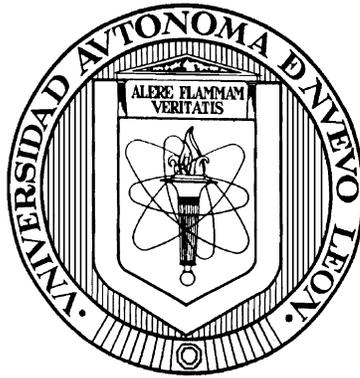


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN  
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



OBTENCIÓN DE ENZIMAS MICROBIANAS Y SU APLICACIÓN EN  
LA PRODUCCIÓN DE ETANOL A PARTIR DE  
HOJAS DE *Agave salmiana*

Por:

Julio Silva Mendoza

Como requisito parcial para obtener el Grado de  
DOCTOR EN CIENCIAS con Orientación en Microbiología Aplicada

Junio, 2020

OBTENCIÓN DE ENZIMAS MICROBIANAS Y SU APLICACIÓN EN  
LA PRODUCCIÓN DE ETANOL A PARTIR DE

HOJAS DE *Agave salmiana*

Comité de Tesis

---

Dra. María Elena Cantú Cárdenas  
Directora de Tesis

---

Dr. Xristo Zárate Kalfópulos  
Secretario

---

Dra. Alma Elizabeth Gómez Loredo  
Primer vocal

---

Dra. Katuska Arévalo Niño  
Segundo vocal

---

Dra. Magdalena de Jesús Rostro Alanís  
Tercer vocal

## RESUMEN

Julio Silva Mendoza

Fecha de Graduación:

Universidad Autónoma de Nuevo León

Facultad de Ciencias Químicas

Título del Estudio: OBTENCIÓN DE ENZIMAS MICROBIANAS Y SU APLICACIÓN EN LA PRODUCCIÓN DE ETANOL A PARTIR DE HOJAS DE *Agave salmiana*.

Número de páginas:

Candidato para el Grado de Doctorado  
en Ciencias con Orientación  
en Microbiología Aplicada

Área de Estudio: Microbiología Aplicada

El Bioetanol es uno de los biocombustibles con mayor demanda a nivel mundial. Éste es producido a partir de cultivos de caña y maíz mediante procesos biotecnológicos. Las plantas de agave son una potencial materia prima para la producción de bioetanol, ya que contienen un alto contenido de polisacáridos que se pueden aprovechar. En este trabajo se utilizaron las hojas de *A. salmiana* para la producción de bioetanol, ya que contienen polisacáridos (celulosa y fructosanos) y monosacáridos (glucosa y fructosa) aprovechables. Se aisló un hongo, identificado como *Penicillium chrysogenum*, el cual produjo celulasas con actividad a altas temperaturas, las cuáles sirvieron para hidrolizar la celulosa presente en el tejido parenquimatoso de las hojas, y con ello obtener azúcares fermentables. La mayor actividad que presentaron las celulasas fueron de 14.4, 3.5 y 4.14 U/g para endoglucanasa, exoglucanasa y  $\beta$ -glucosidasa, respectivamente. Por otro lado, se aisló una levadura identificada como *Hanseniaspora uvarum*. Esta levadura produjo inulinasas con alta actividad enzimática (180.5 U/mL) en comparación con los microorganismos ya reportados. También fermentó eficientemente el jugo de las hojas y la glucosa obtenida por hidrólisis enzimática a etanol generando 30.4 y 6.8 g/L respectivamente. Además, esta levadura mostró resistencia a los compuestos inhibitorios presentes en el jugo de agave.

Firma del asesor:

## AGRADECIMIENTOS

A la UANL y la FCQ por facilitarme las instalaciones, los equipos y proporcionarme todos los materiales para la realización de este proyecto.

A CONACyT por la beca otorgada 514440.

A mi asesora, la Dra. María Elena Cantú Cárdenas, por haberme apoyado y ayudado a lo largo de toda mi formación académica.

Al Dr. Leonardo Chávez, por ayudarme y presionarme durante todo mi proyecto.

Al Dr. Alberto Gómez, por ayudarme y apoyarme siempre que lo necesito.

A mi Comité Tutorial y revisores, muchas gracias por sus comentarios y sugerencias.

A todos mis compañeros y amigos del laboratorio, por siempre apoyarme, entretenerme y distraerme.

A los alumnos de licenciatura que me han ayudado mucho durante todo mi doctorado.

A mi madre y familia por apoyarme.

A la mejor novia del mundo, Marlene Montalvo, por aguantarme todo y estar siempre para mí.

Gracias por todo.

## TABLA DE CONTENIDO

Capítulo	Página
1. INTRODUCCIÓN . . . . .	1
1.1 Celulosa y Celulasas . . . . .	2
1.2 Fructosanos e Inulinasas . . . . .	4
1.3 Fermentación Alcohólica . . . . .	5
1.4 Importancia de las Plantas de Agave en la Biotecnología . . . . .	6
1.5 Hipótesis . . . . .	12
1.6 Objetivo General . . . . .	13
1.7 Objetivos Específicos . . . . .	13
2. MATERIALES Y MÉTODOS . . . . .	14
2.1 Reactivos y Materia Prima . . . . .	14
2.2 Aislamiento de Microorganismos . . . . .	15
2.3 Preparación de Inóculos . . . . .	15
2.4 Evaluación de la Producción de Celulasas . . . . .	16
2.5 Evaluación de la Actividad Inulinasa de los Microorganismos Aislados. . . . .	18
2.6 Evaluación de la Capacidad Fermentadora de los Microorganismos. . . . .	19
2.7 Identificación Molecular de los Microorganismos . . . . .	19
2.8 Producción de Celulasas . . . . .	20
2.9 Determinación de la Actividad Endoglucanasa, Exoglucanasa y $\beta$ -glucosidasa . . . . .	21
2.10 Producción de Inulinasas . . . . .	22
2.11 Determinación de la Actividad Inulinasa . . . . .	23
2.12 Resistencia a Saponinas . . . . .	23
2.13 Producción de Azúcares por Hidrólisis Enzimática . . . . .	25
2.14 Producción de Bioetanol . . . . .	26

3.	RESULTADOS . . . . .	29
3.1	Aislamiento de Microorganismos . . . . .	29
3.2	Evaluación de la Producción de Celulasas . . . . .	30
3.3	Evaluación de la Producción de Inulinasas . . . . .	32
3.4	Evaluación de la Capacidad Fermentativa de los Microorganismos. . . . .	33
3.5	Identificación Molecular de los Microorganismos. . . . .	34
3.6	Producción de Celulasas . . . . .	37
3.7	Efecto del pH y la Temperatura sobre la Actividad Enzimática de las Celulasas . . . . .	39
3.8	Producción de Inulinasas . . . . .	42
3.9	Resistencia a Saponinas . . . . .	43
3.10	Producción de Azúcares por Hidrólisis Enzimática . . . . .	44
3.11	Producción de Bioetanol . . . . .	46
4.	DISCUSIÓN DE RESULTADOS . . . . .	48
4.1	Celulosa de Agave como Fuente de Carbono para la Producción de Celulasas . . . . .	48
4.2	Microorganismos Productores de Inulinasas . . . . .	53
4.3	Microorganismos Fermentadores . . . . .	54
4.4	Identificación de los Microorganismos . . . . .	55
4.5	Producción de Celulasas . . . . .	56
4.6	Producción de Azúcares Reductores por Hidrólisis Enzimática . . . . .	61
4.7	Producción de Inulinasas . . . . .	63
4.8	Resistencia a Compuestos Antimicrobianos . . . . .	64
4.9	Producción de Bioetanol . . . . .	67
5.	CONCLUSIONES . . . . .	72
	REFERENCIAS . . . . .	75

## APÉNDICES

APÉNDICE 1	DETERMINACIÓN DE AZÚCARES REDUCTORES . . . . .	90
APÉNDICE 2	CONDICIONES DE LA PCR . . . . .	92
APÉNDICE 3	SECUENCIAS DE LA REGIÓN AMPLIFICADA DEL ITS DE LOS MICROORGANISMOS . . . . .	93

## LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
1. Pretratamientos empleados sobre las especies de agave . . . . .	10
2. Condiciones para las fermentaciones alcohólicas . . . . .	28
3. Azúcares reductores liberados (mg/mL) de la hidrólisis de los diferentes sustratos con el extracto enzimático recuperado de los hongos crecidos en parénquima . . . . .	32
4. Azúcares reductores liberados (mg/mL) de la hidrólisis de los diferentes sustratos con el extracto enzimático recuperado de los hongos crecidos en las fibras . . . . .	32
5. Azúcares reductores liberados de la hidrólisis de inulina comercial con los extractos enzimáticos obtenidos por fermentación . . . . .	33
6. Resultados del análisis BLAST mostrando las secuencias que produjeron alineamientos significativos en relación con los microorganismos aislados . . . . .	36
7. Máxima actividad enzimática determinada para cada enzima bajo las condiciones de estudio . . . . .	41
8. Crecimiento y producción de gas de las levaduras utilizando diferentes fuentes de carbono . . . . .	43
9. Ensayo antimicrobiano de las saponinas presentes en las hojas de <i>A. salmiana</i> por el método de difusión en disco . . . . .	44
10. Características generales de los diferentes tipos de celulosa . . . . .	51
11. pH óptimo de las celulasas producidas por diferentes	

microorganismos . . . . .	.58
12. Temperatura óptima de las celulasas producidas por diferentes microorganismos (°C) . . . . .	59
13. Actividad enzimática de celulasas producidas por FSS . . . . .	.61
14. Actividad enzimática de inulinasas producidas por diferentes microorganismos . . . . .	63
15. Producción de bioetanol a partir de diferentes especies de Agave . .	.69

## LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Representación esquemática de la hidrólisis de las regiones amorfas y cristalinas de la celulosa por la acción de las celulasas . . . . .	3
2. Planta de <i>A. salmiana</i> (a) y una micrografía del interior de la hoja mostrando la morfología de las fibras (flechas) y las células parenquimatosas (círculos) (b) . . . . .	8
3. Principales morfologías y estructuras representativas de las bacterias (izquierda), levaduras (centro) y hongos (derecha) aislados del agave y del aguamiel (observados a 40 y 100x) . . . . .	30
4. Comparación del crecimiento del mismo hongo sobre parénquima (a) y fibras (b) de agave . . . . .	31
5. Producción de CO <sub>2</sub> en caldo YM suplementado con glucosa, empleando las levaduras aisladas . . . . .	34
6. Gel de agarosa al 1 % mostrando las bandas obtenidas de la extracción del DNAg . . . . .	34
7. Gel de agarosa al 2% mostrando los fragmentos amplificados por PCR de los microorganismos . . . . .	35
8. Imágenes del crecimiento en placa (izquierda), y comparación de la morfología de los hongos aislados (centro) contra los microorganismos de referencia (derecha) . . . . .	37
9. Producción de celulasas por FSS empleando los hongos <i>F. oxysporum</i> (a), <i>P. chrysogenum</i> (b) y <i>A. niger</i> (c) . . . . .	38
10. Efecto del pH sobre la actividad endoglucanasa (a),	

exoglucanasa (b) y $\beta$ -glucosidasa (c) de cada hongo . . . . .	40
11. Efecto de la temperatura sobre la actividad endoglucanasa (a), exoglucanasa (b) y $\beta$ -glucosidasa (c) de cada hongo . . . . .	41
12. Producción de inulinasa por <i>H. uvarum</i> (a) y el efecto del pH (b) y la temperatura (c) sobre su actividad enzimática . . . . .	42
13. Porcentaje de hidrólisis de las células parenquimatosas por el extracto enzimático crudo a diferentes tiempos . . . . .	45
14. Producción de etanol por fermentación (a) y co-fermentación (b) del jugo de agave . . . . .	46
15. Producción de etanol por fermentación (a) y co-fermentación (b) del hidrolizado enzimático . . . . .	47
16. Presencia de saponinas en el jugo de agave antes (a) y después (b) de la esterilización . . . . .	65

## CAPÍTULO 1

### INTRODUCCIÓN

La demanda energética mundial es cubierta en gran parte por los combustibles fósiles (gas natural, carbón y el petróleo y sus derivados) y la energía nuclear. Sin embargo, estas fuentes de energía tienen impactos ambientales como la contaminación del aire, el agua y el suelo en los sitios de extracción, conductos y refinerías<sup>1</sup>. La tendencia actual es ir desplazando poco a poco el consumo de éstas hacia fuentes de energía renovables, las cuáles son más limpias y amigables con el medio ambiente.

En los últimos años los países han apostado por el uso de biocombustibles, principalmente por el bioetanol producido a partir de biomásas lignocelulósicas mediante procesos biotecnológicos<sup>2</sup>. Los principales productores de bioetanol en el mundo son Brasil y Estados Unidos empleando cultivos de caña y maíz como materias primas<sup>3</sup>. Entre ambos países producen cerca del 90 % del bioetanol a nivel mundial.

Las plantas no comestibles y los residuos lignocelulósicos provenientes de diversas industrias son una alternativa para la producción de bioetanol, evitando así el uso de cultivos que pueden ser destinados para la alimentación. Este tipo de biomasa tienen un alto contenido de celulosa y azúcares aprovechables<sup>4</sup>. Además, a nivel mundial se generan cerca de 170–200 x 10<sup>9</sup> toneladas anuales de biomasa lignocelulósica, lo que la convierte en la mejor alternativa para la producción de etanol<sup>5</sup>.

Existen dos etapas importantes en la elaboración de bioetanol: la hidrólisis de los polisacáridos (celulosa, fructanos, almidón o sacarosa) para obtener azúcares simples (glucosa y/o fructosa), y la fermentación de estos a etanol<sup>6</sup>. La hidrólisis se puede llevar a cabo con el uso de enzimas (celulasas, inulinasas o amilasas).

## 1.1 Celulosa y Celulasas

El principal componente de los residuos lignocelulósicos es la celulosa; un polímero fibroso, resistente e insoluble en agua que da soporte y estructura a la pared celular de las plantas<sup>7</sup>. Está formada por unidades de glucosa, unidas por enlaces  $\beta$ -1,4 glucosídicos. La celulosa está organizada en regiones amorfas y cristalinas (Fig. 1). Las porciones cristalinas son las responsables de su recalcitrancia.

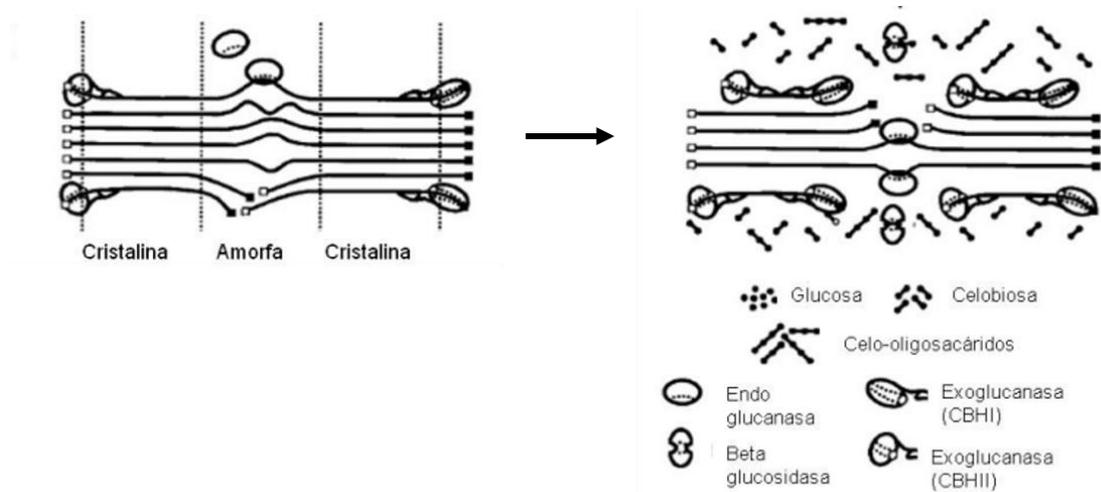


Figura 1. Representación esquemática de la hidrólisis de las regiones amorfas y cristalinas de la celulosa por la acción de las celulasas (Modificado de Lynd *et al.* 2002<sup>8</sup>).

Las celulasas son un sistema enzimático generalmente compuesto de endoglucanasa, exoglucanasa y  $\beta$ -glucosidasa. Estas enzimas actúan en sinergia para hidrolizar las cadenas de celulosa a monómeros de glucosa (Fig. 1)<sup>9</sup>. Las celulasas son producidas por bacterias, hongos, protozoos y algunas especies de animales, siendo las fúngicas las de mayor interés industrial, debido a su gran capacidad hidrolítica<sup>10</sup>.

