



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE
BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA

**“Implementación de un proceso secuencial para la obtención de
etanol a partir de bagazo de caña con *Cellulomonas flavigena* PR-
22 y *Cryptococcus humicola* OJ-31”**

T E S I S

Que presenta

ENRIQUE GONZÁLEZ BAUTISTA

Para obtener el grado de

MAESTRO EN CIENCIAS

En la especialidad de

BIOTECNOLOGÍA

Directora de tesis

DRA. MARÍA TERESA PONCE NOYOLA

México, D.F.

Enero, 2016

Créditos

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de Genética microbiana del departamento de Biotecnología y Bioingeniería del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV) unidad Zacatenco.

El apoyo de esta tesis de maestría tuvo el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) a través de la beca número 297947 y el financiamiento del proyecto número CB/2014-236895 de CONACyT

Dedicatoria

Agradezco a mis padres básicamente por todo, siempre me han apoyado y este proyecto no fue la excepción, siempre estuvieron ahí para cuidarme, aconsejarme y hacerme ver que tengo todas las herramientas necesarias para triunfar en esta vida, además de haber confiado en las elecciones que he tomado durante toda mi vida y que me han llevado hasta donde estoy en este momento. Gracias porque sé que siempre podré confiar en ustedes ya que son, han sido y serán uno de los pilares más importantes en mi vida.

A mi familia ya que a pesar de ser una familia un tanto complicada siempre hemos podido tener ese lazo que nos une, gracias por enseñarme que siempre puedes contar con la familia en la adversidad y en gran medida al éxito de este proyecto.

A mis compañeros/amigos de maestría, que me enseñaron lo afortunado que puedo ser al haberme encontrado con personas tan increíbles como ustedes, a mis amigos del laboratorio 17 de genética microbiana Javier, Citlalli, Jessica, Lety y Carlos por su apoyo, amistad y cariño.

A mis asesores, la Dra. Ana, el Dr. Eliseo y el Dr. Poggi con los que siempre puede contar cuando los necesité, además de siempre tener palabras de aliento y consejos académicos y personales, en especial la Dra. Teresa Ponce por la oportunidad de ser parte de su equipo de trabajo y brindarme el apoyo necesario para culminar de manera exitosa este proyecto.

Contenido

| | |
|--|----|
| 1. Introducción | 1 |
| 1.1. Combustibles fósiles | 1 |
| 1.2. Bioetanol..... | 2 |
| 1.3. Bagazo de caña | 5 |
| 1.4. Celulosa | 5 |
| 1.5. Hemicelulosa | 6 |
| 1.6. Lignina..... | 7 |
| 1.7. Compuestos fenólicos..... | 8 |
| 1.8. Pretratamiento | 9 |
| 1.9. Microorganismos productores de celulasas | 10 |
| 1.10. <i>Cellulomonas flavigena</i> PR-22 | 10 |
| 1.11. Inhibidores de la fermentación alcohólica..... | 11 |
| 1.12. Sacarificación | 12 |
| 1.13. Producción de etanol celulósico | 14 |
| 1.14. Proceso secuencial para la producción de bioetanol | 15 |
| 2. Justificación | 17 |
| 3. Hipótesis general | 18 |
| 4. Objetivo general | 19 |
| 5. Estrategia general de trabajo | 19 |
| 6. Metodología | 20 |
| 6.1. Microorganismos y condiciones de cultivo..... | 20 |
| 6.2. Medio Mineral | 20 |
| 6.3. Producción de holocelulasas en medio M10 y M25 | 21 |
| 6.4. Preparación de las muestras..... | 21 |
| 6.5. Lisis bacteriana | 21 |
| 6.5.1. Lisis térmica | 22 |
| 6.5.2. Lisis enzimática | 22 |
| 6.5.2.1. Lisozima industrial | 22 |
| 6.5.2.2. Lisozima grado reactivo | 22 |

| | |
|--|----|
| 6.5.3. Lisis mecánica | 23 |
| 6.6. Efecto de las perlas de acero sobre la actividad enzimática..... | 23 |
| 6.7. Actividades enzimáticas..... | 24 |
| 6.7.1. β -glucosidasa | 24 |
| 6.7.2. CMCasa | 24 |
| 6.7.3. Xilanasas | 25 |
| 6.8. Determinación de azúcares reductores..... | 25 |
| 6.9. Determinación de proteína | 26 |
| 6.10. Sacarificación | 26 |
| 6.11. Determinación de compuestos fenólicos | 27 |
| 6.12. Inhibición enzimática por compuestos fenólicos..... | 27 |
| 6.13. Prevención de la inhibición enzimática con PVP y PEG | 28 |
| 6.14. Producción de etanol..... | 29 |
| 6.15. Cuantificación de etanol | 29 |
| 7. Resultados y Discusión | 30 |
| 7.1. Producción de holocelulasas y β -glucosidasa de <i>C. flavigena</i> PR-22 en medios M10 y M25. | 30 |
| 7.2. Obtención de la β -glucosidasa de <i>C. flavigena</i> PR-22..... | 33 |
| 7.2.1. Lisis térmica | 33 |
| 7.2.2. Lisis enzimática | 36 |
| 7.2.3. Lisis mecánica | 37 |
| 7.3. Efecto de las perlas de acero sobre la actividad enzimática..... | 38 |
| 7.4. Inhibición enzimática por compuestos fenólicos..... | 39 |
| 7.5. Producción de glucosa y xilosa durante la sacarificación del bagazo de caña..... | 45 |
| 7.6. Producción de etanol a partir de la sacarificación del bagazo de caña | 46 |
| 7.7. Fermentación enriquecida con glucosa y xilosa | 47 |
| 8. Conclusiones..... | 51 |
| 9. Perspectivas..... | 52 |
| 10. Bibliografía..... | 53 |

Índice de figuras

| | |
|--|----|
| Figura 1: Estructura genera de la celulosa | 6 |
| Figura 2: Estructura general de la hemicelulosa | 7 |
| Figura 3: Compuestos fenólicos monocíclicos y policíclicos presentes en la estructura de la lignina. | 8 |
| Figura 4: Cambio estructural de la lignocelulosa después del pretratamiento. | 10 |
| Figura 5: Degradación de la celulosa por acción enzimática en diferentes regiones del polímero | 13 |
| Figura 6: Diagrama general de trabajo | 19 |
| Figura 7: Actividad de xilanasas, CMCasas y β -glucosidasa producidas por <i>C. flavigena</i> PR-22 en medio M10 y M25 | 32 |
| Figura 8: Cinética de liberación de β -glucosidasa durante la lisis térmica de <i>C. flavigena</i> PR-22. | 34 |
| Figura 9: Proteína soluble liberada utilizando lisozima Sigma y lisis térmica | 35 |
| Figura 10: Actividad de β -glucosidasa de <i>C. flavigena</i> PR-22 liberada utilizando lisozima industrial Biogreen | 36 |
| Figura 11: Actividad de A) xilanasas y B) CMCasas remanentes de <i>C. flavigena</i> PR-22 agregando perlas de acero en la sacarificación utilizando Solka floc como fuente de carbono | 39 |
| Figura 12: Inhibición enzimática de A) xilanasas y B) CMCasas por adición de compuestos fenólicos. | 40 |

| | |
|---|----|
| Figura 13: Adsorción de catequina por PVPP a través de puentes de hidrógeno entre el donador de protones del compuesto fenólico y el grupo carbonilo del PVPP. | 41 |
| Figura 14: A) Azúcares reductores, B) actividad de xilanasas y C) CMCasas obtenidos antes y después de la sacarificación añadiendo polímeros en la producción de enzimas | 44 |
| Figura 15: Actividad de β -glucosidasa al final de la sacarificación añadiendo polímeros en la producción de enzimas | 45 |
| Figura 16: Cantidad de azúcares y etanol al final de la fermentación enriquecida con 1% de glucosa | 48 |
| Figura 17: Xilosa y etanol al final de la fermentación enriquecida con 1% de xilosa | 49 |
| Figura 18: Rutas metabólicas posibles para la utilización de xilosa y ribosa por levaduras | 50 |

Índice de tablas

| | |
|---|----|
| Tabla 1: Análisis de la lisis bacteriana por método mecánico | 23 |
| Tabla 2: Degradación de bagazo de caña utilizando medios M10 y M25 | 33 |
| Tabla 3: Identificación de azúcares reductores, actividad de β -glucosidasa y compuestos fenólicos totales (CFT) utilizando lisis mecánica | 37 |
| Tabla 4: Azúcares simples producidos en la sacarificación del bagazo de caña | 46 |
| Tabla 5: Cantidad de azúcares remanentes y etanol producido durante la fermentación de los sacarificados de bagazo de caña utilizando la levadura <i>C. humicola</i> OJ-31 | 47 |

Resumen

Se implementó un proceso secuencial de producción de enzimas, sacarificación y fermentación para la producción de etanol de segunda generación, a partir de bagazo de caña utilizando las cepas de *C. flavigena* PR-22 y *C. humicola* OJ-31. En la etapa de producción de enzimas, de los mecanismos evaluados para la lisis de *C. flavigena* PR-22 y la liberación de la β -glucosidasa, sólo con el proceso mecánico se logró obtener 0.18 UI/ml. También se evaluó el efecto inhibitorio de los compuestos fenólicos (CF) sobre las holocelulasas de *C. flavigena* PR-22 liberados durante la sacarificación y se observó una inhibición del 75 y 65 % de la actividad de xilanasas y CMCasa con 100 y 50 $\mu\text{g/ml}$ de CF respectivamente. Para evitar la inhibición enzimática por los CF, el PVP360 aumentó 35 % la producción de azúcares reductores y logró el triple de actividad remanente de β -glucosidasa al finalizar la sacarificación. El PVP40 aumentó 47 % la actividad de xilanasas y el PEG logró mantener la actividad de CMCasas hasta el final de la sacarificación. La cantidad de alcohol obtenido al final del proceso fue muy baja debido a la cantidad baja de azúcares simples fermentables como la glucosa durante la sacarificación. No obstante se pudo implementar el proceso secuencial en la producción de etanol.

Abstract

A sequential process for production of enzymes, saccharification and fermentation was implemented for the production of second generation ethanol since sugarcane bagasse using of *C. flavigena* PR-22 and *C. humicola* OJ-31. In the enzymes production step, were evaluated some mechanism for the lysis of *C. flavigena* PR-22 and the release of β -glucosidase, only using the mechanical mechanism was able to obtained 0.18 IU / ml. The inhibitory effect of phenolic compounds (PC) released during the saccharification on holocelulasas of *C. flavigena* PR-22 was also evaluated and inhibition of 75 and 65 % of the xylanase and CMCase activity was observed adding 100 and 50 μ g / ml of PC respectively. In order to prevent enzyme inhibition by the PC, some polymers were added like the PVP360 that increased production of reducing sugars by 35% and achieved triple remaining activity of β -glucosidase at the end of the saccharification. PVP40 increased 47 % the activity of xylanases and the PEG addition maintained the activity of CMCases until the end of the saccharification. The amount of alcohol obtained at the end of the process was very low due to the low amount of simple fermentable sugars such as glucose produced during saccharification. However the implementation of the sequential process in ethanol production was able.

1. Introducción

1.1. Combustibles fósiles

La población del mundo depende en gran medida del petróleo. En una u otra de sus muchas formas se usa cotidianamente ya sea como combustible, precursor de compuestos químicos así como en la producción de polímeros sintéticos, entre otros (Gassner & Maréchal, 2013).

El petróleo se ha constituido como la fuente de energía más importante de la sociedad y es un recurso natural no renovable que aporta el porcentaje más alto del total de la energía que se consume en el mundo. Actualmente, el posible agotamiento de las reservas probadas de petróleo ha sido mencionado por algunos observadores como un riesgo latente, ya que al ritmo actual de consumo, las reservas mundiales conocidas se agotarían en 53 años. Por ello, los países que no cuentan con suficientes reservas de petróleo para cubrir sus necesidades, principalmente los desarrollados, buscan nuevas formas de energía, como la nuclear, las renovables o los bio-energéticos, que a la larga puedan resultar más económicas por sus costos bajos de operación (SENER, 2013).

Particularmente en México las reservas probadas de petróleo (11,000 millones de barriles) parecen no ser suficientes para satisfacer las necesidades de la población ya que en menos de 20 años se han consumido 4/5 de las reservas probadas. A este ritmo de consumo se originará una crisis energética en nuestro país (Statistical Review of World Energy, 2015).

1.2. Bioetanol

La conversión de biomasa lignocelulósica a bioetanol es actualmente una de las opciones más populares para la producción sostenible de combustible a partir de recursos renovables (Gassner & Maréchal, 2013).

El bioetanol aparte de ser utilizado como biocombustible, ofrece la oportunidad de ser utilizado como aditivo de la gasolina, en lugar de su sustituto. Los productos petroleros de mayor uso en muchos países son las gasolinas, éstas contienen aditivos químicos llamados oxigenantes. Los oxigenantes permiten que exista la combustión completa en los motores. De esta forma se consigue reducir los gases emitidos a la atmósfera. Existen muchos tipos de oxigenante utilizados para las gasolinas como los alcoholes, el tetra etilo de plomo y éteres. El MTBE (metil-tercbutil éter), el cual es ampliamente utilizado como oxigenante es considerado un compuesto potencialmente tóxico para la salud del ser humano y causante de problemas ambientales, es por ésto que el etanol podría ser una mejor alternativa al uso del MTBE como oxigenante de gasolinas ya que no es tóxico y no representa un problema al medio ambiente.

La obtención de bioetanol a partir de biomasa vegetal puede ser de primera y segunda generación. El bioetanol de primera generación es obtenido a partir de materias primas ricas en sacarosa como la caña de azúcar, la melaza y la remolacha o bien con un alto contenido de almidón como el maíz, arroz, trigo o cebada. Los hidratos de carbono producidos por las plantas durante la fotosíntesis representan un sustrato donde crecen levaduras y bacterias que

generan etanol como producto de su metabolismo. En el caso de la sacarosa, el procedimiento consiste en una fermentación y posterior destilación que permite obtener directamente el bioetanol. En el caso del almidón se añade otra fase previa a la fermentación, que consiste en la hidrólisis enzimática, con glicosil-hidrolasas, para la obtención de glucosa, la cual será posteriormente fermentada.

Por otro lado, el bioetanol de segunda generación se obtiene a partir de los azúcares contenidos en la celulosa y hemicelulosa en los residuos agroindustriales. También se le ha denominado bioetanol celulósico o lignocelulósico.

