



Universidad Autónoma de Sinaloa
Facultad de Ciencias Químico Biológicas
Programa Regional de Posgrado en Biotecnología
Maestría con Orientación en Biotecnología

**Producción de Etanol a partir de
Residuos de *Moringa oleifera* Utilizando
un Bioproceso Consolidado**

T E S I S

Que presenta:

Ibt Héctor Manuel Fonseca Peralta

Para obtener el grado de

**Maestro en Ciencias con Orientación en Biotecnología
Ambiental**

Director(es) de Tesis

Dr. Ignacio Contreras Andrade
Dra. Edith Oliva Cuevas Rodríguez

Culiacán, SIN, MEX

Mayo de 2017

La presente investigación, titulada *Producción de etanol a partir de residuos de Moringa oleifera utilizando un bioproceso consolidado*, se llevó a cabo en los laboratorios del *Programa Regional de Posgrado en Biotecnología, Facultad de Ciencias Químico Biológicas, Universidad Autónoma de Sinaloa*. Como Asesores Académicos participaron: Dra. Bianca Anabel Amézquita López, Dra. Marcela Soto Beltrán, M.C. Raymundo Pérez Ángel, Dr. Sixto Velarde Félix, Dra. Edith Oliva Cuevas Rodríguez (Director de Tesis) y Dr. Ignacio Contreras Andrade (Director de Tesis). Este trabajo de investigación formó parte del proyecto *Tecnologías para el cultivo, manejo poscosecha, producción de biocombustibles y coproductos de moringa en México*, financiado por el Fondo sectorial SAGARPA CONACyT. PROYECTO NO. 175519). Asimismo, el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) apoyó al IBT Héctor Manuel Fonseca Peralta, a través de *Beca Tesis para Estudios de Maestría 2015-2017*.

AGRADECIMIENTOS

A mi director de tesis, Dr. Ignacio Contreras Andrade por haberme aceptado como su estudiante, por darme la libertad para desarrollar esta tesis, y principalmente por mostrarme que tengo un gran potencial como líder, investigador y como ser humano.

A la Dra. Edith Oliva Cuevas Rodríguez por asesorarme y apoyarme durante la realización de este proyecto y por alentarme a continuar en la investigación.

A M.C. Raymundo Pérez Ángel, por enseñarme que en la ciencia hay que dudar y sin su apoyo no pudiera haber encontrado el motor de este proyecto: "*Ganoderma*". Por ofrecerme su gran amistad y apoyarme en todo momento.

A la Dra. Bianca Anabel Amézquita López y la Dra. Johanna Marcela Soto Beltrán por disponer sin dudar de su tiempo para brindarme su asesoría y consejos. Por su apoyo incondicional y ofrecerme una verdadera amistad.

Al Dr. Sixto Velarde Félix por apoyarme en la identificación morfológica de las cepas, por su estratégico método de enseñanza y su gran amistad.

A la M.C. Jeanett Chavez Ontiveros, por su amabilidad brindada y su tiempo para ayudarme a aclarar cualquier duda.

A las Q.F.B. Milagros Guadalupe Monteón Angulo y Thelma Aidaly Arce Martínez, por sacrificar su valioso tiempo en los muestreos, por las malpasadas y aguantar mis quejas, por los momentos de risas absurdas cuando el cansancio nos aquejaba. Y principalmente por ser valientes y poner un gran empeño en el trabajo, por su consejo y su valiosa amistad.

A mis compañeros del laboratorio 22 Silvia, Mario, Maricarmen, Maribel, Miguel, Carolina, Esthela, Edgar, Jocelyn, Hilary, Ángel, Manuel, Grecia, Juan Carlos por su gran apoyo y compartirme su noble amistad.

ÍNDICE GENERAL

	Pág
INDICE GENERAL	i
INDICE DE CUADROS	v
INDICE DE FIGURAS	vii
I RESUMEN	1
I ABSTRACT	2
II INTRODUCCIÓN	3
III REVISIÓN DE LITERATURA	6
A BIOCOMBUSTIBLES	6
1 Clasificación	6
2 Principales países productores de biocombustibles	8
3 México dentro del contexto de biocombustibles	8
B BIOETANOL	9
1 Propiedades fisicoquímicas del etanol	9
2 El etanol como combustible	10
3 Ventajas y desventajas del bioetanol	10
4 Clasificación del bioetanol	11
C BIOMASA UTILIZADA EN LA PRODUCCIÓN DE BIOETANOL	12
1 Fuentes de lignocelulosa	12
2 <i>Moringa oleifera</i> como biomasa lignocelulósica	16
3 Polímeros constituyentes de la lignocelulosa	17
4 Pretratamiento para la biomasa lignocelulósica	20
D MICROORGANISMOS EN LA PRODUCCIÓN DE BIOETANOL	23
1 Microorganismos productores de enzimas lignocelulósicas	24
2 Fermentadores de etanol a partir de hexosas	26
3 Fermentadores de etanol a partir de pentosas	30
E SISTEMAS DE PRODUCCIÓN DE BIOETANOL	32
1 Hidrólisis y fermentación separada	32

2	Sacarificación y fermentación simultánea	34
3	Sacarificación y cofermentación simultánea	34
4	Bioproceso consolidado	34
F	VARIABLES IMPORTANTES EN LOS PROCESOS DE PRODUCCIÓN DE ETANOL	35
1	pH	39
2	Temperatura	39
3	Concentración de oxígeno	40
G	RENDIMIENTOS EN LA PRODUCCIÓN DE BIOETANOL	41
IV	HIPÓTESIS	43
V	JUSTIFICACIÓN	44
VI	OBJETIVO GENERAL	46
A	OBJETIVO GENERAL	46
B	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	46
VII	MATERIALES Y METODOS	47
A	RECOLECCIÓN Y AISLAMIENTO DE HONGOS LIGNOCELULÓSICOS	49
1	Recolección de hongos	49
2	Aislamiento de hongos	49
B	EVALUACIÓN LIGNOCELULOLÍTICA Y ETALOGÉNICA	50
1	Evaluación de la producción de enzimas lignocelulolíticas.	50
2	Evaluación de la actividad etalogénica	52
3	Selección de cepas para el bioproceso consolidado	53
C	IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA DE LAS CEPAS	53
D	EVALUACIÓN ETALOGÉNICA EN GLUCOSA Y XILOSA	54
1	Fermentación	54
2	Cuantificación de etanol	54
3	Rendimientos de producción de etanol	54
E	EVALUACIÓN ETALOGÉNICA EN TALLO DE <i>M. oleifera</i>	55

1	Análisis bromatológicos en tallo de <i>M. oleifera</i>	55
2	Fermentación	58
3	Cuantificación de etanol	59
4	Determinación de rendimientos de producción	59
5	Análisis estadísticos	59
F	EVALUACIÓN DEL RENDIMIENTO ETANÓLICO DE LAS CEPAS EN CONSORCIO CON <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (ATCC 200062)	60
1	Cuantificación de etanol	60
2	Cuantificación de azúcares reductores	60
3	Cuantificación de células de <i>S. cerevisiae</i> (ATCC 200062)	60
4	Cuantificación de actividad de celulasas	61
VIII	RESULTADOS Y DISCUSIONES	62
A	RECOLECCIÓN Y AISLAMIENTO DE HONGOS LIGNOCELULÓSICOS	62
B	EVALUACIÓN LIGNOCELULOLÍTICA Y ETALOGÉNICA	64
1	Evaluación de la producción de enzimas lignocelulolíticas	64
2	Evaluación de actividad etalogénica	66
3	Selección de cepas para el bioproceso consolidado	68
C	IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA DE LAS CEPAS	70
D	EVALUACIÓN ETALOGÉNICA EN GLUCOSA Y XILOSA	74
E	EVALUACIÓN ETALOGÉNICA EN TALLO DE <i>M. oleifera</i>	81
1	Caracterización de tallo de <i>M. oleifera</i> y cálculo de rendimientos teóricos	81
2	Fermentación en tallo de <i>M. oleifera</i>	84
F	EVALUACIÓN DEL RENDIMIENTO ETANÓLICO DE LAS CEPAS EN CONSORCIO CON <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (ATCC 200062)	91
IX	CONCLUSIONES	105

X	ANEXOS	106
A	ANEXO 1: CROMATOGRAMAS DE PRODUCCIÓN DE ETANOL EN MORINGA CON CEPAS FÚNGICAS	106
B	ANEXO 2: PREPARACIÓN DE AGAR CZAPEK	111
XI	BIBLIOGRAFIA	112

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Pág.
1	Cadena de producción de bioenergía. Adaptado de (REN21, 2015; World Energy Council, 2010)	7
2	Tipos procesos para producción de bioetanol de acuerdo al origen de la biomasa, adaptada de (Bajpai, 2013a; SENER, 2006)	14
3	Esquema general de la composición de la biomasa lignocelulósica. Tomado de ("US DOE," 2005)	18
4	Ruta Embden-Meyerhof-Parnas en <i>S. cerevisiae</i> , tomado de (Bai y col., 2008)	28
5	Ruta Entner-Doudoroff <i>Z. mobilis</i> , tomado de (Bai y col., 2008)	29
6	Isomerización de D-xilosa y L-arabinosa. Ruta de pentosas y glucólisis, adaptado de (Gírio y col., 2010; Lehninger & Cox, 2006)	31
7	Sistemas de producción de bioetanol; adaptado de (den Haan y col., 2015; Gírio y col., 2010)	33
8	Estrategia experimental	48
9	Producción de etanol (g/L) en sacarosa con las 19 cepas aisladas	67
10	Evaluación cualitativa de las 19 cepas aisladas con potencial para desarrollar un bioproceso consolidado	69
11	Morfología de colonia, esporas y cuerpo fructífero	73
12	Fermentación en glucosa por <i>Aspergillus ochraceus</i>	75

	(C3a), <i>Aspergillus niger</i> (C3d), <i>Fusarium</i> sp. (C6a), <i>Fusarium oxysporum</i> (C7a), <i>Ganoderma</i> sp. (C1502), en condiciones anaerobias sin agitación, pH 5.0 y temperatura de 28°C	
13	Fermentación en xilosa por <i>Aspergillus ochraceus</i> (C3a), <i>Aspergillus niger</i> (C3d), <i>Fusarium</i> sp. (C6a), <i>Fusarium oxysporum</i> (C7a), <i>Ganoderma</i> sp. (C1502), en condiciones anaerobias sin agitación, pH 5.0 y temperatura de 28°C	76
14	Actividad etalogénica de las cepas en xilosa y glucosa expresados en rendimiento porcentual	80
15	Balance de masa para la producción de etanol de tallo de <i>M. oleifera</i>	83
16	Fermentación en <i>M. oleifera</i> por <i>Aspergillus</i> <i>ochraceus</i> (C3a), <i>Aspergillus niger</i> (C3d), <i>Fusarium</i> sp. (C6a), <i>Fusarium oxysporum</i> (C7a), <i>Ganoderma</i> sp. (C1502), en condiciones anaerobias sin agitación, pH 5.0 y temperatura de 28°C	83
17	Cromatograma de producción de etanol a las 72 h de <i>Ganoderma</i> sp. (C1502)	89
18	Biomembrana producida por <i>Ganoderma</i> sp. (C1502)	90
19	Actividad de celulasa (CMC) por <i>Aspergillus</i> <i>ochraceus</i> (C3a), <i>Aspergillus niger</i> (C3d), <i>Fusarium</i> sp. (C6a), <i>Fusarium oxysporum</i> (C7a), <i>Ganoderma</i> sp. (C1502) en la fermentación de <i>M. oleifera</i> con <i>S.</i> <i>cerevisiae</i> (ATCC 200062)	93

20	Fermentación de <i>M. oleifera</i> por <i>Aspergillus ochraceus</i> (C3a) y <i>S. cerevisiae</i> (ATCC 200062)	95
21	Fermentación de <i>M. oleifera</i> por <i>Aspergillus niger</i> (C3d) y <i>S. cerevisiae</i> (ATCC 200062)	97
22	Fermentación de <i>M. oleifera</i> por <i>Fusarium</i> sp. (C6a) y <i>S. cerevisiae</i> (ATCC 200062)	99
23	Fermentación de <i>M. oleifera</i> por <i>Fusarium oxysporum</i> (C7a) y <i>S. cerevisiae</i> (ATCC 200062)	100
24	Fermentación de <i>M. oleifera</i> por <i>Ganoderma</i> sp. (C1502) y <i>S. cerevisiae</i> (ATCC 200062)	102
25	Fermentación de <i>M. oleifera</i> por <i>Aspergillus ochraceus</i> (C3a), <i>Aspergillus niger</i> (C3d), <i>Fusarium</i> sp. (C6a), <i>Fusarium oxysporum</i> (C7a), <i>Ganoderma</i> sp. (C1502) y <i>S. cerevisiae</i> (ATCC 200062)	103

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Pág.
1	Tipos y ejemplos de biomasa para producción de bioetanol, tomada de (SENER, 2006)	13
2	Microorganismos empleados en el bioproceso para la producción de bioetanol	25
3	Condiciones de cultivos de hongos etalogénicos usados en la producción de etano	37
4	Comparación de rendimientos en la producción de bioetanol a partir de biomasa	42
5	Cepas fúngicas recolectadas de material lignocelulósico en Sinaloa.	63
6	Evaluación cualitativa de actividad enzimática en las cepas aisladas.	65
7	Rendimiento y productividad de etanol en glucosa y xilosa	78
8	Bromatología del tallo de moringa	82
9	Rendimiento actual, rendimiento porcentual y productividad de etanol en <i>M. oleifera</i>	86
10	Rendimiento y productividad de cepas en consorcio con <i>S. cerevisiae</i> (ATCC 200062)	92

I RESUMEN

La producción de bioetanol a partir de biomasa lignocelulósica es uno de los mayores retos para la industria bioenergética. *Moringa oleifera* representa una extraordinaria fuente de biomasa debido a su rápido crecimiento y fácil cultivo. Tiene un 67.1% de carbohidratos que pueden ser fermentados. El bioproceso consolidado juega un importante rol en la bioconversión de madera en etanol y usualmente involucra el uso de un solo microorganismo para producir las enzimas que hidrolizan la celulosa y hemicelulosa y que tiene la capacidad de fermentar pentosas y hexosas en una sola etapa. El objetivo de este proyecto fue evaluar el potencial de cepas fúngicas aisladas del noroeste de México para producir etanol en un bioproceso consolidado. Se evaluó la capacidad de 19 cepas para producir celulasas, xilanasas, lacasas y manganeso peroxidasa usando cajas petris con agar y el substrato correspondiente para cada enzima. También se evaluó la capacidad para producir etanol a partir de glucosa y xilosa. La producción de etanol se midió por espectrofotometría utilizando dicromato de potasio. Se seleccionaron 5 cepas *Aspergillus ochraceus* (C3a), *Aspergillus niger* (C3d), *Fusarium* sp. (C6a), *Fusarium oxysporum* (C7a) y *Ganoderma* sp. (C1502) para desarrollar un bioproceso consolidado y posteriormente se probaron en tallo de moringa triturado. *Ganoderma* sp. (C1502) mostró el mayor rendimiento porcentual de producción de etanol. Este rendimiento aumento de 7.83 a 31.53% al probar la cepa en consorcio con *Saccharomyces cerevisiae* (ATCC 200062). Para concluir, el consorcio de *Ganoderma-Saccharomyces* es el mejor de los evaluados para producir etanol de moringa. Existen algunas perspectivas como optimizar ciertas condiciones de cultivo y desarrollar un pretratamiento para la biomasa con la finalidad de llegar más cerca del rendimiento al teórico máximo.

Palabras claves: Bioproceso consolidado, Moringa oleifera, Bioetanol.

I ABSTRACT

Bioethanol production of lignocellulosic biomass is one of the biggest challenges for bioenergy industry. *Moringa oleifera* represents an extraordinary biomass source due to its fast growth and easy farming. It has a 67.1% of carbohydrate that can be fermented. The Consolidated Bioprocessing plays an important role in the bioconversion of woody material into ethanol and it usually involves the use of just one microorganism to produce enzymes, hydrolyze cellulose and hemicellulose, and fermenting hexoses and pentoses in just a single stage. The aim of this study was evaluate the potential of fungal strains isolated in Northwest of Mexico to perform in a Consolidated Bioprocessing. It was evaluated the strains capacity to produce cellulases, xylanases, laccase and manganese peroxidase using agar plates with a respective substrate for each enzyme. Further, it was evaluated the strains capacity to produce ethanol in Glucose. The ethanol production was measured spectrophotometrically with Potassium dicromate ($K_2Cr_2O_7$). Five strains were selected *Aspergillus ochraceus* (C3a), *Aspergillus niger* (C3d), *Fusarium* sp. (C6a), *Fusarium oxysporum* (C7a) y *Ganoderma* sp. (C1502) as Consolidated Bioprocessing performers and subsequently cultured in crushed lignocellulosic waste of moringa at same culture conditions used previously. *Ganoderma* sp. (C1502) has the higher percentage yield 7.83% and this yield increases when this strain performed in a consortium with *Saccharomyces cerevisiae* (ATCC 200062) at 31.53%. To sum this up the consortium *Ganoderma-Saccharomyces* were selected to produce ethanol from *M. oleifera*. There are some perspectives about this work like optimize conditions related with the evironom to be near of the theoretical maximum.

Keywords: Consolidated bioprocessing, Moringa oleifera, Bioethanol.

II INTRODUCCIÓN

La demanda mundial de energía se encuentra en aumento mientras que el acceso a yacimientos de petróleo es cada vez más complicado y costoso, aunado al daño ambiental causado por el excesivo uso de combustibles fósiles (SENER, 2013a). Esta situación ha inducido a buscar fuentes alternas y sustentables de energía. De acuerdo con el Reporte Global de Energías Renovables (REN21, 2015), de la energía global consumida en el 2014, el 78.3% correspondió a la energía derivada de combustibles fósiles, el 2.5% a la energía nuclear y las energías renovables aportaron solo el 19.2%. Los biocombustibles, como un caso particular de energía renovable aportaron el 0.8% de la energía global, siendo 30.1 billones de litros de biodiésel y 98.3 billones de litros de bioetanol donde la biomasa es la principal fuente para su producción, ya que es un gran contribuyente energético y tiene un gran potencial para expandir la producción de calor, electricidad y combustibles para el transporte (REN21, 2016). Dependiendo del tipo de biomasa y/o el tipo proceso se pueden producir distintas presentaciones de energía (REN21, 2015; World Energy Council, 2010; SENER, 2006) ya sea en forma sólida (carbón), líquida (bioetanol y biodiésel), o gaseosa (biometano) (FAO, 2008). En la actualidad la atención se ha centrado mayoritariamente en los biocombustibles líquidos como el biodiésel y bioetanol que han adquirido una gran importancia en el sector de transporte (FAO, 2008), debido a que sin mayores complicaciones pueden ser utilizados en las maquinas actuales

La producción de biocombustibles líquidos como bioetanol se centra en procesos de bioconversión de biomasa azucarada y amilácea que provienen principalmente de materia prima destinada a la alimentación e.g. arroz, maíz, y sorgo a este tipo de bioetanol se le conoce como de primera generación (Lennartsson y col., 2014). No obstante, el empleo de bioetanol de primera generación genera un desequilibrio en el sector alimentario suponiendo un riesgo en el suministro y seguridad alimentaria (Barros-Rios y col., 2015; Ingale y col.,

2014). A pesar de esta limitación, la biomasa posee una naturaleza multifacética que permite obtener bioetanol a partir de otras fuentes como la celulosa y hemicelulosa proveniente de residuos agroindustriales (Anwar y col., 2014; Ingale y col., 2014) y de cultivos energéticos (Nava-García & Doldán-García, 2014). A este tipo de bioetanol se le conoce como de segunda generación (Lennartsson y col., 2014; Sims y col., 2010). Los cultivos energéticos no requieren de suelos agrícolas destinados a la alimentación, por lo que la disponibilidad de suelo eventualmente no será un problema, además ofrecen algunas ventajas como la protección de los suelos contra la erosión, la liberación de oxígeno y absorción de CO₂ en la atmosfera. Existen diversas especies de plantas como *Brassica carinata*, sorgo (*Sorghum bicolor*), cardo (*Cynara cardunculus*) y jatrofa (*Jatropha curcas*) por mencionar algunas (IDAE, 2007), que se han evaluado de acuerdo a sus características, para ser consideradas en un cultivo energético. Moringa (*Moringa oleifera*) es un árbol de rápido crecimiento y ofrece cualidades de cultivo poco exigentes por lo que se ha considerado como una opción de cultivo energético tentativa para la para la producción de biomasa.

Actualmente, el bioetanol de primera generación es más rentable económicamente si lo comparamos con el de segunda generación, debido a que utiliza una fuente de biomasa que exige menos tratamientos que la lignocelulosa (IEA, 2007). La bioconversión de biomasa lignocelulósica ha resultado ser un reto en la mejora del bioproceso en sus diferentes etapas desde el pretratamiento, la hidrólisis y fermentación de la biomasa incluso en la destilación del etanol. Existen diversas investigaciones enfocadas en el desarrollo de tecnología para optimizar los costos y eficiencia en la producción de bioetanol de segunda generación. Algunos modelos propuestos son la hidrólisis y fermentación separada (Fernandes y col., 2015; J. LiLin y col., 2014; Brethauer & Wyman, 2010), sacarificación y fermentación simultánea (Sukumaran y col., 2009; Tomás-Pejó y col., 2008), sacarificación y cofermentación simultánea (den Haan y col., 2015; Patel y col., 2005) y recientemente los bioprocesos consolidados (den

Haan y col., 2015; Dionisi y col., 2015; Du y col., 2015; Klein-Marcuschamer & Blanch, 2015). Todos estos procesos involucran la intervención de microorganismos como levaduras, hongos y bacterias, así como la aplicación de enzimas (Dionisi y col., 2015; Amore & Faraco, 2012).

Por lo anterior, en este proyecto se evaluó la producción de bioetanol de segunda generación a partir de *Moringa oleifera*, con una previa selección de microorganismos que permitan llevar a cabo un bioproceso consolidado, esta tecnología está enfocada a reducir el costo de producción al unificar las etapas de hidrólisis y fermentación del proceso.

III REVISIÓN DE LITERATURA

A BIOCOMBUSTIBLES

De acuerdo con la terminología empleada para bioenergía por la FAO (2004), biocombustible se define como un recurso energético producido directa o indirectamente a partir de materia biológica la cual se denomina biomasa. El propósito de producir biocombustibles es para que puedan ser convertidos por métodos técnicos y simples en bioenergía (se le acuñe el término “bio” por su origen o fuente) y sean ecológicamente aceptables. En la **Figura 1**, se representa la cadena de producción de biocombustibles en la que, dependiendo de la fuente de obtención de biomasa y del proceso de bioconversión, el resultado será un biocombustible destinado a una forma específica de bioenergía. El desarrollo de nuevas tecnologías ha permitido la producción de biocombustibles en diversos estados físicos, permitiendo la distribución de los biocombustibles en múltiples sectores, ya sea para generar electricidad, calor y/o sistemas de enfriado para fines industriales, servicios energéticos rurales y transporte.

1 Clasificación

Los biocombustibles se pueden clasificar de acuerdo a la fuente, el tipo y una distinción elemental (FAO, 2008).

a Por fuente

Primera generación: Proviene de cultivos alimenticios y se procesan por medios convencionales.

Segunda generación: Se elaboran a partir de materias primas que pueden convertirse en celulosa, como los desechos de los cultivos, aserrín o plantas.

Tercera generación: Proviene de cultivos específicos no alimentarios y que tienen ventajas muy concretas como las algas.

b Por tipo

Sólidos: leña, carbón vegetal y gránulos de madera; líquidos: etanol, biodiésel y aceite de pirolisis; y gaseosos: biogás.

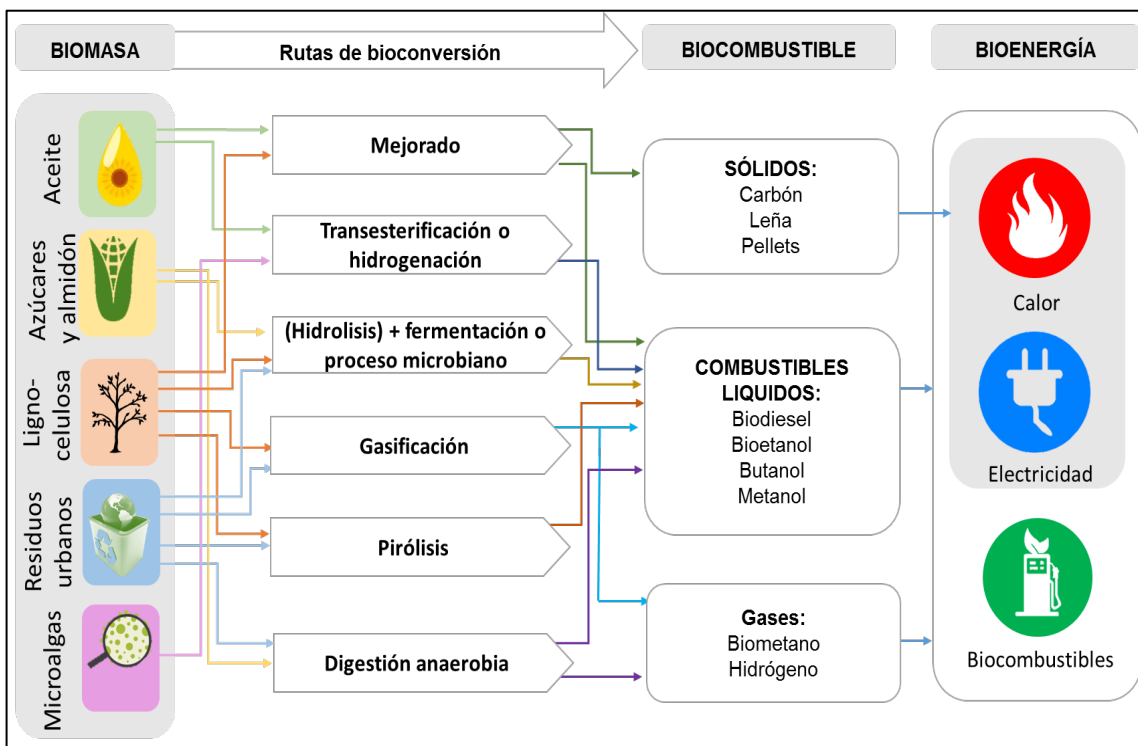


Figura 1. Cadena de producción de bioenergía. Adaptado de (REN21, 2015; World Energy Council, 2010).

c Distinción elemental

Los biocombustibles primarios (no tratados), como la leña, las astillas y los pellets de madera son aquellos en los que el material orgánico se usa esencialmente en su forma natural (tal como se han recogido). Este tipo de biocombustible es de combustión directa y en general se usa para satisfacer la demanda de combustible al cocinar, generar calefacción y/o electricidad en aplicaciones industriales en pequeña y gran escala.

Los biocombustibles secundarios (tratados) en forma sólida (carbón vegetal), líquida (bioetanol y biodiésel), o gaseosa (el biogás, gas de síntesis y el hidrógeno) se usan en un número mayor de aplicaciones, como el transporte y procesos industriales a altas temperaturas (FAO, 2008).

2 Principales países productores de biocombustibles

El impulso internacional de los bioenergéticos, especialmente de los biocombustibles para el transporte, se basa en tres grandes propósitos: fortalecer la seguridad energética, contribuir a la sustentabilidad ambiental y promover el desarrollo agrícola (SENER, 2006). La producción mundial de biocombustibles aumentó 9% en 2014, aportando un total de 128.4 billones de litros. El 77% del total fue etanol y el 23% corresponde a biodiésel y aceite vegetal hidrotratado (REN21, 2016). Los principales países productores de biocombustibles son Estados Unidos, Brasil, Alemania, China y Argentina. La producción de etanol reportada en 2014 fue de 98.3 billones de litros producido a partir de biomasa de maíz dulce y caña de azúcar. Sin embargo, para el 2050 se espera que los biocombustibles provean el 25% de la energía mundial requerida para el transporte (IEA, 2007).

3 México dentro del contexto de biocombustibles

En México el 4.2% del consumo energético total en 2013 fue a partir de biomasa (SENER, 2013b). A pesar de que México no figura entre los grandes productores de biocombustibles en el mundo, en el 2008 entró en vigor la Ley de

Promoción y Desarrollo de los Bioenergéticos (LPDB) cuyo objetivo es impulsar el desarrollo y crecimiento de la industria de biocombustibles, como un medio para contribuir al desarrollo rural, diversificar las opciones energéticas del país y contribuir a la reducción de Gases de Efecto Invernadero (GEI), (SENER, 2013a). Posteriormente, se emitieron programas encaminados a impulsar el desarrollo de etanol anhidro y biodiésel. A la fecha, el tema se ha retomado en el “Pacto por México”, que establece la necesidad de crear una nueva cultura y compromiso ambiental que modifique nuestro estilo de vida, a través de la reducción de la dependencia hacia los combustibles fósiles y el impulso a la inversión para investigación y desarrollo de proyectos de energías a partir de fuentes renovables; así como la necesidad de realizar una reforma energética que sea el motor de inversión y desarrollo de fuentes de energía (SENER, 2013a).

B BIOETANOL

El bioetanol es etanol anhídrido que se obtiene a partir de biomasa y ha sido considerado como un combustible de transporte renovable y sustentable, que no causa un alto impacto sobre el medio ambiente comparado con la gasolina porque reduce la emisión de GEI que contribuyen al calentamiento global (Okamoto y col., 2014).

1 Propiedades fisicoquímicas del etanol

El etanol (C_2H_5OH), también llamado etil alcohol, es químicamente un alcohol donde uno de sus dos átomos de carbono están unidos a un grupo hidroxilo, $-OH$, (Bajpai, 2013a). Entre las propiedades cualitativas se encuentran que es un líquido incoloro, volátil e inflamable. El etanol posee un peso molecular de 46.07 Kg/Kmol, presenta una densidad de 785-809.9 Kg/m³ a una temperatura de 15°C, tiene una viscosidad cinemática de 1.2-1.5 mm²/s, con un punto de fusión es a -114°C y un punto de ebullición a 78°C, la solubilidad en agua es del 100% (Masum y col., 2013).

2 El etanol como combustible

El etanol se puede producir en dos formas, hidratado y anhídrido. El etanol hidratado se puede producir por fermentación de biomasa y una posterior destilación, en la cual el etanol se convierte en etanol anhídrido que puede ser usado directamente como combustible (E100, etanol al 100%) o se puede mezclar con otros combustibles como el biodiésel y la gasolina para mejorar sus propiedades físicas como densidad, viscosidad, octanaje, punto de inflamabilidad y calor de vaporización (Masum y col., 2013; Torres-Jimenez y col., 2011; Costa & Sodré, 2010). En Estados Unidos y recientemente en Europa, el etanol anhídrido ha sido mezclado con gasolina en un 10%, y se le conoce como E10 o “*gasohol*”, debido a la incompatibilidad de E10 con algunos automóviles; la Unión Europea implementó el uso de E5 y E7 (Bajpai, 2013a). Además existen otras variantes como el E85 (85% de etanol y 15% de gasolina) y también E Diésel que consiste en una mezcla de etanol al 15%, aditivos de 1 a 15% y el resto de diésel.

3 Ventajas y desventajas del bioetanol

Las ventajas del bioetanol destacan que es de naturaleza renovable y es un combustible relativamente seguro que puede ser usado en máquinas con pocas modificaciones. Además incrementa la seguridad energética nacional y global dado a que las reservas de petróleo y sus derivados decrecen constantemente debido a que son una fuente no renovable. Comparado con el petróleo, el bioetanol es una fuente renovable que puede ser obtenido de la biomasa vegetal proveniente de residuos forestales, agroindustriales y cultivos energéticos. No es tóxico y es biodegradable lo que permite que en caso de existir un derrame se puede degradar rápidamente y se convierte en una sustancia inofensiva. Además los cultivos destinados a la producción de etanol reducen las emisiones de monóxido dióxido de carbono atmosférico, siendo una potencial ventaja para contribuir con la disminución de GEI (Bajpai, 2013b).

Entre las desventajas prevalecen que tiene un calor de combustión bajo

(por mol, unidad de volumen y por unidad de masa) comparado con el petróleo. Se requieren grandes cantidades de tierra arable para producir los cultivos y obtener el etanol, desencadenando indirectamente efectos negativos como la deforestación, erosión y cambiar el pH en suelos por el uso de fertilizantes. Otra de las desventajas es el manejo de los licores y residuos obtenidos durante la fermentación. Los vehículos impulsados por etanol tendrán desventajas para iniciar el arranque en condiciones de temperatura muy baja. Y algunas máquinas requieren de demasiadas modificaciones para emplear concentraciones muy altas de etanol (Bajpai, 2013b).

4 Clasificación del bioetanol

La clasificación de bioetanol corresponde a la establecida por la FAO (2008), que de acuerdo con la fuente de la que proviene se puede clasificar en primera, segunda o tercera generación, al igual que la clasificación general de biocombustibles.

a Primera generación

Esta clase de biocombustibles provienen de cultivos alimenticios y se procesan por medios convencionales, por ejemplo, el etanol que se obtiene de materiales ricos en azúcares simples, como caña de azúcar (Dantas y col., 2013) y sorgo dulce (Suryaningsih, 2014) y los abundantes en almidón como papa (P. Zhang y col., 2013; L. Zhang y col., 2010), y cereales como el maíz (Barros-Rios y col., 2015) a través de procesos de fermentación y destilación.

b Segunda generación

Son aquellos biocombustibles que se elaboran a partir de materias primas que pueden convertirse en celulosa, como los desechos de los cultivos, el aserrín o plantas con un alto contenido de materia lignocelulósica (Lennartsson y col., 2014; Limayem & Ricke, 2012). Actualmente, la tecnología para producir etanol celulósico no es estable, y una gran parte se encuentra en experimentación, pero se prevén resultados satisfactorios a corto plazo que permitan la implementación

de estas tecnologías en desarrollo.

c Tercera generación

Este tipo de biocombustibles provienen de cultivos específicos no alimentarios y que tienen ventajas potenciales muy concretas; como las algas, que tienen un potencial energético que puede llegar a ser 30 veces mayor que el de los cultivos energéticos en tierra, capturan una gran cantidad de energía solar y se reproducen rápidamente (Doan y col., 2012; Behera y col., 2011; Harun y col., 2010).

C BIOMASA UTILIZADA EN LA PRODUCCIÓN DE BIOETANOL

Para la producción de etanol se suele emplear materias primas azucaradas o amiláceas, como respectivamente son la caña de azúcar y el maíz, que representan las alternativas más adoptadas en las plantas agroindustriales. Sin embargo, la biomasa que ofrece mayor sustentabilidad para obtener bioetanol es la celulosa por no ser un alimento, tener un alto contenido de azúcares disponibles y bajo costo. En el **Cuadro 1**, se presentan los azúcares y polímeros que pueden ser convertidos en etanol y algunos ejemplos de donde se pueden obtener. A la vez en la **Figura 2**, se muestran los procesos de cómo se transforman estos productos en etanol.

1 Fuentes de lignocelulosa

Las fuentes de obtención de lignocelulosa principalmente están constituidas por celulosa, hemicelulosa y lignina (Jönsson y col., 2013), estos polímeros pueden ser transformados en azúcares y posteriormente en etanol. En general las fuentes de obtención de lignocelulosa se dividen en tres categorías: residuos agroindustriales, residuos forestales y cultivos energéticos (de madera y herbáceos) (Carriquiry y col., 2011).

a Residuos agroindustriales

Los sustratos lignocelulósicos provenientes de desechos agroindustriales como tallo, mazorca y rastrojo de maíz (Barros-Rios y col., 2015), rastrojo y

Cuadro 1. Tipos y ejemplos de biomasa para producción de bioetanol, tomada de (SENER, 2006).

