



Tomado de: <https://pixabay.com/es/de-fondo-biomasa-de-cultivos-corte-70997/>

Evaluación de levaduras nativas productoras de etanol presentes en el bagazo de caña de azúcar

Evaluation of producing ethanol native yeasts present in sugar cane bagasse

Adrián González-Leos

José Alfredo Del Angel-Del Angel

José Luis González-Castillo

Nadia Rodríguez-Durán

Guadalupe Bustos-Vázquez*

Universidad Autónoma de Tamaulipas, Unidad Académica Multidisciplinaria Mante, Blvd. Enrique Cárdenas González núm. 1201, col. Jardín, Ciudad Mante, Tamaulipas, México, C.P. 89840.

*Autor para correspondencia:

gbustos@uat.edu.mx

Fecha de recepción:

13 de enero de 2016

Fecha de aceptación:

17 de octubre de 2016

RESUMEN

La hidrólisis química o enzimática del bagazo de caña de azúcar permite la obtención de azúcares fermentables, utilizados en la producción biotecnológica de etanol, mediante el empleo de levaduras comerciales o autóctonas obtenidas de diferentes materiales lignocelulósicos. El objetivo de este trabajo fue valorar la capacidad de producción de etanol de cepas de levaduras nativas, aisladas en medio YPD e hidrolizado de bagazo de caña de azúcar, concentrado hasta un 75 %. Utilizando como variables de estudio el tipo de cepa y el tiempo de proceso, se realizó un análisis multifactorial (ANOVA) para su evaluación.

Los resultados obtenidos con la cepa seleccionada UAT-3, fueron para $Y_{P/S}$ de 0.441 7 g/g y Q_P de 0.076 7 g/L-h a las 120 h. Las condiciones de proceso utilizadas en el presente estudio permitieron aislar y seleccionar cepas nativas de *Saccharomyces cerevisiae*, con características adecuadas para ser utilizadas en procesos biotecnológicos industriales de producción de etanol, utilizando como sustrato residuos o subproductos derivados de la industria azucarera como el bagazo de caña de azúcar.

PALABRAS CLAVE: levaduras nativas, etanol, bagazo de caña de azúcar, hidrolizado hemicelulósico.

ABSTRACT

The chemical or enzymatic hydrolysis of sugar cane bagasse, allows the obtaining of fermentable sugars used in the biotechnological production of ethanol by using commercial or native yeasts obtained from different lignocellulosic materials. The purpose of this study was to assess the production capacity of ethanol from a native yeast strain isolated in YPD and hydrolyzed sugar cane bagasse concentrated up to 75 %. Using as study variables the type of strain and processing time, a multivariate analysis (ANOVA) was performed for its evaluation. The results achieved with the selected strain UAT-3, were 0.441 \pm 7 g/g for $Y_{P/S}$ and 0.076 \pm 7 g/L·h to 120 h for Q_P . The process conditions used in the present study allowed to isolate and select native strains of *Saccharomyces cerevisiae*, with characteristics suitable to be used in industrial biotechnological processes of ethanol production, using as substrate residues or by-products derived from the sugar industry such as bagasse of sugar.

KEYWORDS: native yeasts, ethanol, sugar cane bagasse, hemicelulosic hydrolyzate.

INTRODUCCIÓN

El desarrollo económico demanda un elevado consumo de los diferentes recursos energéticos, por lo que se pronostica un aumento en su costo y su probable escasez en el mediano plazo. Un problema adicional es que los combustibles fósiles han sido asociados con los problemas de contaminación actuales (Carreón-Rodríguez y col., 2009; Saha y col., 2014). Ante esto, se hace necesario encontrar soluciones a la demanda de combustible con reducido impacto ambiental, por ejemplo, energía mareomotriz, hidroeléctrica, geotérmica, solar, eólica y biocombustibles, como el bioetanol obtenido a partir de materiales celulósicos (Suleiman, 2010; Saha y col., 2014).

Existe gran interés en aprovechar los materiales lignocelulósicos que se descartan en los procesos agrícolas y forestales, para transformarlos, a través de hidrólisis química o enzi-

mática, en azúcares fermentables que puedan ser convertidos por diversos microorganismos en metabolitos de interés comercial (Field y col., 2015). La hidrólisis química o enzimática del material lignocelulósico proveniente de residuos de cosecha, como bagazos, sobrantes forestales, pajas o cascarillas, permite su conversión en etanol, que se utiliza como combustible, pero también puede aprovecharse en la obtención de diversos productos químicos (Aguiar-Rivera, 2007; 2011; 2013). El bagazo de caña de azúcar (*Saccharum officinarum*) es un material lignocelulósico ampliamente utilizado para la producción de etanol en diferentes países, como Cuba, Brasil y Estados Unidos, entre otros, sin afectar la producción de alimentos (Fernández y col., 2009).

El etanol fue empleado inicialmente solo para la producción de bebidas alcohólicas, vinagres y conservas, pero actualmente es aplicado a la industria de fármacos, perfumes y cosméticos; en la fabricación de colorantes, materiales explosivos, seda artificial y materiales plásticos (Brooks, 2008). Sin embargo, debido a que el etanol es una fuente neta de energía, fácilmente almacenable, con alto contenido de oxígeno (35 %) y combustión limpia, se le considera de gran aplicación potencial como combustible (Agüero-Rodríguez y col., 2015), siendo utilizado como alternativa para la oxigenación y aumento de octanaje de la gasolina o como aditivo de la misma y como insumo para la producción de biodiésel (Carreón-Rodríguez y col., 2009).

La producción de etanol empleando diferentes levaduras y utilizando bagazo de caña de azúcar como sustrato, se considera una excelente opción industrial por la amplia disponibilidad de esta materia prima. Las levaduras más ampliamente utilizadas desde hace siglos, pertenecen al género *Saccharomyces* sp., por su capacidad de convertir rápidamente los azúcares a etanol, además de presentar una amplia aceptación en los procesos industriales (Ingram y Buttke, 1985). Se han realizado investigaciones para obtener microorganismos ca-

paces de producir etanol eficientemente, a partir de diferentes hexosas y pentosas provenientes de la hidrólisis química o enzimática de los materiales lignocelulósicos (Huerta-Beristain y col., 2008; Chandel y col., 2011).