Las celulasas representan alrededor del 20 % del mercado total de enzimas en el mundo, siendo las terceras enzimas más producidas<sup>11</sup>. Sin embargo, su alto precio eleva los costos de producción de bioetanol. Por esta razón, se busca implementar estrategias para mejorar la eficiencia de las ya existentes, así como la búsqueda de nuevos microorganismos productores de celulasas con mejor actividad.

Alternativamente, las celulasas se pueden producir por fermentación en sustrato sólido (FSS)<sup>11</sup>. Se han reportado varios microorganismos capaces de producirlas utilizando residuos lignocelulósicos como fuente de carbono<sup>12,13</sup>.

## 1.2 Fructosanos e Inulinasas

Los fructosanos son importantes carbohidratos de almacenamiento presentes en más de 36,000 especies de plantas. Son polímeros formados por cadenas lineales de D-fructofuranosa (fructosa), unidas por enlaces  $\beta$ -1,2 con una molécula inicial de glucosa<sup>14</sup>.

Debido a que son una fuente barata y abundante para la producción de jarabe de alta fructosa, bioetanol, ácido cítrico y ácido láctico, los fructosanos son empleados en procesos de fermentación industrial y alimentaria, en las industrias farmacéutica y química, así como en la producción de biocombustibles<sup>14</sup>. Actualmente se producen en el oeste de Europa; a partir de achicoria, y en México; a partir de plantas de agave, ya que estas poseen un alto contenido de fructosanos<sup>15</sup>. A los fructosanos del agave se los conoce comúnmente como inulina o agavinas.

Las inulinasas son enzimas que catalizan la hidrólisis de los enlaces glucosídicos en los fructosanos para producir fructosa y glucosa<sup>16</sup>.

Recientemente, han recibido mucha atención, ya que pueden aplicarse ampliamente para hidrolizar la inulina en la producción de bioetanol y fructosa<sup>16</sup>.

Los principales microorganismos empleados para la producción de inulinasas son las levaduras *Kluyveromyces marxianus* y *Pichia guilliermondii*, y el hongo *Aspergillus niger*<sup>14,17,18</sup>. Las inulinasas también se han producido por fermentación empleando residuos agroindustriales como fuente de carbono<sup>14,19</sup>. Recientemente se han identificado otros microorganismos con la capacidad de producir inulinasas<sup>20,21</sup>.

### 1.3 Fermentación Alcohólica

El etanol es producido a partir de la fermentación directa de distintos monosacáridos<sup>22</sup>. La levadura *Saccharomyces cerevisiae* es el microorganismo comúnmente empleado en la producción de bioetanol, debido a su alta productividad y alta tolerancia al etanol<sup>2</sup>. También se han reportado otros microorganismos con la capacidad de producir eficientemente bioetanol como *Zymomonas mobilis* y *K. marxianus*<sup>23,24</sup>, los cuáles también son usados para elaborar bebidas alcohólicas. Sin embargo, existen algunos desafíos que inhiben la producción de etanol en la fermentación con levaduras, como la alta temperatura, la alta concentración de etanol y la presencia de metabolitos (propios de la materia prima) que exhiben actividad antimicrobiana.

Una buena fuente para la búsqueda de microorganismos productores de bioetanol ha sido el microbiota de alimentos y bebidas fermentadas, tales como el cacao, las uvas y el pulque, donde se han identificado microorganismos como *Hanseniaspora*, *Lactobacillus* y *Kloeckera*, los cuales tienen un rol significativo durante el proceso de fermentación<sup>25-27</sup>.

Hay dos procesos que se utilizan comúnmente para la producción de etanol: la hidrólisis y fermentación separadas (HFS) y la sacarificación y fermentación simultáneas (SFS)<sup>28</sup>. La SFS es un proceso generalmente corto ya que la hidrólisis y la fermentación ocurren de manera simultánea para mantener baja la concentración de glucosa. La HFS se lleva a cabo cuando la temperatura óptima de las enzimas está muy por encima que la temperatura de crecimiento de los microorganismos fermentadores. También se puede emplear la co-fermentación, que consiste en utilizar dos microorganismos con diferentes características; como consumidores de diferentes fuentes de azúcares (hexosas y pentosas)<sup>29</sup>.

#### 1.4 Importancia de las Plantas de Agave en la Biotecnología

Las plantas de agave son una potencial materia prima para la obtención de biocombustibles y productos de alto valor<sup>30</sup>. Los agaves han recibido especial atención debido a su alta eficiencia en el uso del agua y su resistencia a la sequía, lo que les permite crecer en tierras áridas o semiáridas no aptas para otros cultivos<sup>31</sup>. El género *Agave* comprende cerca de 208 especies, de las cuales

alrededor de 150 se encuentran en México, distribuidas en más del 75% de nuestro país. Sin embargo, solo *A. tequilana*, *A. sisalana*, *A. americana*, *A. salmiana*, *A. angustifolia*, *A. lechuguilla* y *A. fourcroydes* son cultivadas y usadas para obtener productos de interés<sup>32</sup>.

Estas plantas han tenido un papel clave en la subsistencia y desarrollo de numerosos pueblos indígenas, empleándolas para obtener distintos productos, entre ellos fibras para la elaboración de ropa y cuerdas, como alimento, forraje, etc<sup>33</sup>. Industrialmente se usan en la elaboración de bebidas alcohólicas, como el tequila y el mezcal. Aprovechando su alto contenido de celulosa y fructosanos, las especies de agave se han empleado recientemente para obtener diferentes productos, como nanocelulosa, azúcares fermentables, biocombustibles y como sustrato en la producción de enzimas<sup>34-38</sup>.

La generación global de residuos de agave (bagazo y hojas) proveniente de las industrias es poca (1.1 millones de toneladas) en comparación con la de otros cultivos, como el maíz, el bagazo de caña de azúcar y la paja de trigo (aproximadamente 500 millones de toneladas)<sup>31</sup>. Sin embargo, debido a su alto potencial para su empleo en la obtención de azúcares, el agave ha ganado interés en los últimos años y en muchos países, como en Australia, Nueva Zelanda y Sudáfrica. La empresa Ausagave® de Australia, es líder mundial en el cultivo de *A. tequilana* para la obtención de azúcares y fibras. En el 2014, la

producción mundial de agave se concentró principalmente en México, con 2.41 millones de toneladas<sup>31</sup>.

Durante la producción industrial de bebidas fermentadas a partir del *A. salmiana* las hojas son descartadas. Éstas hojas contienen celulosa, fructosanos y azúcares simples que pueden ser aprovechados, además, presentan una baja cantidad de lignina (9–13 %) lo que las hace menos recalcitrantes<sup>39,40</sup>.

Las hojas de *A. salmiana* están cubiertas por una capa cerosa de cutina y una capa delgada de clorofila que protege a la planta de las condiciones adversas medioambientales (Fig. 2a). Dentro, las fibras de celulosa sirven como soporte a las hojas, mientras que las células parenquimatosas están envueltas activamente en la fotosíntesis y almacenamiento de nutrientes (Fig. 2b).

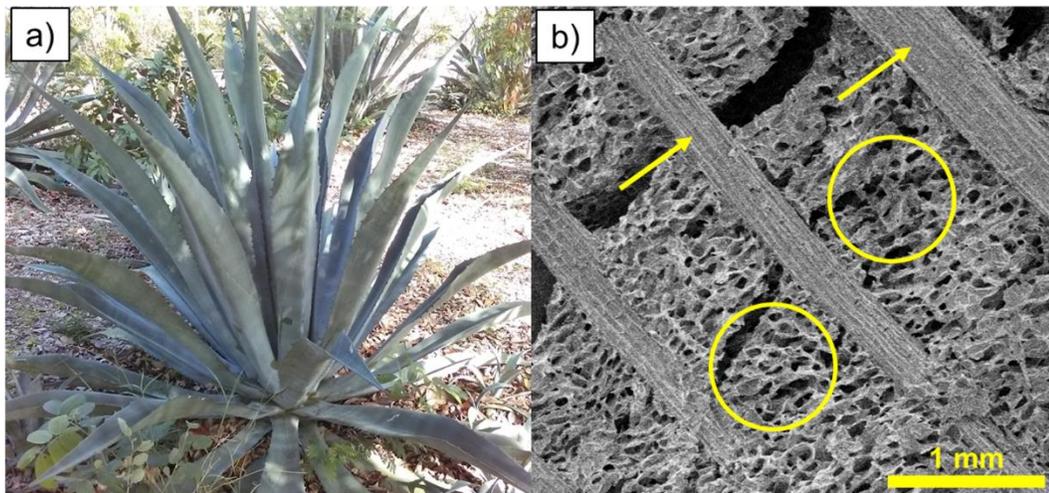


Figura 2. Planta de *A. salmiana* (a) y una micrografía del interior de la hoja mostrando la morfología de las fibras (flechas) y las células parenquimatosas (círculos) (b).

La pared celular en el parénquima de las hojas de los agaves es más delgada en comparación a otras plantas<sup>40</sup>. Se ha logrado aislar nanocelulosa en forma de láminas con espesores de ~80 nm de la pared celular de las células parenquimatosas a partir de las hojas de *A. salmiana*<sup>41</sup>. También se demostró que esta nanocelulosa es más fácil de hidrolizar que la celulosa comercial<sup>42</sup>.

Existen algunos factores que afectan la actividad enzimática durante la hidrólisis de la biomasa lignocelulósica: la porosidad (área superficial accesible), la cristalinidad de las fibras de celulosa, así como también el contenido de lignina y hemicelulosa<sup>43</sup>. Es necesario un pretratamiento (térmico o químico) de la biomasa para aumentar la digestibilidad de la celulosa, y favorecer la hidrólisis<sup>44</sup>. Sin embargo, estos pueden generar compuestos inhibidores de los microorganismos empleados para la fermentación; como el furfural que se produce durante el pretratamiento ácido a partir de la hidrólisis de la hemicelulosa<sup>31,45</sup>.

Se han reportado diferentes pretratamientos para aumentar la digestibilidad de la celulosa de especies de agave para la obtención de azúcares y otros productos de interés. Algunos de estos trabajos se resumen en la Tabla 1. En todos los casos se obtuvo una alta eficiencia en la hidrólisis enzimática. Sin embargo, Corbin *et al.* (2016) reportaron que el pretratamiento puede afectar a

los microorganismos fermentadores, debido probablemente a que se eliminan compuestos o nutrientes necesarios para ellos<sup>46</sup>.

Tabla 1. Pretratamientos empleados sobre las especies de agave.

<b>Especie de agave</b>	<b>Parte de la planta utilizada</b>	<b>Pretratamiento</b>	<b>Ref</b>
<i>A. salmiana</i>	Hojas	NaOH y H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	36
<i>A. tequilana</i>	Hojas	Esterilización	46
<i>A. atrovirens</i>	Hojas	HOAc	47
<i>A. americana</i>	Tallo	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , Na <sub>2</sub> SO <sub>3</sub> , NaOH	48
<i>A. tequilana</i>	Bagazo	[C2mim][OAc]	49
<i>A. tequilana</i>	Bagazo	NaOH y H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	50

Ref: referencias; C2mim: 1 etil-3-metilimidazolio.

En otros trabajos se ha buscado aprovechar los fructosanos de los agaves; descartando la celulosa, empleando para ello las inulinasas, tanto comerciales, como producidas por levaduras aisladas del agave<sup>51-54</sup>. Sin embargo, el uso de la hidrólisis enzimática de ambos polisacáridos (celulosa y fructosanos) no ha sido reportado en un mismo trabajo.

Para la fermentación de los azúcares se han usado diferentes microorganismos, pero se ha encontrado que las cepas nativas presentan un mayor rendimiento<sup>55</sup>. También se han encontrado microorganismos que son capaces tanto de hidrolizar como de fermentar, tal es el caso de la levadura *K. marxianus* que hidroliza fructosanos y el hongo *Fusarium oxysporum* que hidroliza celulosa; este último ya ha sido usado para la obtención de etanol a partir de paja de trigo<sup>52,56,57</sup>. *F. oxysporum* es patógeno de plantas, incluyendo el

agave, del cual se han aislado varias cepas, sin embargo, no se ha empleado en la hidrólisis de celulosa de agave<sup>58</sup>.

La presencia de microorganismos contaminantes puede interferir en la fermentación, por esta razón se han desarrollado diferentes estrategias para evitar este problema, como el empleo de antibióticos; sin embargo, esto aumenta los costos de producción<sup>59</sup>. Otra alternativa es el uso de compuestos o extractos de plantas con actividad antimicrobiana. Un ejemplo de estos son las saponinas, las cuales presentan un efecto inhibitorio sobre diferentes microorganismos, incluyendo levaduras empleadas en fermentaciones industriales<sup>55,60</sup>.

Los agaves son capaces de producir saponinas, y se ha observado que levaduras fermentadoras aisladas del agave, presentan resistencia a las saponinas, y son capaces de crecer y fermentar<sup>61</sup>. Por esta razón, sería factible emplear plantas que produzcan compuestos antimicrobianos y microorganismos resistentes a ellos, como los presentes en el microbioma de la misma planta, de esta forma se reducirían costos al prescindir del uso de antibióticos o agentes químicos para controlar microorganismos contaminantes del proceso de fermentación alcohólica.

Como se ha mencionado, los residuos lignocelulósicos son una alternativa viable para la producción de bioetanol. Sin embargo, los pretratamientos

químicos han sido necesarios para facilitar la conversión de la celulosa a azúcares fermentables. Es necesario el desarrollo de nuevas estrategias donde se eviten estos pretratamientos, utilizando para ello residuos lignocelulósicos menos recalcitrantes.

Para la realización de este proyecto se planteó el uso de las hojas de *Agave salmiana* para la producción de bioetanol, buscando aprovechar tanto los polisacáridos (celulosa y fructosanos) como los azúcares simples presentes. Para llevar a cabo el proyecto se aislaron microorganismos productores de glucosidasas (celulasas e inulinasas) con alta actividad enzimática para la hidrólisis de los polisacáridos, así como microorganismos fermentadores resistentes a saponinas y capaces de producir eficientemente etanol.

### 1.5 Hipótesis

Los microorganismos presentes en el microbioma del *Agave salmiana* pueden producir enzimas hidrolíticas para la obtención de azúcares simples a partir de los polisacáridos presentes en las hojas de la planta, y posteriormente ser fermentados a etanol.

## 1.6 Objetivo General

Obtener una mezcla de enzimas microbianas para la hidrólisis de los polisacáridos presentes en las hojas de *Agave salmiana*, y la fermentación de los azúcares obtenidos a etanol.

## 1.7 Objetivos Específicos

1. Aislar microorganismos presentes en el microbioma de las hojas de *A. salmiana*.
2. Evaluar la capacidad de los microorganismos de hidrolizar los carbohidratos presentes en las hojas de agave.
3. Emplear los microorganismos con capacidad hidrolítica para la producción de sus enzimas por fermentación en fase sólida.
4. Purificar y caracterizar bioquímicamente las enzimas hidrolíticas.
5. Someter a hidrólisis la celulosa de agave empleando las enzimas que mostraron la mayor actividad.
6. Evaluar la producción de etanol a partir de los azúcares obtenidos de las hojas de agave empleando microorganismos fermentadores aislados de aguamiel de agave y cepas empleadas en procesos cerveceros.

## CAPÍTULO 2

### MATERIALES Y MÉTODOS

#### 2.1 Reactivos y Materia Prima

Los reactivos con los que se trabajó a lo largo del proyecto fueron grado reactivo. Los medios de cultivo son de la marca BD Bioxon, la celulosa comercial de Sigma-Aldrich y la inulina comercial de Agaviótica. Las hojas del *A. salmiana* fueron cortadas desde la base de la planta y posteriormente lavadas y descortezadas para eliminar la epidermis y la cutícula. El material restante fue cortado en piezas pequeñas y conservado a -20 °C.

Todos los residuos generados durante el proyecto fueron dispuestos conforme a lo establecido por el Departamento de Medio Ambiente y Seguridad de la Facultad de Ciencias Químicas.

## 2.2 Aislamiento de Microorganismos

Los microorganismos fueron aislados usando agar patata dextrosa (PDA) para hongos y levaduras, y agar Müller-Hinton (MHA) para bacterias. Los microorganismos fermentadores fueron aislados de una muestra de 100 mL de aguamiel de agave por la técnica de dilución y siembra en placa. Los hongos fueron aislados de una hoja de agave en descomposición. Para el aislamiento de los hongos, se tomó una muestra de 10 g de corteza de la hoja asépticamente y se transfirió a 90 mL de solución salina estéril, a partir de aquí se realizó la técnica de dilución y siembra en placa para el aislamiento de los hongos.