Para obtener los azúcares a partir de la lignocelulosa, se requiere separar mediante un pretratamiento la lignina de la celulosa y hemicelulosa para posteriormente hidrolizarlas y obtener los carbohidratos que serán fermentados y convertidos en bioetanol. En la actualidad no existe una producción industrial importante de agrocarburos lignocelulósicos. No obstante, en países como Estados Unidos de América, Canadá, Alemania, Suecia, China y Brasil se realizan investigaciones al respecto. Se estima que de llegarse a desarrollar la tecnología apropiada, este tipo de biocarburo podría ser obtenido a partir de una gran diversidad de materia prima, tal como árboles de crecimiento rápido, paja, residuos agroindustriales y astillas de madera, así como residuos vegetales (DiTomaso *et al.* 2007).

Las perspectivas del bioetanol son que puede llegar a substituir en parte o en su totalidad el consumo de petróleo como una fuente renovable de energía

que sea amigable con el medio ambiente, aunque presenta varios retos en su producción como son:

- Desarrollar un pre tratamiento adecuado que separe la celulosa, hemicelulosa y lignina completamente del material lignocelulósico.
- Obtener una fuente de celulasas económica y confiable.
- Obtener un microorganismo que pueda fermentar tanto hexosas como pentosas.
- Desarrollar una nueva metodología para la producción de etanol con menos gasto de agua y energía la cual reduzca los costos económicos.
- La evaluación de una economía de etanol celulósico.

Es importante subrayar que existen limitaciones biológicas en el proceso de elaboración de bioetanol de segunda generación, puesto que las enzimas aún no pueden hidrolizar la celulosa de manera eficiente. Por ello, se realizan actualmente investigaciones sobre la construcción genética de microorganismos que puedan producir enzimas más eficientes, así mismo se llevan a cabo estudios sobre plantas genéticamente modificadas que tengan niveles bajos de lignina.

La biomasa lignocelulósica presenta una estructura compleja, compuesta de varias fracciones que deben ser procesadas por separado para asegurar una conversión eficiente de estos materiales a etanol. La fracción mayoritaria de la biomasa es la celulosa, compuesta por largas cadenas de glucosa unidas por enlaces β (1-4) que, a su vez, se agrupan en estructuras superiores de gran cristalinidad. Esta estructura cristalina es la que dificulta la hidrólisis de la celulosa para la obtención de azúcares fermentables. La hidrólisis de la celulosa

puede realizarse mediante procesos ácidos, alcalinos, enzimáticos entre otros (Domínguez, 2003).

1.3. Bagazo de caña

Uno de los principales residuos agrícolas que se producen en México por la industria azucarera del país, es el bagazo de caña. El bagazo de caña es el residuo del proceso de extracción de la caña de azúcar, está compuesto de celulosa, hemicelulosa y lignina. A partir de la hidrólisis enzimática de esta biomasa vegetal se pueden obtener azúcares fermentables para la producción de distintos biocombustibles entre ellos el bioetanol (Pandey *et al.*, 2000; Das & Singh, 2004). El principal uso que tiene el bagazo de caña es como combustible para producir energía térmica que se utiliza en las calderas de los ingenios, sin embargo no se consume del todo y no tiene un uso práctico definido (Alonso-Pippo *et al.* 2008). En estado fresco el bagazo de caña contiene un 40 % de agua. Suele utilizarse en la industria del papel y fibras, por la celulosa que contiene (Ardanuy *et al.* 2012).

1.4. Celulosa

Uno de los componentes principales del bagazo de caña es la celulosa. Juega un papel importante en la estructura de las paredes de la célula vegetal y es un homopolisacárido no ramificado, compuesto de unidades de β -D-glucopiranosas unidas por enlace glucosídico β 1-4. Se considera que la celulosa puede llegar a tener desde 10000 hasta 15000 unidades de glucosa por cadena. Esta estructura en forma de fibra la hace insoluble en agua (O'Sullivan, 1997).

Este polisacárido contiene en su estructura regiones amorfas con menos cristalinidad que pueden ser hidrolizadas por acción de glucanasas originando celobiosa, la cual a su vez puede ser degradada a glucosa por acción de una β -glucosidasa y dar como producto 2 moléculas de glucosa (Fig. 1).

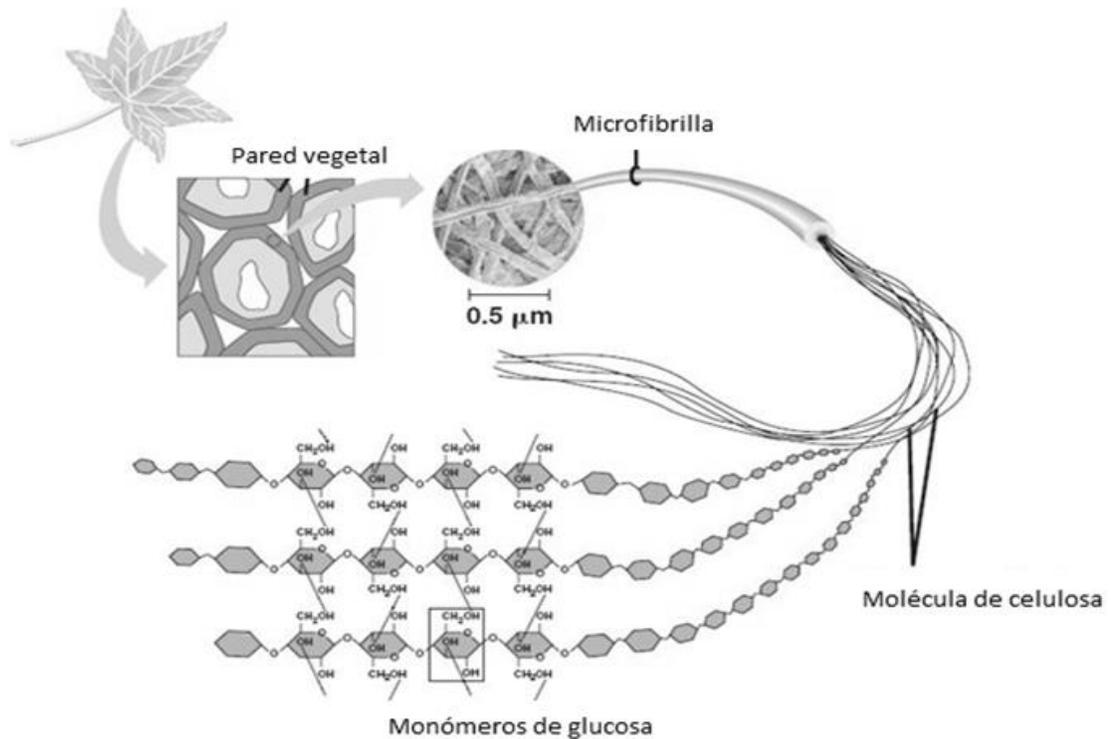


Figura 1: Estructura general de la celulosa

1.5. Hemicelulosa

La hemicelulosa o xilano, es un polisacárido constituido por una cadena lineal de residuos de xilosa y diversas ramificaciones (Fig. 2). El xilano es el polisacárido más abundante después de la celulosa. La corteza de los árboles y la paja contienen hasta 30 % de xilano, la madera de coníferas 7-12 % y la de árboles de hojas caducas 20-25 %. La cadena consta de 30-100 unidades de β -D-xilopiranosas con enlaces 1,4-glicosídicos. Algunos xilanos también presentan

arabinosa, glucosa, galactosa y glucuronato en ramas laterales unidas al C3 de la xilosa (Carrillo, 2003). El xilano es degradado más rápidamente que la celulosa por la baja cristalinidad que presenta en su estructura (Diorio *et al.*, 2003).

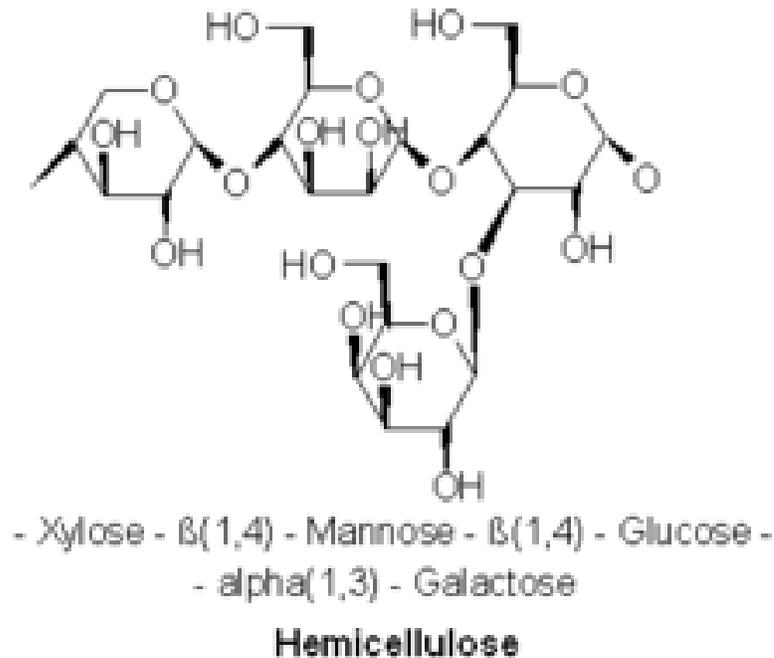


Figura 2: Estructura de la hemicelulosa (Brigham *et al.* 1996)

1.6. Lignina

La lignina es un polímero aromático complejo presente en las paredes celulares de organismos del reino *Plantae*. Después de los polisacáridos (hemicelulosa y celulosa), la lignina es el polímero orgánico más abundante en el mundo vegetal. Es importante destacar que es la única fibra no polisacárido que se conoce. La molécula de lignina presenta un elevado peso molecular, que resulta de la unión de varios ácidos y alcoholes fenilpropílicos (cumarílico, coniferílico y sinapílico) los cuales tienen como estructura base el fenol. El acoplamiento aleatorio de estos compuestos fenólicos, da origen a una

estructura tridimensional, polímero amorfo, característico de la lignina (Taiz & Zeiger, 2006).

1.7. Compuestos fenólicos

El término compuestos fenólicos (CF) engloba a todas aquellas sustancias que poseen en su estructura una unidad de fenol (nombre popular del hidroxibenceno) unido a estructuras aromáticas o alifáticas. La mayoría de los CF son polifenoles, sin embargo en su forma monomérica son llamados ácidos fenólicos (Fig. 3). Los CF tienen su origen en el reino vegetal, siendo uno de los principales metabolitos secundarios y su presencia en el reino animal se debe a la ingesta de éstos. En las plantas los fenoles son biosintetizados de *novo* y su síntesis está regulada genéticamente y como respuesta a factores ambientales involucrados. Los compuestos fenólicos actúan como fitoalexinas las cuales se secretan como respuesta a ataques fúngicos o bacterianos sobre las plantas. (Creus, 2004).

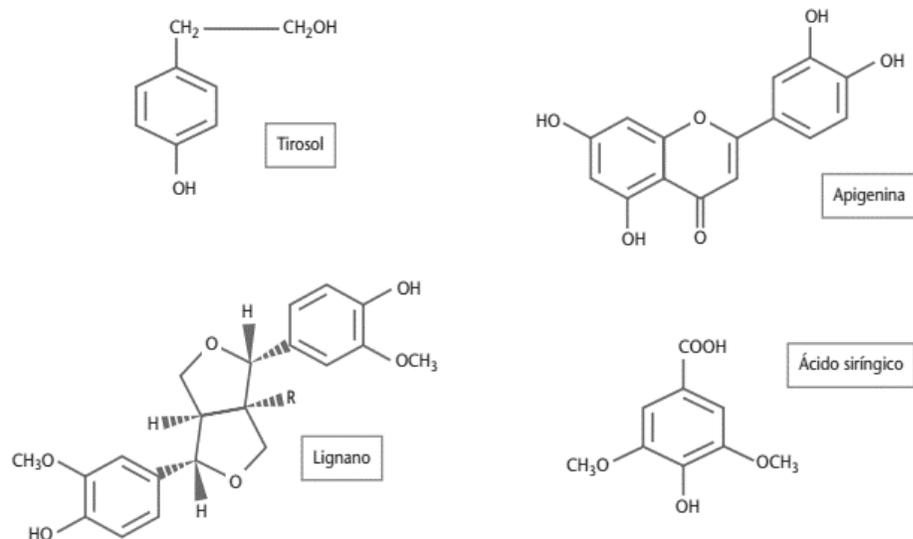


Figura 3: Compuestos fenólicos monocíclicos y policíclicos presentes en la estructura de la lignina.

1.8. Pretratamiento

Existen diferentes tipos de pretratamientos para la holocelulosa, su principal función es la de solubilizar o remover la lignina y/o hemicelulosa para aumentar el área de contacto entre las enzimas celulolíticas y la celulosa. Así mismo puede haber un rompimiento de la estructura cristalina de la celulosa, despolimerizándola parcialmente (Castro *et al.*, 2004) (Fig. 4). Los pretratamientos permiten aumentar la tasa de producción de bioetanol de segunda generación, debido a que permiten la liberación de una mayor cantidad de azúcares durante la etapa de hidrólisis (Talebnia *et al.*, 2010), incluso llegar a rendimientos de producción de etanol superiores al 20 % comparados a la hidrólisis enzimática de la biomasa vegetal sin pretratamiento (Castro *et al.*, 2004).

Un pretratamiento debe tener las siguientes características (Sun & Cheng, 2001):

- Mejorar la digestibilidad de la celulosa y la hemicelulosa en la hidrólisis enzimática posterior
- Evitar la degradación o pérdida de carbohidratos
- Evitar la formación de subproductos inhibidores para los procesos posteriores, hidrólisis enzimática y fermentación de azúcares
- Ser costo-efectivo.

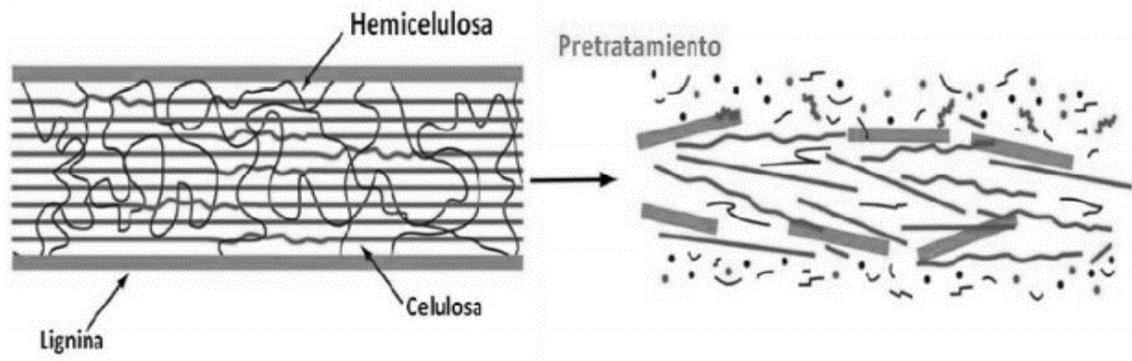


Figura 4: Cambio estructural de la lignocelulosa después del pretratamiento.