En el proceso de producción artesanal de etanol, a partir de caña de azúcar, participan microorganismos nativos de la caña, entre los que destacan levaduras de *Saccharomyces* sp., *Torula* sp. y *Pichia* sp. Sin embargo, en el proceso industrial de obtención de etanol, particularmente para fines carburantes, no es deseable tener la permanencia de linajes diferentes a *Saccharomyces* sp., debido a los requerimientos de alto rendimiento necesarios para alcanzar la rentabilidad económica (Pataro y col., 2000; Schwan y col., 2001). En estos procesos se utilizan inóculos de cepas puras de *Saccharomyces cerevisiae*, para sustituir las levaduras nativas de la caña y tener un mejor control de la fermentación (Carreón-Rodríguez y col., 2009). Es por ello, que regularmente se aíslan levaduras de diversas fuentes naturales, para evaluar su capacidad fermentativa, tolerancia al alcohol y la presión osmótica, habilidad para usar la maltosa o el almidón como sustrato (Yeon-Ju y col., 2011). Los bagazos de caña de azúcar, melazas, mostos para pulques, mezcales, tequilas y otras destilerías pueden ser empleadas como fuentes para la búsqueda, selección y evaluación de cepas de interés en la producción biotecnológica de etanol (Lappe-Oliveras y col., 2008). La actividad killer, que es la capacidad de liberar toxinas que matan a otros microorganismos presente en el medio, es una característica deseable para algunos autores, ya que da una ventaja durante la producción de etanol (Magliani y col., 1997; Marquina y col., 2002; Nally y col., 2005).

Ceccato-Antonini y col. (2004) y Ortiz-Zamora y col. (2009), evaluaron la resistencia de diferentes levaduras a altas concentraciones de sustratos y productos. Actualmente se estudian algunas bacterias, como *Zymomonas mobilis* sp., debido a que son capaces de trans-

formar la glucosa en etanol, con rendimientos del 5 % al 10 %, los cuales son más altos que los rendimientos obtenidos por la mayoría de las levaduras (García, 1998; Mielenz, 2001), aunque presentan algunas desventajas, como su baja tolerancia al alcohol y su tamaño pequeño, lo cual hace difícil su separación, al momento de recuperar el etanol (Ingram y Buttke, 1985). También existe la posibilidad de buscar nuevos microorganismos productores de etanol en ambientes extremos (Oliart-Ros y col., 2016).

El objetivo del presente estudio fue determinar la capacidad de producción de etanol de diferentes cepas de levadura nativas aisladas en medio YPD e hidrolizado de bagazo de caña concentrado hasta un 75 %.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materia prima

El bagazo de caña de azúcar fue proporcionado por el Ingenio Aarón Sáenz Garza de Ciudad Mante, Tamaulipas, México, el cual fue sometido a un proceso de secado, molienda y tamizado; posteriormente, fue almacenado en recipientes cerrados para evitar fluctuaciones de humedad.

Análisis del bagazo

Una alícuota de bagazo de caña fue sometida a secado en estufa (FELISA Mod. FE-291, Jalisco, México) a 105 °C, para determinar la humedad, y en mufla (Thermo Lyne 600, Modelo F6018, EUA) durante 2 ciclos de 3 h cada uno, a 550 °C para calcular el % de cenizas. La muestra seca se sometió a una hidrólisis ácida cuantitativa en dos etapas de tratamiento ácido para calcular su composición química. La primera etapa se realizó con ácido sulfúrico al 72 % a 30 °C por 1 h; la segunda etapa consistió en diluir el medio hasta alcanzar 3 % de concentración de ácido sulfúrico y se calentó a 121 °C por 1 h. El residuo sólido después de la hidrólisis fue considerado como lignina de Klason. Se analizaron el jarabe obtenido en la hidrólisis y el concentrado. Se realizó un análisis cromatográfico (Cromatógrafo marca Waters Mod. 2695, Milford, EUA), para cuanti-

ficar azúcares simples, filtrando las muestras con una membrana de $0.45\mu\text{m}$ y usando un flujo de $0.5\text{ mL}/\text{min}^{-1}$, columna ion-exclusión $50\mu\text{m}$ a $7\mu\text{m}$, $7.8\text{ mm} \times 300\text{ mm}$, $37\text{ }^\circ\text{C}$, detector de IR (índice de refracción) a $40\text{ }^\circ\text{C}$, fase móvil H_2SO_4 al 0.01 N para conocer la concentración de azúcares (glucosa, xilosa, arabinosa y ácido acético). Posteriormente, se hizo un análisis espectrofotométrico para medir la concentración de inhibidores como el furfural y 5-hidroximetilfurfural, usando un espectrofotómetro UV-Vis (Perkin Elmer Mod. Lambda 35 Shelton, EUA), midiendo la absorbancia en longitudes de onda de 230 nm y 260 nm para su cuantificación.

Obtención de hidrolizados

El bagazo de caña fue tratado con ácido sulfúrico al 2% a $122\text{ }^\circ\text{C}$, y un tiempo de reacción de 60 min , en una relación $1:8$, siguiendo el procedimiento descrito por Aguilar y col. (2002). El hidrolizado hemicelulósico obtenido fue separado del material fibroso por filtración y concentrado al vacío a $50\text{ }^\circ\text{C}$, con un rotoevaporador (Rotary evaporator Mod. H5-2001NS, Nae-dong, Korea del Sur), para aumentar la concentración de azúcares fermentables, principalmente la glucosa. El hidrolizado se redujo hasta un 75% de su volumen inicial, ajustando el pH inicial de 0.76 hasta 5.3 con la adición de CaCO_3 .

Selección y mantenimiento de células

Se aislaron 15 cepas de levadura nativas, productoras de etanol, presentes en bagazo de caña de azúcar y se realizaron fermentaciones, como principal prueba fisiológica utilizada en la identificación de levaduras productoras de etanol, de acuerdo a Orberá (2004). Las cepas seleccionadas (UAT-3, UAT-5, UAT-6, UAT-7, UAT-8, UAT-9, UAT-10, UAT-11, UAT-20, UAT-23 y UAT-24), por su capacidad productora de etanol, fueron mantenidas en glicerol (crioprotector) a una temperatura de $-18\text{ }^\circ\text{C}$.

Las cepas se reactivaron utilizando la técnica de estrías en tubo inclinado, en medio nutritivo sintético YPD (glucosa 20 g/L , peptona

20 g/L y extracto de levadura 10 g/L , agar 20 g/L). Después de las 48 h de incubación, se etiquetaron y conservaron en refrigeración ($4\text{ }^\circ\text{C} \pm 1$). La productividad de las cepas se evaluó usando un medio de cultivo YPD que contenía 20 g/L de glucosa, 20 g/L de peptona y 10 g/L de extracto de levadura, en matraces de 250 mL estériles, con un volumen total de 120 mL de medio, incubados a $29\text{ }^\circ\text{C} \pm 1$, a una velocidad de agitación de 100 revoluciones por minuto (rpm) por 48 h . Se tomaron muestras cada 12 h , determinando en cada una: 1) Biomasa producida, determinada por peso seco celular; 2) Recuento directo de células totales utilizando una cámara de Neubaue-er en microscopio óptico (Modelo Revelation III, marca LW Scientific, Lawrenceville, Georgia, EUA); 3) Consumo de sustrato, por determinación de grados Brix; 4) Consumo de sustrato (glucosa) y formación de productos (etanol y ácido acético), por Cromatografía Líquida de Alta eficacia (CLAE), usando una Columna de Intercambio iónico ION-300 (Fase móvil con H_2SO_4 al 0.01M ; flujo de $0.4\text{ mL}/\text{min}^{-1}$; IR y detección UV).