Biomasa	Ejemplos
Azúcares	<ul style="list-style-type: none"> • Sacarosa de cultivos sacaridos: caña de azúcar, remolacha, sorgo dulce. • Azúcares invertidos y hexosas: melazas y otros residuos agroindustriales como lactosa.
Almidón	<ul style="list-style-type: none"> • Granos de cereales: almidón, sorgo, trigo y cebada. • Productos procesados: harina de trigo, cascarilla de maíz. • Raíces almidonadas: yuca, papa, alcachofa israelita.
Celulosa	<ul style="list-style-type: none"> • Residuos Lignocelulósicos: aserrín, paja, residuos boscosos, residuos agrícolas, lejía celulósica. • Residuos urbanos e industriales: papel, fracciones celulósicas.

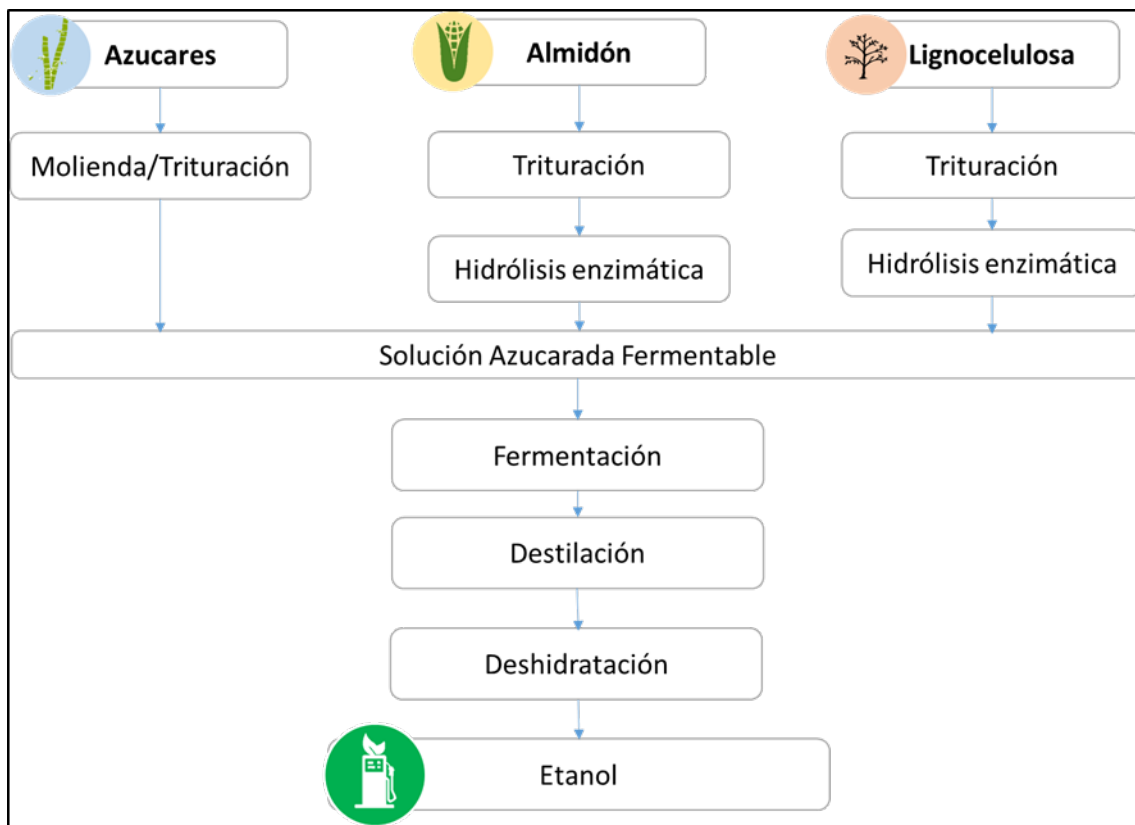


Figura 2. Tipos procesos para producción de bioetanol de acuerdo al origen de la biomasa, adaptada de (Bajpai, 2013a; SENER, 2006).

vinazas de sorgo (Suryaningsih, 2014), pseudo-tallos de bananos (Ingale y col., 2014), cascara y pulpa de mango (Santis Espinosa y col., 2014), bagazo de caña, tallos de algodón, paja de trigo, arroz y caña (Anwar y col., 2014), helechos (Saha y col., 2014), mucílago de café (Pérez-Sariñana y col., 2014) y palma de aceite (Srimachai y col., 2014) suelen ser una alternativa sustentable por ser de fácil adquisición, baja demanda en el mercado, y no causar erosión de suelos.

b Residuos forestales

La transformación de los recursos forestales en productos como pulpa y trozos de madera genera residuos secundarios como aserrín y licores. Estos residuos secundarios son usados por la industria para producción de energía a partir de la biomasa (Perlack y col., 2005). En la madera cerca del 50% lo constituye la celulosa, razón por la cual se considera la principal fuente de materia prima para la obtención de etanol (Jiménez y col., 2004). Cortínez y Lienqueo (2010), evaluaron la degradación de astillas de madera de eucalipto (*Eucalyptus globulus*) y madera de lenga (*Nothofagus pumilio*) mediante hidrólisis ácida y líquidos iónicos para la obtención de bioetanol de segunda generación. Recientemente, Cotana y col. (2014), han producido bioetanol de astillas de madera de pino utilizando explosión de vapor como pretratamiento obteniendo 0.1 g de etanol/g de astillas de pino.

c Cultivos energéticos

Además del aprovechamiento de desechos agroindustriales como fuente de celulosa, los cultivos energéticos se presentan como una alternativa ante la demanda de biomasa para la producción de bioetanol. Un cultivo energético es aquel cultivo agrícola, forestal o acuático, cuya producción parcial o total se utiliza como materia prima para generar energía aprovechable (Nava-García & Doldán-García, 2014). Algunas especies de plantas no convencionales como la jatrofa, el cardo, sorgo dulce, patata y colza etíope se han utilizado como cultivos energéticos. Recientemente se han empleado ramas de árboles de *Moringa oleifera* como sustrato lignocelulósico empleado para la producción de etanol.

Montaño-Morales (2014), reportó haber obtenido un rendimiento de 0.13 g etanol/g *Moringa* en un proceso en el que empleó un complejo enzimático comercial de celulasas y glucoamilasas para realizar la hidrólisis de celulosa y obtener azúcares fermentables que posteriormente convirtió en etanol con *Saccharomyces cerevisiae*. En Sinaloa, se ha propuesto el desarrollo de *Jatropha curcas* (Escoto y col., 2013), como fuente de cultivo energético y demuestran que tiene un gran potencial para sus investigaciones el potencial para producir biomasa, debido a que una hectárea de *Jatropha curcas* puede aportar 20 toneladas de biomasa (biomasa seca), considerando 200 kg de biomasa por árbol para una población de 400 árboles/ha, después de 6 años.

2 *Moringa oleifera* como biomasa lignocelulósica

Moringa pertenece al inmenso orden de las *Brassicales*, dentro de la familia *Moringaceae*, que comprende únicamente un género, *Moringa* el cual se compone por 13 especies que abarcan una gama muy diversa de hábitos o formas de crecimiento. Sus especies se caracterizan por tener hojas pinnadas grandes, en donde cada hoja está dividida en muchos folíolos dispuestos sobre un armazón llamado raquis (Olson & Fahey, 2011).

M. oleifera es un árbol perenne, poco longevo, originario del sur del Himalaya, el nordeste de la India, Bangladesh, Afganistán y Pakistán (Godino y col., 2013; Silva y col., 2013; Pérez y col., 2010). Debido a las bondades agronómicas que esta planta posee, puede crecer en suelos que no están destinados para la agricultura y por lo tanto no se pone en riesgo la seguridad alimentaria por competencia de suelos. *Moringa oleifera* es una planta con gran potencial como productora de materia prima para biocombustibles ya sea como biodiésel, bioetanol o biogás. Su cultivo destaca por su rusticidad, gran capacidad de rebrote, rápido crecimiento y gran versatilidad, puede ser cultivado como árbol aislado o en muy altas densidades (Godino y col., 2013). Es una especie de muy rápido crecimiento que aporta una elevada cantidad de nutrientes al suelo, además de protegerlo de factores externos como la erosión, la desecación y las

altas temperaturas. La moringa es resistente a la sequía y tolera una precipitación anual de 500 a 1 500 mm, crece en un rango de pH de suelo entre 4.5 y 8, excepto en arcillas pesadas, y prefiere suelos neutros o ligeramente ácidos (Pérez y col., 2010). Se desarrolla en climas tropicales y subtropicales (Ali y col., 2014), la planta crece en zonas cuya temperatura media oscila entre los 12,6 y 40 °C, soportando temperaturas mínimas de hasta -1 °C y máximas de hasta 48 °C (Godino y col., 2013). De acuerdo con lo reportado por Montaña-Morales (2014), la moringa a los 45 días de crecimiento posee un 28% de celulosa, 13.2% de hemicelulosa y 4.01% de lignina.

3 Polímeros constituyentes de la lignocelulosa

La lignocelulosa es considerada la fuente de carbono más extensa y abundante en la naturaleza y está compuesta de polímeros de carbohidrato de celulosa, hemicelulosa y lignina (Du y col., 2015; Okamoto y col., 2014). La proporción de estos polímeros difiere en el origen de la biomasa (Irmak y col., 2013; Malherbe & Cloete, 2002). En la **Figura 3** se observa como está compuesta la pared celular de las plantas, siendo relevante que una gran parte de la pared está compuesta de azúcares.

a Celulosa

La celulosa es un polímero constituido por cadenas de *D*-glucosa unidas por enlaces glucosídicos β 1-4 y existen en forma cristalina y amorfa. El contenido de celulosa en plantas varía de un 36 a un 61% (Brethauer & Wyman, 2010). Puede ser hidrolizada por enzimas a glucosa y fermentada rápidamente a etanol por microorganismos como *Saccharomyces cerevisiae* (J. LiZhou y col., 2014). Usualmente se forman arreglos de estructuras microcristalinas de celulosa que presenta mucha dificultad para disolverse o hidrolizarse bajo condiciones naturales. El grado de polimerización de las cadenas de celulosa se encuentra en un rango de 500 a 25000 (Malherbe & Cloete, 2002).

b Hemicelulosa

Las hemicelulosas son una clase heterogénea de polímeros, representando

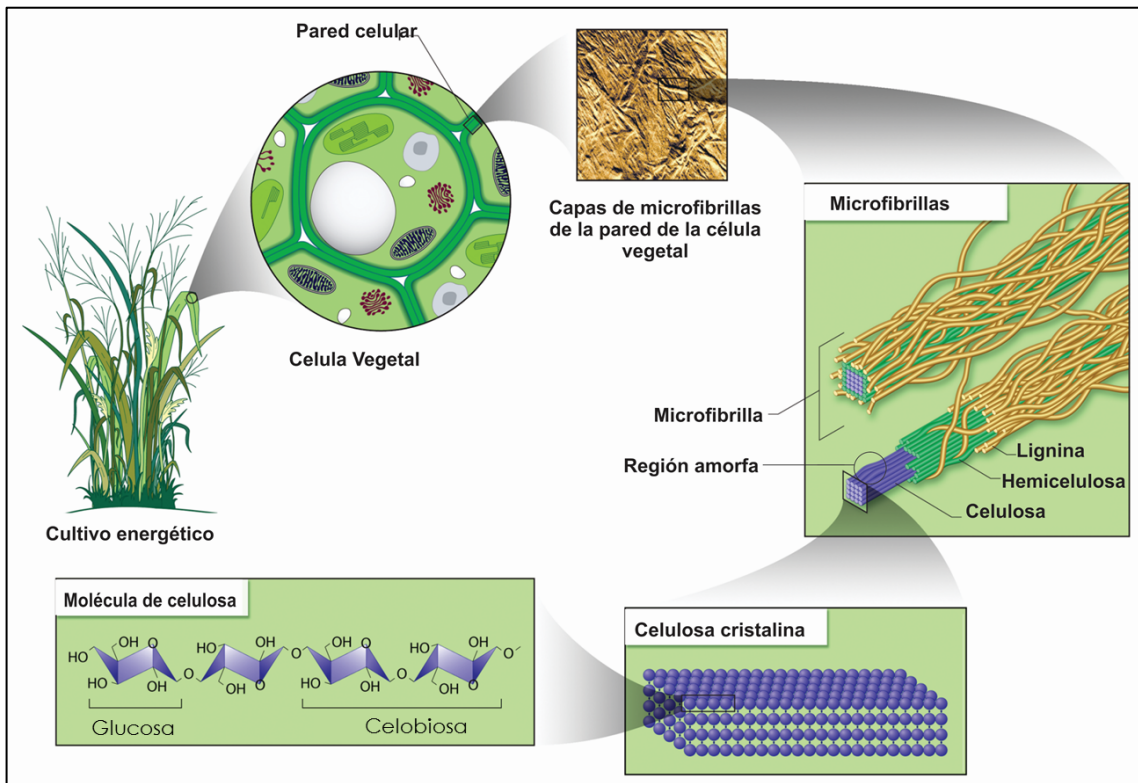


Figura 3. Esquema general de la composición de la biomasa lignocelulósica. Tomado de ("US DOE," 2005).

del 15-35% de la biomasa vegetal, siendo así la más compleja de los tres principales polímeros en la biomasa. La hemicelulosa está compuestas por unidades monoméricas de pentosas (β -D-xilosa, β -D-arabinosa), hexosas (β -D-manosa, β -D-glucosa, β -D-galactosa) y ácidos urónicos (ácidos α -D-glucorónico, α -D-4-O-metilgalacturónico y α -D-galacturónico) y otros azúcares como α -L-ramnosa y α -L-fucosa en menor proporción. La clase de hemicelulosa más común son los xilanos, que son el principal componente de la pared secundaria en las células vegetales constituyendo de un 20-30% en arboles de madera y plantas herbáceas (Gírio y col., 2010). El contenido de hemicelulosa es importante debido a que durante su hidrólisis se generan monosacáridos diferentes a la glucosa que pueden ser transformados en etanol (Dionisi y col., 2015).

a Lignina

La lignina es un polímero de alto grado de carbono, no está constituido por azúcares y aparece impregnando las paredes celulares de ciertos tejidos dándoles rigidez, resistencia, cohesividad e hidrofobicidad (Machado, 2010). Químicamente es un compuesto aromático está formada por tres subunidades repetitivas diferentes de derivados de alcohol: alcohol *p*-cumaril, alcohol coniferil, alcohol sinapil (Dionisi y col., 2015; Doherty y col., 2011). El contenido de lignina en plantas puede variar de un 6-29% (Brethauer & Wyman, 2010). La estructura de la lignina no ha sido definida claramente como la de otros polímeros, debido a la complejidad que afecta su aislamiento, análisis de la composición, y la caracterización estructural, asociado a la naturaleza de sus múltiples unidades estructurales, las cuales no suelen repetirse de forma regular, dado que la composición y estructura de la lignina varían dependiendo de su origen y el método de extracción o aislamiento utilizado (Sifontes & Domine, 2013).

4 Pretratamiento para la biomasa lignocelulósica

La lignocelulosa recalcitrante es una de las mayores barreras para la producción de etanol de segunda generación. El enfoque de los pretratamientos se ha basado en superar esta barrera y obtener la celulosa que puede ser hidrolizada por enzimas y convertida en glucosa. El pretratamiento ha sido uno de las etapas más costosas en los bioprocesos de producción de etanol para la conversión de biomasa en azúcares fermentables. Las condiciones más favorables para un pretratamiento viable serían un ataque enzimático que evite la degradación total de la celulosa y hemicelulosa, evitando la formación de inhibidores enzimáticos y microbianos, minimizar la demanda energética, disminuyendo los costos asociados a la reducción de la fuente de biomasa y la elaboración de reactores para pretratamiento, producción mínima de residuos y la minimización de químicos. Los procesos de pretratamientos se clasifican en físicos, fisicoquímicos, químicos y biológicos. Chen y col. (2012), compararon los rendimientos de azúcar obtenidos de tres biomasa: pasto plateado (*Miscanthus sinensis*), pasto elefante (*Pennisetum purpureum*), y paja de arroz TK-9 con dos pretratamiento, explosión con amonio e hidróxido de calcio ($\text{Ca}(\text{OH})_2$), combinados con hidrólisis enzimática, se observó que ambos pretratamientos potenciaron la disponibilidad de azúcares en las mejores condiciones de actividad para las enzimas. Sin embargo, ninguno de estos métodos desarrollados han sido factibles y técnicamente económico para procesos a una mayor escala.

a Pretratamientos físicos

Dentro de esta clasificación de tratamientos se encuentran la trituración mecánica y pirólisis. La primera consiste en convertir la biomasa lignocelulósica en astillas y fragmentos molidos pequeños, para reducir la cristalización de la celulosa. La talla de los fragmento es de 10-30 mm durante el astillado y de 0.2 a 2 mm durante la molienda o trituración. Los requerimientos energéticos para la trituración dependen del tamaño de partícula deseado y las características de la biomasa. La pirólisis también ha sido usada para tratar la biomasa lignocelulósica

y permite transformar la celulosa y la hemicelulosa rápidamente en azúcares fermentables con buenos rendimientos (Balat, 2011). En general, los procesos de pirólisis se caracterizan por llevarse a cabo a temperaturas entre 300 – 600°C, presión atmosférica y en un ambiente inerte. La pirólisis rápida se destaca, además, por realizarse en condiciones que favorecen altos coeficientes de transferencia de calor y tasas de calentamiento de la biomasa, en un reactor con buen control de temperatura alrededor de 500°C. La pirólisis es seguida por el rápido enfriamiento, separación y condensación de un líquido (Müller y col., 2013)

b Pretratamientos fisicoquímicos

La explosión de vapor de agua es el método más usado para el pretratamiento de materiales lignocelulósicos. Esta técnica incrementa la cristalinidad de la celulosa al promover la hidratación de las zonas amorfas. Asimismo, la hemicelulosa se hidroliza rápidamente por este método y promueve la deslignificación. Este método consiste básicamente en tratar la biomasa astillada a alta presión con vapor saturado y disminuir rápidamente la presión, lo cual provoca que la biomasa entre en proceso de ordenamiento cristalino. La explosión con vapor, comparado con otros métodos ofrece una baja inversión de capital, tiene un bajo impacto ambiental, es menos peligroso comparado con los métodos químicos y tiene una alta tasa de recuperación de glucosa. Los métodos mecánicos convencionales requieren el 70% más de energía que por explosión de vapor para lograr el mismo tamaño de partícula. Es considerado el método más económico para el pretratamiento de madera dura y residuos agroindustriales y el menos económico para madera blanda (Balat, 2011).

La explosión de fibras de amonio (AFEX, por sus siglas en inglés), es uno de los pretratamientos fisicoquímicos alcalinos, en este proceso el material es sometido en amonio líquido a alta temperatura y presión y por consiguiente rápida descomposición, similar a la explosión de vapor. En un típico proceso AFEX, la dosis de amonio líquido es de 1-2 Kg de amonio/Kg de biomasa a una temperatura de 363K y un tiempo de 30 minutos. Este sistema no libera

directamente los azúcares pero si aumenta la oportunidad para un ataque enzimático sobre la celulosa y hemicelulosa. AFEX es un pretratamiento que mejora la tasa de sacarificación en cultivos herbáceos, también ha sido aplicado en periódico, paja de arroz y bagazo de caña (Chen y col., 2012).

El pretratamiento con agua líquida caliente (LHW, por sus siglas en inglés), usualmente involucra temperaturas de 473-503 K por más de 5 minutos. Si el pH se mantiene de 4-7 la degradación de monosacáridos se puede reducir (Balat, 2011).

El ultrasonido es un pretratamiento fisicoquímico moderno y amigable con el medio ambiente. Rehman y col. (2013), describen que puede ser muy efectiva la sonicación de alta energía para desprender los polímeros en la lignocelulosa usando frecuencias de 100 KHz a 1 MHz, conocido como ultrasonido de alta frecuencia. Sin embargo, proponen que a baja frecuencia puede ser utilizada durante la fermentación para mejorar la disponibilidad de azúcares utilizando frecuencias de 16 a 100 KHz.

c Pretratamientos químicos

La ozonólisis consiste en usar ozono para romper la lignina y hemicelulosa e incrementar la biodegradabilidad de la celulosa. El pretratamiento usualmente se lleva a cabo temperatura ambiente de 25°C y es un efectivo removedor de lignina sin la formación de productos tóxicos. Una de las desventajas es que se requieren altas cantidades de ozono lo que puede implicar un alto costo del proceso (Balat, 2011).

El pretratamiento alcalino consiste en la aplicación de soluciones alcalinas para remover la lignina y varios ácidos urónicos, que permiten que la celulosa y hemicelulosa sean más asequibles a las enzimas (Balat, 2011). Este proceso se realiza a bajas temperaturas y baja presión y se lleva en condiciones ambientales pero el tiempo de pretratamiento es en horas incluso días. Las sustancias apropiadas para este proceso son hidróxido de potasio, sodio, calcio y amonio (Badiei y col., 2014; Chen y col., 2012).

EL pretratamiento ácido se enfoca en obtener altos rendimientos de azúcares fermentables. Los ácidos empleados en este método con sulfúrico, nítrico y clorhídrico que expone la celulosa para una digestión enzimática. Estos métodos son altamente efectivos pero altamente contaminantes (Balat, 2011). El pretratamiento ácido usualmente involucra la adición de ácidos concentrados o diluidos a 0.2-2.5 % (p/p) en la biomasa y mezclados continuamente de 130°C a 210°C (Badiei y col., 2014).

d Pretratamientos Biológicos

Los pretratamientos biológicos involucran microorganismos como hongos de pudrición blanca, café y blanda que son usadas para degradar lignina y solubilizar hemicelulosa. Sin embargo, la tasa de hidrólisis es demasiado baja. Los polímeros de carbohidrato en lignocelulosa necesitan ser convertidos en azúcares simples antes de la fermentación. Se han empleado varios métodos de hidrólisis se emplean, en los métodos químicos usan ácidos y en los biológicos enzimas. La hidrólisis enzimática es un método que tiene una tasa de degradación muy baja comparada con la hidrólisis ácida. No obstante, la hidrólisis enzimática ofrece una mayor ventaja en cuanto a costo y ambientalmente amigable (Balat, 2011).

D MICROORGANISMOS EN LA PRODUCCIÓN DE BIOETANOL

La lignocelulosa está constituida por diferentes polímeros y para su conversión a etanol requiere de múltiples enzimas que son obtenidas de microorganismos. Sin embargo, no todos los microorganismos lignocelulósicos son capaces transformar la biomasa lignocelulósica a etanol, y de manera opuesta no todos los microorganismos etalogénicos son capaces de degradar la lignocelulosa. Actualmente se conocen pocas especies de microorganismo que pueda llevar a cabo ambas tareas. Por lo tanto, se emplean consorcios en cultivos mixtos. Du y col. (2015), recientemente evaluaron a *Pseudoxanthomonas taiwanensis* un microorganismo potenciador en la hidrólisis de la celulosa actuando por cometabolismo en un consorcio natural de bacterias celulósicas.

Amore y Faraco (2012), propusieron el uso microorganismos genéticamente modificados para obtener etanol. Sin embargo, Okamoto y col. (2014), caracterizaron la habilidad de la cepa silvestre de *Trametes versicolor* para fermentar xilosa y evaluar el potencial del basidiomiceto para una eficiente producción de bioetanol en un bioproceso consolidado, obteniendo rendimientos de 0.24 g de etanol/ g de paja de trigo. En el **Cuadro 2**, se presentan algunos microorganismos reportados que se han utilizado en la producción de etanol desde fermentadores de hexosas y pentosas hasta degradadores de lignocelulosa.

1 Microorganismos productores de enzimas lignocelulósicas

La celulosa es un polímero que puede ser encontrado en mayor concentración en la biomasa lignocelulósica y su hidrólisis se lleva a través de un complejo enzimático que actúa sinérgicamente, este complejo está compuesto por tres tipos de celulasas: a) endoglucanasas (EC 3.2.1.4), b) β -celobiohidrolasas (EC 3.2.1.91 y c) β -glucosidasas (EC 3.2.1.21) (Xiao y col., 2004). En el **Cuadro 2** se muestran algunos microorganismos que presentan este tipo de actividad enzimática.

Entre los microorganismos que son capaces transformar la hemicelulosa en monómeros de xilosa, son los productores de enzimas de xilanasas, estas son un grupo de enzimas responsable de la hidrólisis del xilano. Las principales son endo-1,4- β -xilanasas (E.C. 3.1.8) y β -xilosidasa (E.C. 3.2.1.37) e involucran el rompimiento de enlaces glucosídicos en la cadena principal de xilano. La mayoría de los microorganismos productores de estas enzimas son hongos, entre los cuales se encuentran *Aspergillus niger*, *Humicola insolens*, *Termomonospora fusca*, *Trichoderma reesei*, *T. longibrachiatum*, *T. koningii*. Sin embargo, comercialmente se han obtenido a partir de bacterias como *Bacillus* sp. (Girio y col., 2010).

Los microorganismos lignolíticos tienen la capacidad de producir enzimas para descomponer los distintos polímeros que componen la lignocelulosa.

Cuadro 2. Microorganismos empleados en el bioproceso para la producción de bioetanol

Microrganismo	Actividad	Referencia
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Fermenta glucosa a etanol	(Bovo y col., 2015; Chandel y col., 2011; Chander Kuhad y col., 2010)
<i>Zymomonas mobilis</i>	Fermenta glucosa a etanol	(Gonçalves y col., 2015; Ndaba y col., 2014; Thirumalai Vasan y col., 2011)
<i>Pichia stipitites</i>	Fermenta xilosa a etanol	(Chandel y col., 2011; Buaban y col., 2010)
<i>Candida shehatae</i>		(Hickert y col., 2014)
<i>Trametes versicolor</i> <i>Trametes hirsuta</i>	Fermentan xilosa y otras hexosas en etanol	(Okamoto y col., 2014)
<i>Pseudoxanthomonas taiwanensis</i>	Potenciador de consorcios cometabolismo	(Du y col., 2015)
Consortio: <i>Acetivibrio cellulolyticus</i> <i>Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum</i> <i>Clostridium stercorarium</i> <i>Clostridium thermosuccinogenes</i> <i>Clostridium thermopalmarium</i> <i>Clostridium sporogenes</i>	Transformación de celulosa a etanol	(Du y col., 2015)
<i>Penicillium echinulatum</i>	Produce celulasas y xilanasas	(dos Reis y col., 2013)
<i>Pholiota adiposa</i>		(Jagtap y col., 2012)
<i>Streptomyces sp.</i>	β -glucosidasa	(Hsu y col., 2011)
<i>Bacillus carboniphilus</i>	Celulasas	(Annamalai y col., 2014)
<i>Pholiota adiposa</i>	Lignocelulasas	(Jagtap y col., 2012)
<i>Phlebia sp.</i>	Celulosa a etanol	(Kamei y col., 2012)
<i>Penicillium purpurogenum</i>	β -1,4-endoglucanasa	(K.-M. Lee y col., 2010)
<i>Trichoderma reesei</i>	Celulasas	(C. Li y col., 2013)
<i>Penicillium citrinum</i>	B- Glucosidasa	(Ng y col., 2010)
<i>Penicillium janthinellum</i>	Celulasas	(Singhania y col., 2014)
<i>Trametes versicolor</i> <i>Trametes hirsuta</i>	Fermenta hexosas y xilosas en etanol	(Okamoto y col., 2014)
<i>Thermoanaerobacter pentosaceus</i>	Paja de colza pretratada a etanol	(Tomás y col., 2013)
<i>Aspergillus fumigatus</i> <i>Aspergillus ellipticus</i>	Degradan lingnocelulosa en celuosa	(Ingale y col., 2014)
<i>Trametes suaveolens</i>	Fermentan lignocelulosa a etanol	(Okamoto y col., 2014)

La lignina puede degradarse a través de enzimas que son producidas por hongos de pudrición blanca e.g. *Auricularia auricula*, *Cookeina sulcipes*, *Cookeina thricoloma*, *Earliella scabrosa*, *Ganoderma*, *Picnoporus sanguineus*, *Pleurotus ostreatus*, *Ramaria* sp., *Schizophyllum commune*, *Trametes* sp., entre otros, que producen enzimas como lacasas, manganeso peroxidasa y lignina peroxidasa. Blaich y Esser (1975), detectaron actividad lacasa en hongos descomponedores de madera usando la tinción con *p*-fenilendiamina. Entre las especies analizadas, a saber, *Coprinus plicatilis*, *Fomes fomentarius*, *Heterobasidion annosum*, *Hypholoma fasciculare*, *Kuehneromyces mutabilis*, *Leptoporus litschaueri*, *Panus stipticus*, *Phellinus igniarius*, *Pleurotus corticatus*, *P. ostreatus*, *Polyporus brumalis*, *Stereum hirsutum*, *Trametes gibbosa*, *T. hirsuta* y *T. versicolor*, exhibieron la producción de más de una isoenzima (Baldrian, 2006).

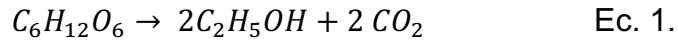
2 Fermentadores de etanol a partir de hexosas

Una vez degradados los polímeros de la lignocelulosa a sus unidades monoméricas estas pueden ser hexosas como D-glucosa, que mediante la glucólisis y se transforman a etanol. *Saccaromyces cerevisiae* es el microorganismo más representativo entre los fermentadores de etanol a partir de hexosas, *Zymomonas mobilis* también ha sido muy estudiado en las últimas tres décadas (Bovo y col., 2015; Bai y col., 2008). Se ha reportado que algunos hongos filamentosos como *Trichoderma* sp., *Neurospora* sp., *Rhizopus* sp., *Aspergillus oryzae*, *Mucor circinelloides*, *Paecilomyces variotii*, *Fusarium verticillioides*, *Fusarium oxysporum*, y muchos otros basidiomicetos de pudrición blanca como *Trametes versicolor*, *Flammulina velutipes*, *Phlebia* sp., *Peniophora cinerea* y *Trametes suaveolens* son capaces de producir etanol (Salehi Jouzani & Taherzadeh, 2015).

Otras hexosas como D-manosa se transforman en D-glucosa mediante la isomerización llevada por la enzima 6-fosfato-manosa-isomerasa y la D-

galactosa se transforma en D-glucosa por la ruta de Leloir (Gírio y col., 2010).

A continuación se presenta la reacción general (Ec. 1) para la conversión de hexosas a etanol (Dionisi y col., 2015).



a Ruta Embden-Meyerhof-Parnas

La principal ruta metabólica para la fermentación de etanol es la glucólisis (Embden-Meyerhof-Parnas o EMP), en la que una molécula de glucosa es metabolizada en dos moléculas de piruvato, que bajo condiciones anaerobias el piruvato se puede transformar en etanol (Bai y col., 2008), como se presenta en la **Figura 4**. Durante la glucólisis se producen 2 moléculas de Adenosin trifosfato (ATP) que son usadas para la biosíntesis de biomasa celular por *S. cerevisiae*. Debido a que la fosfofructoquinasa se inhibe en presencia de altas concentraciones de ATP, la levadura emplea la biosíntesis como una forma para seguir produciendo ATP de manera continua mientras exista sustrato. Teóricamente el rendimiento de la fermentación alcohólica por la ruta EMP es de 0.551 g de Etanol y 0.489 g de CO₂ para una masa base 1 g de glucosa. Sin embargo, en la práctica se obtiene un rendimiento del 90-95% del teórico máximo (Kuyper y col., 2004).

a Ruta Entner-Doudoroff

La ruta Entner-Doudoroff (ED) es una ruta metabólica empleada por bacterias gram-negativas como *Z. mobilis* que fermenta etanol a partir de la glucosa y al igual que la ruta EMP, se acoplan a las reacciones catalizadas por la enzima piruvato carboxilasa y alcohol deshidrogenasa (Bai y col., 2008). En la **Figura 5** se ilustra, la ruta ED donde a partir de una hexosa como glucosa y/o fructosa se puede llegar a producir etanol. En comparación de la ruta EMP, la ruta ED permite la conversión de glucosa a piruvato en un número menor de reacciones. Además permite la incorporación de gluconato como una fuente alterna de carbono, considerando que la EMP solo incluye hexosas.

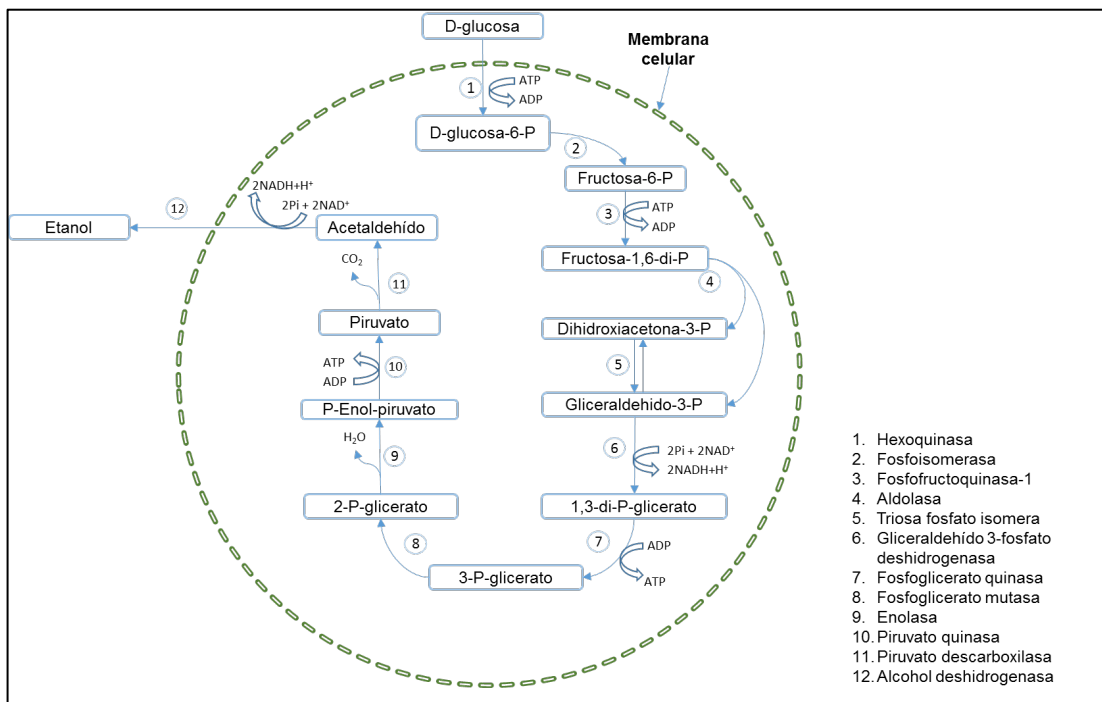


Figura 4. Ruta Embden-Meyerhof-Parnas en *S. cerevisiae*, tomado de (Bai y col., 2008).