1.9. Microorganismos productores de celulasas

Las celulasas son producidas principalmente por hongos y bacterias. Dentro de los hongos los principales géneros productores de celulasas son: *Trichoderma*, *Phanerochaete* y *Fusarium*, en cuanto a las bacterias destacan los géneros *Cellulomonas*, *Clostridium* y *Bacillus* entre otros (Elberson *et al.*, 2000). Las celulasas de origen fúngico, han sido las más estudiadas por la capacidad de estos microorganismos de producirlas en grandes cantidades y de forma extracelular, facilitando su separación de los medios de cultivo (Domínguez, 2003).

1.10. *Cellulomonas flavigena* PR-22

Dentro de las bacterias celulolíticas destaca el género *Cellulomonas* por tener un sistema enzimático no agregado, así mismo por tener un metabolismo netamente respiratorio aunque también puede fermentar. Este género puede usar diversas fuentes de carbono para su crecimiento como son: glucosa,

celulosa, almidón, xilosa, arabinosa, manosa, galactosa, celobiosa, maltosa, trealosa y sacarosa (De la Torre & Casas-Campillo, 1984; Stackebrandt *et al.*, 2006). Dentro de este género se encuentra *Cellulomonas flavigena* que es un bacilo Gram-positivo mesófilo aislado de suelo (De la Torre & Casas-Campillo, 1984).

C. flavigena se ha sometido a diferentes procesos mutagénicos con el objetivo de aumentar su actividad celulolítica. De esta manera se obtuvo la mutante de alta velocidad específica de crecimiento llamada PN-120. Esta mutante mostró tener 9.4 veces más actividad de β -glucosidasa que la cepa materna utilizando salicina como sustrato, entre otras características (Ponce-Noyola & De la Torre, 1995). Con el fin de obtener una cepa resistente a altas concentraciones de glucosa, se aisló la mutante PR-22, a partir del tratamiento mutagénico con nitrosoguanidina de la cepa PN-120 (Rojas-Rejón, 2007). La mutante PR-22 obtenida tiene una actividad xilanolítica y celulolítica de 40 U/mg y 4 U/mg respectivamente, lo que representa un aumento de 2 y 1.5 veces más que la cepa PN-120. Por lo que esta cepa destaca por su potencial biotecnológico.

1. 11. Inhibidores de la fermentación alcohólica

La producción de etanol a partir de biomasa vegetal ha demostrado ser un proceso con múltiples retos. Uno de ellos es que contiene intrínsecamente inhibidores microbianos que se liberan durante el pretratamiento y la hidrólisis enzimática, afectando el rendimiento de la fermentación. Los inhibidores pueden alterar la replicación celular, el metabolismo de azúcares, o interrumpir la integridad de la membrana celular. Se han detectado al menos cuatro clases

principales de inhibidores de la producción de etanol a partir de residuos agroindustriales, formados en la conversión de la biomasa: furfural e hidroximetil furfural (furanos), ácidos débiles y CF (Teter *et al.*, 2014).

Los CF, como la vainillina, siringaldehído y ferulato, son de los principales constituyentes de la lignina y también están vinculados a la hemicelulosa en algunos residuos de biomasa vegetal, por ejemplo, las gramíneas. Estos compuestos son capaces de incrustarse en la membrana celular de los organismos, causando pérdida de la integridad estructural. Los CF de bajo peso molecular se comportan como ácidos débiles lo que genera cambios en el pH intracelular. Para evitar este tipo de inhibidores, el proceso debe eliminar gran parte de la lignina (Teter *et al.* 2014).

1.12. Sacarificación

La sacarificación es el proceso de obtención de azúcares a partir de residuos vegetales. Este proceso se puede dar por la acción de varias enzimas holocelulolíticas (Fig. 5) como son las celulasas y xilanasas. Las celulasas involucran un complejo de, por lo menos, tres actividades diferentes. De esta manera las endo- β -1,4-glucanasas (E.C. 3.2.1.4) rompen al azar los enlaces internos de la molécula en las regiones amorfas, las exo- β -1,4-glucanasas (E.C. 3.2.1.91) remueven unidades de glucosa o celobiosa a partir del extremo libre no reductor de la cadena de celulosa, y finalmente la β -glucosidasa (E.C. 3.2.1.21) hidroliza la celobiosa producida por las actividades anteriores, dando como producto final la glucosa (Montenecourt & Eveleigh, 1979).

Por otro lado las xilanasas son un grupo de enzimas que participan sinérgicamente en la degradación de la xilana. Las más conocidas son las endo- β -D-xilanasas (E.C. 3.2.1.8), las cuales rompen al azar los enlaces glicosídicos de la cadena principal de la molécula, las β -xilosidasas (E.C. 3.2.1.37) son enzimas activas sobre oligosacáridos cortos, llevando a cabo la hidrólisis de los enlaces β -1,4-aril-xilopiranosido produciendo xilosa (Biely, 1993). Todas estas enzimas actúan en ciertas zonas de la cadena de celulosa y hemicelulosa degradándolas y liberando azúcares (hexosas y pentosas) que posteriormente por fermentación microbiana se pueden transformar a bioetanol. Actualmente se prefiere separar las pentosas de las hexosas para poder utilizar microorganismos diferentes para cada una de las fracciones; ésto es debido a que los microorganismos que fermentan ambas fracciones lo hacen de manera más lenta que los que sólo fermentan hexosas. El organismo ideal para este proceso es el que sea capaz de fermentar tanto hexosas como pentosas en una sola etapa (Cardona *et al.*, 2010).

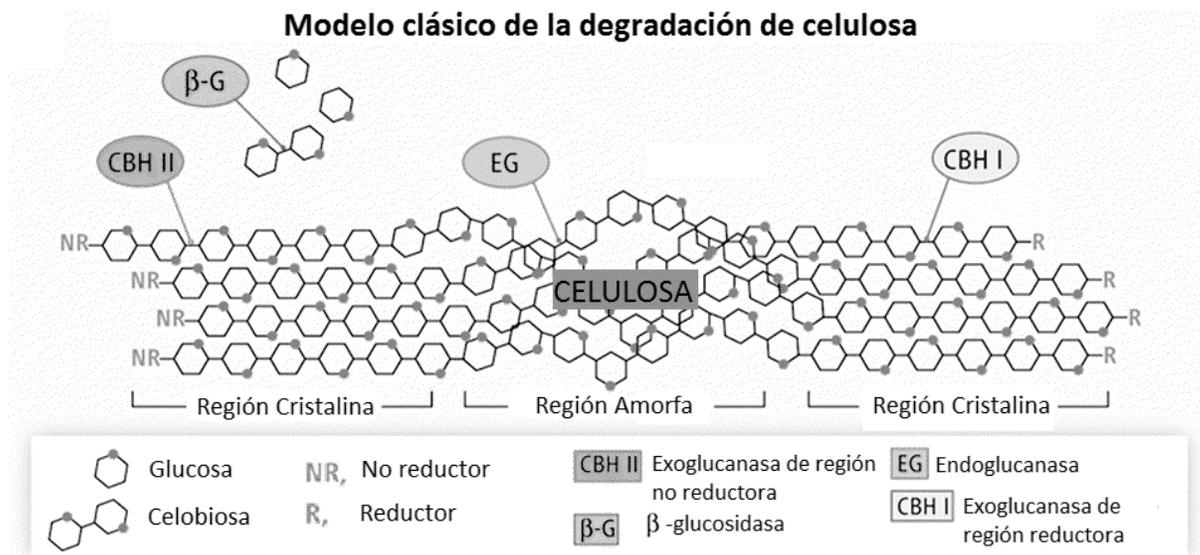


Figura 5: Degradación de la celulosa por acción enzimática en diferentes regiones del polímero

Las condiciones en las que se lleva a cabo la sacarificación deben ser favorables para las enzimas que se estén utilizando en este proceso. Por lo anterior es importante conocer la temperatura y pH óptimos en los cuales funcionan adecuadamente las celulasas y xilanasas. Las celulasas y xilanasas de *C. flavigena* han sido estudiadas y descritas previamente teniendo un intervalo de temperatura óptimo entre 50 y 55 °C y un pH óptimo de 7.0 a 9.0 (Martínez *et al.*, 2003). En el caso de la β -glucosidasa la temperatura óptima oscila entre los 40 y 45 °C con un pH óptimo en el intervalo de 6.0 a 6.5.

1.13. Producción de etanol celulósico

La producción de etanol o fermentación alcohólica, consiste en la transformación de la glucosa en etanol y CO₂ mediante microorganismos adecuados. Para un proceso fermentativo que tiene como finalidad un proceso industrial productivo es importante contar con algún microorganismo que genere un alto rendimiento de bioetanol, alta productividad y que sea capaz de tolerar altas concentraciones del producto (Talebnia *et al.*, 2010). Por lo general para este proceso se utiliza *Saccharomyces cerevisiae* la cual es una levadura que cumple con todos los requisitos antes mencionados. Sin embargo este microorganismo tiene ciertas desventajas como es la deficiencia de utilizar celobiosa y/o xilosa para producir etanol (Talebnia *et al.*, 2010).

Por otro lado existen levaduras como *Cryptococcus humicola*, la cual ha demostrado tener la capacidad de crecer en un medio con azúcares provenientes de la hidrólisis de bagazo de caña (hexosas, pentosas y oligosacáridos), detectándose ciertos niveles de etanol (González-García,

2009). *Cryptococcus humicola* fue aislada de mostos de mezcal de la zona mezcalera de Oaxaca y en estudios previos se observó que esta levadura tiene la capacidad de utilizar para su crecimiento diversas fuentes de carbono como glucosa, xilosa, galactosa, celobiosa entre otras. Así mismo, para la producción de bioetanol se han observado buenos rendimientos tanto en glucosa como en celobiosa, sin embargo en xilosa los niveles de producción son muy bajos. Para mejorar los rendimientos de producción de etanol de esta levadura, se ha realizado mutagénesis aleatoria con nitrosoguanidina (NTG), de las mutantes obtenidas se seleccionó la cepa OJ-31 con la cual se obtuvo una producción de 5.5 g/l de etanol, 250 % la producción de la cepa silvestre. (Ocampo-Ortega, 2011).

1.14. Proceso secuencial para la producción de bioetanol

El proceso tradicional para la producción de etanol celulósico comprende principalmente tres grandes pasos: producción de las enzimas celulolíticas; sacarificación del sustrato y fermentación de los azúcares en el sacarificado. Estos pasos se llevan a cabo de manera independiente e involucran el manejo de reactores independientes, con la consecuencia de mayor número de operaciones unitarias, consumo de energía, riesgos de contaminación, etc. Se han propuesto varias alternativas para reducir o evitar este número de pasos, entre ellos el llamado sacarificación y fermentación simultáneos (SSF por sus siglas en inglés) y el proceso secuencial. El primero consiste en un proceso en el que se realizan de manera simultánea la hidrólisis enzimática de la celulosa a glucosa (sacarificación) y la fermentación de ésta a etanol por el mismo microorganismos generalmente (Ballesteros *et al.*, 2002). El proceso secuencial propuesto consiste en llevar a cabo las 3 etapas principales del proceso de

producción de etanol de segunda generación en un mismo contenedor, lo que trae ventajas como un riesgo menor de contaminación por la disminución de la manipulación y aumentar la productividad del proceso por la reducción del tiempo de operación, así como menor consumo de energía al evitar los pasos de trasiego.

2. Justificación

La producción de biocombustibles a partir de residuos vegetales renovables, puede reemplazar en parte a los combustibles fósiles no renovables.

Estos biocombustibles son sustentables en su producción y liberan menos contaminantes al ambiente, pero el costo que representa la producción en las etapas convencionales encarece el proceso.

Por lo que la implementación de un proceso secuencial donde se hagan simultáneamente los procesos de producción de enzimas, sacarificación y fermentación utilizando cepas mejoradas genéticamente, podría aumentar los rendimientos de producción de bioetanol celulósico.

3. Hipótesis general

La implementación de un proceso secuencial de producción de enzimas, sacarificación y fermentación, utilizando cepas mutagenizadas aumentará la productividad de la producción de etanol a partir de bagazo de caña.

4. Objetivo general

Establecer un proceso secuencial de producción de bioetanol de segunda generación a partir de la sacarificación de bagazo de caña por *C. flavigena* PR-22 y fermentación por *C. humicola* OJ-31.

5. Estrategia general de trabajo

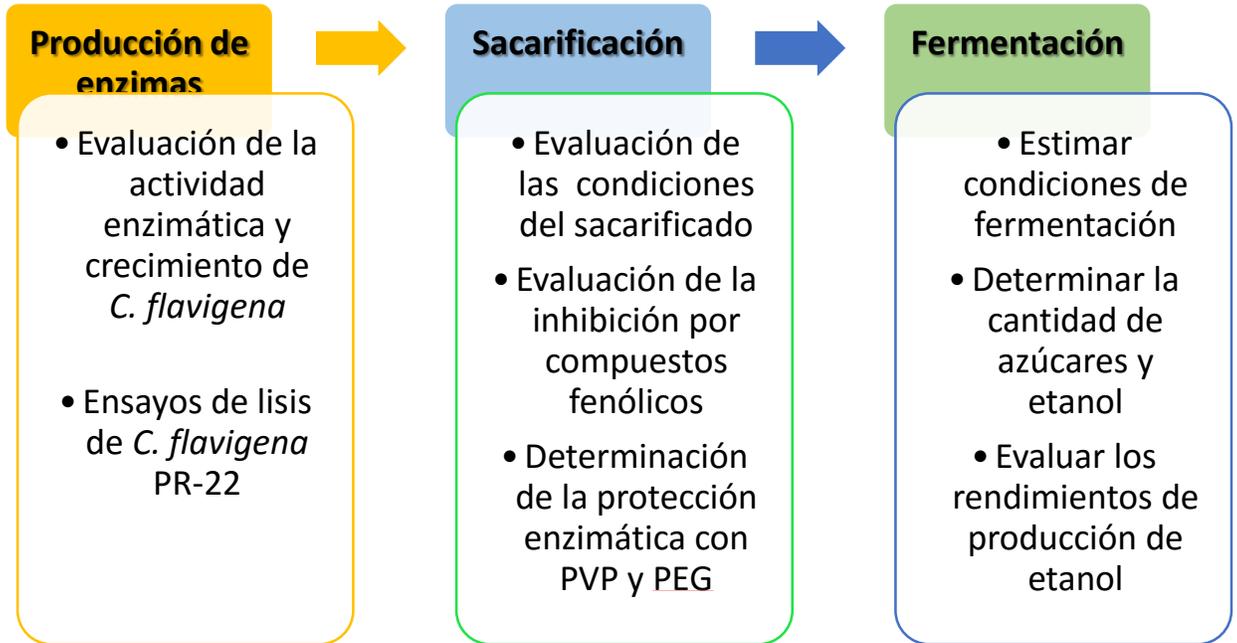


Figura 6: Diagrama general de trabajo

6. Metodología

6.1. Microorganismos y condiciones de cultivo

La cepa utilizada fue *Cellulomonas flavigena* PR-22 (Rojas-Rejón *et al.*, 2011). El inóculo se obtuvo a partir de una colonia de *C. flavigena* PR-22 crecida en placa de medio adicionado con carboximetilcelulosa (CMC) al 1 %, la cual se propagó en matraces Erlenmeyer de 250 ml conteniendo 50 ml de medio mineral y 1 % (p/v) de bagazo de caña pretratado alcalinamente (De la Torre & Casas-Campillo, 1984). Los cultivos se incubaron a 37 °C y 150 rpm durante 48 h en una incubadora rotatoria (Gyromax Orbital Incubator Shaker, Amerex Instruments, USA). Este crecimiento se propagó a un segundo matraz con medio mineral donde se incubó por 24 h más en las mismas condiciones. Finalmente el cultivo obtenido se utilizó como inóculo en una relación del 10 % (v/v) en los experimentos en matraz y en reactor.

