medio empleado fue de harina de ramón (Anexo 15); se incubaron por 4 días a temperaturas de 32, 35, 38 y 41 °C inoculadas con un disco de 1.1 cm de agar micelio, a partir de placas Petri de PDA con hongo crecido de 5 días.

### **2.2.6 Hidrólisis de almidón soluble de las cepas en estudio**

La prueba se realizó siguiendo la metodología Wickerham [192], para lo cual se dispensaron en tubos de ensayo 4.5 mL de una solución de almidón soluble al 0.5% (p/v) que después se esterilizaron a 120 °C por 15 min; posteriormente, a cada tubo se le añadieron de manera aséptica 0.5 mL de base nitrogenada Difco al 6.7% (esterilizada por microfiltración). Estos tubos fueron incubados a 32 °C por dos semanas con 100  $\mu$ L de cada aislado de levadura a partir de una solución de glucosa al 0.1% y 6.7% de base nitrogenada Difco.

La hidrólisis de almidón se evaluó añadiendo 2 gotas de Lugol a los tubos. Si la actividad amilolítica era negativa, la solución adquiriría una coloración violenta intenso por la reacción del Lugol con el almidón, si la hidrólisis era parcial la coloración era violácea o rosado, mientras que, si la hidrólisis era completa, la solución no presentaba color alguno [10].

Para los hongos la prueba se hizo en placas Petri de medio de harina de ramón agar que se inocularon con un disco de 1.1 cm de agar micelio y se incubaron a 32, 35, 38 y 41 °C por 4 días. Posteriormente, las placas se inundaron con Lugol, observándose un halo hialino alrededor del disco de micelio, cuando, debido a su capacidad amilolítica el hongo fue capaz

de hidrolizar el almidón del medio [10].

### **2.2.7 Tolerancia de las cepas en estudio a distintas concentraciones de etanol**

Antes de determinar la tolerancia a etanol, se sembraron e incubaron a 32 °C por 24 h las levaduras en placas Petri de medio Agar extracto de levadura-extracto de malta-peptona-glucosa [(YMPGA), Anexo 17]. Posteriormente, a partir de estas placas, cada levadura se inoculó por asada en tubos de ensayo con 5 mL con caldo extracto de levadura-extracto de malta-peptona-glucosa [(YMPG), Anexo 16] los cuales fueron incubados a 32 °C por 24 h. A partir de estas suspensiones, las levaduras se inocularon por triplicado en tubos de ensayo con 5 mL de caldo YMPG adicionado con 8% de glucosa y 3% (v/v) de etanol absoluto, y se incubaron a 32 °C hasta observar crecimiento celular por turbidez. Si existió crecimiento se inoculó a la siguiente concentración de etanol, y así sucesivamente con incrementos del 1% hasta que la levadura no presentara crecimiento [10, 94, 95].

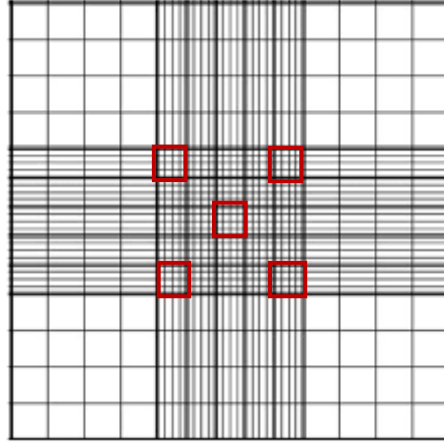
Los hongos se sembraron primeramente en cajas Petri de YMPGA y se incubaron a 32 °C por 5 días. Posteriormente, de estas placas se tomaron discos de agar micelio de 1.1 cm de diámetro y se inocularon por triplicado en placas Petri de YMPGA adicionadas con 8% de glucosa y etanol absoluto al 3% (v/v) y se incubaron a 32 °C por 9 días. Si existió crecimiento se inoculó en la siguiente concentración de etanol, y así sucesivamente con incrementos del 1% hasta que el hongo no presentara crecimiento [10, 94].

### **2.2.8 Cinética de crecimiento de los aislados de levaduras en medio GELP**

#### **2.2.8.1 Preparación del inóculo**

La viabilidad celular se determinó con la tinción de azul de metileno, y la concentración celular utilizando una cámara de Neubauer. Para esto se agregaron 6 mL de agua destilada al cultivo en placa de GELPA de cada una de las levaduras en estudio, incubada a 32 °C por 24 h. De esta suspensión se tomó 1 mL que se transfirió a un tubo con agua destilada hasta una dilución de 1:100 [96].

En un vial, se colocó 1 mL de la dilución 1:10 y 1 mL de azul de metileno y se agitó. Posteriormente, se tomaron 10 µL que se colocaron en la cámara de Neubauer para observar las levaduras en el microscopio a un aumento de 400x [96, 97]. La concentración y viabilidad de las células se cuantificaron en 5 cuadrantes de la cámara tomando en cuenta las células vivas (blancas) y muertas (azules), y usando las siguientes fórmulas [98, 99]:



**Figura 2.1.** Cuadrantes utilizados en la cámara de Neubauer

$$\text{Concentración} \left( \frac{\text{cel}}{\text{mL}} \right) = \frac{\# \text{ células viables}}{\# \text{ de cuadros}} \times 250,000 \times FD$$

$$\% \text{ Viabilidad} = \frac{\# \text{ células blancas o hialinas}}{\# \text{total de células}} \times 100$$

### 2.2.8.2 Cinética de crecimiento

La cinética de crecimiento de los 4 aislados de levaduras se llevó a cabo por triplicado en matraces Erlenmeyer de 250 mL con 100 mL de medio GELP. De cada cepa, se añadió una concentración inicial de inóculo de  $1 \times 10^5$  cel/ mL. Los matraces se taparon con torundas de algodón para permitir el intercambio gaseoso, y se incubaron a  $32 \pm 2$  °C y se agitaron a 130 rpm [95]. Para obtener las curvas de crecimiento, se tomaron 100 µL de muestra cada 4 h durante 28 h de los matraces, posteriormente, se realizaron las diluciones necesarias y se añadió el azul de metileno en una dilución 1:1. Las levaduras se observaron y contaron en la cámara de Neubauer siguiendo la metodología descrita en la sección 2.2.8.1.

### 2.2.8.3 Velocidad específica de crecimiento y tiempos de duplicación

La velocidad máxima de crecimiento ( $\mu_{\max}$ ) para cada levadura se calculó de acuerdo con los datos obtenidos de la curva de crecimiento para la fase de crecimiento exponencial. Se utilizó la siguiente ecuación [100]:

$$(1) \mu_{max} = \ln\left(\frac{X_f}{X_i}\right)\left(\frac{1}{t}\right)$$

ln= logaritmo natural; Xf= crecimiento final (ce/mL); Xi= crecimiento inicial (cel/mL); t= tiempo (h)

El tiempo de duplicación (td) se calculó con la siguiente ecuación [100]:

$$(2) td = \frac{\ln 2}{\mu}$$

ln= logaritmo natural;  $\mu$ = velocidad específica de crecimiento (h)

## **2.2.9 Cinética de liberación de azúcares reductores por los aislados *Trametes hirsuta* Bm-2 y RT-1**

### **2.2.9.1 Preparación del inóculo**

Para el inóculo se tomaron discos de agar micelio de 1.1 cm de diámetro, al quinto día del crecimiento del hongo de placas Petri de medio PDA incubadas a 32 °C [11].

### **2.2.9.2 Dinámica de la hidrólisis enzimática**

La prueba se realizó por triplicado en matraces Erlenmeyer de 250 mL a los que se añadieron 14 g de harina de semillas de ramón y 100 mL de agua destilada para obtener una suspensión al 14% (p/v). Los matraces se taparon con torundas de algodón y se esterilizaron a 120 °C por 15 min. Cuando los matraces se enfriaron se procedió a inocular 2 discos de agar-micelio de *T. hirsuta* Bm-2 y RT-1, cada hongo en sus respectivos matraces, y ya inoculados se incubaron sin agitación a 32 °C por 14 días [11].

De cada matraz inoculado se tomó 1 mL de muestra de la suspensión que se almacenó en tubos Eppendorf a 4 °C para su análisis posterior. Las muestras fueron tomadas en los siguientes intervalos de tiempo [11]:

- Antes de esterilizar la suspensión;
- Tiempo 0, 48, 96, 144, 192, 240 y 288 h (cada 2 días por 14 días);

La liberación de azúcares reductores presentes en las alícuotas se cuantificó con el método de Miller [103].

## **2.3 Fermentación**

### **2.3.1 Preparación del sustrato**

En matraces Erlenmeyer de 250 mL se preparó una suspensión de harina de ramón al 14% (p/v) con 100 mL de agua destilada, los matraces se taparon con torundas de algodón y se esterilizaron a 120 °C y 15 Psi por 15 min [11].

### **2.3.2 Preparación del inóculo**

En el caso de las levaduras, el inóculo con una concentración de  $1 \times 10^6$  cel/mL se preparó a partir de un cultivo de 24 h de crecimiento en medio GELPA, tal y como se describe en la sección 2.2.8.1.

Para los hongos se realizó como se describe en la sección 2.2.9.1.

### **2.3.3 Estrategia de SCFS**

Para la primera estrategia de SCFS, se inocularon por triplicado, en matraces de Erlenmeyer de 250 mL de capacidad con 100 mL de una suspensión acuosa estéril de harina de semillas de ramón (HSR) al 14% (p/v), con 2 discos de agar micelio de 1.1 cm de diámetro, y posteriormente se incubaron, sin agitación a  $32 \pm 2$  °C durante 7 días para permitir el crecimiento del hongo. Pasado el tiempo de incubación se procedió a agitar los matraces a 150 rpm por 24 h, al cabo de los cuales se tomó 1 mL de muestra de la suspensión para examinar la cantidad de glucosa por HPLC.

Después, se procedió a adicionar los aislados de levaduras seleccionados según las pruebas cualitativas *C. tropicalis* PL-1 (1.2 mL) y *H. guilliermondii* TL-3 (0.64 mL), en sus respectivos matraces para la fermentación, los que se incubaron durante 6 días a 32 °C, sin agitación y en oscuridad. Cada 24 h se tomaron 2 mL de muestra para determinar el pH y la concentración de glucosa.

En la segunda estrategia para estudiar si la viscosidad del medio afectaba la hidrólisis del almidón y fermentación, se realizó el mismo procedimiento. Sin embargo, en el día 7 se retiró el micelio del hongo de los matraces y se les añadió 50 mL de agua estéril con una concentración de 1.5 g/L de sulfato de amonio como fuente de nitrógeno para las levaduras, y se agitó durante 24 h a 150 rpm. La fermentación se llevó a cabo de la misma manera, pero usando solamente la levadura *C. tropicalis* PL-1 (1.98 mL), las muestras fueron analizadas por DNS.

### 2.3.4 Destilación

Para realizar la destilación, la suspensión con etanol se filtró con una bomba de vacío y se colectó el sobrenadante. Posteriormente, se tomó una alícuota de 25 mL del sobrenadante y se mezcló con 25 mL de agua destilada (1:1); la mezcla se transfirió a un matraz de bola de 100 mL, se añadieron 8 perlas de ebullición y se procedió a destilar a  $95 \pm 2$  °C hasta recuperar un volumen de 25 mL de una mezcla de agua con bioetanol.

### 2.3.5 Eficiencia del proceso

En teoría, 1 g de almidón equivale a 1.11 g de glucosa y 0.511 es el factor de conversión de la glucosa a etanol [43, 102]. Para calcular el rendimiento teórico se utilizó la siguiente fórmula:

$$\text{Rendimiento teórico (g)} = \frac{\text{g de almidón} \times 1.11 \text{ g de glucosa}}{1 \text{ g de almidón}} \times 0.511$$

El rendimiento de bioetanol o eficiencia de la fermentación se calculó con la siguiente fórmula [21]:

$$\text{Rendimiento bioetanol (\%)} = \frac{\text{bioetanol obtenido } \left(\frac{\text{g}}{\text{L}}\right)}{\text{bioetanol teórico } \left(\frac{\text{g}}{\text{L}}\right)} \times 100\%$$

## 2.4 Métodos analíticos

### 2.4.1 Determinación de azúcares reductores directos (ARD)

La cuantificación de azúcares reductores se realizó con el método de Miller [103]; a cada 0.1 mL de muestra se le adicionaron 1.5 mL de ácido 3,5 dinitrosalicílico (DNS), esta mezcla se hirvió por 5 min, y posteriormente se colocó en un recipiente con agua para ajustar la temperatura a la del ambiente. La absorbancia se leyó en un espectrofotómetro (Jenway, 6405 UV/Vis, Staffordshire, UK) a una longitud de onda de 550 nm, y la concentración se determinó mediante la extrapolación de los valores obtenidos a una curva estándar de glucosa [101]. La curva de calibración se encuentra en el Anexo 1 y 2.

### 2.4.2 Evaluación de la concentración de azúcares reductores totales por HPLC

Para la identificación y cuantificación de los azúcares se utilizó un cromatógrafo HPLC modelo Agilent 1260 Infinity II Manual Injector (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EUA) con un detector de índice de refracción (RID). La separación se llevó a cabo con una

columna ZORBAX Carbohydrate 4.6 x 250 mm x 5 $\mu$  (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EUA). La fase móvil fue una mezcla de 75% acetonitrilo y 25% agua; flujo de 2 mL/ min, colectores a 40 °C y detector a 35 °C; la inyección de la muestra fue de 20  $\mu$ L [104]. Los azúcares de la marca CHEM SERVICE que se identificaron y utilizaron como estándares se encuentran en el Anexo 8.

#### **2.4.3 Determinación de la concentración de bioetanol por cromatografía de gases**

La concentración de bioetanol se determinó por cromatografía de gases usando un equipo Perkin Elmer modelo Clarus 500 (PerkinElmer, Waltham, MA, EUA) con un detector de ionización de flama; equipado con una columna EC-WAX, (30 m  $\times$  32 mm de diámetro interno y 0.25  $\mu$ m de espesor de película de la marca Alltech). El gas acarreador fue N<sub>2</sub> con una presión de 7 psi y un Split de 20 mL/ min. Las condiciones de temperatura del horno fueron: temperatura inicial 50 °C x 1 min, y una rampa de 2 °C/min hasta llegar a 78 °C x 2 min, posteriormente se realizó una rampa de 40 °C/min hasta llegar a 90 °C durante 2 min. La temperatura de inyección fue de 120 °C y la del detector de ionización de flama de 200 °C; volumen de muestra inyectado fue de 2  $\mu$ L [8]. La curva de calibración se encuentra en el Anexo 10.

#### **2.4.4 Análisis estadístico**

Al finalizar la fermentación, con los datos del etanol obtenidos en cada tratamiento, se realizó para cada estrategia un análisis de varianza de una vía y una prueba de medias de Tukey  $\alpha=0.05$  con el software SPSS 16 © SPSS, Inc. [8].

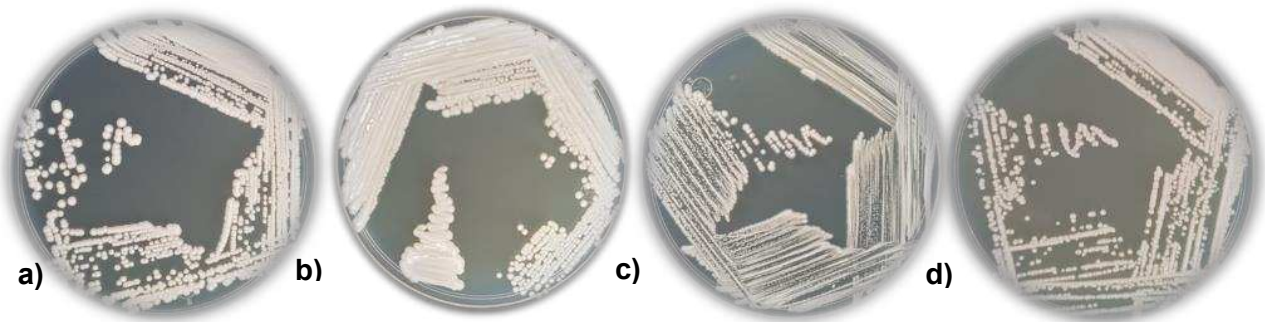


## CAPÍTULO III

### RESULTADOS

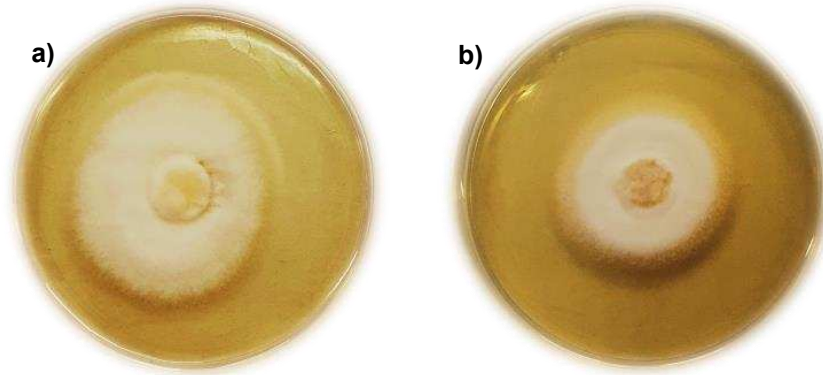
#### 3.1 Reactivación de los aislados de levaduras y hongos

En la reactivación de las cepas de levaduras, figura 3.1, se observó que *Candida tropicalis* PL-1 mostró colonias convexas, de color blanco, lisas, opacas, con borde continuo y textura butirosa; *Issatchenkia orientalis* TL-2 presentó colonias planas, de color marfil en el centro y marfil claro en la periferia, opacas, con borde fimbriado por el desarrollo de pseudomicelio, y textura butirosa; *Hanseniaspora guilliermondii* TL-3 formó colonias pequeñas convexas, de color marfil, brillosas, con borde continuo, y textura butirosa; y *Meyerozyma guilliermondii* RSL-3 presentó colonias convexas, de color blanco, brillosas, con borde continuo, y textura butirosa. Se demostró que las levaduras seleccionadas se encuentran viables y puras y la morfología presentada concuerda con la descrita en Kurtzman [ 55, 58, 63, 65].



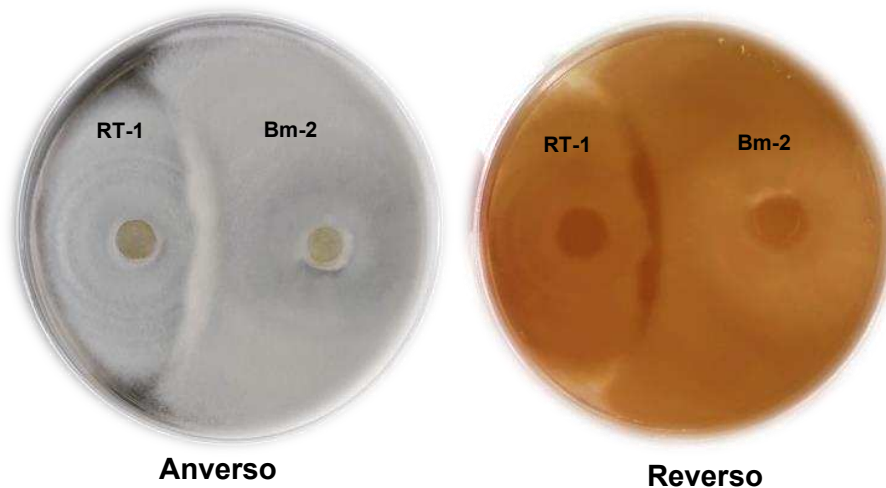
**Figura 3.1** Reactivación de las levaduras nativas: a) *Candida tropicalis*; b) *Issatchenkia orientalis* 2; c) *Hanseniaspora guilliermondii*; d) *Meyerozyma guilliermondii*

En el caso de los hongos *Trametes hirsuta* Bm-2 formó una colonia con crecimiento vigoroso y micelio algodonoso de color blanco a crema; RT-1 presentó una colonia con crecimiento más lento, presencia de anillos concéntricos y micelio algodonoso color blanco., figura 3.2.



**Figura 3.2** Crecimiento de los aislados de *Trametes hirsuta* a) Bm-2 y b) RT-1 en PDA

Puesto que los aislados de hongos utilizados pertenecen a la misma especie, se realizó una prueba de competencia intraespecífica en la cual se inocularon ambos aislados de forma simultánea en los extremos opuestos de una placa de PDA, como se muestra en la figura 3.3. La interacción ecológica entre dos organismos puede ser positiva (sinérgica), neutral (sin ningún efecto) o negativa (antagónica) y afectar de igual o de forma diferente a las dos partes (bilateral) [105]. El resultado de esta prueba mostró que el crecimiento del Bm-2 fue más rápido que el de RT-1, asimismo cuando los dos micelios entraron en contacto se formó un abultamiento en el frente de ambos, y ninguno de los dos micelios creció sobre el otro ni progresó, esto probablemente como consecuencia de un antagonismo bilateral o coantagonismo [193].



**Figura 3.3** Prueba de competencia intraespecífica de *Trametes hirsuta* Bm-2 y RT-1

Por el reverso de la placa, en la zona de contacto de ambos micelios, se observó una franja de color oscuro, que posiblemente se deba a la producción y liberación de un metabolito secundario, con efecto fungiestático, por cualquiera de los dos aislados o por ambos. Boddy y Hiscox [106] mencionan que, algunos de los mecanismos antagonistas utilizados por los micelios para atacar o defenderse de sus competidores incluyen la liberación de toxinas, producción de enzimas, alteración de la tasa metabólica, cambios morfológicos en micelio (las hifas pueden agregarse para formar barreras de defensas para bloquear físicamente a los invasores, o formar cordones para penetrar las defensas del competidor), y en algunos casos la liberación de compuestos volátiles o difusibles.

Este comportamiento podría deberse a que, en su ambiente natural, los hongos de distintos grupos de basidiomicetos pueden colonizar y degradar el mismo material leñoso utilizando diferentes estrategias [107]; como resultado del vasto y diverso metabolismo secundario que han desarrollado debido a que su micelio y cuerpos fructíferos se exponen a numerosos depredadores y competidores [108]. Igualmente, aunque son hongos autóctonos de la Península de Yucatán, sus fuentes de aislamiento son distintas; pues mientras que Bm-2 fue aislado de madera en descomposición, RT-1 se obtuvo de la planta viva *Acalypha gaumeri*. Esta última implicación podría ser importante, porque los hongos de la podredumbre blanca que son aislados de árboles vivos y que actúan como patógenos, se adaptan para sobrevivir a los compuestos antifúngicos liberados por la planta como compuestos fenólicos, taninos o alcaloides [109].

Con los resultados obtenidos en esta etapa, se descartó el uso simultáneo de los aislados Bm-2 y RT-1 para la sacarificación de la harina de semillas de ramón en el mismo reactor por su posible competencia instraespecífica.

### **3.2 Tolerancia de las cepas bajo estudio a distintas temperaturas**

La termotolerancia es una característica deseable en las levaduras, porque durante la fermentación ocurre un aumento de la temperatura (35-45°C) debido a sus reacciones metabólicas [47, 110, 111]. La gran mayoría de las levaduras son mesófilas (temperaturas óptimas entre 15- 35 °C) [88], y este incremento en la temperatura supone un estrés que puede causar daños en la membrana celular, así como la desnaturalización y agregación de proteínas que participan en el proceso fermentativo [47, 111]. La importancia de este parámetro en la tesis fue para determinar la temperatura de la SCFS, razón por la cual los aislados de levaduras nativas se sometieron a distintas temperaturas para conocer el rango

en el que pueden crecer y proliferar, y en el cual sufren inactivación y muerte, el crecimiento se registró mediante turbidez en la tabla 3.1.

**Tabla 3.1 Tolerancia a distintas temperaturas de las levaduras nativas**

Temperatura	32°C	37°C	40°C	42°C	45°C
<b><i>C. tropicalis</i> (PL-1)</b>	+++	+++	+++	+++	-
<b><i>I. orientalis</i> (TL-2)</b>	+++	+++	++	++	-
<b><i>M. guilliermondii</i> (RSL-3)</b>	+++	+++	++	-	-
<b><i>H. guilliermondii</i> (TL-3)</b>	+++	++	-	-	-

+++ buen crecimiento; ++ crecimiento moderado; + crecimiento débil; - sin crecimiento

En el cuadro se observa que las levaduras PL-1 y TL-2 fueron las más termotolerantes, ya que a 42 °C crecieron bien y de forma moderada, respectivamente; sin embargo, a 45 °C ninguno de los aislados presentó crecimiento.