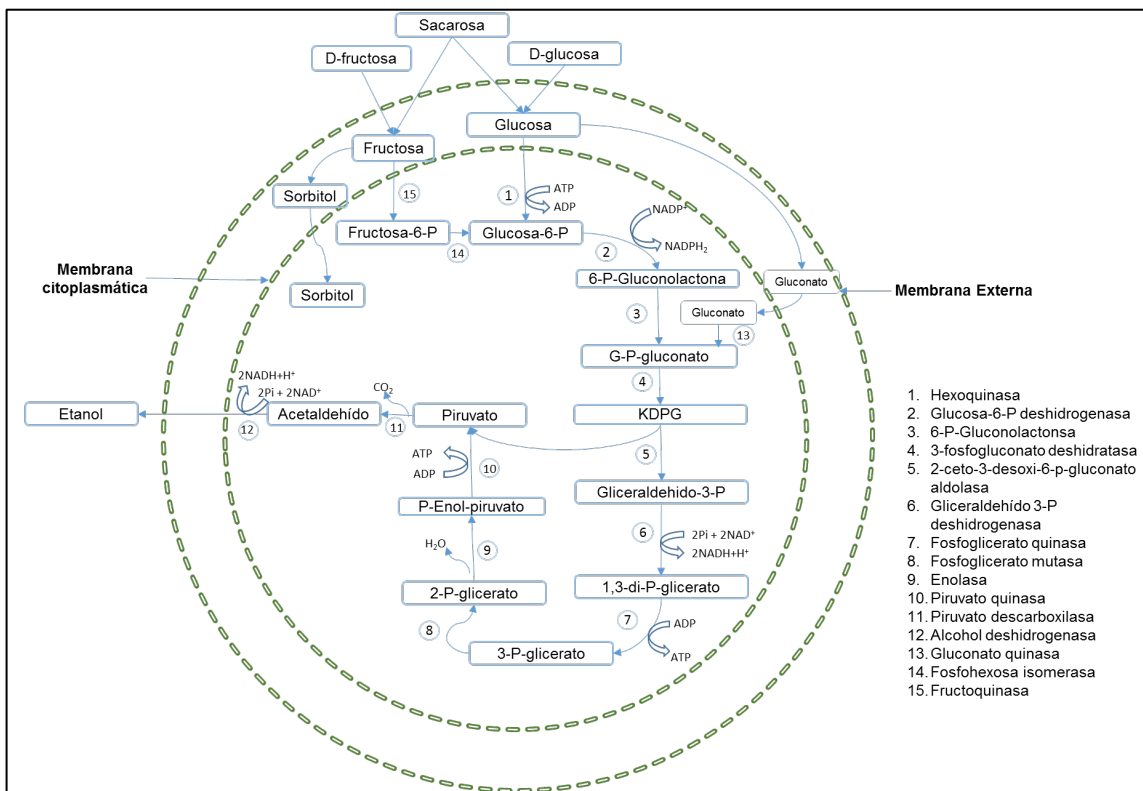
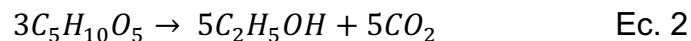


Figura 5. Ruta Entner-Doudoroff *Z. mobilis*, tomado de (Bai y col., 2008)

3 Fermentadores de etanol a partir de pentosas

Una vez que la hemicelulosa se degrada en D-xilosa y D-arabinosa estos azúcares son metabolizados a través de la ruta de pentosas, para que estos monosacáridos puedan ser incorporados a dicha ruta es necesario la previa intervención de algunas enzimas con actividad de isomerasas como la D-xilosa isomerasa (E.C. 1.1.1.44), D-xilosa reductasa (E.C. 5.3.1.5), xilitol deshidrogenasa (EC 1.1.1.9), xiluloquinasa (EC 2.7.1.17), L-arabinosa isomerasa (EC 5.3.1.4), L-ribuloquinasa (EC 2.7.1.16), L-ribulosa-5P 4-epimerasa (EC 5.1.3.4), L-arabinosa reductasa (EC 1.1.1.21), L-arabitol 4-dehidrogenasa (EC 1.1.1.12), L-xilulosa reductasa (EC 1.1.1.10) (Gírio y col., 2010). Al final de las reacciones de isomerización se obtiene como producto la D-xilulosa-5-P que se incorpora a la ruta de pentosas en la fase no oxidativa que como resultado final se obtiene fructosa-6-P y gliceraldehido 3-P, que se pueden convertir a etanol ya sea por la ruta EMP como se ilustra en la **Figura 6** (Lehninger & Cox, 2006).

A continuación se presenta la reacción general (Ec. 2) para la conversión de pentosas a etanol (Dionisi y col., 2015).



La ruta catabólica para L-arabinosa está presente en bacterias como *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* y *Lactobacillus plantarum* (Gírio y col., 2010). En hongos fue descrita por primera vez en *Penicillium chrysogenum* (Chiang & Knight, 1961). Sin embargo, no son especies que puedan llevar a cabo una fermentación alcohólica. En cambio que microorganismos como las levaduras pueden fermentar la xilosa, ejemplo de ello se tiene a *Candida shehatae*, *Candida parapsilosis*. y *Pichia stipitis* (Hickert y col., 2014; Balat, 2011; Buaban y col., 2010) y a partir de D-Xilulosa-5-P *Saccharomyces. cerevisiae* puede fermentar a etanol (Balat, 2011).

E SISTEMAS DE PRODUCCIÓN DE BIOETANOL

Las metodologías estándar para la producción de bioetanol son la hidrólisis y fermentación separadas (SHF, por sus siglas en inglés Separated Hydrolysis and Fermentation) y la sacarificación y fermentación simultánea (SSF, por sus siglas en inglés Simultaneous Saccharification and Fermentation), ambos procesos permiten disminuir la viscosidad del medio y mejorar la transferencia de masa durante la biorreacción, además que permiten obtener una mayor concentración de glucosa debido a que la hidrólisis enzimática se lleva en condiciones de temperatura y pH óptimos (den Haan y col., 2015). Sin embargo, ambas metodologías requieren la adición de enzimas exógenas implicando una etapa adicional al proceso.

La sacarificación y cofermentación simultánea (SSCF, por sus siglas en inglés Simultaneous Saccharification and Cofermentation) implica la fermentación de hexosas y pentosas en una etapa reduciendo el número de etapas de tres a dos (**Figura 7**). Recientemente se ha estudiado la conversión de lignocelulosa a etanol en una sola etapa también conocido como bioproceso consolidado (CBP, por sus siglas en inglés Consolidated Bioprocessing) que es una estrategia promisorio para reducir costos y disminuir los requerimientos operarios (Du y col., 2015).

1 Hidrólisis y fermentación separada

Después del pretratamiento de biomasa las siguientes etapas son hidrólisis y fermentación, la cual puede llevarse a cabo de manera separada o simultánea. Cuando la hidrólisis y la fermentación se llevan en diferentes recipientes se denomina SHF, en este proceso cada etapa se pueden realizar en óptimas condiciones de pH y temperatura. Sin embargo, la concentración de glucosa y celobiosa inhiben la actividad enzimática de las celulasas (Tomás-Pejó y col., 2008).

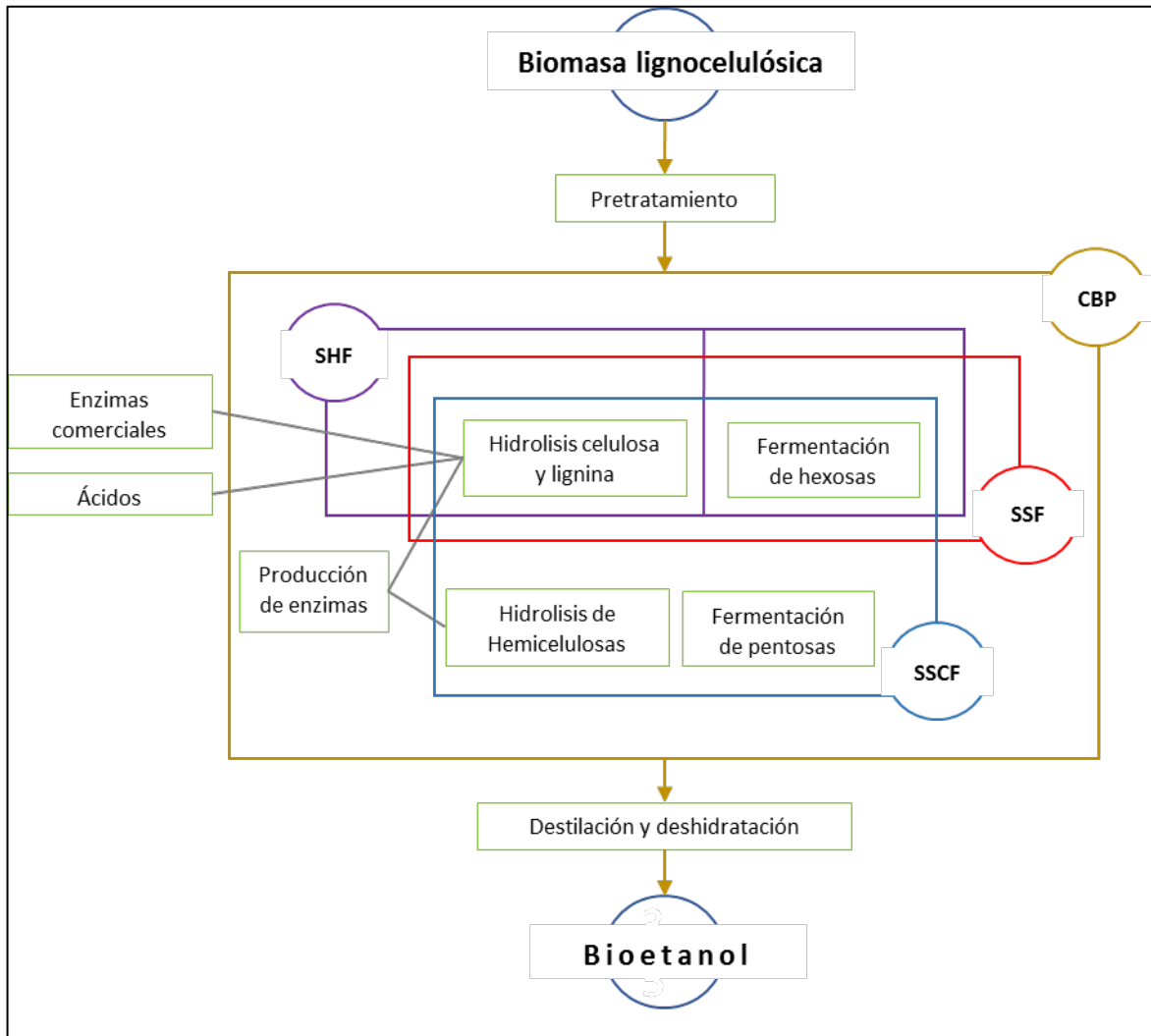


Figura 7. Sistemas de producción de bioetanol; adaptado de (den Haan y col., 2015; Gírio y col., 2010).

2 Sacarificación y fermentación simultánea

La SSF es uno de los métodos más estudiados para la producción de bioetanol, en este proceso la hidrólisis enzimática y la fermentación se llevan a cabo en el mismo recipiente. Debido a que la glucosa obtenida en la hidrólisis se transforman en etanol por la fermentación la concentraciones de esta hexosa no son tan altas para provocar inhibición de celulasas (Tomás-Pejó y col., 2008). Bak (2015) propuso una estrategia para optimizar el bioproceso en la etapa de río abajo, en la que emplearon al hongo *Mucor indicus* durante la sacarificación y *S. cerevisiae* en la fermentación. El proceso consistió en optimizar el crecimiento de *Mucor indicus*, empleando variaciones de glucosa, extracto de levadura y fosfato de potasio, por consiguiente evaluaban la bioconversión del sustrato en etanol en las diferentes preparaciones.

3 Sacarificación y cofermentación simultánea

La SSCF consiste en la hidrólisis de celulosa y hemicelulosa que se realiza por enzimas y la posterior fermentación de pentosas y hexosas desempeñada por levaduras como *Pichia stipitis* y *Saccharomyces cerevisiae*, respectivamente para cada azúcar. Aunque se ha reportado que se han empleado cepas de *Saccharomyces cerevisiae* genéticamente modificadas para la fermentación de pentosas (Menon & Rao, 2012). Al igual que una SSF, la SSCF presenta la ventaja de llevarse a cabo en un mismo tanque, lo que le otorga la ventaja de disminuir el número de etapas en el proceso y costos (Anwar y col., 2014), además la producción de etanol es mayor comparada con los SHF, lo que impide la invasión de microorganismos endógenos al proceso (Brethauer & Wyman, 2010).

4 Bioproceso consolidado

El CBP es una metodología que emplea una sola especie de microorganismo capaz de transformar en una etapa la conversión de biomasa lignocelulosa a etanol (Okamoto y col., 2014). No existen muchas cepas silvestres capaces de

realizar una bioconversión de celulosa a etanol pero se han diseñado algunas cepas mediante el uso de ingeniería genética. Para la obtención de cepas idóneas para un CBP se disponen de dos opciones o categorías la primera es transformar cepas productoras de celulasa en etanólicas y la segunda es transformar cepas etanólicas en celulólicas (Amore & Faraco, 2012).

F VARIABLES IMPORTANTES EN LOS PROCESOS DE PRODUCCIÓN DE ETANOL

Los principales retos en la producción de etanol en un CBP son: i) mantener una considerable producción de enzimas sin comprometer la capacidad de fermentación de etanol. ii) llevar a cabo la cofermentación de hexosas y pentosas y a la vez iii) tolerar altas concentraciones de etanol y productos obtenidos en la degradación de lignocelulosa (den Haan y col., 2015).

Comúnmente las fermentaciones pueden clasificarse como naturales o artificiales, según haya o no intervención del hombre en ellas. También se pueden clasificar por el tipo de producto que se desea obtener, la presencia o ausencia de oxígeno que pueden ser aerobias y anaerobias, o por el estado del sustrato. Es este último aspecto el que permite clasificarlas en fermentaciones sumergidas o en estado líquido (FEL) y fermentaciones en estado sólido (FES) (Suárez Arango & Nieto, 2013).

La FEL es aquella en la cual hay por lo menos la misma concentración de agua y de sustrato sólido (nutrientes) en el proceso, es decir, que hay una solución de los nutrientes. La FES se define como cualquier fermentación que ocurre en ausencia o casi ausencia de líquido libre, que emplea un sustrato inerte (materiales sintéticos) o un sustrato natural (materiales orgánicos) como un soporte sólido.

Las FES han demostrado ser particularmente adecuados para la producción de enzimas por hongos filamentosos, ya que reproducen las condiciones bajo las cuales estos hongos crecen en la naturaleza (Couto & Toca-Herrera, 2007). Sin embargo, para la producción industrial de enzimas se utiliza principalmente una

fermentación sumergida que involucra el crecimiento de microorganismos en un medio líquido rico en nutrientes y con una alta concentración de oxígeno. La fermentación líquida es el tipo de fermentación más utilizado en la industria debido a que es sencilla, pueden controlarse más variables y con mayor facilidad que en la FES y el producto final es mucho más fácil de recuperar. En esta los microorganismos crecen suspendidos en el medio de cultivo y en el caso de los hongos miceliales, estos pueden formar pequeñas esferas de micelio denominadas “pellets” cuando hay agitación; de otra forma, crecen en la superficie.

En la FEL el desarrollo del microorganismo se presenta de una forma típica, originando una fase de latencia, una de crecimiento (fase logarítmica), una fase estacionaria y, la última, la fase de muerte. La FEL a su vez puede dividirse en continua, por lote, y alimentada, según la entrada y salida tanto del sustrato como del producto, respectivamente (Suárez Arango & Nieto, 2013). Durante un cultivo sumergido es posible controlar los parámetros como la temperatura, pH y oxígeno disuelto a diferencia de un cultivo sólido que estos parámetros no se pueden monitorear. En el **Cuadro 3**, se presentan algunos reportes de producción de etanol con hongos en un bioproceso consolidado, las condiciones de cultivo más importantes son la temperatura que oscila de 25 a 35 °C, el pH utilizado es de 4.7 a 6.0 y la agitación de 50 a 180 r.p.m., todos los cultivos se realizaron en FEL y también se presentan los rendimientos obtenidos en sustratos lignocelulósicos como salvado de trigo, rastrojo de caña y paja de arroz, polímeros como almidón, quitina coloidal celulosa y xilano, disacáridos como celobiosa, maltosa y sacarosa, y monosacáridos como glucosa y xilosa. Los mejores rendimientos se presentan en las fermentaciones en los azúcares simples (> 80% del teórico máximo), mientras que los sustratos lignocelulósicos presentan rendimientos menores (<60% del teórico máximo), lo que indica que las condiciones de cultivo juegan un papel importante en el comportamiento de los microorganismos tanto bioquímico como genético.

Cuadro 3. Condiciones de cultivos de hongos etalogénicos usados en la producción de etanol

Microorganismo	Condiciones	Rendimientos	Observaciones	Referencia
<i>Fusarium oxysporum</i>	Etapa fermentativa: 29°C, pH 6, 130 rpm	0.22 g etanol/ g salvado de trigo	Proceso no optimizado 56% del teórico máximo Contenido 0.775 g de Glucosa/g salvado de trigo	(Anasontzis y col., 2011)
	Etapa fermentativa: 35°C, pH 6, 50 rpm	0.125 g etanol/ g paja de arroz	64.4% del teórico máximo 0.379 de Glucosa/ g paja de arroz	(J. Xu y col., 2015)
	Etapa fermentativa: 30°C, pH 5.5, 80 rpm Cultivo combinado con <i>S. Cerevisiae</i>	0.128 g etanol/ g paja de arroz	66.02% del teórico máximo	(Paschos y col., 2015)
<i>Schizophyllum commune</i>	30°C, pH 6, 120 rpm	0.412 g etanol/ g de Glucosa	80.5% del teórico máximo	(Horisawa y col., 2015)
<i>Flammulina velutipes</i>	Etapa fermentativa: 25°C	0.4 g de etanol/g celobiosa	78.20 % del teórico máximo	(Maehara y col., 2013)
<i>M. circinelloides</i>	28°C, pH 5.5, 120 rpm	0.12 g de etanol/ g de quitina coloidal	-	(Inokuma y col., 2013)
<i>Paecilomyces variotii</i>	29°C, pH 6, 180 rpm	0.343 g de etanol/ g de glucosa 0.463 g de etanol/ g de xilosa	67.12% y 90.58% del teórico máximo, respectivamente para cada azúcar.	(Zerva y col., 2014)
<i>F. verticillioides</i> y <i>Acremonium zeae</i>	28°C, pH 6, 180 rpm	0.50 g de etanol/ g sacarosa y 0.48 g de etanol/ g sacarosa	-	(de Almeida y col., 2013)
<i>Peniophora cinérea</i>		0.41 g de etanol/ g de glucosa	79% del teórico máximo	
<i>Trametes suaveolens</i>	28°C, pH 6, estático	0.39 g de etanol/ g de glucosa	76% del teórico máximo	(Okamoto y col., 2010)
<i>Trametes. hirsuta</i>	28°C, pH 6, estático	0.49 g de etanol/ g	94.8, 88 y 92% del	(Okamoto y col., 2011)

		de glucosa 0.46 g de etanol/ g de almidón 0.47 g de etanol/g de celobiosa y/o maltosa	teórico máximo, respectivamente para cada sustrato.
<i>Trametes versicolor</i>	28°C, pH 4.7, 180 rpm	0.46 g de etanol/ g de glucosa 0.49g de etanol/ g de celobiosa 0.48 g de etanol/g de maltosa 0.25 g de etanol/ g de celulosa, xilano, salvado de trigo, paja de arroz. Rendimiento aproximado para cada sustrato.	Efecto del pH de 3 a 5 no mostro diferencia significativa. 89.9, 95.7, 92.8, (Okamoto y col., 48.87% del teórico 2014) máximo, respectivamente para cada sustrato.
<i>Phlebia sp.</i>	28°C, pH 6, estático.	0.225 g de etanol/ g de bagazo de caña 20g de bagazo tiene 13.33 g de azúcares.	65.7% del teórico (Khuong y col., máximo. 2014)

1 pH

El pH es la actividad de iones de hidrógeno en una solución y es definido como el logaritmo negativo de la concentración de iones de hidrógeno. Cada especie de microorganismo tiene definido un rango de pH para crecer y un pH de crecimiento óptimo. La mayoría de los hongos prefieren ambientes ligeramente ácidos, alrededor de un pH de 4 a 6 (Woolverton, 2008). Los microorganismos responden a cambios externos de pH utilizando mecanismos para mantener su pH citoplasmático. Así, los microorganismos fermentativos frecuentemente varían su hábitat produciendo metabolitos como ácidos orgánicos. Graves y col. (2006), evaluaron el efecto de los ácidos acético y láctico sobre la producción de etanol con *Saccharomyces cerevisiae* en una fermentación de puré de maíz y comprobaron que el ácido láctico no inhibe completamente la producción de etanol en un rango de pH de 4 a 5.5. Por lo contrario, encontraron que el ácido acético inhibe completamente la producción de etanol en el mismo rango de pH. Debido a que los microorganismos cambian el pH de su entorno, es recomendable utilizar amortiguadores en el medio de cultivo para prevenir la inhibición del crecimiento y la producción de metabolitos deseados como el etanol. Comúnmente el fosfato es usado como un buen amortiguador, en el que se emplea ácido débil (H_2PO_4^-) y su base conjugada (HPO_4^{2-}) (Khan y col., 2007).

2 Temperatura

Los hongos al igual que todos los microorganismos son profundamente afectados por la temperatura del ambiente. De hecho los microorganismos son altamente susceptibles porque su temperatura interna varía con la del ambiente externo (Tuomela y col., 2000). Un importante efecto de la temperatura es sobre las reacciones catalizadas por enzimas. Cada enzima tiene una temperatura en la cual mantiene un funcionamiento óptimo, a una temperatura debajo de este punto, la actividad catalítica disminuye. Sin embargo, si la temperatura excede el

valor de la óptima puede resultar letal para el crecimiento del microorganismo (Woolverton, 2008), ya que se detienen todas las actividades metabólicas. La temperatura influye sobre la producción de etanol en un CBP dado que todas las reacciones para realizar la bioconversión de lignocelulosa a etanol están catalizadas por enzimas, por ende si el microorganismo no se encuentra en una temperatura óptima se afectara su crecimiento y a la vez la producción de etanol, debido a que este es un metabolito primario que se produce en la fase exponencial de crecimiento del microorganismo. Además, es necesario considerar desde el punto de vista fisicoquímico que un aumento excesivo de la temperatura puede disminuir la solubilidad del oxígeno (Maron & Prutton, 1998), por lo tanto se tendrá un efecto sobre metabolismo del microorganismo a consecuencia de la disminución de la concentración de oxígeno en el medio de cultivo.

3 Concentración de oxígeno

La importancia del oxígeno en el crecimiento de los hongos esta correlacionada con su metabolismo. Un organismo que es capaz de crecer en presencia de oxígeno atmosférico O_2 , se le denomina aerobio, mientras los que crecen en ausencia son anaerobios. Casi todos los organismos que dependen completamente del oxígeno atmosférico O_2 , son aerobios obligados. Los anaerobios facultativos no requieren oxígeno para su crecimiento, pero crecen mejor en su presencia. Los anaerobios aerotolerantes ignoran el oxígeno y crecen en presencia o ausencia de igual manera. Y los anaerobios obligados no toleran el oxígeno y mueren en presencia de este. Los hongos generalmente son aerobios, sin embargo, la mayoría de las levaduras son anaerobios facultativos (Woolverton, 2008).

El oxígeno disponible en un medio de cultivo es medido como oxígeno disuelto (DO), y la solubilidad de este en función de la temperatura y la concentración de solutos en el medio. También está determinado por las condiciones de agitación y aireación. La aireación beneficia el crecimiento celular

y mejora la transferencia de masa con respecto al substrato, producto y oxígeno. La agitación también es importante para una transferencia de masa y calor. Al incrementar la agitación en un fermentador con micelios, el crecimiento tiende a aumentar, posiblemente porque los micelios son fragmentados y se generan más extremos a través de los cuales pueden crecer, o debido a la estrecha relación que existe entre el oxígeno disuelto con la agitación, que podría este influir en la producción de biomasa. Los hongos cultivados en medio líquido, donde se utiliza agitación mecánica, pueden sufrir ruptura celular si la energía introducida por la agitación es mayor que la resistencia del micelio. Cuando el hongo deja de crecer bajo estas condiciones se le conoce como estrés hidrodinámico. En los hongos la agitación puede afectar el tipo de morfología, además, influye en las propiedades de la pared celular, la longitud de las hifas y la rugosidad de las aglomeraciones miceliales. A su vez los consecuentes cambios en la reología del medio de cultivo afecta la transferencia de masa, el esfuerzo cortante y la eficiencia de mezclado (Fazenda y col., 2010).

G RENDIMIENTOS EN LA PRODUCCIÓN DE BIOETANOL

En el **Cuadro 4** se indican algunos rendimientos obtenidos en diversos trabajos en los que se ha producido etanol lignocelulósico. Los rendimientos más altos que van desde 0.2 a 0.4 g de etanol/g biomasa son obtenidos a partir de residuos que proviene de biomasa azucarada como el sorgo dulce, bagazo de caña, cardo dulce y caña de azúcar. Para el caso de biomasa completamente lignocelulósica se encuentra la paja de arroz, moringa, harina de cassava y papel que son rendimientos menores debido a la compleja estructura del sustrato con rendimientos de 0.093 a 0.189 g de etanol/g biomasa. Estos resultados además del tipo de biomasa se deben al uso de los distintos pretratamientos usados donde los pretratamientos químicos con ácidos parecen ser más efectivos que los biológicos. Otro factor es la cepa los trabajos reportados en el cuadro con rendimiento más alto utilizaron a *Saccharomyces cerevisiae*. Esto demuestra que los métodos, condiciones y materiales factores muy importantes.

Cuadro 4. Comparación de rendimientos en la producción de bioetanol a partir de biomasa

Sustrato	Pretratamiento	Microorganismo	Rendimiento	Referencia
Bagazo de caña	Hidrólisis acida con H ₂ SO ₄	<i>Kluyveromyces sp</i>	0.165 g etanol/g bagazo	(Behera y col., 2014)
Paja de arroz	Hidrólisis enzimatica con celulasas	<i>Aspergillus niger</i> ; <i>Trichoderma reesei</i>	0.093 g etanol/g paja de arroz	(Behera y col., 2014)
<i>Moringa oleifera</i>	Hidrólisis acida con H ₂ SO ₄	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	0.130 g de etanol/g de biomasa vegetal	(Montaño-Morales, 2014)
Flores de mahula (<i>Madhuca latifolia</i> L.)	Deshidratación	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	0.223 g de etanol/g de Flores	(Behera y col., 2011)
Harina de cassava (<i>Manihot esculenta</i> Crantz)	Hidrólisis acida con HCl y enzimatica con termamil- y amilogucosidasa	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	0.189 g de etanol/g de harina	(Behera & Ray, 2015)
Bagazo molido	Molienda	<i>Pichia stipitis</i>	0.29 g ethanol/g available	(Buaban y col., 2010)
Caña de azucar silvestre (<i>Saccharum spontaneum</i>)	Secado y puerizado	<i>Pichia stipitis</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	P.S. 0.44 g/g; S.C. 0.44 g/g; combinados 0.49 g/g	(Chandel y col., 2011)
Papel periodico	Coctel de exoglucanasa, β-glucosidasa y xilanasas	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	0.14 g etanol/ml de caldo	(Chander Kuhad y col., 2010)
<i>Cynara cardunculus</i>	Explosion por vapor	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	0.266 g etanol/g cardo	(Fernandes y col., 2015)
Vinasas de sorgo Dulce	<i>Pseudoxanthomonas taiwanensis</i> <i>Acetivibrio cellulolyticus</i> , <i>Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum</i> , <i>Clostridium stercorarium</i> , <i>Clostridium thermosuccinogenes</i> , <i>Clostridium thermopalmarium</i> , y <i>Clostridium sporogenes</i>		0.295 g etanol/ g celulosa	(Du y col., 2015)

IV HIPÓTESIS

Los hongos aislados en regiones del estado de Sinaloa poseen la capacidad para producir etanol a través de un bioproceso consolidado utilizando residuos lignocelulosicos de *M. oleifera*.

V JUSTIFICACIÓN

El bioetanol como combustible, se ha introducido rápidamente en el mercado energético debido a la alta demanda de combustible que existe principalmente al sector transporte. Además, resulta ser un producto interesante por su bajo costo comparado con los combustibles fósiles como la gasolina y el diésel y el hecho de que es un combustible amigable con el ambiente. La producción de bioetanol es una tecnología en transición que aún requiere de ciertos ajustes en diversas etapas del bioproceso y así, obtener bases para establecer un método sólido y contribuir a la seguridad energética. A pesar de que la actual industria de biocombustibles en el mundo está logrando grandes avances con la producción de bioetanol de primera generación se debe tomar en cuenta que es necesario respetar ciertas políticas internacionales referentes a la seguridad alimentaria. Por lo tanto, unas de las principales consideraciones que deben tomarse en cuenta para la producción de bioetanol es que la biomasa sea barata, no debe ocasionar un impacto negativo en el sector alimenticio y ambiental. La biomasa lignocelulósica obtenida de cultivos energéticos como *M. oleifera* resulta ser una opción atractiva para producir bioetanol de segunda generación ya que no es un cultivo designado a la producción de alimentos y puede crecer en suelos que no están destinados a la agricultura, por ende la seguridad alimentaria no se verá en riesgo por competencia de tierras fértiles y el aumento de precios en alimentos, además, de que estos cultivos contribuirán a prevenir la erosión de suelos y mejorar la calidad del aire, además que permite la producción de otros biocombustibles como el biodiesel, coproductos como polímeros y glicerol, y subproductos como harinas proteicas. Actualmente, se han desarrollado metodologías como SHF, SSF y/o SSCF que permiten la obtención de buenos rendimientos de etanol, sin embargo, estos procesos aun no son viables económicamente para un escalamiento. No obstante, recientes investigaciones apuestan por un nuevo método denominado bioproceso consolidado que permite reducir el número de etapas en la bioconversión de lignocelulosa a etanol

unificando en una etapa la hidrólisis del sustrato y la fermentación de hexosas y pentosas, y por lo tanto generar una reducción en los costos de producción y aumento en la eficiencia de bioconversión. Aunando, las ventajas ambientales que permite el desarrollo de energías renovables como lo es el bioetanol, cabe mencionar que la importancia de generar investigación que permita la consolidación de los métodos para producción de bioetanol de segunda generación, tendrá un impacto económico cuando estos procesos se escalen a nivel industrial y se comercialicen, al generar nuevas fuentes de empleos. Asimismo, se hará una contribución importante en el sector energético dando bases para establecer una seguridad energética. La producción bioetanol de segunda generación a partir de biomasa de *Moringa oleifera* utilizando hongos nativos, representa un avance para el sector industrial energético en Sinaloa. Principalmente porque este proyecto es una base para desarrollar un bioproceso que permita producción de combustibles que no generen GEI y de bajo costo. Este proyecto tiene la finalidad de diseñar un bioproceso en escala de laboratorio y de generar datos que propicien en un futuro el escalamiento piloto e industrial. Además, el hecho de utilizar hongos nativos denota la gran biodiversidad que existe en el estado que aún no se ha explotado económicamente.

VI OBJETIVOS

A OBJETIVO GENERAL

Desarrollar un bioproceso consolidado para la producción de etanol a partir de residuos lignocelulósicos de *Moringa oleifera* utilizando hongos nativos del estado de Sinaloa.

B OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Aislar hongos nativos de Sinaloa provenientes de fuentes de lignocelulosa con actividad enzimática de celulasas, xilanasas, manganeso peroxidasa, lacasas y capacidad etanólica.
2. Identificación morfológica de las cepas que presentan actividad lignocelulolítica y etalogenica.
3. Evaluar rendimientos de producción de etanol en glucosa y xilosa en las cepas seleccionadas.
4. Evaluar producción etanol de las cepas seleccionadas en sustrato lignocelulósico de *M. oleifera*.
5. Evaluar producción de etanol y enzimas lignocelulolíticas de las cepas en consorcio con *Saccharomyces cerevisiae* (ATCC 200062) en *M. oleifera*.

VII MATERIALES Y METODOS

La metodología para realizar este proyecto está compuesta por dos etapas la primera consiste en el aislamiento, y selección de hongos en función a su capacidad lignolítica, hemicelulolítica, celulolítica y etalogénica. Seguido por la identificación morfológica de las cepas idónea. La segunda etapa consistió en la evaluación de rendimientos etalogénicos y la evaluación de las cepas en consorcio con *Saccharomyces cerevisiae* (ATCC 200062).

En la **Figura 8**, se observa un diagrama de flujo en el que se describe la estrategia experimental abordada para la realización de este trabajo, en general, consta de 6 pasos, el primero consiste en la recolección de material visualmente infectado por hongos de las clases basidiomicetos y ascomicetos, para su posterior aislamiento. El segundo paso fue crítico en la preselección de cepas, ya que se realizó la evaluación lignocelulolítica cualitativa de los hongos aislados. Posteriormente se evaluó la capacidad de fermentación alcohólica a través de proceso semicuantitativo que se describe en esta metodología. Una vez seleccionados los hongos con capacidad de llevar a cabo un CBP, se identificaron morfológicamente de acuerdo a su clase taxonómica. Hasta este punto concluye la primera etapa de la metodología. En el cuarto paso se evalúan los hongos seleccionados en glucosa y xilosa en cinéticas de 96 horas, para determinar el rendimiento y comparar estadísticamente las cepas. También, se evaluaron en sustrato lignocelulolítico que fue tallo de *Moringa oleifera* triturado, para determinar si pueden llevar a cabo una buena producción de enzimas y cofermentación de hexosas y pentosas simultáneamente. Además, se realizaron análisis bromatológicos del sustrato para poder calcular los rendimientos y productividades de las cepas durante la fermentación. Finalmente, las cepas fueron evaluadas en consorcio con *Saccharomyces cerevisiae* (ATCC 20062) en sustrato lignocelulósico (tallo de *M. oleifera* triturado) para evaluar el sinergismo y antagonismo de los hongos en presencia de esta levadura.

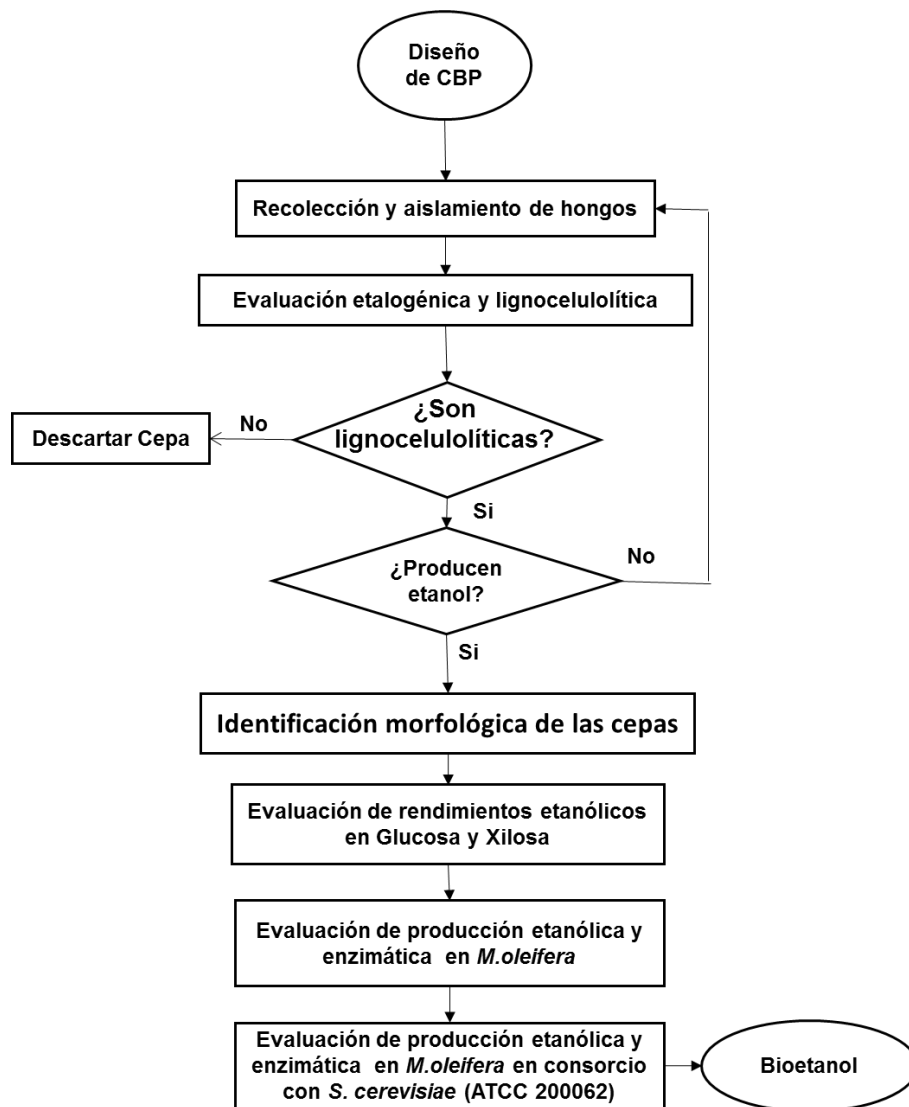


Figura 8. Estrategia experimental

A RECOLECCIÓN Y AISLAMIENTO DE HONGOS LIGNOCELULÓSICOS

1 Recolección de hongos

La recolección de hongos se realizó en tallos y ramas de moringa y otras fuentes de lignocelulosa en proceso de descomposición y visualmente infectadas con hongos xilófagos en el predio agrícola del agricultor cooperante Jorge Torres en Culiacán, Sinaloa ubicado en las coordenadas 24°59'00.7" N, 107°23'00.9" W. También se recolectaron hongos en el municipio de Elota, Sinaloa en residuos en pudrición provenientes de cultivo de Moringa y otras fuentes de lignocelulosa, en las coordenadas 23°58'34.2" N, 106°43'01.7 W. Se consideró un último punto de muestreo en el municipio de Cósala a partir de madera lignocelulósica proveniente de un arroyo en las coordenadas 24°24.4'4.41" N, 106°41' 27.4" W.