6.2. Medio Mineral

El medio mineral (M10) que se utilizó en el presente trabajo tiene la siguiente composición en (g/l): NaCl (5.5); (NH₄)₂SO₄ (2.5); PO₄⁻³ (3.5); CaCl₂ (0.1); MgSO₄ • 7H₂O (0.1); extracto de levadura (0.02); todo ésto se disolvió en agua de la llave. El medio M25 tiene la misma composición que el M10 pero la concentración de los componentes se multiplica 2.5 veces exceptuando el NaCl. El sustrato utilizado fue bagazo de caña al 1 y 2.5 % (p/v) respectivamente.

6.3. Producción de holocelulasas en medio M10 y M25

La producción de los complejos enzimáticos se llevó a cabo en matraz Erlenmeyer de 125 ml utilizando 50 ml de medio de cultivo M10 o M25 agregando bagazo de caña como fuente de carbono. Los matraces se inocularon con *C. flavigena* PR-22 y los cultivos se incubaron a 37 °C durante 24 h a 150 rpm. Se evaluó el crecimiento y producción de CMCasa, xilanasa y β -glucosidasa.

6.4. Preparación de las muestras

Las muestras obtenidas fueron centrifugadas a 10,000 rpm durante 5 min. El paquete celular se recuperó para determinar proteína y obtener la β -glucosidasa. El sobrenadante se utilizó para las determinaciones de CMCasa, xilanasa, azúcares, proteína soluble y CF.

6.5. Lisis bacteriana

La β -glucosidasa es una enzima intracelular. Para llevar a cabo su determinación fue necesario romper las células para obtener un extracto crudo libre de células y poder cuantificarla. Se probaron diferentes técnicas con la finalidad de evaluar con cuál de ellas, se tenía mejor rendimiento enzimático.

6.5.1. Lisis térmica

Un cultivo de *C. flavigena* PR-22 de 24 h de crecimiento se incubó durante 72 horas a 50 °C (la cual es la temperatura óptima de sus holocelulasas) manteniendo las condiciones de agitación. Se realizó una cinética de liberación de la β -glucosidasa y de la proteína en el sobrenadante.

6.5.2. Lisis enzimática

6.5.2.1. Lisozima industrial

Cultivos de *C. flavigena*-PR-22 de 24 h de crecimiento fueron adicionados con la lisozima industrial (Biogreen) a diferentes concentraciones (0.4, 0.6, 0.8, 1 y 2 mg/ml). Se incubaron a 37 °C durante 3 horas y se tomó muestra cada hora. Después de ese tiempo se midió la cantidad de proteína soluble que se liberaba al medio, así como la actividad de β -glucosidasa.

6.5.2.2. Lisozima grado reactivo

Se utilizó lisozima Sigma como control positivo de la lisis de *C. flavigena* PR-22. La lisis se llevó a cabo a 37 °C durante 1 h a 150 rpm agregando 1 mg de lisozima por cada mililitro de cultivo. Después de ese tiempo se midió la cantidad de proteína soluble que se liberaba al medio, así como la actividad de β -glucosidasa.

6.5.3. Lisis mecánica

Se utilizaron perlas de vidrio o acero con diferentes diámetros así como diferente número de perlas por volumen de medio de cultivo (Tabla 1). Las perlas se adicionaron durante el proceso de sacarificación (ver más adelante). Al finalizar se evaluó la cantidad de azúcares reductores así como la actividad de la β -glucosidasa y la cantidad de CF totales liberados.

Tabla 1: Análisis de la lisis bacteriana por método mecánico

| Tratamiento | Material de perla | Diámetro de perlas (mm) | No. De perlas |
|-------------|-------------------|-------------------------|---------------|
| 1 | Vidrio | 4 | 10 |
| 2 | Vidrio | 4 | 20 |
| 3 | Acero | 2 | 20 |
| 4 | Acero | 2 | 40 |
| 5 | Acero | 4 | 10 |

6.6. Efecto de las perlas de acero sobre la actividad enzimática

Se evaluó si habría algún efecto negativo de las perlas de acero sobre las holocelulasas de *C. flavigena* PR-22 durante la sacarificación. Se utilizó un cultivo de *C. flavigena* PR-22 en medio M10 y Solka flocc BW 100 (1 %) como fuente de carbono, la cual es celulosa con una pureza de 99 %. Las condiciones de cultivo fueron 37 °C; 150 rpm durante 24 h, se evaluó la adición de 1, 2 y 3 perlas de acero en 5 ml de cultivo y se incubó en condiciones de sacarificación:

50 °C, 150 rpm durante 24 h, se determinó la actividad de xilanasas y CMCase remanente al finalizar el sacarificado.

6.7. Actividades enzimáticas

6.7.1. β -glucosidasa

Se mezclan 1 ml de para-nitrofenil β -glucopiranosido (pNPG) 1 mM en regulador de fosfatos 50 mM pH 6.2 con 100 μ l de extracto enzimático. La mezcla se incuba a 40 °C durante 15 min deteniendo la reacción con 1 ml de Na_2CO_3 1 M (modificado de Kim & Pack, 1989). El color desarrollado se lee a 405 nm en espectrofotómetro, el valor de la absorbancia se interpoló en una curva de calibración de liberación de para-nitrofenol (PNP) con un intervalo de 0 a 400 μ g/ml de sustrato.

6.7.2. CMCase

Se mezclaron 100 μ l de muestra, más 150 μ l de regulador Tris-HCl pH 7.2 y 250 μ l de carboximetilcelulosa 1 % (CMC), la reacción se incubó a 50 °C durante 3 min, se detuvo la reacción agregando 1.5 ml de DNS, se llevó a baño María en ebullición durante 5 min, posteriormente se enfrió con agua corriente. Se ajustó el volumen agregando 3 ml de agua destilada y finalmente se leyó a 550 nm en espectrofotómetro, se elaboraron un blanco de reactivo con 500 μ l de regulador con el que se calibró el equipo y un blanco de sustrato el cual contenía 250 μ l de regulador más 250 μ l de CMC. Los valores de absorbancia

obtenidos se interpolaron en una curva de calibración de celobiosa con un intervalo de 0 a 500 $\mu\text{g/ml}$ de sustrato.

6.7.3. Xilanasas

Se mezclaron 50 μl de muestra, más 950 μl de regulador citratos-fosfatos pH 7.0 y 500 μl de xilana 1 %, la reacción se incubó a 40 °C durante 5 min, se detuvo la reacción agregando 1.5 ml de DNS, se llevó a baño María en ebullición durante 5 min, posteriormente se enfrió con agua corriente. Se ajustó el volumen agregando 3 ml de agua destilada y finalmente se leyó a 550 nm en espectrofotómetro, se elaboraron un blanco de reactivo con 1.5 ml de regulador con el que se calibró el equipo y un blanco de sustrato el cual contenía 1 ml de regulador más 500 μl de xilana. Los valores de absorbancia obtenidos se interpolaron a una curva de calibración de xilosa con un intervalo de 0 a 500 $\mu\text{g/ml}$ de sustrato.

6.8. Determinación de azúcares reductores

Se mezclan 100 μl de muestra con 400 μl de agua destilada, se agrega 1.5 ml de ácido dinitrosalicílico (DNS) y se mezclan suavemente, se incuba a baño María en ebullición durante 5 minutos, al finalizar se enfrían con un baño de agua común y se agregan 3 ml de agua destilada, para finalizar se lee a 550 nm. Los valores de absorbancia obtenidos se interpolaron en una curva de calibración de glucosa con un intervalo de 0 a 500 $\mu\text{g/ml}$ de sustrato.

6.9. Determinación de proteína

La cantidad de proteína se determinó con el método de Lowry *et al.* (1951). Se mezclaron 25 μ l de muestra con 475 μ l de agua destilada, se agregaron 500 μ l de NaOH 1N posteriormente se llevaron a ebullición en baño María durante 5 min. Se enfriaron con un baño de agua corriente y se agregaron 2.5 ml del reactivo C (50 ml de Na₂CO₃ al 5 % más 1 ml de tartrato de Na y K al 2 % y 1 ml de CuSO₄ 5H₂O al 1 %). La mezcla se agitó con vortex y se dejó reposar durante 10 min, finalmente se agregaron 500 μ l de reactivo de Folin 1N, se agitó con vortex, dejando reposar la reacción durante 30 min. Finalmente se leyó a 750 nm en espectrofotómetro y se determinó la cantidad de proteína contra una curva estándar de albúmina bovina en un intervalo de 0 a 100 μ g de proteína.

6.10. Sacarificación

Las sacarificaciones se llevaron a cabo agregando 3 % (p/v) de bagazo de caña pretratado alcalinamente al reactor donde se llevó a cabo la primera etapa de producción de enzimas. Se incubó a 50 °C (temperatura óptima enzimática) durante 24 h a 150 rpm. Al finalizar esta etapa se evaluó la cantidad de azúcares reductores y azúcares libres fermentables (glucosa y xilosa), la actividad enzimática remanente de xilanasas, CMCasas y β - glucosidasa además los CF totales liberados.

6.11. Determinación de compuestos fenólicos

La determinación de compuestos fenólicos se llevó a cabo en el sobrenadante, por el método modificado de Singleton *et al.* (1999) el cual utiliza el reactivo de Folin. Se añadió un paso previo de precipitación de proteínas utilizando ácido tricloroacético (TCA) al 10 % durante 30 min a 4 °C, la muestra se centrifuga a 10,000 rpm durante 10 minutos. Los pasos a realizar son los siguientes: 250 µl de muestra se mezclaron con 250 µl de reactivo de Folin, se agitaron y se agregaron 500 µl de Na₂CO₃ al 5 %. Después se agregaron 4 ml de H₂O desionizada, se dejó reposar durante 30 min para posteriormente centrifugar a 10,000 rpm durante 10 min, se recuperó el sobrenadante y se leyó a 725 nm en espectrofotómetro.

Se evaluó el efecto del pH y proteína sobre la determinación de los CF, para ésto se hicieron controles de vainillina 0.1 % agregando TCA al 10 % y un control de proteína utilizando vainillina al 0.1 % más albúmina bovina al 1 %.

6.12. Inhibición enzimática por compuestos fenólicos

Se evaluó el efecto inhibitorio de los CF sobre las enzimas holocelulolíticas de *C. flavigena* PR-22. Se añadieron diferentes concentraciones de CF en la mezcla de reacción de cada una de las actividades enzimáticas a evaluar. Para la inhibición de xilanasas se utilizaron desde 10 hasta 100 µg de CF y para el caso de la inhibición de CMCasas se utilizaron de 10 hasta 50 µg de CF. Se midió la actividad remanente después de la interacción con el inhibidor.

La preparación de los extractos enzimáticos libres de CF, se hizo a partir de un cultivo de 24 h con medio mineral y Solka flocc al 1 % (sustrato) inoculado con *C. flavigena* PR-22 utilizando las mismas condiciones para la producción de enzimas, al finalizar se analizó la actividad de xilanasas, y CMCasas.

Los CF fueron obtenidos a partir de un sacarificado de bagazo de caña filtrado, se adicionó 10 % (v/v) de TCA concentrado al 100 % para precipitar las proteínas presentes y evitar algún falso positivo en las determinaciones enzimáticas. Después de la precipitación se procedió a neutralizar y concentrar la muestra en Speedvac modelo 5301 (Eppendorf).

6.13. Prevención de la inhibición enzimática con PVP y PEG

Se utilizaron polímeros con capacidad de adsorber los CF en su estructura, los cuales fueron: Polivinilpirrolidona PM 40,000 (PVP 40); polivinilpirrolidona PM 360,000 (PVP 360); polivinilpirrolidona insoluble (PVPP) y polietilenglicol (PEG).

Los polímeros se agregaron al 0.4 % (p/v) a cultivos de *C. flavigena* PR-22 creciendo en matraz de 125 ml con 25 ml de medio M10. Los cultivos se incubaron durante 24 h a 37 °C y 150 rpm para evaluar posteriormente la actividad de xilanasas y CMCasas así como la cantidad de CF y azúcares reductores liberados. Después se procedió con el proceso de sacarificación el cual fue durante 24 h a 50 °C a 150 rpm adicionando 10 perlas de acero de 4 mm de diámetro. Se evaluó la actividad enzimática remanente (xilanasas y CMCasas), así como la actividad de la β -glucosidasa como un marcador de lisis bacteriana. Así mismo se evaluó la cantidad de azúcares reductores producidos en el sacarificado. El control negativo no contenía ningún polímero.

6.14. Producción de etanol.

El sacarificado obtenido previamente fue inoculado (10 % v/v) con *C. humicola* OJ-31 previamente crecida en medio YPD a 30 °C por 24 h. Se purgó el medio con nitrógeno grado industrial para favorecer las condiciones anóxicas y se selló herméticamente. La fermentación se llevó a cabo a 30 °C sin agitación durante 24 h. Al finalizar la fermentación se cuantificó el etanol obtenido así como los azúcares remanentes.

6.15. Cuantificación de etanol

El etanol producido se cuantificó por medio de HPLC-IR; columna Hi-plex H⁺ 300 x 7.7 mm (Agilent). La fase móvil que se utilizó fue H₂SO₄ al 5 mM, con un flujo de 0.6 ml/min, utilizando una temperatura del detector de 50 °C y una temperatura en columna de 65 °C. Se utilizó una precolumna Hi-plex Guard Column 50 x 7.7 mm (Agilent), para la protección de la columna, las muestras fueron previamente filtradas utilizando un acrodisco de 1.3 cm de diámetro con un tamaño de poro de 0.45 µm (PALL).