Una vez aislados, estos fueron conservados en tubos con agar LB (bacterias) y agar dextrosa Sabouraud (SDA) (hongos y levaduras). La morfología de los microorganismos fue observada por microscopía óptica.

## 2.3 Preparación de Inóculos

De no especificarse otra cosa, los inóculos de los microorganismos fueron preparados de la siguiente manera:

Las bacterias fueron inoculadas en tubos con 5 mL de agar LB e incubadas a 37 °C por 16 h. Posteriormente, las células fueron recuperadas con solución salina estéril y transferidas a un tubo con solución salina. La concentración de las

bacterias se ajustó a una D.O.<sub>630 nm</sub> de 0.25, que corresponde a  $3 \times 10^8$  UFC/mL. Para determinar la absorbancia se usó un espectrofotómetro Genesys 20.

Las levaduras fueron inoculadas en tubos con 5 mL de agar YM o PDA e incubadas a 28 °C por 24 h. De igual forma, las células fueron recuperadas con solución salina y ajustadas a una concentración de  $1 \times 10^7$  células/mL. Las levaduras fueron contadas con ayuda de una cámara de Neubauer.

Los hongos fueron cultivados en tubos con 5 mL de agar YM o PDA e incubados a 28 °C por 3-5 días, dependiendo de la cepa. Las esporas también fueron recuperadas con solución salina y con ayuda de la cámara de Neubauer, se ajustó su concentración a  $1 \times 10^6$  esporas/mL.

#### 2.4 Evaluación de la Producción de Celulasas

Debido a las diferencias morfológicas entre las fibras y el parénquima de las hojas (Fig. 2b), estas fueron separadas y empleadas de manera individual para la producción de celulasas. Una porción de biomasa congelada (Sección 2.1) fue liofilizada para facilitar la separación mecánica de las fibras y el parénquima. Posteriormente, las fibras se lavaron con agua caliente para remover los azúcares y el parénquima se usó tal cual. Una pequeña porción del parénquima fue usada para obtener nanocelulosa por un método previamente reportado por

el grupo de trabajo<sup>37</sup>. La celulosa microcristalina comercial de 20  $\mu\text{m}$  (MCC20) se usó como control en la producción de celulasas.

Además de trabajar con los hongos aislados de las hojas de agave, también se evaluaron hongos del cepario del Laboratorio de Biotecnología 1 y la cepa comercial *Aspergillus niger* ATCC 9142 con el fin de comparar la actividad enzimática.

Se prepararon matraces con 500 mg de sustrato (fibra, parénquima o MCC20) suplementados con 1 mg de sulfato de amonio y 1 mL de buffer de acetatos pH 5. Los matraces fueron esterilizados y posteriormente inoculados con 1 mL de una suspensión de esporas (Sección 2.3) e incubados por 14 días a 28° C y 150 rpm. Después de la incubación, las enzimas fueron recuperadas añadiendo 25 mL de buffer de acetatos pH 5 y transferidas a tubos cónicos de 50 mL. Los tubos fueron centrifugados a 4000 rpm por 20 min. El sobrenadante fue separado y usado como extracto enzimático crudo para hidrolizar 3 sustratos diferentes: fibra, parénquima y nanocelulosa.

Las hidrólisis se realizaron en tubos Eppendorf de 2 mL conteniendo 100  $\mu\text{L}$  de extracto crudo, 900  $\mu\text{L}$  de buffer de acetatos pH 5 y 10 mg de sustrato (fibra, parénquima o nanocelulosa). Los tubos se incubaron a 50 °C, 150 rpm por 24 h. Después de la hidrólisis, los azúcares fueron determinados por el método del

ácido 3,5 DNS<sup>62</sup> (Apéndice 1). Se conservaron los hongos cuyas enzimas generaron una mayor liberación de azúcares reductores a partir de la hidrólisis de los diferentes sustratos. Estos hongos fueron empleados para la producción de celulasas por FSS.

## 2.5 Evaluación de la Actividad Inulinasa de los Microorganismos Aislados

Se evaluó la capacidad de las levaduras y las bacterias aisladas de producir inulinasas. Se prepararon matraces con 30 mL de medio (inulina comercial 5%, peptona 1% y extracto de levadura 1%). Estos fueron esterilizados y posteriormente inoculados con 1 mL de una suspensión celular de cada microorganismo (Sección 2.3). Los matraces fueron incubados por 4 días a 30 °C, a 150 rpm.

Después del tiempo de incubación, el medio fue transferido a tubos cónicos de 50 mL y centrifugados a 4000 rpm por 20 min para separar el extracto enzimático crudo de las células. Las reacciones de hidrólisis se llevaron a cabo en tubos Eppendorf de 2 mL conteniendo 500 µL de extracto, 500 µL de buffer de acetatos pH 5 y 10 mg de inulina comercial. Los tubos fueron incubados por 20 min, 150 rpm a 37 °C. Posteriormente se midieron los azúcares liberados por el método del ácido 3,5 DNS. Se conservó el microorganismo cuyo extracto enzimático generó más azúcares reductores a partir de la hidrólisis de la inulina. Esta levadura fue empleada para la producción de inulinasas.

## 2.6 Evaluación de la Capacidad Fermentadora de los Microorganismos

Dado que en la fermentación alcohólica se libera dióxido de carbono, se realizó un *screening* preliminar para descartar aquellos microorganismos que no son capaces de producir gas a partir de glucosa. Cada microorganismo (hongo, bacteria o levadura) se inoculó en un tubo de ensayo con caldo YM suplementado con glucosa (5 g/L). Los microorganismos se incubaron por 4 días a 28 (hongos y levaduras) y 37 °C (bacterias). Los tubos de ensayo contenían tubos Durham invertidos, los cuales sirvieron para evidenciar la producción de gas.

## 2.7 Identificación Molecular de los Microorganismos

Se realizó la identificación molecular de los hongos y las levaduras mediante el análisis de la secuencia de la región del espaciador transcrito interno (ITS) del DNAr 5.8S. Para analizar estas secuencias, fue necesario extraer previamente el DNAg de los microorganismos y posteriormente amplificar esta región.

Para la extracción del DNAg de las levaduras se empleó el método de extracción con solventes (fenol-cloroformo). El DNAg de los hongos fue extraído con el kit comercial PowerSoil® DNAg de MoBio Laboratories. La extracción del DNAg se comprobó mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1%. Una vez extraído el DNAg, se utilizaron los primers ITS1 5' > 3' TCCGTAGGTGAACCTGCGG e ITS4 5' > 3' TCCTCCGCTTATTGATATGC para la amplificación.

Se utilizó el kit de MyTaq™ DNA Polymerase de BioLine para la amplificación. Las condiciones de las reacciones de PCR se llevaron a cabo conforme al protocolo recomendado por el fabricante (Apéndice 2). La verificación de las amplificaciones se realizó mediante una electroforesis en gel de agarosa al 2%.

Una vez comprobado que se obtuvieron las amplificaciones deseadas, estas se mandaron a secuenciar con la empresa Psomagen (<http://macrogenusa.com/>). Las secuencias fueron analizadas con la Herramienta Básica de Búsqueda de Alineación Local (BLAST) del National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

## 2.8 Producción de Celulasas

Una porción de biomasa lignocelulósica fue descongelada (Sección 2.1) y lavada con agua caliente para remover compuestos inorgánicos, colorantes y azúcares. Los azúcares reductores se midieron en el agua de lavado hasta comprobar que se eliminaron por completo de la biomasa. La biomasa fue secada en estufa de vacío por 2 días a 70 °C. Posteriormente, se molió con un molino Krups modelo GX410011 por un tiempo de un minuto.

Las fermentaciones se llevaron a cabo en matraces Erlenmeyer de 125 mL que contenían 3 g de biomasa molida y 12 mL de medio Mandel Weber modificado (por litro de medio: 2 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1.4 g de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 0.3 g de

MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.3 g de CaCl<sub>2</sub>, 1 mL de Tritón x-100, 1 g de peptona y 1 g de extracto de levadura, ajustado a pH 5). Los matraces fueron esterilizados y posteriormente inoculados con 3 mL de solución de esporas (Sección 2.3) de cada hongo. Los matraces se incubaron a 28 °C por tiempos de 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12 y 14 días, sin agitación. Los extractos enzimáticos crudos fueron recuperados conforme a los descrito previamente en la Sección 2.4.

### 2.9 Determinación de la Actividad Endoglucanasa, Exoglucanasa y β-glucosidasa

Las actividades endoglucanasa, exoglucanasa y β-glucosidasa fueron determinadas empleando carboxi metil celulosa (CMC), MCC20 y p-nitrofenil-β-D-glucopiranosido (pNPG) como sustratos, respectivamente. Los ensayos de actividad exoglucanasa y endoglucanasa se realizaron en tubos Eppendorf de 2 mL conteniendo 900 μL de buffer de acetatos pH 5, 100 μL del extracto enzimático y 10 mg de sustrato (CMC o MCC20). Los tubos se incubaron a 50 °C, 150 rpm por 2 h para actividad exoglucanasa y a 50 °C por 20 min y sin agitación para actividad endoglucanasa. Los azúcares liberados fueron medidos por el método del ácido 3,5 DNS.

La actividad β-glucosidasa se determinó incubando 50 μL del extracto enzimático y 200 μL de pNPG (en buffer de acetatos pH 5) a 50 °C por 10 min, sin agitación. Después de la incubación se añadió 1 mL de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0.2 M para detener la reacción. Posteriormente, se leyeron las absorbancias a una longitud

de onda de 405 nm para determinar la cantidad de p-nitrofenol (pNP) liberado de la reacción de hidrólisis.

Una vez que se determinó el día en que obtenía la mayor producción de cada enzima, se evaluó la influencia del pH y la temperatura sobre la actividad enzimática. Para ello se realizaron ensayos variando el pH de 3 a 10 y las temperaturas de hidrólisis de 30 a 90 °C. Una unidad de actividad (UA) se definió como la cantidad de extracto enzimático crudo que libera 1  $\mu\text{mol}$  de glucosa o pNP por minuto por gramo de biomasa bajo las condiciones de estudio.

## 2.10 Producción de Inulinasas

La biomasa lignocelulósica (Sección 2.1) fue descongelada y exprimida para obtener el jugo de agave. El jugo fue filtrado con ayuda de un embudo de filtración para eliminar restos de fibras de agave. Para Las fermentaciones se llevaron a cabo en matraces de 125 mL conteniendo 30 mL de jugo suplementado con medio mínimo (g/L:  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.4,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  1,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.3 y  $\text{CaCl}_2$  0.3, pH 5). El medio fue esterilizado y posteriormente inoculado con 500  $\mu\text{L}$  de una suspensión celular de la levadura ajustada a una D.O.<sub>630 nm</sub> de 0.5.

Los matraces se incubaron a 28 °C, 140 rpm a tiempos de 1, 2, 3 y 4 días. Posteriormente el sobrenadante fue recuperado en tubos cónicos de 50 mL y conservado para la determinación de la actividad inulinasas.

## 2.11 Determinación de la Actividad Inulinasa

La actividad se determinó en tubos Eppendorf de 2 mL conteniendo 300  $\mu$ L de extracto enzimático crudo y 1 mL de inulina 1.3 % (en buffer de acetatos pH 5). Los tubos se incubaron a 40 °C por 10 min, sin agitación. Posteriormente se determinaron los azúcares reductores por el método del ácido 3,5 DNS.

Una vez que se determinó el día en que obtenía la mayor producción de las inulinasas, se evaluó la influencia del pH y la temperatura sobre la actividad enzimática. Para ello se realizaron ensayos variando el pH de 3 a 10 y las temperaturas de hidrólisis de 30 a 90 °C. Una UA se definió como la cantidad de extracto enzimático crudo que libera 1  $\mu$ mol de fructosa por minuto por mililitro de medio bajo las condiciones de estudio.

## 2.12 Resistencia a Saponinas

Se trabajó con la levadura aislada del agave que presentó mayor actividad enzimática (sección 2.5) y cinco cepas de *S. cerevisiae*; cuatro empleadas comercialmente para la producción de cerveza artesanal (Windsor, Safale S-04, Safbrew S-33 y YPFEN), y una para la elaboración de productos de panificación (Tradi-Pan®).

100 mL del jugo de agave fueron concentrados mediante evaporación hasta un volumen de 10 mL para concentrar las saponinas. Para comprobar la presencia de saponinas, el concentrado se transfirió a un tubo cónico de 50 mL y se agitó para evidenciar la formación de espuma. Se midió el tiempo de permanencia de la espuma.

Primeramente, se evaluó si las levaduras eran capaces de crecer y fermentar utilizando el jugo de agave y diferentes fuentes de carbono (inulina, glucosa, fructosa y sacarosa). Los azúcares se prepararon al 3 % con medio mínimo (Sección 2.10) mientras que el jugo se usó tal cual. Las levaduras fueron inoculadas en tubos de ensayo con 7 mL de medio (jugo de agave o azúcares) incubadas por 3 días a 28 °C, sin agitación. Los tubos de ensayo contenían tubos Durham invertidos para poder observar la producción de gas.

Para evaluar el efecto de las saponinas sobre las levaduras se realizaron pruebas antimicrobianas de difusión en disco. Se prepararon cajas Petri con 20 mL de SDA las cuales fueron inoculadas con 200 µL de una suspensión de células ajustadas a una D.O.<sub>630 nm</sub> de 0.5. Se colocaron 3 discos impregnados con 10 µL del concentrado y un control impregnado con 10 µL de solución salina estéril. Las cajas fueron incubadas por 20 h a 28 °C de forma invertida. Después de la incubación se midieron los halos de inhibición.

### 2.13 Producción de Azúcares por Hidrólisis Enzimática

Una vez determinado el hongo con mayor actividad enzimática, este se empleó para producir una cantidad suficiente de azúcares para los ensayos de producción de etanol. Las enzimas fueron producidas por FSS. La biomasa (molida) para el ensayo fue obtenida conforme a lo descrito en la sección 2.8.

Los ensayos se llevaron a cabo en matraces de 125 mL los cuales contenían 3 g de biomasa y 12 mL de medio mínimo (Sección 2.10). Estos fueron esterilizados e inoculados con 3 mL de solución de esporas ( $1 \times 10^6$  esporas/mL) e incubados a 28 °C por 10 días, sin agitación.

Después de la incubación, se añadieron 30 mL de buffer de acetatos pH 5 a cada matraz. Para recuperar una mayor cantidad de enzimas, el contenido del matraz fue transferido a una jeringa para exprimir la biomasa con ayuda del émbolo. El extracto enzimático fue recuperado en tubos cónicos de 50 mL.

Una porción de la biomasa obtenida previamente fue tamizada para separar las fibras del parénquima. Este tejido parenquimatoso fue sometido a hidrólisis enzimática para la producción de azúcares, mientras que las fibras fueron descartadas. Los ensayos se realizaron en tubos Eppendorf de 2 mL conteniendo 1000  $\mu$ L de buffer de acetatos pH 5, 500  $\mu$ L del extracto enzimático crudo y 10

mg de parénquima. Los tubos se incubaron a 50 °C y 150 rpm, a tiempos de 0, 12, 24 y 48 h. Después de cada tiempo, los azúcares fueron determinados por el método del ácido 3, 5 DNS. Los ensayos se realizaron por triplicado.

Para obtener una mayor cantidad de azúcares, las hidrólisis se llevaron a cabo en tubos cónicos de 50 mL. Los tubos contenían 450 mg de parénquima, 20 mL de buffer de acetatos pH 5 y 10 mL del extracto enzimático crudo. Los tubos se incubaron a 50 °C, 150 rpm por 3 días. Después de la hidrólisis, los tubos fueron centrifugados y los sobrenadantes se recuperaron en un frasco de 1 L. Posteriormente, se determinaron los azúcares reductores y se conservaron a -20 °C hasta su uso.

#### 2.14 Producción de Bioetanol

Para la producción de etanol, el jugo de agave y el hidrolizado enzimático (Sección 2.13) fueron usados como sustratos, de forma separada. Se trabajó con la levadura aislada que presentó mayor actividad enzimática. Para la producción de etanol por co-fermentación se usó la levadura comercial Safale S-04 junto con la cepa aislada.