Evaluación de la cepa nativa seleccionada en medios con hidrolizado

La cepa de levadura seleccionada como la mejor productora de etanol (UAT-3), se evaluó en medios formulados con concentrado del hidrolizado de bagazo de caña de azúcar, conteniendo 65.42 g/L de xilosa, 20.40 g/L de glucosa y 7.83 g/L de arabinosa. El contenido de compuestos inhibidores en el medio fue de 3.47 g/L de ácido acético, 1.71 g/L de furfural y 1.24 g/L de 5-hidroximetilfurfural. Se comparó la producción de esta levadura en un medio de cultivo YPD que contenía 20 g/L de glucosa, 20 g/L de peptona y 10 g/L de extracto de levadura. Se realizó una cinética de producción durante 216 h . Se tomó muestra cada 24 h y se realizaron análisis de consumo de sustrato, formación de productos y biomasa producida; determinando la productividad volumétrica (Q_P) ($\text{g}/\text{L}\cdot\text{h}$), rendimiento en producto ($Y_{P/S}$) (g/g), y rendimiento en biomasa ($Y_{X/S}$) (g/g).

Análisis estadístico

Los resultados fueron analizados utilizando los programas de Microsoft Excel 2007 y Statgraphics, versión 5.1. Para conocer el efecto de la composición del medio en los rendimientos de Y_P/S , Q_P , Y_X/S y del tiempo de la cinética de fermentación para cada una de las cepas, se realizó un ANOVA multifactorial con un nivel de confiabilidad del 95 %, evaluando los parámetros de rendimiento durante la fermentación.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La caracterización química permitió establecer que el bagazo de caña de azúcar contenía 8.94 ± 0.07 % de humedad y 3.03 ± 0.1 % de cenizas. Pandey y col. (2000), mencionaron que el bajo contenido de cenizas del bagazo de caña le permite ser un mejor sustrato durante la fermentación, comparado con otros residuos lignocelulósicos como la paja de arroz o trigo.

La composición estructural del bagazo, obtenida mediante una hidrólisis ácida cuantitativa, para establecer el contenido de glucano, xilano, arabano y lignina, se muestra en la Tabla 1. Los valores obtenidos son cercanos a los valores teóricos reportados en la literatura por diferentes autores para caña de azúcar (Pandey y col., 2000; Ferrer y col., 2002; Bousarsar y col., 2009; Zumalacárregui-De-Cárdenas y col., 2015).

La hidrólisis ácida permite degradar el bagazo, obteniendo glucosa, que puede ser utilizada en procesos de fermentación etanólica con alto rendimiento (Guarnizo-Franco y col., 2009). En hidrolizados lignocelulósicos, la concentración de azúcares depende de las condiciones de hidrólisis utilizadas (Larsson y col., 1999; Palmqvist y Hahn-Hägerdal, 2000a). En este sentido, Chandler y col. (2012), mencionaron que se pueden obtener altas concentraciones de azúcares si se realiza hidrólisis en dos etapas, aplicando inicialmente temperaturas entre 100 °C y 140 °C, seguido de un calentamiento entre 160 °C a 180 °C. Sin embargo, si en la primera etapa se utilizan rangos de 140 °C a 160 °C cambia el comportamiento, disminuyendo la cantidad de azúcares producidos. En el presente estudio, se obtuvo un alto contenido de carbohidratos con las condiciones de hidrólisis química empleadas, lo que puede ser aprovechado para transformar el bagazo de caña de azúcar en un medio fermentable, que puede ser convertido por fermentación microbiana en productos con alto valor agregado, como el etanol (Chandler y col., 2012).

La concentración del hidrolizado utilizada en este trabajo permitió incrementar el contenido de los azúcares fermentables: xilosa, glucosa y arabinosa (Tabla 2). Sin embargo, se con-

■ **Tabla 1. Composición química del bagazo de caña de azúcar.**

Table 1. Chemical composition of sugar cane bagasse.

Componentes	% Materia seca*
Glucano	42.94 ± 0.41
Xilano	23.54 ± 0.22
Arabano	1.98 ± 0.11
Lignina	24.97 ± 0.61
Otros componentes	9.194 ± 0.91

*Valor promedio de tres análisis y su desviación estándar.

■ **Tabla 2. Concentración de los componentes del hidrolizado de bagazo de caña de azúcar.**
Table 2. Concentration of components of hydrolyzate sugar cane bagasse.

Componentes		Hidrolizado*	
		Sin concentrar	Concentrado
Azúcares (g/L)	Xilosa	24.79 ± 0.12	65.42 ± 0.38
	Glucosa	6.65 ± 0.40	20.40 ± 0.66
	Arabinosa	2.50 ± 0.03	7.83 ± 0.48
Compuestos inhibidores (g/L)	Ácido acético	3.47 ± 0.04	10.21 ± 0.09
	Furfural	1.71 ± 0.01	4.88 ± 0.26
	Hidroximetilfurfural	1.24 ± 0.09	2.27 ± 0.20

*Valor promedio de tres análisis y su desviación estándar.

centraron también el ácido acético, el furfural y el hidroximetilfurfural, compuestos derivados del furano y que pueden actuar como inhibidores en el proceso de fermentación, afectando el crecimiento de las levaduras y el rendimiento en la producción de etanol (Oliva, 2003). En la Tabla 2 se observa que el ácido acético alcanzó valores de 10.21 g/L, concentración muy superior a los 3 g/L que ha sido reportada como suficiente para afectar el proceso de fermentación (Felipe y col., 1995). Zyl y col. (1991), utilizaron *Pichia stipitis* para producir etanol a partir de hidrolizado hemicelulósico de bagazo de caña, y descubrieron que el grado de inhibición causado por el ácido acético no sólo dependía de su concentración, sino también de la concentración de oxígeno y pH del medio.