7. Resultados y Discusión

El objetivo principal del presente trabajo fue establecer un proceso secuencial de producción de bioetanol a partir de bagazo de caña. Dicho proceso consistiría en llevar a cabo la producción de las holocelulasas, posteriormente la sacarificación del sustrato para obtener los azúcares fermentables y finalmente la producción de etanol. Todo lo anterior en el mismo reactor para ahorrar pasos de trasiego y disminuir los riesgos de contaminación. Se procedió a evaluar cada una de las etapas por separado para finalmente integrarlas, una vez establecidas las mejores condiciones.

7.1. Producción de holocelulasas y β -glucosidasa de *C. flavigena* PR-22 en medios M10 y M25.

La producción de las enzimas hidrolíticas para degradar el bagazo de caña, se llevó a cabo con la cepa PR-22 de *C. flavigena* creciendo en los medios M10, medio mineral usado para el crecimiento de *C. flavigena* (De la Torre & Casas-Campillo, 1984) y en medio M25 el cual tiene incrementados todos los nutrientes 2.5 veces a excepción del NaCl (De la Torre & Casas-Campillo, 1984). Se observó que no existen diferencias significativas al utilizar cualquiera de los dos medios de cultivo en la producción y actividad de xilanasas y CMCasas (Fig. 7A y 7B). Sin embargo la producción de β -glucosidasa fue mayor al utilizar el medio M25 (Fig. 7C).

Uno de los propósitos de utilizar el medio M25 fue incrementar la producción de todo el complejo holocelulolítico, ya que al tener una mayor concentración de sustrato permitiría un mayor crecimiento y por lo tanto mayor expresión de dicho complejo. Respecto al crecimiento éste si se mejoró comparado con el medio M10 (4.5 y 5.5 g/l de proteína celular respectivamente) y la actividad de la β -glucosidasa también, lo que era de esperarse ya que esta actividad se encuentra asociada a la célula (Ríos-Fránquez, 2012). Las otras actividades enzimáticas que son extracelulares, pudieron verse inhibidas o bien adsorbidas al sustrato al estar éste en altas concentraciones.

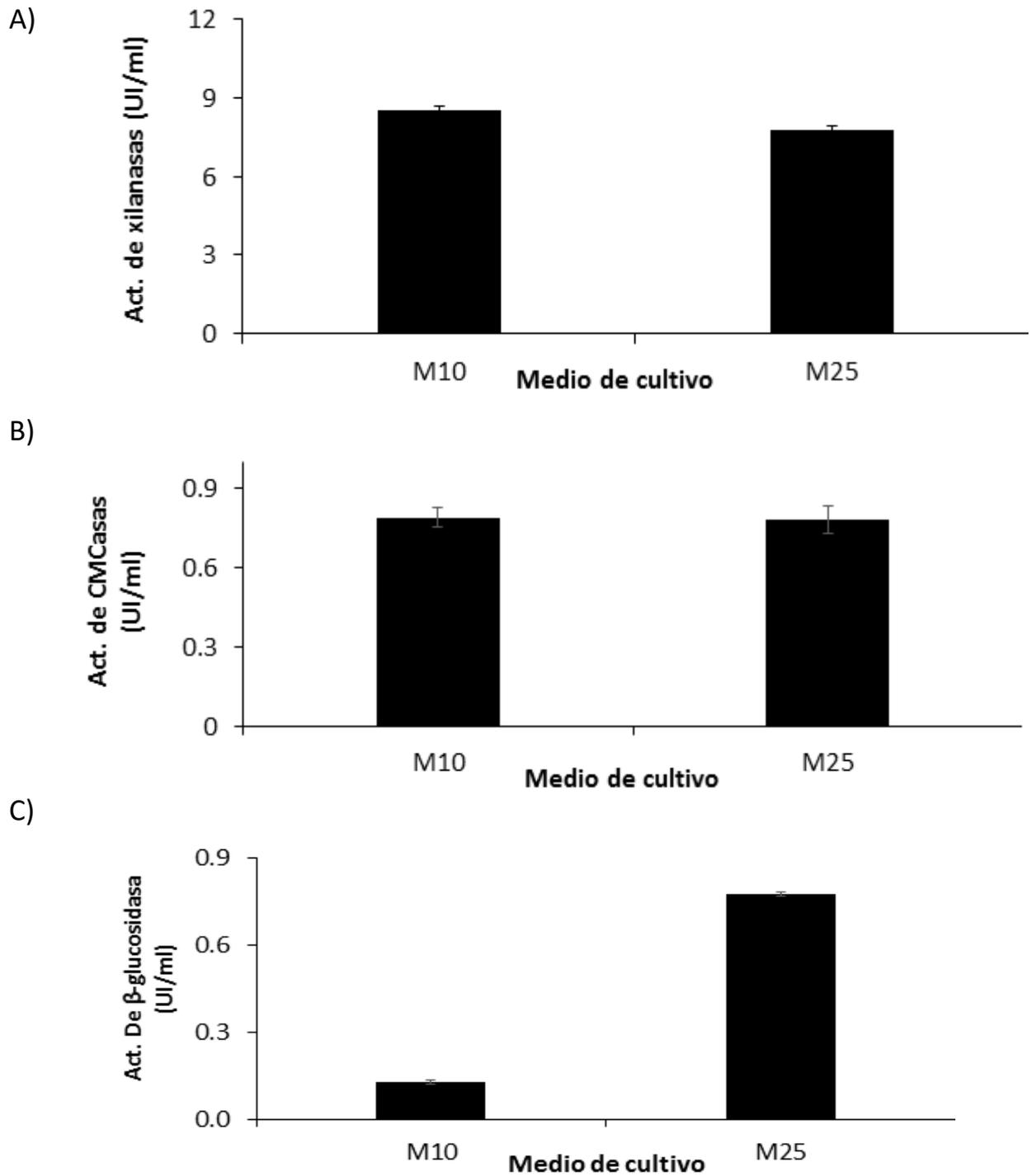


Figura 7: Actividad de xilanasas, CMCasas y β -glucosidasa producidas por *C. flavigena* PR-22 en medio M10 y M25

Finalizada la etapa de producción del complejo holocelulolítico se evaluó el consumo de sustrato en ambos medios para el cálculo de rendimiento de actividad enzimática por gramo de sustrato consumido (Tabla 2). La cantidad de bagazo de caña consumida en porcentaje fue mayor utilizando el medio M10 en comparación al medio M25. Así mismo se observó que el mejor medio para producir tanto celulasas como xilanasas es el medio M10, por lo que este medio se seleccionó para los siguientes experimentos.

Tabla 2: Degradación de bagazo de caña utilizando medios M10 y M25

| <i>Medio de cultivo</i> | <i>Bagazo inicial (g/l)</i> | <i>Bagazo consumido (g/l)</i> | <i>Yx/s xilanasas *</i> | <i>Yx/s CMCasas *</i> | <i>Yx/s β-glucosidasa *</i> |
|-------------------------|-----------------------------|-------------------------------|-------------------------|-----------------------|-----------------------------|
| M10 | 10 | 4.8 | 1.84 | 0.17 | 0.02 |
| M25 | 25 | 6.7 | 1.14 | 0.11 | 0.11 |

*UI de actividad enzimática/g de bagazo de caña consumido durante la etapa de producción de enzimas con *C. flavigena* PR-22

7.2. Obtención de la β-glucosidasa de *C. flavigena* PR-22

7.2.1. Lisis térmica

Como se describió anteriormente, la sacarificación se llevó a cabo al terminar la fase de producción de enzimas necesarias para la degradación del bagazo de caña. Sin embargo para una completa sacarificación se debe liberar la β-glucosidasa intracelular de *C. flavigena* PR-22. Por lo anterior se evaluó la lisis

de la bacteria a la temperatura de sacarificación (50 °C). Bajo estas condiciones se analizó la actividad de la β -glucosidasa y proteína soluble liberada al medio a lo largo de 72h. Durante la determinación de actividad de β -glucosidasa liberada, se utilizaron dos controles: el paquete celular de 50 ml de un cultivo de *C. flavigena* PR-22 centrifugado y resuspendido en 10 ml de regulador de fosfatos 50 mM, se concentró en un volumen de 10 ml para concentrarlo 5 veces y se lisó con una solución de lisozima (Sigma) 1mg/ml. El segundo control fue un cultivo sin concentrar pero lisado en las mismas condiciones. Para el caso de la liberación de proteína intracelular se utilizó como control el cultivo sin concentrar lisado con lisozima (Sigma) 1mg/ml (Fig. 8).

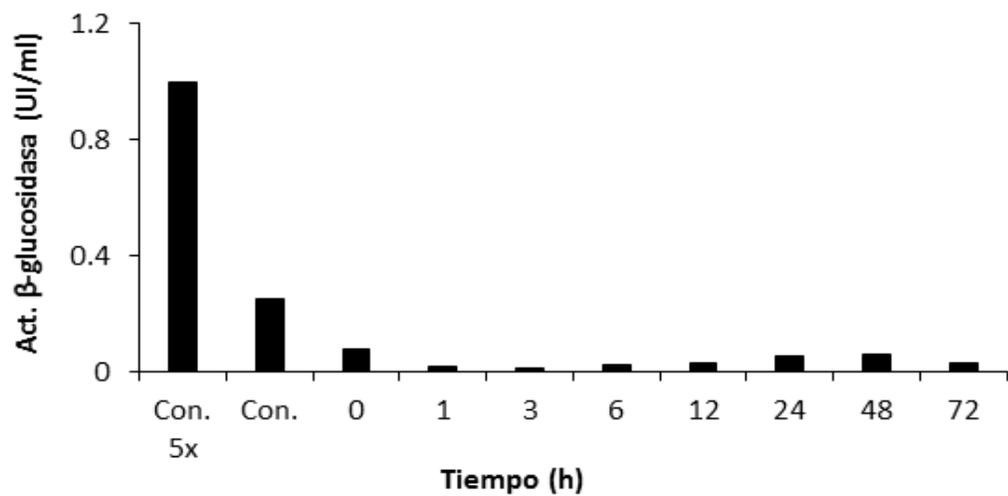


Figura 8: Cinética de liberación de β -glucosidasa durante la lisis térmica de *C. flavigena* PR-22.

Se evaluó la cantidad de proteína soluble liberada después de la lisis, la cual se comparó con un control positivo de lisis usando lisozima Sigma (Fig. 9). Se observó una baja concentración de proteína soluble por la pobre lisis bacteriana, por lo que se utilizaron otras técnicas para la lisis de *C. flavigena* PR-22 y la posterior liberación de la β -glucosidasa.

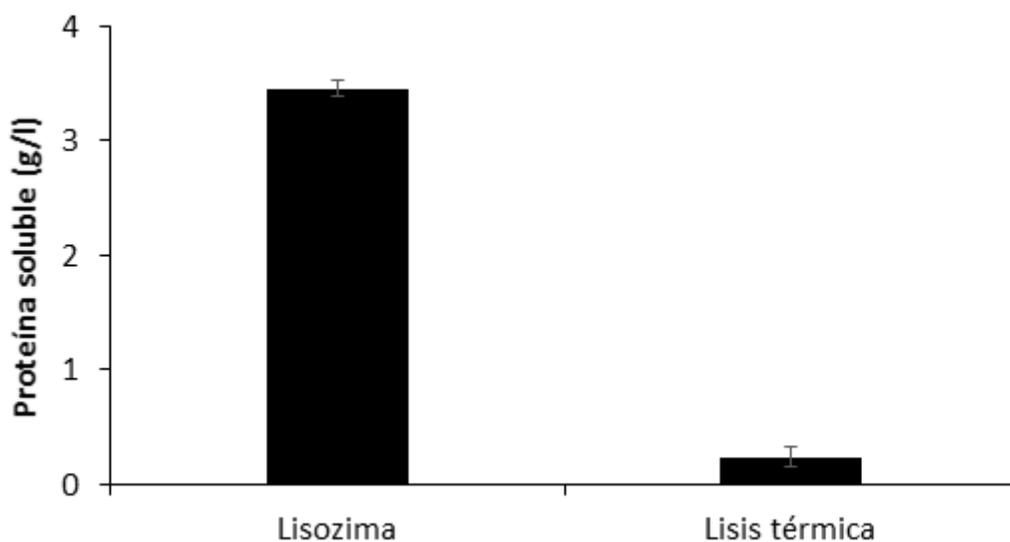


Figura 9: Proteína soluble liberada utilizando lisozima Sigma y lisis térmica

La lisis de *C. flavigena* PR-22 a 50 °C durante 72 h fue muy pobre ya que es una bacteria Gram-positiva y la pared bacteriana que posee contiene una gran cantidad de peptidoglicano lo que le confiere resistencia a la temperatura. Con base en estos resultados se decidió evaluar la lisis celular usando otros métodos.

7.2.2. Lisis enzimática

Al no tener éxito en la lisis térmica de *C. flavigena* PR-22 y la consiguiente liberación de la β -glucosidasa, se planteó llevar a cabo la lisis enzimática pero utilizando lisozima industrial (Biogreen) la cual tiene la capacidad de disminuir la DQO en efluentes de aguas residuales (comunicación personal del proveedor). Para este ensayo se utilizaron diferentes concentraciones de Biogreen y un control de lisozima Sigma de 1mg/ml. El resultado mostró que con Biogreen no se logró lisar a *C. flavigena* PR-22 ya que se observó una actividad baja de β -glucosidasa en el sobrenadante (<0.1 UI/ml) (Fig. 10).