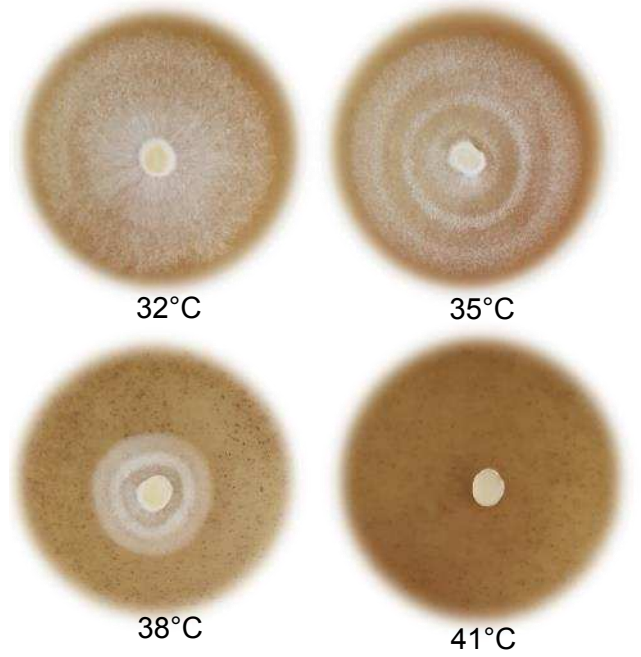
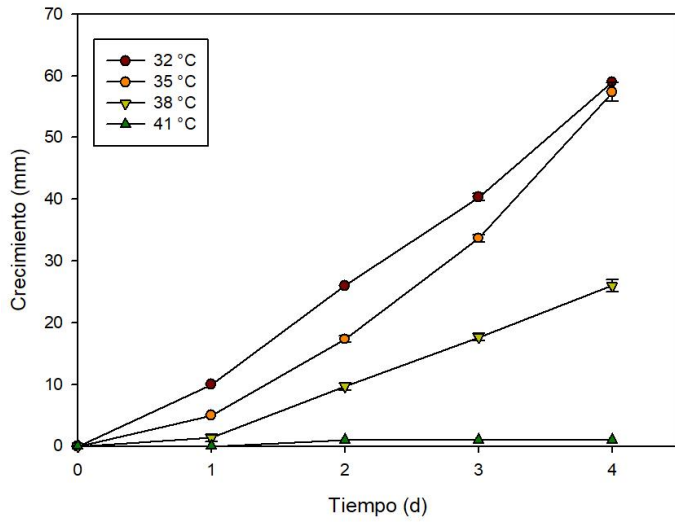
Por otro lado, el aislado RSL-3 mostró crecimiento hasta los 40 °C, mientras que TL-3 sólo toleró 37 °C como máxima temperatura. La razón por la cual las levaduras crecieron a más de 35 °C es que pueden desarrollar mecanismos para lidiar con temperaturas elevadas como son: la síntesis de proteínas de choque térmico (HSPs, por sus siglas en inglés), cambios en la estructura lipídica de la membrana celular y la síntesis de trehalosa [112]. Sin embargo, el requerimiento de la temperatura óptima y máxima tolerada para el crecimiento también está determinado por el hábitat específico de aislamiento [88].

En el caso de las especies de *Candida* e *Issatchenkia* se ha registrado que estas pueden tolerar temperaturas de hasta 42 °C y ligeramente mayores [88], como se reporta en la investigación realizada por Pongcharoen y Kawano-Kawada [111], quienes aislaron cepas de *C. tropicalis* del suelo de un campo de caña de azúcar en Tailandia y cuya termotolerancia se registró hasta los 42 °C. En el caso de *I. orientalis*, se reportó que puede crecer y producir etanol a temperaturas elevadas que oscilan entre los 41-43 °C [62] y una llegó a mostrar crecimiento hasta los 45 °C [110]. Los resultados obtenidos en la investigación, para estos dos aislados, concordaron con los reportados.

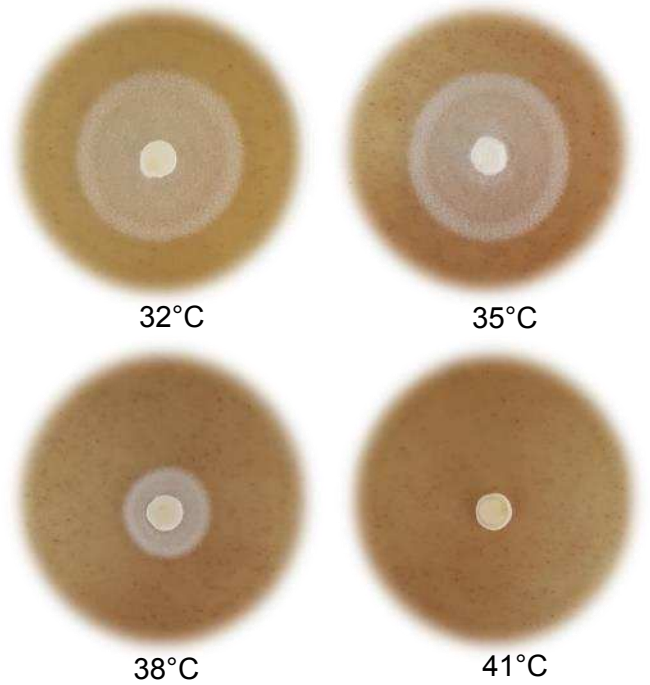
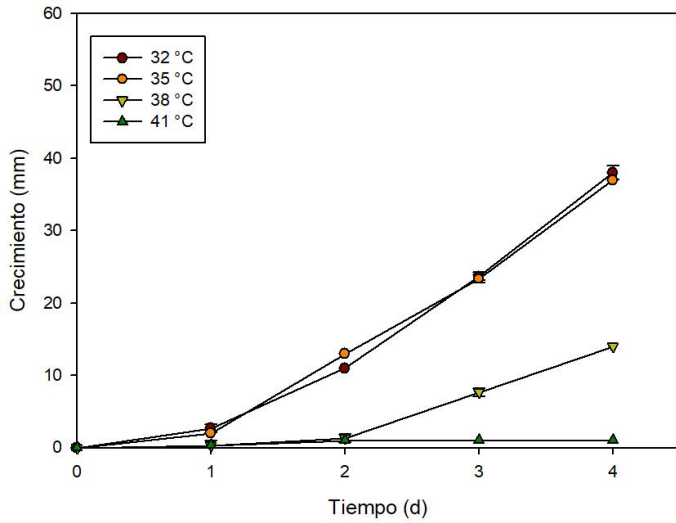
La temperatura estándar de crecimiento para *M. guilliermondii* va de 30 hasta 42 °C [113], aunque la especie nativa RSL-3 creció a una temperatura máxima de 40 °C; por otro lado, la temperatura más elevada tolerada por TL-3 de 37 °C, y concordó con lo reportado por Cadez y Smith [63] para *H. guilliermondii*.

La tolerancia a altas temperaturas por parte de las levaduras es importante, debido a que comúnmente la fermentación ocurre entre 20-35 °C [47, 24] y las cepas que se utilizan para las fermentaciones industriales comienzan a inactivarse alrededor de los 33-35 °C [110]; el contar con levaduras termotolerantes supondría una ventaja, ya que estas se inactivarían a temperaturas más altas teniendo más posibilidades de continuar con el proceso fermentativo para la producción de bioetanol; además, su uso también contribuye a la disminución del riesgo de contaminación con otros microorganismos debido a las altas temperaturas [110].

En lo que a los hongos concierne, también se registró su crecimiento a distintas temperaturas para determinar la máxima temperatura tolerada, la de mayor crecimiento, y la máxima en la cual el diámetro cesa. En la prueba se detectó que, al término de 4 días, ambos aislados de *T. hirsuta* Bm-2 y RT-1, mostraron el mayor crecimiento a los 32 °C con 59 mm y 38 mm de diámetro, respectivamente. Asimismo, se observó que a 35 °C ambos aislamientos presentaron un crecimiento similar al registrado a 32 °C, ya que Bm-2 creció 57 mm y RT-1 37 mm de diámetro. Sin embargo, a partir de esa temperatura, los hongos presentaron un crecimiento más lento, y en el caso del aislado Bm-2 la morfología colonial cambió ya que presentó el desarrollo de círculos concéntricos; a 41 °C el crecimiento de ambos aislados de *T. hirsuta* fue casi nulo, pues tan solo fue de 1 mm, como puede observarse en las figuras 3.4 y 3.5. Es importante resaltar que Bm-2 presentó una tasa de crecimiento mayor que RT-1.



**Figura 3.4** Tolerancia a distintas temperaturas de *T. hirsuta* Bm-2 en medio de harina de semillas de ramón



**Figura 3.5** Tolerancia a distintas temperaturas de *T. hirsuta* RT-1 en medio de harina de semillas de ramón

La mayoría de los hongos de la pudrición de la madera, pertenecientes a la división Basidiomycota, poseen temperaturas de crecimiento que oscilan entre 5 y 40 °C, con una óptima de 25 °C [114]. Sin embargo, especies tropicales de hongos, incluido el género *Trametes* crecen de manera óptima entre 30-40 °C, aunque también pueden desarrollarse en temperaturas menores a los 20 °C [114]. Los resultados obtenidos concordaron con los registrados en la literatura, puesto que las temperaturas máximas de crecimiento se encontraron dentro de los rangos reportados.

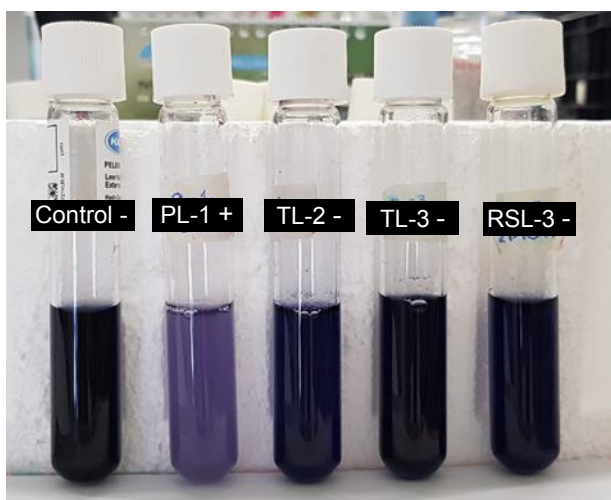
Los resultados obtenidos en esta prueba podrían estar vinculados con la zona geográfica, Yucatán, de la que fueron recolectados los aislados, porque las temperaturas que predominan en dicho estado son: 36 °C la máxima promedio, 26 °C la media anual y 16 °C la mínima promedio [115]. Si se observan las temperaturas de crecimiento del hongo estas se relacionan con las que se registran en Yucatán, ya que tuvieron crecimiento a 32 y 35 °C, el cual fue disminuyendo a 38 °C, temperatura que sobrepasa los 36 °C que es la máxima promedio del estado y a la cual estarían comúnmente sometidos.

Un comportamiento similar al registrado en esta tesis fue reportado por Mswaka y Magan [116], quienes aislaron hongos, algunos pertenecientes al género *Trametes*, de distintos bosques y condiciones climatológicas de Zimbabwe. Observaron que los hongos tenían diferentes temperaturas óptimas y máximas de crecimiento, y registraron 3 grupos distintos: a) temperaturas bajas de 25-30°C sin crecimiento a 37°C; b) temperaturas intermedias de 30-37°C sin crecimiento a 45°C; c) y temperaturas altas sin crecimiento a 55°C, demostraron que la temperatura de crecimiento se relacionaba con su distribución geográfica, ya que los hongos aislados de las zonas más calientes eran los que mayor rango de temperaturas de crecimiento presentaban [115].

Como se observó en los resultados, los hongos y las levaduras presentaron temperaturas de crecimiento similares, por lo tanto, se descartó la existencia de algún problema en cuanto a temperatura en la SCFS. Sin embargo, es importante señalar que la temperatura ideal para la producción de bioetanol depende de las levaduras [47].

### 3.3 Hidrólisis de almidón soluble por los aislados de levaduras y hongos bajo estudio

La prueba de hidrólisis de almidón por las levaduras nativas *C. tropicalis* PL-1, *I. orientalis* TL-2, *H. guilliermondii* TL-3 y *M. guilliermondii* RSL-3 se realizó para determinar si poseían capacidad amilolítica, debido a que el sustrato contenido en el reactor, tendrá además de glucosa, productos de la actividad  $\alpha$ -amilasa del hongo como dextrinas, oligosacáridos, trimaltosas y maltosas [30, 117, 118]. La evaluación se efectuó en tubos de ensayo con almidón soluble y base nitrogenada, y los resultados se presentan en la figura 3.6.



**Figura 3.6** Prueba de hidrólisis de medio de almidón soluble adicionado con base nitrogenada en *C. tropicalis* PL-1, *I. orientalis* TL-2, *H. guilliermondii* TL-3 y *M. guilliermondii* RSL-3

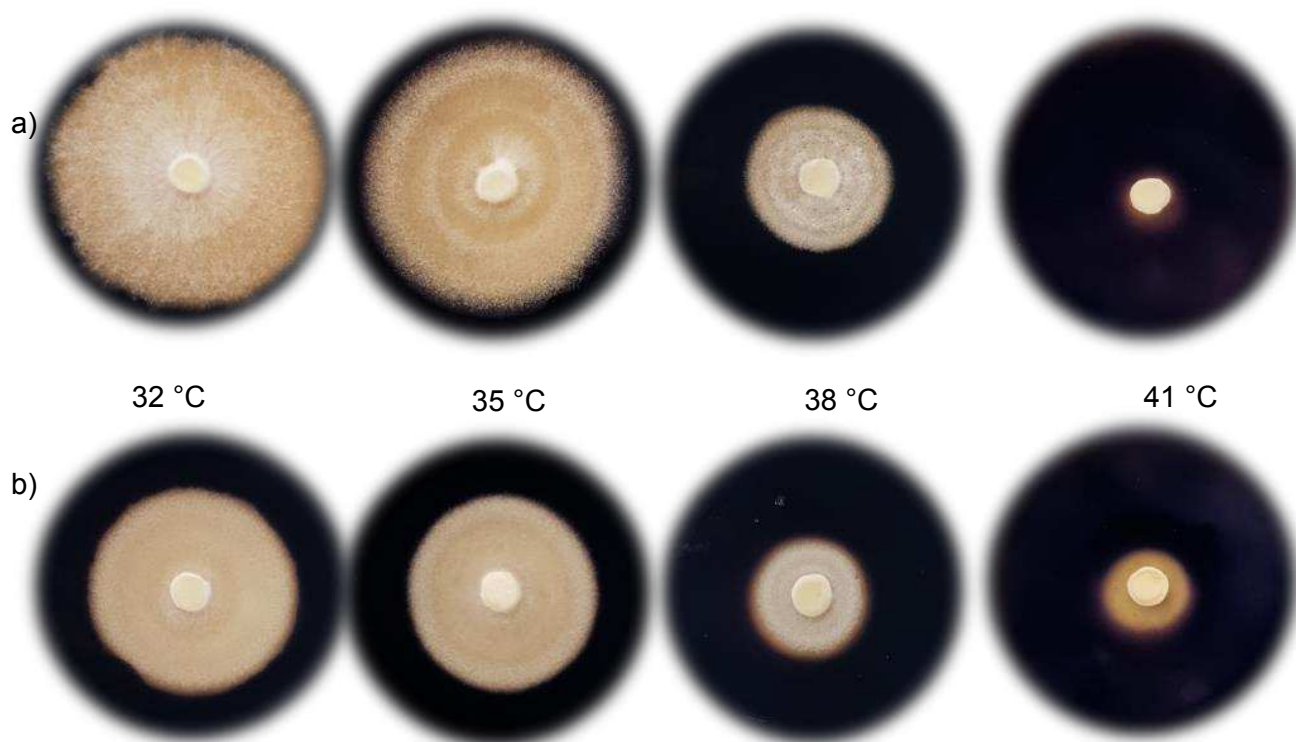
Se observó que sólo *C. tropicalis* PL-1 exhibió capacidad amilolítica parcial, ya que la solución de almidón presentó una coloración violeta claro, que indica que el almidón se despolimerizó parcialmente [119]. Los tubos de ensayo con los demás aislados presentaron una coloración violeta intenso, igual a la del control, y se debe a la reacción química del almidón con el yodo del Lugol, cuando este se inserta en los huecos de la molécula helicoidal del almidón (amilosa) [120].

Algunos géneros de levaduras como *Candida*, *Pichia* y *Saccharomyces*, se han reportado como productores de amilasas como  $\alpha$ -amilasa o glucoamilasa; sin embargo, la producción, excreción y actividad dependen específicamente de cada cepa [118]. En el caso de *C. tropicalis* PL-1, esta capacidad amilolítica se debió a la síntesis de la enzima glucoamilasa permitiéndole degradar el almidón, a una tasa baja [56, 57, 111, 121].



Por otro lado, se ha reportado que la levadura *M. guilliermondii* es capaz de sintetizar las enzimas  $\alpha$ -amilasa y glucoamilasa [66, 122]; sin embargo, en este estudio no se detectó actividad de estas enzimas. La razón podría estar asociada al medio de cultivo puesto que este juega un papel determinante en la síntesis de las enzimas [66] porque las fuentes de carbono afectan el crecimiento y producción de amilasas, así como la fuente orgánica e inorgánica de nitrógeno [122]. Por esta causa, no se descartó la capacidad amilolítica de la levadura. Por último, para *I. orientalis* ni *H. guilliermondii* no existen reportes sobre su capacidad amilolítica.

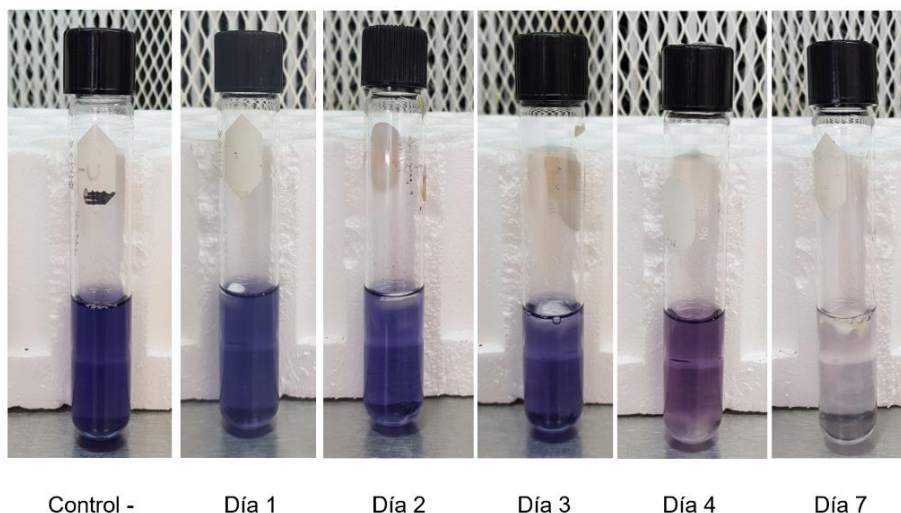
Para los aislados de *T. hirsuta* Bm-2 y RT-1 la prueba de hidrólisis de almidón se realizó en placas con medio de harina de semillas de ramón que contiene almidón, a diferentes temperaturas y 4 días de incubación. Posteriormente, las placas se inundaron con Lugol, para revelar la capacidad amilolítica, figura 3.7.



**Figura 3.7** Hidrólisis de almidón en placa de medio de harina de semilla de ramón incubadas por 4 días a distintas temperaturas por *T. hirsuta* (a) Bm-2 y (b) RT-1

Se observó que Bm-2 y RT-1 hidrolizaron el almidón contenido en el medio de cultivo debido a la formación del halo hialino, que se produce alrededor de la colonia, como resultado de que el yodo del Lugol no formó complejos con el almidón porque este fue hidrolizado [124]. Este halo se observó a 38 y 41 °C con RT-1, y solamente a esta última temperatura en Bm-2. Se supuso que no se apreció el halo en las temperaturas de 32 y 35 °C porque la glucosa resultante de la acción enzimática fue consumida rápidamente para la producción de micelio, el cual recubrió la zona hialina. En el caso de 38 y 41 °C, es posible que la observación del halo se deba a que estas temperaturas afectaron el crecimiento del hongo al causar daños en su membrana (integridad), la desnaturalización de proteínas [111], el transporte de nutrientes y funciones bioenergéticas [52], lo que impidió el consumo de la glucosa. En el estudio de Paludo *et al.* se demostró que para la producción enzimática no se requería una gran cantidad de biomasa [125]. Asimismo, es posible que la enzima se encuentre asociada a la pared celular, pues por el reverso de la colonia no hay coloración.

Puesto que esta fue la primera vez que se evaluó la capacidad amilolítica del aislado RT-1, también se realizó la prueba en medio líquido con almidón soluble, a 32 °C por 7 días, para visualizar la hidrólisis del polisacárido. Como se observa en la figura 3.8, desde el primer día hay un ligero cambio en la coloración del medio, con respecto al control, haciéndose esto más evidente al cuarto día, en el cual aparece una coloración violeta claro, que desapareció al séptimo día. Estos cambios de coloración indicaron la acción de las  $\alpha$ -amilasa sobre el almidón del medio, ya que, al reducirse la longitud de la cadena, la intensidad en el color violeta disminuye, y cuando el tamaño de las cadenas de amilosa es menor o igual a 20 unidades de glucosa no se produce una coloración [126]. Esto sugirió su gran potencial para la hidrólisis del almidón presente en la harina de semillas de *B. alicastrum*. No se realizó la prueba en el aislado Bm-2 porque ya había sido comprobada esta capacidad por Olguin [11] y se hizo una prueba preliminar con ambos aislados en medio líquido con almidón soluble, en la cual Bm-2 no presentó capacidad amilolítica, a diferencia de RT-1 el cual hidrolizó el almidón.



**Figura 3.8** Hidrólisis del almidón soluble en medio líquido por *T. hirsuta* RT-1 a 32 °C y a diferentes días de incubación

Los resultados concordaron con lo reportado por diversos autores [11, 71, 127, 128] quienes también evidenciaron la capacidad amilolítica del basidiomiceto *Trametes hirsuta*, la cual probablemente se deba a la síntesis de las enzimas  $\alpha$ -amilasa y glucoamilasa (complejo amilasa), capacitándolo para utilizar esta fuente de carbono que también se encuentra en las plantas y restos de materia vegetal a los que tienen acceso [120].

### **3.4 Tolerancia de los aislados de levaduras y hongos bajo estudio a distintas concentraciones de etanol**

Además de la temperatura, el aumento en la concentración de etanol también supone un estrés para las levaduras durante la fermentación, porque su acumulación en el medio inhibe el crecimiento y viabilidad celular, afecta la permeabilidad de las células y la conformación de las proteínas causando su disfunción o desnaturalización, todo lo cual afecta el transporte de glucosa, aminoácidos y iones, y de las enzimas glicolíticas, provocando una menor producción de bioetanol [129 ,130].

La prueba de tolerancia a distintas concentraciones de etanol se realizó a los aislados nativos de levadura, para constatar su capacidad de adaptación y desarrollo, así como para conocer la máxima concentración que toleraban. Los resultados se registraron en la tabla 3.2.

La levadura *C. tropicalis* PL-1 fue la que menor tolerancia a etanol presentó, ya que su crecimiento fue débil al 7% (v/v) y casi nula al 8% (v/v) de etanol. Por otra parte, los aislados de *I. orientalis* TL-2, *M. guilliermondii* RSL-3 y *H. guilliermondii* TL-3 mostraron la máxima tolerancia a 11% (v/v) de etanol, sin embargo, su crecimiento fue débil a partir del 10% (v/v). Asimismo, se observó que todos los aislados de levaduras tuvieron buen crecimiento en concentraciones de 3-4% (v/v) de etanol y que a partir del 5% (v/v) su tasa de crecimiento fue disminuyendo, paulatinamente, conforme se incrementaba la concentración del alcohol; es probable que esta sea la concentración que comenzó a representar un estrés para las levaduras, desencadenando respuestas adaptativas para sobrevivir a más altas concentraciones de etanol [129, 134].