El furfural e hidroximetilfurfural alcanzaron concentraciones de 4.88 g/L y 2.27 g/L respectivamente. Estos compuestos fenólicos de bajo peso molecular son tóxicos y afectan el crecimiento celular (Purwadi y col., 2004). Se ha reportado que concentraciones de 0.25 g/L a 0.5 g/L de furfural no afectaron el crecimiento de *S. stipitis*; aunque concentraciones más

altas (1.5 g/L a 2 g/L) afectaron el crecimiento de la levadura y disminuyeron el rendimiento de etanol y la productividad (Nigam, 2001). Palmqvist y Hahn-Hägerdal (2000b), demostraron que el efecto inhibitorio de hidroximetilfurfural es similar al de furfural, causando de igual forma un retraso tardío en el crecimiento celular, sin embargo se considera menos tóxico al hidroximetilfurfural.

Por otra parte, es posible reducir el efecto que pudiera causar la presencia de compuestos inhibidores en el hidrolizado, aplicando un método de detoxificación que permita reducir su concentración a niveles más bajos de los requeridos para afectar el metabolismo de los microorganismos fermentadores de interés (Yong-Jin y col., 2011; Field y col., 2015).

Selección de la cepa nativa mayor productora de etanol

La capacidad productora de etanol de las levaduras varía entre géneros, especies e incluso entre cepas dentro de una misma especie. *S. cerevisiae* es la levadura más utilizada para la obtención de etanol, sin embargo, se ha reportado que las diferentes cepas varían en su ren-

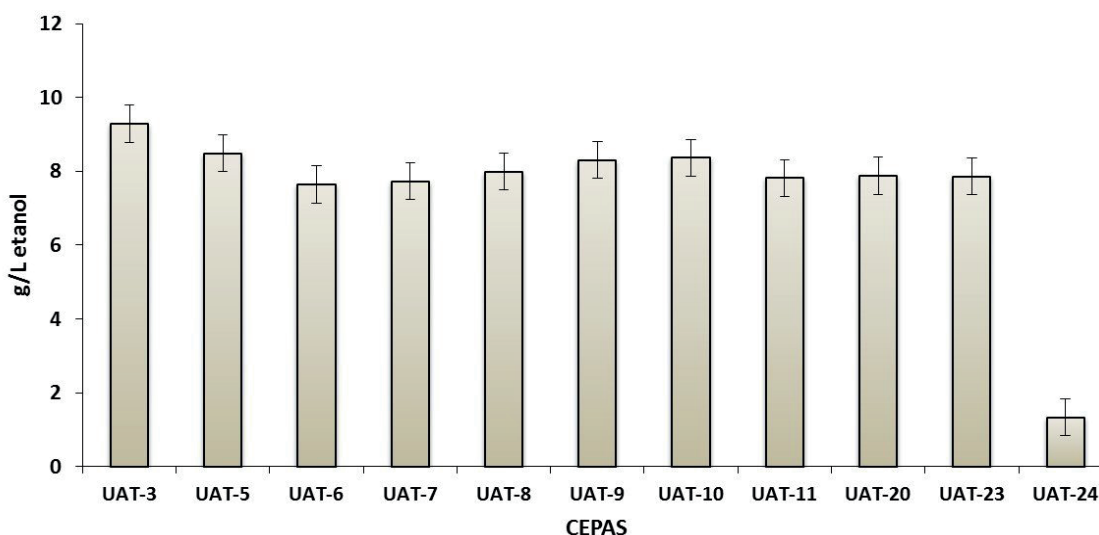
dimiento de etanol, dependiendo de las condiciones de proceso (Tuite y Oliver, 1991; Carballo, 2000). Entre los criterios de selección de las cepas destacan, su capacidad fermentativa, medida como producción de etanol, la tolerancia a la acidez, el consumo de azúcares y la buena productividad volumétrica de etanol. La capacidad fermentativa se ve influenciada por diferentes factores, como la temperatura, la concentración de azúcares, el pH, y algunas otras variables que influyen en el crecimiento de los microorganismos (Caridi, 2003).

En este estudio, las cepas de levadura nativas, aisladas previamente, fueron evaluadas en su capacidad productiva de etanol usando medio comercial YPD (Figura 1), determinando el rendimiento en producto ($Y_{P/S}$), el rendimiento de biomasa ($Y_{X/S}$) y la productividad volumétrica (Q_P) (Tabla 3). Las principales cepas productoras identificadas fueron UAT-3, UAT-5, UAT-9 y UAT-10 con 9.28 g/L, 8.4 g/L, 8.31 g/L y 8.37 g/L de etanol respectivamente (Figura 1). La cepa nativa UAT-3 fue seleccionada como la mejor productora de etanol, por presentar el valor más alto de rendimiento ($Y_{P/S}$) con 0.504 6 g/g, muy cercano al rendimiento teórico (0.51 g/g); y la mayor productividad vo-

lométrica (Q_P) de 0.386 g/L·h (Tabla 3). Los resultados de esta cepa fueron mayores a los obtenidos en fermentaciones en fedbatch de hidrolizados enzimáticos no deslignificados de bagazos realizados por Albuquerque-Wanderley y col. (2013), lo que indica que es una cepa con buena capacidad de producción de etanol. Gómez-Ruiz y col. (2007), aislaron cepas de levaduras *S. cerevisiae* de la región productora de mezcal, reportando resultados de $Y_{P/S}$ de 0.068 0 g/g, biomasa (cel/mL) de $1.37E + 08$ y una Q_P de 0.136 5 g/L·h, valores inferiores a los presentados por la cepa UAT-3 de este estudio.

La cepa UAT-24 tuvo la menor productividad de etanol (1.34 g/L) (Figura 1) y los menores valores de rendimiento y productividad volumétrica (Tabla 3), pero presentó la mayor producción de biomasa (Tabla 3). Estos resultados indicaron que esta levadura destinó el consumo de azúcares al crecimiento celular, teniendo baja eficiencia fermentativa.

Las cepas productoras de etanol pueden ser aisladas de fuentes diversas a las exploradas en el presente estudio. Oviedo-Zumaqué y col. (2009), utilizaron excedentes de plátano para



■ Figura 1. Producción de etanol de cada cepa nativa en medios YPD.
Figure 1. Production of ethanol in each native strain in YPD media.

■ Tabla 3. Parámetros cinéticos y estequiométricos de producción de etanol en medios YPD utilizando levaduras nativas.

Table 3. Kinetic and stoichiometric parameters of ethanol production in YPD media using native yeasts.