Las levaduras fueron inoculadas en tubos Hach con 5 mL de SDA e incubadas a 28 °C por 20 h. Posteriormente, las células fueron recuperadas con solución salina y ajustadas a una D.O.<sub>630 nm</sub> de 0.5. Se prepararon 2 matraces con 50 mL

de jugo de agave suplementado con medio mínimo (Sección 2.10) y 2 con 50 mL de caldo patata dextrosa (PDB). Los matraces fueron esterilizados y posteriormente inoculados; los que contenían jugo de agave fueron inoculados con 1 mL de la levadura aislada, mientras que los que contenían PDB fueron inoculados con 1 mL de la levadura comercial. Las levaduras fueron incubadas a 28 °C, 120 rpm por 24 h.

Después de la incubación, el contenido de cada matraz fue transferido a tubos cónicos de 50 mL y centrifugados a 4000 rpm por 10 min para obtener los paquetes celulares. El medio fue decantado y las células fueron lavadas dos veces con agua desmineralizada estéril para eliminar restos de medio y posibles metabolitos tóxicos que se hubieran producido.

De los dos tubos cónicos con los paquetes celulares de cada levadura, uno fue resuspendido en jugo de agave y el otro con el hidrolizado enzimático obtenido en la sección 2.3. Todos los tubos fueron ajustados a una D.O.<sub>630 nm</sub> de 0.5. Las células resuspendidas en jugo de agave se usaron como inóculo para la fermentación del jugo, mientras que las resuspendidas en el hidrolizado para la fermentación del hidrolizado enzimático.

Las fermentaciones se llevaron a cabo en frascos de 60 mL con tapón de goma. El jugo de agave y el hidrolizado fueron suplementados con algunos

nutrientes [g/L:  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  2,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  1.4,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.3,  $\text{CaCl}_2$  0.3, peptona 3 y extracto de levadura 3, el pH se ajustó a 5]. Los frascos fueron esterilizados y posteriormente inoculados bajo las condiciones descritas en la tabla 2.

Tabla 2.- Condiciones para las fermentaciones alcohólicas.

	Condición 1	Condición 2	Condición 3	Condición 4
Jugo	40.5 mL	-	36.0 mL	-
Hidrolizado	-	40.5 mL	-	36.0 mL
Levadura aislada	4.5 mL	4.5 mL	4.5 mL	4.5 mL
Levadura comercial	-	-	4.5 mL	4.5 mL
Volumen final	45.0 mL	45.0 mL	45.0 mL	45.0 mL

Los frascos se incubaron por 24, 48 y 72 h a 28 °C sin agitación. Después de cada tiempo de incubación, se tomaron alícuotas de 2 mL para su análisis por Cromatografía de Gases (CG) para la determinación de etanol. La determinación de etanol se realizó en un Cromatógrafo de gases HP6890 Agilent G1530A. Se usó una columna Agilent 19091z-433 (30 m, 0.25 mm, 0.25  $\mu\text{m}$ ). La temperatura inicial fue de 70 °C por 1 min, seguida de una rampa de 10 °C/min hasta 220 °C. El tiempo total de la corrida fue de 16 min. La temperatura del inyector se mantuvo a 200 °C y la del detector a 250 °C. El volumen de muestra inyectada fue de 1  $\mu\text{L}$  con una jeringa de 10  $\mu\text{L}$ .

Los azúcares también fueron monitoreados durante la fermentación. Los azúcares totales fueron medidos con ayuda de un refractómetro manual para medir los °Brix, mientras que los azúcares reductores fueron determinados por el método del ácido 3,5 DNS. Los ensayos se realizaron por duplicado.

## CAPÍTULO 3

### RESULTADOS

#### 3.1 Aislamiento de los Microorganismos

A partir de las hojas de agave y el aguamiel se aislaron varias colonias de microorganismos, crecidas tanto en PDA, como en MHA. Se consiguieron aislar 21 colonias de bacterias, 5 de levaduras y 8 de hongos. Las claves asignadas para los microorganismos fueron B1–B21, L1–L5 y H1–H8 para las bacterias, levaduras y hongos, respectivamente. La Figura 3 muestra las principales estructuras representativas y morfologías de los microorganismos aislados.

Las bacterias presentan morfologías de tipo bacilo y coco, y en algunos bacilos se observa que son capaces de producir exo-polisacáridos. En cuanto a las levaduras, cuatro de ellas fueron aisladas del aguamiel y solo una de las hojas, mientras que todos los hongos fueron aislados de las hojas. En algunos de los hongos aislados se observan conidióforos en forma de pincel, típicos de los *Penicillium*<sup>63–66</sup>. Los demás hongos aislados presentan macroconidios, típicos de hongos del género *Fusarium*<sup>58,67</sup>.

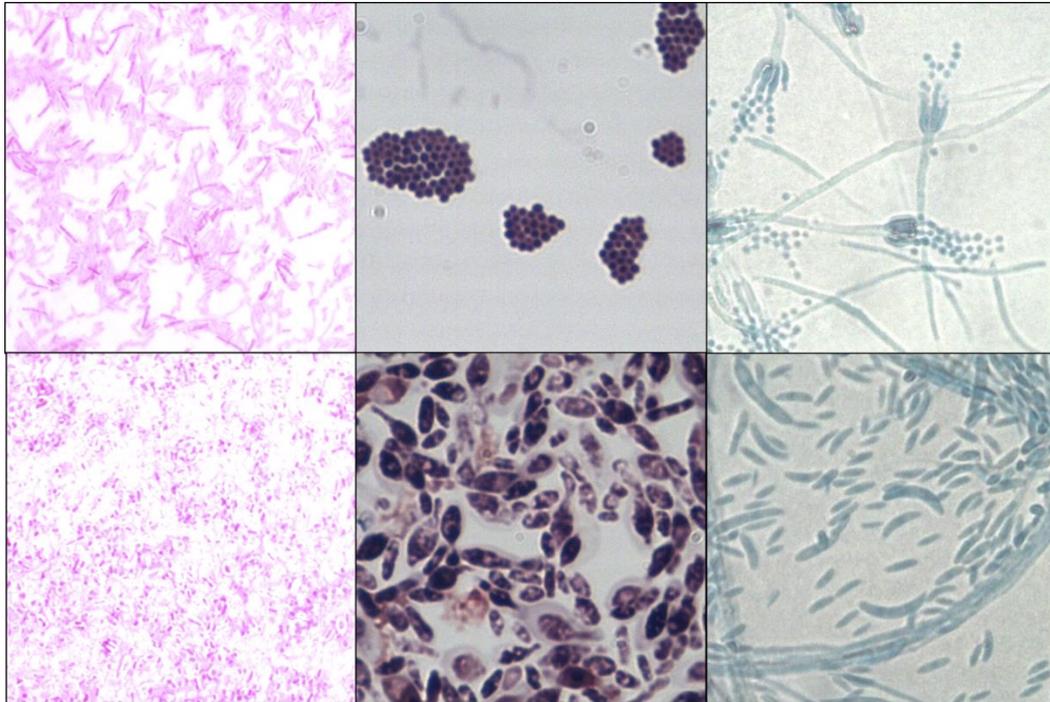


Figura 3. Principales morfologías y estructuras representativas de las bacterias (izquierda), levaduras (centro) y hongos (derecha) aislados del agave y del aguamiel (observados a 40 y 100x).

### 3.2 Evaluación de la Producción de Celulasas

Los hongos aislados, los del cepario del laboratorio de Biotecnología y el hongo de referencia *A. niger* fueron cultivados en tres diferentes fuentes de carbono: celulosa comercial, fibras y parénquima de las hojas de agave.

Ningún hongo fue capaz de crecer utilizando la celulosa comercial como fuente de carbono. Solo en cinco matraces se pudo observar la formación de algunas esporas, indicando poco crecimiento. Sin embargo, al recuperar los extractos enzimáticos crudos, no se pudo determinar la actividad enzimática, ya

que no se observó generación de azúcares reductores a partir de las hidrólisis de los diferentes sustratos (fibra, parénquima y nanocelulosa).

Todos los hongos fueron capaces de utilizar las fibras y el parénquima. Se observó un mayor crecimiento de los hongos en los matraces que contenían parénquima como fuente de carbono (Fig. 4a). A la semana se observó un mayor crecimiento en comparación de cuando se emplearon las fibras, donde le llevó a los hongos dos semanas el poder desarrollarse.

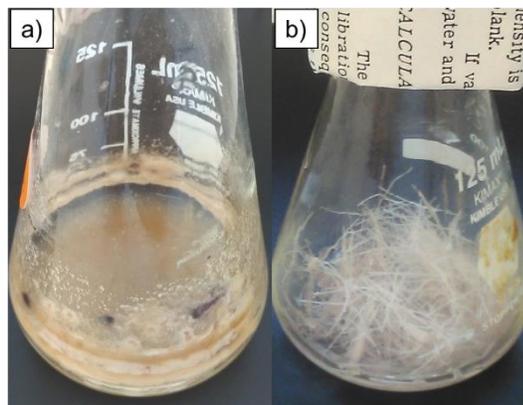


Figura 4. Comparación del crecimiento del mismo hongo sobre parénquima (a) y fibras (b) de agave.

La Fibra, el parénquima y la MCC20 fueron sujetas a hidrólisis con los extractos enzimáticos crudos recuperados de los hongos crecidos en fibra y en parénquima como fuentes de carbono. En las tablas 3 y 4 se muestran los resultados de los hongos en los que se observó mayor actividad. Los hongos H6 y H7 fueron aislados de las hojas de agave.

Tabla 3. Azúcares reductores liberados (mg/mL) de la hidrólisis de los diferentes sustratos con el extracto enzimático recuperado de los hongos crecidos en parénquima.

Microorganismo	Fibra	Parénquima	Nanocelulosa
<i>A. niger</i> ATCC 9142	ND	1.20	ND
H6	ND	0.88	ND
H7	ND	0.91	ND

ND no detectado.

Tabla 4. Azúcares reductores liberados (mg/mL) de la hidrólisis de los diferentes sustratos con el extracto enzimático recuperado de los hongos crecidos en las fibras.

Microorganismo	Fibra	Parénquima	Nanocelulosa
<i>A. niger</i> ATCC 9142	0.24	0.90	1.11
H6	0.23	0.80	0.95
H7	0.17	0.90	1.07

Las enzimas recuperadas de los hongos que fueron cultivados con parénquima solo fueron capaces de hidrolizar el parénquima. No se observó hidrólisis de los otros dos sustratos. Por otro lado, se observó hidrólisis de los tres sustratos usando las enzimas recuperadas de los hongos cultivados en las fibras de agave.

### 3.3 Evaluación de la Producción de Inulinasas

Las levaduras y las bacterias aisladas fueron inoculadas en medios de cultivo que contenían inulina comercial como fuente de carbono. A excepción de cuatro bacterias, todos los demás microorganismos fueron capaces de crecer bajo las condiciones de estudio.

En la Tabla 5 se muestran los resultados obtenidos de la hidrólisis de inulina comercial empleando el extracto enzimático recuperado de las fermentaciones

de los diferentes microorganismos. Se observó que una bacteria destacó sobre los demás microorganismos (B8). En general, se aprecia que los extractos enzimáticos de las levaduras liberaron una mayor cantidad de azúcares reductores a partir de la hidrólisis de la inulina comercial en comparación con las bacterias (a excepción de la B8).

Tabla 5. Azúcares reductores liberados de la hidrólisis de inulina comercial con los extractos enzimáticos obtenidos por fermentación.

Microorganismo	mg/mL de azúcares reductores	Microorganismo	mg/mL de azúcares reductores
B1	0.63	B15	0.40
B3	0.50	B16	0.84
B4	0.90	B17	0.70
B6	0.46	B18	0.64
B7	0.40	B19	0.60
B8	1.06	B20	0.50
B9	0.42	L1	0.51
B10	0.35	L2	1.00
B11	0.38	L3	0.98
B13	0.79	L4	0.90
B14	0.65	L5	0.88

### 3.4 Evaluación de la Capacidad Fermentativa de los Microorganismos

Todos los microorganismos aislados de las hojas de agave y del aguamiel fueron cultivados en medio líquido con un capilar invertido con la finalidad de observar la generación de dióxido de carbono a partir de la fermentación de la glucosa. Ninguna bacteria u hongo fue capaz de producir gas, solamente cuatro de las cinco levaduras presentaron esta característica (Fig. 5).

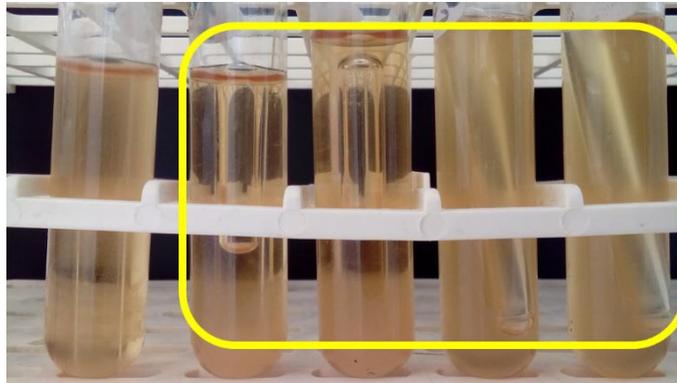


Figura 5. Producción de CO<sub>2</sub> en caldo YM suplementado con glucosa, empleando las levaduras aisladas. El cuadro muestra el gas acumulado dentro de los tubos Durham.

### 3.5 Identificación Molecular de los Microorganismos

Se extrajo el DNAg de las cinco levaduras y de los hongos H6 y H7. En la Figura 6 se observan las bandas de la extracción del DNAg de los microorganismos. Las bandas correspondientes a los hongos se ven más tenues, lo que significa que se extrajo una menor cantidad de DNA. Sin embargo, fue suficiente para poder realizar la amplificación de los fragmentos ITS.

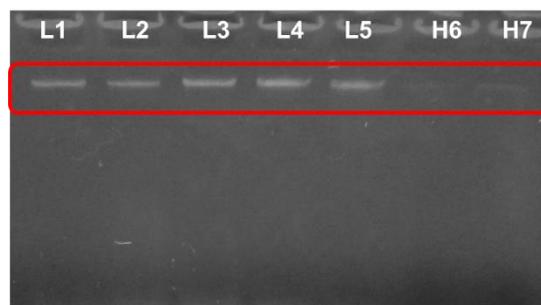


Figura 6. Gel de agarosa al 1 % mostrando las bandas obtenidas de la extracción del DNAg. El cuadro rojo muestra la localización de las bandas obtenidas.

La Figura 7 muestra los fragmentos de DNA amplificados por PCR utilizando los primers ITS1 e ITS4. Las bandas se encuentran a una altura de entre 500 y 700 pb. Estos fragmentos corresponden con los reportado en la bibliografía para el DNAr 5.8S<sup>67,68</sup>.

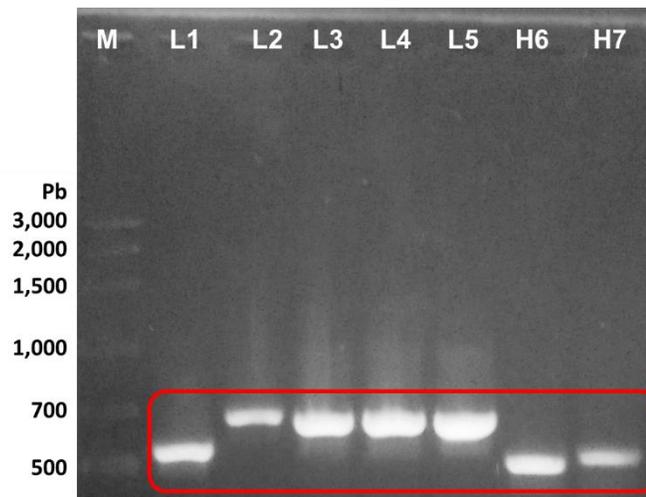


Figura 7. Gel de agarosa al 2% mostrando los fragmentos amplificados por PCR de los microorganismos. El cuadro rojo muestra la localización de las bandas obtenidas.

Las secuencias obtenidas de la amplificación de la región del ITS 5.8S se reportan en el Apéndice 3. Dichas secuencias se analizaron utilizando el programa bioinformático BLAST del NCBI. La Tabla 6 muestra los resultados obtenidos del análisis. Las secuencias de las levaduras L2–L5 fueron similares por lo que fueron consideradas como la misma levadura; *Hanseniaspora uvarum*. Las diferencias en los % de identidad son debidas a pequeños errores durante la secuenciación (Apéndice 3), donde algunos nucleótidos (A, T, C o G) fueron reportados con la letra N, lo cual indica que no fue determinada la base nitrogenada exacta. Por tal motivo, fueron consideradas como la misma levadura.