Los hongos macroscópicos se recolectaron manualmente, tomando el hongo junto con el material leñoso al que estaba adherido y se depositaron en bolsas plásticas, trasladándose al laboratorio de Biocombustibles N. 22 de la Facultad de Ciencias Químico Biológicas de la Universidad Autónoma de Sinaloa, en Culiacán, Sinaloa, permaneciendo a temperatura ambiente hasta su procesamiento.

2 Aislamiento de hongos

Para el aislamiento de hongos ascomicetos se utilizó el material leñoso recolectado, esparciendo residuos de aserrín en placas petri con agar papa dextrosa (PDA, por sus siglas en inglés) en condiciones asépticas utilizando campana de flujo laminar (Thermoscientific, A2 1385, USA), se dejaron en incubadora (Thermoscientific, Max Q 6000, USA) a 28°C durante 3 a 5 días, a los primeros indicios de crecimiento de colonias se aislaron por separado nuevamente en placas petri con PDA. Finalmente, se realizaron cultivos monospóricos.

Para el caso de basidiomicetos, una vez recolectados los hongos se siguió el método de Chaparro y col. (2009). En el que se cortó un fragmento del cuerpo

fructífero con tijeras quirúrgicas estériles y realizó una desinfección de las muestras agregando con una pipeta pasteur hipoclorito de sodio (NaOCl) al 5%, seguido de un lavado con agua estéril, posteriormente un lavado de etanol al 70% y finalmente otro lavado con agua estéril. Posteriormente, se tomó el fragmento del hongo desinfectado y se colocó en un medio de cultivo de PDA se dejaron en incubadora (Thermoscientific, Max Q 6000, USA.) a 28°C durante 5 a 10 días, y se almacenaron a 4°C.

Todos los hongos aislados se conservaron por resiembra periódica en PDA y en agua estéril a 4°C donde se almacenó micelio en tubos de vidrio de cultivo con agua estéril (Bueno & Gallardo, 1998).

B EVALUACIÓN LIGNOCELULOLÍTICA Y ETALOGÉNICA

1 Evaluación de la producción de enzimas lignocelulolíticas.

Se evaluó la producción de celulasas, xilanasas, lacasas y Manganese peroxidases (MnP), mediante el uso de técnicas cualitativas empleando agar en placas petri con los sustratos carboximetilcelulosa (CMC), AZCL-arabinosilano, ABTS (ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin)-6-sulfónico) y rojo fenol respectivamente para cada enzima. Siguiendo las metodologías reportadas por Pointing (1999), para celulasas y lacasas, para los ensayos de MnP se siguió la metodología reportada por Antonio Revuelta (2013) y para los de xilanasas se utilizó el procedimiento descrito en la hoja de seguridad del sustrato de Megazyme con reportes basados en Phalip y col. (2009).

a Celulasas

EL CMC es un sustrato para endoglucanasas y puede ser usado para pruebas de endoglucanasas y β -glucosidasa. Para realizar este método se utilizó un medio basal que consistió en una solución con las siguientes sales y concentraciones, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 5g/L, KH_2PO_4 1g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g/L, extracto de levadura 0.1 g/L, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.001 g/L. Se agregó CMC al 2% y agar al 1.6%. Se esterilizó en autoclave (YAMATO, SK110c, JP) a 121°C, 1.1 Kg/cm² por 15

minutos. Se vertió en placas petri y se inoculó cada placa con su respectiva cepa en condiciones asépticas utilizando campana de flujo laminar (Thermoscientific, A2 1385, USA) y se almacenaron a 28°C en incubadora (Thermoscientific, Max Q 6000, USA). El crecimiento del hongo era un indicativo de la producción de enzimas (Pointing, 1999).

b Xilanasas

En un buffer de acetatos 25 mM de pH 4.7, se adicionó agar microbiológico en una concentración de 15 g/L, se esterilizó a 121°C y 1.1 Kg/cm² por 15 minutos, se dejó enfriar hasta alcanzar los 60°C y se agregó el sustrato AZCL-arabinoxilano (Megazyme) al 0.1%, se agitó y se vertió en placas petri. Se inoculó cada placa con su respectiva cepa y se incubó a 28°C. Al hidrolizarse el sustrato se liberará el colorante AZCL manifestando un color azul que indicará la presencia de xilanasas (Phalip y col., 2009).

c Lacasas

Se utilizó un medio de cultivo basal con KH₂PO₄ 1 g/L; (NH₄)₂SO₄ 0.5 g/L; MgSO₄ g/L; CaCl₂.2H₂O 0.01 g/L; extracto de levadura 0.01 g/L; CuSO₄.5H₂O 0.001 g/L; Fe₂(SO₄)₃ 0.001 g/L; MnSO₄.H₂O 0.001 g/L; y se adicionó ABTS al 0.1 % p/v y agar microbiológico al 1.5%, se esterilizó a 121°C y 1.1 Kg/cm² por 15 minutos, se vertió en placas petri. Se inoculó cada placa con su respectiva cepa y se incubó a 28°C. Al oxidarse el sustrato se manifestando un color verde azulado que indicará la presencia de Lacasas (Pointing, 1999).

d Manganeso peroxidasa

Se preparó PDA y se esterilizó a 121°C y 1.1 Kg/cm² por 15 minutos, se dejó enfriar hasta alcanzar los 60°C y se agregó colorante rojo fenol al 0.2 %, se agitó y se vertió en placas petri. Se inoculó cada placa con su respectiva cepa y se incubó a 28°C. La presencia de la enzima se manifestará si existe un cambio de coloración de amarillo a rojo-naranja (Antonio Revuelta, 2013).

2 Evaluación de la actividad etalógica

Para la identificación de cepas etalógicas se llevaron a cabo fermentaciones en sacarosa y el alcohol producido durante el cultivo se cuantificó mediante espectrofotometría, tras realizar una previa reacción de óxido reducción con una solución dicromato de potasio ($K_2Cr_2O_7$) y ácido sulfúrico (H_2SO_4), (Brown y col., 2011; Zumaqué y col., 2009). A continuación se describen los métodos a detalle.

a Fermentación en Sacarosa

Por cada cepa recolectada se llevó a cabo una fermentación en matraces de 250 mL. Se preparó medio de cultivo de sacarosa 30 g/L; extracto de levadura 10 g/L; KH_2PO_4 10 g/L; $(NH_4)_2SO_4$ 2g/L; y $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5 g/L (Okamoto y col., 2014), se ajustó el pH a 5.0 utilizando potenciómetro (Thermoscientific, ORION STAR A211, USA) y adicionando ácido sulfúrico (H_2SO_4) con un gotero. Posteriormente, se esterilizó en autoclave (YAMATO, SK110c, JP) a $121^\circ C$, 1.1 Kg/cm² por 15 minutos. Cada matraz contenía un volumen de 150 mL de medio de cultivo y se inocularon uno por cada cepa en condiciones asépticas utilizando campana de flujo laminar (Thermoscientific, A2 1385, USA). A continuación se almacenaron todos bajo las mismas condiciones de temperatura $28^\circ C$ y sin agitación (Elisashvili y col., 2008) utilizando incubadora (Thermoscientific, Max Q 6000, USA) durante un tiempo de 96 h. La toma de muestras se realizó cada 12 horas, tomando un volumen de 5 mL en tubos de centrifuga de 15 mL estériles, bajo condiciones asépticas de campana de flujo laminar (Okamoto y col., 2014).

b Cuantificación de etanol

Cada muestra tomada de la fermentación se centrifugó (Eppendorf ,5702 R, DE) durante 15 minutos a 3500 r.p.m., posteriormente el sobrenadante se evaporó y se recuperó para eliminar impurezas que pudieran intervenir en la cuantificación de etanol. El sobrenadante se colocó en frascos de vidrios acoplados a condensadores de 20 cm y mediante una parrilla de calentamiento (Thermoscientific, CIMAREC SP131015, USA) se evaporaban completamente a

450°C, los condensadores estaban a 4°C enfriados por un flujo continuo anticongelante suministrado por un equipo condensador (Fisher Scientific, isotemp 3028, USA).

La cuantificación de etanol se determinó mediante una reacción oxido-reducción como se describe en el procedimiento de Zumake y col. (2009). Este método consiste en oxidar el etanol en acetaldehído y reducir el ion Cr^{+3} a Cr^{+2} ; el cromo forma oxido crómico y el resultado se interpreta como positivo si cambia el producto de reacción de anaranjado a verde/azul (altas concentraciones) o marrón (bajas concentraciones). Se utilizó una solución oxidante que contenía 33.68 g/L de dicromato de potasio ($\text{Cr}_2\text{K}_2\text{O}_4$) 325 mL/L de ácido sulfúrico concentrado (H_2SO_4) aforado con agua destilada. La reacción consistió en agregar a 0.4 mL de la muestra evaporada y 0.8 mL de solución oxidante durante 10 minutos, enseguida se agregan 10 mL de agua destilada y se leyó absorbancia en espectrofotómetro (Thermoscientific, Genesys 10S UV-Vis, USA) a 585 nm, y se comparó en una curva de calibración tratada de la misma manera que las muestras utilizando 12 estándares (0.1, 0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 g/L) y usando como patrón etanol absoluto 99.9 % (Sigma-Aldrich, USA)

3 Selección de cepas para el bioproceso consolidado

Se seleccionaron aquellas cepas con actividad de celulasas, xilanasas y actividad lignolítica como lacasas o Manganese peroxidasa y también por capacidad de fermentación alcohólica.

C IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA DE LAS CEPAS

Las cepas evaluadas en *M. oleifera* se identificaron morfológicamente a través de sus macro y microesporas para el caso de ascomicetos. El procedimiento consistió en realizar frotis de micelio y espora teñidos con azul lactofenol para su posterior visualización en microscopio (Labomed, CxL, MX) a 40X. Para el caso de cepas presuntivas de *Fusarium* se realizó observación de fialides en microscopio directa en cultivos de PDA con hojas de banano (Leslie y

col., 2006).

Los basidiomicetos seleccionados se identificación a partir de su morfología macroscópica o cuerpo fructífero y comparando resultados con la literatura y una biblioteca del software Myco Key 4.1.

D EVALUACIÓN ETALOGÉNICA EN GLUCOSA Y XILOSA

1 Fermentación

Por cada cepa seleccionada se llevó a cabo una fermentación por triplicado en matraces de 250 mL. Se preparó medio de cultivo de glucosa o xilosa 20 g/L; extracto de levadura 10 g/L; KH_2PO_4 10 g/L; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2g/L; y $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g/L (Okamoto y col., 2014), se ajustó el pH a 5.0 utilizando potenciómetro (Thermoscientific, ORION STAR A211, USA) y adicionando ácido sulfúrico (H_2SO_4) con un gotero. Posteriormente, se esterilizó en autoclave (YAMATO, SK110c, JP) a 121°C , 1.1 Kg/cm^2 por 15 minutos. Cada matraz contenía un volumen de 150 mL de medio de cultivo y se inocularon condiciones asépticas utilizando campana de flujo laminar (Thermoscientific, A2 1385, USA). A continuación se almacenaron todos bajo las mismas condiciones de temperatura 28°C y sin agitación (Elisashvili y col., 2008) utilizando incubadora (Thermoscientific, Max Q 6000, USA) durante un tiempo de 96 h. La toma de muestras se realizó cada 12 horas, tomando un volumen de 5 mL en tubos de centrifuga de 15 mL estériles, bajo condiciones asépticas de campana de flujo laminar (Okamoto y col., 2014).

2 Cuantificación de etanol

La cuantificación se realizó empleando la misma metodología de esta sección de materiales y métodos B.2.b

3 Rendimientos de producción de etanol

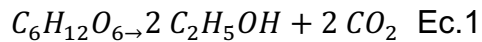
Los rendimientos de producción se obtienen en mediante estequiometria considerando que 1 mol de glucosa produce 2 moles de etanol y que 1 mol de

xilosa produce 1.67 moles de etanol como se muestra en las ecuaciones 1 y 2 (Dionisi y col., 2015).

Los siguientes cálculos demuestran el procedimiento a seguir:

a Balance para la conversión de Glucosa a etanol.

Considerando que:



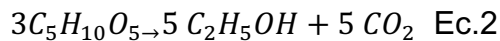
$$20 \text{ g } C_6H_{12}O_6 \left(\frac{1 \text{ mol } C_6H_{12}O_6}{180.1559 \text{ g } C_6H_{12}O_6} \right) \times \left(\frac{2 \text{ mol } C_2H_5OH}{1 \text{ mol } C_6H_{12}O_6} \right) \times \left(\frac{46.08 \text{ g } C_2H_5OH}{1 \text{ mol } C_2H_5OH} \right) = 10.23 \text{ g } C_2H_5OH$$

Por lo tanto, en **20 g** de glucosa se obtiene un rendimiento teórico de **10.2311 g de etanol**, por lo tanto el rendimiento porcentual se expresa como:

$$\text{Rendimiento en \%} = \left(\frac{\text{Valor max g de } C_2H_5OH \text{ de la fermentación}}{10,2311 \text{ g } C_2H_5OH} \right) \times 100$$

b Balance para la conversión de Xilosa a etanol.

Considerando que:



$$20 \text{ g } C_5H_{10}O_5 \left(\frac{1 \text{ mol } C_5H_{10}O_5}{150.13 \text{ g } C_5H_{10}O_5} \right) \times \left(\frac{5 \text{ mol } C_2H_5OH}{3 \text{ mol } C_5H_{10}O_5} \right) \times \left(\frac{46.08 \text{ g } C_2H_5OH}{1 \text{ mol } C_2H_5OH} \right) = 10.2311 \text{ g } C_2H_5OH$$

Por lo tanto, en **20 g** de Xilosa se obtiene un rendimiento teórico de **10.2311 g**, por lo tanto el rendimiento porcentual se expresa como:

$$\text{Rendimiento en \%} = \left(\frac{\text{Valor max g de } C_2H_5OH \text{ de la fermentación}}{10,2311 \text{ g } C_2H_5OH} \right) \times 100$$

E EVALUACIÓN ETALOGÉNICA EN TALLO DE *M. oleifera*

1 Análisis bromatológicos en tallo de *M. oleifera*

Se determinó cenizas, proteína, lignina, celulosa, hemicelulosa, en tallo de moringa para determinar la concentración de azúcares disponibles y posteriormente los rendimientos de producción de etanol siguiendo las siguientes metodologías.

a Cenizas

Se colocó en crisoles secados y tarados 1 g de muestra y se introducen en la mufla a 100°C, con incrementos de 100°C/h hasta alcanzar los 550°C, las muestras se dejan a esa temperatura durante 12 horas, pasado el tiempo se enfrían en desecador y finalmente se pesan los crisoles con la muestra. El porcentaje de cenizas se calculó en base a la siguiente ecuación.

$$\%Cenizas = \frac{(Peso\ de\ crisol\ +\ muestra\ calcinada) - (Peso\ de\ crisol)}{(Peso\ de\ muestra)} \times 100$$

b Proteína

Se utilizó el método 46.12, microKjeldahl, de la AOAC (1999) para la determinación de nitrógeno en un sistema Kjeltel (Mod 1009 y 1002 Tecator, SE). Se digirirán 0.2 g de muestra, con 5 mL de ácido sulfúrico y mezcla reactiva de selenio (Merck Co., Alemania) a una temperatura de 200°C. En la destilación de la muestra, previamente diluida con 25 mL de agua, se emplearan disoluciones de NaOH al 40% y ácido bórico al 4% como indicador para recibir el destilado. La titulación se llevara a cabo con una disolución valorada de HCl 0.1 N. Posteriormente, la proteína cruda se calculó por multiplicación del contenido de nitrógeno total por el factor 6.25.

$$\%Proteínas = \frac{(Normalidad * mL\ de\ HCl\ gastado * 0.014 * 6.25)}{(Peso\ de\ muestra)} \times 100$$

c Tratamiento de la muestra para eliminar extraíbles

Las muestras se procesaron de acuerdo con la norma TAPPI T 204, para eliminar extraíbles como proteínas y lípidos que pudieran interferir con la cuantificación de lignina y celulosa. Primero se trituró el tallo en molino manual y posteriormente en molino eléctrico (Hoffman Manufacturing, Stein M-2 Sample Mill, USA) durante 10 minutos. La muestra triturada se mezcló con agua destilada a 95°C con agitación durante 3 horas. Se filtró la madera y secó a 105°C en estufa (Fisher Scientific, 625G, USA). Posteriormente se lavó con una mezcla de

solventes ethanol-benceno (agua) 1:2 v/v por 4 horas. Se filtró al vacío y se lavó con etanol absoluto y después se realizaron tres lavados con agua (un lavado cada hora). Se dejó nuevamente en la estufa a 60°C.

d Determinación de lignina

El contenido de lignina se determinó utilizando el procedimiento descrito en la norma TAPPI T 222 om-88, para determinación de lignina insoluble en madera, con modificaciones de Álvarez Godoy y col. (2007). En este procedimiento 1 g de madera anhídrida libre de extraíbles es hidrolizada con 15 mL de ácido sulfúrico al 72% durante dos horas en un baño de agua a 20°C. Seguida por una segunda hidrólisis diluyendo el ácido al 3% y colocando la mezcla en una autoclave a 120°C durante 1 hora. El residuo filtrado e insoluble en ácido, se colocó en un crisol previamente secado a 105°C por 24 horas y tarado en balanza digital. El contenido de lignina se seca nuevamente a 105°C por 24 horas y se pesa en balanza digital. El porcentaje de lignina se calculó en base a la siguiente ecuación.

$$\%Lignina = \frac{(Peso\ de\ crisol + Lignina) - (Peso\ de\ crisol)}{Peso\ de\ muestra} \times 100$$

e Determinación de celulosa

El contenido de celulosa se determinó mediante el método de Kushner y Höffer, como reporta Cárdenas y col. (2009). A 1 g de muestra anhídrida libre de extraíbles se le agregó 5 mL de ácido nítrico (HNO₃) concentrado y 20 mL de etanol absoluto. Se mantuvo en agitación constante en baño maría durante 30 minutos. Se decantó el líquido y se realizó una segunda hidrólisis bajo con la misma relación etanol- HNO₃ (1:4). Al terminar la segunda digestión el sólido se realizó un lavado con 100 mL de agua destilada. Enseguida se utilizó 100 mL de solución saturada de acetato de sodio (25g en 100 ml). Se filtró en un embudo Buchner de porosidad fina, una vez retenido el sólido en el filtro se le agregan 500 ml de agua caliente. El residuo se secó a 105°C por 24 horas en un crisol previamente secado bajo las mismas condiciones y tarado en balanza digital. El

residuo seco se pesa en balanza digital. El porcentaje de celulosa se calculó en base a la siguiente ecuación.

$$\%Celulosa = \frac{(Peso\ de\ crisol + celulosa) - (Peso\ de\ crisol)}{Peso\ de\ muestra} \times 100$$

f Determinación de hemicelulosa

Las hemicelulosas totales se estiman por diferencia entre 100 y la suma del porcentaje de celulosa, el porcentaje de lignina, cenizas y proteína en madera libre de extraíbles (Orea-Igarza y col., 2006).

2 Fermentación

Las cepas seleccionadas se cultivaron en tubos de cultivos de 10 utilizando un caldo con tallo de moringa triturado en molino eléctrico (Hoffman Manufacturing, Stein M-2 Sample Mill, USA) durante 10 minutos a una concentración de 20 g/L; extracto de levadura 10 g/L; KH_2PO_4 10 g/L; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2g/L; y $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g/L (Okamoto y col., 2014), se ajustó el pH a 5.0 utilizando potenciómetro (Thermoscientific, ORION STAR A211, USA) y adicionando ácido sulfúrico (H_2SO_4) con un gotero. Posteriormente, se esterilizó en autoclave (YAMATO, SK110c JP) a 121°C , 1.1 Kg/cm^2 por 15 minutos. Los inóculos se prepararon en tubos de ensayo con 20 ml de agua estéril y tres cuadros de 1 cm^2 aproximadamente de micelios obtenidos de un cultivo previo en PDA de 7 días, se agitaron en vortex hasta obtener una solución homogénea de esporas y micelio. Posteriormente, se inocularon en los tubos que contenían 10 mL de caldo de cultivo agregando 1 mL del inóculo bajo condiciones asépticas utilizando campana de flujo laminar (Thermoscientific, A2 1385, USA). Enseguida se almacenaron todos bajo las mismas condiciones de temperatura 28°C y sin agitación (Elisashvili y col., 2008) utilizando incubadora (Binder, Redline, DE) durante un tiempo de 132 h. La toma de muestras se realizó cada 12 horas, tomando tres tubos de ensayos por cada cepa.

3 Cuantificación de etanol

La concentración de etanol se determinó por cromatografía de gases (Cromatógrafo Agilent Technologies, 6890N, USA), a través de un sistema de detección masas (Agilent, 5973 N, USA), con una columna Supelcowax-10 (30m×0.25mm, $d_f = 0.5 \mu\text{m}$). El gas acarreador fue helio a 10 psi. Para la cuantificación se realizaron curvas de calibración preparadas con diversos estándares acuosos de etanol 0.1, 0.5, 1, 1.5, 2, 3, 4, 5 g/L (Anasontzis y col., 2011) utilizando un patrón de etanol absoluto 99.9% (Sigma-Aldrich, USA). La muestra proveniente de la fermentación se centrifugó a 4400 r.p.m. por 30 minutos y el sobrenadante se filtró a través de dos membranas acopladas de 0.25 y 0.41 μm de diámetro y se inyectó 1 μl de sobrenadante directamente al cromatógrafo, bajo las condiciones de temperatura de 40°C por 5 minutos, seguida por una rampa de 15°C/min hasta 150°C.

4 Determinación de rendimientos de producción

Considerando que el porcentaje de celulosa obtenido en tallo contiene el 100% de hexosas y el porcentaje de hemicelulosa el 100% de pentosas la composición del tallo. Los rendimientos de producción se pueden deducir mediante estequiometría considerando que 1 mol de glucosa produce 2 moles de etanol y que 1 mol de xilosa produce 1.67 moles de etanol como se muestra en las ecuaciones 1 y 2 (Dionisi y col., 2015).

5 Análisis estadísticos

Los rendimientos obtenidos en ***g etanol/g M. oleifera*** con las cepas evaluadas se compararon mediante una **ANOVA unifactorial** para determinar si existen diferencias significativas y mediante la prueba de **Tuckey** con un nivel de significancia de $\alpha = 0.05$ para determinar las mejores cepas.

F EVALUACIÓN DEL RENDIMIENTO ETANÓLICO DE LAS CEPAS EN CONSORCIO CON *Saccharomyces cerevisiae* (ATCC 200062)

1 Cuantificación de etanol

La cuantificación se realizó empleando la misma metodología de esta sección de materiales y métodos B.2.b

2 Cuantificación de azúcares reductores

La cuantificación de azúcares reductores se realizó por el método de DNS (Miller, 1959). Se preparó una solución de DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico) 10.6 g, NaOH 19.8 g, sal Rochelle 306 g, metasulfito de sodio 8.3 g en 1416 ml de agua destilada. La solución se deja en agitación por 24 horas.

Se preparó una curva de calibración con estándar de glucosa a concentraciones de 0.5, 1, 1.5, 2, 3 mg/ml. Posteriormente se tomaron 180 µL de cada estándar y se le agregaron 180 µL de solución de DNS. Se llevó a reaccionar en baño maría a 100°C por 5 minutos. Enseguida se detuvo la reacción en refrigerador a 4°C por un minuto. Finalmente, se tomaron 225 µL y se aforó a 1 ml con agua destilada, se leyó absorbancia a 570 nm de longitud de onda en espectrofotómetro (Thermoscientific, Genesys 10S UV VIS, USA).

Las muestras fueron centrifugadas a 4400 rpm para precipitar los sólidos. El sobrenadante se trató de igual manera que los estándares. Finalmente, se calculan las concentraciones usando la curva de calibración.

3 Cuantificación de células de *S. cerevisiae* (ATCC 200062)

La cuantificación de células se realizó mediante cámara de Neubauer en microscopio (Labmed CxL) a 40X. Para ello se utilizaron 100 µL de la muestra que se depositaron en la cámara cubierta previamente con cubreobjetos. Para el conteo se tomaron en cuenta 5 cuadros del nivel 3. Para calcular la concentración celular en estos cuadros se utilizó la siguiente ecuación (EC. 3):

$$\text{Concentración} = \frac{\text{número de células}}{\text{número de cuadros}} \times 250000 \quad \text{Ec.3}$$

4 Cuantificación de actividad de celulasas

La actividad de celulasa total se medirá de acuerdo al procedimiento recomendado por la IUPAC y modificaciones de (King y col., 2009) utilizando carboximetilcelulosa (CMC). La mezcla consistió en 90 μL de muestra y 90 μL del sustrato (20mg/ml) disuelto en buffer de acetato de sodio al 0.1 M a pH 5.5. Se incubó durante 2 horas a 50°C. Utilizando una curva de glucosa de 0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, y 3.0 mg/mL preparada en buffer de acetato de sodio al 0.1 M y pH 5.5 se determinó la concentración de azúcares liberados por las enzimas con los tres sustratos empleados. El procedimiento consistió en agregar DNS en relación 1:2 con respecto al hidrolizado, calentar a 95°C por 5 minutos, posteriormente enfriar a 4°C por 1 minuto y llevar a 20°C. Al producto de la reacción se le agregó agua 4.5 veces por cada volumen de la reacción de DNS con el hidrolizado. Se leyó absorbancia a 570 nm en espectrofotómetro (Thermoscientific Genesys 10S UV VIS, USA.), los resultados expresados en mg/ml fueron expresados en unidades de actividad enzimática por litro (U/L) utilizando la siguiente expresión (Ec. 4), de acuerdo a lo reportado por (Xiao y col., 2004).

$$\frac{U}{L} = \text{Resultado} \frac{mg}{ml} \times \frac{1 \times 10^6 \mu mol}{1 mol} \times \frac{1 g}{1000 mg} \times \frac{1}{120 min} \text{ Ec.4}$$

VIII RESULTADOS Y DISCUSIONES

A RECOLECCIÓN Y AISLAMIENTO DE HONGOS LIGNOCELULÓSICOS

Se recolectaron un total de 19 cepas entre ellas hongos basidiomicetos y ascomicetos, principalmente de residuos en pudrición de moringa y árboles cercanos (**Cuadro 5**). Se aislaron 7 hongos basidiomicetos (con los siguientes códigos de identificación: C1502, C1503,...C1508) a partir de carpóforos, y el resto se aislaron de esporas de madera con mayor probabilidad de ser ascomicetos (C1a, C1b, C3a...C7c), aunque no se descartó la probabilidad de obtener un basidiomiceto debido a que algunas muestras de madera estaban infestadas con fragmento de cuerpo fructíferos. De los materiales obtenidos del rancho Tecolotes, ubicado en el municipio de Culiacán, Sinaloa,

En el **Cuadro 5**, se enlistan las cepas aisladas, así como el lugar de recolección y el sustrato en el cual se encontró la cepa. El 74% de las cepas fueron aislados de tallo de *Moringa oleifera*, el 16% fue aislado de madera de naranjo aledaña a los cultivo de moringa, un el 10% fue recolectado de material leñoso de origen desconocido cercano a los cultivos de moringa.

En general se encontraron 49 carpóforos; sin embargo, solo 7 basidiomicetos fueron aislados con el procedimiento de Chaparro y col. (2009), debido probablemente a que el resto de las setas presentó sensibilidad al etanol (70%) y el hipoclorito de sodio (NaOCl), también se debe a que las setas presentaron un grosor menor (<5 mm) comparadas con las cepas aisladas, por lo que en consecuencia el crecimiento de las setas resultó ser inhibido. En el caso de Cosalá solo se aisló una cepa de 21 carpóforos encontrados. En Elota cuatro cepas de 25 y en Tecolotes solo se recolectaron dos cepas que corresponden a basidiomicetos del género *Trametes* y *Picnoporus*. No obstante, entre las 19 cepas aisladas, se encontraron cepas lignocelulolíticas y etalogénicas por lo que no se tuvo que repetir el procedimiento de recolección y aislamiento, en caso de no encontrar alguna cepa con estas características.

Cuadro 5. Cepas fúngicas recolectadas de material lignocelulósico en Sinaloa.

	Cepa	Fecha de recolección	Lugar de recolección	Sustrato	Coordenadas	
Ascomicetos	C1a	22-05-15	Rancho "Ticolotes"	Madera de moringa	24°59'00.7" N	107°23'00.9" W
	C1b	22-05-15	Rancho "Ticolotes"	Madera de moringa	24°59'00.7" N	107°23'00.9" W
	C3a	22-05-15	Rancho "Ticolotes"	Madera de moringa	24°59'00.7" N	107°23'00.9" W
	C3b	22-05-15	Rancho "Ticolotes"	Madera de moringa	24°59'00.7" N	107°23'00.9" W
	C3c	22-05-15	Rancho "Ticolotes"	Madera de moringa	24°59'00.7" N	107°23'00.9" W
	C3d	22-05-15	Rancho "Ticolotes"	Madera de moringa	24°59'00.7" N	107°23'00.9" W
	C5a	22-05-15	Rancho "Ticolotes"	Madera de moringa	24°59'00.7" N	107°23'00.9" W
	C6a	22-05-15	Rancho "Ticolotes"	Madera de moringa	24°59'00.7" N	107°23'00.9" W
	C7a	22-05-15	Rancho "Ticolotes"	Madera de moringa	24°59'00.7" N	107°23'00.9" W
	C7b	22-05-15	Rancho "Ticolotes"	Madera de moringa	24°59'00.7" N	107°23'00.9" W
	C7c	22-05-15	Rancho "Ticolotes"	Madera de moringa	24°59'00.7" N	107°23'00.9" W
Basidiomicetos	C1502	14-08-15	Elota	Árbol	23°58'34.2" N	106°43'01.7 W
	C1503	14-08-15	Elota	Madera de moringa	23°58'34.2" N	106°43'01.7 W
	C1504	16-02-16	Rancho "Ticolotes"	Madera de naranjos	24°59'00.7" N	107°23'00.9" W
	C1505	14-08-15	Rancho "Ticolotes"	Madera de naranjos	24°59'00.7" N	107°23'00.9" W
	C1506	14-08-15	Elota	Madera moringa	23°58'34.2" N	106°43'01.7 W
	C1507	14-08-15	Elota	Madera de moringa	23°58'34.2" N	106°43'01.7 W
	C1508	14-08-15	Cosalá	Madera arrollo	24°24.4'4.41" N	106°41' 27.4" W

B EVALUACIÓN LIGNOCELULOLÍTICA Y ETALOGÉNICA

1 Evaluación de la producción de enzimas lignocelulolíticas

El **Cuadro 6** muestra la evaluación cualitativa de actividad enzimática en las cepas aisladas; en él se observa que de las 19 cepas aisladas, el 100 % mostraron actividad de celulasa en carboximetilcelulosa (CMC) y papel filtro (PF). También que el 89.5% mostró actividad de xilanasas en el sustrato AZCL-Arabinosilano (AZCL-AX). Mientras que para la actividad de lacasa, evaluada en ABTS, el 63% resultó tener la enzima y, finalmente, para el caso de manganeso peroxidasa sólo el 47% de las cepas tuvieron actividad en rojo fenol (RF).

Los basidiomicetos, particularmente los hongos de pudrición blanca, son considerados como productores de enzimas lignolíticas (Zoglowek y col., 2016). Es importante resaltar que de las cepas estudiadas, tres hongos basidiomicetos presentaron actividad de lacasa: *Trametes* (C1504), *Picnoporus* (C1505) y basidiomiceto no identificado (C1508). Mientras que nueve cepas considerados como ascomicetos, particularmente del género *Aspergillus* (C1a, C1b), *Penicillium* (C5b) *Fusarium* (C7a) y otras no identificadas (C3b, C3C, C5a, C7b y C7c) resultaron producir lacasa. La producción de enzimas lacasas obtenidas de hongos ascomicetos han sido muy poco estudiados (Baldrian, 2006). Sin embargo, podemos encontrar en la literatura ascomicetos patogénicos como *Aspergillus nidulans*, *Penicillium* y *Curvularia* como productores de lacasas. Aunque, no son capaces de oxidar el syringaldazine por lo que no se consideran verdaderas lacasas (Rodríguez y col., 1996; Banerjee & Vohra, 1991). Ciertamente la presencia de lacasas y otras enzimas oxidantes se encuentran en fitopatógenos como *Fusarium*, por lo que probablemente sea una razón de la resistencia a fungicidas que presenta. Tal es el caso *Cryptococcus (Filobasidiella) neoformans* donde se describe que la resistencia a fungicidas se debe a la producción de enzimas tirosina oxidasa y lacasas (Zhu y col., 2001).

Los hongos (C3a, C3b, C5a, C5b, C7a, C7b, C7c), actividad de lacasa y MnP, mientras que los hongos (C6a, C1502, C1503 y C1506) únicamente MnP.

Cuadro 6. Evaluación cualitativa de actividad enzimática en las cepas aisladas.

		ACTIVIDAD LIGNOCELULOLÍTICA				
Enzima	Celulasas	Xilanasa	Lacasas	Mn Peroxidasas		
<i>Sustrato</i>	<i>CMC</i>	<i>PF</i>	<i>AZCL-AX</i>	<i>ABTS</i>	<i>RF</i>	
Cepas	1a	+	+	+	-	
	1b	+	+	-	+	-
	3a	+	+	+	-	-
	3b	+	+	+	+	+
	3c	+	+	+	+	+
	3d	+	+	+	-	-
	5a	+	+	+	+	+
	5b	+	+	+	+	-
	6a	+	+	+	-	+
	7a	+	+	+	+	+
	7b	+	+	+	+	+
	7c	+	+	+	+	+
	1502	+	+	+	-	+
	1503	+	+	+	-	+
	1504	+	+	+	+	-
	1505	+	+	+	+	-
	1506	+	+	+	-	+
	1507	+	+	-	-	-
1508	+	+	+	+	-	

(+ Presencia de la enzima, - Ausencia de la enzima)

2 Evaluación de actividad etalogénica

La actividad etalogénica sólo estuvo presente en las siguientes cepas: C3a, C3d, C6a, C7a y C1502, tal como lo muestra la **Figura 9**; como se puede observar, del total de las 19 cepas sólo estas cinco lograron mantener una tendencia característica de una cinética microbiana, donde se observa el incremento de etanol con respecto al tiempo de fermentación. Las cepas C6a y C1502 presentan disminución y aumentos continuos durante la fermentación, una posible explicación a este comportamiento puede ser la producción de ácido acético o láctico, que puede producirse por presencia de oxígeno o incrementos de pH (Graves y col., 2006). Por otro lado, también se observó que algunas cepas (C3a y C7a) mantenían un comportamiento en la producción de etanol continuo vs el tiempo. Mientras que la cepa C3d probablemente utiliza otro mecanismo para producir energía, siendo el piruvato un metabolito clave en biosíntesis de moléculas y en la generación de energía mediante el ciclo de Krebs (Lehninger & Cox, 2006). Lo que podría indicar que este microorganismo optó por alguno de estos procesos bioquímicos durante las primeras 48 horas de crecimiento y posteriormente continúa por la fermentación alcohólica, lo cual podría explicar el comportamiento que se muestra en la **Figura 9**.