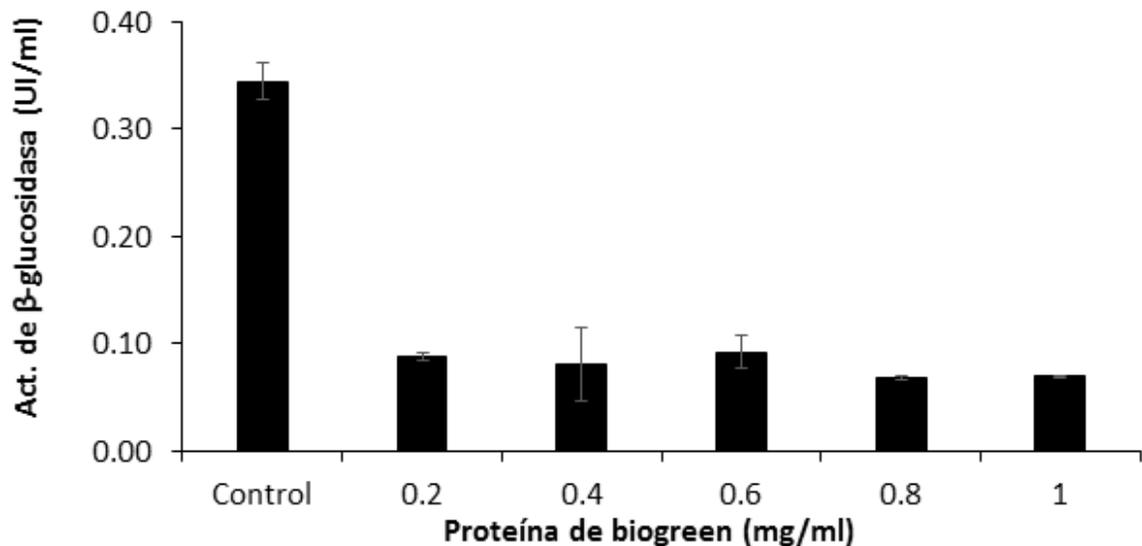


Figura 10: Actividad de β -glucosidasa de *C. flavigena* PR-22 liberada utilizando lisozima industrial Biogreen

7.2.3. Lisis mecánica

Se planteó llevar a cabo un método mecánico de lisis de *C. flavigena* PR-22 para la obtención de la actividad de β -glucosidasa en el sobrenadante. Durante este procedimiento se evaluó la actividad de la β -glucosidasa como parámetro de lisis, y los azúcares reductores producidos en la sacarificación. Así mismo se evaluó la presencia de CF, los cuales se ha reportado que en altas concentraciones llegan a inhibir la actividad holocelulolítica (Tejirian & Xu, 2011). Como se muestra en la tabla 3, el tratamiento con 10 perlas de acero de 4 mm fue el único donde se observó actividad de β -glucosidasa y la concentración más baja de CF en comparación con los otros tratamientos. Por lo anterior este tratamiento se seleccionó para los ensayos de sacarificación posteriores.

Tabla 3: Identificación de azúcares reductores, actividad de β -glucosidasa y compuestos fenólicos totales (CFT) utilizando lisis mecánica

| Material de perla | Diámetro de perlas (mm) | No. de perlas | Azúcares DNS (g/l) | Act. β-glucosidasa (UI/ml) | CFT (μg/ml) |
|--------------------------|--------------------------------|----------------------|---------------------------|--|-----------------------------------|
| Control | - | - | 4.3 | No detectable | 46 |
| Vidrio | 4 | 10 | 3.1 | No detectable | 77 |
| Vidrio | 4 | 20 | 3.6 | No detectable | 140 |
| Acero | 2 | 20 | 5.6 | No detectable | 266 |
| Acero | 2 | 40 | 5.9 | No detectable | 340 |
| Acero | 4 | 10 | 4.3 | 0.18 | 59 |

La molienda mecánica fue el único método donde se pudo obtener, en el sobrenadante, la β -glucosidasa de *C. flavigena* PR-22. Además de la liberación de la β -glucosidasa, este tratamiento favorecería la generación de zonas amorfas dentro de la estructura de la celulosa, lo que permitiría una mejor interacción entre las holocelulasas con su sustrato lo que la hace más susceptible a la degradación enzimática (Sánchez-Riaño & Gutiérrez-Morales, 2010).

7.3. Efecto de las perlas de acero sobre la actividad enzimática

Al haber seleccionado un tratamiento de molienda mecánica con perlas de acero para la lisis de *C. flavigena* PR-22, se evaluó si dichas perlas tenían algún efecto negativo sobre la actividad enzimática de xilanas y CMCasas de este microorganismo ya que se observó que mientras transcurría la sacarificación las perlas presentaban desgaste por la abrasividad del medio así como oxidación. Como se observa en la figura 11, el uso de perlas de acero no tuvo un efecto negativo significativo sobre la actividad enzimática de dichas enzimas, inclusive hubo un incremento de la actividad de éstas posiblemente por un efecto sinérgico de los iones metálicos liberados y la actividad enzimática donde estos iones pudieran actuar como aceptores de electrones o cofactores (Aggett, 1985).

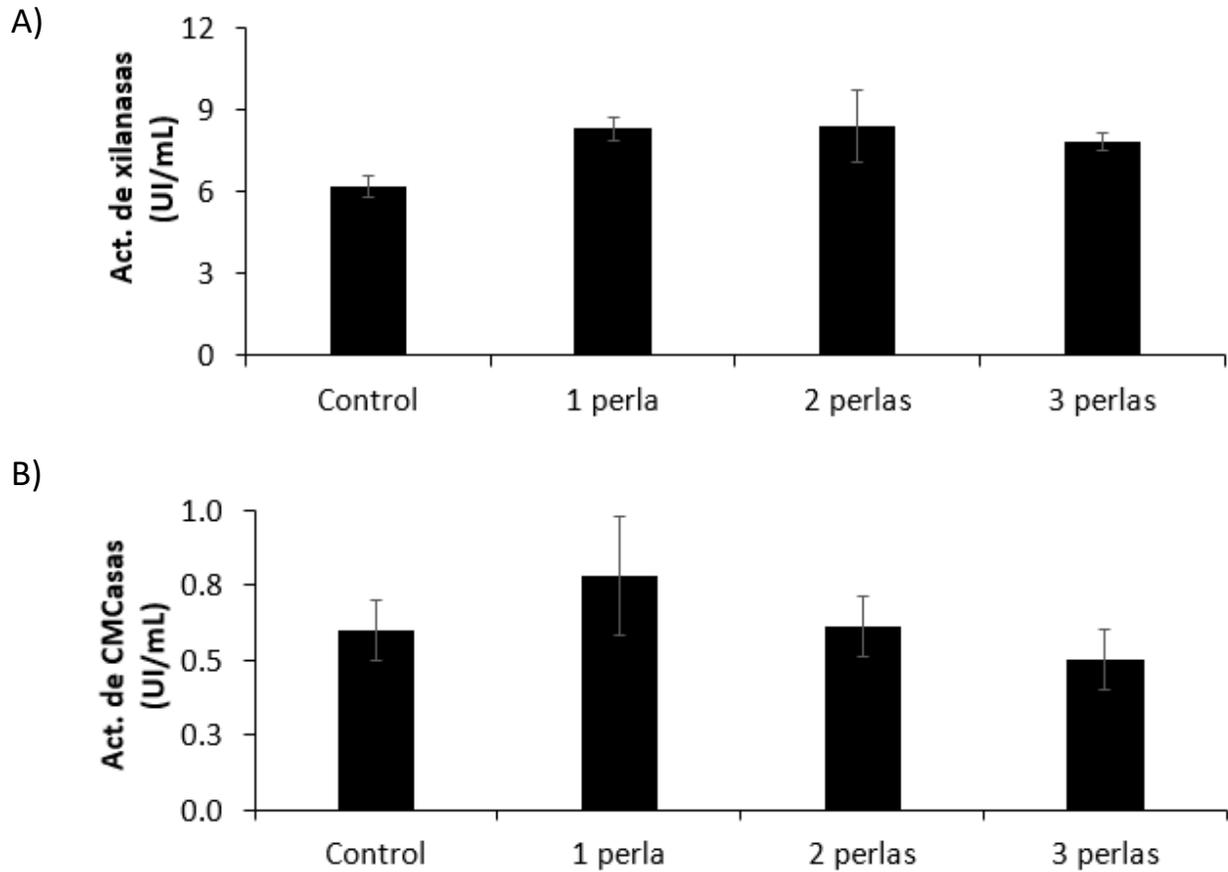


Figura 11: Actividad de A) xilanasas y B) CMCasas remanentes de *C. flavigena* PR-22 agregando perlas de acero en la sacarificación utilizando Solka flocc como fuente de carbono

7.4. Inhibición enzimática por compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos están contenidos dentro de la estructura del bagazo de caña, los cuales tienen actividad antimicrobiana inhibiendo las enzimas bacterianas y fúngicas (Tejirian & Xu, 2011). Por lo anterior se decidió evaluar el efecto que podrían tener estos compuestos sobre las holocelulasas de *C. flavigena* PR-22 durante el proceso de sacarificación. Cabe señalar que los CF

se obtuvieron de un concentrado resultante de la degradación de bagazo de caña a las condiciones de sacarificación. Las xilanasas y CMCasas se obtuvieron a partir de un extracto crudo enzimático de un cultivo de *C. flavigena* PR-22 creciendo en Solka flocc (celulosa 99 %) como sustrato libre de CF. Se evaluaron diferentes concentraciones de CF sobre la actividad de xilanasas y CMCasas. Como se puede observar en la figura 12 se obtuvo una inhibición de 75 y 65 % para la actividad de xilanasas y CMCasa con 100 y 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de CF respectivamente.

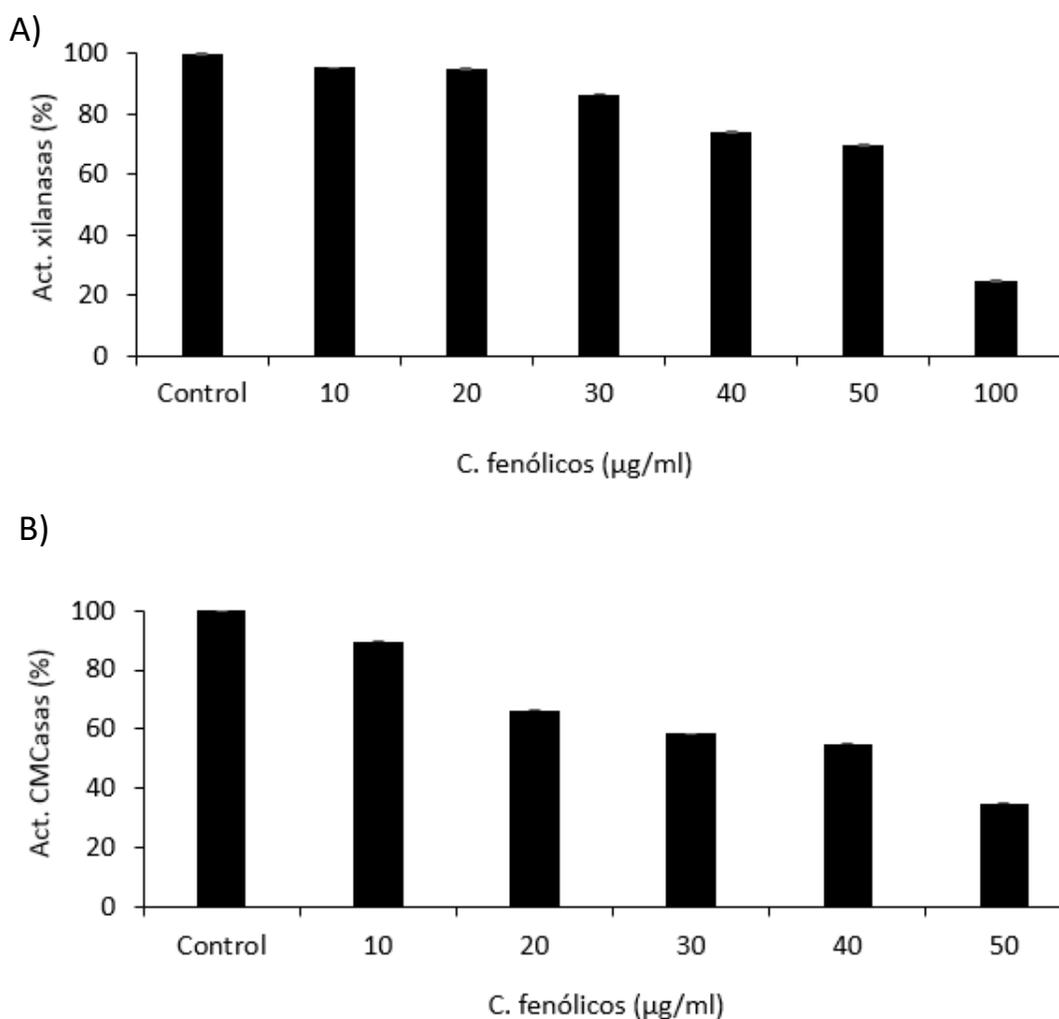
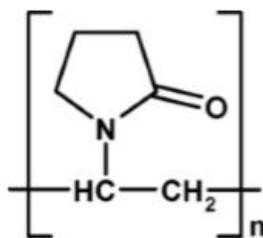


Figura 12: Inhibición enzimática de A) xilanasas y B) CMCasas por adición de compuestos fenólicos.

La cantidad de CF probados corresponde a la cantidad de CF que se liberan al medio y se han detectado durante la sacarificación del bagazo de caña. La concentración de CF ensayados redujo la actividad de las holocelulasas de *C. flavigena* PR-22 lo que puede afectar el rendimiento de producción de azúcares simples fermentables en el sacarificado y por consiguiente originar una baja concentración de bioetanol resultante de la fermentación. Se ha reportado que los CF pueden unirse a las enzimas celulolíticas e inhibir su actividad (Larsson *et al.*, 1999). Para inhibir a este tipo de compuestos se ha recomendado la adición de PVPP (polivinilpirrolidona) el cual es un polímero insoluble que puede fisorber a los CF mediante puentes de hidrógeno (Fig. 13) y así evitar que se unan a las enzimas celulolíticas (Gultek *et al.*, 2001).



Estructura química de la PVPP - $(C_6H_9NO)_n$, $P_m = (111.1)n$

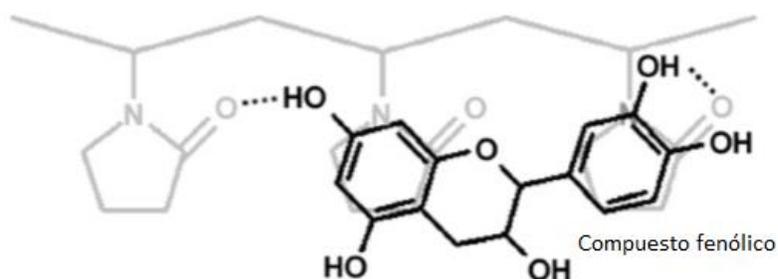


Figura 13: Adsorción de catequina por PVPP a través de puentes de hidrógeno entre el donador de protones del compuesto fenólico y el grupo carbonilo del PVPP.

Con base en la información anterior, se decidió analizar el efecto preventivo de la inhibición de las holocelulasas de *C. flavigena* PR-22 por acción de CF al añadir los polímeros PEG y PVP. Se probaron 3 tipos de PVP (PVP40, PVP 360 y PVPP) y un PEG (PM = 40,000). La adición de los polímeros se hizo en el proceso de producción de las holocelulasas y se continuó con la sacarificación del bagazo de caña en presencia de las perlas de acero. Con la adición de estos polímeros se esperaba una mayor actividad de holocelulasas así como un mayor rendimiento de azúcares reductores en la sacarificación.

Se evaluó la cantidad de azúcares reductores producidos durante la sacarificación, además de las actividades de xilanasas y CMCasas al final de la etapa de producción de enzimas y después de la sacarificación; así mismo se evaluó la actividad de β -glucosidasa al final de la sacarificación.