Tabla 6. Resultados del análisis BLAST mostrando las secuencias que produjeron alineamientos significativos en relación con los microorganismos aislados.

Microorganismo aislado	Microorganismo identificado	% de identidad	Número de acceso
Levadura L1	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	99.82	MN170556.1
Levadura L2	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	99.52	MK267742.1
Levadura L3	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	99.56	MK267742.1
Levadura L4	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	99.8	KF728823.1
Levadura L5	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	96.47	KF728823.1
	<i>Fusarium proliferatum</i>	99.79	MK105817.1
Hongo H6	<i>Fusarium fujikuroi</i>	99.79	MN396539.1
	<i>Fusarium oxysporum</i>	99.79	MN272281.1
	<i>Penicillium rubens</i>	93.22	MN413181.1
Hongo H7	<i>Penicillium chrysogenum</i>	93.22	MN262086.1
	<i>Penicillium dipodomycicola</i>	93.22	MK461921.1

De acuerdo con los resultados los análisis BLAST, los hongos que presentaron mayor actividad glucosídica son pertenecientes a los géneros *Fusarium* y *Penicillium*. Sin embargo, el análisis arrojó tres posibles especies para cada uno (Tabla 6). Debido a lo anterior, para complementar los resultados obtenidos del análisis molecular se realizaron microcultivos y cultivos en placa de ambos hongos para observar sus características macroscópicas y microscópicas y así determinar las especies.

En la Figura 8 se observa la morfología por microscopia óptica y el tipo de crecimiento en placa de los dos hongos. El hongo *Penicillium* presenta colonias aterciopeladas de color verde, mientras que al microscopio se observan conidióforos hialinos, con fiálides sobre métulas y conidias en forma de cadena, Las colonias del hongo *Fusarium* son algodonosas de color blanco y producen un pigmento morado, por otro lado, al microscopio se observan macroconidias fusiformes con septos transversales y microconidias elipsoidales.

Realizando una extensiva búsqueda bibliográfica y comparando con perfiles morfológicos reportados para estas especies de hongos, se determinó que, por sus condiciones de crecimiento, características macroscópicas y microscópicas los hongos H6 y H7 corresponden a *Fusarium oxysporum* y a *Penicillium chrysogenum*, respectivamente<sup>58,63–65,67,69</sup>.

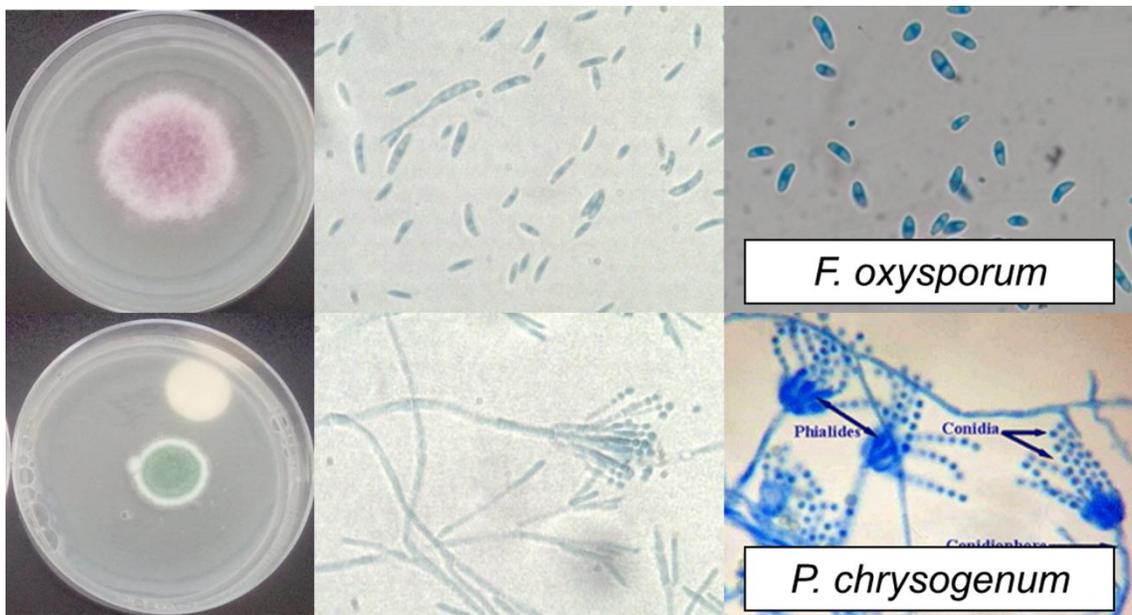


Figura 8. Imágenes del crecimiento en placa (izquierda), y comparación de la morfología de los hongos aislados (centro) contra los microorganismos de referencia (derecha).

### 3.6 Producción de Celulasas

Las celulasas fueron producidas por FSS empleando los hongos *A. niger* ATCC 9142, *F. oxysporum* y *P. chrysogenum* cultivados a 28 °C a diferentes tiempos. La Figura 9 muestra la producción de las celulasas (en función de su actividad) producidas por estos hongos, utilizando la celulosa de las hojas de *A. salmiana* como fuente de carbono (fibras y parénquima).

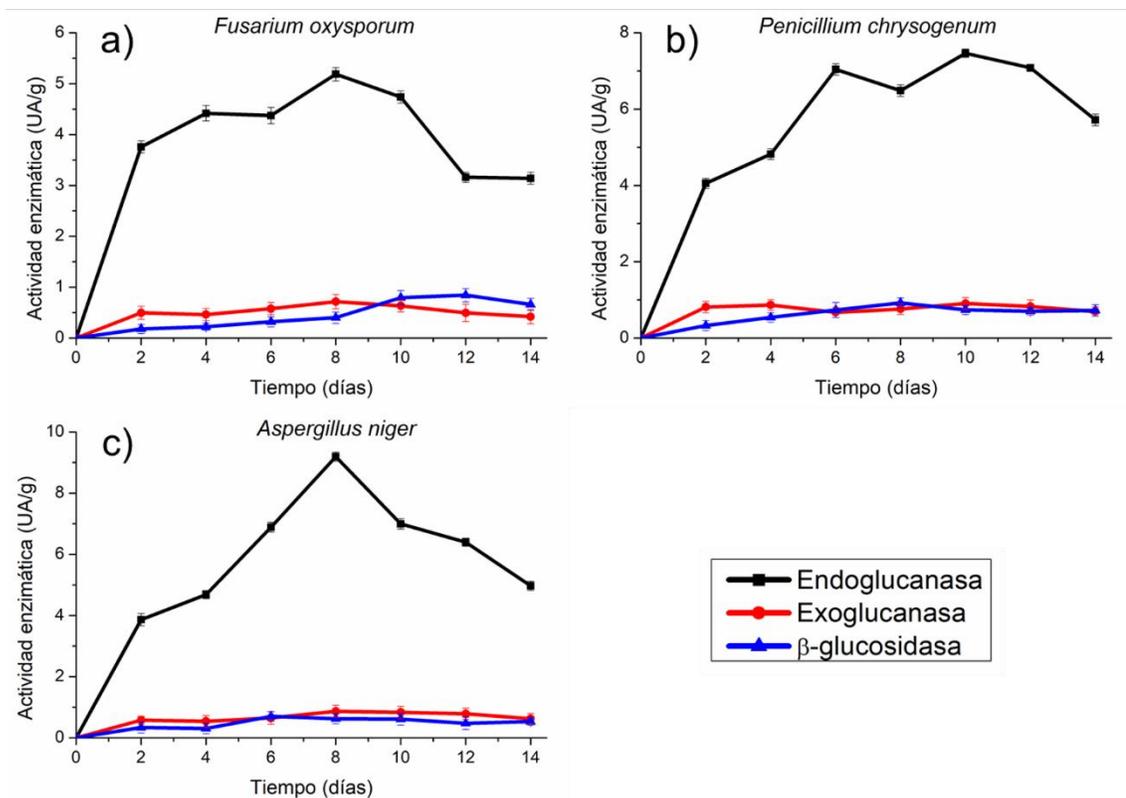


Figura 9. Producción de celulasas por FSS empleando los hongos *F. oxysporum* (a), *P. chrysogenum* (b) y *A. niger* (c).

La actividad de todas las enzimas producidas por los hongos fue detectada después de dos días de fermentación. En el caso de *Penicillium*, la actividad exoglucanasa incrementó significativamente desde el día 2 y permaneció constante hasta los diez días, disminuyendo lentamente después de ese día. Las actividades endoglucanasa y β-glucosidasa estuvieron incrementando hasta los días 6 y 8, respectivamente. Sin embargo, la actividad β-glucosidasa mostró una rápida disminución después del día 8, mientras la endoglucanasa conservó su actividad hasta el día 12.

Las endo- y exoglucanasas producidas por *F. oxysporum* tuvieron un comportamiento similar a lo largo de la fermentación, alcanzando su actividad máxima al día 8 y disminuyendo rápidamente a partir de eso. La actividad  $\beta$ -glucosidasa fue aumentando progresivamente a lo largo del tiempo hasta alcanzar su máxima actividad al día 12.

En el caso de la cepa comercial de *A. niger*, el comportamiento de las tres enzimas fue muy similar durante los días de la fermentación. La actividad  $\beta$ -glucosidasa alcanzó su mayor actividad al día 8, mientras que las actividades endo- y exoglucanasas, al día 10 de la fermentación.

### 3.7 Efecto del pH y la Temperatura sobre la Actividad Enzimática de las Celulasas

La Figura 10 muestra el efecto que tuvo el pH sobre la actividad enzimática de las celulasas producidas por los hongos. El pH óptimo para las endo- y exoglucanasas de los tres hongos fue entre 4 y 5. Variaciones en el pH disminuyen significativamente la actividad de estas dos enzimas. El pH óptimo para la  $\beta$ -glucosidasa fue diferente en cada hongo (entre 4 y 6), a diferencia de las otras dos enzimas, éstas son más tolerantes a las variaciones en el pH.

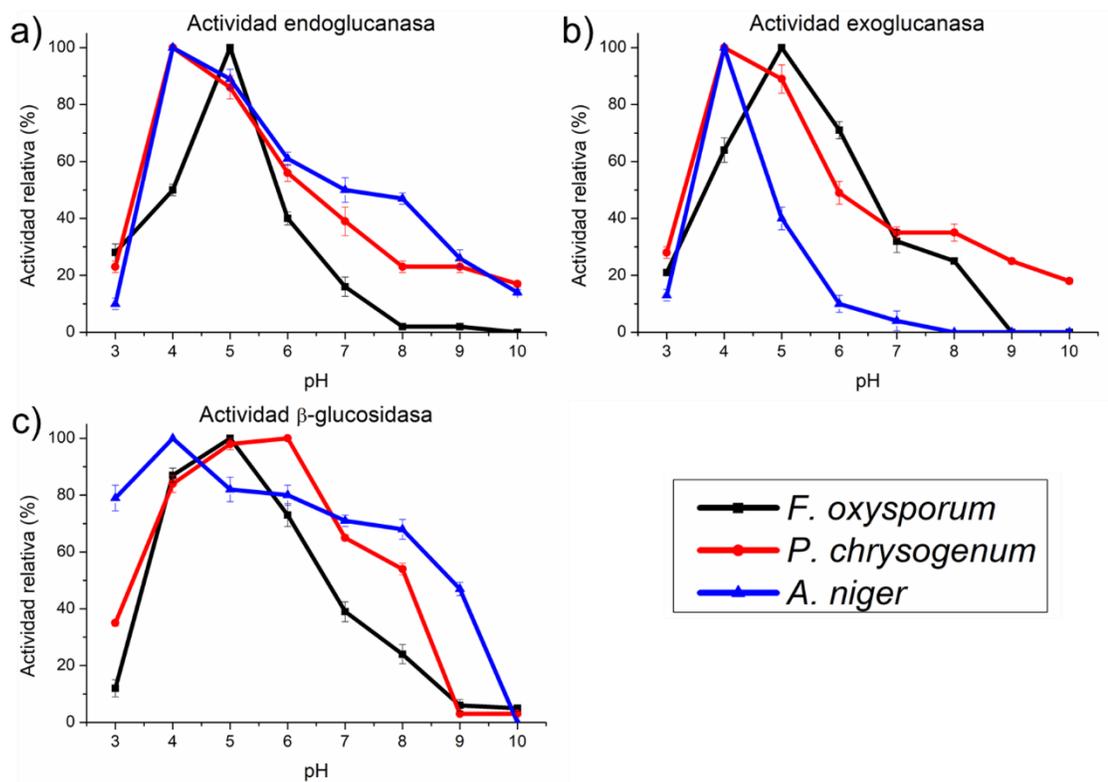


Figura 10. Efecto del pH sobre la actividad endoglucanasa (a), exoglucanasa (b) y  $\beta$ -glucosidasa (c) de cada hongo.

La Figura 11 muestra el efecto de la temperatura sobre la actividad de las enzimas. En general, las celulasas producidas por los hongos aislados tienen actividad a temperaturas más altas que las producidas por el hongo comercial; destacando las celulasas de *P. chrysogenum*, que presentan su mayor actividad a temperaturas de 50 y 70 °C. Ninguna de las enzimas mostró actividad arriba de 80 °C.

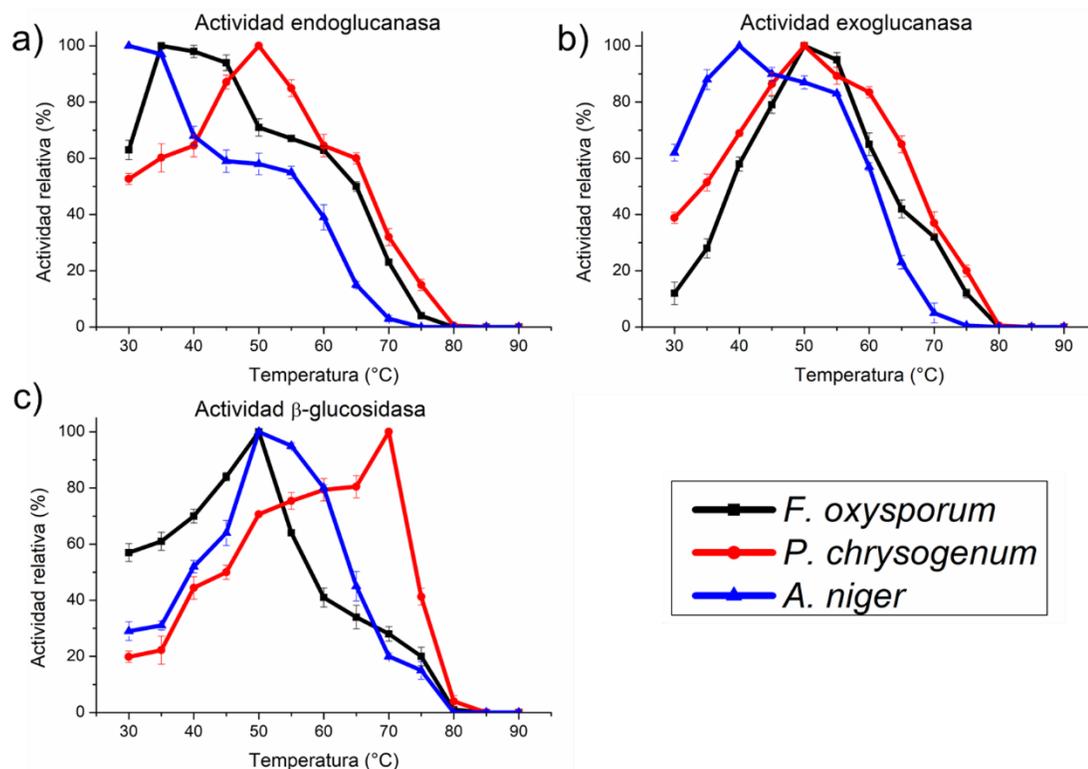


Figura 11. Efecto de la temperatura sobre la actividad endoglucanasa (a), exoglucanasa (b) y β-glucosidasa (c) de cada hongo.

Una vez determinadas las temperaturas y pH óptimos de cada enzima, se realizaron los ensayos enzimáticos bajo esas condiciones, para determinar la máxima actividad enzimática de cada una. En la tabla 7 se muestran los resultados obtenidos.

Tabla 7. Máxima actividad enzimática determinada para cada enzima bajo las condiciones de estudio.