**Tabla 3.2** Tolerancia de los aislados de levaduras nativas a distintas concentraciones de etanol a 32 °C.

Concentración etanol	3%	4%	5%	6%	7%	8%	9%	10%	11%	12%
<b><i>C. tropicalis</i> (PL-1)</b>	+++	+++	++	++	+	+	-	-	-	-
<b><i>I. orientalis</i> (TL-2)</b>	+++	+++	++	++	++	++	++	+	+	-
<b><i>M. guilliermondii</i> (RSL-3)</b>	+++	+++	++	++	++	++	++	+	+	-
<b><i>H. guilliermondii</i> (TL-3)</b>	+++	+++	++	++	++	++	++	+	+	-

+++ buen crecimiento; ++ crecimiento moderado; + crecimiento débil; - sin crecimiento

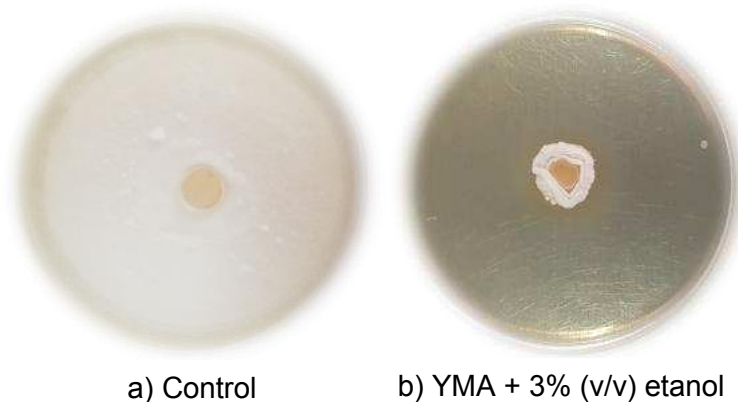
Las distintas concentraciones máximas de etanol que toleraron los aislados nativos de los frutos del ramón (PL-1, 8%; TL-2, RSL-3 y TL-3, 11%) se deben a que cada cepa de levaduras tiene una capacidad diferente para sobrevivir o crecer en la presencia de etanol [131]. Esta capacidad de las levaduras para adaptarse al etanol está dada por la interacción de múltiples genes, alrededor de 200, que están involucrados en la síntesis de proteínas y trehalosa, cambios en la membrana y pared celular, metabolismo de lípidos, entre otros [129, 131, 132, 133, 134]. Según la clasificación de tolerancia a etanol existen 3 categorías: pobre (3-6%), moderada (6-10%) y alta (10-13%) [135]. De acuerdo con ésta, el aislado PL-1 es una levadura de tolerancia moderada, mientras que TL-2, RSL-3 y TL-3 son de tolerancia alta. Esta característica es importante, debido a que entre más tolerancia a etanol se tenga, la fermentación será más rápida y completa, obteniéndose líquidos con mayor

concentración de etanol, traduciéndose en un mejor rendimiento y sustentabilidad del proceso [131].

En cuanto a lo registrado en la literatura para cada aislado en particular, para *C. tropicalis* se han reportado cepas cuya tolerancia a etanol puede ir de 7-20% (v/v) a distintas temperaturas [111, 112, 136] por lo que el aislado PL-1 se encuentra dentro de los rangos señalados. Por otro lado, la tolerancia mostrada por *I. orientalis* TL-2 también concuerda con lo informado en diferentes reportes, en los que se ha registrado una tolerancia a etanol exógeno de 7-15% (v/v) [112, 136, 137, 138, 139]. En lo que respecta a *M. guilliermondii*, existe poca información acerca de su metabolismo y producción de bioetanol [140], sin embargo, existe un reporte en el que se señala una tolerancia de 20% (v/v) de etanol de una cepa de esta especie [141]. Por último, *H. guilliermondii* es una especie que aparece en las etapas tempranas de la fermentación del vino, y comúnmente se le atribuye una tolerancia a etanol entre 4-7% (v/v) [64, 142, 143, 144], a diferencia de lo reportado, el aislado obtenido de frutos de *B. alicastrum* toleró una concentración de etanol del 11% (v/v). La tolerancia exhibida por las levaduras nativas las convierte en candidatas para su uso en la producción de bioetanol.

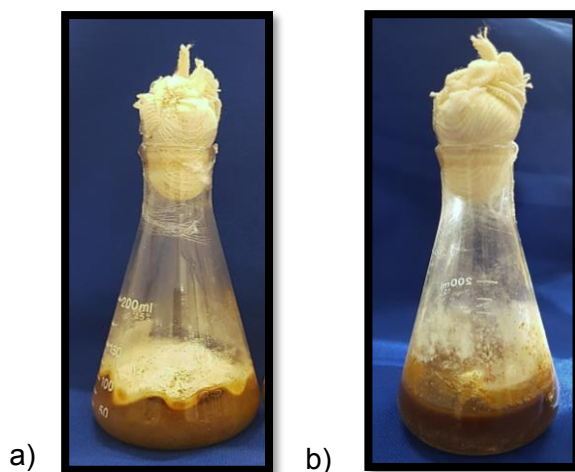
En lo que se refiere a los hongos, algunos basidiomicetos producen la enzima alcohol deshidrogenasa, la cual convierte el acetaldehído en etanol permitiendo la conversión de carbohidratos a alcohol etílico [145, 146]; la capacidad fermentativa de estos hongos no ha sido bien caracterizada [147], pero se considera que deben presentar una alta tolerancia para obtener rendimientos de etanol considerables en el proceso fermentativo [146].

Olguin *et al.* demostraron que la especie de *T. hirsuta* Bm-2 posee una alta tolerancia a etanol, ya que el crecimiento del hongo es vigoroso hasta una concentración de 10% (v/v) y este disminuye a partir de 11% (v/v) hasta ser nulo a 14% (v/v) de etanol en el medio [11]. Se esperaba que RT-1 tuviera un comportamiento similar a Bm-2, sin embargo, el hongo posee una limitada tolerancia a etanol ya que mostró un crecimiento escaso al término de la prueba (10 días, a una concentración de 3% (v/v), figura 3.9), en comparación con el control, por lo que no se realizaron más ensayos a más altas concentraciones de etanol. Un comportamiento similar al de RT-1 fue reportado por Paschos en 2015, donde la biomasa y tasa de crecimiento del hongo *F. oxysporum*, bajo condiciones aeróbicas, disminuyeron por la presencia de etanol [1-6% (p/v)].



**Figura 3.9** Tolerancia a etanol de *T. hirsuta* RT-1

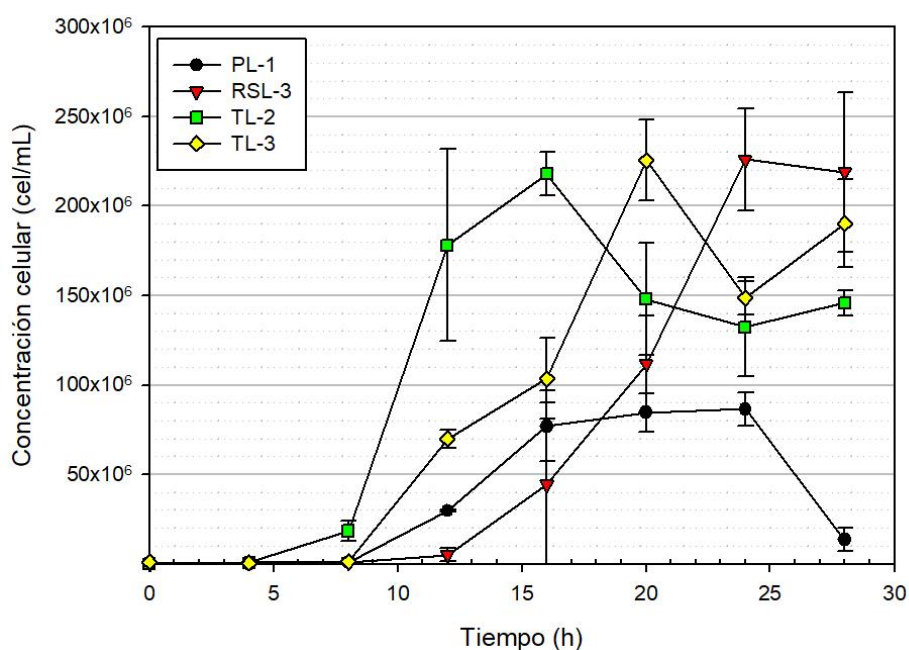
Debido a la poca tolerancia de RT-1 al etanol, su principal desempeño fue en la etapa de sacarificación de la harina de semilla de ramón. Esto puede observarse en la figura 3.10, donde la cepa RT-1 fue inoculada en un matraz conteniendo una suspensión estéril de harina de semillas de ramón al 14% (p/v). Al cabo de 30 días de la inoculación se advirtió un cambio en la textura de la suspensión, ya que es menos espesa y más líquida, lo que demostró la capacidad de sacarificación del aislado *T. hirsuta* RT-1, mas no la producción de etanol.



**Figura 3.10** Crecimiento de *T. hirsuta* RT-1 en una suspensión de harina de semillas de ramón al 14 % (p/v) a) 10 días de inoculado ; b) 30 días de inoculado

### 3.5 Curva de crecimiento de los aislados nativos de levaduras en medio GELP

Las curvas de crecimiento y parámetros cinéticos de los aislados nativos de levadura en medio GELP a  $32 \pm 2$  °C, en la cual se advierten las distintas fases: latencia (periodo sin crecimiento, pero de adaptación fisiológica al entorno), exponencial (duplicación de la población celular) y estacionaria (velocidad de crecimiento de la población es cero, no se produce aumento ni disminución netos del número de células); en un tiempo de 28 h, se presenta en la figura 3.11. Cabe señalar que es la primera vez que se realizó la curva de crecimiento de las 4 levaduras nativas.



**Figura 3.11** Curva de crecimiento de las levaduras nativas en medio GELP a  $32 \pm 2$  °C a 130 rpm

La fase de latencia de los aislados osciló entre las 4 y 8 h, con excepción de la levadura RSL-3 que se extendió hasta las 12 h, para dar comienzo a la fase exponencial. Las levaduras PL-1 y TL-2 alcanzaron la concentración celular más alta y el inicio de la fase estacionaria a las 16 h, mientras que para TL-3 y RSL-3 esto se presentó a las 20 y 24 h para, respectivamente.

La mayor velocidad de crecimiento,  $0.48 \text{ h}^{-1}$  fue mostrada por TL-2, así como el menor tiempo de duplicación de 2.04 h; mientras que la menor velocidad  $0.32 \text{ h}^{-1}$  la presentó RSL-3, y un tiempo de duplicación de 3.01 h, razón por la cual le tomó más tiempo llegar a la fase estacionaria.

El inóculo inicial de las levaduras fue de  $1 \times 10^5 \text{ cel/mL}$  y los máximos de concentración celular alcanzados se encontraron entre  $7.7 \times 10^7$  y  $2.3 \times 10^8 \text{ cel/mL}$ , la levadura PL-1 fue la que menor biomasa produjo y RSL-3 la que tuvo el mayor incremento.

**Tabla 3.3** Parámetros cinéticos de los aislados de levaduras en medio GELP a  $32 \pm 2^\circ\text{C}$  a 130 rpm

Levadura	Concentración máxima de células (cel/mL)	$\mu_{\text{max}}$ ( $\text{h}^{-1}$ )	Tiempo de duplicación (h)
PL-1	77,000,000	0.42	1.65
TL-2	218,000,000	0.48	1.44
TL-3	225,666,667	0.39	1.78
RSL-3	226,000,000	0.32	2.17

La comparación de los resultados de la concentración celular con la literatura fue difícil porque no se encontraron investigaciones realizadas bajo las mismas condiciones de temperatura, tiempo de crecimiento, concentración de inóculo, medio de cultivo y recuento en microscopio, utilizadas en esta tesis, para cada una de las levaduras.

Sin embargo, se han reportado concentraciones de entre  $1 \times 10^7 \text{ UFC/mL}$  a  $25^\circ\text{C}$  [148] y  $2 \times 10^8 \text{ UFC/mL}$  a  $20^\circ\text{C}$  para *H. guilliermondii* en jugos de uva, y un aumento de su biomasa de  $1 \times 10^5$  a  $1 \times 10^7$ -  $1 \times 10^8 \text{ cel/mL}$  [149, 150]; y en el caso de *C. tropicalis* una concentración celular máxima de  $1 \times 10^7 \text{ UFC/mL}$  a  $37^\circ\text{C}$  [151]. Asimismo, se ha demostrado que especies no pertenecientes al género *Saccharomyces* como: *Hanseniaspora*, *Candida*, *Pichia* y *Metschnikowia*, pueden alcanzar poblaciones de  $10^7 \text{ UFC/mL}$  o incluso más en las primeras etapas de la fermentación alcohólica [152], cifras alcanzadas en la presente investigación.

La producción de alcohol por las levaduras está ligada a la producción de biomasa, ya que el etanol se produce para mantener el balance redox celular y generar ATPs para su crecimiento [43], es por eso, que las levaduras durante la fase logarítmica utilizan la glucosa para generar etanol durante la fermentación [153]. Una vez que se llega a la fase estacionaria, se recomienda detener la fermentación porque la producción de etanol disminuye al no haber aumento de crecimiento celular, además se ha calculado que las células en división elaboran etanol 33 veces más rápido, en comparación con células sin

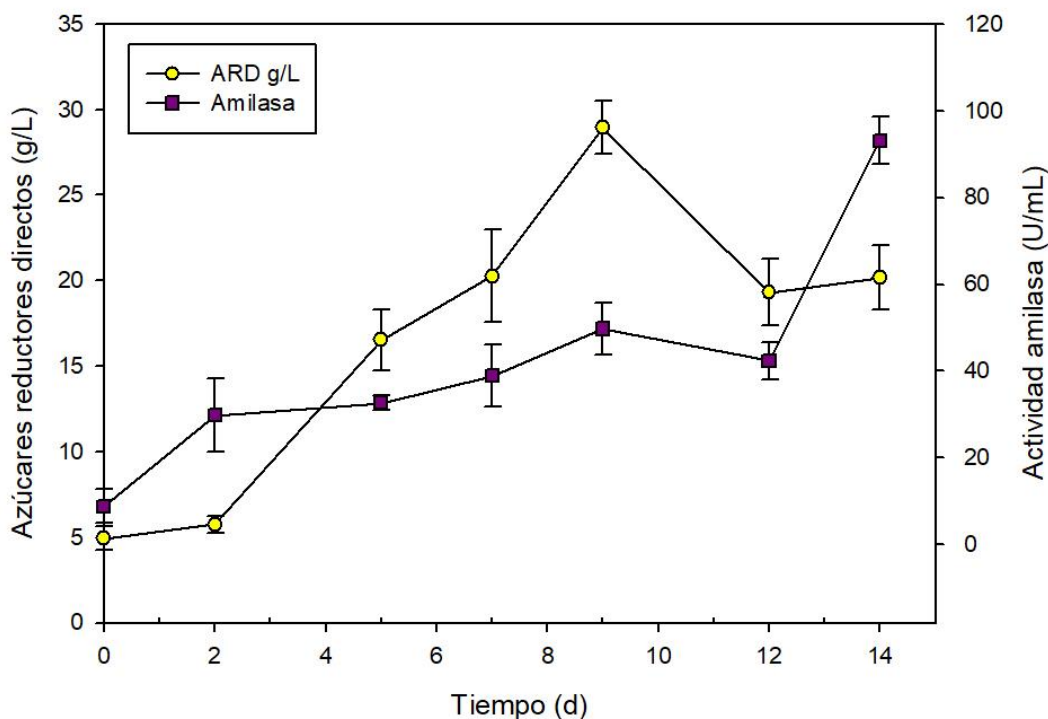


duplicación o reproducción [35, 43, 153]. Por lo tanto, la fermentación activa de los aislados de levaduras sería de 16 h para PL-1 y TL-2, 20 h y 24 h para TL-3 y RSL-3, respectivamente.

### **3.6 Cinética de liberación de azúcares reductores por *Trametes hirsuta* Bm-2 y RT-1**

La capacidad amilolítica de *T. hirsuta* RT-1 que se comprobó, anteriormente, de forma cualitativa, se cuantificó en harina de semillas de *B. alicastrum*, se midió la actividad  $\alpha$ -amilasa y se cuantificaron los azúcares reductores producidos. En la figura 3.12, se observa que la mayor liberación de azúcares reductores ocurrió en el día 9 con 28.95 g/L, para después decrecer conforme avanzó el tiempo, debido al consumo de los ARD por el hongo. Este resultado es comparable con el obtenido por Olguin *et al.* quienes utilizaron el hongo *T. hirsuta* Bm-2 sobre el mismo sustrato, que produjo la mayor concentración de ARD (30 g/L) en el día 8.

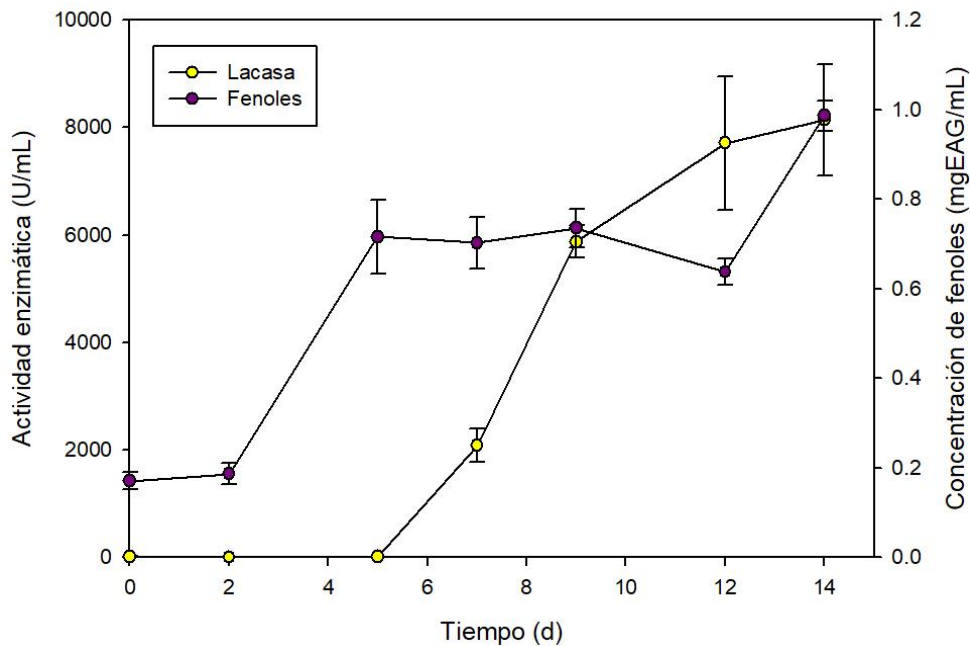
En cuanto a la producción de  $\alpha$ -amilasa, se detectó actividad enzimática desde el inicio del ensayo con 8.9 U/mL, debido a que en las semillas se pueden encontrar enzimas como la  $\beta$ - y  $\alpha$ -amilasa [154]. Una vez inoculado el hongo, la actividad de la  $\alpha$ -amilasa aumentó, ya que su síntesis es inducida en la presencia de almidón o maltosa de la suspensión de harina de semilla de ramón, lo que provocó que el hongo liberara una pequeña cantidad de  $\alpha$ -amilasas, que hidrolizaron el almidón parcialmente a productos solubles (como la maltosa), para posteriormente inducir una mayor producción de la enzima [117, 156]. El primer pico de actividad enzimática de la  $\alpha$ -amilasa, se presentó en el día 9 con 49.77 U/mL y coincidió con la mayor concentración de ARD liberados por el hongo; después, la actividad disminuyó, probablemente debido a una alta concentración de glucosa la que actuó como represor catabólico en la síntesis de la enzima [117, 156, 157]; una vez que bajó la concentración de ARD, la glucosa dejó de ser un represor, lo que provocó que la enzima alcanzara su máxima actividad en el día 14 con 93.15 U/mL. La detección de la actividad enzimática en la cinética concordó con Pérvez *et al.* [155], quienes mencionan que la producción de amilasas fúngicas se presenta entre los días 3-7 de incubación pudiendo extenderse hasta el día 15.



**Figura 3.12** Cinética de liberación de azúcares reductores y actividad  $\alpha$ -amilasa de *T. hirsuta* RT-1 en harina de semillas de ramón a 32 °C

Olguin *et al.* [11] reportaron una actividad  $\alpha$ -amilasa de *T. hirsuta* Bm-2 de 135 U/mL sobre a harina de semillas de ramón, se esperaba que RT-1 mostrara una actividad similar, sin embargo, la actividad de la enzima fue menor (49.77 U/mL). Esta diferencia se debe a que son distintas cepas, y la producción y especificidad de las enzimas al almidón, amilosa y amilopectina, varían dependiendo de cada microorganismo, incluso entre miembros del mismo género, especie y cepa [156,158]. Otros parámetros que afectan la producción de la  $\alpha$ -amilasa son pH, temperatura, fosfato, fuentes de carbono y nitrógeno del medio, la edad del inóculo, y la fuente de aislamiento [156].

Se midió la actividad lacasa y concentración de fenoles, figura 3.13, debido a que las semillas de *B. alicastrum* además de poseer fibra, minerales, vitaminas, entre otros, contiene compuestos fenólicos como ácido gálico, ácido p-hidroxibenzóico, ácido vanílico, ácido caféico, ácido p-coumárico y ácido clorogénico [159, 160]; estos compuestos fenólicos, pueden inducir la producción de lacasas o funcionar como mediadores redox de origen natural para esta enzima [72, 161].