En cuanto a la producción de azúcares reductores se observó una mejor producción de éstos en todos los casos donde se adicionó algún polímero, sin embargo, en presencia del PVP 360 al inicio del proceso de producción de enzimas, se obtuvo 35 % más azúcares reductores en el sacarificado en comparación con el control (Fig. 14A). Esto quiere decir que el agregar polímeros al inicio de la producción de enzimas se evita el proceso de inhibición enzimática por acción de los CF lo que favorece la liberación de azúcares reductores.

Respecto a la actividad de xilanasas, se observa una mejor producción de esta actividad enzimática al agregar los diversos polímeros lo que significa que éstos pueden inhibir la presencia de los CF y así mejorar la producción de las enzimas. No obstante, el PVP 40 favoreció más la producción lográndose un incremento 47 % más en comparación con el control (Fig. 14B). Por otro lado estos polímeros evitaron el efecto inhibitorio de los CF ya que al agregarlos se obtuvo

una mayor cantidad de actividad de xilanasas al terminar la sacarificación. En este caso, el PVP 360 fue el que mostró mejores resultados ya que se obtuvo 54 % más actividad remanente de xilanasas.

La producción de CMCasas sólo se vio favorecida al agregar PVP sin embargo la diferencia de actividad con respecto al control no fue significativa (Fig. 14C). Por otro lado la actividad enzimática que se mantuvo casi igual a la inicial al finalizar la sacarificación fue cuando se añadió el PEG. Lo anterior significa que este polímero protegió la actividad de CMCasas a lo largo de la sacarificación a pesar de estar en presencia de CF.

Finalmente la actividad de β -glucosidasa que se obtuvo al agregar PVP 360 fue aproximadamente 3 veces mayor que el control sin polímero, ésto es relevante ya que esta actividad enzimática es limitante para la obtención de azúcares simples fermentables como la glucosa durante la sacarificación (Fig. 15).

A)

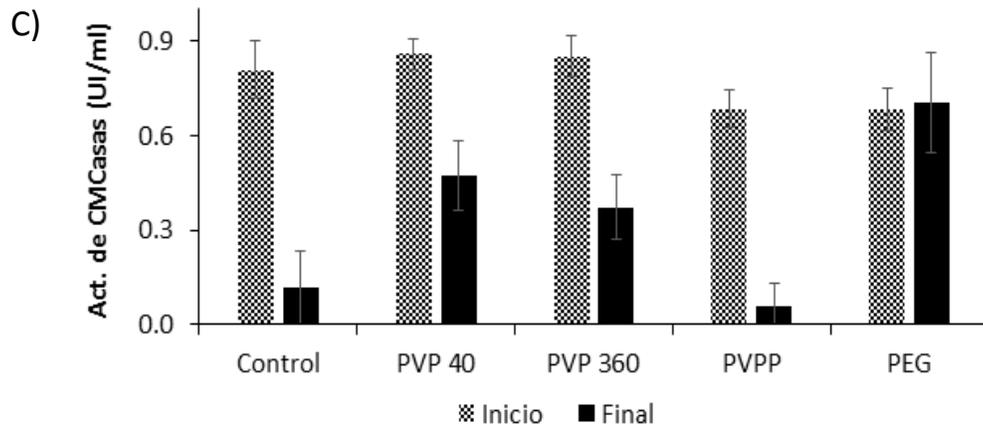
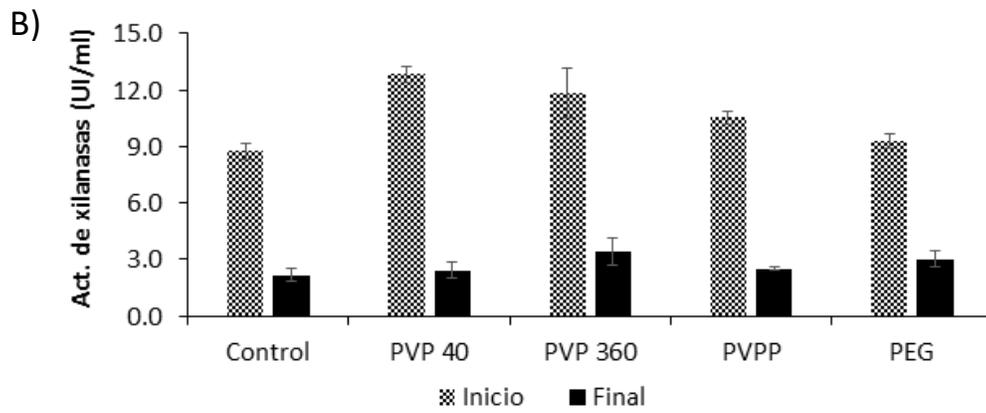
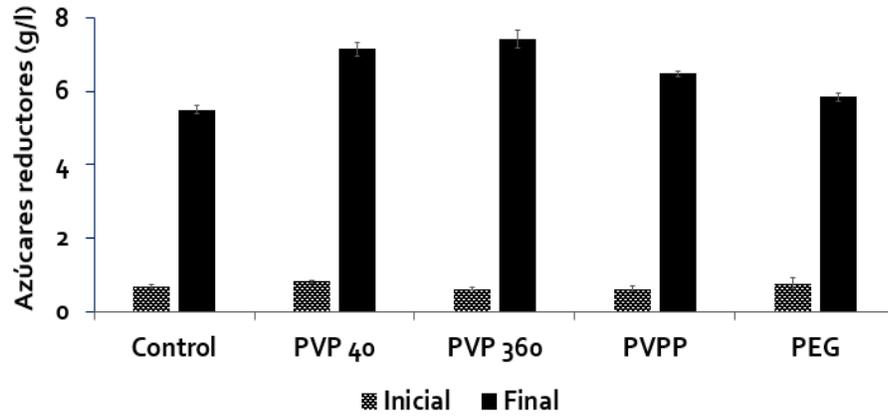


Figura 14: A) Azúcares reductores, B) actividad de xilanasas y C) CMCasas obtenidos antes y después de la sacarificación añadiendo polímeros en la producción de enzimas

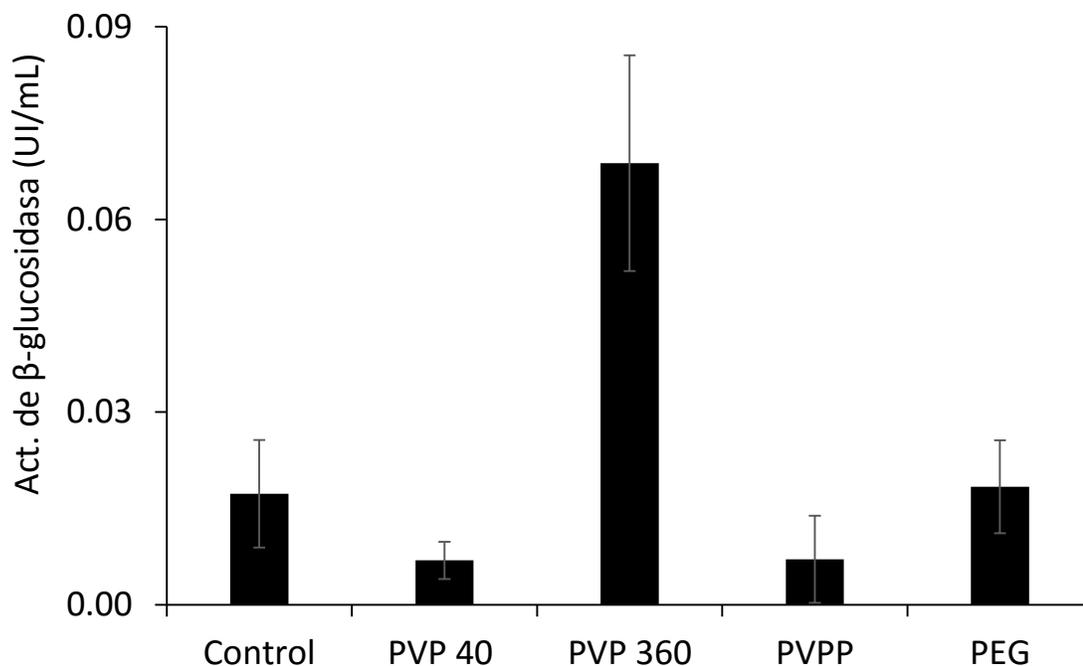


Figura 15: Actividad de β -glucosidasa al final de la sacarificación añadiendo polímeros en la producción de enzimas

7.5. Producción de glucosa y xilosa durante la sacarificación del bagazo de caña

Se seleccionaron los polímeros PVP 360 y PEG para el proceso de producción de enzimas y continuar con la sacarificación ya que fueron los que dieron la mejor actividad de xilanasas y CMCasas en comparación con los otros polímeros probados. En estas condiciones se podría esperar un incremento en la liberación de azúcares simples fermentables como glucosa y xilosa durante la sacarificación. Se evaluó la cantidad de glucosa y xilosa producidas en la sacarificación observando que fue baja posiblemente por la baja actividad de la β -glucosidasa y posiblemente también β -xilosidasa, enzimas intracelulares

responsables de la degradación de celobiosa y xilobiosa (disacáridos), lo que limita el proceso de obtención de azúcares simples fermentables en la sacarificación. (Tabla 4).

Tabla 4: Azúcares simples producidos en la sacarificación del bagazo de caña

| | <i>Sacarificado (g/l)</i> | |
|-----------------------|---------------------------|--------|
| | Glucosa | Xilosa |
| <i>Control</i> | 0.17 | 0.4 |
| <i>PVP 360</i> | 0.318 | 1.4 |
| <i>PEG</i> | 0.165 | 1.6 |

7.6. Producción de etanol a partir de la sacarificación del bagazo de caña

Una vez establecidas las condiciones de producción de holocelulasas y la obtención de azúcares durante la sacarificación del bagazo de caña, se procedió a llevar a cabo la fermentación de los azúcares simples utilizando la levadura *C. humicola* OJ-31. Para ésto se inoculó en una relación 10 % (v/v) el sobrenadante decantado del sacarificado previamente. La cantidad de glucosa y xilosa residuales, así como la cantidad de etanol producido en el mosto, se analizó por HPLC (Tabla 5). Se observó que la cantidad de etanol producido fue baja como consecuencia de la baja cantidad de glucosa y xilosa obtenidas en la sacarificación (Tabla 4). Se obtuvo un rendimiento aproximado de 0.1 gramos de etanol/g de glucosa, este rendimiento bajo pudiera ser por la presencia de inhibidores como los compuestos fenólicos que se encontraban durante la fermentación. Sin embargo el proceso de obtención de etanol de segunda generación utilizando bagazo de caña como sustrato se logró.

Tabla 5: Azúcares remanentes y etanol producido durante la fermentación de los sacarificados de bagazo de caña utilizando la levadura *C. humicola* OJ-31

Resultado de la fermentación (g/l)

| Muestra | Glucosa | Xilosa | Etanol |
|----------------|----------------|---------------|---------------|
| Control | No detectado | 0.38 | 0.02 |
| PVP 360 | No detectado | 0.36 | 0.03 |
| PEG | No detectado | 0.24 | 0.02 |

7.7. Fermentación enriquecida con glucosa y xilosa

Para comprobar que las condiciones de fermentación eran las adecuadas y que los polímeros o algún otro componente del medio pudieran estar interfiriendo en el proceso, se probó enriquecer la fermentación adicionando 10 g/l de glucosa al medio de cultivo con las mismas condiciones utilizadas en las fermentaciones anteriores. Al finalizar la fermentación, se analizó por HPLC la cantidad de etanol producido y los azúcares remanentes. Como resultado de esta fermentación enriquecida con glucosa, se obtuvo una concentración de etanol alrededor de 5 g/l, lo cual corresponde con el rendimiento máximo teórico de 0.5 g de etanol/g de glucosa. Esto quiere decir que las condiciones en las que se llevó a cabo la fermentación fueron adecuadas ya que hubo un consumo casi total de los azúcares. (Fig. 16).

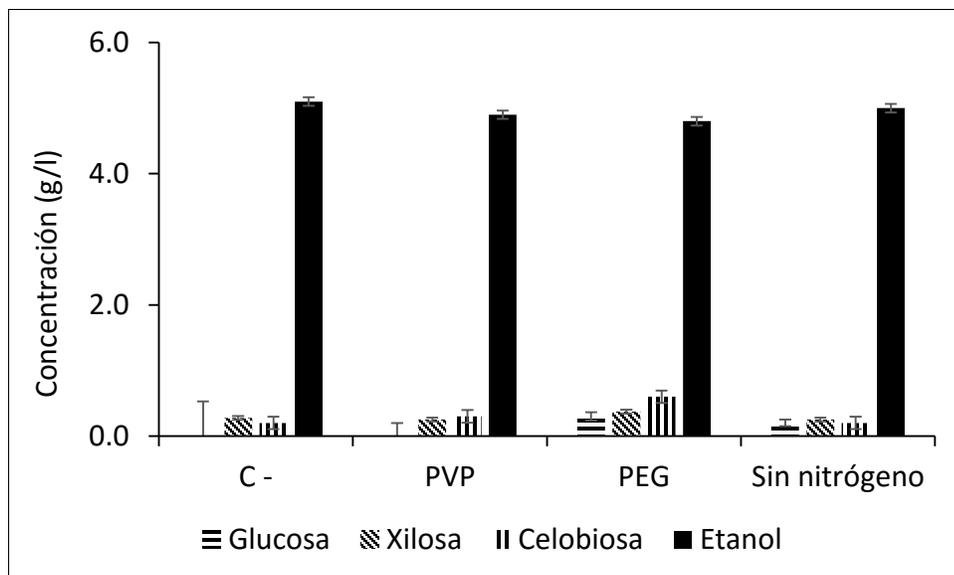


Figura 16: Cantidad de azúcares y etanol al final de la fermentación enriquecida con 1 % de glucosa

Por otro lado se probó una fermentación enriquecida agregando 10 g/l de xilosa, para evaluar el consumo así como la capacidad de *C. humicola* OJ-31 de fermentar esta fuente de carbono a etanol. Los resultados obtenidos muestran que aunque la levadura tiene la capacidad de utilizar la xilosa como fuente de carbono ya que se observa una disminución de la concentración de este azúcar al finalizar la fermentación, ésta no logra metabolizarla hacia etanol (Fig. 17).