Hongo	Enzima	Actividad UA/g
<i>P. chrysogenum</i>	Endoglucanasa	14.40
	Exoglucanasa	3.50
	β-glucosidasa	4.14
<i>F. oxysporum</i>	Endoglucanasa	10.50
	Exoglucanasa	1.50
	β-glucosidasa	1.20
<i>A. niger</i> ATCC 9142	Endoglucanasa	11.40
	Exoglucanasa	1.00
	β-glucosidasa	1.10

Dado que las tres celulasas de *P. chrysogenum* mostraron una mayor actividad en comparación con las enzimas de los otros dos hongos, esta cepa se eligió para la producción de azúcares reductores a partir de la hidrólisis enzimática del tejido parenquimatoso de las hojas de agave.

### 3.8 Producción de Inulinasas

La producción de inulinasas se llevó a cabo con la levadura *H. uvarum*, ya que fue la que presentó mayor actividad enzimática (Sección 3.3). La levadura se incubó por 4 días con jugo de agave como fuente de carbono. También se determinó el pH y la temperatura óptimos de la enzima. En la Figura 12 se muestran los resultados obtenidos.

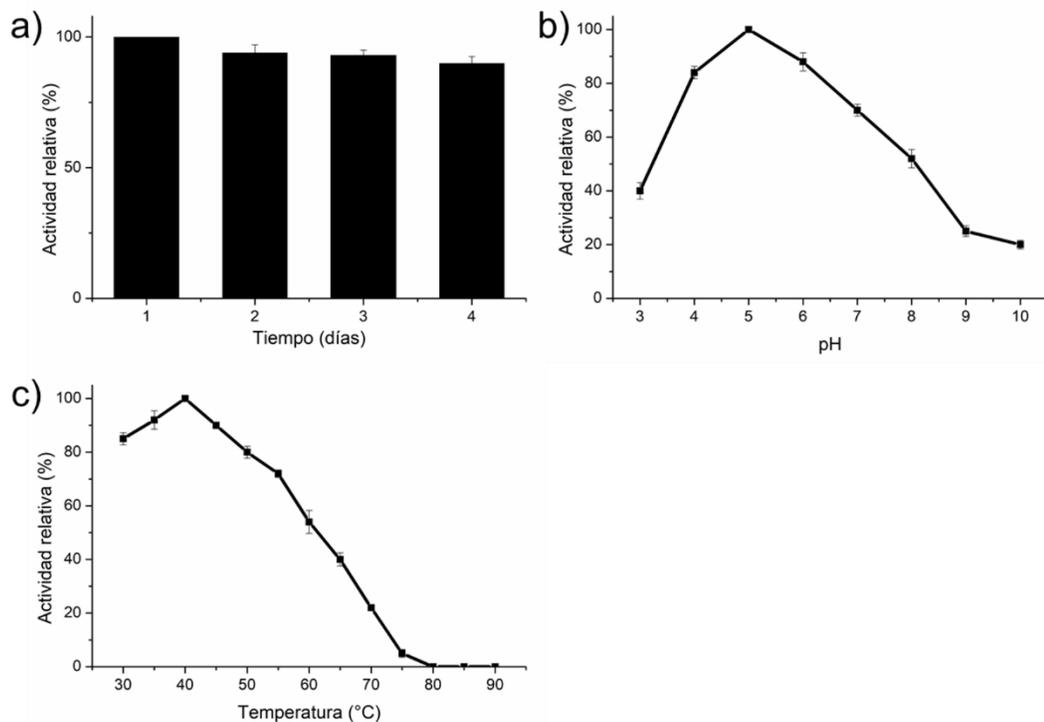


Figura 12. Producción de inulinasas por *H. uvarum* (a) y el efecto del pH (b) y la temperatura (c) sobre su actividad enzimática.

Al primer día de incubación se alcanzó la máxima producción de inulinasas. Al transcurrir los días la actividad fue disminuyendo muy lentamente. Por tanto, no es necesario extender el tiempo de fermentación más de un día, para la obtención de mayor actividad inulinasa.

Su temperatura óptima fue de 40 °C y su pH óptimo de 5. Variaciones en el pH disminuyen su actividad. La enzima tiene estabilidad en un rango de temperatura de 30–55 °C. A temperaturas de 30 °C presenta una actividad arriba del 80 %, que es una temperatura cercana a la de su crecimiento de 28 °C. La mayor actividad enzimática fue de 180.5 UA/mL, la cual fue determinada realizando la hidrólisis de inulina bajo las condiciones óptimas de temperatura y pH.

### 3.9 Resistencia a Saponinas

Se evaluó la capacidad de las levaduras de poder crecer y fermentar a partir del jugo de agave y otros carbohidratos como fuente de carbono. En la Tabla 8 se muestran los resultados obtenidos.

Tabla 8. Crecimiento y producción de gas de las levaduras utilizando diferentes fuentes de carbono.

Levaduras	Jugo	Inulina	Sacarosa	Glucosa	Fructosa
<i>H. uvarum</i>	+	+	-	+	+
Windsor	-	+	+	+	+
Safale S-04	-	+	+	+	+
Safbrew S-33	-	+	+	+	+
YPFEN	-	+	+	+	+
Tradi-Pan®	-	+	+	+	+

+: crecimiento y producción de gas; -: sin crecimiento.

*H. uvarum* fue la única levadura capaz de utilizar el jugo de agave. También demostró ser capaz de fermentar los demás azúcares, a excepción de la sacarosa. Por otro lado, las levaduras comerciales pudieron crecer y fermentar utilizando todos los azúcares, pero no demostraron ser capaces de crecer en el jugo de agave.

Los resultados de la actividad antimicrobiana de las saponinas sobre las diferentes levaduras se muestran en la Tabla 9. No se observó la formación de una zona de inhibición en *H. uvarum*. Los niveles de inhibición son similares en las levaduras comerciales.

Tabla 9. Ensayo antimicrobiano de las saponinas presentes en las hojas de *A. salmiana* por el método de difusión en disco.

Levaduras	Zona de inhibición (mm)
<i>H. uvarum</i>	NI
Windsor	9 ± 0.2
Safale S-04	11 ± 0.3
Safbrew S-33	9.4 ± 0.1
YPFEN	9 ± 0.1
Tradi-Pan	10 ± 0.2

NI: no presentó inhibición.

### 3.10 Producción de Azúcares por Hidrólisis Enzimática

La hidrólisis enzimática del parénquima de las hojas de *A. salmiana* se llevó a cabo con el extracto enzimático crudo producido por FSS por el hongo *P. chrysogenum*, el cual demostró tener la mayor actividad celulolítica de los hongos

de estudio (sección 3.7). La Figura 13 muestra el porcentaje de hidrólisis del parénquima.

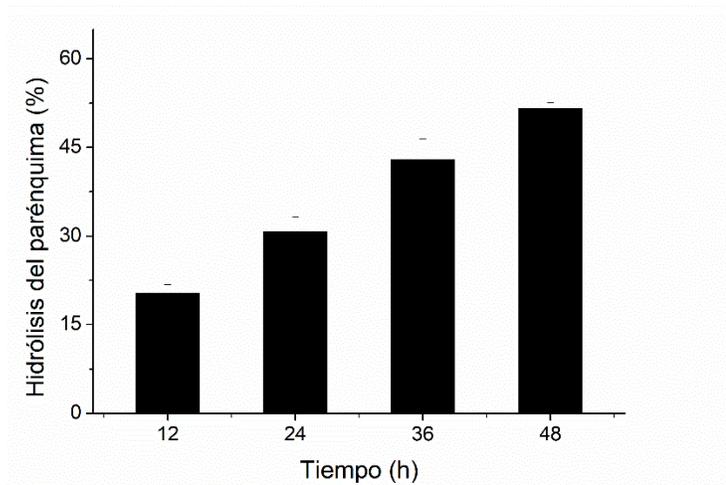


Figura 13. Porcentaje de hidrólisis de las células parenquimatosas por el extracto enzimático crudo a diferentes tiempos.

Para producir una mayor cantidad de azúcares para la fermentación alcohólica fue necesario escalar el proceso de hidrólisis enzimática a un mayor volumen (450 mg de parénquima, 20 mL de buffer y 10 mL de extracto enzimático crudo). Las hidrólisis se realizaron en tubos cónicos de centrifuga de 50 mL por un tiempo de 3 días.

Al final se logró hidrolizar el parénquima en un 56 %, un porcentaje un poco mayor que el obtenido a los 2 días de hidrólisis. Posteriormente, el contenido de todos los tubos se transfirió a un frasco de plástico de un litro para juntar los hidrolizados y usarlos en la producción de bioetanol.

### 3.11 Producción de Bioetanol

La producción de bioetanol se llevó a cabo conforme a las condiciones indicadas en la Tabla 2 (sección 2.14). Durante los siete días que duraron las fermentaciones se monitoreó la producción de etanol, así como el consumo de azúcares. En las Figuras 14 y 15 se muestran los resultados obtenidos.

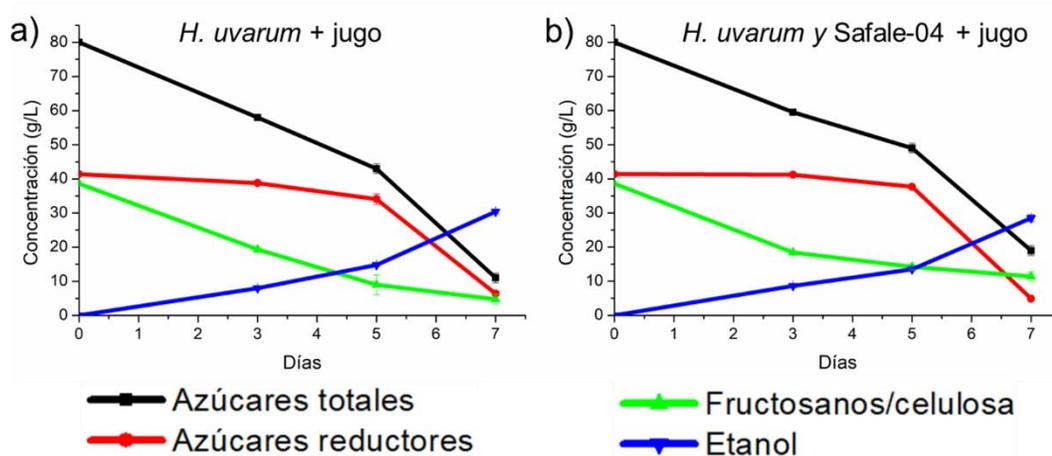


Figura 14. Producción de etanol por fermentación (a) y co-fermentación (b) del jugo de agave.

El jugo de agave tenía una concentración inicial de azúcares de 80 g/L, de los cuales 41.4 g correspondían a azúcares simples y el resto a inulina. Al final de la fermentación y co-fermentación del jugo de agave quedaron 11 y 19 g/L de azúcares totales, respectivamente. La levadura *H. uvarum* generó 30.4 g/L de etanol al final de la fermentación, mientras que en co-cultivo con la levadura Safale-04 se generaron 28.5 g/L.

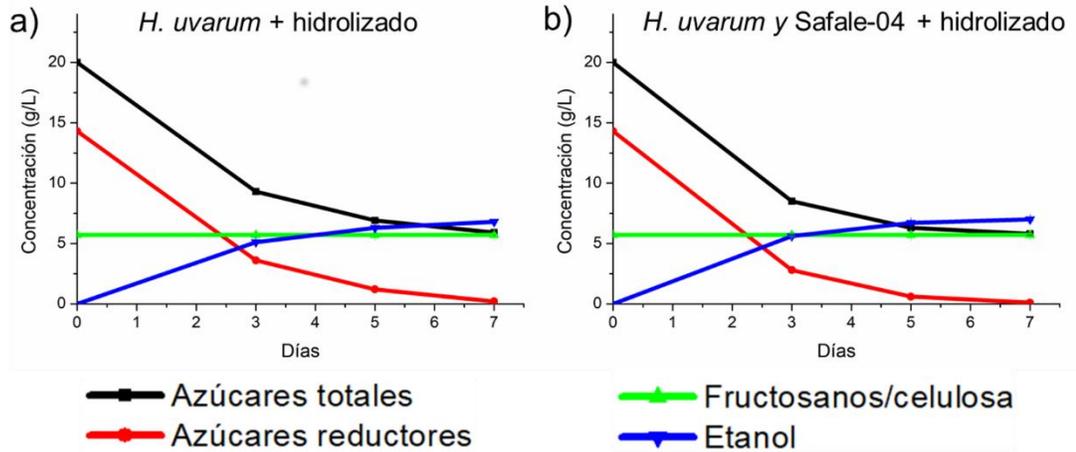


Figura 15. Producción de etanol por fermentación (a) y co-fermentación (b) del hidrolizado enzimático.

El hidrolizado enzimático obtenido del parénquima de las hojas de agave se utilizó sin una filtración previa a la fermentación. Por tal motivo, tenía una concentración inicial de 20 g/L de azúcares totales, de los cuales 14.3 g correspondían a glucosa y el resto a celulosa y oligosacáridos que no fueron hidrolizados por las enzimas. Al final de la fermentación la levadura *H. uvarum* produjo 6.8 g/L de etanol, mientras que en la co-fermentación se generaron 7 g/L, una cantidad muy similar. En ambas fermentaciones se consumió por completo la glucosa, quedando solamente la celulosa y los oligosacáridos.

## CAPÍTULO 4

### DISCUSIÓN DE RESULTADOS

#### 4.1 Celulosa de Agave como Fuente de Carbono para la Producción de Celulasas

La celulosa presenta dos diferentes morfologías dentro de las hojas de *Agave salmiana*, forma parte de las fibras que dan soporte y rigidez a la planta y también se encuentra como parte de la pared celular de las células parenquimatosas, las cuales sirven para el almacenamiento de agua y nutrientes<sup>37,70</sup>. Por tal motivo, se evaluó la capacidad de los hongos de poder utilizar ambas celulosas como fuente de carbono.

Como se mostró en la sección 3.2, los hongos crecieron mucho más rápido cuando fueron cultivados en el parénquima que en las fibras de agave (Fig. 4). Sin embargo, cuando se utilizaron los extractos enzimáticos crudos para hidrolizar los tres diferentes sustratos, el extracto enzimático recuperado de los hongos crecidos sobre el parénquima solo fue capaz de hidrolizar el parénquima, mientras que el recuperado de los hongos crecidos en las fibras hidrolizó los tres

sustratos: fibra, parénquima y nanocelulosa aislada del parénquima (Tablas 3 y 4).

Las fibras fueron lavadas para remover azúcares y otros compuestos, mientras que el parénquima se usó tal cual. Dado que el extracto enzimático recuperado del crecimiento de los hongos en el parénquima solo pudo hidrolizar el parénquima y no las fibras ni la nanocelulosa (aislada del parénquima), se dedujo que los hongos no produjeron celulasas durante la fermentación o las produjeron en una cantidad demasiado baja como para no detectarse la liberación de azúcares durante las hidrólisis (Tabla 3). Por otro lado, se observó liberación de azúcares a partir de la hidrólisis del parénquima. Probablemente, los hongos produjeron inulinasas para hidrolizar los fructosanos presentes. Hongos del género *Aspergillus* ya han sido reportados como productores de inulinasas<sup>16,18,71,72</sup>.

El extracto enzimático recuperado de los hongos crecidos sobre las fibras fue capaz de hidrolizar los tres sustratos. Dado que las fibras fueron lavadas para eliminar otros azúcares, quedando exclusivamente la celulosa de la fibra como fuente de carbono, los hongos tuvieron que producir celulasas para desarrollarse. La nanocelulosa es la celulosa aislada de la pared celular de las células parenquimatosas<sup>73</sup>, por tanto, los azúcares liberados de la hidrólisis del

parénquima, son derivados de la digestión de la celulosa y no de los fructosanos presentes.

En hábitats naturales, los microorganismos regulan su producción de enzimas para un uso más eficiente de la fuente de carbono disponible<sup>74</sup>. Anteriormente, se ha reportado que la adición de glucosa al medio de cultivo favorece el rápido crecimiento de los hongos, pero suprime la actividad celulolítica<sup>75</sup>. Dado que las células parenquimatosas contienen azúcares simples, estos fueron utilizados rápidamente por los hongos antes que la celulosa, por tanto, la producción de celulasas por los hongos se vio limitada (Tabla 3). En el caso de las fibras, al no existir otra fuente de carbono, los hongos tuvieron que producir celulasas para poder desarrollarse.