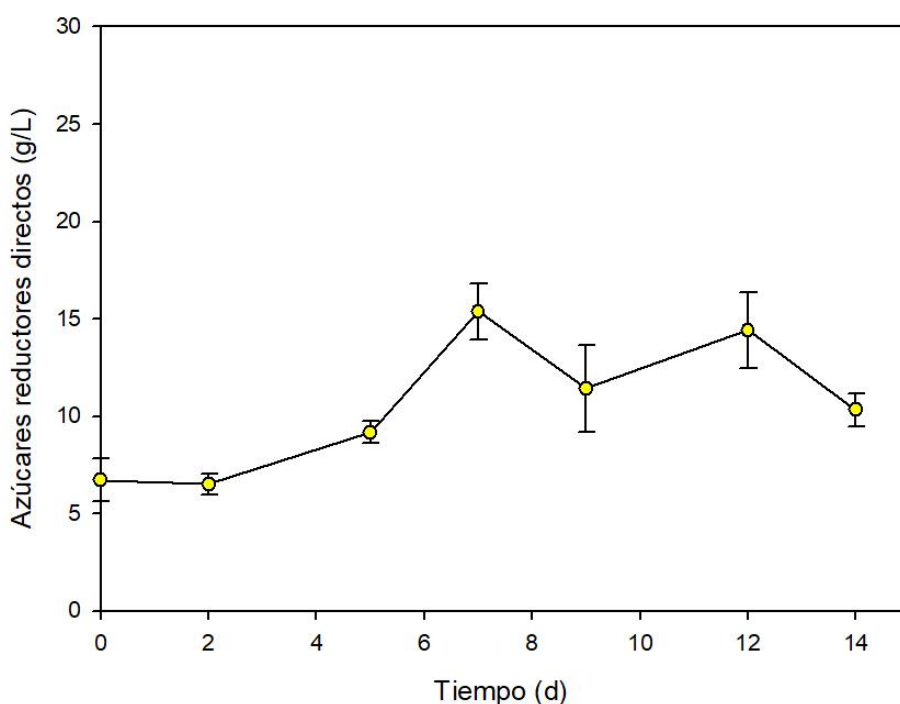


**Figura 3.13** Actividad lacasa de *T. hirsuta* RT-1 y concentración de fenoles en harina de semillas de ramón a 32 °C

La razón por la que se cuantificó la enzima lacasa es que juega un papel importante en el proceso de sacarificación en la harina de semillas de ramón porque desintegra, junto con otras enzimas producidas por el hongo, la matriz fibroprotéica que envuelve a los gránulos de almidón, permitiendo su liberación y exposición a las amilasas [11]; a la par se midió la concentración de fenoles por su implicación en la inducción de la síntesis de la enzima. En la figura 3.13, se observa que la actividad lacasa coincidió en el día 5, en el cual hubo un aumento en la concentración de los fenoles contenidos en la semilla de harina de ramón, lo que sugirió su actuación como inductores de la enzima; Tapia-Tussell *et al.* [72] reportaron que compuesto fenólicos, entre ellos el ácido vanílico (presente en la harina semillas de ramón) funcionan como inductores en la síntesis de lacasa en la especie de *T. hirsuta* Bm-2. Posteriormente, se observa que la actividad aumentó, mientras que la concentración de fenoles se mantuvo y después disminuyó, propablemente porque el hongo puede usar estos compuestos fenólicos como fuente de carbono [163]. Por último, se advirtió que la actividad lacasa alcanzó en el día 14 la mayor actividad 8,920 U/mL junto con la mayor concentración de fenoles. El aumento en la concentración de fenoles en la harina de semillas de ramón, podría deberse a que los fenoles son liberados por otras enzimas extracelulares como hidrolíticas de proteínas, carbohidratos y lípidos, ya que los fenoles además de encontrarse

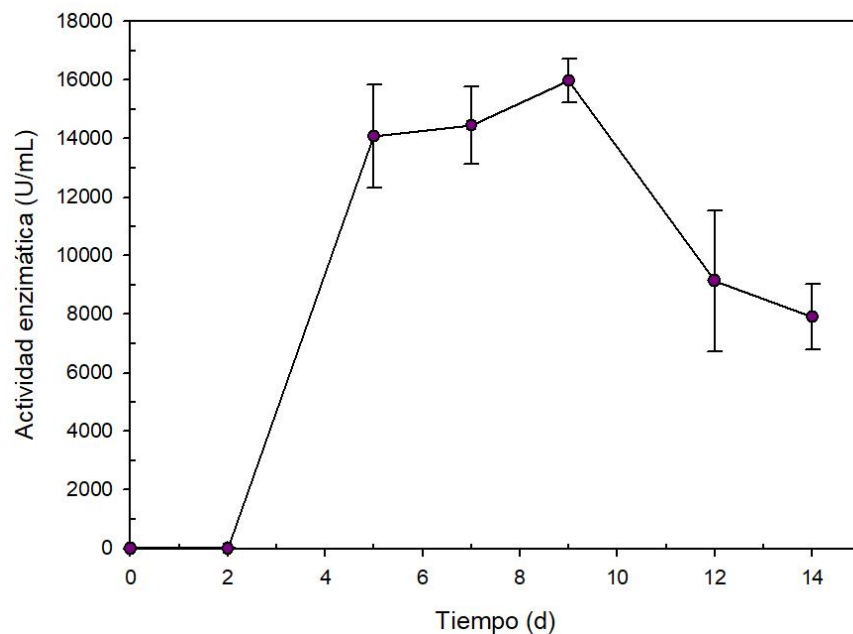
en la fibra (lignina, hemicelulosa y celulosa), pueden estar asociados a carbohidratos simples o complejos y lípidos [162]; además Olguin *et al.* [11 ] reportaron que *T. hirsuta* Bm-2 podía hidrolizar la fibra insoluble presente en la harina de semillas de ramón por la producción de celulasas. Una vez liberados los fenoles la lacasa los utilizó como mediadores, los cuales se difundieron para poder oxidar otros compuestos, y de esta manera, actuando sinérgicamente con otras enzimas extracelulares, destruir macromoléculas [194, 195], en la presente investigación la matriz protéica que envuelve a los gránulos de almidón de la harina de semillas de ramón.

Por otro lado, se realizó la cinética de liberación de ARD del hongo *T. hirsuta* Bm-2 para corroborar si su capacidad amilolítica seguía siendo igual a la reportada por Olguin *et al.* (30 g/L) en el bioproceso consolidado, sin embargo, el Bm-2 en esta investigación solamente alcanzó un máximo de 15.4 g/L de ARD en el séptimo día, figura 3.14.



**Figura 3.14** Cinética de liberación de azúcares reductores por *T. hirsuta* Bm-2 en harina de semillas de ramón a 32 °C

Igualmente, se cuantificó la actividad lacasa (figura 3.15) teniendo una máxima actividad enzimática en el día 9 con 15,981.48 U/mL. La menor producción de ARD por Bm-2 puede deberse a la producción de lacasa, ya que, al cuantificar la producción de enzimas del extracto enzimático, producido por este hongo en un reactor agitado con aire tipo Airlift; se detectó una disminución en la actividad  $\alpha$ -amilasa, pero un incremento en la actividad lacasa [164]; estos resultados concordaron con los de Zhang *et al.* [127], quienes reportaron una disminución en la actividad amilasa y un aumento de lacasa cuando *T. hirsuta* SSM-3 se co-cultivó con la levadura *Sporidiobolus pararoseus* SSM-8. El cambio observado en el comportamiento de Bm-2 pudo deberse a su resiembra periódica, la cual incrementa el riesgo de inducir variaciones genéticas en la cepa [91].



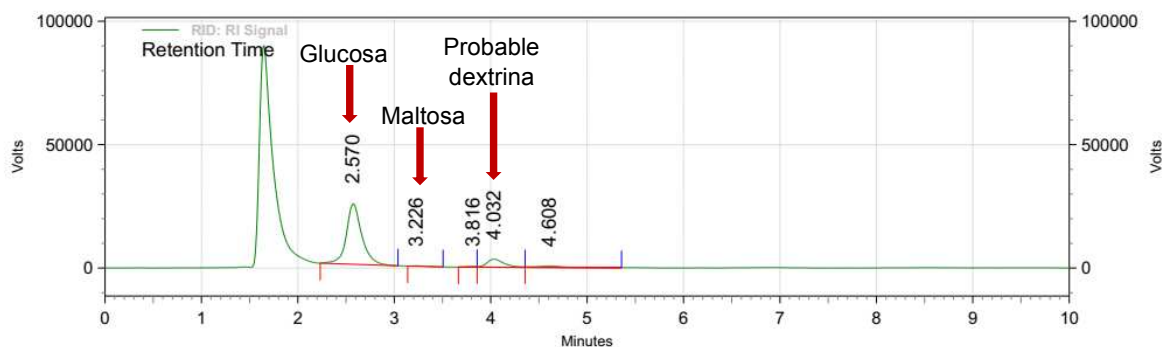
**Figura 3.15** Actividad lacasa en harina de semillas de ramón por *T. hirsuta* Bm-2 a 32 °C

Al final de esta etapa, y por los resultados obtenidos con ambas cepas de *T. hirsuta*, se decidió utilizar sólo la cepa *T. hirsuta* RT-1 para la estrategia de SCFS, ya que presentó una mayor cantidad de ARD que estarán disponibles para su transformación a etanol por la levadura.

### 3.7 Estrategias de sacarificación y cofermentación simultánea

Antes de proceder a la SCFS se agregaron en matraces Erlenmeyer 100 mL de una suspensión de harina de semillas de ramón al 14 % (con un contenido de humedad inicial de 8.9%); si a los 14 g se le resta el contenido de humedad, se obtiene un total de 12.76 g de los cuales el 63 % corresponde a la fracción amilácea (8.04 g). Para calcular la cantidad de glucosa teórica del proceso de hidrólisis, se asumió que 1 g de almidón equivale a 1.11 g de glucosa [102], y que se deberían de producir 89.2 g/L de glucosa. Por triplicado se inocularon los matraces, con la suspensión al 14%, con la cepa RT-1 para la hidrólisis de la harina de semillas de ramón.

Previamente, en la cinética de liberación de ARD, se observó que en condiciones estáticas se obtenían 28.75 g/L de ARD, el cual representó un 32.23 % de la hidrólisis teórica. Por esta razón, se procedió a agitar los matraces (previamente inoculados con RT-1) a 150 rpm a  $32 \pm 2$  °C por 24 h del día 7 al 8 de incubación, se tomaron las muestras y se analizaron por HPLC. Los carbohidratos iniciales, figura 3.16, fueron glucosa (en mayor proporción), maltosa y probablemente dextrinas, lo que difiere de lo reportado por Jiménez Villarreal en 2019, quien utilizando el mismo sustrato, amilasas comerciales y ultrasonido obtuvo glucosa, sacarosa y dextrinas [104]; esta diferencia podría deberse a que el hongo consumió la sacarosa presente en la harina de semillas de ramón. El análisis de los productos de la sacarificación, indicaron la presencia de enzimas del complejo amilasa como la  $\alpha$ -amilasa (EC 3.2.1.1) y glucoamilasa (EC 3.2.1.3), las que trabajan de forma sinérgica para hidrolizar el almidón en unidades de glucosa [117, 166].



**Figura 3.16** Identificación de carbohidratos en la harina de semillas de ramón hidrolizada por *T. hirsuta* RT-1

La agitación de la suspensión de la harina de semillas de ramón durante 24 hrs, después del séptimo día de incubación del hongo, fue muy adecuada, ya que no sólo disminuyó su viscosidad (figura 3.17) sino que también incrementó la concentración de glucosa a 39.78 g/L, en promedio, lo que representó un 44.59% de hidrólisis teórica (sin tomar en consideración la cantidad de glucosa utilizada por el hongo para la producción de biomasa).

El aumento en el porcentaje de hidrólisis pudo deberse a que la agitación a baja velocidad mejoró la homogenización de la enzima, la interacción enzima-sustrato [167], y asimismo favoreció la distribución de nutrientes y oxígeno, lo que permitió obtener una mayor producción de metabolitos primarios como las amilasas [168]. Aunque, los efectos de la agitación sobre la actividad de la  $\alpha$ -amilasa aún no se han estudiado en profundidad, los resultados obtenidos son semejantes a los observados por Farid *et al.*, quienes registraron que con una agitación de 200-300 rpm, se obtenía la máxima concentración de glucosa, y con una agitación de 150-200 rpm la mayor cantidad de enzimas  $\alpha$ -amilasa y glucoamilasa [169].



**Figura 3.17** Harina de semillas de ramón agitada a 150 rpm por 24 h a 32 °C

A pesar del beneficio de la agitación, el 55.41% de la suspensión de harina de semillas de *B. alicastrum* no fue hidrolizada, lo que significa un paso limitante en el proceso, pues la producción de etanol depende de la obtención de cantidades altas de ARD que serán convertidos a alcohol por las levaduras [118, 170]. La baja tasa de hidrólisis puede ser atribuida a diversas causas como la capacidad amilolítica de la cepa de *T. hirsuta* utilizada, así como a la producción y actividad enzimática. Por ejemplo, aunque la producción de  $\alpha$ -

amilasas se relaciona con la temperatura óptima de crecimiento y formación de micelio, estas condiciones no necesariamente son las mismas para obtener la máxima producción enzimática [156, 171, 172]; asimismo, la síntesis de las enzimas es regulada por represión catabólica cuando la glucosa está presente en el medio [117, 173].

En cuanto a la actividad enzimática, la tasa de hidrólisis de la  $\alpha$ -amilasa depende de factores como temperatura, pH, naturaleza y concentración del sustrato y enzima, y la presencia de iones de calcio [171]. En un estudio realizado por Roldán *et al.* se observó que la velocidad de agitación (0, 50, 250, 500, 1000 and 1500 rpm) producía cambios en la estructura secundaria de la  $\alpha$ -amilasa y una tendencia negativa al aumentar la velocidad de agitación en la actividad enzimática [167]. Asimismo, las enzimas pueden desnaturalizarse o sufrir proteólisis por la interacción con otros compuestos en el medio de fermentación (fenoles, glucosa, etanol) [167, 168, 172]. Otro factor importante a considerar, es la relación de las enzimas  $\alpha$ -amilasa y amiloglucosidasa en la hidrólisis del almidón, porque, si bien trabajan de forma conjunta, pueden ser factores limitantes en el proceso [117, 166, 174].

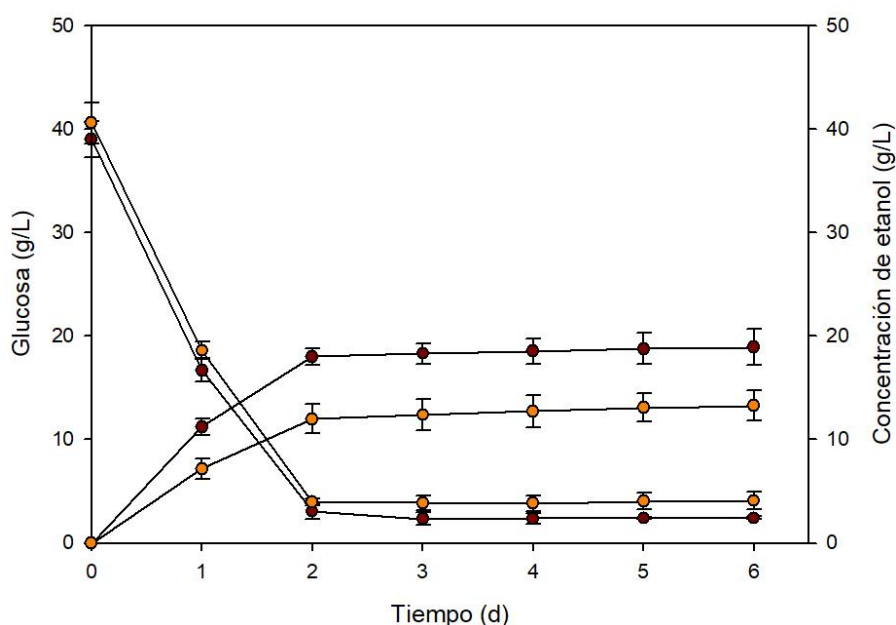
Otros factores ajenos a las enzimas, provienen del almidón, el cual, al momento de gelatinizarse, presenta la retrogradación (recristalización) y la posible formación de complejos de inclusión de las cadenas de amilosa con los ácidos grasos presentes, fenómenos que producen una resistencia a la degradación enzimática [167]. Igualmente, la viscosidad genera problemas en la dispersión del almidón y las enzimas, resultando en una hidrólisis incompleta [42].

Esto conduce a la necesidad imperativa de optimizar la etapa de licuefacción y sacarificación de la harina de semillas de ramón. Algunas medidas que se pudieran realizar son: aumentar la concentración de la enzima, lo cual tiene un efecto positivo en la hidrólisis, la adición de surfactantes que incrementan la excreción de proteínas al aumentar la permeabilidad de la membrana celular [167, 175]; o agregar iones de  $\text{Ca}^{+2}$  que se encargan del doblamiento y estabilidad de la enzima [171] y que tal vez no se encuentre en cantidades suficientes en las semillas de *B. alicastrum*. Igualmente, se pudiera utilizar el hongo como fuente de un extracto enzimático sin su inclusión en la etapa de hidrólisis; así como estudiar si resulta benéfico modificar el tiempo de inoculación de la levadura pues Farid *et al.* observaron que el tiempo de inoculación de la levadura *S. cerevisiae*, con respecto al hongo *Aspergillus awamori* tenía un impacto en la producción de etanol, pues cuando se agregaba



72 h después de la inoculación del hongo, este aumentaba, a diferencia de cuando se inoculaban juntos desde el inicio del proceso en el almidón [169].

Para la fase fermentativa se inocularon de forma independiente las levaduras *C. tropicalis* PL-1 y *H. guilliermondii* TL-3 con una concentración del inóculo de  $1 \times 10^6$  cel/mL, y la concentración inicial de glucosa fue de 38.99 g/L para PL-1 y 40.58 g/L para TL-3. La fermentación se llevó a cabo en forma estática, en oscuridad y a  $32 \pm 2^\circ$  C; las muestras se tomaron cada 24 h durante todo el proceso y se analizaron por medio de HPLC. Como se observa en la figura 3.18, el mayor consumo de glucosa se dio en los primeros dos días del proceso fermentativo hasta llegar a una fase donde el consumo de glucosa fue mínimo. La levadura *C. tropicalis* PL-1 utilizó el 93% de glucosa mientras que *H. guilliermondii* TL-3 el 89.92 %, esto sin tomar en consideración la cantidad utilizada para la producción de biomasa, con una glucosa residual de 2.41 g/L y 4.09 g/L, respectivamente.



**Figura 3.18** Fermentación de la glucosa presente en el hidrolizado de la harina de semillas de ramón por *C. tropicalis* PL-1 (rojo) y *H. guilliermondii* TL-3 (naranja)

En cuanto a la producción de etanol se observa en la figura 3.18 que este correspondió con el consumo de glucosa, pues la mayor producción de etanol se presentó durante los primeros dos días, y un aumento leve al término de la fermentación. Por lo tanto, la fermentación puede ser detenida en el día 3, estos resultados concordaron con lo reportado

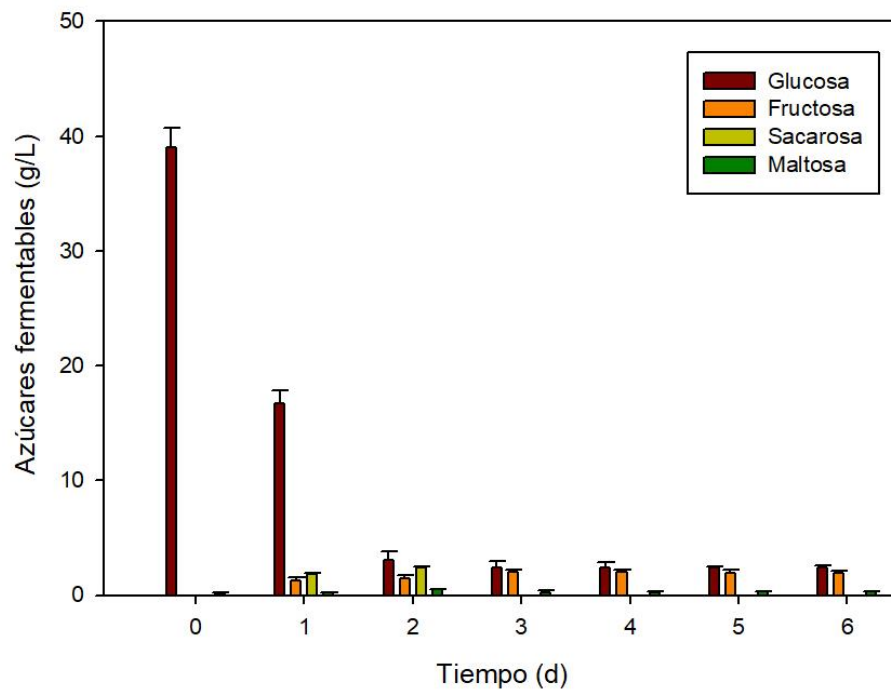
para el tiempo ideal de una fermentación que es de 48-72 h y que la productividad de etanol decrece cuando el tiempo aumenta de 72 a 96 h [42].

Durante la fermentación alcohólica, alrededor del 95% de los azúcares solubles son convertidos a etanol y CO<sub>2</sub>, pues también se elaboran otros productos como la biomasa celular y glicerol [42]. La producción de etanol obtenida en esta investigación para *C. tropicalis* PL-1 y *H. guilliermondii* TL-3 fue de 18.93 g/L (2.4 % [v/v]) y 13.26 g/L (1.68 % [v/v]), con una eficiencia de fermentación del 95.03% y 63.96%, respectivamente, y diferentes estadísticamente. El pH de las fermentaciones varió durante el transcurso de la fermentación, pues se inició con un pH de 5.45 y se concluyó con un pH de 4.6; lo cual no supone una fuente de estrés ya que la mayoría de los medios utilizados para la producción de bioetanol tienen un pH de 4.5-5.5 [47].

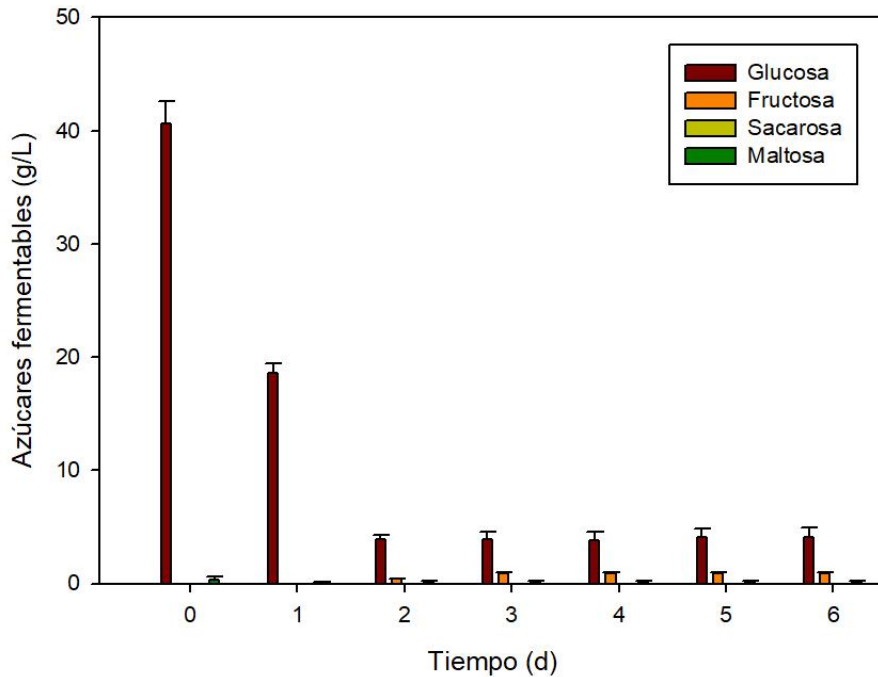
Los resultados indican que *C. tropicalis* PL-1 fue más eficiente en la producción de etanol que *H. guilliermondii* TL-3, pues a pesar de que consumió el 89.92% de la glucosa, esto no se vio reflejado en la producción de etanol lo que sugiere su utilización en otra ruta metabólica. Las diferencias pueden deberse a que la capacidad de fermentación difiere para las distintas especies y cepas de levaduras, en parte por su genotipo y sus requerimientos nutricionales, haciéndose las discrepancias más evidentes en condiciones de estrés donde las levaduras tienen que adaptarse al nuevo ambiente [176, 177]. Sin embargo, existen más causas que pueden afectar la fermentación como: una alta concentración de azúcares, temperaturas extremas, completa anaerobiosis, deficiencias en nutrientes, concentración de etanol, presencia de ácidos grasos de cadena mediana, entre otros [179], cuyos efectos individuales y los posibles sinérgicos hacen que sea difícil encontrar la causa que afecta la fermentación [177]. En el caso de *H. guilliermondii* TL-3, una posible razón que pudo afectar la fermentación es su baja termotolerancia pues no crece a más de 37 °C, además es probable que la viscosidad del medio de harina de semillas de *B. alicastrum* haya afectado la difusión y disipación térmica [178], causando un aumento en la temperatura, la que, junto con el etanol tienen un efecto sinérgico, pues los daños provocados en la levadura por estos dos factores se hacen más severos con la presencia de etanol a temperaturas altas, y la síntesis de las proteínas de choque térmico (HSP por sus siglas en inglés), para lidiar con este estrés, depende de la habilidad de la levadura [134, 176]; además de que el género *Hanseniaspora* posee habilidades fisiológicas limitadas y requiere de un suministro externo de vitaminas [48] y aunque las

semillas de ramón contienen vitaminas A y del complejo B, probablemente no en la cantidad suficiente o sean las necesarias para la levadura.

Además de analizar el consumo de glucosa, también se detectó la presencia de otros carbohidratos en el transcurso de la fermentación, como se observa en la figura 3.19 y 3.20 que son: glucosa, fructosa, sacarosa y maltosa.