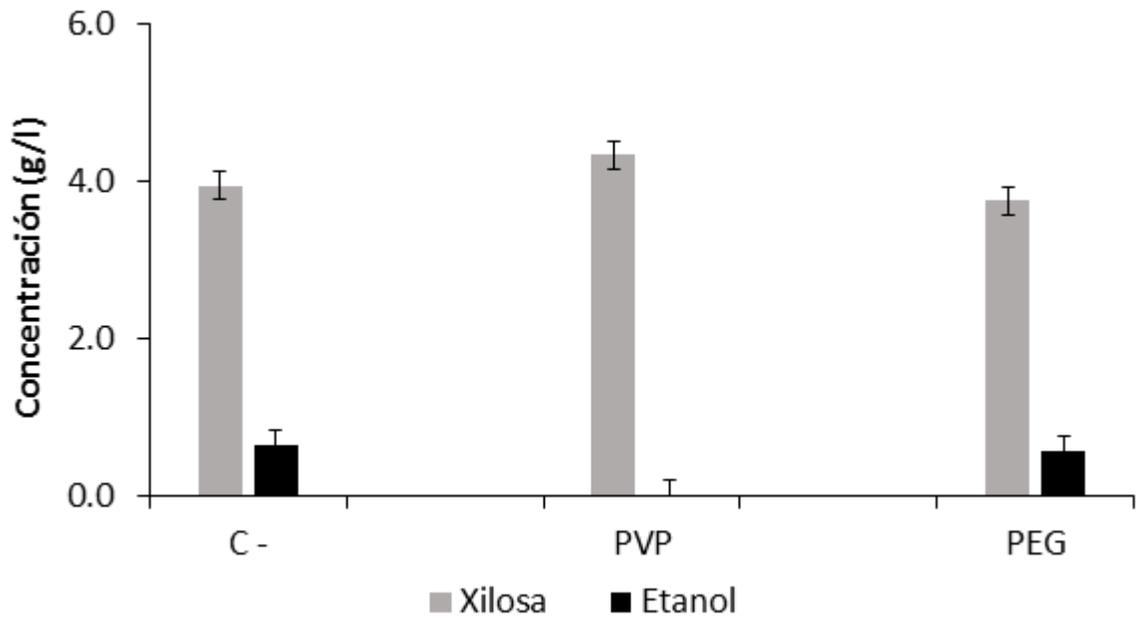


Figura 17: Xilosa y etanol al final de la fermentación enriquecida con 1 % de xilosa

La ruta metabólica para la formación de etanol a partir de xilosa en las levaduras requiere de muchos pasos metabólicos (Fig. 18). El primero es la transformación de la xilosa a xilitol, sin embargo para la continuación de la ruta para la formación de etanol se deben dar diversos pasos enzimáticos que comprende el ciclo de las pentosas fosfato. En *C. humicola* OJ-31 la maquinaria metabólica para la formación de etanol por esta ruta metabólica podría estar limitada (Van Zyl *et al.*, 1993).

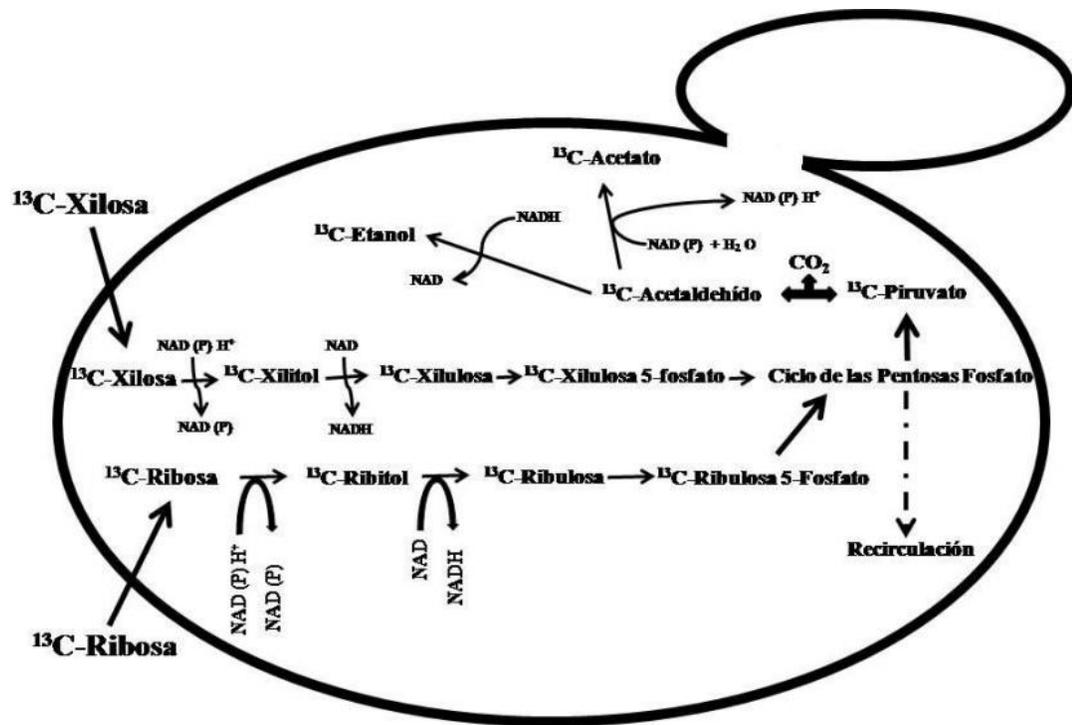


Figura 18: Rutas metabólicas posibles para la utilización de xilosa y ribosa por levaduras

8. Conclusiones

Se implementó un sistema secuencial de producción de enzimas, sacarificación y fermentación para la producción de etanol.

A pesar de la baja cantidad de azúcares simples fermentables como glucosa y xilosa, se obtuvo etanol con el proceso planteado en este proyecto (30 mg/l). La baja concentración de glucosa en el sacarificado se debe a la baja actividad extracelular de β -glucosidasa obtenida en la producción de enzimas ya que el proceso de lisis no fue el mejor. La adición de polímeros como PVP y PEG en la etapa de producción de enzimas permitió mantener o incrementar la actividad de CMCase (100 % de actividad remanente), xilanasas (47% de incremento agregando PVP 40), y β -glucosidasa (3 veces mayor actividad agregando PVP 360) y por lo tanto la acumulación de azúcares reductores, por una posible desactivación de los compuestos fenólicos.

9. Perspectivas

Evaluar el efecto de añadir los polímeros en diferentes concentraciones sobre las holocelulasas de *C. flavigena* PR-22 durante la producción de enzimas.

Analizar diferentes condiciones del pretratamiento con NaOH sobre el bagazo de caña y evaluar la actividad enzimática producida al añadir diferentes polímeros en la etapa de producción de enzimas.

Hacer la identificación de los compuestos fenólicos presentes en el bagazo de caña crudo y pretratado utilizando espectrometría de masas.

10. Bibliografía

1. Aggett P J. (1985). Physiology and metabolism of essential trace elements: an outline. *Clin Endocrinol Metab.* 14 (3): 513–43.
2. Alonso-Pippo W, Luengo C, Koehlinger J, Garzone P, Cornacchia G. (2008). Sugarcane energy use: The cuban case. *Energy policy.* 36(6): 2163-2181.
3. Ardanuy M, Antunes M, Velasco J I. (2012). Vegetable fibres from agricultural residues as thermo-mechanical reinforcement in recycled polypropylene-based green foams. *Waste Management.* 32(2): 256-263.
4. Ballesteros I, Oliva J M, Negro M J, Manzanares P, Ballesteros M. (2002). Proceso de sacarificación y fermentación simultánea para la conversión de la fracción celulósica del residuo de la extracción del aceite de oliva en etanol. *Grasas y aceites.* 53(3): 282-288.
5. Biely P. (1993) Hemicellulose and hemicellulases, Ed. Coughlan y Hazlewood Portland Press Research Monograph p. 29. Brigham J S, Adney W S, Himmel M E. (1996). Hemicelluloses: diversity and applications. *Handbook on bioethanol: production and utilization.* Taylor and Francis, Washington, DC. 119.
6. Cardona C A, Quintero J A, Paz I C. (2010). Production of bioethanol from sugarcane bagasse: Status and perspectives. *Bioresour Technol.* 101: 4754–4766.
7. Carrillo L. (2003). Los hongos de los alimentos y forrajes. Universidad Nacional de Salta, Argentina. 118.
8. Castro C, Valverde M, Paredes O. (2004). Biocombustibles: biomasa lignocelulósica y procesos de producción. *CONCYTEG.* 54: 1246-1269.

9. Creus E G. (2004). Compuestos fenólicos, un análisis de sus beneficios para la salud. *Ámbito farmacéutico*. 23: 80-84.
10. Das H, Singh S K. (2004). Useful byproducts from cellulosic wastes of agriculture and food industry a critical appraisal. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 44: 77-89.
11. De la Torre M, Casas-Campillo C. (1984). Isolation and characterization of a symbiotic cellulolytic mixed bacterial culture. *App Microbiol Biotechnol*. 19(6): 430-434.
12. Diorio L A, Forchiassin F, Papinutti V L, Sueldo D V. (2003). Actividad enzimática y degradación de diferentes tipos de residuos orgánicos por *Saccobolus saccoboloides* (Fungi, Ascomycotina). *Revista Iberoamericana de Micología*. 20: 10-15.
13. DiTomaso M, Barney J N, Fox A M. (2007). Biofuel Feedstocks: The Risk of Future Invasions. All U.S. Government Documents (Utah Regional Depository). 79.
14. Domínguez J M O. (2003). Efecto de los productos de degradación originados en la explosión por vapor de biomasa de chopo sobre *Kluyveromyces marxianus*. Tesis doctoral CIEMAT.
15. Elberson M, Malekzadeh F, Yazdi M, Kameranpour N. (2000). *Cellulomonas persica* sp. and *Cellulomonas iraniensis* sp. mesophilic cellulose-degrading bacteria isolated from forest soil. *Int J Syst Evol Microbiol*. 50: 993-996.
16. Gassner M, Maréchal F. (2013) Increasing efficiency of fuel ethanol production from lignocellulosic biomass by process integration. *Energy Fuels*. 27: 2107–2115.

17. González-García R. (2009). Caracterización cinética y metabólica de una levadura aislada de mostos de mezcal capaz de crecer en sacarificados de bagazo de caña para la producción de etanol. Reporte de estancia de investigación CINVESTAV-IPN.
18. Gultek A, Seckin T, Onal Y, Icduygu M G. (2001). Preparation and phenol captivating properties of polyvinylpyrrolidone-montmorillonite hybrid materials. *J Appl Polym Sci.* 81(2): 512-519.
19. Kim H K, Pack M Y. (1989). Cloning and expression of *Cellulomonas fimi* β -glucosidase genes in *Escherichia coli*. *Enzyme Microb Technol.* 11: 313-316.
20. Larsson S, Reimann A, Nilvebrant N, Jonsson L J. (1999). Comparison of different methods for the detoxification of lignocellulose hydrolysates of spruce. *Appl Biochem Biotechnol.* 77: 91–103.
21. Lowry O H, Rosebrough N J, Farr A L, Randall R J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 193(1): 265-275.
22. Martínez-Trujillo A. Pérez-Avalos O, Ponce-Noyola T. (2003). Enzymatic properties of a purified xylanase from mutant PN-120 of *Cellulomonas flavigena*. *Enzyme Microb Technol.* 32(3): 401-406.
23. Montenecourt B S, Eveleigh D E. (1979). Selective screening methods for the isolation of high yielding cellulase mutants of *Trichoderma reesei*. *Adv Chem Ser.* 181: 289-301.
24. O'Sullivan A C. (1997). Cellulose: the structure slowly unravels. *Cellulose.* 4: 173-207.
25. Ocampo-Ortega N J. (2011). Obtención de cepas mutantes de *Cryptococcus humicola* con capacidad fermentativa de hidrolizados de residuos lignocelulósicos para la producción de bioetanol. Tesis de Maestría. Departamento de Biotecnología y Bioingeniería CINVESTAV-IPN.

26. Pandey A, Soccol C R, Nigam P, Soccol V T. (2000). Biotechnological potential of agroindustrial residues. *Bioresour Technol.* 74: 69-80.
27. Ponce-Noyola T, De la Torre M. (1995). Isolation of a high-specific-grow-rate mutant of *Cellulomonas flavigena* on sugar-cane bagase. *Appl Microbiol Biotechnol.* 42: 709-712.
28. Ríos-Fránquez F J. (2012). Secuenciamiento del gen y caracterización bioquímica de la β -glucosidasa de *Cellulomonas flavigena* PR-22. Tesis de Maestría. Departamento de Biotecnología y Bioingeniería CINVESTAV-IPN.
29. Rojas-Rejón O A. (2007). Caracterización cinética y bioquímica de la mutante PR-22 de *Cellulomonas flavigena*. Tesis de Maestría. Departamento de Biotecnología y Bioingeniería CINVESTAV-IPN.
30. Rojas-Rejón O A, Poggi-Varaldo H M, Ramos-Valdivia A C, Martínez-Jiménez A, Cristiani-Urbina E, De la Torre-Martínez M, Ponce-Noyola T. (2011). Production of cellulases and xylanases under catabolic repression conditions from mutant PN-120 of *Cellulomonas flavigena*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 38: 257-264.
31. Sánchez-Riaño A M, Gutiérrez-Morales A I. (2010). Producción de bioetanol a partir de subproductos agroindustriales lignocelulósicos. *Revista Tumbaga.* 5: 61-91
32. SENER. (2013). Estrategia Nacional de Energía 2013-2027. Gobierno de México.
33. Singleton V L, Orthofer R, Lamuela-Raventos R M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Meth Enzymol.* 299: 152-178.
34. Stackebrandt E, Schumann P, Prauser H. (2006). The family *Cellulomonadaceae*. In: *The prokaryotes*, Springer New York. 3: 983-1001.

35. Statistical Review of World Energy. (2015). bp.com/statisticalreview #BPstat Centre for Energy Economics Research and Policy, Heriot-Watt University.
36. Sun Y, Cheng J. (2001). Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: A review. *Bioresour Technol.* 83: 1-11.
37. Taiz L, Zeiger E. (2006). *Fisiología Vegetal* (Vol. 10). Universitat Jaume.
38. Talebnia F, Karakashev D, Angelidaki I. (2010). Production of bioethanol from wheat straw: an overview on pretreatment, hydrolysis and fermentation. *Bioresour Technol.* 101(13): 4744-4753.
39. Tejirian A, Xu F. (2011). Inhibition of enzymatic cellulolysis by phenolic compounds. *Enzyme Microb Technol.* 48: 239-247.
40. Teter S, Sutton K B, Emme B. (2014). Enzymatic processes and enzyme development in biorefining En: Waldron K eds. *Advances in Biorefineries: Biomass and Waste Supply Chain Exploitation*. Woodhead Publishing. United Kingdom p 199-226.
41. Van Zyl C, Prior B A, Kilian S G, Brandt E V. (1993). Role of D-ribose as a cometabolite in D-xylose metabolism by *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Environ Microbiol.* 59: 1487-1494.