CEPA	Y _{P/S} (g/g)*	Y _{X/S} (g/g)*	Q _P (g/L·h)*
UAT-3	0.505 ± 0.002	0.125 ± 0.005	0.387 ± 0.019
UAT-5	0.499 ± 0.052	0.022 ± 0.026	0.324 ± 0.076
UAT-6	0.429 ± 0.020	0.137 ± 0.055	0.336 ± 0.018
UAT-7	0.399 ± 0.020	0.214 ± 0.053	0.340 ± 0.028
UAT-8	0.455 ± 0.020	0.029 ± 0.004	0.363 ± 0.008
UAT-9	0.048 ± 0.016	0.130 ± 0.008	0.372 ± 0.003
UAT-10	0.451 ± 0.002	0.096 ± 0.013	0.369 ± 0.004
UAT-11	0.435 ± 0.023	0.060 ± 0.013	0.351 ± 0.031
UAT-20	0.432 ± 0.000	0.038 ± 0.007	0.348 ± 0.004
UAT-23	0.443 ± 0.005	0.051 ± 0.023	0.350 ± 0.003
UAT-24	0.165 ± 0.046	0.644 ± 0.640	0.015 ± 0.014

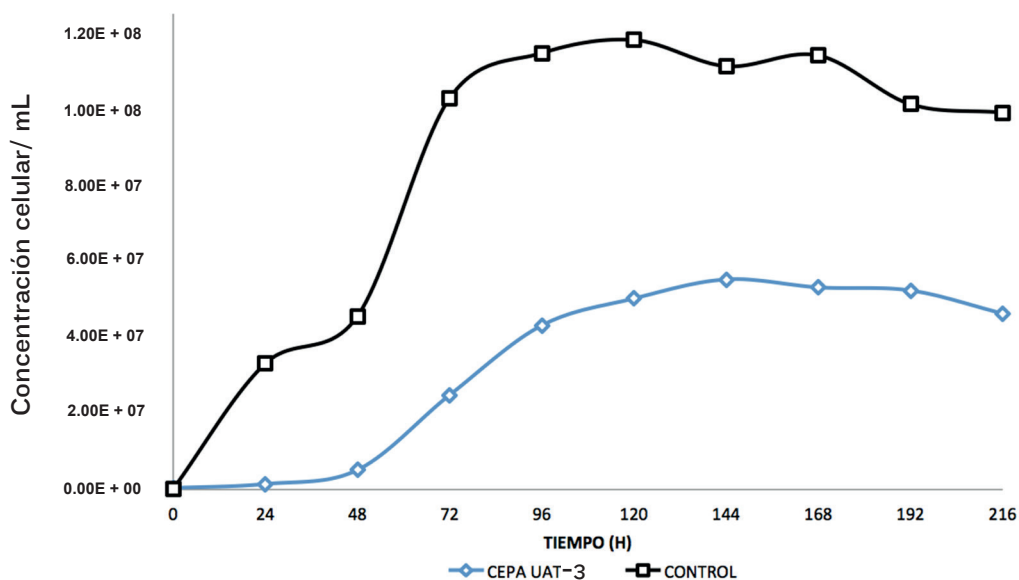
*Valor promedio de tres análisis y su desviación estándar.

Y_{P/S}, rendimiento g de etanol por g de glucosa; Y_{X/S}, rendimiento de biomasa; Q_P, productividad volumétrica.

darle un valor agregado a los residuos poscosecha, logrando una evaluación de cepas nativas con potencial en la producción de etanol. Joshi y col. (2005) y Mohanty y col. (2006), alcanzaron altas concentraciones usando células de *S. cerevisiae* en pulpa de piña, durazno y marañón, adicionando sales minerales. Por otra parte, se puede mejorar la productividad de las levaduras mediante su inmovilización, proceso que permite un mayor aprovechamiento del sustrato. Matiz y col. (2002), ensayaron con diferentes cepas nativas inmovilizadas a partir de *Z. mobilis* sp. utilizando el medio de fermentación sintético modificado en condiciones de microaerofilia, obteniendo mejores resultados que al utilizar células libres.

Cinética de fermentación utilizando la cepa seleccionada en hidrolizado de bagazo de caña de azúcar

En la Figura 2 se observa la cinética de crecimiento celular de la cepa nativa seleccionada UAT-3, tanto en el medio de cultivo YPD caldo (control), como en hidrolizado de caña de azúcar concentrado, enriquecido con 10 g/L de extracto de levadura y 20 g/L de Peptona, para determinar la producción de etanol y su capacidad de adaptación al medio con diversos inhibidores presentes en el hidrolizado, realizando una cinética de fermentación de 216 h y tomando muestra cada 24 h. El medio control presentó una concentración inicial de 20 g/L de glucosa. En tanto que la concentración ini-



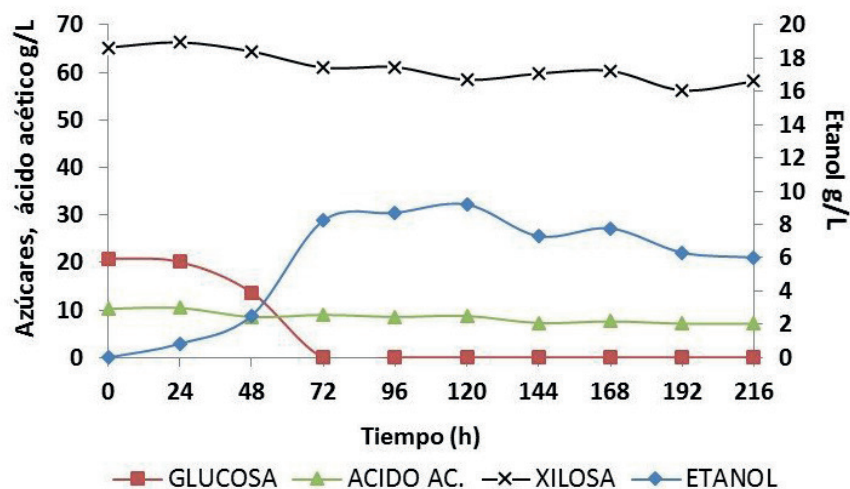
■ Figura 2. Cinética de crecimiento de la cepa nativa UAT-3, en hidrolizado de bagazo de caña de azúcar y su control (Medio YPD).
Figure 2. Cell concentration of the native strain UAT-3, in hydrolyzate sugar cane bagasse and control (YPD media).

cial de glucosa en el hidrolizado de bagazo de caña de azúcar fue de 20.40 g/L.

El crecimiento celular de la cepa nativa UAT-3 en el medio control fue mayor y alcanzó una concentración celular superior a $1.10E + 08$ a las 96 horas (Figura 2), en tanto que su crecimiento mostró una fuerte inhibición en el hidrolizado de bagazo de caña de azúcar durante las primeras 48 horas, provocado por una lenta adaptación al medio, lo que causó que se presentase una fase exponencial prolongada, obteniéndose una concentración celular máxima de $4.50E + 07$ a las 144 horas, debido a la presencia de sustancias inhibitoras liberadas tras el tratamiento ácido que se realizó en el bagazo de caña de azúcar. Aunque el crecimiento celular de la cepa UAT-3 fue afectado negativamente, Ortiz-Zamora y col. (2009), obtuvieron valores muy por de bajo de los obtenidos en este ensayo, en un tiempo de fermentación de 144 h, con cepas de levadura aisladas de fuentes naturales (melaza de caña de azúcar, jugo de uva, miel de caña, jugo de caña y piña), que fueron inhibidas por la concentración de azúcares en el medio. La inhibición de sustrato se hace muy significativa en rangos de 5 % p/v a

25 % p/v de azúcar, con una inhibición completa del crecimiento de 25 % p/v a 40 % p/v de glucosa, dependiendo de la cepa (Jones y col., 1981; Attfield y Ketsas, 2000; Malacrino y col., 2005).