**Figura 3.19** Identificación de azúcares durante la fermentación con *C. tropicalis* PL-1



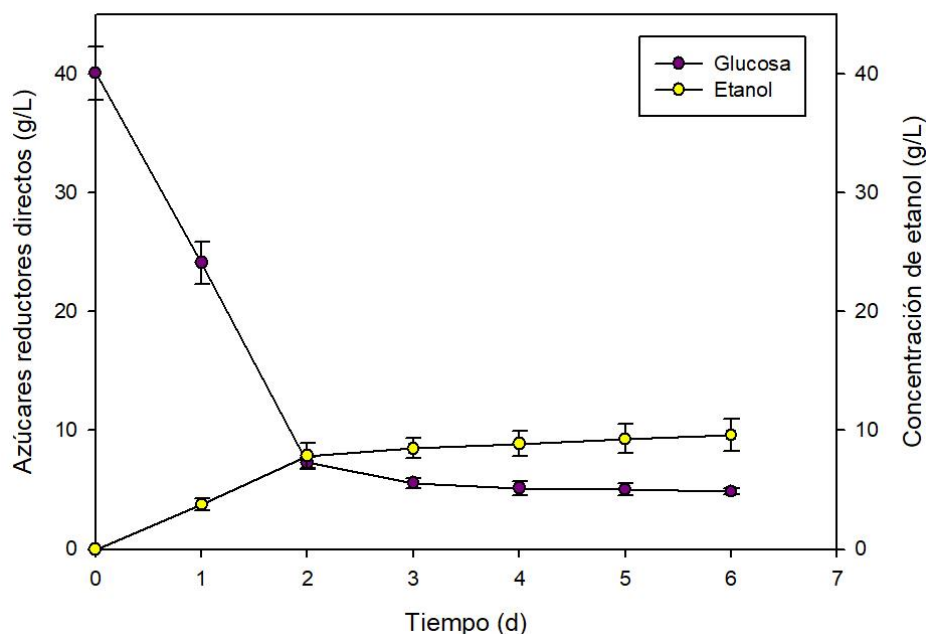
**Figura 3.20** Identificación de azúcares durante la fermentación con *H. guilliermondii* TL-3

La ausencia de sacarosa y fructosa al inicio de la fermentación puede atribuirse al metabolismo de las levaduras pues no fueron encontrados cuando sólo se encontraba *T. hirsuta* RT-1. Ambas levaduras iniciaron con glucosa y maltosa, sin embargo, al transcurrir la fermentación con *C. tropicalis* PL-1 aparecieron la fructosa y sacarosa, la desaparición de la última, probablemente debido a la síntesis de la enzima invertasa ( $\beta$ -fructofuranosidasa) que cataliza la hidrólisis de la sacarosa en fructosa y glucosa [182]; en el caso de TL-3 no hay presencia de sacarosa, sin embargo, también se detectó la fructosa al avanzar en el proceso fermentativo. La aparición de estos carbohidratos pudo deberse a que en el análisis de la composición de azúcares de la semilla de *B. alicastrum* se ha detectado la presencia de fructosa, lactosa, sacarosa, glucosa y maltosa [85], además de lípidos y proteínas, los cuales pueden estar enlazados a carbohidratos [180]. Sin embargo, la diferencia del metabolismo presentado se debe a que la utilización de los oligosacáridos y polisacáridos y su hidrólisis a los monómeros constituyentes depende de la expresión de las hidrolasas apropiadas las cuales pueden estar taxonómicamente restringidas [181]. Por último, en la fermentación de ambas especies la maltosa no es consumida, en el caso de TL-3 es entendible porque no usa el disacárido; sin embargo, en PL-1, pudo deberse a que los primeros azúcares consumidos son la glucosa y sacarosa, pero la glucosa reprime la

asimilación de otros carbohidratos como la maltosa [43, 183]. El poco consumo de fructosa en ambas levaduras posiblemente esté relacionado con el hecho de que la fructosa y glucosa utilizan el mismo acarreador para entrar a la célula, pero este es más afín a la glucosa [183].

En cuanto a la presencia del hongo en el proceso fermentativo, se supuso que al momento de agregar la levadura el proceso se convertiría en una SCFS, sin embargo, debido a que el hongo tuvo una baja tolerancia al etanol y no lo produjo, es probable que se viera afectada su supervivencia. Por lo tanto, el proceso se convirtió en una sacarificación y fermentación secuencial, cuya ventaja radica en que la primera especie (hongo) inoculada puede llevar a cabo sus funciones metabólicas normales sin la influencia de la segunda especie (levadura) [184], teniendo ambos organismos las condiciones adecuadas para la producción tanto de enzimas amilolíticas, por el hongo, como de etanol para la levadura.

En la segunda estrategia, la concentración inicial (figura 3.21) fue de 40.10 g/L y final de 4.85 g/L de ARD, consumiéndose 87.91% de los azúcares, porcentaje menor en comparación con el consumido en la fermentación realizada con el hidrolizado sin diluir y sin la fuente de nitrógeno. La eficiencia del proceso fermentativo fue de 46.81 %, con una producción de etanol de 9.59 g/L [1.22 % (v/v)] que es estadísticamente diferente en comparación con el primer tratamiento con *C. tropicalis* PL-1. Aunque se esperaba que la producción fuera mayor, el bajo porcentaje de eficiencia pudo deberse a que cuando se añade agua para disminuir la viscosidad del medio, los azúcares se diluyen dando como resultado un menor rendimiento de etanol [42]. En un estudio por Manikandan y Viruthagiri investigaron el efecto de la relación C/N en la fermentación y observaron que la concentración de etanol en el medio decrecía cuando se incrementaba la concentración de nitrógeno [186]. Sin embargo, en el contexto de adición de fuentes asimilables de nitrógeno, los elementos críticos para optimizar el proceso son la cepa de levadura utilizada, sustrato, el tipo y tiempo de adición de la fuente de nitrógeno, temperatura y concentración inicial de glucosa [187]. Otra razón que podría explorarse, es que el micelio de *T. hirsuta* RT-1 fue sustraído, a diferencia de la primera estrategia y aunque este probablemente estuviese muerto por la concentración de etanol, pudo haber fungido como una fuente de nutrientes (proteínas y polisacáridos) para la levadura; por ejemplo, algunas levaduras producen  $\beta$ ,1-3 glucanasas que destruyen la pared celular de los hongos [185], y especies del género *Candida* tienen actividad proteolítica, pectinolítica y glucosidasa [181].



**Figura 3.21** Fementación de ARD presentes en la harina de semillas de ramón por *Candida tropicalis* PL-1

En conclusión, la baja producción de etanol se debió a la poca disponibilidad de ARD en todos los procesos, por lo que es necesario aumentar la eficiencia de la licuefacción y la sacarificación. No obstante, la hidrólisis biológica del sustrato, en lo que a la conversión enzimática (licuefacción y sacarificación) se refiere, representa un ahorro en la producción de bioetanol, ya que representan uno de los obstáculos tecno-económicos más importante para la producción de este biocombustible [174]. Para posteriores estudios, se sugiere el uso de *C. tropicalis* PL-1 debido a la mayor producción de etanol determinada en la presente investigación; a que posee la capacidad de metabolizar una gran variedad de fuentes de carbono incluyendo azúcares, fenoles, alcanos y sus derivados, y ácidos grasos [188]; además de que se ha propuesto como una especie potencial para la producción comercial de bioetanol [57, 111, 189, 190, 191]. Sin embargo, una vez que se aumenten los ARD es necesario que se investigue si se deben ajustar parámetros en el proceso fermentativo con el fin de optimizarlo. Se debe poner especial atención en la relación C/N [187] ya que esto asegura el buen desempeño metabólico de la levadura y por lo tanto en la eficiencia de la fermentación. La cantidad de etanol producida por PL-1 de 18.93 g/L fue mayor a la obtenida por Olguin *et al.* en el BPC con la especie *T. hirsuta* Bm-2 que fue de 13 g/L, lo que demuestra que la hidrólisis del almidón y fermentación secuencial utilizando dos

especies de microorganismos produce mayores rendimientos que el usar una sola especie. Asimismo, al utilizar los aislados *T. hirsuta* RT-1 + *C. tropicalis* PL-1 se produjo mayor cantidad de etanol que en la fermentación secuencial utilizando la misma levadura, pero con la cepa *T. hirsuta* Bm-2 donde se produjeron 15.6 g/L, lo que indica la probable interacción negativa de las especies debido a que en teoría se debió de producir más alcohol ya que ambas especies tienen capacidad fermentativa.

## CONCLUSIONES

- En este estudio se demostró el antagonismo bilateral de *T. hirsuta* de Bm-2 y RT-1 lo que anuló su posible uso simultáneo en la hidrólisis de la semilla de harina de ramón.
- Las levaduras presentaron características deseables de termotolerancia (37-42 °C) y tolerancia moderadamente alta a etanol que posibilitan su uso en la producción de bioetanol, así como la capacidad amilolítica de *C. tropicalis* PL-1.
- Se demostró que la cepa *T. hirsuta*, RT-1 es diferente en cuanto a su tolerancia a etanol, crecimiento a distintas temperaturas y capacidad amilolítica en comparación con la cepa de la misma especie, *T. hirsuta* Bm-2, probablemente debido a las distintas fuentes de aislamiento.
- Se evidenció la producción de amilasas y lacasas extracelulares en la sacarificación del almidón de la harina de semillas de ramón, habilitándolo como candidato para posteriores estudios relacionados con hidrólisis biológica de almidón, en material lignocelulósico, así como su uso en un BPC y la producción de extractos enzimáticos.
- El proceso se transformó en una sacarificación y fermentación secuencial, en vez de una SCFS debido a que la cepa *T. hirsuta* RT-1 mostró poca tolerancia a etanol y no presentó capacidad fermentativa.
- Se demostró que la estrategia de sacarificación y fermentación secuencial con dos organismos produce mayores rendimientos que una sola especie, lo que posibilita su uso para la producción de bioetanol.



## **PERSPECTIVAS**

Estudiar el aumento de la hidrólisis de almidón al disminuir en distintos porcentajes la carga de harina de semillas de ramón.

Investigar la producción de un coctel enzimático utilizando la harina de semillas de ramón.

## BIBLIOGRAFÍA

- [1] Pérez Pariente, J. (2016). *Biocombustibles. Sus implicaciones energéticas, ambientales y sociales* (1ra edición), Cd. de México, México: Fondo de Cultura Económica.
- [2] Antoni, D., Zverlov, V.V. y Schwarz, W.H. (2007). Biofuels from microbes. *Applied microbiology and biotechnology*, 7, pp 23-35. doi: 10.1007/s00253-007-1163-x
- [3] Aguilar Sánchez, P., Navarro Pineda, F. S., Sacramento Rivero, J. C., y Barahona Pérez L. F. (2017). Life-cycle assessment of bioethanol production from sweet sorghum stalks cultivated in the state of Yucatan, Mexico. *Clean technologies and environmental policy*, 20, pp 1685-1696. doi.org/10.1007/s10098-017-1480-4
- [4] Ruíz, H.A., Martínez, A. y Vermerris, W. (2016). Bioenergy potential, energy crops, and biofuel production in México. *Bioenergy research*, 9, pp 981-984. doi 10.1007/s12155-016-9802-7
- [5] Diario Oficial de la Federación. (2008). Ley de promoción y desarrollo de los bioenergéticos. Recuperado el 18 de diciembre de 2018 de: <http://www.diputados.gob.mx/LeyesBiblio/pdf/LPDB.pdf>
- [6] Tauro, R., Serrano Medrano, M. y Maserá, O. (2018) Solid biofuels in Mexico: a sustainable alternative to satisfy the increasing demand for heat and power. *Clean technologies and environmental policy*, 20, pp 1527-1539. doi.org/10.1007/s10098-018-1529-z
- [7] Galicia Medina, C. M.<sup>†</sup>, Barrios Estrada, C.<sup>†</sup>, Esquivel Hernández, D.A., Rostro Alanís, M.J., Torres Antonio, J. y Parra Saldívar, R. (2017). Current state of bioethanol fuel blends in Mexico. *Biofuels, bioproducts and biorefining*, 12, pp 338–347. doi: 10.1002/bbb.184
- [8] Olguin Maciel, E., Larqué Saavedra, A., Pérez Brito, D., Barahona Pérez, F., Alzate Gaviria, L., Toledano Thompson, T., Lappe Oliveras, P.E., Huchin Poot, E. y Tapia Tussell, R. (2017). *Brosimum alicastrum* as a novel starch source for bioethanol production. *Energies*, 10 (1574), pp 1-10. doi:10.3390/en10101574
- [9] Pérez Pacheco, E., Moo Huchin, V.M., Estrada León, R.J., Ortiz Fernández, A., May Hernández L.H., Ríos Soberanis, C.R. y Betancur Ancona, D. (2013). Isolation and characterization of starch obtained from *Brosimum alicastrum* Swartz seeds. *Carbohydrate polymers*, 101, pp 920-927. doi: 10.1016/j.carbpol.2013.10.012

- [10] Huchin-Poot, E.G. (2015). Aislamiento de la microbiota del fruto de *Brosimum alicastrum* Swartz para su uso en la producción de bioetanol. Tesis de Maestría en Energía Renovable, CICY, México.
- [11] Olguin-Maciél, E., Larqué-Saavedra, A., Lappe-Oliveras, P. E., Barahona-Pérez, L. F., Alzate-Gaviria, L., Chablé-Villacis, R. y 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. doi:10.3390/microorganisms7110483
- [12] González Ávila, M.E. (2009). Producción de bioenergía en el norte de México: tan lejos y tan cerca...*Frontera norte*, 21 (41), pp 177-183.
- [13] San Miguel, G. y Gutiérrez F. (2015). *Tecnologías para el uso y transformación de biomasa energética* (3ª edición). Madrid, España: Ediciones Mundi-Prensa.
- [14] Bajpai, P. (2013). *Advances in bioethanol* (1<sup>st</sup> edition). Patiala, India: Springer New Delhi. doi: 10.1007/978-81-322-1584-4
- [15] Baeyens, J., Kang, Q., Appels, L., Dewil, R., Yongqin, L. y Tianwei, T. (2015). Challenges and opportunities in improving the production of bio-ethanol. *Progress in energy and combustion science*, 47, pp 60-88. doi.org/10.1016/j.pecc.2014.10.003
- [16] Alalwan, H.A., Alminshid A.H. y A.S. Aljaafari, H. (2019). Promising evolution of biofuel generations. Subject review. *Renewable energy focus*, 28 (00), pp 127-139. <https://doi.org/10.1016/j.ref.2018.12.006>
- [17] Lennartsson, P.R., Erlandsson, P. y Taherzadeh, M. (2014). Integration of the first- and second-generation bioethanol processes and the importance of by-products. *Bioresource technology*, 165, pp 3-8. doi.org/10.1016/j.biortech.2014.01.127
- [18] Biofuel. (2010). Biofuels, the fuel of the future. Recuperado el 29 de marzo de 2019 de: <http://biofuel.org.uk/>
- [19] Carriquiry, M.A., Du, X. y Timilsina, G.R. (2011). Second generation biofuels: economics and policies. *Energy policy*, 39, pp 4222-4234. doi:10.1016/j.enpol.2011.04.036
- [20] Lee, R.A. y Lavoie, J.M. (2013). From first-to third-generation biofuels: challenges of producing a commodity from a biomass of increasing complexity. *Animal frontiers*, 3 (2), pp 6-11. doi:10.2527/af.2013-0010

- [21] Fan, M., Zhang, S., Ye, G., Zhang, H. y Xie, J. (2018). Integrating sugarcane molasses into sequential cellulosic biofuel production based on SFF process of high solid loading. *Biotechnology for biofuels*, 11(329), pp 1-9. doi: 10.1186/s13068-018-1328-0
- [22] Sillanpää, M. y Ncibi, C. (2017). *A sustainable bioeconomy. The green industrial revolution* (1<sup>st</sup> edition). Cham, Suiza: Springer International Publishing. doi: 10.1007/978-3-319-55637-6
- [23] Aro, E.M. (2016). From first generation biofuels to advanced solar biofuels. *The royal swedish academy of sciences*, 45 (1), pp 34-31. doi: 10.1007/s13280-015-0730-0
- [24] Vohra, M., Manwar, J., Manmode, R., Padgilwar, S. y Patil, S. (2014). Bioethanol production: feedstock and current technologies. *Journal of environmental chemical engineering*, 2, pp 573-584. doi: 10.1016/j.jece.2013.10.013
- [25] Renewable fuels association. (2020). Annual fuel ethanol production. U.S. and world ethanol production. Recuperado el 25 de marzo de 2020 de: <https://ethanolrfa.org/statistics/annual-ethanol-production/>
- [26] Pubchem, Open Chemistry Database. (2019). Ethyl- tert-butyl ether. Recuperado el 1 de abril de 2019 de: [https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Tert-Butyl\\_ethyl\\_ether#section=Top](https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Tert-Butyl_ethyl_ether#section=Top)
- [27] U.S. Department of Energy. (s.f.). Flex-fuel vehicles. Recuperado el 1 de abril de 2019 de: <https://www.fueleconomy.gov/feg/flextech.shtml>
- [28] Instituto Mexicano del Petróleo. (2017). Reporte de inteligencia tecnológica, "Bioetanol". Recuperado el 2 de abril de 2019 de: [https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/296708/IT\\_Bioetanol\\_01022018.pdf](https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/296708/IT_Bioetanol_01022018.pdf)
- [29] Diario Oficial de la Federación. (2016). NOM-016-CRE-2016, Especificaciones de calidad de los petrolíferos. Recuperado el 2 de abril de 2019 de: [http://www.dof.gob.mx/nota\\_detalle.php?codigo=5450011&fecha=29/08/2016](http://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5450011&fecha=29/08/2016)
- [30] Bertolini, A.C. (2010). *Starches* (1<sup>st</sup> edition). Florida, Estados Unidos de América: CRC Press.

- [31] Amagliani, L., O'Regan, J., Kelly, A.L., y O'Mahony, J.A. (2016). Chemistry, structure, functionality and applications of rice starch. *Journal of cereal science*, 70, pp 291-30. doi: 10.1016/j.jcs.2016.06.014.
- [32] Melo, V. y Cuamatzi, O. (2007). *Bioquímica de los procesos metabólicos*, 2ª edición. México, D.F.: Editorial Reverté, S.A.
- [33] Ruiz Avilés G. (2006). Obtención y caracterización de un polímero biodegradable a partir de almidón de yuca. *Ingeniería y ciencia*, 2 (4), pp 5-28.
- [34] Méndez Prieto, J., Rubio Hinojosa, C.U., Román Gutiérrez A.D., Méndez Marzo, M.A., González Ramírez, C.A. y Prieto García, F. (2009). Degradación física del almidón de cebada (*Hordeum sativum* Jess). Correlación entre la gelatinización y el tamaño de gránulos. *Multiciencias*, 9 (2), pp 115-125
- [35] Hernández Alicia, Alfaro, I. y Arrieta R. (2003). *Microbiología industrial* (1ª edición). San José, Costa Rica: Editorial Universidad Estatal a Distancia (EUNED).
- [36] Yongfeng, A. y Jay-lin, J. (2015). Gelatinization and rheological properties of starch. *Starch journal*, 67, pp 213-224. doi: 10.1002/star.20140020
- [37] Wang, S. y Copeland, L. (2013). Molecular disassembly of starch granules during gelatinization and its effect on starch digestibility: a review. *Food and function*, 4, pp 1564-1580. doi: 10.1039/c3fo60258c
- [38] Moradi, M., Shariati, P., Tabandeh F., Yakhchali, B., y Khaniki Bakshi, G. (2014). Screening and Isolation of powerful amyolytic bacterial strains. *International journal of current microbiology and applied sciences*, (3) 2, pp 758-768.
- [39] Jung, Y-s., Lee, B-H. y Yoo S-H. (2017). Physical structure and absorption properties of tailor-made porous starch granules produced by selected amyolytic enzymes. *Plos one*, (12) 7, pp 1-14. doi: 10.1371/journal.pone.0181372
- [40] Drapcho, C.M., Nhuan, N.P. y Walker, T.H. (2008). *Biofuels engineering process technology* (1<sup>st</sup> edition). Estados Unidos de América: The McGraw-Hill Companies, Inc., pp 3-370. doi:10.1036/0071487492

- [41] Bai, F.W., Anderson, W.A., Moo-Young, M. (2007). Ethanol fermentation technologies from sugar and starch feedstocks. *Biotechnology advances*, 26, pp 89-105. doi: 10.1016/j.biotechadv.2007.09.00
- [42] Zbed, H., Sahu, J.N., Suely, A., Boyce, A.N. y Faruq, G. (2017). Bioethanol production from renewable sources: current perspectives and technological progress. *Renewable and sustainable energy reviews*, 71, pp 475-501. doi: 10.1016/j.rser.2016.12.076
- [43] Walker, G.M. y Stewart, G.G. (2016). *Saccharomyces cerevisiae* in the production of fermented beverages. *Beverages*, 30(2), pp 1-12. doi: 10.3390/beverages2040030
- [44] Rastogi, M. y Shrivastava, S. (2017). Recent advances in second generation bioethanol production: An insight to pretreatment, saccharification and fermentation processes. *Renewable and sustainable energies reviews*, 80, pp 330-340. doi.org/10.1016/j.rser.2017.05.225
- [45] García Platero, J.M. (2006). *Biblioteca de recursos electrónicos de humanidades Excelencia para red de comunicaciones internet, la derivación*. Madrid, España: Liceus Servicios de Gestión.
- [46] You Y., Pengfei, L., Yang, X. y Jiang, J. (2017). Enhancement of ethanol production from green-liquor -ethanol-pretreated sugarcane bagasse by glucose-xylose cofermentation at high solid loadings with mixed *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Biotechnology for biofuels*, 10 (92). doi 10.1186/s13068-017-0771-7
- [47] Mohd Azhar, S.H., Abdulla, R., Azmah Jambo, S., Marbawi, H., Azlan Gansau, J., Mohd Faik, A.A. y Francis Rodrigues, K. (2017). Yeasts in sustainable bioethanol production: A review. *Biochemistry and biophysics report*, 10, pp 52-61. doi.org/10.1016/j.bbrep.2017.03.003
- [48] Starmer, W.T. y Lachance, M.A. (2011). Chapter 6 *Yeast ecology*. En En C.P. Kurtzman, J.W. Fell y T. Boekhout (5<sup>th</sup> edition), *The Yeasts. A taxonomic study* (pp 65-83). Amsterdam, Países Bajos: Elsevier.
- [49] Radecka, D., Mukherjee, V., Quintanilla Mateo, R., Stojiljkovic, M., Foulquié Moreno, M.R. y Thevelein, J.M. (2015). Looking beyond *Saccharomyces*: the potential of

nonconventional-yeasts species for desirable traits in bioethanol fermentation. *Federation of european microbiological societies*, 15 (6), pp 1-13. doi: 10.1093/femsyr/fov053

[50] Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. (s.f.). Distribución de las especies. Recuperado el 15 de abril de 2019 de: <https://www.biodiversidad.gob.mx/especies/distribesp.html>

[51] Herrera Ruiz, J. (2008). *Viaje al asombroso mundo de los hongos* (1ra edición). D.F., México: Fondo de Cultura Económica.

[52] Madigan, M.T., Martinko, J.M., Dunlap, P.V. y Clark, D.P. (2015). *Brock. Microbiología de los microorganismos* (14ª edición). Madrid, España: Pearson Educación, S.A.

[53] García, V. (2004). *Introducción a la microbiología* (2ª edición). San José, Costa Rica: Editorial Universidad Estatal a Distancia.

[54] Leader International Fungal Education. (s.f.). Fungal infections: *Candida tropicalis*. Recuperado el 20 de abril de 2019 de: <http://www.life-worldwide.org/fungaldiseases/candida-tropicalis1>

[55] Lachance, M.A., Boekhout, T., Scorzetti, G., Fell, J.W. y Kurtzman, P.C. (2011). Chapter 90 *Candida* Berkhout (1923). En C.P. Kurtzman, J.W. Fell y T. Boekhout (5th edition), *The Yeasts. A taxonomic study* (pp 1256-1258). Amsterdam, Países Bajos: Elsevier.

[56] Nakamura, L.K. (1970). Influence of the acceptor during transglucosylation by transglucosylamylase of *Candida tropicalis*. *Canadian journal of biochemistry*, 48, pp 1260-1267.

[57] Jamaï, L., Ettayebi, K., El Yamani, J. y Ettayebi, M. (2006). Production of bioethanol from starch from free and immobilized *Candida tropicalis* in the presence of  $\alpha$ - amylase. *Bioresource technology*, 98, pp 2765- 2770. doi: 10.1016/j.biortech.2006.09.057

[58] Kurtzman, C.P. (2011). Chapter 57 *Pichia* E.C. Hansen (1904). En C.P. Kurtzman, J.W. Fell y T. Boekhout (5th edition), *The Yeasts. A taxonomic study* (pp 685-707). Amsterdam, Países Bajos: Elsevier.