En general este experimento permitió evidenciar las cepas que tienen actividad etalogénica, y discriminar el resto de las cepas aisladas, las cuales no produjeron más de 1 g/L de etanol, lo cual no es un indicativo de que no sean etalogenicas, pero el resultado se puede poner en duda hasta que no se analizado por un método analítico más exacto y de alta precisión como lo es la cromatografía de gases. No obstante este método nos permite observar rápidamente las cepas productoras de etanol y a un bajo costo.

Por lo tanto, las cepas que produjeron más de 1 g/L de etanol, se les acuñe que presentaron actividad etalogénica, lo cual se incluye como una cualidad más a parte de las enzimáticas, para la preselección de cepas con potencial para desarrollar un bioproceso consolidado.

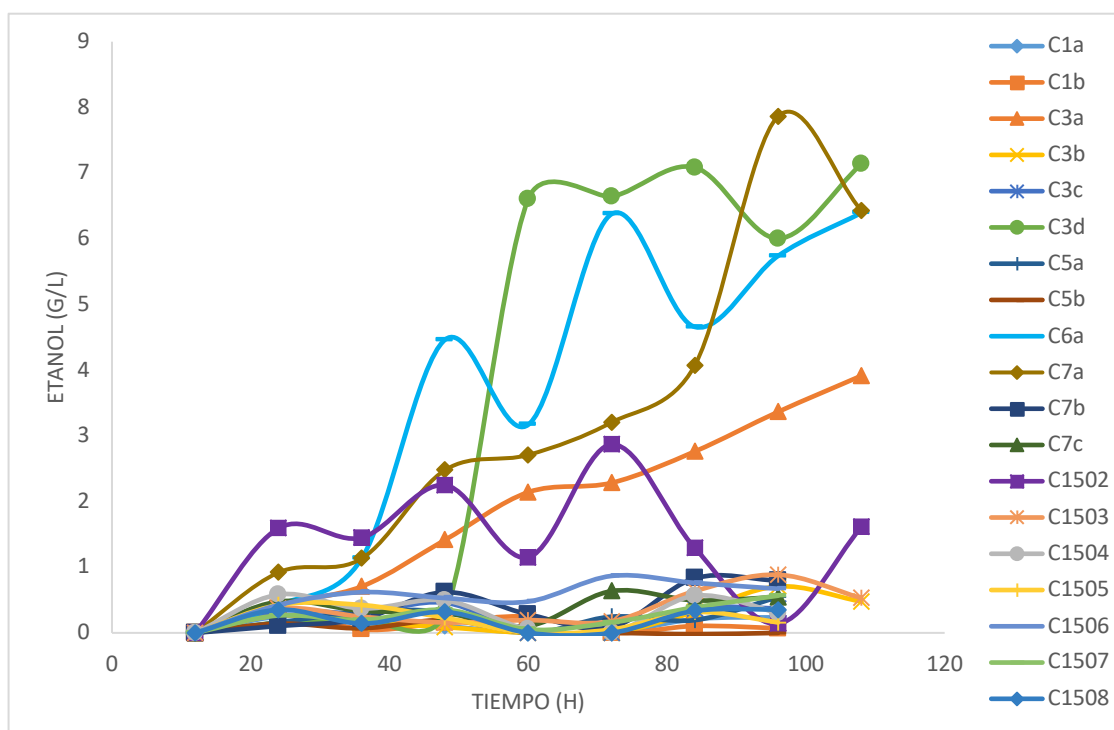


Figura 9. Producción de etanol (g/L) en sacarosa con las 19 cepas aisladas

3 Selección de cepas para el bioproceso consolidado

En la **Figura 10** se presentan las cualidades evaluadas para desarrollar un bioproceso consolidado (CBP) de las 19 cepas. De acuerdo con, den Haan y col. (2015), un microorganismo capaz de desarrollar un CBP, debe hidrolizar celulosa y hemicelulosa, por lo tanto debe producir enzimas como las celulasas y xilanasas. Además, debe ser capaz de fermentar las hexosas y pentosas producidas durante la hidrólisis de celulosa y hemicelulosa.

A partir los resultados obtenidos del “screening” enzimático y de la fermentación alcohólica en sacarosa, se puede asumir que solo 5 cepas son capaces de llevar a cabo un CBP. La cepa C7a presentó actividad de celulasa en Carboximetilcelulosa (CMC) y Papel filtro (PF), actividad de xilanasas en el sustrato AZCL-arabinoxilano (AZCL-AX) y en la fermentación de sacarosa se obtuvo un resultado mayor a 1 g/L de etanol. En cuanto, a la actividad lignolítica presentó lacasas en ABTS y Manganeso peroxidasa en rojo fenol. Hasta cierto punto, esto le otorga una gran idoneidad. Pero eso no es un indicativo de la eficiencia que tiene para producir etanol utilizando un sustrato lignocelulósico. La actividad lignolítica no está considerada como una característica de las cepas que desarrollan un bioproceso consolidado. Sin embargo, esto confiere una ventaja extra al bioproceso, por que durante la degradación de lignina se producen muchos compuestos aromáticos como fenoles con actividad antimicrobiana, lo cual pudiera interpretarse como inhibición del crecimiento del microorganismo y de la producción de etanol (Klinke y col., 2004)

Las cepas C3a, C3d, C6a y C1502 también tienen la capacidad para desarrollar un CBP, a pesar de que no producen enzimas lacasas, presentan actividad lignolítica debido a que producen Mn peroxidasa. Por lo tanto, las cepas mencionadas se preseleccionaron para ser evaluadas cuantitativamente y determinar las de mejor rendimiento y productividad.

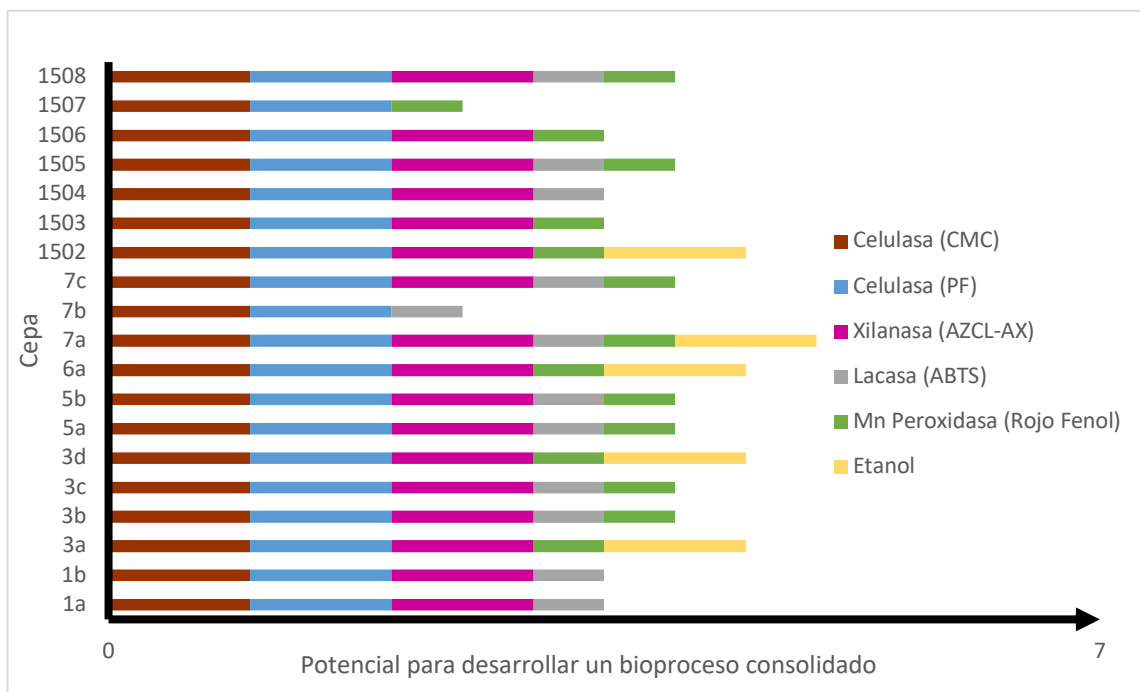


Figura 10. Evaluación cualitativa de las 19 cepas aisladas con potencial para desarrollar un bioproceso consolidado (cada color equivale a una característica)

C IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA DE LAS CEPAS

Los hongos multicelulares se identificaron en base a su apariencia física. La **Figura 11** muestra una serie de imágenes para las cepas C3a, C3d, C6a, C7a y C1502 donde se observan las características de colonia y esporas.

La cepa C3d presentó características microscópicas muy particulares del hongo *Aspergillus niger*, como conidióforo unido a una cabeza globosa con fialides radiadas y esporas color oscuro (Arenas, 2003). Además de visualizar las esporas en microscopio a 40X, se confirmó la especie utilizando claves morfológicas (Piontelli, 2008), el hongo se cultivó en agar Czapek (Anexo 2) y se incubó a dos temperaturas diferentes 25°C y 37°C, las características mejor ajustadas fueron para *Aspergillus niger*, con cabezas conidiales café oscuras a negras; biseriadas y/o uniseriadas), diámetro de las colonias de 5-7 cm en agar Czapek incubado a 37°C; conidios globosos, irregularmente rugosos a finamente rugosos.

La cepa C3a también resultó pertenecer al género *Aspergillus* al tener características microscópicas muy similares a la cepa C3d (Arenas, 2003). La excepción fue el color de sus esporas amarillas en PDA. Por lo cual se evaluó su morfología microscópica en placa utilizando utilizando claves morfológicas (Piontelli, 2008), el hongo se cultivó en agar Czapek y se incubó a dos temperaturas diferentes 25°C y 37°C, las características se ajustan a la especie *Aspergillus ochraceus*. Con colonias de 3.9-5.9 cm en agar Czapek incubado a 25°C, y de 0-3.5 cm en agar Czapek a 37 °C. Las altas temperaturas afectan el crecimiento de esta cepa. También presentó conidios globosos a ampliamente elipsoides lisos a finamente rugosos a ambas temperatura.

En cuanto la determinación de la especie la identificación morfológica ofrece una certeza aparente. La mejor manera de determinar la especie y aclarar las dudas al respecto, es mediante técnicas de biología molecular, como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) seguido de una secuenciación. Sin embargo, la identificación morfológica es necesaria y se

debe realizar previamente a la identificación molecular debido a que las secuencias de genes a amplificar y secuenciar, pueden variar los distintos géneros de hongos. Las especies del género *Aspergillus* comúnmente se identifican molecularmente a partir de la región nuclear ribosomal, y se amplifica el gen ITS (Internal Transcribed Spacer), específicamente ITS 1 e ITS 2, para su posterior secuenciación y análisis en base de datos (Gherbawy & Voigt, 2010).

De acuerdo con el catálogo de Leslie y col. (2006), para la identificación morfológica de *Fusarium*, se determinó que las cepas C6a y C7a pertenecen a este género, ya que presentaron macro y microconidias fusiformes (en forma de vainas) en microscopio a 40x. Determinado el género se procedió con la identificación a nivel especie mediante la observación de las fialides directamente de un cultivo en PDA utilizando microscopio con zoom a 40x. La cepa C7a presentó fialides muy similares a la de la especie *Fusarium oxysporum*. Además, que la morfología de colonia es propia de este género con micelio algodonoso de color blanco y pigmentos morados. La cepa C6a no presentó fialides. En la morfología de colonia presentó micelio algodonoso con pigmentos anaranjados. Acorde con Leslie y col. (2006), determinar una especie morfológicamente para el género *Fusarium* es muy difícil debido a las similitudes microscópicas y la variedad de pigmentos que una sola especie puede presentar en una solo medio de cultivo (Leslie y col., 2006). Debido a lo anterior la cepa C6a se denominó *Fusarium* sp. El género *Fusarium* se identifica molecularmente mediante la amplificación y secuenciación del gen TEF-1 α (Translation Elongation Factor) para su posterior secuenciación y análisis en base de datos, esta sería la manera para aclarar dudas con respecto a la especie (Gherbawy & Voigt, 2010)

La cepa C1502, se aisló de un cuerpo fructífero o basidiocarpo el cual era perenne, pileado (sombrero) sin estípite o tallo. De consistencia leñosa o semejante al corcho. Superficie superior plana, surcada, glabra, con una costra distintiva, al principio rojiza y brillante a café. De acuerdo a estas características se realizó una comparación visual mediante el uso de una biblioteca digital de

imágenes utilizando el software MycoKey 4.1, al realizar la búsqueda y comparar con los basidiomicetos reportados y la apariencia resultó ser muy similar a la del género *Ganoderma*.

Las características microscópicas fueron presencia de clamidiosporas, basidioesporas circulares de color oscuro e hifas muy gruesas de doble pared. Suárez-Medellín y col. (2012), reportaron en la morfología para *Ganoderma resinaceus*, hifas muy gruesas de doble pared, y también argumentan encontrar basidioesporas ovoides y amarillentas, lo cual difiere a las características encontradas para la cepa C1502, Sin embargo, al final reportan haber identificado molecularmente como *Ganoderma lucidum*. También se realizó un frotis de micelio y esporas, proveniente de un cultivo en PDA y se utilizó azul lactofenol para teñir las preparaciones microscópicas, se observó que las hifas son septadas, y también se tiñeron circulares y se encontraron esporas de forma ovoide, y clamidioesporas unidas a las hifas. Por lo anterior se determinó que la cepa C1502 pertenece al género *Ganoderma* aunque no se logró determinar la especie.

En el caso del género *Ganoderma* la especie se puede identificar mediante la amplificación y secuenciación de la región nuclear ribosomal. Gottlieb y col. (2000), realizaron un estudio para amplificar los fragmentos ITS1-5.8S-ITS2 evaluando distintos pares de iniciadores. Seleccionaron el par BMB-CR/LR0 que amplifican las regiones ITS 1 e ITS 2 produciendo amplicones de 730 pares de bases.

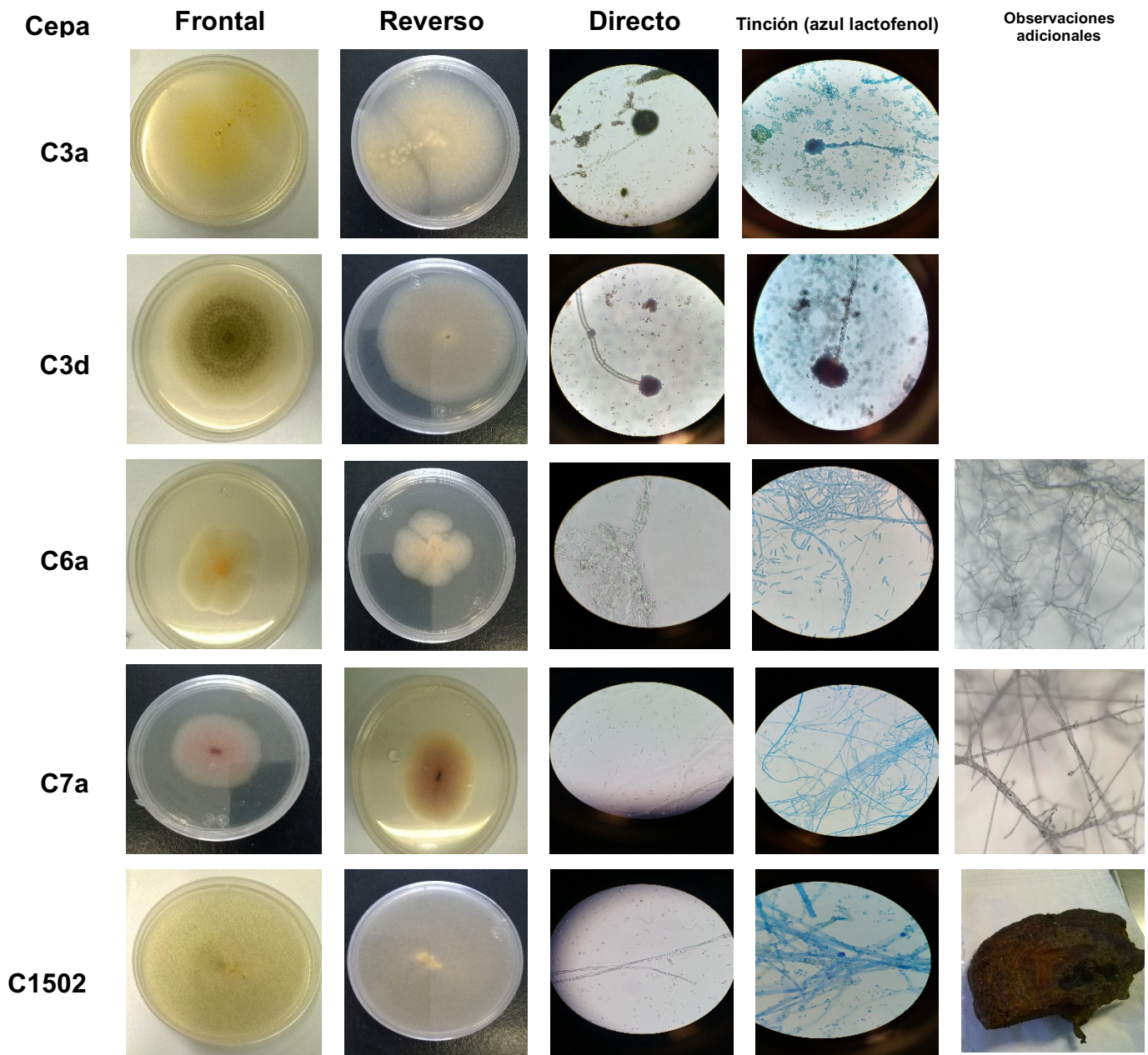


Figura 11. Morfología de colonia, esporas y cuerpo fructífero
 En observaciones especiales se muestran la ausencia y presencia de fialides de la cepas C6a y C7a respectivamente, y el cuerpo fructífero de la cepa C1502.

D EVALUACIÓN ETALOGÉNICA EN GLUCOSA Y XILOSA

La cepa que resultó con mayor rendimiento etanólico en glucosa fue *Fusarium* sp. (C6a) con 0.37 g etanol/g glucosa y también presentó mayor productividad 1.87 g/L d. *Fusarium oxysporum* (C7a) tuvo un rendimiento de 0.21 g etanol/g glucosa y una productividad 1.01 g/L d. Lo que demuestra que el género *Fusarium* tiene un alto potencial para fermentar hexosas. En el **Cuadro 7** se muestra un reporte de la literatura, Ruiz y col. (2007) presentan rendimientos similares a los obtenidos con la cepa *Fusarium* sp. (C6a) en cuanto a fermentación de glucosa. Sin embargo, los rendimientos fueron menores en una relación 1:10 comparados con las cepas de *Fusarium* sp. (C6a) y *Fusarium oxysporum* (C7a).

En el caso de la fermentación de xilosa la cepa con mayor rendimiento fue *Ganoderma* sp. (C1502) con 0.11 g etanol/g glucosa y una productividad 0.70 g/L d. La cepa *Ganoderma* sp. (C1502) presentó una disminución en la concentración de etanol al tiempo de 60 h en la fermentación en glucosa (**Figura 12**) y de igual manera en la fermentación de xilosa (**Figura 13**), y también en el análisis preliminar en sacarosa (**Figura 9**). Este fenómeno puede deberse a la activación de algún mecanismo metabólico que disminuya la concentración de etanol, dado que ocurre a las 60 horas de fermentación en azúcares simples y durante la fase exponencial. Es de suponerse que este microorganismo utilice la fermentación alcohólica no como una ruta para obtener energía en condiciones anaerobias, sino para producir etanol como un precursor para la síntesis de algún polímero necesario para la formación de cuerpo fructífero. Por el momento, no se ha reportado ninguna especie del género *Ganoderma* que fermente etanol. Sin embargo, existen reportes de especies de *Ganoderma* productoras de exopolímeros como *G. resinaceum* y *G. lucidum* (Kim y col., 2006; Lee & Kang, 1996).

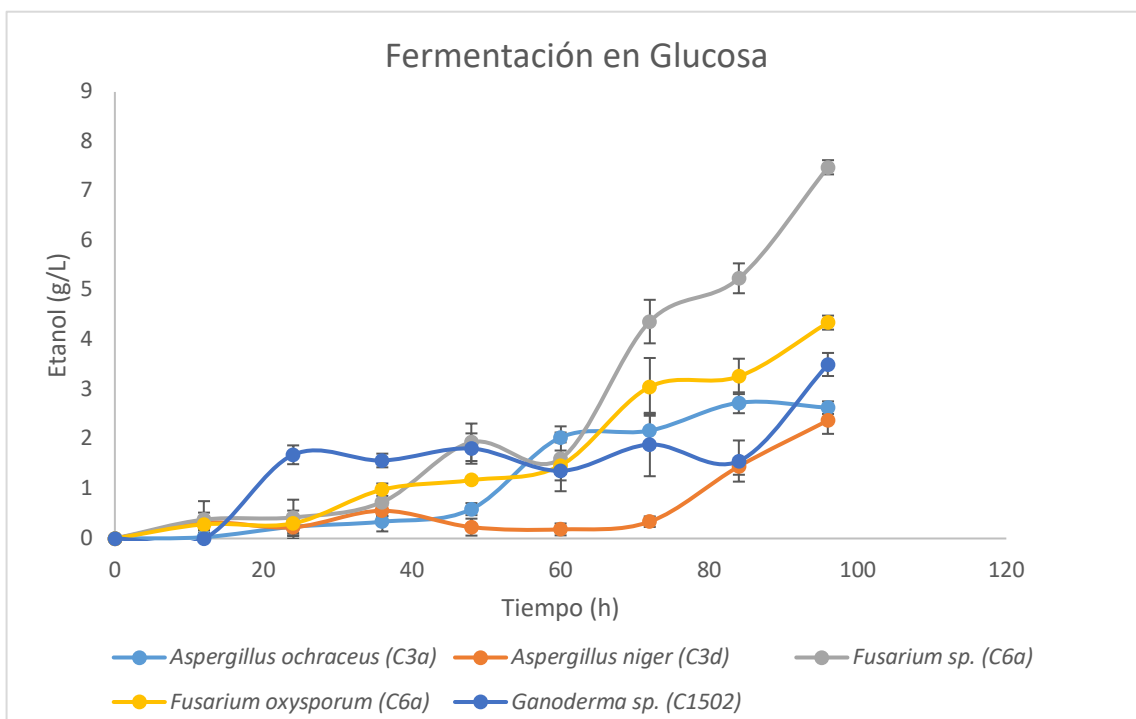


Figura 12. Fermentación en glucosa por *Aspergillus ochraceus* (C3a), *Aspergillus niger* (C3d), *Fusarium sp.* (C6a), *Fusarium oxysporum* (C7a), *Ganoderma sp.* (C1502), en condiciones anaerobias sin agitación, pH 5.0 y temperatura de 28°C.

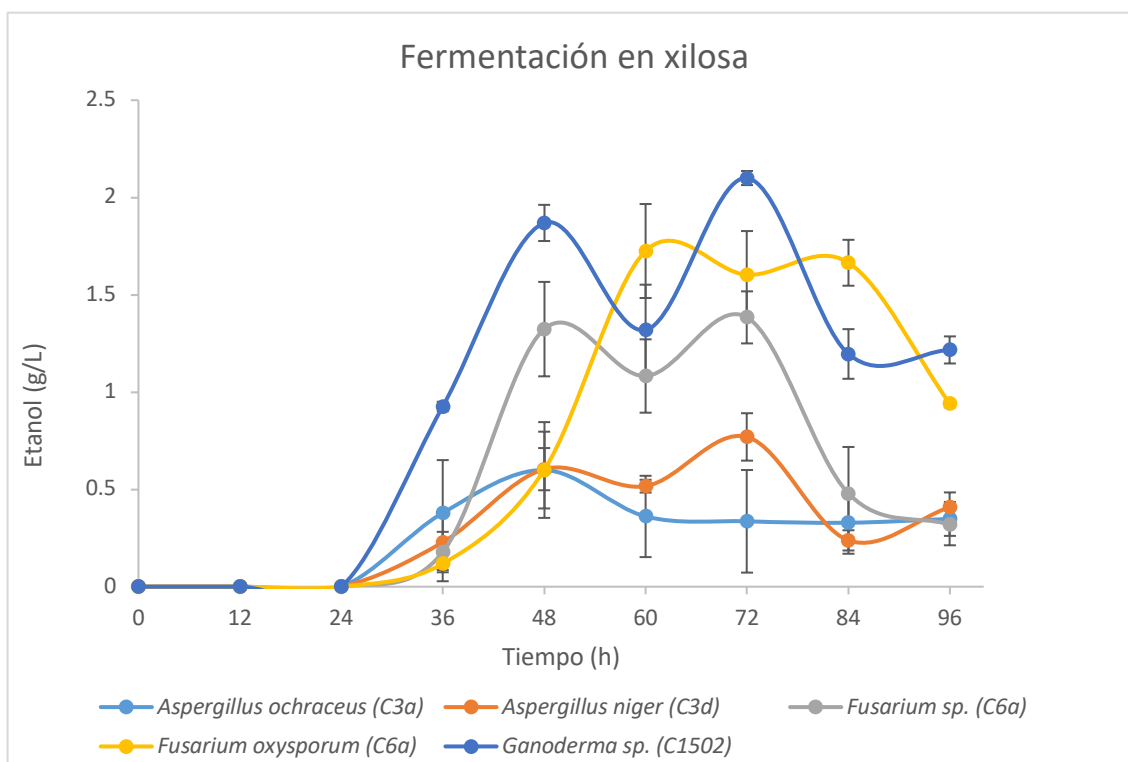


Figura 13. Fermentación en xilosa por *Aspergillus ochraceus* (C3a), *Aspergillus niger* (C3d), *Fusarium sp.* (C6a), *Fusarium oxysporum* (C7a), *Ganoderma sp.* (C1502), en condiciones anaerobias sin agitación, pH 5.0 y temperatura de 28°C.

Las cepas de *Aspergillus niger* (C3d) y *Aspergillus ochraceus* (C3a), presentaron los rendimientos más bajos 0.12 g etanol /g glucosa y 0.14 g etanol/g glucosa respectivamente. *Aspergillus niger* (C3d) inició la producción de etanol pasadas las 72 h fermentación. Lo cual puede indicar que tiene un mecanismo adicional para crecer y producir energía. Este microorganismo ha sido reportado como productor de ácido cítrico, lo que puede sugerir que utiliza el ciclo de Krebs durante ese tiempo (Vega y col., 2012). En el **Cuadro 7** se puede comparar los resultados con otras especies del mismo género en rendimiento y productividad, obtenidos en las fermentaciones de glucosa y xilosa.

Comparando los resultados entre las cepas evaluadas en este trabajo y las reportadas en la literatura (**Cuadro 7**), existen cepas que muestran rendimientos superiores a los obtenidos en este estudio. Sin embargo, las condiciones en las que se llevaron a cabo los experimentos en la mayoría de los casos no son las mismas. Por ejemplo, Skory y col. (1997) utilizaron concentraciones de azúcar de (50 g/L) comparado con las utilizadas en este trabajo (20 g/L). Al aumentar la concentración de azúcares en el medio de cultivo la actividad de oxígeno en agua disminuye. Además, las fermentaciones se realizaron en matraces Erlenmeyer de 50 ml utilizando sólo 20 ml de volumen para la fermentación, donde la geometría del recipiente también se considera un factor de importancia, porque influye en la transferencia de masa y calor. Aunado a que incluyeron una fase aerobia de 24 horas para aumentar el crecimiento del microorganismo. Procedimiento similar al utilizado por Anasontzis y col. (2011).

Okamoto y col. (2014), utilizaron intervalos de pH de 2.0 a 5.0. Sin embargo, demostraron que a pH bajos la fermentación de xilosa se detenía. La única condición que no ha variado significativamente es la temperatura que oscila entre los 28 a 30°C, considerada como la temperatura ideal de crecimiento para los hongos (Woolverton, 2008).

Cuadro 7. Rendimiento y productividad de etanol en glucosa y xilosa

Cepa	Glucosa			Xilosa			Referencia
	E	Y	P	E	Y	P	
<i>Aspergillus awamori</i> NRRL 3112	7.20	0.14	1.20	1.40	0.03	0.23	Skory y col. (1997)
<i>Aspergillus foetidus</i> NRRL 337	5.20	0.10	0.87	3.40	0.07	0.57	Skory y col. (1997)
<i>Aspergillus niger</i> NRRL 326	5.70	0.11	0.95	1.20	0.02	0.20	Skory y col. (1997)
<i>Aspergillus oryzae</i> NRRL 694	24.40	0.48	4.07	4.70	0.09	0.78	Skory y col. (1997)
<i>Aspergillus sojae</i> NRRL 6271	14.40	0.29	2.40	2.10	0.04	0.35	Skory y col. (1997)
<i>Aspergillus tamari</i> NRRL 429	18.60	0.37	3.10	2.90	0.06	0.48	Skory y col. (1997)
<i>Fusarium oxysporum</i> F3	17.50	0.43	4.38	8.70	0.22	1.24	Panagiotou y col., (2005)
<i>Fusarium oxysporum</i> VTT-D-80134	9.50	0.38	3.16	6.30	0.25	0.90	Ruiz y col. (2007)
<i>Monilia</i> sp.	23.00	0.46	3.28	11.00	0.22	1.57	Gong y col. (1981)
<i>Mucor indicus</i> CCUG 22424	8.50	0.43	4.25	na	na	na	Sharifia y col. (2008)
<i>Pestalotiopsis</i> sp. XE-1	2.80	0.34	0.56	3.80	0.33	0.76	Pang y col. (2011)
<i>Rhizopus javanicus</i> NRRL13161	23.50	0.47	7.83	2.30	0.05	0.77	Skory y col. (1997)
<i>Rhizopus oryzae</i> NRRL3133	14.90	0.30	2.48	10.80	0.21	3.60	Skory y col. (1997)
<i>Trichoderma</i> sp. strain A10	5.00	0.10	0.25	0.80	0.02	0.10	Stevenson y Weimer (2002)
<i>Trichoderma reesei</i>	4.80	na	na	0.50	na	na	Q. Xu y col. (2009)
<i>Paecilomyces variotii</i> ATHUM 8891	10.30	0.34	0.85	13.90	0.46	1.16	Zerva y col. (2014)
<i>Trametes suaveolens</i>	7.70	0.39	0.43	1.20	0.06	na	Okamoto y col. (2010)
<i>Peniophora cinérea</i>	8.10	0.41	0.51	1.80	0.09	na	Okamoto y col. (2010)
<i>Trametes hirsuta</i>	9.70	0.49	3.23	3.90	0.20	0.33	Okamoto y col. (2011)
<i>Trametes versicolor</i>	9.20	0.46	3.07	8.80	0.44	2.20	Okamoto y col. (2014)
<i>Aspergillus ochraceus</i> (C3a)	2.74	0.14 ^d	0.78 ^c	0.60	0.03 ^c	0.30 ^{bc}	Este trabajo
<i>Aspergillus niger</i> (C3d)	2.38	0.12 ^d	0.59 ^d	0.77	0.04 ^c	0.26 ^c	Este trabajo
<i>Fusarium</i> sp. (C6a)	7.48	0.37 ^a	1.87 ^a	1.38	0.07 ^b	0.46 ^b	Este trabajo
<i>Fusarium oxysporum</i> (C7a)	4.22	0.21 ^b	1.05 ^b	1.73	0.09 ^{ab}	0.69 ^a	Este trabajo
<i>Ganoderma</i> sp. (C1502)	3.67	0.18 ^c	0.92 ^c	2.10	0.11 ^a	0.70 ^a	Este trabajo

*Letras diferentes indican diferencia significativa. Tuckey ($\alpha=0.05$). (Solo para cepas evaluadas en este trabajo)

^EConcentración máxima de etanol, g/L

^YRendimiento de etanol, g de etanol por gramo de fuente de carbono

^PProductividad, g/L d

na: no aparece

En la **Figura 14**, se comparan los rendimientos obtenidos por las 5 cepas evaluadas expresados en porcentaje, que representa la eficiencia de conversión de glucosa y xilosa en etanol. Considerando que el 100% del teórico máximo es 0.511 g de fuente de carbono/ g de etanol (Horisawa y col., 2015). La cepa de *Fusarium* sp. (C6a) presentó la eficiencia de conversión de glucosa más alta (73.13%), respecto al resto de las cepas evaluadas. La eficiencia de fermentación de xilosa fue muy baja para esta cepa de (13.53%) comparado con la eficiencia de fermentación de glucosa. Ambos fuentes de carbono son monosacáridos, por lo que supone que su metabolismo debe ser muy eficiente. Sin embargo, Panagiotou y col. (2005), reportaron que *Fusarium oxysporum*, bajo condiciones anaerobias limitaba el consumo de xilosa se y el xilitol era el principal producto del metabolismo de xilosa. También identificaron un cuello de botella en la ruta de pentosas debido a que durante la fermentación de xilosa hubo una acumulación de sedoheptulosa-7-P y eritrosa-4-P, por lo que la regulación de la enzima transaldolasa es crítica durante el metabolismo de xilosa en condiciones anaerobias. Por lo anterior, esto sugiere que ambas las cepas *Fusarium* sp. (C6a) y *Fusarium oxysporum* (C7a), presentan el mismo comportamiento metabólico.

La cepa de *Ganoderma* sp. (C1502) presentó una eficiencia de 20.53%, siendo esta la mayor entre las 5 cepas evaluadas. Sin embargo, no existe diferencia significativa ($p < 0.05$) con el resultado obtenido con la cepa *Fusarium oxysporum* (C7a) lo que pudiera indicar que el consumo de xilosa en *Ganoderma* sp. (C1502) también pudiera estar limitado por las condiciones anaerobias. Las cepas de *Aspergillus ochraceus* (C3a) y *Aspergillus niger* (C3d) presentaron las eficiencias más bajas durante la fermentación de glucosa, 26.74 y 23.26%, y xilosa, 5.86 y 7.52%, respectivamente.

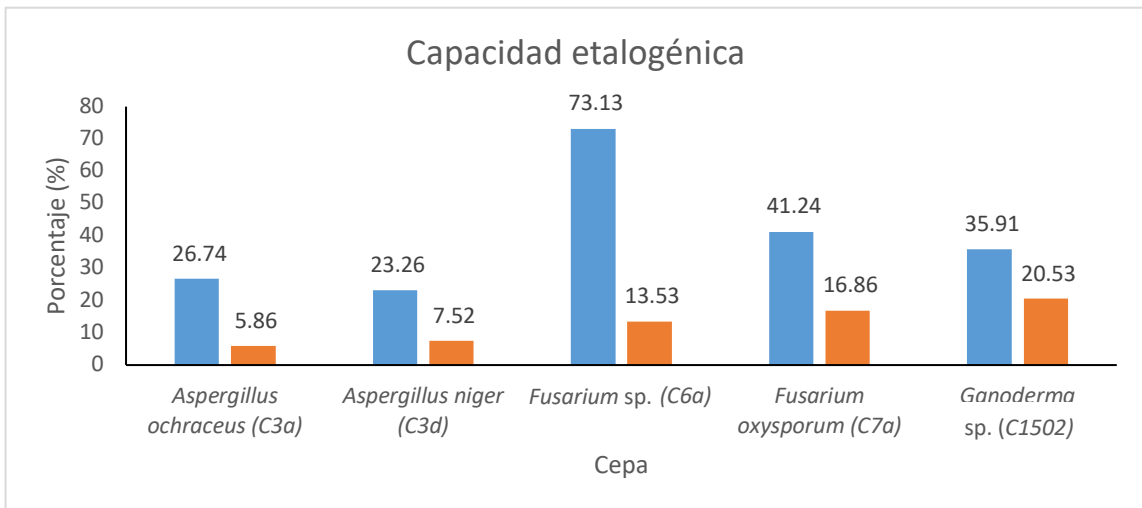


Figura 14. Actividad etalógica de las cepas en xilosa y glucosa expresados en rendimiento porcentual.