En la Figura 3 se muestra la cinética de producción de etanol y consumo de azúcares de la cepa nativa UAT-3, en medio obtenido a partir del hidrolizado de caña. El incremento en la producción de etanol estuvo directamente asociado con la disminución en el contenido de glucosa, alcanzándose el valor máximo de producción etanólica y el agotamiento del carbohidrato a las 72 horas. Aunque existen cepas de levaduras capaces de producir etanol hemicelulósico, al metabolizar la xilosa, además de glucosa (Antunes y col., 2014), la cepa seleccionada, no fue capaz de hidrolizar la D-xilosa presente en el medio, ni la L-arabinosa (datos no mostrados), ambos denominados azúcares residuales. Algunos investigadores han demostrado que los suplementos de urea pueden aumentar la producción de etanol, ya que la urea es un componente esencial en el crecimiento de la levadura (Lopes y Sola-Penna, 2001; Choi y col., 2009).



■ Figura 3. Cinética de producción de etanol y consumo de sustrato por la cepa nativa UAT-3 en hidrolizado de bagazo de caña de azúcar.

Figure 3. Kinetics of ethanol production and substrate consumption by the native strain UAT-3 in hydrolyzate sugar cane bagasse.

En la Tabla 4 se muestran los parámetros cinéticos de etanol obtenidos por la cepa nativa UAT-3, utilizando el hidrolizado de bagazo de caña de azúcar. A los 120 días se alcanzó el valor más alto de rendimiento de etanol ($Y_{P/S}$), que fue de 0.442 g de etanol/g de glucosa, que representa el 86 % del máximo rendimiento teórico (0.511 g/g); así como el máximo valor de productividad (Q_p), siendo de 0.077 (g/L·h). Los valores de productividad obtenidos por la cepa UAT-3 fueron superiores a los publicados por Fernández y col. (2009), quienes reportaron una productividad de 0.12 g/g y rendimiento de 0.19 g/L·h, empleando una cepa de *S. cerevisiae* nativa en hidrolizados ácidos de bagazo con una concentración inicial de 12.1 g/L de glucosa, 2.0 g/L de ácido acético, 0.8 g/L de furfural y 2.0 g/L de hidroximetilfurfural. Al utilizar dos cepas industriales en el mismo medio, la productividad máxima alcanzada fue de 0.06 g/g, 0.43 g/g, y el rendimiento máximo de 0.06 g/L·h, 0.46 g/L·h respectivamente. También existen estudios en los que se han aislado cepas de levaduras con capacidad de fermentación en ambientes severos, estableciendo las características de crecimiento en varios monosacáridos y evaluando su capacidad para

fermentar etanol a partir de glucosa, manosa, galactosa, fructosa y xilosa (Kodama y col., 2013). En este estudio se observó que la inhibición del rendimiento de etanol fue mayor a la productividad volumétrica, debido probablemente a que los inhibidores presentes en el hidrolizado impidieron una producción rápida de etanol durante las primeras horas, pero luego ocurrió un proceso de adaptación de la cepa UAT-3, lo que permitió incrementar el rendimiento de etanol.

CONCLUSIONES

Las condiciones utilizadas en el presente estudio, para la hidrólisis química del bagazo de caña de azúcar, permitieron obtener un mosto fermentable, compuesto principalmente por azúcares hemicelulósicos, en el que pudieron crecer las cepas de levaduras seleccionadas y producir etanol. El proceso de acondicionamiento para las cepas de levaduras aisladas, permitió su adaptación y crecimiento en el mosto obtenido por hidrólisis química, alcanzando la máxima productividad de etanol a los 120 días, siendo del 86 % del máximo rendimiento teórico. Es conveniente mantener la búsqueda de nuevas cepas productoras de etanol, con

■ Tabla 4. Parámetros cinéticos de producción de etanol utilizando la cepa de levadura nativa UAT-3 en hidrolizado de bagazo de caña concentrado.

Table 4. Kinetic parameters of ethanol production using native yeast strain UAT-3 hydrolyzate sugar cane bagasse concentrate.

Parámetros de la fermentación		
Tiempo (h)	Y _{P/S} (g/g)*	Q _P (g/L·h)*
120	0.441 7 ± 0.024	0.076 7 ± 0.002
216	0.288 9 ± 0.04	0.027 8 ± 0.003

*Y_{P/S}, rendimiento de etanol por g de glucosa ± desviación estándar y Q_P, productividad volumétrica de etanol ± Desviación estándar.

mayor capacidad de fermentación, preferentemente capaces de consumir y transformar en etanol arabinosa y xilosa.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Fondo Mixto CONACyT Gobierno del Estado de Tamaulipas, Convenio

00192588 de la Convocatoria M0021-2012-40, y a la Dirección de Superación Académica, del Programa para el Desarrollo Profesional Docente de la Convocatoria 2015 para el fortalecimiento a Cuerpos Académicos por el apoyo financiero otorgado en el proyecto con clave UAT-CA-115.