[59] Kirchmayr, M.R., Segura-García, L.E., Lappe Oliveras, P., Moreno-Terrazas, R., De la Rosa, M. y Gschaedler, M. (2017). Impact of environmental conditions and process

modifications on microbial diversity, fermentation efficiency and chemical profile during the fermentation of *Mezcal* in Oaxaca. *Food and science technology*, 79, pp160-169. dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2016.12.052

[60] Jiménez Segura, V.H. (2016). Caracterización de la diversidad de levaduras durante la fermentación de pulque de la Hacienda de Xochuca en Tlaxco, Tlaxcala. Tesis de licenciatura en Química de alimentos, Facultad de Química, UNAM, México.

[61] American Type Culture Collection. (s.f.). *Issatchenkia orientalis* Kudrjanzev (ATCC®6258™). Recuperado el 22 de abril de 2019 de: <https://www.atcc.org/Products/All/6258.aspx#characteristics>

[62] Yuangsaard, N., Yongmanitchai, W., Yamada, M., y Limtong, S. (2012). Selection and characterization of a newly isolated thermotolerant *Pichia kudriavzevii* strain for ethanol production at high temperature from cassava starch hydrolysate. *Antonie van Leeuwenhoek*, 103, pp 577–588. doi 10.1007/s10482-012-9842-8

[63] Cadez, N. y Smith, Th. Maudy. (2011). Chapter 32 *Hanseniaspora* Zikes (1912). En C.P. Kurtzman, J.W. Fell y T. Boekhout (5<sup>th</sup> edition), *The Yeasts. A taxonomic study* (pp 421-434). Amsterdam, Países Bajos: Elsevier.

[64] Zironi. R., Romano P., Suzzi, G., Battistutta, F. y Comi, G. (1993). Volatile metabolites produced in wine by mixed and sequential cultures of *Hanseniaspora guilliermondii* or *Kloeckera apiculata* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology letters*, 15 (3), pp 235-238.

[65] Kurtzman, P.C. (2011). Chapter 47 *Meyerozyma* Kurtzman and Suzuki M. (2010). En C.P. Kurtzman, J.W. Fell y T. Boekhout (5<sup>th</sup> edition), *The Yeasts. A taxonomic study* (pp 621-624). Amsterdam, Países Bajos: Elsevier.

[66] Acourene, S. y Ammouche, A. (2011). Optimization of ethanol, citric acid, and  $\alpha$ -amylase production from date wastes by strains of *Saccharomyces cerevisiae*, *Aspergillus niger*, and *Candida guilliermondii*. *Journal for industrial microbiology and biotechnology*, 39, pp 759-766. doi 10.1007/s10295-011-1070-0

[67] Aust, S.D. (1995). Mechanisms of degradation of white rot fungi. *Environmental health perspectives*, (103) 5, pp 59-61.



- [68] Čilerdžić, J., Stajić M., Vukojević, J., Duletić-Laušević, S., y Knežević, A. (2011). Potential of *Trametes hirsuta* to produce ligninolytic enzymes during degradation of agricultural residues. *BioResources*, 6 (3), pp 2885-2895. doi: 10.15376/biores.6.3.2885-2895
- [69] Inaturalist. (s.f.). Hairy bracket (*Trametes hirsuta*). Recuperado el 24 de abril de 2019 de: <https://www.inaturalist.org/taxa/116695-Trametes-hirsuta>
- [70] Emberger Gary, Messiah College. (2008). *Trametes hirsuta*. Recuperado el 24 de abril de 2019 de: [https://www.messiah.edu/Oakes/fungi\\_on\\_wood/poroid%20fungi/species%20pages/Trametes%20hirsuta.htm](https://www.messiah.edu/Oakes/fungi_on_wood/poroid%20fungi/species%20pages/Trametes%20hirsuta.htm)
- [71] Okamoto, K., Nitta, Y., Maekawa, N. y Yanase, H. (2011). Direct ethanol production from starch, wheat bran and rice straw by white rot fungus *Trametes hirsuta*. *Enzyme and microbial technology*, 48, pp 273-277. doi: 10.1016/j.enzmictec.2010.12.001
- [72] Tapia-Tussell, R., Pérez-Brito, D., Torres-Calzada, C., Cortés-Velázquez, A., AlzateGaviria, L., Chablé-Villacís, R. y Solís-Pereira, S. (2015). Lacasse gene expresión and vinasse biodegradation by *Trametes hirsuta* Strain Bm-2. *Molecules*, 20, pp 15147-15157. doi: 10.3390/molecules200815147
- [73] Zapata-Castillo, P., Villalonga-Santana, L., Islas-Flores, I., Rivera-Muñoz, G., Ancona-Escalante, W. y Solís-Pereira, S. (2015). Synergistic action of laccase from *Trametes hirsuta* Bm-2 improves decolourization of indigo carmine. *Letters in applied microbiology*, 61, pp 252-258. doi:10.1111/lam.12451
- [74] Ancona-Escalante, W., Tapia-Tussell, R., Pool-Yam, L., Can-Cauich, A. y Lizama-Uc, G. (2018). Laccase-mediator system produced by *Trametes hirsuta* Bm-2 on lignocellulosic substrate improves dye decolorization. *3 Biotech*, 298(8), pp 1-8. doi: 10.1007/s13205-018-1323-y
- [75] Meiners, M., Sanchez Garduño, C. y De Blois, S. (2009). El ramón: Fruto de nuestra cultura y raíz para la conservación. CONABIO. *Biodiversitas*, 87, pp 7-10.

[76] Ayala, A. y Sandoval, S.M. (1995). Establecimiento y producción temprana de forraje de ramón (*Brosimum alicastrum* Swartz) en plantaciones a altas densidades en el norte de Yucatán, México. *Agroforestería en las Américas*, 7, pp 10-16.

[77] CONABIO. (2005). *Brosimum alicastrum*: distribución potencial. Recuperado el 27 de abril de 2019 de: [http://www.conabio.gob.mx/informacion/gis/layouts/dis\\_b\\_alicgw](http://www.conabio.gob.mx/informacion/gis/layouts/dis_b_alicgw)

[78] Peters, C.M. y Pardo Tejada, E. (1982). *Brosimum alicastrum* (Moraceae): uses and potential in Mexico. *Economic botany*, (36) 2, pp 166-175. <http://www.jstor.org/stable/4254368>

[79] Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. (1972). *Brosimum alicastrum* Sw. subsp. *alicastrum* C.C. Berg. (1972). Recuperado el 27 de abril de 2019 de: [http://www.conabio.gob.mx/conocimiento/info\\_especies/arboles/doctos/47-morac1m.pdf](http://www.conabio.gob.mx/conocimiento/info_especies/arboles/doctos/47-morac1m.pdf)

[80] González Hernández, O., Vergara Yoisura, S. y Larqué Saavedra, A. (2014). Primeras etapas de crecimiento de *Brosimum alicastrum* Sw en Yucatán. *Revista mexicana de ciencias forestales*, (6) 27, pp 38-48.

[81] Hernández Escobar, L.E. (2013). Evaluación de las plántulas de ramón (*Brosimum alicastrum* Swartz) bajo fertirriego, en condiciones de vivero en Quintana Roo. Informe final de Residencia Profesional, Instituto Tecnológico de la Zona Maya. Quintana Roo, México.

[82] Global biodiversity information facility. (s.f.). *Brosimum alicastrum* Sw. Recuperado el 29 de abril de 2019 de: <https://www.gbif.org/species/2984660>

[83] Vohman, The equilibrium fund E. (s.f.) Manual de buenas prácticas sobre la propagación, reforestación y aprovechamiento de *Brosimum alicastrum*: MASICA. Recuperado el 29 de abril de 2019 de: <http://biblioteca.upnfm.edu.hn/images/directorios%20tematicos/MAmbiente/MANUAL%20DE%20BUENAS%20PR%20CTICAS.pdf>

[84] Hernández González, O., Vergara Yoisura, S. y 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, pp 70-81.

[85] Flaster, T. (2007). Maya Nut (*Brosimum alicastrum* SW.) and Maya Nut-derived ingredients for use in traditional foods. Generally recognized as safe (GRAS) Self-affirmation report. Recuperado el 05 de enero de 2021 de: <https://mayanutinstitute.org/es/biblioteca/>

[86] Larqué Saavedra, A. (2014). *Brosimum alicastrum*, ramón. *Gaceta siidetey*, (6) 49, pp 5-35.

[87] Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. (1991). Guía para la manipulación de semillas forestales. Recuperado el 2 de mayo de 2019 de: <http://www.fao.org/3/AD232S/ad232s00.htm#TOC>

[88] Kurtzman, P.C., Fell, J.W., Boekhout, T. y Robert, V. (2011). Chapter 7 Methods for isolation, phenotypic characterization and maintenance of yeasts. En C.P. Kurtzman, J.W. Fell y T. Boekhout (5<sup>th</sup> edition), *The Yeasts. A taxonomic study* (pp 87-110). Amsterdam, Países Bajos: Elsevier.

[89] Humber, R.A. (1997). Chapter V-5. Fungi: preservation of cultures. En L.A., Lacey (1<sup>ST</sup> edition), *Manual of techniques in insect pathology, biological techniques series* (pp 269-279). California, EUA: Academic press, Inc. doi: 10.1016/B978-012432555-5/50015-4

[90] Martínez, A., León, M. y González, G. (2009). Conservación de cepas de *Candida utilis* en agua destilada estéril. *ICIDCA sobre los derivados de la caña de azúcar, (XLIII)* 2, pp 47-50.

[91] Heredia, N.L., García Alvarado, J.S., Solís Soto, L.Y., Venegas García, H.F., Merino Mascorro, J.A. y Franco Frías, E. (2017). *Diagnóstico microbiológico: de lo tradicional a lo moderno, Manual de Laboratorio* (1<sup>a</sup> edición), pp 9- 217. Monterrey, Nuevo León: Editorial Universitaria UANL.

[92] Montesinos-Matías, R., Ayala-Zermeño, M.A. y Berlanga-Padilla, A.M. (2015). Manual para la conservación y mantenimiento de hongos entomopatógenos. Centro Nacional de Referencia de Control Biológico (1<sup>a</sup> edición), pp 11-59. Colima, México: SAGARPA-SENASICA.

- [93] Montesinos-Matías, R., Ayala-Zermeño, M.A., Berlanga-Padilla, A., Gallou, A. y Arredondo Bernal, H.C. (2015). Crioconservación de diferentes especies de hongos entomopatógenos. *XXXVIII Congreso nacional de control biológico, Sociedad mexicana de control biológico, A.C.* pp 469-473.
- [94] Lachance, M.A. (1995). Yeast communities in a natural tequila fermentation. *Antonie van Leeuwenhoek*, (68), pp 151-160.
- [95] Tzec Gamboa, M.C. (2006). Evaluación de levaduras aisladas de mostos de henequén (*Agave fourcroydes*) para la producción de una bebida alcohólica. Tesis de Maestría en Ciencias, CICY, México.
- [96] Barquera Bibiano, Z. M. (2014). Obtención de bioetanol a partir de la semilla del ramón (*Brosimum alicastrum* Sw.). Tesis de Maestría en Energía Renovable, CICY, México.
- [97] Westerdijk Fungal Biodiversity Institute. (2016). A quick method for estimating the percentage of viable cells in a yeast population, using methylene blue staining. Recuperado el 01 de septiembre de 2019 de: <http://www.westerdijkinstitute.nl/BioloMICSNews.aspx?Rec=5639>
- [98] Adame Rodríguez, J.M., Rivera Morales, L.G, Aréchiga Carvajal, E.T. y Robledo Leal, E. (2013). *Manual de prácticas de micología* (edición 2013), pp 2-58. Monterrey, Nuevo León: Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León.
- [99] Bastidas, O. (2013). Conteo celular con hematocitómetro, uso elemental del hematocitómetro. *Technical note- Neubauer chamber cell counting*. Recuperado el 01 de septiembre de 2019 de: [https://www.academia.edu/13150839/Technical\\_Note\\_Nebauer\\_Chamber\\_Cell\\_Counting\\_1\\_Oscar\\_Bastidas](https://www.academia.edu/13150839/Technical_Note_Nebauer_Chamber_Cell_Counting_1_Oscar_Bastidas)
- [100] Quintero Ramírez, R. (1993). Ingeniería bioquímica: teoría y aplicaciones (1ra edición). D.F., México: Editorial Alhambra-Mexicana.
- [101] Olguin Maciel, E. (2015). Estudio para optimizar la obtención de bioetanol a partir de harina de semillas de ramón (*Brosimum alicastrum* Sw.). Tesis de Maestría en Energía Renovable, CICY, México.

- [102] Nicoletta Gronchi, L.F., Lorenzo Cagnin, S.B., Valentino, P., Basaglia, M. y Casella, S. (2019). Novel yeast strains for the efficient saccharification and fermentation of starchy by-products to bioethanol. *Energies*, 12(714), pp 1-13. doi: 10.3390/en12040714
- [103] Miller, G.L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical chemistry*, 31 (3), pp 426-428.
- [104] Jiménez Villarreal, I.A. (2019). Efecto del ultrasonido en el proceso de sacarificación para la producción de bioetanol a partir de harina de ramón. Tesis de maestría en Energía Renovable, CICY, México.
- [105] Mille-Lindblom, C. (2005). Interactions between bacteria and fungi on aquatic detritus-causes and consequences (PhD dissertation). Acta Universitatis Upsaliensis, Uppsala. Recuperado el 11 de enero de 2021 de: <http://urn.kb.se/resolve?urn=urn:nbn:se:uu:diva-5771>
- [106] Boddy, L. y Hiscox, J. (2017). Fungal ecology: principles and mechanisms of colonization and competition by saprotrophic fungi. *Mycobiology spectrum*, 4, pp 1-16. doi: 10.1128/microbiolspec.FUNK-0019-2016
- [107] Geoffrey, D. (2016). Chapter 8 Fungal degradation of wood cell walls. En Yoon Soo Kim, Ryo Funada y Adya P. Singh (1<sup>st</sup> edition), *Secondary xylem biology* (pp 131-167). Amsterdam, Países Bajos: Elsevier. doi: 10.1016/B978-0-12-802185-9.00008-5
- [108] Schüffler, A. (2018). Secondary metabolites of basidiomycetes. En Anke, T. y Schüffler, A. (2<sup>nd</sup> edition), *The Mycota XV: Physiology and genetics* (pp 232- 464). Cham, Suiza: Springer Nature. doi: 10.1007/978-3-319-71740-1
- [109] Peralta, R.M., Da Silva, B.P., Gomes Correa, R.C., Kato, C.G., Vicente Seixas, F.A. y Bracht, A. (2017). Chapter 5 Enzymes from basidiomycetes- peculiar and efficient tools for biotechnology. En Brahmachari, G. (1<sup>st</sup> edition), *Biotechnology of microbial enzymes* (119-149). Amsterdam, Países Bajos: Elsevier. doi: 10.1016/B978-0-12-803725-6.00005-4
- [110] Talukder, A. A., Easmin, F., Mahmud, S. A., y Yamada, M. (2016). Thermotolerant yeasts capable of producing bioethanol: isolation from natural fermented sources,

identification and characterization. *Biotechnology & biotechnological equipment*, 30(6), pp 1106-1114. doi: 10.1080/13102818.2016.1228477

[111] Pongcharoen, P., y Miyuki, K. K. (2018). Identification and characterization of *Candida tropicalis* isolated from soil of sugarcane plantation in Thailand for ethanol production. *AsiaPacific journal of science and technology*, 23(3), pp 1-9. <https://so01.tci-thaijo.org/index.php/APST/article/view/85956>

[112] Techaparin, A., Thanonkeo, P., & Klanrit, P. (2017). High-temperature ethanol production using thermotolerant yeast newly isolated from Greater Mekong Subregion. *Brazilian journal of microbiology*, 48(3), pp 461-475. doi: 10.1016/j.bjm.2017.01.006

[113] Sibirny, A.A. y Boretsky, Y.R. (2009). Chapter 6 *Pichia guilliermondii*. En Satyanarayana, T., y Kunze, G. (Eds.). (2009). *Yeast biotechnology: diversity and applications* (Vol. 78). Dordrecht: Springer, pp 113-134

[114] Magan, N. (2008). Ecophysiology: impact of environment on growth, synthesis of compatible solutes and enzyme production. In *British mycological society symposia series* (Vol. 28). Academic Press, pp 63-78. doi: 10.1016/S0275-0287(08)80006-9

[115] Cuentame INEGI. (2020). Información por entidad: Yucatán. Recuperado el 03 de septiembre de 2019 de: <http://cuentame.inegi.org.mx/monografias/informacion/yuc/territorio/clima.aspx?tema=me&e=31>

[116] Mswaka, A. Y. y Magan, N. (1999). Temperature and water potential relations of tropical *Trametes* and other wood-decay fungi from the indigenous forests of Zimbabwe. *Mycological research*, 103(10), pp 1309-1317. doi:10.1017/S0953756298008491

[117] Brambl, R., Marzluf, G.A. y Springer Link (Servicio en línea). (1996). III Biochemistry and molecular biology. En Esser, K. y Lemke, P.A. *Mycota: a comprehensive treatise on fungi as experimental systems for basic and applied research* (pp 1-449). Nueva York, EUA: Springer-Verlag Berlin Heidelberg. doi: 10.1007/978-3-662-10367-8

[118] Reddy, L.V.A., Reddy, O.V.S. y Basappa, S.C. (2009). Chapter 24 Potentiality of yeasts in the direct conversion of starchy materials to ethanol and its relevance in the new

millennium. En Satyanarayana, T. y Kunze, G. (eds.). *Yeast biotechnology: diversity and applications* (1-744). Springer Science + Business Media B.V. doi:10.1007/978-1-4020-8292-4\_24

[119] Singh, V. (2009). Conversion of starch into sugars. 1<sup>st</sup> Brazil-U.S. Biofuel short course. Recuperado el 26 de enero de 2020 de: <http://www.iea.usp.br/midiateca/apresentacao/singhbiofuels1.pdf>

[120] Olivas, E.E. (2012). *Manual de prácticas laboratorio de microbiología*. Recuperado el 20 de marzo de 2019 de: <https://bivir.uacj.mx/Reserva/Documentos/rva2011296.pdf>

[121] Cholis, M. y Chanson, C. (2019, February). Molecular identification and potential ethanol production of long-term thermo-tolerant yeast *Candida tropicalis*. In *IOP Conference Series: earth and environmental science* (Vol. 239, No. 1, p. 012004). IOP Publishing. doi: 10.1088/1755-1315/239/1/012004

[122] Lagzouli, M., Charouf, R., El-Yachioui, O., Berny, M. E. H., y Jadal, M. (2007). Optimisation de la croissance et de la production de glucoamylase extracellulaire par *Candida guilliermondii*. *Bulletin de la Société de la Pharmacie de Bordeaux*, 146, pp 251-270.

[123] Druzhinina, I.S. y Kubicek, C.P. (2016). IV Environmental and microbial relationships. En Esser, K. (3<sup>rd</sup> edition), *The Mycota: a comprehensive treatise on fungi as experimental systems for basic and applied research* (pp 3-291). Cham, Suiza: Springer. doi: 10.1007/978-3-319-29532-9

[124] Rodríguez Cavallini, E., Gamboa Coronado, M. M., Hernández Chavarría, F. y García Hidalgo, J. (2005). *Bacteriología general: principios y prácticas de laboratorio* (1era edición). San José, Costa Rica: Editorial de la Universidad de Costa Rica.

[125] Paludo, L. C., Frantz, S. C., Ançay Jr, R., Stutz, H., Dantas, T. L. P., y Spier, M. R. (2018). Optimization, kinetic and bioprocess parameters of amylases production from *Coprinus comatus* under submerged culture using starch-based simple medium: partial enzyme characterization. *Biocatalysis and agricultural biotechnology*, 16, pp 529-537. doi: 10.1016/j.bcab.2018.09.022

[126] Visvanathan, R., Qader, M., Jayathilake, C., Chaminda Jayawardana, B., Liyanage, R. y Sivakanesan, R. (2020). Critical review on conventional spectroscopic  $\alpha$ -amylase activity detection method: merits, demerits, and future prospects. *Society of chemical industry*, 100, pp 2836-2847. doi: 10.1002/jsfa.10315

[127] Zhang, J., Wei, K. y Hong, C. (2019). Enhancing lacasse production by white-rot fungus *Trametes hirsuta* SSM-3 in co-culture with yeast *Sporidiobolus pararoseus* SSM-8. *Preparative biochemistry and biotechnology*, 50(1), pp 1-8. doi:10.1080/10826068.2019.1655764

[128] Carrillo-Nieves, D., Saldarriaga-Hernández, S., Gutiérrez-Soto, G., Rostro-Alanis, M., Hernández-Luna, C., Álvarez, A.J., Iqbal, H.M.N. y Parra-Saldívar, R. (2020). Biotransformation of agro-industrial waste to produce lignocellulolytic enzymes and bioethanol with zero waste. *Biomass conversion and biorefinery*. doi: 10.1007/s13399-020-00738-6

[129] Ding, J., Huang, X., Zhang, L., Zhao, N., Yang, D., y Zhang, K. (2009). Tolerance and stress response to ethanol in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied microbiology and biotechnology*, 85(2), pp 253-263. doi: 10.1007/s00253-009-2223-1

[130] Charoenbhakdi, S., Dokpikul, T., Burphan, T., Techo, T. y Auesukaree, C. (2016). Vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase Protects *Saccharomyces cerevisiae* cells against ethanol-induced oxidative and cell wall stresses. *Applied and environmental microbiology*, 82(10), pp 3121- 3130. doi: 10.1128/AEM.00376-16

[131] Snoek, T., Verstrepen, K.J., Voordeckers, K. (2015). How do yeast cells become tolerant to high ethanol concentrations? *Springer*, (62), pp 475-480. doi: 10.1007/s00294-015-0561-3

[132] Ma, M., y Liu, Z. L. (2010). Mechanisms of ethanol tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied microbiology and biotechnology*, 87(3), pp 829-845. doi: 10.1007/s00253-010-2594-3

[133] Stanley, D., Bandara, A., Fraser, J., Chambers, P.J. y Stanley, G.A. (2010). The ethanol stress response and ethanol tolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of applied microbiology*, 109, pp 13-24. doi: 10.1111/j.1365-2672.2009.04657.x



- [134] Piper, P.W. (1995). The heat shock and ethanol stress response of yeast exhibit extensive similarity and functional overlap. *FEMS microbiology letters*, 134(2-3), pp 121-127. doi: 10.1111/j.1574-6968.1995.tb07925.x
- [135] Casey, G.P. y Ingledew, W.M. (1986). Ethanol tolerance in yeasts. *CRC Critical reviews in microbiology*, 13(3), pp 219-280. doi: 10.3109/10408418609108739
- [136] Dung, N. T. P., Thanonkeo, P., y Phong, H. X. (2012). Screening useful isolated yeasts for ethanol fermentation at high temperature. *International journal of applied science and technology*, 2(4). pp 65-71.
- [137] Archana, K. M., Ravi, R., y Anu-Appaiah, K. A. (2015). Correlation between ethanol stress and cellular fatty acid composition of alcohol producing non-*Saccharomyces* in comparison with *Saccharomyces cerevisiae* by multivariate techniques. *Journal of food science and technology*, 52(10), pp 6770-6776. doi: 10.1007/s13197-015-1762-y
- [138] Miao, Y., Xiong, G., Li, R., Wu, Z., Zhang, X., y Weng, P. (2018). Transcriptome profiling of *Issatchenkia orientalis* under ethanol stress. *AMB express*, 8(1), 39. pp 1-13. doi: 10.1186/s13568-018-0568-5
- [139] Pongcharoen, P., Chawneua, J., y Tawong, W. (2018). High temperature alcoholic fermentation by new thermotolerant yeast strains *Pichia kudriavzevii* isolated from sugarcane field soil. *Agriculture and natural resources*, 52(6), pp 511-518. doi: 10.1016/j.anres.2018.11.017
- [140] Fabricio, M. F., Valente, P., y Ayub, M. A. Z. (2019). Oleaginous yeast *Meyerozyma guilliermondii* shows fermentative metabolism of sugars in the biosynthesis of ethanol and converts raw glycerol and cheese whey permeate into polyunsaturated fatty acids. *Biotechnology progress*, 35(6) pp 1-8. doi: 10.1002/btpr.2895
- [141] Maxwell Gidado, R.S., Olatiilu, O.A., Etuk-Udo, G.A., Onyenekwe, P. C., Isu, R.N. Y Habu, J. (2016). Isolation and characterization of yeast inhabiting alcohol processing environment in Bayelsa State, Nigeria. *Science publishing group*, 1(3), pp 78-85. doi: 10.11648/j.aas.20160103.15
- [142] Pina, C., Santos, C., Couto, J. A., y Hogg, T. (2004). Ethanol tolerance of five non-*Saccharomyces* wine yeasts in comparison with a strain of *Saccharomyces cerevisiae*—

influence of different culture conditions. *Food microbiology*, 21(4), pp 439-447. doi: 10.1016/j.fm.2003.10.009