Como se mencionó anteriormente, los principales factores involucrados en la hidrólisis de la celulosa son la porosidad, la cristalinidad y el contenido de lignina y hemicelulosa<sup>43</sup>. Cuando la biomasa es más porosa, las enzimas pueden acceder más fácilmente al sustrato favoreciendo la hidrólisis. Una biomasa con alta cristalinidad será más recalcitrante y difícil de hidrolizar. Por otro lado, una biomasa libre de lignina y hemicelulosa también será fácil de hidrolizar, debido a que no existen componentes que limiten el acceso de las enzimas. La tabla 10 muestra las principales diferencias entre los tipos de sustratos sujetos a hidrólisis enzimática.

Tabla 10. Características generales de los diferentes tipos de celulosa.

	Fibras	Nanocelulosa	Parénquima
Medidas	Espesor de ~500 $\mu\text{m}$	Espesor de ~80 nm y longitudes mayores a 20 $\mu\text{m}$	
Pureza	No	Sí	No
Índice de cristalinidad	~72	58.2	45

La nanocelulosa y el parénquima son más fáciles de hidrolizar en comparación con las fibras debido a la baja cristalinidad y pequeño tamaño que poseen. Al ser más pequeñas aumenta el área superficial y el contacto de las enzimas con el sustrato, lo que provoca una mayor hidrólisis<sup>38</sup>.

Las diferencias en la hidrólisis de la nanocelulosa y el parénquima pueden estar relacionadas por las diferencias estructurales entre ambas fuentes de carbono<sup>37</sup>. Durante la obtención de la nanocelulosa a partir del parénquima se remueven los azúcares presentes, además, se elimina la lignina que recubre la celulosa, lo cual la hace más fácil de hidrolizar que la celulosa presente en la pared celular del parénquima<sup>42</sup>.

En un trabajo previo del grupo de trabajo, el parénquima de las hojas de agave fue tratado bajo tres condiciones diferentes para la obtención de nanocelulosa: con agua caliente, peróxido de hidrógeno y ácido sulfúrico<sup>42</sup>. Los análisis por Difracción de rayos X mostraron la eliminación de azúcares simples en las tres muestras y la eliminación de lignina con el tratamiento con peróxido y ácido

sulfúrico. Además, se realizó un experimento donde las diferentes nanocelulosas obtenidas fueron sujetas a hidrólisis con una celulasa comercial. Se reportó que los tres tratamientos favorecieron la liberación de azúcares.

Dado los resultados obtenidos en este trabajo, junto con lo reportado previamente por el grupo de trabajo, se considera importante el minimizar o eliminar los azúcares simples de la biomasa lignocelulósica antes de llevar a cabo una fermentación para inducir la producción de celulasas desde el inicio. Las hojas de agave contienen altas cantidades de azúcares solubles<sup>35,39</sup> que se pueden extraer al exprimir las hojas después de un proceso de congelación-descongelación. Estos azúcares pueden ser aprovechados para otros fines. En este proyecto, el jugo que se obtuvo al exprimir la biomasa fue usado para la producción de inulinasas y para la producción de etanol por fermentación alcohólica.

La biomasa exprimida contiene fibra, parénquima y azúcares residuales. Esta fue lavada con agua caliente para eliminar restos de azúcares que hayan quedado. Ya que la biomasa contiene en su mayoría celulosa, se decidió molerla para aumentar el área superficial (de la fibra, principalmente) y utilizarla para la producción de celulasas por fermentación en sustrato sólido. Con la finalidad de reducir pasos simplificando y eficientizando el proceso de producción de

enzimas, no se consideró apropiado separar las fibras del parénquima y se optó por trabajar con la biomasa únicamente molida.

#### 4.2 Microorganismos Productores de Inulinasas

Se evaluó la capacidad de las levaduras y las bacterias aisladas del agave de producir inulinasas. A excepción de cuatro bacterias, todos los demás microorganismos fueron capaces de utilizar la inulina como fuente de carbono y de producir inulinasas (Tabla 5). Los extractos enzimáticos obtenidos de una bacteria (B8) y de cuatro levaduras (L2–L5) fueron los que generaron una mayor liberación de azúcares reductores a partir de los experimentos de hidrólisis de la inulina comercial.

El aguamiel es obtenido a partir de los magueyes, principalmente del *A. salmiana* y *A. furcroydes*<sup>76</sup>. El aguamiel es un líquido rico en carbohidratos (principalmente fructosanos), minerales y proteínas que puede consumirse fresco o fermentarse para la obtención del pulque<sup>77</sup>. Se ha analizado la microbiota de esta bebida y se ha encontrado una gran variedad de bacterias y levaduras<sup>76–78</sup>.

Debido a que los fructosanos son la principal fuente de carbono en el aguamiel, se esperaba que todos los microorganismos aislados fueran capaces

de crecer utilizando la inulina comercial, sin embargo, cuatro cepas no fueron capaces de desarrollarse.

En un consorcio microbiano conviven microorganismos de diferentes géneros y especies, por tanto, no todos son capaces de generar los mismos metabolitos o enzimas<sup>79</sup>. Unos dependen de otros para producir enzimas necesarias que hidrolicen los carbohidratos a azúcares más simples que puedan utilizar<sup>80</sup>. Probablemente, las cuatro bacterias que no crecieron no eran capaces de producir inulinasas para poder desarrollarse de manera autónoma. Sin embargo, la mayoría de las bacterias y las levaduras sí produjeron inulinasas, por eso fueron capaces de crecer usando la inulina comercial como fuente de carbono.

#### 4.3 Microorganismos Fermentadores

Se realizó un *screening* para identificar aquellos microorganismos que son capaces de producir dióxido de carbono por fermentación de la glucosa. El experimento se realizó con todos los microorganismos aislados del agave, de los cuales solo cuatro levaduras fueron capaces de generar este gas (Fig. 5).

Dentro de la microbiota de los alimentos y bebidas fermentadas, existen muchos microorganismos que son responsables de la fermentación, no solo levaduras del género *Saccharomyces*, si no también levaduras no *Saccharomyces*, como *Kluyveromyces*, *Kloeckera* y *Hanseniaspora* y bacterias

como *Zymomonas* y *Lactobacillus*<sup>23–27,81</sup>. Inclusive, se han reportado especies de *Fusarium* que pueden producir etanol en condiciones de anaerobiosis<sup>52,56,57</sup>.

#### 4.4 Identificación de los Microorganismos

Se realizó la identificación molecular de las cinco levaduras y de los hongos H6 y H7 mediante el análisis de la región del ITS del DNAr 5.8S. Estas regiones son secuencias de gran importancia para distinguir especies de hongos y levaduras por análisis de PCR<sup>68</sup>.

El DNAg de las levaduras se extrajo mediante el método de extracción con solventes, mientras que el de los hongos con un kit comercial. Ambas técnicas resultaron adecuadas para la extracción del DNAg (Fig. 6). Por lo general, la extracción del material genético de los hongos resulta costosa, difícil y tediosa, ya que se necesitan procedimientos agresivos para poder lisar el micelio, como por ejemplo el tratamiento con nitrógeno líquido, el uso de perlas de vidrio o la sonicación<sup>81</sup>. Sin embargo, con el uso del kit se evitan estos procedimientos.

Mediante el análisis BLAST se identificaron dos tipos de levaduras en los aislados, *R. mucilaginosa* y *H. uvarum*. Ambas especies de levaduras ya han sido reportadas como parte de la microbiota de las plantas de agave<sup>76,78</sup>, por lo que las levaduras coinciden con lo ya reportado en la bibliografía. Debido a que *H. uvarum* mostró ser capaz de producir dióxido de carbono por la fermentación de

glucosa y tener mayor actividad glucosídica, se decidió utilizar esta levadura para la obtención de inulinasas y la producción de etanol.

De acuerdo con el análisis BLAST y con las características macroscópicas y microscópicas de los hongos, estos se identificaron como *F. oxysporum* y *P. chrysogenum*. Estos resultados concuerdan con lo reportado anteriormente por Vega-Ramos *et al.* 2013 y Contreras-Hernández *et al.* 2018 quienes reportan que ambos hongos están relacionados con las especies de agaves, siendo *Fusarium* un patógeno para estas plantas<sup>58,82</sup>.

#### 4.5 Producción de Celulasas

Las celulasas fueron producidas por FSS empleando los hongos *A. niger* ATCC 9142, *F. oxysporum* y *P. chrysogenum*. Los resultados se mostraron en la Figura 8.

Las exoglucanasas son las enzimas responsables de la hidrólisis de las porciones cristalinas de la celulosa<sup>9</sup>. Las fibras de agave tienen un alto índice de cristalinidad (Tabla 10), similar a la celulosa comercial, por eso es necesario que estas enzimas estén activas durante toda la fermentación para poder hidrolizar las fibras y utilizarlas como fuente de carbono<sup>41,42</sup>. En el caso de *Penicillium*, se puede observar que la actividad es constante a partir del día 2. La actividad

exoglucanasa de *Fusarium* y *Aspergillus* empieza a disminuir paulatinamente después de alcanzar su máxima actividad.

Las endoglucanasas se encargan de hidrolizar las regiones amorfas de la celulosa<sup>9</sup>. El parénquima del agave es un material con menor cristalinidad, por tanto, tiene más regiones amorfas en su estructura (Tabla 10). En las hojas de *A. salmiana*, el parénquima y las fibras se encuentran en una relación 4.5:1 parénquima:fibra<sup>42</sup>. Probablemente, esto contribuyó a que la actividad endoglucanasa fuera mucho mayor en los tres hongos en comparación con la actividad de las otras dos enzimas.

Las endo- y exoglucanasas de *Fusarium* y *Penicillium* tienden a aumentar muy rápidamente desde el inicio de la fermentación, superando el 60 % de actividad. También muestran un comportamiento similar entre ellas a lo largo de toda la fermentación, indicando que están utilizando tanto las fibras como el parénquima al mismo tiempo. Las enzimas producidas por *Aspergillus* tienen un aumento muy lento de su actividad, en comparación con los hongos aislados del agave.

La sinergia entre endoglucanasas y exoglucanasas genera celobiosa, la cual posteriormente es hidrolizada por las  $\beta$ -glucosidasas<sup>83</sup>. Este disacárido es un fuerte inhibidor de las endo- y exoglucanasas, por eso, es necesaria la constante actividad de la  $\beta$ -glucosidasa, para mantener la concentración de celobiosa al

mínimo y evitar así la inhibición de las otras enzimas. En los tres hongos se puede observar que la disminución en la  $\beta$ -glucosidasa después alcanzar el día de mayor actividad conduce a una lenta pérdida de actividad en las otras enzimas. Por tanto, no es necesario extender el tiempo de las fermentaciones, ya que el punto de actividad máxima para cada enzima se alcanzó antes de los 12 días.

En la figura 9 se mostró el efecto que tuvo el pH sobre la actividad enzimática de las distintas celulasas. El pH óptimo para cada una de las enzimas de estudio está dentro del rango de los ya reportados para otros microorganismos en diferentes trabajos (Tabla 11).

Tabla 11. pH óptimo de las celulasas producidas por diferentes microorganismos.

Microorganismo	Endoglucanasa	Exoglucanasa	$\beta$ -glucosidasa	Ref
<i>A. niger</i> ATCC 9142	4	4	4	Presente trabajo
<i>P. crysogenum</i>	4	4	6	
<i>F. oxysporum</i>	5	5	5	
<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	4.5	5	4.5	84
<i>Penicillium</i> sp.	4.5	NR	NR	85
<i>Pyrococcus furiosus</i>	NR	NR	6	86
<i>A. niger</i>	NR	NR	4	87
<i>Symbiobacterium thermophilum</i>	5	5	NR	88
<i>Paenibacillus xylanilyticus</i> M33	5	NR	NR	89

Ref: referencias; NR: No reportado

En la Figura 10 se observó la influencia que tuvo la temperatura en la actividad enzimática de las distintas celulasas. A medida que aumenta la temperatura aumenta la velocidad de reacción y, por tanto, la actividad enzimática<sup>90</sup>. Una vez

que las enzimas alcanzan su máxima actividad, está disminuye considerablemente conforme aumenta la temperatura. Esta inactivación de las enzimas es debido a su desnaturalización<sup>90</sup>.

La temperatura a la que la desnaturalización se vuelve importante varía de una enzima a otra. Normalmente es insignificante por debajo de 30 °C, y comienza a ser apreciable por encima de los 40 °C<sup>90,91</sup>. En este trabajo, destacaron las enzimas de *Penicillium*, las cuales mostraron la mayor actividad a 50 °C (endoglucanasa y exoglucanasa) y 70 °C ( $\beta$ -glucosidasa). En la tabla 12 es posible comparar los resultados obtenidos con lo reportado en otros trabajos.

Tabla 12. Temperatura óptima de las celulasas producidas por diferentes microorganismos (°C).

Microorganismo	Endoglucanasa	Exoglucanasa	$\beta$ -glucosidasa	Ref
<i>A. niger</i> ATCC 9142	30	40	50	Presente trabajo
<i>P. crysogenum</i>	50	50	70	
<i>F. oxysporum</i>	35	50	50	
<i>T. longibrachiatum</i>	60	50	NR	84
<i>Penicillium</i> sp.	65	NR	NR	85
<i>P. furiosus</i>	NR	NR	100	86
<i>A. niger</i>	NR	NR	65	87
<i>S. thermophilum</i>	55	45	NR	88
<i>Amycolaptosis</i> sp.	60	60	NR	75
<i>P. xylanilyticus</i> M33	40	NR	NR	89

Ref: referencias; NR: No reportado

Las hidrólisis enzimáticas industriales que se realizan a menos de 50 °C muestran tasas de hidrólisis lentas, lo que genera bajas cantidades de azúcares a partir de la biomasa lignocelulósica. Además, son propensas a la contaminación microbiana. En tales casos, se requiere una alta cantidad de enzima. Por esta

razón se ha sugerido el uso de enzimas que trabajen a altas temperaturas para superar estas limitaciones<sup>92</sup>. Las enzimas de *Penicillium* y *Fusarium* podrían ser convenientemente útiles para emplearse en procesos industriales debido a que tienen actividad a altas temperaturas.

Una vez que se encontraron las condiciones óptimas de pH y temperatura, se determinó la temperatura óptima de cada enzima. En la tabla 7 se observa que las enzimas de *Penicillium* destacaron sobre las de los otros hongos de estudio. En la tabla 13 se hace una comparación de las celulasas producidas por *P. chrysogenum* con lo reportado en otros trabajos.

Las condiciones de las fermentaciones, así como los microorganismos y la biomasa usada, son los principales factores que influyen en la actividad enzimática y la cantidad de celulasas producidas por fermentación en sustrato sólido<sup>11,94,96</sup>; por lo tanto, una comparación realista de la producción de enzimas por diferentes microorganismos y fuentes de carbono como se reporta en la literatura puede no ser posible debido a las diferentes condiciones de fermentación descritas por cada grupo de investigación<sup>94</sup>. Sin embargo, las enzimas producidas por el hongo aislado, *P. chrysogenum*, mostraron tener una mayor actividad enzimática en comparación con otras especies de *Penicillium* (Tabla 13).

Tabla 13. Actividad enzimática de celulasas producidas por FSS.

Enzima	Microorganismo	Fuente de carbono	Actividad (U/g)	Ref.	
Endoglucanasa	<i>Penicillium citrinum</i> MTSS 6489	Salvado de trigo	7.56	93	
		Salvado de arroz	10.20		
		Paja de arroz	3.72		
	<i>Fomitopsis</i> sp. RCK2010	Salvado de trigo	71.70	94	
		<i>A. niger</i>	Harina de soya	35.10	95
		<i>A. nidulans</i> AKB25	Frijol negro	152.14	96
		<i>P. citrinum</i> CBMAI 1186	Salvado de trigo	1.93	97
<i>P. chrysogenum</i>	Hojas de <i>A. salmiana</i>	14.40	PT		
Exoglucanasa	<i>Penicillium citrinum</i> MTSS 6489	Salvado de trigo	6.88	93	
		Salvado de arroz	2.56		
		Paja de arroz	4.56		
	<i>Fomitopsis</i> sp. RCK2010	Salvado de trigo	3.49	94	
		<i>A. niger</i>	Harina de soya	0.55	95
		<i>A. nidulans</i> AKB25	Frijol negro	3.42	96
		<i>P. citrinum</i> CBMAI 1186	Salvado de trigo	1.33	97
<i>P. chrysogenum</i>	Hojas de <i>A. salmiana</i>	3.50	PT		
β-glucosidasa	<i>Fomitopsis</i> sp. RCK2010	Salvado de trigo	53.68	94	
		<i>A. nidulans</i> AKB25	Frijol negro	35.11	96
	<i>P. citrinum</i> CBMAI 1186	Salvado de trigo	0.22	97	
	<i>P. chrysogenum</i>	Hojas de <i>A. salmiana</i>	4.14	PT	

Ref: referencia. PT: presente trabajo

#### 4.6 Producción de Azúcares Reductores por Hidrólisis Enzimática

Como se mencionó anteriormente, la celulosa presente en la pared celular de las células parenquimatosas resultó ser más fácil de hidrolizar que la celulosa de las fibras (Sección 4.1). Por tal motivo, el parénquima fue separado de las fibras y usado para la obtención de azúcares. La biomasa molida se utilizó para la producción de las enzimas (Sección 2.8 y 4.1)

Los procesos físicos de corte y molienda son útiles para el procesamiento de la biomasa lignocelulósica, ya que logran disminuir el tamaño de partícula, aumentando el área superficial<sup>98</sup>. Sin embargo, estos pretratamientos físicos no tienen impacto para eliminar otros componentes físicos como cera, lignina, azúcares, ni mejoran considerablemente la digestibilidad de la celulosa, es por eso por lo que los pretratamientos químicos (alcalinos o ácidos) se han vuelto necesarios para mejorar la desmineralización de la celulosa<sup>43</sup>.