REFERENCIAS

- Agüero-Rodríguez, J. C., Tepetla-Montes, J. y Torres-Beristáin, B. (2015). Producción de biocombustibles a partir de la caña en Veracruz, México: perspectivas y riesgos socio-ambientales. *CienciaUAT*. 9(2): 74-84.
- Aguilar, R., Ramírez, J., Garrote, G., and Vázquez, M. (2002). Kinetic study of the acid hydrolysis of sugar cane bagasse. *Journal of Food Engineering*. 55(4): 309-318.
- Aguilar-Rivera, N. (2007). Bioetanol de la caña de azúcar. *Avances en Investigación Agropecuaria. Revista AIA*. 11(3): 25-39.
- Aguilar-Rivera, N. (2011). Efecto del almacenamiento de bagazo de caña en las propiedades físicas de celulosa grado papel. *Ingeniería investigación y tecnología*. 12(2): 189-197.
- Aguilar-Rivera, N. (2013). Análisis de la productividad de etanol de caña de azúcar en ingenios azucareros de México. Universidad Autónoma del Estado de México, Toluca, México. *Ciencia Ergo Sum*. 20(1): 17-28.
- Albuquerque-Wanderley, M., C., Martín, C., Moraes-Rocha, J. G., and Ribeiro-Gouveia, E. (2013). Increase in ethanol production from sugarcane bagasse based on combined pretreatments and fed-batch enzymatic hydrolysis. *Bioresource Technology*. 128: 448-453.
- Antunes, F. A. F., Chandell, A. K., Milessi, T. S. S., Santos, J. C., Rosa C. A., and da-Silva, S. S. (2014). Bioethanol production from sugarcane bagasse by a novel Brazilian pentose fermenting yeast *Scheffersomyces shehatae* UFMG-HM 52.2: Evaluation of fermentation medium. *International Journal of Chemical Engineering*. (1): 1-8.
- Attfield, P. V. and Ketsas, S. (2000). Hyper-osmotic stress response by strains of baker's yeasts in high sugar concentration medium. *Letters in Applied Microbiology*. 31(4): 323-327.
- Boussarsar, H., Rogé, B., and Mathlouthi, M. (2009). Optimization of sugarcane bagasse conversion by hydrothermal treatment for the recovery of xylose. *Bioresource Technology*. 100(24): 6537-6542.
- Brooks, A. A. (2008). Ethanol production potential of local yeast strains isolated from ripe banana peels. *African journal of Biotechnology*. 7(20): 3749-3752.
- Carballo, F. (2000). *Microbiología industrial: Microorganismos de interés industrial*. España: Editorial Acribia. 31 Pp.
- Caridi, A. (2003). Effect of protectants on the fermentation performance of wine yeasts subjected to osmotic stress. *Food Technology Biotechnology*. 41(2): 145-148.
- Carreón-Rodríguez, O. E., Ramos-López, A. S., Centeno-Leija, S., Leal-Reyes, L. J., Martínez-Jiménez, A., and Fer-

- nández-Sandival, M. T. (2009). Etanol carburante. *Biotechnología*. 13(3): 79-102.
- Ceccato-Antonini, S. R., Davis-Tosta, Ch., and da-Silva, A. C. (2004). Determination of yeast killer activity in fermenting sugarcane juice using selected ethanol-making strains. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 47(1):13-23.
- Chandel, A. K., Chandrasekhar, G., Radhika, K., Ravinder, R., and Ravindra, P. (2011). Bioconversion of pentose sugars into ethanol: A review and future directions. *Biotechnology and Molecular Biology Review*. 6(1): 8-20.
- Chandler, C., Villalobos, N., González, E., Arenas, E., Mármol, Z., Ríos, J. y Aiello-Mazzarri, A. (2012). Hidrólisis ácida diluida en dos etapas de bagazo de caña de azúcar para la producción de azúcares fermentables. *Multiciencias*. 12(3):245-253.
- Choi, G. W., Kang, H. W., and Moon, S. K. (2009). Repeated-batch fermentation using flocculent hybrid, *S. cerevisiae* for the efficient production of bioethanol. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 84(2): 261-269.
- Felipe, M. G. A., Veira, M. V., Vitolo, M., Mancilha, I. M., Roberto, I. C., and Silva, S. S. (1995). Effect of acetic acid on xylose fermentation to xylitol by *Candida guilliermondii*. *Journal of Basic Microbiology*. 35(3): 171-177.
- Fernández, T., Martín, C. y Taherzadeh, M. (2009). Evaluación de cepas industriales de *Saccharomyces cerevisiae* para la obtención de etanol a partir de fuentes que no afectan la producción de alimentos. *ATAC*. 1: 5-10.
- Ferrer, J. R., Páez, G., Arenas-De-Moreno, L., Chandler, C., Mármol, Z. y Sandoval, L. (2002). Cinética de la hidrólisis ácida de bagacillo de caña de azúcar. *Revista de la Facultad de Agronomía*. 19(1): 23-33.
- Field, S. J., Ryden, P., Wilson, D., James, S. A., Roberts, I. N., Richardson, ..., and Clarke, T. A. (2015). Identification of furfural resistant strains of *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces paradoxus* from a collection of environmental and industrial isolates. *Biotechnology for Biofuels*. 8(1): 1-8.
- García, M., Quintero, R. y Lopez, A. (1998). *Biología Alimentaria*. México: Editorial LIMUSA S.A. 619 Pp.
- Gómez-Ruiz, S. E., De-los-Ríos-Deras, G. C., Soto-Cruz, N. O., López-Miranda, J. y Rutiaga-Quiñones, O. M. (2007). Capacidad fermentativa de cepas de *Saccharomyces cerevisiae* nativas de la región productora de mezcal de Durango, en XIII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería VII, Simposio Internacional de Producción de Alcoholes y Levaduras. Durango. [En línea]. Disponible en: <http://www.smbb.com.mx/congresos%20smbbacpu>
- lco09/TRABAJOS/AREA_X/CX-18.pdf. Fecha de consulta: 24 de noviembre de 2015.
- Guarnizo-Franco, A., Martínez-Yépes, P. N., and Valencia-Sánchez, H. A. (2009). Pretratamientos de la celulosa y biomasa para la sacarificación. *Scientia et Technica*. 2(42):284-289.
- Huerta-Beristain, G., Utrilla, J., Hernández-Chavez, G., Bolívar, F., Gosset, G., and Martínez, J. (2008). Specific ethanol production rate in ethanologenic *Escherichia coli* strain KO11 is limited by pyruvate decarboxylase. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*. 15(1): 55-64.
- Ingram, L. O. and Buttke, T. M. (1985). Effects of alcohols on microorganisms. *Advances in microbial physiology*. 25:253-300.
- Jones, S. R. P., Pammen, T. N., and Greenfield, P. F. (1981). Alcohol fermentation by yeasts. The effect of environmental and other variables. *Process Biochemistry*. 16(3): 42-49.
- Joshi, V. K., Shah, P. K., and Kumar, K. (2005). Evaluation of peach cultivars for wine preparation. *Journal of Food Science and Technology*. 42(1): 83-89.
- Kodama, S., Nakanishi, H., Arachchige, T., Piyamali, T. T., Isono, N., and Hisamatsu, M. (2013). A wild and tolerant yeast suitable for ethanol fermentation from lignocelluloses. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 115(5): 557-561.
- Lappe-Oliveras, P., Moreno-Terrazas, R., Arrizón-Gaviño, J., Herrera-Suárez, T., García-Mendoza, A., and Gschaedler-Mathis, A. (2008). Yeasts associated with the production of Mexican alcoholic nondistilled and distilled Agave beverages. *FEMS yeast research*. 8(7):1037-1052.
- Larsson, S., Palmqvist, E., Hahn-Hägerdal, B., Tengborg, Ch., Stenberg, K., Zacchi, G., and Nilvebrant, N. O. (1999). The generation of fermentation inhibitors during dilute acid hydrolysis of softwood. *Enzyme and Microbiology Technology*. 24(3):151-159.
- Lopes, D. H. J. and Sola-Penna, M. (2001). Urea increases tolerance of yeast inorganic pyrophosphatase activity to ethanol: the other side of urea interaction with proteins. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 394(1): 61-66.
- Magliani, W., Conti, S., Gerloni, M., Bertolotti, D., and Polonelli, L. (1997). Yeast killer systems. *Clinical Microbiology Reviews*. 10(3): 369-400.
- Malacrino, P., Tosi, E., Caramia, G., Prisco, R., and Zappaloli, G. (2005). The vinification of partially dried grapes: A comparative fermentation study of *Saccharomyces*