[143] Albergaria, H., Torrao, A. R., Hogg, T., y Gírio, F. M. (2003). Physiological behaviour of *Hanseniaspora guilliermondii* in aerobic glucose-limited continuous cultures. *FEMS yeast research*, 3(2), pp 211-216. doi: 10.1016/S1567-1356(02)00187-3

[144] Moreira, N., Pina, C., Mendes, F., Couto, J. A., Hogg, T., y Vasconcelos, I. (2011). Volatile compounds contribution of *Hanseniaspora guilliermondii* and *Hanseniaspora uvarum* during red wine vinifications. *Food control*, 22(5), pp 662-667. doi: 10.1016/j.foodcont.2010.07.025

[145] Okamura, T., Ogata, T., Minamimoto, N., Takeno, T., Noda, H. Fukuda, S. y Ohsugi, M. (2001). Characteristics of wine produced by mushroom fermentation. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, (65)7, pp 1596-1600. doi: 10.1271/bbb.65.1596

[146] Wang, J., Suzuki, T., Dohra, H., Takigami, S., Kako, H., Soga, A., Kameis, I., Mori, T...Hirai, H. (2016). Analysis of ethanol fermentation mechanism of ethanol producing white-rot fungus *Phlebia*, sp. MG-60 by RNA-seq. *BMC genomics*, (616)17, pp 1-11. doi: 10.1186/s12864-016-2977-7

[147] Mizuno, R., Ichinose, H., Maehara, T., Takabatake, K. y Kaneko, S. (2009). Properties of ethanol fermentation by *Flammulina velutipes*. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 73(10), pp 2240- 2245. doi: 10.1271/bbb.90332

[148] Moreira, N., Mendes, F., Guedes de Pino, P., Hogg, T. y Vasconcelos, I. (2008). Heavy sulphur compounds, higher alcohols and ester production profile of *Hanseniaspora uvarum* and *Hanseniaspora guilliermondii* grown as pure and mixed cultures in grape must. *International journal of food microbiology*, 124, pp 231-238. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2008.03.025

[149] Lage, P., Barbosa, C., Mateus, B., Vasconcelos, I. Mendes-Faia, A. y Mendes-Ferreira, A. (2014). *H. guilliermondii* impacts growth kinetics and metabolic activity of *S. cerevisiae*: the role of initial nitrogen concentration. *International journal of food microbiology*, 172, pp 62-69. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2013.11.031

- [150] Andorra, I., Monteiro, M., Esteve-Zarzoso, B., Albergaria, H. y Mas, A. (2011). Analysis and direct quantification of *Saccharomyces cerevisiae* and *Hanseniaspora guilliermondii* populations during alcoholic fermentation by fluorescence *in situ* hybridization, flow cytometry and quantitative PCR. *Food microbiology*, 28, pp 1483-1491. doi: 10.1016/j.fm.2011.08.009
- [151] Irshad, M.D., Shreaz, S., Manzoor, N., Khan, L.A., y Moshahid, R. (2010). Anticandidal activity of *Cassia fistula* and its effect on ergosterol synthesis. *Pharmaceutical biology*, 49(7), pp 727-733. doi: 10.3109/13880209.2010.544318
- [152] Fleet, G.H. (2008). Wine yeasts for the future. *Federation of European microbiological societies*, 8, pp 979-995. doi: 10.1111/j.1567-1364.2008.00427.x
- [153] Matmati, N. y Hannun, Y.A. (2008). ISC1 (inositol phosphosphingolipid-phospholipase C), the yeast homologue of neutral sphingomyelinases. *Journal of lipid research*, 49, pp 922-928. doi: 10.1194/jlr.R800004-JLR200
- [154] Saranraj, P. y Stella, D. (2013). Fungal amylase- a review. *International journal of microbiological research*, 4(2), pp 203-211. doi: 10.5829/idosi.ijmr.2013.4.2.75170
- [155] Pervez, S., Aman, A., Iqbal, S., Siddiqui, N. N., y Qader, S. A. 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. pp 1-10.
- [156] Gupta, R., Gigras, P., Mohapatra, H., Goswami, V.K. y Chauhan, B. (2003). Microbial  $\alpha$ -amylases: a biotechnological perspective. *Process biochemistry*, pp 1599-1616. doi: 10.1016/S0032-9592(03)00053-0
- [157] Dar, G.H., Kamili, A.N., Nazir, R., Bandh, S.A., Jan, T.R. y Chishti, M.Z. (2015). Enhanced production of  $\alpha$ - amylase by *Penicillium chrysogenum* in liquid culture by modifying the process parameters. *Microbial pathogenesis*, 88, pp 10-15. doi: 10.1016/j.micpath.2015.07.016

- [158] Gopinath, S.C.B., Anbu, P., Arshad, M.K. Md., Lakshmipriya, T., Hong Voon, C., Hashim, U. y Chinni, S.V. (2017). Biotechnological processes in microbial amylase production. *Biomed research international*, pp 1-10. doi:10.1155/2017/1272193
- [159] Hatice Kubra Ozer. (2016). Phenolic compositions and antioxidant activities of Maya nut (*Brosimum alicastrum*): comparison with commercial nuts. *International journal of food properties*, 20(11). doi: 10.1080/10942912.2016.1252389
- [160] Subiria-Cueto, R., Larqué-Saavedra, A., Reyes-Vega, M.L., De la Rosa, L.A., Santana-Contreras, L.E., Gaytán-Martínez, M...Martínez-Ruíz, N.R. (2019). *Brosimum alicastrum* Sw. (Ramón): an alternative to improve the nutritional properties and functional potential of the wheat flour tortilla. *Foods*, 8(613), pp 1-18. doi: 10.3390/foods8120613
- [161] Kunamneni, A., Camarero, S., García-Burgos, C., Plou, F.J., Ballesteros, A. y Alcalde, M. (2008). Engineering and applications of fungal laccases for organic synthesis. *Microbial cell factories*, 32(7). doi: 10.1186/1475-2859-7-32
- [162] Quirós-Sauceda, A.E., Palafox-Carlos, H., Sáyago-Ayerdi, S.G., Ayala-Zavala, J.F., Bello-Perez, L.A., Álvarez-Parrilla, E., De la Rosa, L.A., González-Córdova, A.F. y González-Aguilar, G.A. (2014). Dietary fiber and phenolic compounds as functional ingredients: interaction and possible effect after ingestion. *The royal society of chemistry*, 5, pp 1063-1072. doi: 10.1039/c4fo00073k
- [163] Ancona-Escalante, W., Tapia-Tusell, R., Pool-Yam, L., Can-Cauch, A., Lizama-Uc, G. y Solís-Pereira, S. (2018). Laccase -mediator system produced by *Trametes hirsuta* Bm-2 on lignocellulosic substrate improves dye decolorization. *3 Biotech*, 8(298), pp 1-8. doi: 10.1007/s13205-018-1323-y
- [164] Olguin Maciel, E. (2020). 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 de doctor en ciencias en energía renovable, CICY, México.
- [165] El-Fallal, A., Abou Dohara, M., El-Sayed, A. y Omar, N. (2012). Chapter 21 Starch and microbial  $\alpha$ -amylases: from concepts to biotechnological applications. En C.F. Chang (1<sup>st</sup> edition), *Carbohydrates- comprehensive studies on glycobiology and glycotecchnology* (pp 459- 488). Croatia, Intech. doi: 10.5772/51571

- [166] Cripwell, R.A., Favaro, L., Viljoen-Bloom, M. y van Zyl, W. (2020). Consolidated Bioprocessing of raw starch to ethanol by *Saccharomyces cerevisiae*: achievements and challenges. *Biotechnology advances*, 42. doi: 10.1016/j.biotechadv.2020.107579
- [167] Roldán-Cruz, C., García-Hernández, A., Álvarez-Ramírez, J. y Vernon-Carter, E.J. (2020). Effect of the stirring speed in the *in vitro* activity of  $\alpha$ -amylase. *Food hydrocolloids*, pp 1-26. doi: 10.1016/j.foodhyd.2020.106127
- [168] Henshaw, E. y Wakil, S.M. (2019). Effect of agitation speed and incubation time on amylase production by *Bacillus* species isolated from malted and fermented maize (*Zea mays*). *Microbiology research journal international*, 27(3), pp 1-7. doi: 10.9734/mrji/2019/v27i330097
- [169] Farid, M.A., El-Enshasy, H.A. y Noor El-Deen, A.M. (2002). Alcohol production from starch by mixed cultures of *Aspergillus awamori* and immobilized *Saccharomyces cerevisiae* at different agitation speeds. *Journal of basic microbiology*, 42(3), pp 162-171. doi: 10.1002/1521-4028(200206)42:3<162::AID-JOBM162>3.0.CO;2-C
- [170] Murado, M.A., Pastrana, L., Vázquez, J.A., Mirón, J. y González, M.P. (2008). Alcoholic chestnut fermentation in mixed culture. Compatibility criteria between *Aspergillus oryzae* and *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Bioresource technology*, 99, pp 7255-7263. doi: 10.1016/j.biortech.2007.12.053
- [171] Sivaramakrishnan, S., Gangadharan, D., Nampoothiri Madhavan, K., Soccol, C.R. y Pandey, A. (2006).  $\alpha$ - Amylases from microbial sources- an overview on recent developments. *Food technology and biotechnology*, 44(2), pp 173-184.
- [172] Rousset, S. y Schlich, P. (1989). Amylase production in submerged culture using principal component analysis. *Journal of fermentation and bioengineering*, 68(5), pp 339-343.
- [173] Zhao, J., Chen, Y.H. y Kwan, H.S. (2000). Molecular cloning, characterization, and differential expression of a glucoamylase gene from the basidiomycetous fungus *Lentinula edodes*. *Applied and environmental microbiology*, 66(6), pp 2531- 2535.

- [174] Sakwa, L., Cripwell, R.A., Rose, S.H. y Viljoen-Bloom, M. (2018). Consolidated bioprocessing of raw starch with *Saccharomyces cerevisiae* strains expressing fungal alpha-amylase and glucoamylase combinations. *FEMS yeast research*, 18(7), pp 1-10. doi: 10.1093/femsyr/foy085
- [175] Jinu, J. (2017). Amylases- bioprocess and potential applications: a review. *International journal of bioinformatics and biological sciences*, 5(2), pp 41-50. doi: 10.5958/2321-7111.2017.00006.3.
- [176] Bisson, L. (1999). Stuck and sluggish fermentations. *American journal of enology and viticulture*, 50, pp 107-119.
- [177] Malherbe, S., Bauer, F.F. y Du Toit, M. (2007). Understanding problems fermentations- a review. *South african journal for enology and viticulture*, 28(2), pp 169-186.
- [178] Hoshida, H. y Akada, R. (2017). Chapter 2 High-temperature bioethanol fermentation by conventional and nonconventional yeasts. En Sibirny, A.A. (1<sup>st</sup> edition) *Biotechnology of yeasts and filamentous fungi* (pp 40-61). Cham, Switzerland: Springer. doi: 10.1007/978-3-319-58829-2
- [179] Zamora, F. (2009). Chapter 1 Biochemistry of alcoholic fermentation. En Moreno-Arribas, M.V. y Polo, C.M. (1<sup>st</sup> edition) *Wine chemistry and biochemistry* (3-26). Nueva York, EUA: Springer New York. doi: 10.1007/978-0-387-74118-5
- [180] Brás, N.F., Fernandes, P.A., Ramos, M.J. y Cerqueira, N. (2012). Glycosidases- a mechanistic overview. En C.F. Chang (1<sup>st</sup> edition), *Carbohydrates- comprehensive studies on glycobiology and glycotecology* (pp 459- 488). Croatia, Intech. doi: 10.5772/51571
- [181] Dickinson, R.J. y Kruckeberg, A.L. (2006). Chapter 8 Carbohydrate metabolism. En Querol, A. y Fleet, G.H. (1<sup>st</sup> edition). *Volume 2 Yeasts in food and beverages* (pp 215-242). Heidelberg, Alemania: Springer.
- [182] Souza Guimaraes, L.E. (2012). Chapter 20 Carbohydrates from biomass: sources and transformation by microbial enzymes. En C.F. Chang (1<sup>st</sup> edition), *Carbohydrates- comprehensive studies on glycobiology and glycotecology* (pp 459- 488). Croatia, Intech. doi: 10.5772/51576

- [183] Verstrepen, K.J., Iserentant, D., Malcorps, P., Derdelinckx, G., Van Dijck, P., Winderickx, J... Delvaux, F.R. (2004). Glucose and sucrose: hazardous fast-food for industrial yeast? *Trends in biotechnology*, 22(10), pp 531-537. doi: 10.1016/j.tibtech.2004.08.001
- [184] Ciani, M., Canonico, L., Oro, L. y Comitina, F. (2014). Sequential fermentation using non-*Saccharomyces* yeasts for the reduction of alcohol content in wine. *EDP sciences*, pp 1-3. doi: 10.1051/bioconf/20140302015.
- [185] Fleet, G.H. (2003). Yeast interactions and wine flavour. *International journal of food microbiology*, 86, pp 11-22. doi: 10.1016/S0168-1605(03)00245-9
- [186] Manikandan, K. y Viruthagiri, T. (2010). Optimization of C/N ratio of the medium and fermentation conditions of ethanol production from tapioca starch using co-culture of *Aspergillus niger* and *Saccharomyces cerevisiae*. *International journal of Chemtech research*, 2, pp 947-955.
- [187] Gobert, A., Tourdot-Maréchal, R., Sparrow, C., Morge, C. y Alexandre, H. (2019). Influence of nitrogen status in wine alcoholic fermentation. *Food microbiology*, 83, pp 71-85. doi: 10.1016/j.fm.2019.04.008
- [188] Jamai, L. y Ettayebi, M. (2013). Bioethanol production process using the non-conventional yeast *Candida tropicalis*. *2013 International renewable and sustainable energy conference (IRSEC)*, Ouarzazate, 2013, pp 477-481. doi: 10.1109/IRSEC.2013.6529710
- [189] Zulfikar, Cholis, M. y Chanson, C. (2018). Molecular identification and potential ethanol production of long term thermotolerant yeast *Candida tropicalis*. *IOP Conference series: earth and environmental science*, pp 1-8. doi: 10.1088/1755-1315/239/1/012004
- [190] Adelabu, B.A., Kareem, S.O., Adeogun, A.I. y Ademolu, K.O. (2018). Direct bioconversion of sorghum straw to ethanol in a single step process by *Candida* species. *Jordan journal of biological sciences*, 11(1), pp 57-63.
- [191] Shariq, M. y Sohail, M. (2019). Application of *Candida tropicalis* MK-160 for the production of xylanase and ethanol. *Journal of King Saud University*, 31, pp 1189-1194. doi: 10.1016/j.jksus.2018.04.009

[192] Wickerham, J.L. (1951). Taxonomy of yeasts. 1951. United States department of of agriculture, *Technical bulletin No. 1029*. Washington, EUA.

[193] Tuininga, A. R. (2005) Interspecific interaction terminology: from mycology to general ecology. En Dighton, J., White, J.F. y Oudemans, P. (3<sup>rd</sup> edition). *The fungal community, its organization and role in the ecosystem* (pp1-904). Florida, EUA: CRC Press

[194] Jeon, J.R., Baldrian, P., Murugesan, K., Chang, Y.S. (2011). Laccase-catalysed oxidations of naturally occurring phenols: from in vivo biosynthetic pathways to green synthetic applications. *Microbial biotechnology*, 5(3), pp 318-332. doi: 10.1111/j.1751-7915.2011.00273.x

[195] Cañas, A.I. y Camarero, S. (2010). Laccases and their natural mediators: biotechnological tools for sustainable-ecofriendly processes. *Biotechnology advances*, 28, pp 694-705. doi: 10.1016/j.biotechadv.2010.05.002



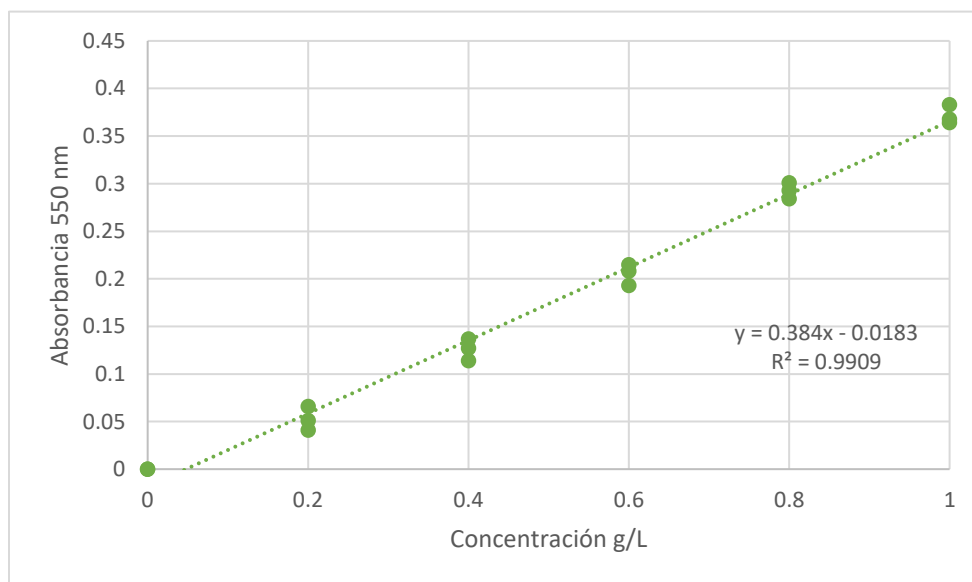
## ANEXOS

### Anexo 1

#### Curva de calibración de ARD (Método de DNS)

Absorbancia de 550 nm

ARD (g/L)	R1	R2	R3	Promedio
0	0	0	0	0
0.2	0.041	0.051	0.066	0.053
0.4	0.114	0.137	0.127	0.126
0.6	0.193	0.208	0.215	0.205
0.8	0.284	0.301	0.293	0.293
1	0.364	0.368	0.383	0.372

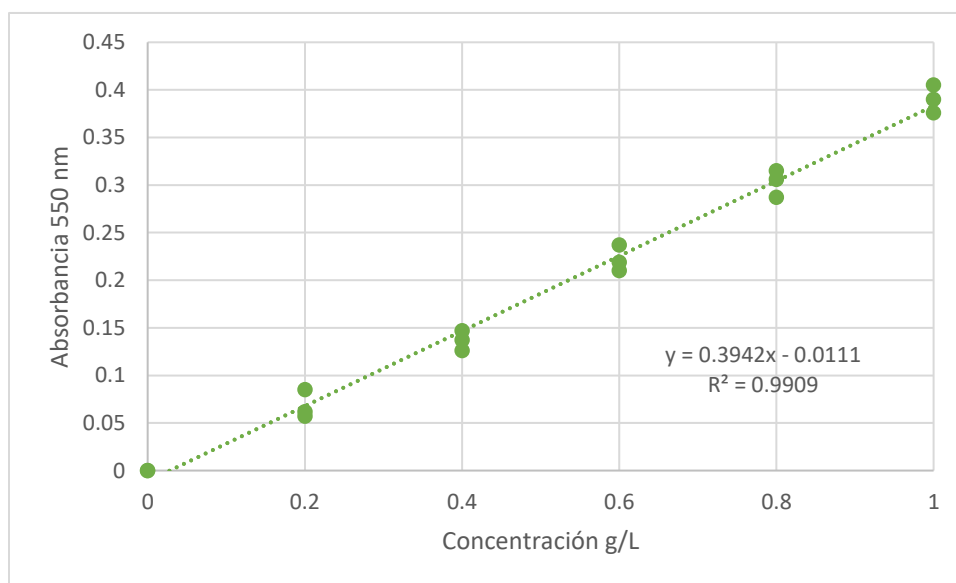


## Anexo 2

### Curva de calibración de ARD (Método de DNS)

Absorbancia de 550 nm

ARD (g/L)	R1	R2	R3	Promedio
0	0	0	0	0
0.2	0.057	0.062	0.085	0.068
0.4	0.126	0.147	0.137	0.136
0.6	0.21	0.237	0.219	0.222
0.8	0.287	0.315	0.306	0.302
1	0.376	0.405	0.39	0.390

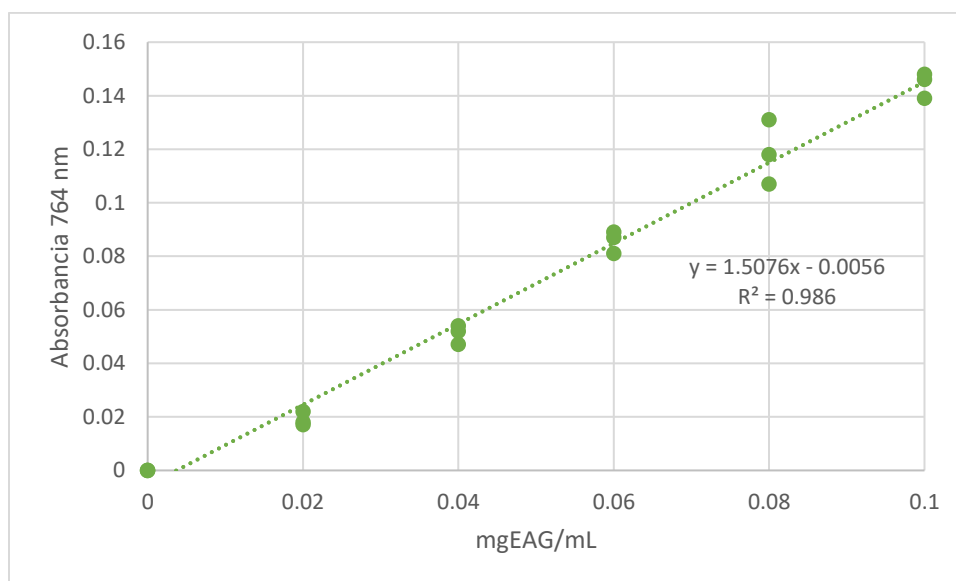


### Anexo 3

#### Curva de calibración de fenoles

Absorbancia 764 nm

MgEAG/ mL	R1	R2	R3	Promedio
0	0	0	0	0
0.02	0.017	0.022	0.018	0.019
0.04	0.054	0.047	0.052	0.051
0.06	0.089	0.081	0.087	0.086
0.08	0.107	0.131	0.118	0.119
0.1	0.148	0.139	0.146	0.144