E EVALUACIÓN ETALOGÉNICA EN TALLO DE *M. oleifera*

1 Caracterización de tallo de *M. oleifera* y cálculo de rendimientos teóricos

La composición del tallo de moringa se muestra en el **Cuadro 8**. La relación celulosa/lignina es de 2.17. Khider y Elsaki (2012), obtuvieron resultados muy similares de 2.1 teniendo 50.9% en celulosa y 24.9% en lignina. Su estudio fue realizado para evaluar la idoneidad en 4 árboles (*Acacia mellifera*, *Acacia senegal*, *Eucalyptus tereticornis* y *Moringa oleifera*) para producir carbón y biocombustibles sólido.

Por otro lado, para la producción de etanol, moringa presenta ciertas ventajas debido a que su composición en contenido de celulosa y hemicelulosa es de 67.1%. No obstante, el contenido de lignina es una desventaja dado que es un impedimento para que las enzimas puedan hidrolizar la celulosa y hemicelulosa. Por lo tanto, esta madera sugiere un tratamiento efectivo de bajo consumo energético y amigable con el medio ambiente.

De acuerdo con los análisis bromatológicos realizados en tallo de moringa el 46.8% corresponde a celulosa y el 20.3% a hemicelulosa por lo tanto se puede inferir que el 67.1 % de la biomasa empleada corresponde a azúcares que pueden ser fermentados. Entonces de **20 g de biomasa seca** se obtienen **13.422 g de azúcares**. Ahora, considerando que la eficiencia de conversión para hexosas y pentosas en etanol es de 51.1%, teóricamente de **13.422 g de azúcares** producen **6.8586 g de etanol**. En este sentido, en la **Figura 15**, se presenta un diagrama que muestra un balance de masa con las etapas para la producción de etanol. Donde se observa que teóricamente se puede obtener hasta un 34% de etanol de lo que representa la biomasa seca, de acuerdo con los resultados obtenidos en el análisis bromatológico de moringa (**Cuadro 8**).

Cuadro 8. Bromatología del tallo de moringa

Composición biomasa seca	Porcentaje %
Lignina	21.567 ± 1.158
Celulosa	46.810 ± 1.228
Hemicelulosa	20.307 ± 0
Extraíbles/Proteínas	5.953 ± 0.306
Cenizas	5.363 ± 0.277

(Promedio ± desviación estándar)

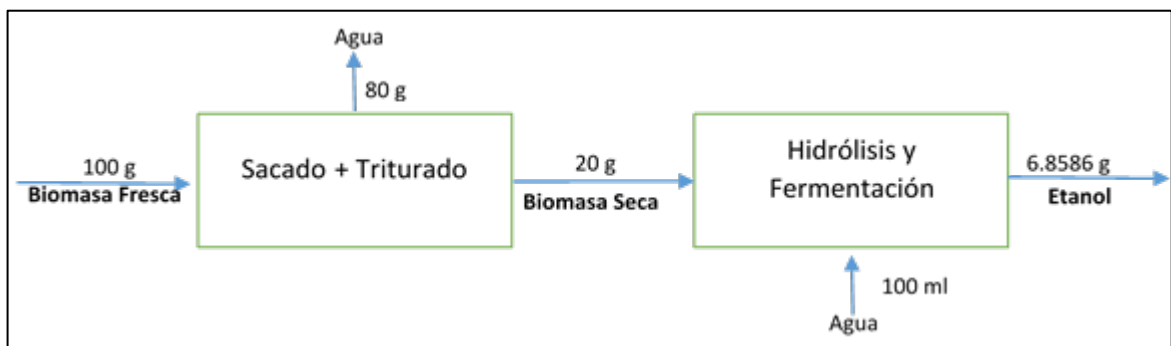


Figura 15. Balance de masa para la producción de etanol de tallo de *M. oleifera*.

2 Fermentación en tallo de *M. oleifera*

Al evaluar la fermentación de tallo de moringa, en la **Figura 16** se observa que la cepa *Ganoderma* sp. (C1502) tiene mejor con un rendimiento porcentual de 4.76% del teórico máximo, con respecto al resto de las cepas evaluadas. En el **Cuadro 9**, se presentan los rendimientos, rendimientos porcentuales y productividad y se comprueba mediante la prueba de Tuckey ($\alpha=0.05$) diferencias significativas en el rendimiento con respecto a las otras cepas.

Se han evaluado algunas cepas en sustratos lignocelulósicos como *Fusarium oxysporum* con rendimientos de 0.138 g de etanol/g de paja de trigo (Paschos y col., 2015). Esta cepa comparada con *Ganoderma* sp. (C1502) tiene un rendimiento cinco veces mayor esto es debido a que la biomasa de paja de trigo fue pretratada por hidrólisis ácida y se manejó en concentraciones del 4%.

Por otro lado, Okamoto y col. (2014), reportó a *Trametes versicolor* con rendimiento de 0.25 g de etanol/g de paja de arroz lo que corresponde a un 66% del teórico máximo en paja de arroz sin pretratamiento. Lo que sugiere que mediante la optimización de temperatura, pH, medio de cultivo y aireación, muy probablemente, se pueden alcanzar rendimientos porcentuales mayores a los que se alcanzaron en este estudio.

A pesar de que *Ganoderma* sp. (C1502) no resultó ser la de mejor rendimientos en fermentación de glucosa, posiblemente el resultado se deba a diversos escenarios. El primero indica que puede existir una alta actividad lignolítica en comparación con las otras cepas, y a pesar de no dar positivo para lacasas, es muy probable que este efecto se deba por la presencia de peroxidasas u otras enzimas oxidorreductoras. *Ganoderma* es el único basidiomiceto entre las cepas evaluadas y es un hongo de pudrición blanca y destacan por tener una actividad lignolítica muy eficiente. Este género de hongos es conocido por ser plaga de bosques, palmas y otros árboles (Paterson, 2007; Susanto y col., 2005).

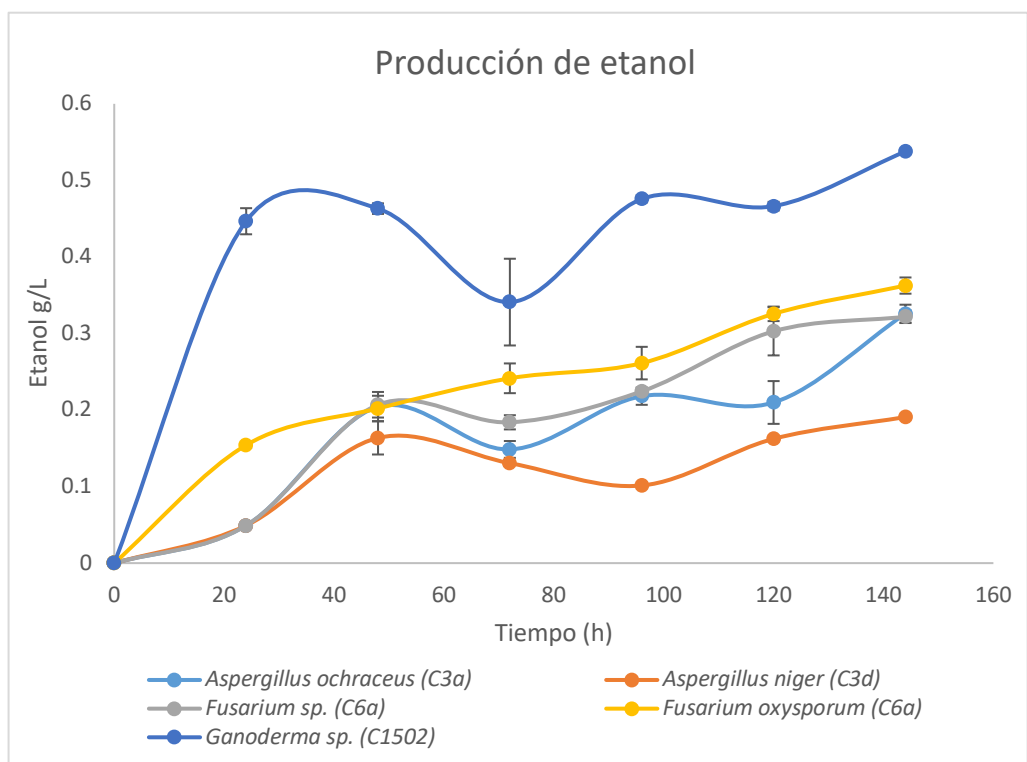


Figura 16. Fermentación en *M. oleifera* por *Aspergillus ochraceus* (C3a), *Aspergillus niger* (C3d), *Fusarium sp.* (C6a), *Fusarium oxysporum* (C7a), *Ganoderma sp.* (C1502), en condiciones anaerobias sin agitación, pH 5.0 y temperatura de 28°C.

Cuadro 9. Rendimiento actual, rendimiento porcentual y productividad de etanol en *M. oleifera*.

Cepa	Rendimiento (g etanol/g de moringa)	Rendimiento (%)	Productividad (g/L d)
<i>Aspergillus ochraceus</i> (C3a) ^{bc}	0.016	4.746	0.05
<i>Aspergillus niger</i> (C3d) ^c	0.010	2.779	0.03
<i>Fusarium</i> sp. (C6a) ^{bc}	0.016	4.687	0.05
<i>Fusarium oxysporum</i> (C7a) ^b	0.018	5.280	0.06
<i>Ganoderma</i> sp. (C1502) ^a	0.027	7.831	0.09

*Letras diferentes representan diferencia significativa. Prueba Tuckey ($\alpha= 0.05$).

Los resultados obtenidos en estos experimentos están muy por debajo de los resultados obtenidos en la literatura, y una de las causas puede ser el porcentaje de lignina de las biomásas utilizadas para los experimentos. En los resultados obtenidos de los análisis bromatológicos en tallo de moringa (**Cuadro 8**), se observa que el contenido de lignina no es muy diferente al de muchos árboles. Lo que sugiere que este factor es un gran obstáculo para la transformación de esta biomasa en etanol. Okamoto y col. (2014), reportan haber usado paja de trigo con las siguientes características: (35.7% glucosa, 16.9% xilosa, 9.7% arabinosa, 1% galactosa, 7.8% lignina, 17.5% proteína y 6.8% grasas y 4.6% cenizas). Lo cual permite que los azúcares estén más disponibles para la fermentación y se obtengan rendimientos más altos.

En un segundo escenario se puede especular que existe una actividad de celulasas y xilanasas mejor que las otras cepas evaluadas y que la temperatura (28°C) sea muy cercano a la temperatura óptima de hidrólisis de estas enzimas. La desventaja que podría presentar *Ganoderma* sp. (C1502), es la disminución en la producción de etanol al tiempo de 72 h (**Figura 16**), y mediante análisis de cromatografía de gases, se comprobó que esto se debe a que existe una producción de ácido oxálico y etanol (2, vinyloxy), tal como se muestra en la **Figura 17**. Lo que sugiere que el etanol es usado para la síntesis de algún metabolito primario indispensable para su crecimiento. Los basidiomicetos tienen diversas fases de crecimiento, además de transformarse de esporas en hifas y micelios, también producen cuerpo fructífero formado por polímeros muy resistentes como la quitina, piruvato y acetato. Por lo que se puede especular que el ácido oxálico y el etanol (2, vinyloxy) son utilizados como precursores de alguno de estos polímeros. El etanol (2, vinyloxy), siendo sinónimo del etilenglicol vinyl ether, es un polímero utilizado como soporte en diversas aplicaciones biomédicas (Alexander y col., 2013; Z. Zhang y col., 2003). Sin embargo, no existe reporte de que pueda ser sintetizado por algún microorganismo.

El ácido oxálico, puede ser sintetizado a través del ciclo de Krebs, en la

etapa de producción de oxalacetato (Lehninger & Cox, 2006). Takao (1965), evaluó 47 especies de basidiomicetos productores de ácidos orgánicos, y entre ellos se reporta a *Ganoderma lucidum* como productor de ácido oxálico, y se estima que es producido para despolimerizar la celulosa y hemicelulosa a través de procedimientos no enzimáticos ya que el ácido oxálico tiene dos pKa's podría mimetizar la hidrólisis de un glucósido mediante un mecanismo iónico, además puede (J.-W. Lee y col., 2010). Por otro lado, Osińska-Jaroszuk y col. (2014), encontraron que existe una correlación entre la producción de ácido oxálico con el pH durante el crecimiento de *Ganoderma applanatum*, lo que causa una disminución del pH en el medio de cultivo. Además se estima que el ácido oxálico participa en diversas funciones en el metabolismo de hongos de podrición blanca como en la despolimerización de lignocelulosa, amortiguación el pH en microambientes, regulación de enzimas oxidativas como las lignolíticas (lacasas, Mnp peroxidasa, lignina peroxidasa, tirosina oxidasa, entre otras) y en la quelación de metales (Shimada y col., 1997).

En las observaciones realizadas en el caldo de cultivo inoculado con la cepa *Ganoderma* sp. (C1502) durante las primeras horas se detectó la formación de fluidos altamente viscosos, y posteriormente la formación de una biomembrana transparente y de baja densidad, como se ilustra en la **Figura 18**. En la perspectiva ingenieril, la transformación del micelio a una biomembrana puede resultar favorable en la fermentación. Esta membrana puede permitir llevar dos fases simultáneas en la biorreacción una aerobia en el espacio de cabeza del reactor y otra anaerobia en la fase líquida, similar al procedimiento utilizado por Brethauer y Studer (2014). Así, el hongo tendrá acceso al oxígeno y producirá una mayor cantidad de enzimas, y en la fase anaerobia los azúcares pudieran ser fermentados por una cepa con mayor eficiencia etalogénica como *Saccharomyces cerevisiae*. Aunado a que el hongo no afectará en ese punto la viscosidad del medio de cultivo y tendrá tolerancia a altas concentraciones de etanol al ser una cepa etalogénica.

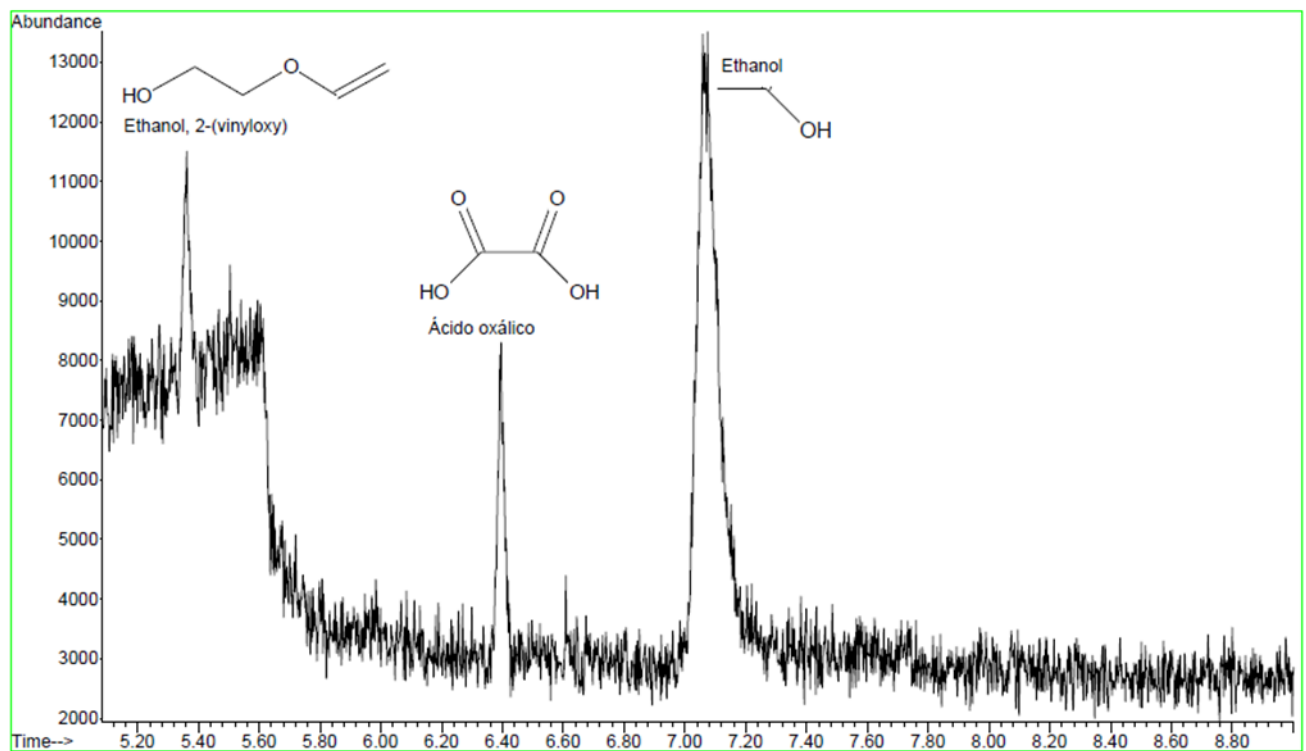


Figura 17. Cromatograma de producción de etanol a las 72 h de *Ganoderma* sp. (C1502)

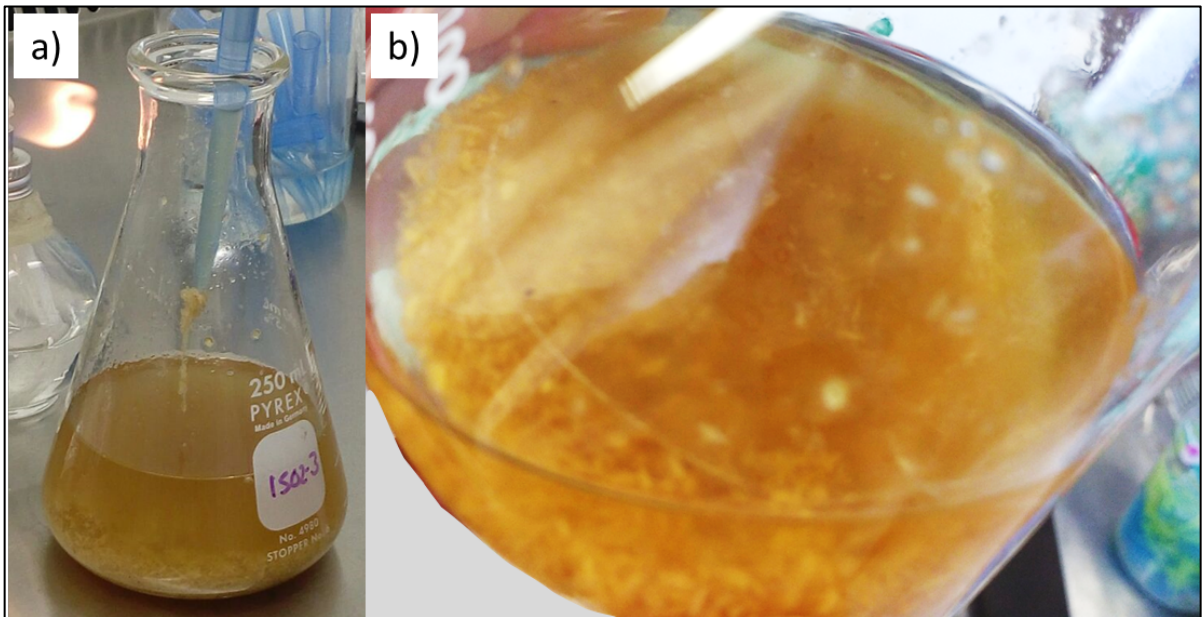


Figura 18. Biomembrana producida por *Ganoderma* sp. (C1502). a) Formación de membrana a las 72 h y b) formación de membrana a las 132 h de cultivo.

F EVALUACIÓN DEL RENDIMIENTO ETANÓLICO DE LAS CEPAS EN CONSORCIO CON *Saccharomyces cerevisiae* (ATCC 200062)

Una de las estrategias utilizadas para producir etanol de moringa en un bioproceso consolidado es la utilización de un consorcio microbiano, donde se pueden encontrar sinergias que pueden hacer más eficiente la utilización del substrato y aumentar los rendimientos. La aplicación de cultivos mixtos es una opción inexplorada dado que se requieren encontrar condiciones similares para todos los microorganismos del consorcio (Zoglowek y col., 2016; Brethauer & Studer, 2014). En el **Cuadro 10** se presentan los resultados obtenidos en la fermentación de moringa utilizando las cepas fúngicas con levadura.

La cepa de *Fusarium sp.* (C6a) y *Fusarium oxysporum* (C7a), tienen significativamente ($p < 0.05$) los rendimientos más bajos durante la fermentación de moringa en consorcio con *S. cerevisiae* (ATCC 200062) de 0.05 g etanol/g moringa para ambas o representando en eficiencia de fermentación en un 18%, a pesar de haber tenido los mayores rendimientos durante la fermentación de glucosa 0.37 y 0.21 g etanol/g glucosa, respectivamente. Una explicación a esto, se observa en la **Figura 19**, donde se compara la producción de celulasas entre los 6 consorcios evaluados. Las cepas de *Fusarium* presentan curvas de producción de celulasas donde en algún punto en el tiempo, no tienen más de 8 unidades de enzima por litro, al igual que *Ganoderma sp.* (C1502). Sin embargo, este basidiomiceto produce ácido oxálico y permite despolimerizar la lignocelulosa (Shimada y col., 1997), y por lo tanto se ve reflejado en el rendimiento el cual fue de 0.11 g etanol/g moringa, expresado en porcentaje se tendría un 31.53% de eficiencia durante la fermentación.

El consorcio en el que se utilizaron todas las cepas fúngicas (*A. ochraceus* (C3a), *A. niger* (C3d), *Fusarium sp.* (C6a), *F. oxysporum*. (C7a), *Ganoderma sp.* (C1502) y *S. cerevisiae* ATCC 200062) presentó un rendimiento de 0.10 g etanol/g moringa, no diferente ($p < 0.05$) al consorcio de *Ganoderma sp.* (C1502) y *S. cerevisiae* (ATCC 200062).

Cuadro 10. Rendimiento y productividad de cepas en consorcio con *S. cerevisiae* (ATCC 200062)

Cepa	Rendimiento (g etanol/g de moringa)	Rendimiento porcentual (%)	Productividad (g etanol/L d)
<i>Aspergillus ochraceus</i> (C3a)	0.06 ^b	18.55	0.51 ^b
<i>Aspergillus niger</i> (C3d)	0.06 ^b	17.64	0.27 ^c
<i>Fusarium</i> sp. (C6a)	0.05 ^b	14.57	0.22 ^c
<i>Fusarium oxysporum</i> (C7a)	0.05 ^b	13.99	0.48 ^b
<i>Ganoderma</i> sp. (C1502)	0.11 ^a	31.53	0.48 ^b
Consortio (C3a, C3d, C6a, C7a, C1502, <i>S. cerevisiae</i>)	0.10 ^a	29.51	1.35 ^a

*Letras diferentes representan diferencia significativa. Prueba Tuckey ($\alpha= 0.05$).

*Rendimiento porcentual basado en un teórico máximo de 0.343 g etanol/g de moringa.

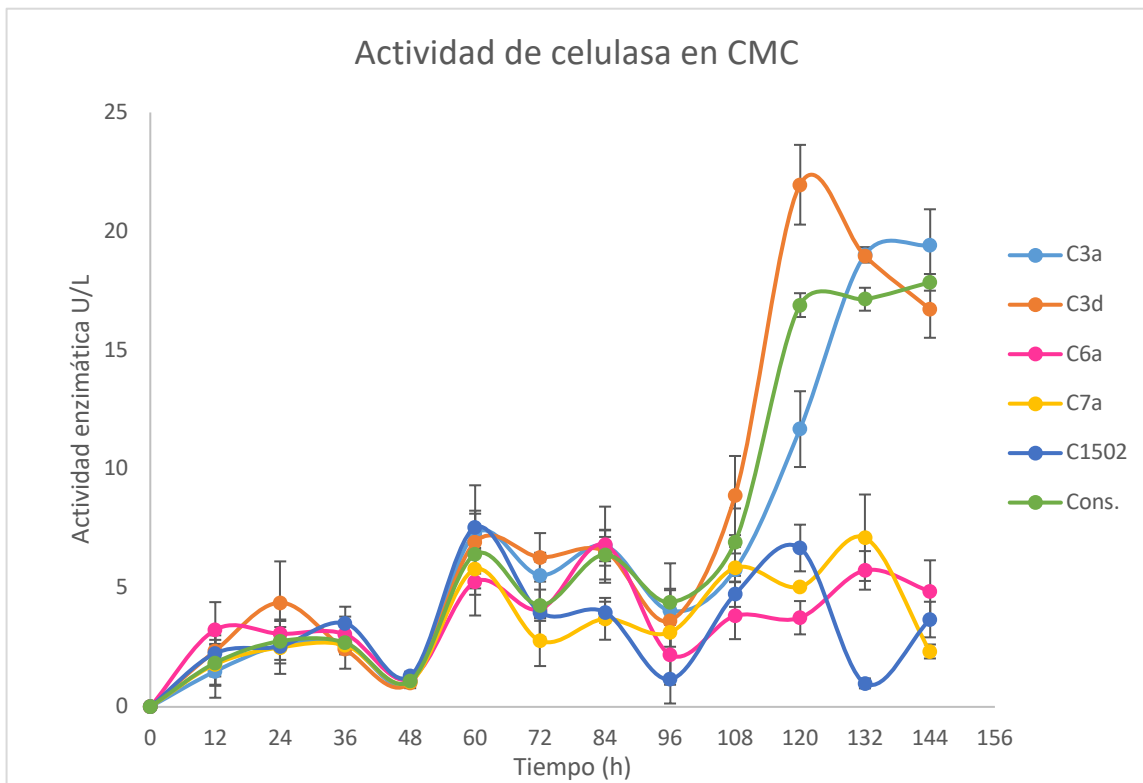


Figura 19. Actividad de celulasa (CMC) por *Aspergillus ochraceus* (C3a), *Aspergillus niger* (C3d), *Fusarium* sp. (C6a), *Fusarium oxysporum* (C7a), *Ganoderma* sp. (C1502) en la fermentación de *M. oleifera* con *S. cerevisiae* (ATCC 200062).

A partir de las variables medidas en las cinéticas microbianas se pueden definir comportamientos de sinergia y antagonismo entre cada cepa fúngica hacia *S. cerevisiae*. En la **Figura 20**, se muestran las curvas obtenidas en la fermentación entre *Aspergillus ochraceus* (C3d) y *S. cerevisiae*, en primera instancia se observa que durante las primeras 24 horas la producción de etanol dependió de la levadura puesto que es directamente proporcional a la concentración de levadura, donde se aprovecharon los azúcares disponibles que contenía el medio de cultivo provenientes de la moringa. Al reducirse la disponibilidad de azúcares la concentración celular disminuye, entonces inicia la producción de enzimas por parte del hongo y la disponibilidad de azúcares se reanuda, dentro de este lapso de 36 a 60 h, la producción de etanol depende del hongo y aunque que inicia el crecimiento de la levadura no se puede observar una proporcionalidad entre metabolito y célula, como sucedió en las primeras 24 h. A las 72 h se observa un decaimiento drástico en la producción de etanol y la disponibilidad de azúcares disminuye. Este fenómeno se puede deber al complejo metabolismo que presentan las cepas del genero *Aspergillus*, y al presenciar competencia por la fuente de carbono, la cepa pudo haber metabolizado el etanol para obtener energía, en la **Figura 20** se observa que en el tiempo de 72 a 96 horas la producción de etanol no incrementa y se mantiene constante al igual que la concentración celular de la levadura. A las 108 h se reanuda el crecimiento de la levadura y la producción de etanol. Por lo tanto, se puede asumir que este consorcio no es sinérgico y existe una competencia por los azúcares una vez liberados. Esto sugiere que la presencia de la levadura tiene un efecto en el metaboloma de *Aspergillus ochraceus* (C3a) para activar genes que posiblemente metabolicen el etanol. Además, los decaimientos de concentración de células de levadura pueden deberse a su sensibilidad a la ochratoxina una toxina producida por este hongo (Bayman y col., 2002).

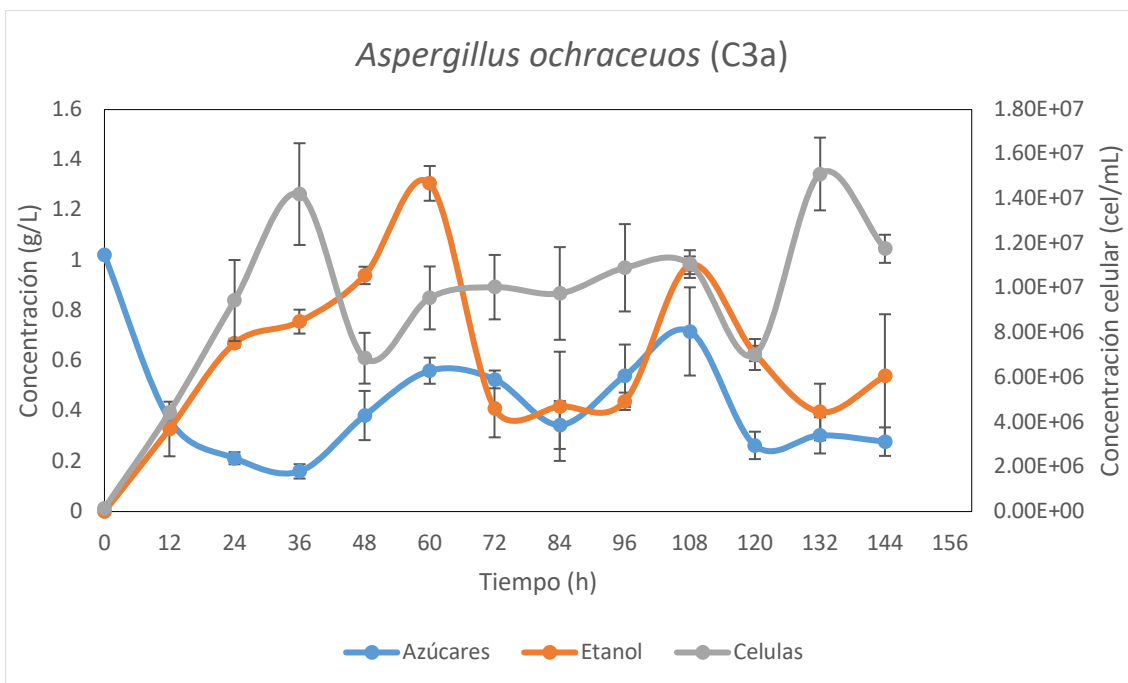


Figura 20. Fermentación de *M. oleifera* por *Aspergillus ochraceus* (C3a) y *S. cerevisiae* (ATCC 200062).

En la **Figura 21**, se muestran las curvas obtenidas en la fermentación entre *Aspergillus niger* (C3d) y *S. cerevisiae* (ATCC 200062), en este caso la producción de etanol es directamente proporcional a la concentración de celular de la levadura durante las 144 h de la cinética. Esto sugiere que no existe antagonismo por parte del hongo hacia la levadura. No obstante, se observa una ligera disminución en la producción de etanol, concentración celular y azúcares en el lapso de tiempo de las 60 a 96 h. Esto puede deberse a la saturación de las celulasas y xilanasas enzima por el sustrato. Pero pasado este tiempo se observa que las tres variables incrementan nuevamente. Este hongo en particular mantuvo la producción de celulasas más alta que el resto de los hongos, dando un máximo de producción a las 120 h de 21.96 U/L (**Figura 19**). El rendimiento obtenido fue de 0.05 g etanol/g glucosa no diferente significativamente ($p < 0.05$), al de *A. ochraceus* (C3a), *Fusarium* sp. (C6a) y *F. oxysporum*. (C7a). Aunque si presentó productividad menor que *A. ochraceus* (C3a) y *F. oxysporum*. (C7a), 0.27 g/L d.

El consorcio de *Aspergillus niger* y *S. cerevisiae*, ha sido reportado como un consorcio altamente efectivo llegando a producir buenos resultados en la fermentación de almidón, llegando a obtener 0.43 g etanol/g almidón de cassava. Lo cual representa el 100% de eficiencia de la fermentación, bajo condiciones de cultivo de 35°C, 300 r.m.p. y pH 5.0 (Ado y col., 2009).

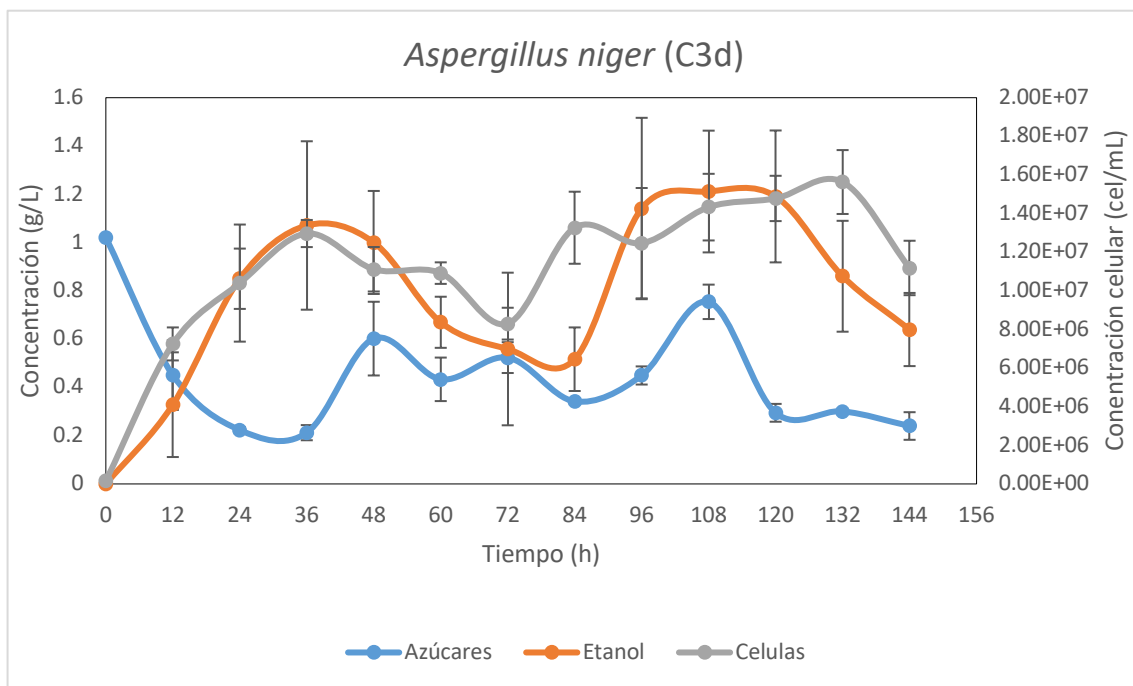


Figura 21. Fermentación de *M. oleifera* por *Aspergillus niger* (C3d) y *S. cerevisiae* (ATCC 200062).

El consorcio de *Fusarium* sp. (C6a) y *S. cerevisiae* (ATCC 200062) (**Figura 22**), presentó una producción de etanol dependiente de la levadura. Por lo que en esta gráfica se puede interpretar que conforme se liberaban los azúcares por el hongo la levadura los fermentaba. Además cabe mencionar que el patrón en la cinética de las tres variables que aparecen en la gráfica y el de celulasa (**Figura 19**), son muy parecidos. En este caso se puede asumir que se llevó a cabo la sacarificación y fermentación simultánea.

En la **Figura 23**, se observa la cinética de *Fusarium oxysporum* (C7a) y *S. cerevisiae* (ATCC 200062), esta combinación presentó un decaimiento drástico a las 84 horas en la producción de etanol y azúcares. Sin embargo, a partir de las 96 h la producción de azúcares se reanuda y a las 120 h la producción de etanol también. Una posible explicación es que puede deberse a la baja producción de enzimas o las enzimas no estaban en condiciones óptimas de realizar la catálisis. Estos resultados se pueden comparar con experimentos similares realizados por Panagiotou y col. (2011), que utilizaron a *Fusarium oxysporum* y una cepa *S. cerevisiae* recombinante en salvado de trigo, obteniendo una productividad 2.59 g/L h, lo que es 5 veces mayor al resultado obtenido por el consorcio *Fusarium* sp. (C7a) y *S. cerevisiae* (ATCC 200062), 0.48 g/L h, (**Cuadro 10**). El uso de ingeniería metabólica es una de las variantes que deben ser altamente considerados, ya que al modificar genéticamente las cepas se pueden tener mejores resultados, además de la optimización de condiciones de crecimiento y de formulación de medios de cultivo.