- cerevisiae* strains under high sugar stress. *Letters in Applied Microbiology*. 40(6): 466–472.
- Marquina, D., Santos, A., and Peinado, J. (2002). Biology of killer yeasts. *International Microbiology*. 5(2): 65-71.
- Matiz, A., Torres, C. y Poutou, R. A. (2002). Producción de etanol con células inmovilizadas de *Zymomonas mobilis* spp. *Revista MVZ Córdoba*. 7(2): 216-223.
- Mielenz, J. R. (2001). Ethanol production from biomass: technology and commercialization status. *Current Opinion in Microbiology*. 4(3): 324–329.
- Mohanty, S., Ray, P., Swain, M. R., and Ray, R. C. (2006). Fermentation of cashew (*Anacardium occidentale* L.) “apple” into wine. *Journal of Food Processing and Preservation*. 30(3): 314-322.
- Nally, M. C., Maturano, Y. P., Vázquez F. y Toro M. E. (2005). Comportamiento de una cepa salvaje de *Saccharomyces cerevisiae* killer y su isogénica sensible respecto de diferentes fuentes de nitrógeno en cultivos mixtos. *Revista Argentina de Microbiología*. 37(1): 73-77.
- Nigam, J. N. (2001). Ethanol production from wheat straw hemicellulose hydrolysate by *Pichia stipitis*. *Journal of Biotechnology*. 87(1): 17– 27.
- Oliart-Ros, R. M., Sánchez-Otero, M. G. y Manresa-Presas, Á. (2016). Utilización de microorganismos de ambientes extremos y sus productos en el desarrollo biotecnológico. *CienciaUAT*. 11(1): 79-90.
- Oliva, J. M. (2003). Efecto de los productos de degradación originados en la explosión por vapor de biomasa de chopo sobre *Kluyveromyces Marxianus*. [En línea]. Disponible en :<http://www.ucm.es/BUCM/tesis/bio/ucmt26833.pdf>. Fecha de consulta: 27 de noviembre de 2015.
- Orberá, T. (2004). Métodos moleculares de identificación de levaduras de interés biotecnológico. *Revista Iberoamericana de Micología*. 21: 15-19.
- Ortiz-Zamora, O., Cortés-García, R., Ramírez-Lepe, M., Gómez-Rodríguez, J., and Aguilar-Uscanga, M. G. (2009). Isolation and selection of ethanol resistant and osmotolerant yeasts from Regional Agricultural Sources in Mexico. *Journal of Food Process Engineering*. 32 (5): 775-786.
- Oviedo-Zumaqué, L., Lara-Mantilla, C. y Mizger-Pantoja, 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. *Revista Colombiana de Biotecnología*. 11(1): 40-47.
- Palmqvist, E. and Hahn-Hägerdal, B. (2000a). Fermentation of lignocellulosic hydrolysates I: Inhibition and detoxification. *Bioresource Technology*. 74(1): 25–33.
- Palmqvist, E. and Hahn-Hägerdal, B. (2000b). Fermentation of lignocellulosic hydrolysates II: Inhibitors and mechanisms of inhibition. *Bioresource Technology*. 74(1): 17-24
- Pandey, A., Soccol, C. R., Nigam, C., and Soccol, V. T. (2000). Biotechnological potential of agroindustrial residues I: Sugar cane bagasse. *Bioresource Technology*. 74(1): 69-80.
- Pataro, C., Guerra, J. B., Petrillo-Peixoto, M. L., Mendonça-Hagler, L. C., Linardi, V. R., and Rosa, C. A. (2000). Comunidades de levadura y polimorfismo genético de la especie *Saccharomyces cerevisiae* asociada a una fermentación artesanal en Brasil. *Journal Applied Microbiology*. 89(1): 24-31.
- Purwadi, R., Niklasson, C., and Taherzadeh, M. J. (2004). Kinetic study of detoxification of dilute-acid hydrolysates by Ca(OH)₂. *Journal of Biotechnology*. 114(1): 187–198.
- Saha, P., Baishnab, A. C., Alam, F., Khan, M. R., and Islam, A. (2014). Production of bio-fuel (bio-ethanol) from biomass (pteris) by fermentation process with yeast. *Procedia Engineering*. 90: 504–509.
- Schwan, R. F., Mendonça, A. T., Da-Silva, J. J., Rodrigues, V., and Wheals, A. E. (2001). Microbiology and physiology of Cachaça (Aguardente) fermentations. *Antonie van Leeuwenhoek*. 79(1): 89–96.
- Suleiman, L. N. (2010). Renewable energy as a solution to Nigerian energy crisis. *VUAS*. 13-19.
- Tuite, M. F. and Oliver, S. G. (1991). *Saccharomyces*. *Biotechnology Handbooks, chapter 8, Culture Systems*. New York: Plenum Press. 282 Pp.
- Yeon-Ju, L., Yu-Ri, Ch., So-Young, L., Jong-Tae, P., Jae-Hoon, S., Kwan-Hwa, P., and Jung-Wan, K. (2011). Screening wild yeast strains for alcohol fermentation from various fruits. *Mycobiology*. 39(1): 33-39.
- Yong-Jin, K., An-Zhou, M., Qian, L., Feng, W., Guo-Qiang, Z., and Chun-Zhao, L. (2011). Effect of lignocellulosic inhibitory compounds on growth and ethanol fermentation. *Bioresource Technology*. 102(17): 8099-8104.
- Zumalacárregui-De-Cárdenas, L. M., Pérez-Ones, O., Rodríguez-Ramos, P. A., Zumalacárregui-De-Cárdenas, B. M., and Lombardi, G. (2015). Potencialidades del bagazo para la obtención de etanol frente a la generación de electricidad. *Ingeniería, Investigación y Tecnología*. 16(3): 407–418.
- Zyl, C. V., Prior, B. A., and Du-Preez, J. C. (1991). Acetic acid inhibition of D-xylose fermentation by *Pichia stipitis*. *Enzyme Microbiology Technology*. 13(1): 82–86.