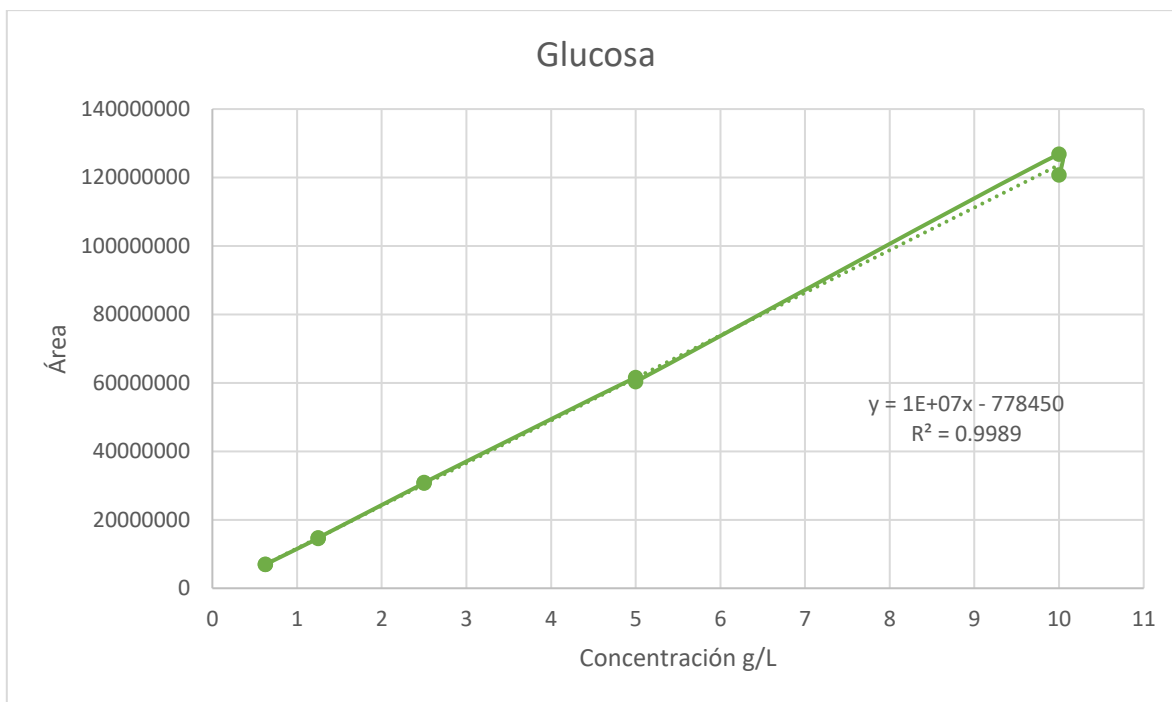


## Anexo 4

### Curva de calibración de glucosa en HPLC

#### Áreas bajo la curva

Glucosa (g/L)	R1	R2	Promedio
0	0	0	0
0.625	7021485	6936861	6979173
1.25	14584889	14752682	14668785.5
2.5	30710889	30861902	30786395.5
5	61612748	60353793	60983270.5
10	126837536	120741734	123789635

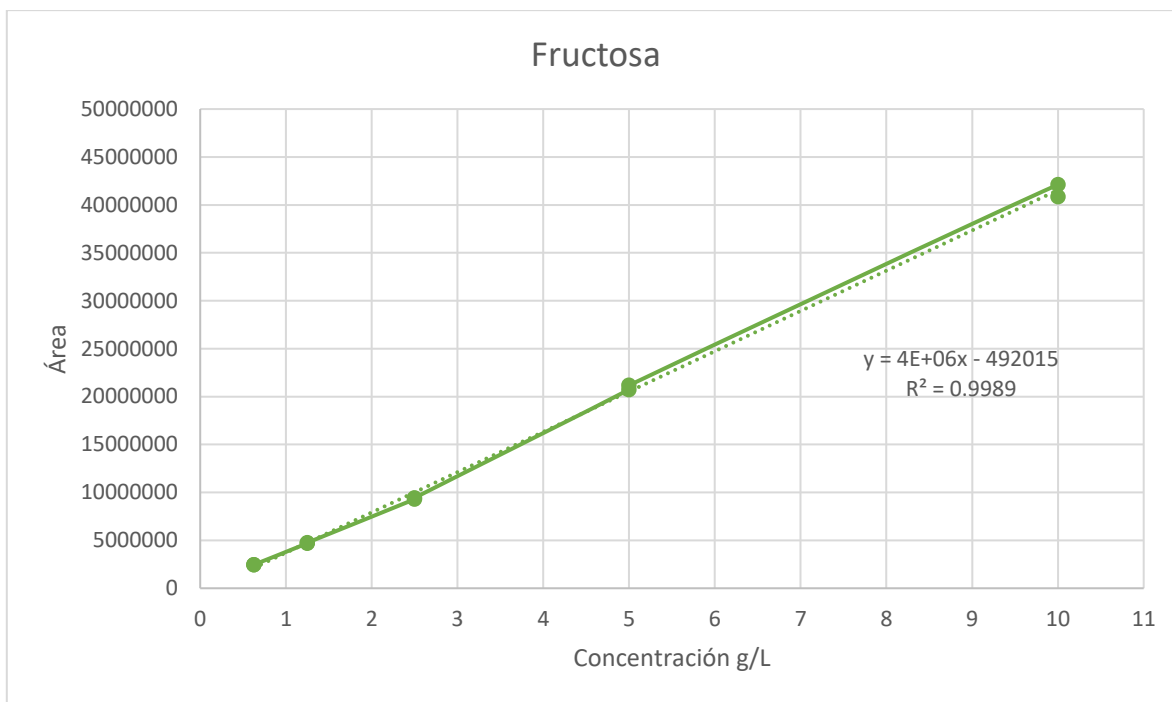


## Anexo 5

### Curva de calibración de fuctosa en HPLC

#### Áreas bajo la curva

Fructosa (g/L)	R1	R2	Promedio
0	0	0	0
0.625	2462479	2456106	2459292.5
1.25	4699578	4761262	4730420
2.5	9290584	9437604	9364094
5	20732880	21174937	20953908.5
10	42108607	40845573	41477090

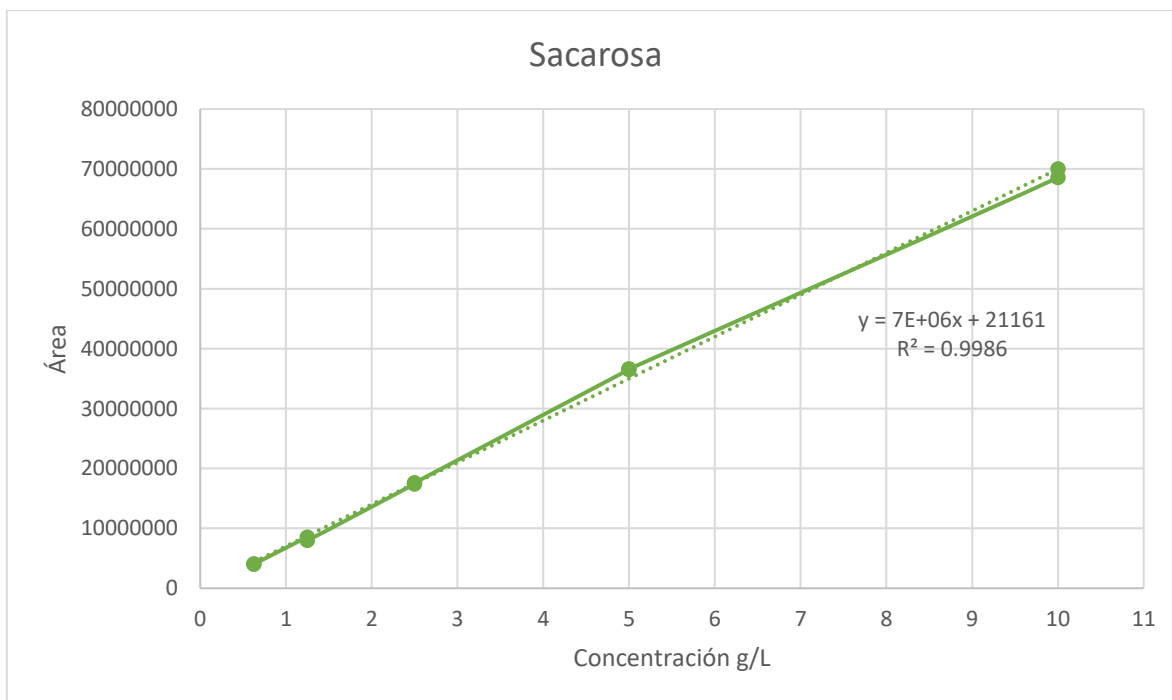


## Anexo 6

### Curva de calibración de sacarosa en HPLC

#### Áreas bajo la curva

Sacarosa (g/L)	R1	R2	Promedio
0	0	0	0
0.625	4060426	4026515	4043470.5
1.25	8522466	7986769	8254617.5
2.5	17416888	17601999	17509443.5
5	36524298	36605876	36565087
10	68564470	70027432	69295951

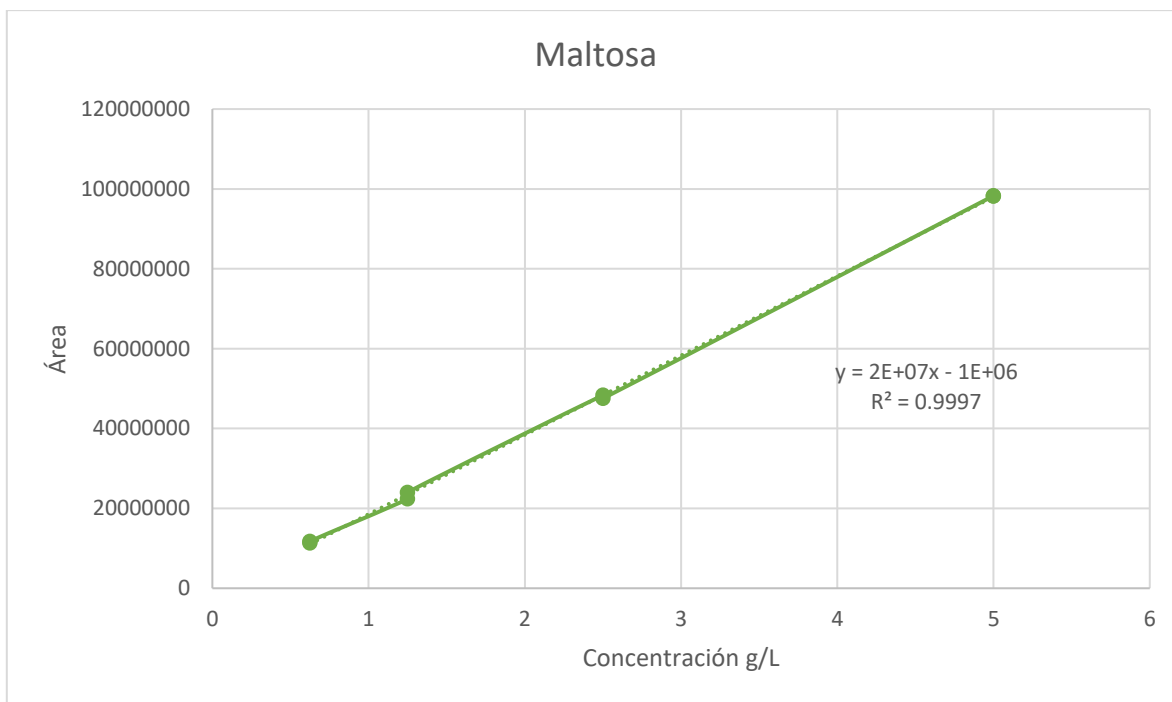


## Anexo 7

### Curva de calibración de maltosa en HPLC

#### Áreas bajo la curva

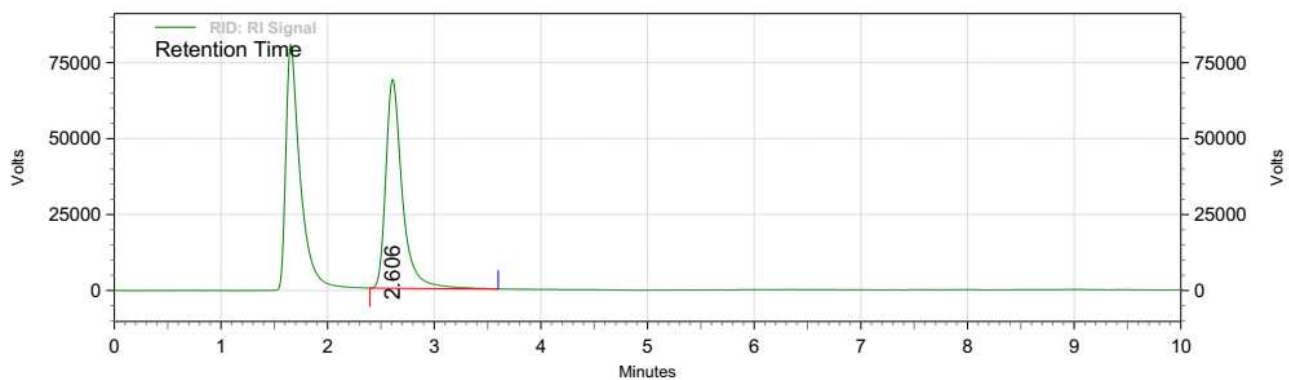
Maltosa (g/L)	R1	R2	Promedio
0	0	0	0
0.625	5816231	5749790	5783010.5
1.25	11374531	11787265	11580898
2.5	22382397	24034609	23208503
5	48339526	47539604	47939565
10	98273648	98199150	98236399



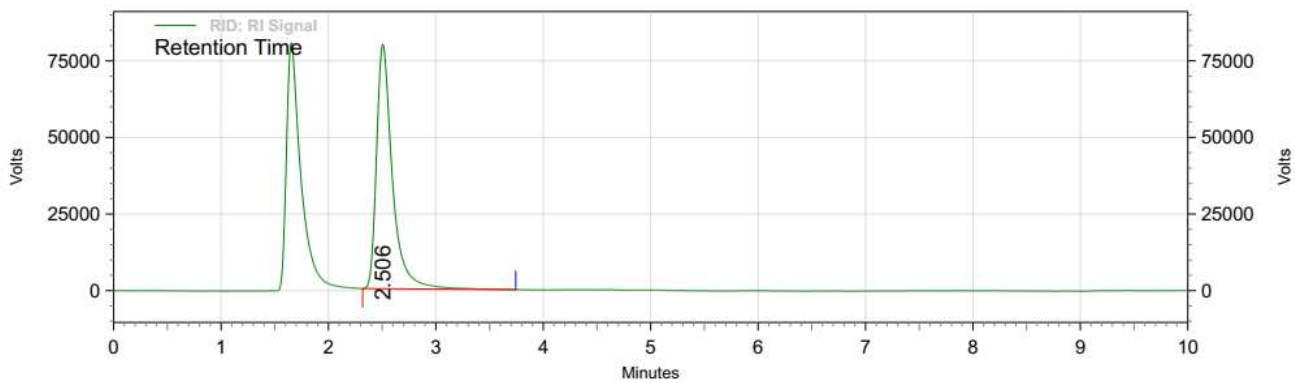
## Anexo 8

Cromatogramas de los estándares usados para la identificación de los azúcares fermentables.

Glucosa

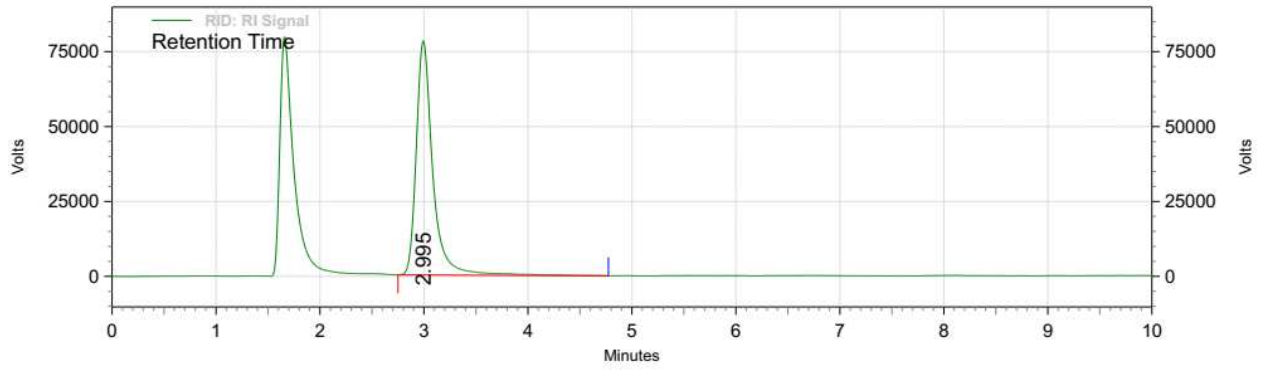


Fructosa

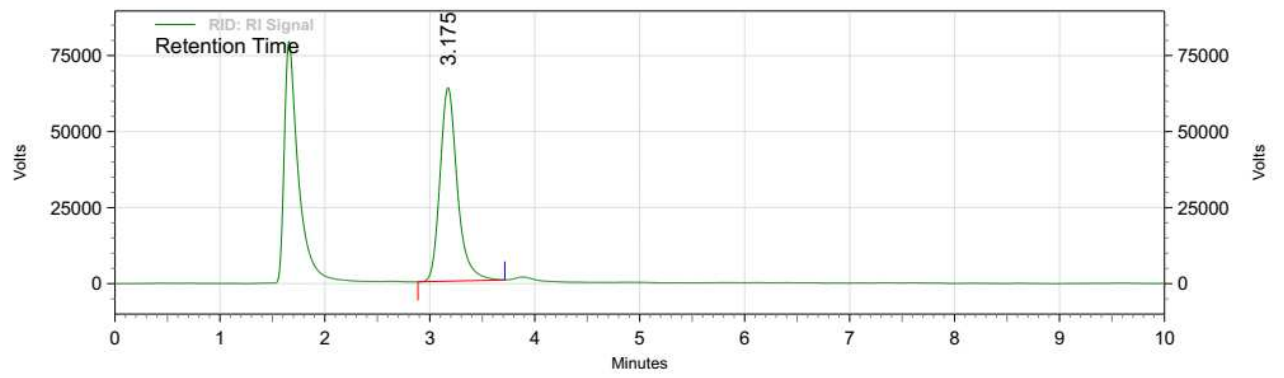




## Sacarosa



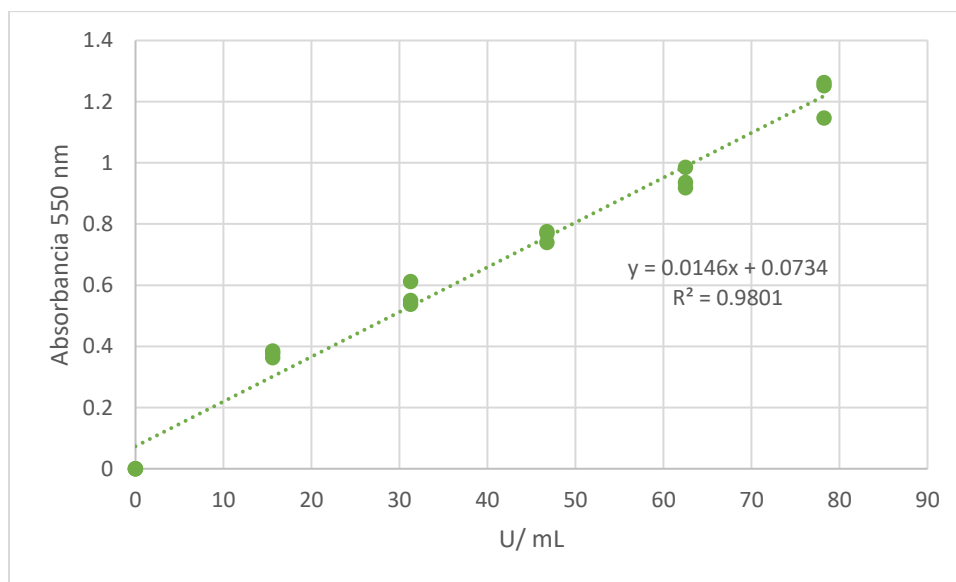
## Maltosa



## Anexo 9

### Curva de calibración de actividad amilasa

Amilasa (U/ mL)	R1	R2	R3	Promedio
0	0	0	0	0
15.60	0.363	0.377	0.385	0.375
31.25	0.538	0.550	0.612	0.567
46.75	0.775	0.740	0.769	0.761
62.50	0.919	0.936	0.986	0.947
78.25	1.263	1.147	1.252	1.221

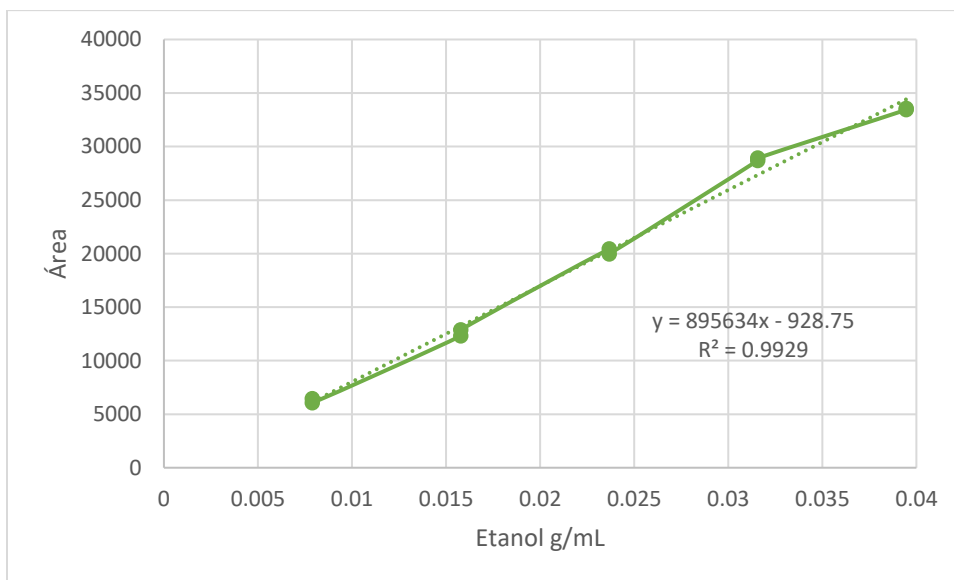


## Anexo 10

### Curva de calibración de concentración de etanol

#### Áreas bajo la curva

Etanol (g/mL)	R1	R2	Promedio
0	0	0	0
0.00789	6462	6058.99	6260.50
0.01578	12308.51	12888.98	12598.75
0.02367	20428.88	19973.42	20201.15
0.03156	28688.21	28917.81	28803.01
0.03945	33429.58	33552.68	33491.13



### Anexo 11

#### Medio Agar glucosa-extracto de levadura-peptona (GELPA)

Glucosa	20 g
Extracto de levadura	<b>5 g</b>
Peptona de caseína	<b>10 g</b>
Agar	<b>20 g</b>
H <sub>2</sub> O	<b>1 L</b>

### Anexo 12

#### Medio glucosa-extracto de levadura-peptona (GELP)

Glucosa	20 g
Extracto de levadura	<b>5 g</b>
Peptona de caseína	<b>10 g</b>
H <sub>2</sub> O	<b>1 L</b>

### Anexo 13

#### Medio Agar- papa-dextrosa (PDA)

Extracto de papa	40 g
Dextrosa	<b>4 g</b>
Agar	<b>3g</b>
H <sub>2</sub> O	<b>1 L</b>

## Anexo 14

### Medio papa-dextrosa

Papa	200 g
Dextrosa	<b>20 g</b>
H <sub>2</sub> O	<b>1 L</b>

## Anexo 15

### Medio harina de ramón

Harina de ramón	15 g
Agar	<b>20 g</b>
H <sub>2</sub> O	<b>1 L</b>

## Anexo 16

### Medio Agar extracto de levadura- extracto de malta-peptona-gluosa (YMPG)

Glucosa	10 g
Extracto de levadura	<b>3 g</b>
Extracto de malta	<b>3 g</b>
Peptona de caseína	<b>5 g</b>
H <sub>2</sub> O	<b>1 L</b>

## Anexo 17

### Medio Agar extracto de levadura- extracto de malta-peptona-gluosa (YMPGA)

Glucosa	10 g
Extracto de levadura	3 g
Extracto de malta	3 g
Peptona de caseína	5 g
Agar	20 g
H <sub>2</sub> O	1 L

## Anexo 18



Incubadora utilizada para cultivar y mantener a los hongos, levaduras y fermentación.

## Anexo 19



Incubadora Scorpion con control de temperatura y agitación que se utilizó durante la hidrólisis de la harina de semillas de ramón.

## Anexo 20



Cromatógrafo de alta resolución (HPLC) Agilent 1260 Infinity II Manual Injector

## Anexo 21



Microdestilador.