Una manera de aumentar los rendimientos es mediante el uso de un pretratamiento previo. de Almeida y col. (2013), demostraron que con el uso de biomasa pretratada reducida en lignina (de 22 a 7 % de lignina), se pueden obtener rendimientos de 0.15 g etanol/ g de bagazo de caña utilizando la cepa de *Fusarium verticilloides*.

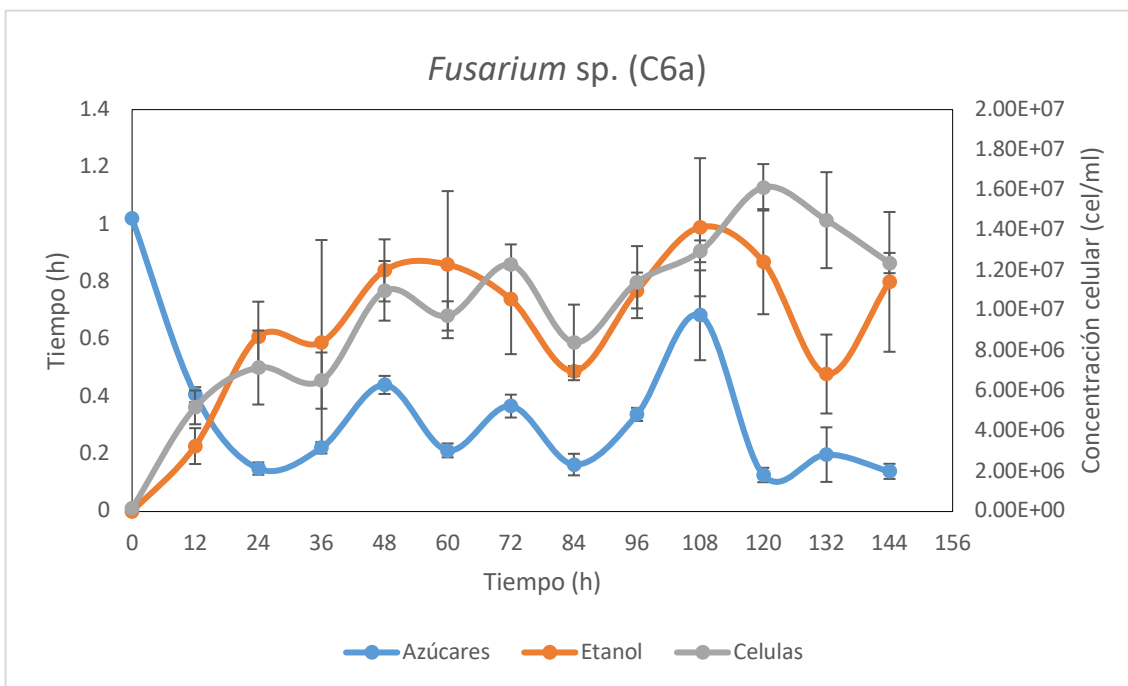


Figura 22. Fermentación de *M. oleifera* por *Fusarium* sp. (C6a) y *S. cerevisiae* (ATCC 200062).

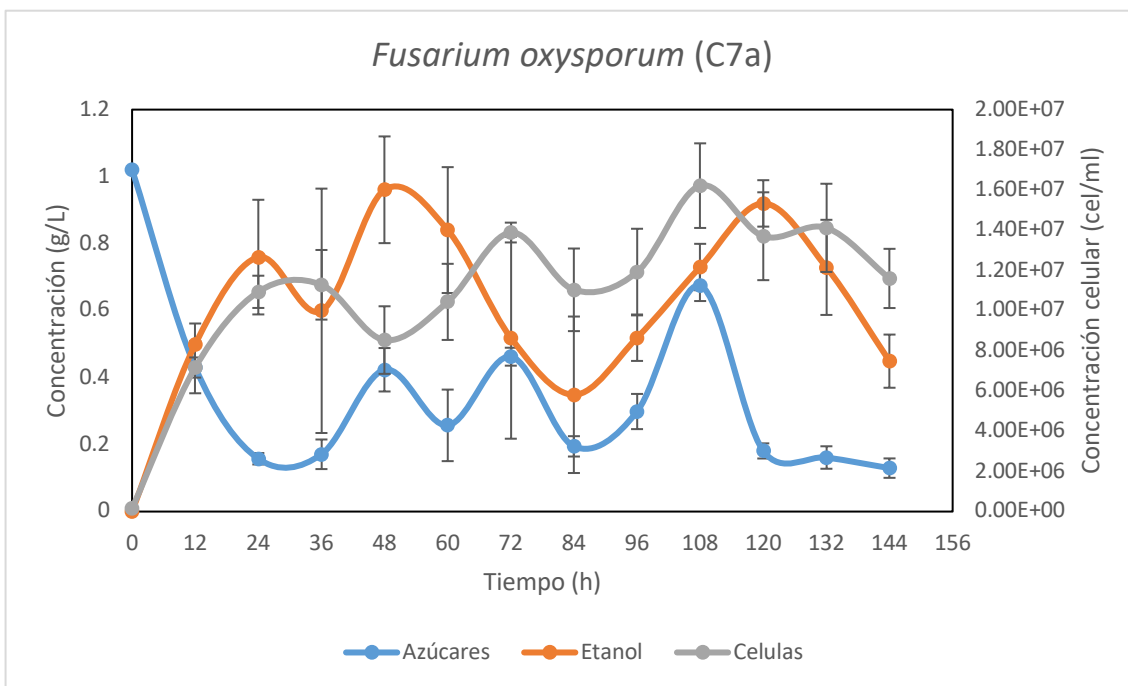


Figura 23. Fermentación de *M. oleifera* por *Fusarium oxysporum* (C7a) y *S. cerevisiae* (ATCC 200062).

En el consorcio de *Ganoderma* sp. (C1502) y *S. cerevisiae* (**Figura 24**), la producción de etanol depende de la levadura y la producción de azúcares depende del hongo durante las primeras 48 h. No obstante, a partir de las 60 h se presenta un fenómeno descrito anteriormente causado por el basidiomiceto, la disminución de etanol y la producción de ácido oxálico. La producción de etanol se reanuda a las 72 h, aunque la producción de etanol parece deberse al hongo, muy probablemente se deba a la fermentación de pentosas; fenómeno que no se observó en ninguna de las otras cepas evaluadas. A pesar de la disminución de etanol y de presentar baja producción de celulasas en determinado tiempo de la cinética, se obtuvieron los rendimientos más altos (**Cuadro 10**), y es posible que las enzimas producidas sean más eficientes en cuanto a la hidrólisis del substrato y tengan una alta tasa de recambio en comparación con las otras cepas o a que ácido oxálico fomenta la despolimerización de lignocelulosa.

En la **Figura 25**, se presenta un consorcio en el que interactúan 6 cepas, *A. ochraceus* (C3a), *A. niger* (C3d), *Fusarium* sp. (C6a), *F. oxysporum*. (C7a), *Ganoderma* sp. (C1502) y *S. cerevisiae* (ATCC 200062), donde se observa una rápida producción de etanol, probablemente debido a la baja disponibilidad de azúcares las cepas se estresaron y como respuesta produjeron una alta actividad enzimática. Sin embargo, la concentración de etanol disminuye drásticamente y no se recupera durante toda la cinética, quizás por el antagonismo descrito por *Aspergillus ochraceus* (C3a). La concentración celular se mantuvo incluso sin azúcares disponibles. No obstante, cabe mencionar que *S. cerevisiae* puede metabolizar xilulosa-5 fosfato (Balat, 2011), y durante la cinética aprovechó los azúcares que los hongos hacían disponible. Aun así, se puede explicar que la producción de etanol no se continuo por efecto de inhibidores producidos a partir de la degradación de lignina y a las altas concentraciones de NAD⁺ (nicotin adenin dinucleótido) y NADP⁺ (nicotin adenin dinucleótido fosforilado) que inhiben la glucolisis y la ruta de pentosas (Anasontzis y col., 2016; Klinke y col., 2004).

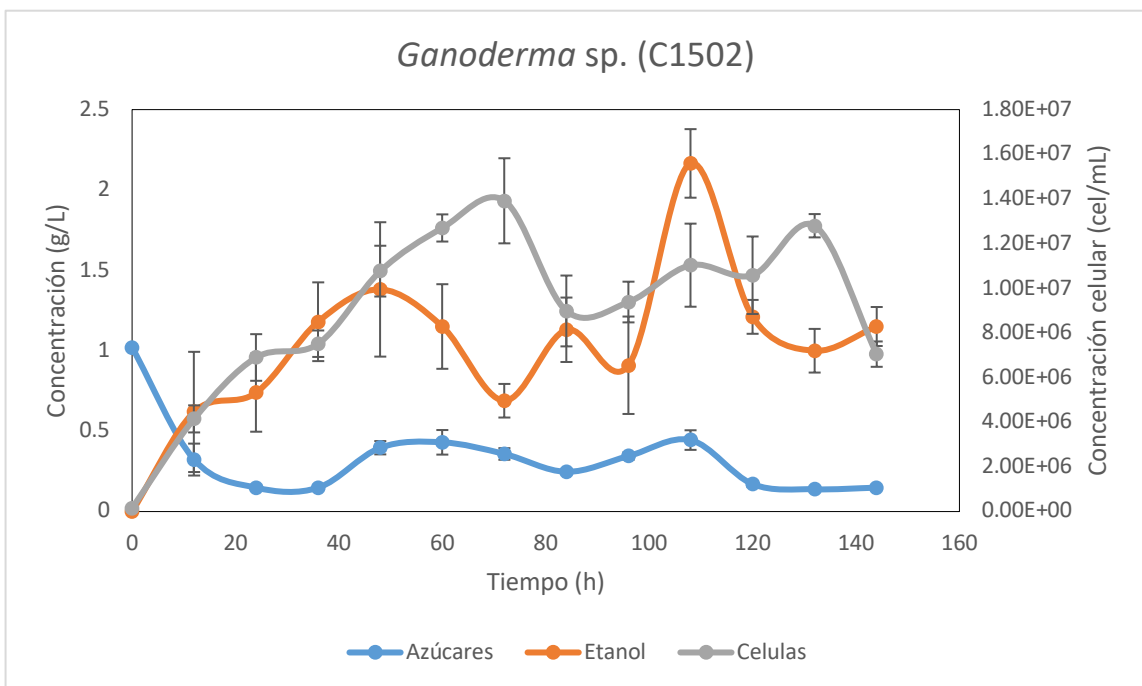


Figura 24. Fermentación de *M. oleifera* por *Ganoderma* sp. (C1502) y *S. cerevisiae* (ATCC 200062).

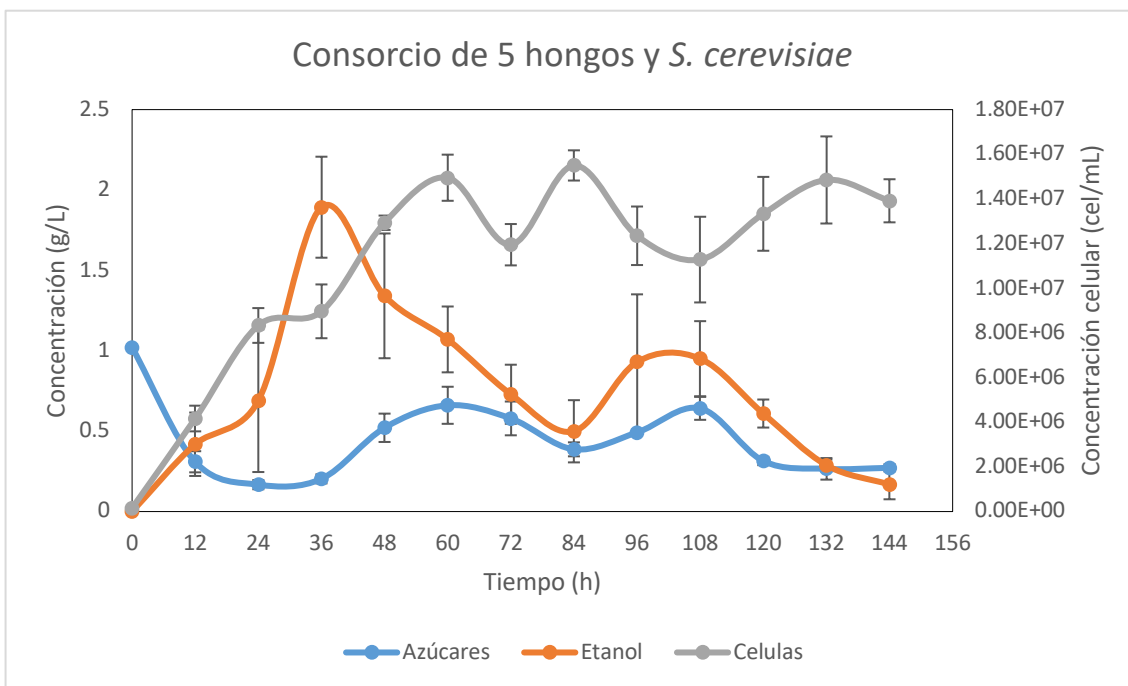


Figura 25. Fermentación de *M. oleifera* por *Aspergillus ochraceus* (C3a), *Aspergillus niger* (C3d), *Fusarium sp.* (C6a), *Fusarium oxysporum* (C7a), *Ganoderma sp.* (C1502) y *S. cerevisiae* (ATCC 200062).

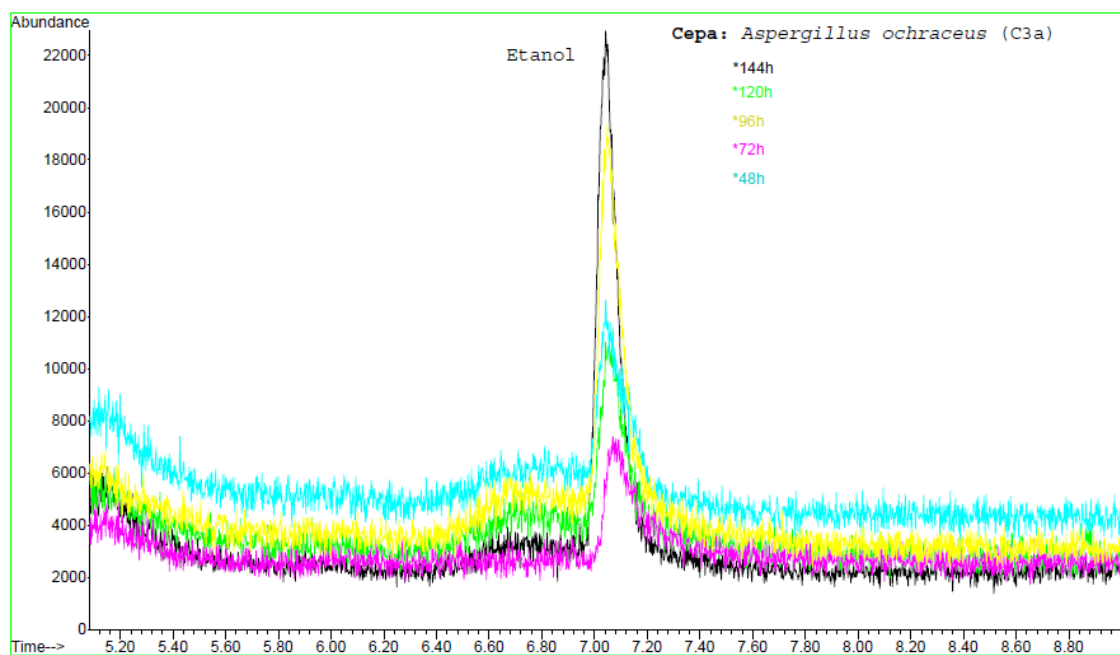
El consorcio de *Ganoderma* sp. (C1502) y *S. cerevisiae* (ATCC 200062) y el de *A. ochraceus* (C3a), *A. niger* (C3d), *Fusarium* sp. (C6a), *F. oxysporum*. (C7a), *Ganoderma* sp. (C1502) y *S. cerevisiae* (ATCC 200062), que obtuvieron rendimientos de 0.11 y 0.10 g etanol/g moringa respectivamente, pueden ser comparados con el resultado obtenido por Montaña-Morales (2014), que mediante un pretratamiento ácido sobre la moringa, seguido de una hidrólisis enzimática utilizando un kit comercial de celulasas y una fermentación con levadura, logró obtener el rendimiento de 0.113 g etanol/ g moringa. Lo más notable es que en los procedimientos utilizados en este trabajo no se utilizó un pretratamiento químico o fisicoquímico. Por lo tanto el uso de un pretratamiento puede resultar favorable para este proceso. Otra ventaja de la metodología empleada en este trabajo es que se utilizó un bioproceso consolidado (den Haan y col., 2015), por lo tanto esto permitió reducir el número de etapas a una, lo cual supone un ahorro de tiempo, energía y dinero en una escala mayor. Comparado el procedimiento con Montaña-Morales (2014), el cual es más costoso por utilizar tres etapas en el proceso (pretratamiento, hidrólisis y fermentación) y el hecho de usar enzimas comerciales. De ahí radica la importancia de utilizar cepas que permitan desarrollar un bioproceso consolidado y que además tienen una alta capacidad para ser utilizadas en diferentes sustratos.

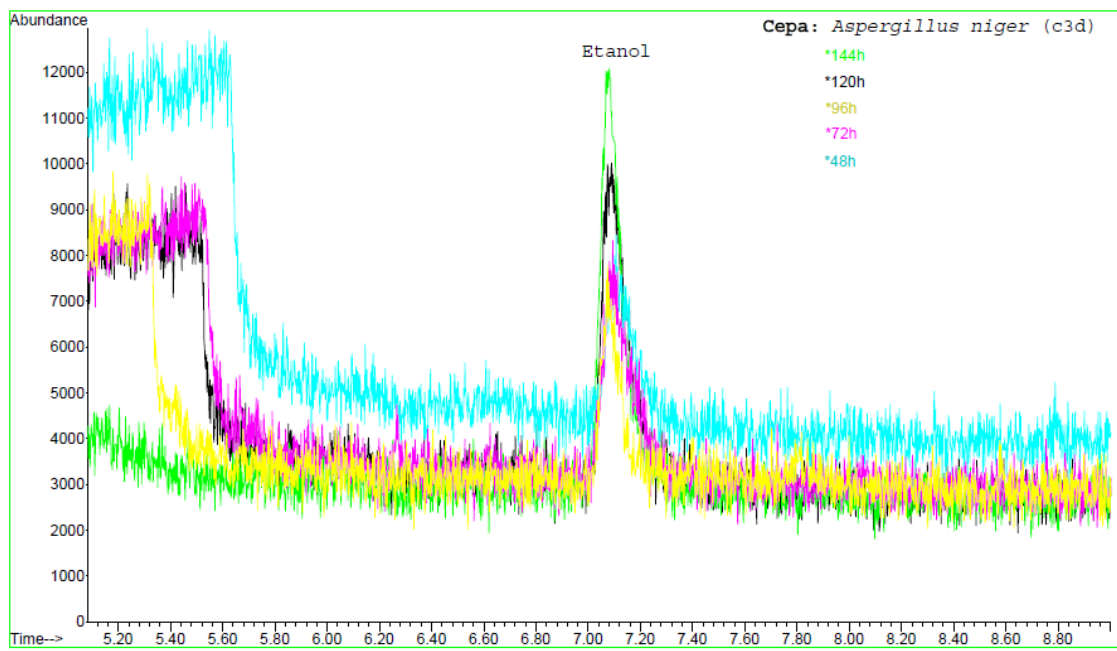
IX CONCLUSIONES

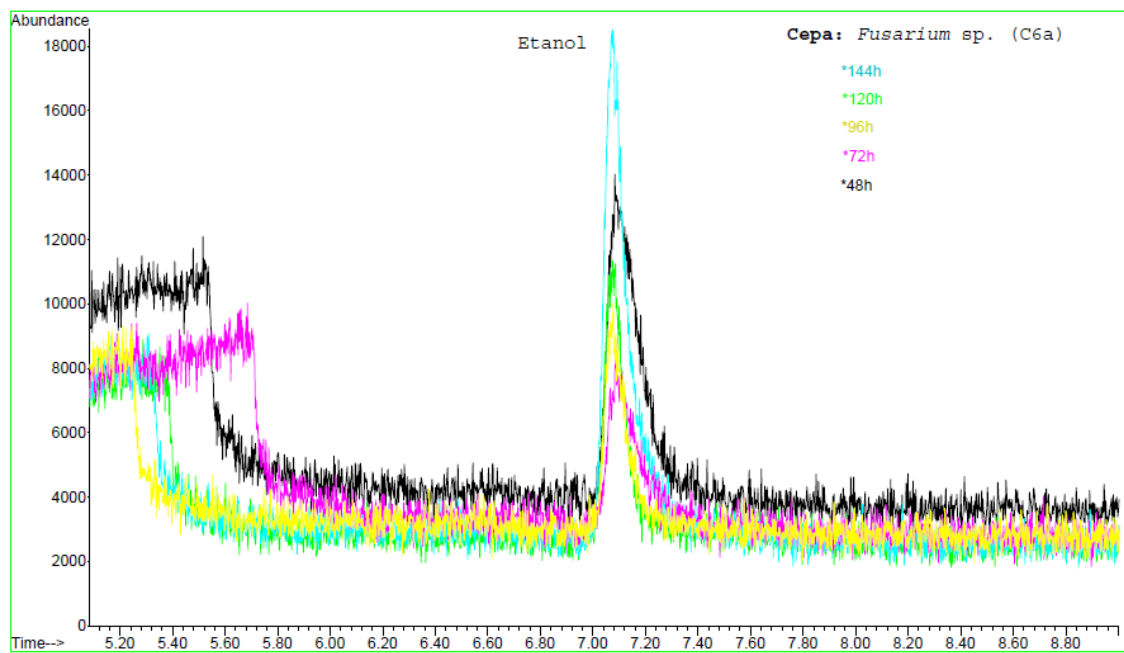
1. Se identificaron morfológicamente cinco cepas, *Aspergillus ochraceus* (C3a), *Aspergillus niger* (C3d), *Fusarium* sp. (C6a), *Fusarium oxysporum* (C7a) y *Ganoderma* sp. (C1502) que producen etanol de moringa en un bioproceso consolidado ya que pueden hidrolizar celulosa y hemicelulosa y fermentar hexosas y pentosas.
2. Producir etanol a partir de tallo de *Moringa oleifera* en un bioproceso consolidado requiere de un pretratamiento efectivo y amigable para el medio ambiente para llegar al teórico máximo debido al porcentaje de lignina que contiene es de 21.57%.
3. La cepa *Fusarium* sp. (C6a), fermenta glucosa con una eficiencia de fermentación de 73.13% mayor que las otras cepas evaluadas.
4. La cepa *Ganoderma* sp. (C1502) fermenta xilosa con una eficiencia de fermentación de 35.91% mayor que las otras cepas evaluadas.
5. El consorcio de *Ganoderma* sp. (C1502) y *S. cerevisiae* (ATCC 200062) tienen una eficiencia del 31.53% mayor a la de las otras cepas en consorcio de con *S. cerevisiae* (ATCC 200062).
6. *Aspergillus ochraceus* (C3a) presentó antagonismo hacia *S. cerevisiae* (ATCC 200062) durante la fermentación en moringa.
7. El consorcio de *Aspergillus ochraceus* (C3a), *Aspergillus niger* (C3d), *Fusarium* sp. (C6a), *Fusarium oxysporum* (C7a) y *Ganoderma* sp. (C1502) con *S. cerevisiae* (ATCC 200062) tienen una productividad de 1.35 g/L d, mejor que el resto de los consorcios evaluados.
8. *Ganoderma* sp. (C1502), produce etanol y lo utiliza como precursor para la síntesis de polímeros.
9. *Ganoderma* sp. (C1502), es productor de ácido oxálico, y posiblemente lo utilice para regular funciones en la despolimerización de lignocelulosa y producción de exopolímeros.

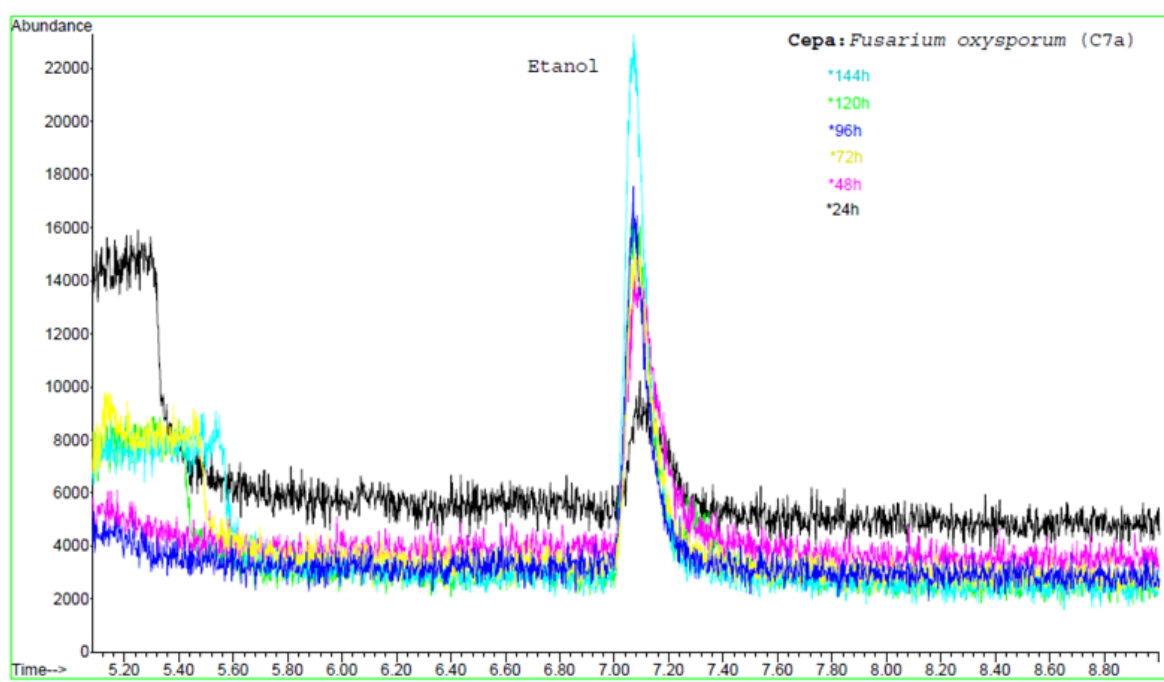
X ANEXOS

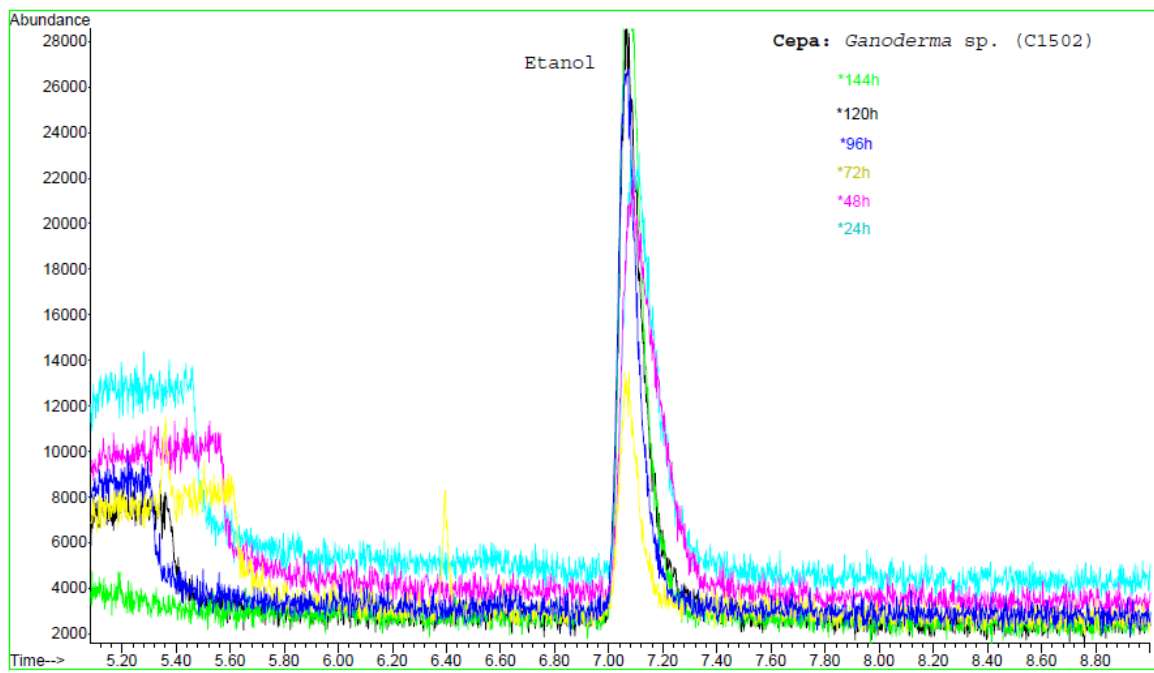
A ANEXO 1: CROMATOGRAMAS DE PRODUCCIÓN DE ETANOL EN MORINGA CON CEPAS FÚNGICAS











B ANEXO 2: PREPARACIÓN DE AGAR CZAPEK

CONCENTRADO CZAPEK	CANTIDAD
NaNO₃	30 g
KCl	5 g
MgSO₄.7H₂O	5 g
FeSO₄. TH₂O	0.1 g
ZnSO₄. TH₂O	0.1 g
CuSO₄. 5H²O	0.1 g
Agua destilada	100 ml

AGAR CZAPEK	CANTIDAD
K₂HPO₄	1 g
Concentrado Czapek	10 mL
Extracto de levadura	5 g
Sacarosa	30 g
Agar	15 g
Agua destilada	1L

XI BIBLIOGRAFIA

- Ado, S., Olukotun, G., Ameh, J., & Yabaya, A. (2009). Bioconversion of cassava starch to ethanol in a simultaneous saccharification and fermentation process by co-cultures of *Aspergillus niger* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Science World Journal*, 4(1).
- Alexander, A., Ajazuddin, Khan, J., Saraf, S., & Saraf, S. (2013). Poly(ethylene glycol)–poly(lactic-co-glycolic acid) based thermosensitive injectable hydrogels for biomedical applications. *Journal of Controlled Release*, 172(3), 715-729. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2013.10.006>
- Ali, M., Yusof, Y., Chin, N., Ibrahim, M., & Basra, S. (2014). Drying Kinetics and Colour Analysis of Moringa Oleifera Leaves. *Agriculture and Agricultural Science Procedia*, 2, 394-400.
- Álvarez Godoy, E., de Carvalho Rodrigues, J. C., Martins Alves, A. M., & Álvarez Lazo, D. (2007). Estudio del contenido y la calidad de la lignina mediante Pirólisis analítica en madera de *Pinus caribaea*. *Maderas. Ciencia y tecnología*, 9, 179-188.
- Amore, A., & Faraco, V. (2012). Potential of fungi as category I Consolidated BioProcessing organisms for cellulosic ethanol production. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 16(5), 3286-3301. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.rser.2012.02.050>
- Anasontzis, G. E., Kourtoglou, E., Villas-Boâs, S. G., Hatzinikolaou, D. G., & Christakopoulos, P. (2016). Metabolic Engineering of *Fusarium oxysporum* to Improve Its Ethanol-Producing Capability. *Frontiers in Microbiology*, 7, 632. doi: 10.3389/fmicb.2016.00632
- Anasontzis, G. E., Zerva, A., Stathopoulou, P. M., Haralampidis, K., Diallinas, G., Karagouni, A. D., & Hatzinikolaou, D. G. (2011). Homologous overexpression of xylanase in *Fusarium oxysporum* increases ethanol productivity during consolidated bioprocessing (CBP) of lignocellulosics. *Journal of Biotechnology*, 152(1–2), 16-23. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiotec.2011.01.002>
- Annamalai, N., Rajeswari, M. V., & Balasubramanian, T. (2014). Enzymatic saccharification of pretreated rice straw by cellulase produced from *Bacillus carboniphilus* CAS 3 utilizing lignocellulosic wastes through statistical optimization. *Biomass and Bioenergy*, 68, 151-160. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biombioe.2014.06.018>
- Antonio Revuelta, B. (2013). Evaluación del potencial enzimático de macromicetos lignícolas del centro del estado de Veracruz.
- Anwar, Z., Gulfranz, M., & Irshad, M. (2014). Agro-industrial lignocellulosic biomass a key to unlock the future bio-energy: A brief review. *Journal of Radiation Research and Applied Sciences*, 7(2), 163-173.
- Arenas, R. (2003). *Micología médica ilustrada*.
- Badiei, M., Asim, N., Jahim, J. M., & Sopian, K. (2014). Comparison of Chemical

- Pretreatment Methods for Cellulosic Biomass. *APCBEE Procedia*, 9, 170-174. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.apcbee.2014.01.030>
- Bai, F. W., Anderson, W. A., & Moo-Young, M. (2008). Ethanol fermentation technologies from sugar and starch feedstocks. *Biotechnology Advances*, 26(1), 89-105. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2007.09.002>
- Bajpai, P. (2013a). Chemistry, Types, and Sources of Ethanol *Advances in Bioethanol* (pp. 13-20): Springer India.
- Bajpai, P. (2013b). Introduction *Advances in Bioethanol* (pp. 1-12): Springer India.
- Bak, J. S. (2015). Downstream optimization of fungal-based simultaneous saccharification and fermentation relevant to lignocellulosic ethanol production. *SpringerPlus*, 4(1), 47.
- Balat, M. (2011). Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: A review. *Energy Conversion and Management*, 52(2), 858-875. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.enconman.2010.08.013>
- Baldrian, P. (2006). Fungal laccases – occurrence and properties. *FEMS Microbiology Reviews*, 30(2), 215-242. doi: 10.1111/j.1574-4976.2005.00010.x
- Banerjee, U., & Vohra, R. (1991). Production of laccase by *Curvularia* sp. *Folia microbiologica*, 36(4), 343-346.
- Barros-Rios, J., Romani, A., Garrote, G., & Ordas, B. (2015). Biomass, sugar, and bioethanol potential of sweet corn. *GCB Bioenergy*, 7(1), 153-160.
- Bayman, P., Baker, J. L., Doster, M. A., Michailides, T. J., & Mahoney, N. E. (2002). Ochratoxin production by the *Aspergillus ochraceus* group and *Aspergillus alliaceus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(5), 2326-2329.
- Behera, S., Mohanty, R. C., & Ray, R. C. (2011). Ethanol production from mahula (*Madhuca latifolia* L.) flowers with immobilized cells of *Saccharomyces cerevisiae* in *Luffa cylindrica* L. sponge discs. *Applied Energy*, 88(1), 212-215. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.apenergy.2010.07.035>
- Behera, S., & Ray, R. (2015). Batch ethanol production from cassava (*Manihot esculenta* Crantz.) flour using *Saccharomyces cerevisiae* cells immobilized in calcium alginate. *Annals of Microbiology*, 65(2), 779-783. doi: 10.1007/s13213-014-0918-8
- Behera, S., Singh, R., Arora, R., Sharma, N. K., Shukla, M., & Kumar, S. (2014). Scope of algae as third generation biofuels. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, 2.
- Blaich, R., & Esser, K. (1975). Function of enzymes in wood destroying fungi. *Archives of Microbiology*, 103(1), 271-277. doi: 10.1007/BF00436360
- Bovo, B., Carlot, M., Fontana, F., Lombardi, A., Soligo, S., Giacomini, A., & Corich, V. (2015). Outlining a selection procedure for *Saccharomyces cerevisiae* isolated from grape marc to improve fermentation process and distillate quality. *Food Microbiology*, 46, 573-581. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2014.10.001>
- Brethauer, S., & Studer, M. H. (2014). Consolidated bioprocessing of

- lignocellulose by a microbial consortium. *Energy & Environmental Science*, 7(4), 1446-1453.
- Brethauer, S., & Wyman, C. E. (2010). Review: Continuous hydrolysis and fermentation for cellulosic ethanol production. *Bioresource Technology*, 101(13), 4862-4874. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2009.11.009>
- Brown, W. H., Foote, C. S., Iverson, B. L., & Anslyn, E. (2011). *Organic Chemistry*: Cengage Learning.
- Buaban, B., Inoue, H., Yano, S., Tanapongpipat, S., Ruanglek, V., Champreda, V., Pichyangkura, R., Rengpipat, S., & Eurwilaichitr, L. (2010). Bioethanol production from ball milled bagasse using an on-site produced fungal enzyme cocktail and xylose-fermenting *Pichia stipitis*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 110(1), 18-25. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiosc.2009.12.003>
- Bueno, L., & Gallardo, R. (1998). Preservación de hongos filamentosos en agua destilada estéril. *Rev Iberoam Micol*, 15(3), 166-168.
- Cárdenas, V., Gómez, M., & Padilla, L. (2009). DEGRADACIÓN DE CELULOSA Y PRODUCCIÓN DE ETANOL A PARTIR DEL ASERRÍN DE GUADUA UTILIZANDO EL SISTEMA BIOLÓGICO (*Aspergillus niger*-*Saccharomyces cerevisiae*).
- Carriquiry, M. A., Du, X., & Timilsina, G. R. (2011). Second generation biofuels: Economics and policies. *Energy Policy*, 39(7), 4222-4234. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.enpol.2011.04.036>
- Cortínez, V., & Lienqueo, M. E. (2010). Comparación de pretratamientos en residuos forestales para la producción de bioetanol de segunda generación: hidrólisis ácida y líquidos iónicos. *EL DILEMA ENERGÉTICO CHILENO Y EL ROL DE LAS UNIVERSIDADES Cristian Cárdenas-Lailhacar*, 35.
- Costa, R. C., & Sodré, J. R. (2010). Hydrous ethanol vs. gasoline-ethanol blend: Engine performance and emissions. *Fuel*, 89(2), 287-293. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fuel.2009.06.017>
- Cotana, F., Cavalaglio, G., Gelosia, M., Nicolini, A., Coccia, V., & Petrozzi, A. (2014). Production of Bioethanol in a Second Generation Prototype from Pine Wood Chips. *Energy Procedia*, 45, 42-51. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.egypro.2014.01.006>
- Couto, S. R., & Toca-Herrera, J. L. (2007). Laccase production at reactor scale by filamentous fungi. *Biotechnology Advances*, 25(6), 558-569. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2007.07.002>
- Chandel, A. K., Singh, O. V., Narasu, M. L., & Rao, L. V. (2011). Bioconversion of *Saccharum spontaneum* (wild sugarcane) hemicellulosic hydrolysate into ethanol by mono and co-cultures of *Pichia stipitis* NCIM3498 and thermotolerant *Saccharomyces cerevisiae*-VS3. *New Biotechnology*, 28(6), 593-599. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.nbt.2010.12.002>
- Chander Kuhad, R., Mehta, G., Gupta, R., & Sharma, K. K. (2010). Fed batch enzymatic saccharification of newspaper cellulose improves the sugar

- content in the hydrolysates and eventually the ethanol fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. *Biomass and Bioenergy*, 34(8), 1189-1194. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biombioe.2010.03.009>
- Chaparro, D. F., Rosas, D. C., & Varela, A. (2009). Aislamiento y evaluación de la actividad enzimática de hongos descomponedores de madera (Quindío, Colombia). *Revista Iberoamericana de Micología*, 26(4), 238-243. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.riam.2009.03.005>
- Chen, B.-Y., Chen, S.-W., & Wang, H.-T. (2012). Use of different alkaline pretreatments and enzyme models to improve low-cost cellulosic biomass conversion. *Biomass and Bioenergy*, 39, 182-191. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biombioe.2012.01.012>
- Chiang, C., & Knight, S. G. (1961). L-arabinose metabolism by cell-free extracts of *Penicillium chrysogenum*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 46(2), 271-278. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/0006-3002\(61\)90750-8](http://dx.doi.org/10.1016/0006-3002(61)90750-8)
- Dantas, G. A., Legey, L. F. L., & Mazzone, A. (2013). Energy from sugarcane bagasse in Brazil: An assessment of the productivity and cost of different technological routes. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 21, 356-364. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.rser.2012.11.080>
- de Almeida, M. N., Guimarães, V. M., Falkoski, D. L., Visser, E. M., Siqueira, G. A., Milagres, A. M. F., & de Rezende, S. T. (2013). Direct ethanol production from glucose, xylose and sugarcane bagasse by the corn endophytic fungi *Fusarium verticillioides* and *Acremonium zeae*. *Journal of Biotechnology*, 168(1), 71-77. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiotec.2013.07.032>
- den Haan, R., van Rensburg, E., Rose, S. H., Görgens, J. F., & van Zyl, W. H. (2015). Progress and challenges in the engineering of non-cellulolytic microorganisms for consolidated bioprocessing. *Current Opinion in Biotechnology*, 33, 32-38. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.copbio.2014.10.003>
- Dionisi, D., Anderson, J. A., Aulenta, F., McCue, A., & Paton, G. (2015). The potential of microbial processes for lignocellulosic biomass conversion to ethanol: a review. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 90(3), 366-383. doi: 10.1002/jctb.4544
- Doan, Q. C., Moheimani, N. R., Mastrangelo, A. J., & Lewis, D. M. (2012). Microalgal biomass for bioethanol fermentation: Implications for hypersaline systems with an industrial focus. *Biomass and Bioenergy*, 46, 79-88. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biombioe.2012.08.022>
- Doherty, W. O. S., Mousavioun, P., & Fellows, C. M. (2011). Value-adding to cellulosic ethanol: Lignin polymers. *Industrial Crops and Products*, 33(2), 259-276. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2010.10.022>
- dos Reis, L., Fontana, R. C., da Silva Delabona, P., da Silva Lima, D. J., Camassola, M., da Cruz Pradella, J. G., & Dillon, A. J. P. (2013). Increased production of cellulases and xylanases by *Penicillium echinulatum* S1M29 in batch and fed-batch culture. *Bioresource Technology*, 146, 597-603. doi:

- <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2013.07.124>
- Du, R., Yan, J., Li, S., Zhang, L., Zhang, S., Li, J., Zhao, G., & Qi, P. (2015). Cellulosic ethanol production by natural bacterial consortia is enhanced by *Pseudoxanthomonas taiwanensis*. *Biotechnology for Biofuels*, 8(1), 10.
- Elisashvili, V., Kachlishvili, E., & Penninckx, M. (2008). Effect of growth substrate, method of fermentation, and nitrogen source on lignocellulose-degrading enzymes production by white-rot basidiomycetes. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 35(11), 1531-1538. doi: 10.1007/s10295-008-0454-2
- Escoto, L., Contreras, I., & Angulo, M. (2013). Cadena agroindustrial de *Jatropha curcas*: paquetes tecnológicos para el noroeste de México. *Editorial Publicia, Alemania*.
- FAO. (2004). *TERMINOLOGÍA UNIFICADA SOBRE BIOENERGÍA*. Roma, Italia: Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación Retrieved from <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/009/j6439s/j6439s00a.pdf>.
- FAO. (2008). *EL ESTADO MUNDIAL DE LA AGRICULTURA Y LA ALIMENTACIÓN; BIOCOMBUSTIBLES: perspectivas, riesgos y oportunidades* (O. D. L. N. U. P. L. A. Y. L. ALIMENTACIÓN Ed.). Roma, Italia.
- Fazenda, M. L., Harvey, L. M., & McNeil, B. (2010). Effects of dissolved oxygen on fungal morphology and process rheology during fed-batch processing of *Ganoderma lucidum*. *Journal of microbiology and biotechnology*, 20(4), 844-851.
- Fernandes, M. C., Ferro, M. D., Paulino, A. F. C., Mendes, J. A. S., Gravitis, J., Evtuguin, D. V., & Xavier, A. M. R. B. (2015). Enzymatic saccharification and bioethanol production from *Cynara cardunculus* pretreated by steam explosion. *Bioresource Technology*, 186, 309-315. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2015.03.037>
- Gherbawy, Y., & Voigt, K. (2010). *Molecular identification of fungi*: Springer.
- Gírio, F. M., Fonseca, C., Carneiro, F., Duarte, L. C., Marques, S., & Bogel-Łukasik, R. (2010). Hemicelluloses for fuel ethanol: A review. *Bioresource Technology*, 101(13), 4775-4800. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2010.01.088>
- Godino, M., Villegas, S., Izquierdo, M., Velásquez, J., & Vargas, R. (2013). Evaluación del uso energético de la *Moringa oleifera*. *Revista Agroforestería Neotropical*, 2(1).
- Gonçalves, F. A., Santos, E. S. d., & de Macedo, G. R. (2015). Alcoholic fermentation of *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia stipitis* and *Zymomonas mobilis* in the presence of inhibitory compounds and seawater. *Journal of Basic Microbiology*, 55(6), 695-708. doi: 10.1002/jobm.201400589
- Gong, C.-s., Maun, C. M., & Tsao, G. T. (1981). Direct fermentation of cellulose to ethanol by a cellulolytic filamentous fungus, *Monilia* sp. *Biotechnology Letters*, 3(2), 77-82. doi: 10.1007/bf00145114
- Gottlieb, A. M., Ferrer, E., & Wright, J. E. (2000). rDNA analyses as an aid to the

- taxonomy of species of Ganoderma. *Mycological Research*, 104(9), 1033-1045.
- Graves, T., Narendranath, N., Dawson, K., & Power, R. (2006). Effect of pH and lactic or acetic acid on ethanol productivity by *Saccharomyces cerevisiae* in corn mash. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 33(6), 469-474. doi: 10.1007/s10295-006-0091-6
- Harun, R., Danquah, M. K., & Forde, G. M. (2010). Microalgal biomass as a fermentation feedstock for bioethanol production. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 85(2), 199-203. doi: 10.1002/jctb.2287
- Hickert, L. R., Cruz, M. M., Dillon, A. J. P., Fontana, R. C., Rosa, C. A., & Ayub, M. A. Z. (2014). Fermentation kinetics of acid-enzymatic soybean hull hydrolysate in immobilized-cell bioreactors of *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida shehatae*, *Spathaspora arborariae*, and their co-cultivations. *Biochemical Engineering Journal*, 88, 61-67. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bej.2014.04.004>
- Horisawa, S., Ando, H., Ariga, O., & Sakuma, Y. (2015). Direct ethanol production from cellulosic materials by consolidated biological processing using the wood rot fungus *Schizophyllum commune*. *Bioresource Technology*, 197, 37-41. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2015.08.031>
- Hsu, C.-L., Chang, K.-S., Lai, M.-Z., Chang, T.-C., Chang, Y.-H., & Jang, H.-D. (2011). Pretreatment and hydrolysis of cellulosic agricultural wastes with a cellulase-producing *Streptomyces* for bioethanol production. *Biomass and Bioenergy*, 35(5), 1878-1884. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biombioe.2011.01.031>
- IDAE. (2007). Biomasa: Cultivos energeticos. In S. A. D. d. E. IDAE (Instituto para la Diversificación y Ahorro de la Energía); BESEL (Ed.). Madrid, España.
- IEA. (2007). Biofuel Production.
- Ingale, S., Joshi, S. J., & Gupte, A. (2014). Production of bioethanol using agricultural waste: banana pseudo stem. *Brazilian Journal of Microbiology*, 45(3), 885-892.
- Inokuma, K., Takano, M., & Hoshino, K. (2013). Direct ethanol production from N-acetylglucosamine and chitin substrates by *Mucor* species. *Biochemical Engineering Journal*, 72, 24-32. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bej.2012.12.009>
- Irmak, S., Kurtuluş, M., Hasanoğlu, A., & Erbatur, O. (2013). Gasification efficiencies of cellulose, hemicellulose and lignin fractions of biomass in aqueous media by using Pt on activated carbon catalyst. *Biomass and Bioenergy*, 49, 102-108. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biombioe.2012.12.016>
- Jagtap, S. S., Dhiman, S. S., Jeya, M., Kang, Y. C., Choi, J.-H., & Lee, J.-K. (2012). Saccharification of poplar biomass by using lignocellulases from *Pholiota adiposa*. *Bioresource Technology*, 120, 264-272. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2012.06.002>
- Jiménez, A. B., Freer, J., Hernández, J. B., Gutiérrez, J. R., & Bancalari, M. E.

- (2004). Relación entre edad del árbol y su composición química en *Pinus radiata* (D. Don) crecido en Chile y su importancia para la producción de bioetanol. *Revista Forestal Mesoamericana Kurú*, 1(1), 1-8.
- Jönsson, L. J., Alriksson, B., & Nilvebrant, N.-O. (2013). Bioconversion of lignocellulose: inhibitors and detoxification. *Biotechnol Biofuels*, 6(1), 16.
- Kamei, I., Hirota, Y., Mori, T., Hirai, H., Meguro, S., & Kondo, R. (2012). Direct ethanol production from cellulosic materials by the hypersaline-tolerant white-rot fungus *Phlebia* sp. MG-60. *Bioresource Technology*, 112, 137-142. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2012.02.109>
- Khan, M. S., Zaidi, A., & Wani, P. A. (2007). Role of phosphate-solubilizing microorganisms in sustainable agriculture—a review. *Agronomy for Sustainable Development*, 27(1), 29-43.
- Khider, T. O., & Elsaki, O. T. (2012). Heat value of four hardwood species from Sudan. *Journal of Forest Products & Industries*, 1, 5-9.
- Khuong, L. D., Kondo, R., De Leon, R., Kim Anh, T., Shimizu, K., & Kamei, I. (2014). Bioethanol production from alkaline-pretreated sugarcane bagasse by consolidated bioprocessing using *Phlebia* sp. MG-60. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 88, 62-68. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ibiod.2013.12.008>
- Kim, H. M., Paik, S., Ra, K. S., Koo, K. B., Yun, J. W., & Choi, J. W. (2006). Enhanced production of exopolysaccharides by fed-batch culture of *Ganoderma resinaceum* DG-6556. *JOURNAL OF MICROBIOLOGY-SEOUL*, 44(2), 233.
- King, B. C., Donnelly, M. K., Bergstrom, G. C., Walker, L. P., & Gibson, D. M. (2009). An optimized microplate assay system for quantitative evaluation of plant cell wall-degrading enzyme activity of fungal culture extracts. *Biotechnology and Bioengineering*, 102(4), 1033-1044. doi: 10.1002/bit.22151
- Klein-Marcuschamer, D., & Blanch, H. W. (2015). Renewable fuels from biomass: Technical hurdles and economic assessment of biological routes. *AIChE Journal*, 61(9), 2689-2701. doi: 10.1002/aic.14755
- Klinke, H. B., Thomsen, A. B., & Ahring, B. K. (2004). Inhibition of ethanol-producing yeast and bacteria by degradation products produced during pre-treatment of biomass. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 66(1), 10-26. doi: 10.1007/s00253-004-1642-2
- Kuyper, M., Winkler, A. A., van Dijken, J. P., & Pronk, J. T. (2004). Minimal metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for efficient anaerobic xylose fermentation: a proof of principle. *FEMS yeast research*, 4(6), 655-664. doi: 10.1016/j.femsyr.2004.01.003
- Lee, J.-W., Rodrigues, R. C. L. B., Kim, H. J., Choi, I.-G., & Jeffries, T. W. (2010). The roles of xylan and lignin in oxalic acid pretreated corncob during separate enzymatic hydrolysis and ethanol fermentation. *Bioresource Technology*, 101(12), 4379-4385. doi: <http://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.12.112>

- Lee, K.-M., Jeya, M., Joo, A.-R., Singh, R., Kim, I.-W., & Lee, J.-K. (2010). Purification and characterization of a thermostable endo- β -1,4-glucanase from a novel strain of *Penicillium purpurogenum*. *Enzyme and Microbial Technology*, 46(3–4), 206-211. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.enzmictec.2009.11.002>
- Lee, S.-Y., & Kang, T.-S. (1996). Production Conditions and Characterization of the Exo-biopolymer Produced by Submerged Cultivation of *Ganoderma lucijum* Mycelium. *Microbiology and Biotechnology Letters*, 24(1), 111-118.
- Lehninger, A. L., & Cox, M. M. (2006). *Principios de bioquímica*: Omega.
- Lennartsson, P. R., Erlandsson, P., & Taherzadeh, M. J. (2014). Integration of the first and second generation bioethanol processes and the importance of by-products. *Bioresource Technology*, 165, 3-8.
- Leslie, J. F., Summerell, B. A., & Bullock, S. (2006). *The Fusarium laboratory manual* (Vol. 2): Wiley Online Library.
- Li, C., Yang, Z., He Can Zhang, R., Zhang, D., Chen, S., & Ma, L. (2013). Effect of pH on cellulase production and morphology of *Trichoderma reesei* and the application in cellulosic material hydrolysis. *Journal of Biotechnology*, 168(4), 470-477. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiotec.2013.10.003>
- Li, J., Lin, J., Zhou, P., Wu, K., Liu, H., Xiong, C., Gong, Y., Xiao, W., & Liu, Z. (2014). One-pot simultaneous saccharification and fermentation: A preliminary study of a novel configuration for cellulosic ethanol production. *Bioresource Technology*, 161, 171-178. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2014.02.130>
- Li, J., Zhou, P., Liu, H., Wu, K., Kang, X., Gong, Y., Xiao, W., Lin, J., & Liu, Z. (2014). A comparison of fermentation strategies for cellulosic ethanol production from NaOH-soaked sugarcane bagasse at high solid loading with decreased cellulase loading. *Industrial Crops and Products*, 62, 446-452. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.09.007>
- Limayem, A., & Ricke, S. C. (2012). Lignocellulosic biomass for bioethanol production: Current perspectives, potential issues and future prospects. *Progress in Energy and Combustion Science*, 38(4), 449-467. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pecs.2012.03.002>
- Maehara, T., Ichinose, H., Furukawa, T., Ogasawara, W., Takabatake, K., & Kaneko, S. (2013). Ethanol production from high cellulose concentration by the basidiomycete fungus *Flammulina velutipes*. *Fungal Biology*, 117(3), 220-226. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.funbio.2013.02.002>
- Malherbe, S., & Cloete, T. E. (2002). Lignocellulose biodegradation: Fundamentals and applications. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*, 1(2), 105-114. doi: 10.1023/A:1020858910646
- Maron, S. H., & Prutton, C. F. (1998). *Fundamentos de fisicoquímica*: Limusa.
- Masum, B. M., Masjuki, H. H., Kalam, M. A., Rizwanul Fattah, I. M., Palash, S. M., & Abedin, M. J. (2013). Effect of ethanol–gasoline blend on NOx emission in SI engine. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 24, 209-222. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.rser.2013.03.046>

- Menon, V., & Rao, M. (2012). Trends in bioconversion of lignocellulose: Biofuels, platform chemicals & biorefinery concept. *Progress in Energy and Combustion Science*, 38(4), 522-550. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pecs.2012.02.002>
- Miller, G. L. (1959). Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Analytical Chemistry*, 31(3), 426-428. doi: 10.1021/ac60147a030
- Montaño-Morales, H. F. (2014). *Producción de bioetanol a partir de material lignocelulósico de moringa oleifera*. Universidad Nacional de Colombia.
- Müller, N., Tessini, C., Segura, C., Grandón, H., & Berg, A. (2013). PIRÓLISIS RÁPIDA DE BIOMASA.
- Nava-García, F. J., & Doldán-García, X. R. (2014). Cultivos energéticos. *Agricultura, sociedad y desarrollo*, 11(1), 25-34.
- Ndaba, B., Chiyanzu, I., Marx, S., & Obiero, G. (2014). Effect of *Saccharomyces cerevisiae* and *Zymomonas mobilis* on the co-fermentation of sweet sorghum bagasse hydrolysates pretreated under varying conditions. *Biomass and Bioenergy*, 71, 350-356. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biombioe.2014.09.022>
- Ng, I. S., Li, C.-W., Chan, S.-P., Chir, J.-L., Chen, P. T., Tong, C.-G., Yu, S.-M., & Ho, T.-H. D. (2010). High-level production of a thermoacidophilic β -glucosidase from *Penicillium citrinum* YS40-5 by solid-state fermentation with rice bran. *Bioresource Technology*, 101(4), 1310-1317. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2009.08.049>
- Okamoto, K., Imashiro, K., Akizawa, Y., Onimura, A., Yoneda, M., Nitta, Y., Maekawa, N., & Yanase, H. (2010). Production of ethanol by the white-rot basidiomycetes *Peniophora cinerea* and *Trametes suaveolens*. *Biotechnology Letters*, 32(7), 909-913. doi: 10.1007/s10529-010-0243-7
- Okamoto, K., Nitta, Y., Maekawa, N., & Yanase, H. (2011). Direct ethanol production from starch, wheat bran and rice straw by the white rot fungus *Trametes hirsuta*. *Enzyme and Microbial Technology*, 48(3), 273-277. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.enzmictec.2010.12.001>
- Okamoto, K., Uchii, A., Kanawaku, R., & Yanase, H. (2014). Bioconversion of xylose, hexoses and biomass to ethanol by a new isolate of the white rot basidiomycete *Trametes versicolor*. *SpringerPlus*, 3(1), 121.
- Olson, M. E., & Fahey, J. W. (2011). *Moringa oleifera*: un árbol multiusos para las zonas tropicales secas. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 82, 1071-1082.
- Orea-Igarza, U., Cordero-Machado, E., Pérez Díaz, N., & Gómez Marín, R. (2006). Composición química de la corteza de tres especies de eucaliptos, a tres alturas del fuste comercial. Parte 2 *Eucalyptus pellita* F. Muell. *Revista Forestal Venezolana*, 50(1), 53-58.
- Osińska-Jaroszuk, M., Wlizio, K., Szałapata, K., & Jarosz-Wilkotazka, A. (2014). Correlation between the production of exopolysaccharides and oxalic acid secretion by *Ganoderma applanatum* and *Tyromyces palustris*. *World*

- Journal of Microbiology & Biotechnology*, 30(12), 3065-3074. doi: 10.1007/s11274-014-1733-x
- Panagiotou, G., Christakopoulos, P., & Olsson, L. (2005). The influence of different cultivation conditions on the metabolome of *Fusarium oxysporum*. *Journal of Biotechnology*, 118(3), 304-315. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiotec.2005.05.004>
- Panagiotou, G., Christakopoulos, P., Villas-Boas, S. G., & Olsson, L. (2005). Fermentation performance and intracellular metabolite profiling of *Fusarium oxysporum* cultivated on a glucose–xylose mixture. *Enzyme and Microbial Technology*, 36(1), 100-106. doi: <http://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2004.07.009>
- Panagiotou, G., Topakas, E., Moukouli, M., Christakopoulos, P., & Olsson, L. (2011). Studying the ability of *Fusarium oxysporum* and recombinant *Saccharomyces cerevisiae* to efficiently cooperate in decomposition and ethanolic fermentation of wheat straw. *Biomass and Bioenergy*, 35(8), 3727-3732. doi: <http://doi.org/10.1016/j.biombioe.2011.05.005>
- Pang, Z.-w., Liang, J.-j., & Huang, R.-b. (2011). Fermentation of xylose into ethanol by a new fungus strain *Pestalotiopsis* sp. XE-1. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 38(8), 927-933. doi: 10.1007/s10295-010-0862-y
- Paschos, T., Xiros, C., & Christakopoulos, P. (2015). Ethanol effect on metabolic activity of the ethalogenic fungus *Fusarium oxysporum*. *BMC Biotechnology*, 15(1), 1-12. doi: 10.1186/s12896-015-0130-3
- Patel, M. A., Ou, M. S., Ingram, L. O., & Shanmugam, K. T. (2005). Simultaneous Saccharification and Co-Fermentation of Crystalline Cellulose and Sugar Cane Bagasse Hemicellulose Hydrolysate to Lactate by a Thermotolerant Acidophilic *Bacillus* sp. *Biotechnology Progress*, 21(5), 1453-1460. doi: 10.1021/bp0400339
- Paterson, R. R. M. (2007). Ganoderma disease of oil palm—A white rot perspective necessary for integrated control. *Crop Protection*, 26(9), 1369-1376. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cropro.2006.11.009>
- Pérez-Sariñana, B. Y., Saldaña-Trinidad, S., SEL, F., PJ, S., & D, E. (2014). Bioethanol Production from Coffee Mucilage. *Energy Procedia*, 57, 950-956.
- Pérez, A., Sánchez, T., Armengol, N., & Reyes, F. (2010). Características y potencialidades de *Moringa oleifera*, Lamark: Una alternativa para la alimentación animal. *Pastos y Forrajes*, 33, 1-1.
- Perlack, R. D., Wright, L. L., Turhollow, A. F., Graham, R. L., Stokes, B. J., & Erbach, D. C. (2005). Biomass as feedstock for a bioenergy and bioproducts industry: the technical feasibility of a billion-ton annual supply: DTIC Document.
- Phalip, V., Goubet, F., Carapito, R., & Jeltsch, J.-M. (2009). Plant cell wall degradation with a powerful *Fusarium graminearum* enzymatic arsenal. *J Microbiol Biotechnol*, 19(6), 573-581.

- Piontelli, L. (2008). Aportes morfotaxonómicos en el género *Aspergillus* Link: claves para las especies ambientales y clínicas más comunes. *Bol. micol*, 23, 49-66.
- Pointing, S. B. (1999). Qualitative methods for the determination of lignocellulolytic enzyme production by tropical fungi. *Fungal Diversity*.
- Rehman, M. S. U., Kim, I., Chisti, Y., & Han, J.-I. (2013). Use of ultrasound in the production of bioethanol from lignocellulosic biomass. *EEST Part A: Energy Sci Res*, 30(2), 1391-1410.
- REN21. (2015). *Renewables 2015 global status report*: REN21.
- REN21. (2016). *Renewables 2016 global status report*: REN21.
- Rodriguez, A., Falcon, M., Carnicero, A., Perestelo, F., la Fuente, G. D., & Trojanowski, J. (1996). Laccase activities of *Penicillium chrysogenum* in relation to lignin degradation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 45(3), 399-403.
- Ruiz, E., Romero, I., Moya, M., Sánchez, S., Bravo, V., & Castro, E. (2007). Sugar fermentation by *Fusarium oxysporum* to produce ethanol. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 23(2), 259-267. doi: 10.1007/s11274-006-9222-5
- Saha, P., Baishnab, A., Alam, F., Khan, M., & Islam, A. (2014). Production of Bio-fuel (Bio-ethanol) from Biomass (*Pteris*) by Fermentation Process with Yeast. *Procedia Engineering*, 90, 504-509.
- Salehi Jouzani, G., & Taherzadeh, M. J. (2015). Advances in consolidated bioprocessing systems for bioethanol and butanol production from biomass: a comprehensive review. *Biofuel Research Journal*, 2(1), 152-195.
- Santis Espinosa, F. L., Y Pérez-Sariñana, B., Saldaña-Trinidad, S., D., E., & P.J., S. (2014). Evaluation of Agro-industrial Wastes to Produce Bioethanol: Case Study-Mango (*Mangifera Indica* L.). *Energy Procedia*, 57, 860-866.
- SENER. (2006). Potencialidades y Viabilidad del uso de Bioetanol y Biodiesel para el Transporte en México.
- SENER. (2013a). Analisis y propuesta para la introducción de etanol anhidrido en las gasolinas que comercializa Pemex.
- SENER. (2013b). Balance de Energía Nacional.
- Sharifia, M., Karimi, K., & Taherzadeh, M. J. (2008). Production of ethanol by filamentous and yeast-like forms of *Mucor indicus* from fructose, glucose, sucrose, and molasses. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 35(11), 1253-1259. doi: 10.1007/s10295-008-0422-x
- Shimada, M., Akamtsu, Y., Tokimatsu, T., Mii, K., & Hattori, T. (1997). Possible biochemical roles of oxalic acid as a low molecular weight compound involved in brown-rot and white-rot wood decays. *Journal of Biotechnology*, 53(2-3), 103-113. doi: [http://doi.org/10.1016/S0168-1656\(97\)01679-9](http://doi.org/10.1016/S0168-1656(97)01679-9)
- Sifontes, M. C., & Domine, M. E. (2013). Lignina, estructura y aplicaciones: Métodos de despolimerización para la obtención de derivados aromáticos de interés industrial. *Avances en Ciencias e Ingeniería*, 4(4), 15-46.

- Silva, C. L. P. A. C., Vargas, T. S., & Baptista, D. F. (2013). Molluscicidal activity of *Moringa oleifera* on *Biomphalaria glabrata*: integrated dynamics to the control of the snail host of *Schistosoma mansoni*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 23(5), 848-850.
- Sims, R. E. H., Mabee, W., Saddler, J. N., & Taylor, M. (2010). An overview of second generation biofuel technologies. *Bioresource Technology*, 101(6), 1570-1580. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2009.11.046>
- Singhania, R. R., Saini, J. K., Saini, R., Adsul, M., Mathur, A., Gupta, R., & Tuli, D. K. (2014). Bioethanol production from wheat straw via enzymatic route employing *Penicillium janthinellum* cellulases. *Bioresource Technology*, 169, 490-495. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2014.07.011>
- Skory, C. D., Freer, S. N., & Bothast, R. J. (1997). Screening for ethanol-producing filamentous fungi. *Biotechnology Letters*, 19(3), 203-206. doi: 10.1023/a:1018337003433
- Srimachai, T., Thonglimp, V., & Sompong, O. (2014). Ethanol and Methane Production from Oil Palm Frond by Two Stage SSF. *Energy Procedia*, 52, 352-361.
- Stevenson, D. M., & Weimer, P. J. (2002). Isolation and characterization of a *Trichoderma* strain capable of fermenting cellulose to ethanol. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 59(6), 721-726. doi: 10.1007/s00253-002-1027-3
- Suárez-Medellín, J., Luna-Rodríguez, M., Mendoza, G., Salinas, A., Suárez Quiroz, M. L., & Trigos, Á. (2012). Caracterización morfológica y molecular de una cepa silvestre mexicana perteneciente al género *Ganoderma*. *Revista mexicana de micología*, 36, 33-40.
- Suárez Arango, C., & Nieto, I. J. (2013). Cultivo biotecnológico de macrohongos comestibles: una alternativa en la obtención de nutraceuticos. *Revista Iberoamericana de Micología*, 30(1), 1-8. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.riam.2012.03.011>
- Sukumaran, R. K., Singhania, R. R., Mathew, G. M., & Pandey, A. (2009). Cellulase production using biomass feed stock and its application in lignocellulose saccharification for bio-ethanol production. *Renewable Energy*, 34(2), 421-424. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.renene.2008.05.008>
- Suryaningsih, R. (2014). Bioenergy Plants in Indonesia: Sorghum for Producing Bioethanol as an Alternative Energy Substitute of Fossil Fuels. *Energy Procedia*, 47, 211-216.
- Susanto, A., Sudharto, P. S., & Purba, R. Y. (2005). Enhancing biological control of basal stem rot disease (*Ganoderma boninense*) in oil palm plantations. *Mycopathologia*, 159(1), 153-157. doi: 10.1007/s11046-004-4438-0
- Takao, S. (1965). Organic Acid Production by Basidiomycetes: I. Screening of Acid-Producing Strains. *Applied Microbiology*, 13(5), 732-737.
- Thirumalai Vasan, P., Sobana Piriya, P., Immanuel Gilwax Prabhu, D., & John Vennison, S. (2011). Cellulosic ethanol production by *Zymomonas mobilis*

- harboring an endoglucanase gene from *Enterobacter cloacae*. *Bioresource Technology*, 102(3), 2585-2589. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2010.09.110>
- Tomás-Pejó, E., Oliva, J. M., Ballesteros, M., & Olsson, L. (2008). Comparison of SHF and SSF processes from steam-exploded wheat straw for ethanol production by xylose-fermenting and robust glucose-fermenting *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Biotechnology and bioengineering*, 100(6), 1122-1131.
- Tomás, A. F., Karagöz, P., Karakashev, D., & Angelidaki, I. (2013). Extreme thermophilic ethanol production from rapeseed straw: Using the newly isolated *Thermoanaerobacter pentosaceus* and combining it with *Saccharomyces cerevisiae* in a two-step process. *Biotechnology and bioengineering*, 110(6), 1574-1582.
- Torres-Jimenez, E., Jerman, M. S., Gregorc, A., Lisec, I., Dorado, M. P., & Kegl, B. (2011). Physical and chemical properties of ethanol–diesel fuel blends. *Fuel*, 90(2), 795-802. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fuel.2010.09.045>
- Tuomela, M., Vikman, M., Hatakka, A., & Itävaara, M. (2000). Biodegradation of lignin in a compost environment: a review. *Bioresource Technology*, 72(2), 169-183. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0960-8524\(99\)00104-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0960-8524(99)00104-2)
- US DOE. (2005). from <https://public.ornl.gov/site/gallery/detail.cfm?id=181&topic=53&citation=&general=&restsection=>
- Vega, A. S., Valdés, L. F., & Rendón, A. C. (2012). Caracterización de una cepa nativa de *Aspergillus niger* y evaluación de la producción de ácido cítrico. *Revista Universidad EAFIT*, 38(128), 33-42.
- Woolverton, C. J. (2008). Prescott, Harley and Klein's Microbiology 7th edition ed: New York: The McGraw-Hill Companies.
- World Energy Council. (2010). 2010 Survey of Energy Resources. Londres, Reino Unido.
- Xiao, Z., Storms, R., & Tsang, A. (2004). Microplate-based filter paper assay to measure total cellulase activity. *Biotechnology and bioengineering*, 88(7), 832-837. doi: 10.1002/bit.20286
- Xu, J., Wang, X., Hu, L., Xia, J., Wu, Z., Xu, N., Dai, B., & Wu, B. (2015). A novel ionic liquid-tolerant *Fusarium oxysporum* BN secreting ionic liquid-stable cellulase: Consolidated bioprocessing of pretreated lignocellulose containing residual ionic liquid. *Bioresource Technology*, 181, 18-25. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2014.12.080>
- Xu, Q., Singh, A., & Himmel, M. E. (2009). Perspectives and new directions for the production of bioethanol using consolidated bioprocessing of lignocellulose. *Current Opinion in Biotechnology*, 20(3), 364-371. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.copbio.2009.05.006>
- Zerva, A., Savvides, A. L., Katsifas, E. A., Karagouni, A. D., & Hatzinikolaou, D. G. (2014). Evaluation of *Paecilomyces variotii* potential in bioethanol

- production from lignocellulose through consolidated bioprocessing. *Bioresource Technology*, 162, 294-299. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2014.03.137>
- Zhang, L., Chen, Q., Jin, Y., Xue, H., Guan, J., Wang, Z., & Zhao, H. (2010). Energy-saving direct ethanol production from viscosity reduction mash of sweet potato at very high gravity (VHG). *Fuel Processing Technology*, 91(12), 1845-1850. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fuproc.2010.08.009>
- Zhang, P., Chen, C., Shen, Y., Ding, T., Ma, D., Hua, Z., & Sun, D. (2013). Starch saccharification and fermentation of uncooked sweet potato roots for fuel ethanol production. *Bioresource Technology*, 128, 835-838. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2012.10.166>
- Zhang, Z., Menges, B., Timmons, R., Knoll, W., & Förch, R. (2003). Surface plasmon resonance studies of protein binding on plasma polymerized di (ethylene glycol) monovinyl ether films. *Langmuir*, 19(11), 4765-4770.
- Zhu, X., Gibbons, J., Garcia-Rivera, J., Casadevall, A., & Williamson, P. R. (2001). Laccase of *Cryptococcus neoformans* is a cell wall-associated virulence factor. *Infection and immunity*, 69(9), 5589-5596.
- Zoglowek, M., Hansen, G. H., Lübeck, P. S., & Lübeck, M. (2016). Fungal consortia for conversion of lignocellulose into bioproducts. *Mycology: Current and Future Developments: Fungal Biotechnology for Biofuel Production*, 1, 329.
- Zumaqué, L. O., Mantilla, C. L., & Pantoja, M. M. (2009). *Levaduras autóctonas con capacidad fermentativa en la producción de etanol a partir de pulpa de excedentes de plátano Musa (AAB Simmonds) en el departamento de Córdoba, Colombia*: Universidad Nacional de Colombia.