Para favorecer la hidrólisis de la biomasa y obtener una mayor cantidad de azúcares, fue necesario utilizar una gran cantidad de extracto enzimático crudo, con lo que se logró hidrolizar el parénquima en un 56 % en un tiempo de 48 horas (Fig. 13). Aunque el parénquima utilizado para la obtención de azúcares no recibió un pretratamiento químico, se logró una alta conversión de la biomasa. El porcentaje de hidrólisis obtenido fue similar al reportado por otros autores que han trabajado con especies de *Agave*<sup>36,38,99</sup>. Como se demostró anteriormente, el parénquima fue más fácil de hidrolizar que las fibras de agave debido a su mayor área superficial (Tablas 3 y 4).

Por lo tanto, además de seleccionar el método de pretratamiento más apropiado y el complejo enzimático, también sería conveniente considerar la porción más digerible de la biomasa como otro factor a considerar durante la hidrólisis enzimática.

#### 4.7 Producción de Inulinasas

La producción de inulinasas se llevó a cabo con la levadura *H. uvarum* utilizando el jugo de agave como fuente de carbono. La máxima actividad enzimática obtenida de la inulinasa fue de 180.5 U/mL, llevada a cabo bajo las condiciones óptimas de pH y temperatura de la enzima (pH de 5 a 40 °C). En la tabla 14 se compara la actividad de la inulinasa producida por la levadura aislada con la actividad reportada para otros microorganismos.

Tabla 14. Actividad enzimática de inulinasas producidas por diferentes microorganismos.

Microorganismo	Fuente de carbono	Actividad (UA/mL)	pH óptimo	Temperatura óptima (°C)	Ref.
<i>H. uvarum</i>	Fructosanos de hojas de <i>A. salmiana</i>	180.5	5	40	Presente trabajo
<i>K. marxianus</i> ATCC 16045	Sacarosa	176	NR	NR	100
<i>P. guilliermondi</i>	Inulina	60	6	60	17
<i>K. marxianus</i>	Extracto de Dalia	1.52	4	50	19
<i>A. niger</i>	Achicoria de Jerusalén	185	NR	NR	16
<i>E. coli</i> recombinante*	Medio LB	44.40	5.3	45	20

Ref: Referencia; NR: no reportado. \*Se expresó el gen rInuAHJ7 de *Arthrobacter* sp. HJ7 en *E. coli*.

No se encontraron reportes previos donde se haya evaluado la producción de enzimas por microorganismos del género *Hanseniaspora*. Sin embargo, se puede observar que su actividad es alta en comparación con otros microorganismos. Tamang *et al.* 2016 reportaron los principales géneros de levaduras iniciadoras en alimentos fermentados y bebidas alcohólicas; donde se encontró la presencia de *Hanseniaspora*<sup>24</sup>. Esto explicaría la alta actividad inulinasa, ya que al ser una

de las levaduras iniciadoras del proceso de fermentación, participaría en la producción de azúcares fermentables para su utilización por otros microorganismos.

#### 4.8 Resistencia a Compuestos Antimicrobianos

Las plantas de agave contienen saponinas, unos glúcidos esteroideos capaces de inhibir el crecimiento de los microorganismos durante la fermentación<sup>61, 101</sup>. Ya que las saponinas son capaces de generar espuma, el jugo de agave fue agitado para observar la formación y la persistencia de la espuma, como una forma cualitativa de identificar su presencia en el jugo de agave.

La Figura 16 muestra la presencia de saponinas en el extracto de las hojas de *A. salmiana* mediante la generación de espuma. La permanencia de la espuma fue por más de 20 minutos, también se observa que las saponinas están presentes aún después de la esterilización del jugo. Por esta razón, se evaluó la resistencia de *H. uvarum* a las saponinas.

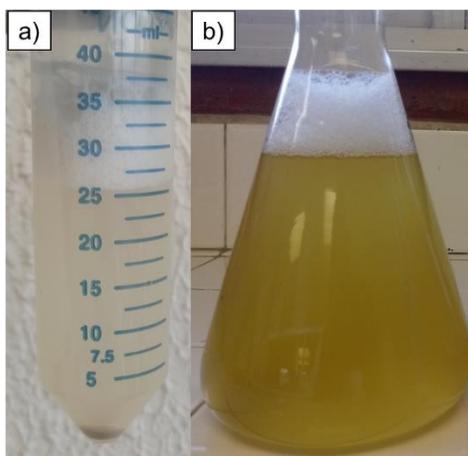


Figura 16. Presencia de saponinas en el jugo de agave antes (a) y después (b) de la esterilización.

La inulina, la glucosa, la sacarosa y la fructosa son de los principales carbohidratos que se encuentran presentes en las especies de agave<sup>40, 102</sup>. Las levaduras comerciales mostraron ser capaces de utilizar estos azúcares, sin embargo, no fueron capaces de crecer en el jugo de agave (Tabla 8), lo que indica que en este se encuentra presente algún metabolito que inhibe su desarrollo.

Por otro lado, la levadura aislada sí fue capaz de crecer en el jugo de agave y fermentarlo, mostrando la misma capacidad cuando fue cultivada con glucosa y fructosa como fuente de carbono. Sin embargo, no fue capaz de utilizar la sacarosa.

La invertasa es la enzima que se encarga de hidrolizar la sacarosa a glucosa y fructosa<sup>103</sup>. Se desarrolló un experimento adicional para verificar si *H. uvarum* no produce esta enzima. El experimento se llevó a cabo bajo la misma

metodología de la Sección 2.11, pero utilizando sacarosa en lugar de inulina. El extracto no fue capaz de hidrolizar la sacarosa, por tanto, se demostró que *H. uvarum* no produce invertasas.

Li *et al.* 2012 determinaron la composición química de diferentes especies de agave y reportaron que las hojas de *A. salmiana* son las que presentan una menor cantidad de sacarosa ( $\sim 0.5$  g/L)<sup>102</sup>. Probablemente, dentro del microbioma del agave, son otros los microorganismos que se encargan de su consumo.

A diferencia de *H. uvarum*, las levaduras comerciales se vieron inhibidas por las saponinas en el ensayo antimicrobiano. Comparando los resultados obtenidos del crecimiento de los microorganismos en el jugo de agave y otros azúcares (Tabla 8) con las pruebas de actividad antimicrobiana (Tabla 9), se demostró que las levaduras comerciales fueron inhibidas por la presencia de saponinas en el jugo de *A. salmiana*, ya que éstas permanecen en el jugo aún después de su esterilización (Fig. 16).

Verástegui *et al.* 2008 evaluaron la actividad antimicrobiana de extractos de cuatro especies de agave (*A. lechuguilla*, *A. picta*, *A. scabra* y *A. lophanta*)<sup>101</sup>. Todos los extractos mostraron actividad inhibitoria sobre hongos y levaduras, y solo el extracto de *A. picta* mostró actividad sobre bacterias patógenas, como *E. coli*, *V. cholerae* y *S. aureus*.

Alcázar *et al.* 2016 demostraron que los extractos de *A. duranguensis* y *A. salmiana* tienen actividad contra especies de *S. cerevisiae* usadas para la fermentación, pero no contra *K. marxianus*, una levadura aislada del agave, la cual presentó actividad saponinasa, recuperándose de una exposición a las saponinas<sup>61</sup>. También existen hongos capaces de producir tomatinasa, una enzima que hidroliza las saponinas, permitiéndoles desarrollarse en plantas que producen estos compuestos<sup>104</sup>. Ya que la levadura *H. uvarum* fue aislada de las hojas del *A. salmiana*, probablemente sea capaz de producir alguna de estas dos enzimas para poder desarrollarse.

Cira *et al.* 2008 consiguieron clonar y expresar la tomatinasa de *F. oxysporum* en *S. cerevisiae*, logrando que la levadura fuera capaz de producir etanol a partir de los fructosanos del *A. tequilana* y el *A. salmiana*, resistiendo la presencia de las saponinas<sup>105</sup>.

*H. uvarum* mostró ser capaz de utilizar los fructosanos de las hojas de *A. salmiana* y de producir inulinasas con una alta actividad, además de no verse inhibida por la presencia de saponinas. Estas ventajas sobre las levaduras comerciales la convierten en una candidata apta para emplearse en la producción de etanol a partir de los carbohidratos presentes en las especies de agaves.

#### 4.9 Producción de Bioetanol

La co-fermentación no demostró tener una influencia en la producción de etanol a partir del jugo de agave (Fig. 13). En la producción de etanol a partir del hidrolizado se observó un ligero aumento en la velocidad de consumo de azúcares durante la co-fermentación. Diversos autores han indicado que la co-fermentación incrementa el rendimiento en la producción de etanol<sup>1,2,29</sup>. Sin embargo, esto no se observó en los experimentos realizados con el jugo de agave. Esto se debió a que la levadura comercial se vio inhibida por la presencia de las saponinas (como se discutió anteriormente en la Sección 4.8), por tal motivo no pudo desarrollarse ni contribuir en la generación de etanol.

En la tabla 15 se comparan los resultados obtenidos en la producción de bioetanol en el presente trabajo con lo reportado por otros investigadores donde emplearon diferentes especies de agaves.

Tabla 15. Producción de bioetanol a partir de diferentes especies de Agave.

Microorganismo	Fuente de carbono	Tipo de Fermentación	Azúcares iniciales (g/L)	Etanol producido (g/L)	% de rendimiento	Ref.
<i>H. uvarum</i>	Jugo de	SH	80	30.4	74.5	
<i>H. uvarum/S. cerevisiae</i>	hojas de <i>A. salmiana</i>	SH	80	28.5	69.9	PT
<i>H. uvarum</i>	Hojas de <i>A. salmiana</i>	HFS	14.3	6.8	93.2	
<i>H. uvarum/S. cerevisiae</i>	hidrolizadas	HFS	14.3	7	95.3	
<i>K. marxianus</i>	<i>A. tequilana</i>	HFS	125	44.9	95	52
<i>K. marxianus</i>	Jugo de hojas de <i>A. fourcroydes</i>	HFS	60	16.5	80.04	55
<i>S. cerevisiae</i>	Hojas de <i>A. tequilana</i>	HFS	41.4	11.4	74	40
<i>K. marxianus</i>	Hojas de <i>A. salmiana</i>	HFS	50	24.15	92.88	36
<i>S. cerevisiae</i>	Hojas de <i>A. salmiana</i>	HFS	50	22.79	87.63	36
<i>K. marxianus</i>	Jugo de <i>A. tequilana</i>	SH	100	30.21	59.7	53
<i>K. marxianus</i>	Jugo de hojas de <i>A. tequilana</i>	SH	59.8	26.1	85	46

Ref: referencia; PT: presente trabajo; HFS: hidrólisis y fermentación separadas; SH: sin hidrólisis de celulosa, se emplearon los fructosanos del agave para la producción de bioetanol.

Segura-Garcia *et al.* 2015 y Corbin *et al.* 2016 produjeron etanol a partir de la fermentación directa de los fructosanos del *A. tequilana*<sup>46,53</sup>. Flores *et al.* 2013 y Villegas *et al.* 2014 realizaron primero la hidrólisis enzimática de los fructosanos y posteriormente fermentaron la fructosa y glucosa producidas<sup>52,55</sup>. Corbin *et al.* 2015 y Láinez *et al.* 2019 realizaron la hidrólisis enzimática de la celulosa y posteriormente la fermentación de los azúcares obtenidos<sup>36,40</sup>.

En los trabajos donde utilizaron los fructosanos del agave se observa una mayor cantidad de azúcares iniciales en comparación de los obtenidos por la hidrólisis enzimática de la celulosa. Los agaves tienen una alta cantidad de

fructosanos, habiendo más cantidad de estos en la piña de la planta que en las hojas. Las hojas de *A. fourcroydes* y *A. tequilana* contenían cerca de 60 g/L de azúcares, mientras que las hojas de *A. salmiana* contenían 80 g/L, una cantidad mayor. Sin embargo, se obtuvo un menor rendimiento en la producción de etanol en este trabajo.

En los trabajos donde se realizó la hidrólisis enzimática de la celulosa, se obtuvo una mayor cantidad de azúcares en comparación con lo obtenido en este trabajo a partir de la hidrólisis del parénquima, esto puede deberse al tipo de pretratamiento que se llevó a cabo. Corbin *et al.* 2015 y Láinez *et al.* 2019 realizaron pretratamientos ácidos y alcalinos para favorecer la hidrólisis de la celulosa con lo que lograron una mayor cantidad de azúcares. Aún así, la levadura *H. uvarum* tuvo un mayor rendimiento en la producción de etanol, en comparación con las otras levaduras, *S. cerevisiae* y *K. marxianus*.

Keshtkar *et al.* 2019 reportaron el aislamiento de varias cepas de *Hanseniaspora* a partir de uvas empleadas en la elaboración de vino<sup>106</sup>. La levadura identificada como *Hanseniaspora opuntiae* MK 460485 fue la que mostró una mayor tolerancia al etanol de 16 % v/v y a la glucosa de 60 g/L y una producción de 12 g/L de etanol durante la fermentación. En este proyecto, la levadura *H. uvarum* resultó más eficiente, pudiendo tolerar 80 g/L de glucosa y produciendo 30.4 g/L de etanol.

Con base en los resultados obtenidos, la levadura aislada *Hanseniaspora uvarum* tiene un potencial prometedor para ser empleada en la producción de etanol a partir de los fructosanos de las hojas de *A. salmiana*.

## CAPÍTULO 5

### CONCLUSIONES

En este proyecto, se evaluaron los carbohidratos presentes en las hojas de *Agave salmiana* tanto para la producción de enzimas glucosídicas, así como para la producción de etanol. Para llevar a cabo el proyecto, fue necesario aislar microorganismos de las hojas con alta actividad enzimática y microorganismos fermentadores.

Los microorganismos aislados mostraron tener la capacidad de hidrolizar los carbohidratos presentes en las hojas de agave. Las bacterias y levaduras fueron capaces de hidrolizar los fructosanos, mientras que los hongos de hidrolizar las fibras y el parénquima.

De los hongos de estudio, las enzimas producidas por el hongo identificado como *Penicillium chrysogenum* fueron las que mostraron mayor actividad: endoglucanasa 14.4 UA/g, exoglucanasa 3.50 UA/g y  $\beta$ -glucosidasa 3.14 UA/g. Estas enzimas mostraron actividad a altas temperaturas; la temperatura óptima

de endoglucanasa y exoglucanasa fue de 50 °C y la de  $\beta$ -glucosidasa de 70 °C. Al tener actividad a altas temperaturas resultan convenientemente útiles para emplearse en procesos industriales enzimáticos que se realicen a temperaturas elevadas.

Las inulinasas producidas por la levadura identificada como *H. uvarum* demostraron tener la mayor actividad enzimática; 180.5 UA/mL. La levadura tiene potencial para ser utilizada en la producción de azúcares a partir de la hidrólisis de los fructosanos del agave.

Los polisacáridos presentes en las hojas pudieron ser hidrolizados a azúcares fermentables. Se logró hidrolizar el parénquima en un 56 % con ayuda de las celulasas producidas. Durante la fermentación alcohólica, los fructosanos presentes en el jugo de agave fueron hidrolizados en un 88 %.

Los polisacáridos presentes en las hojas de *A. salmiana* fueron eficientemente fermentados a etanol, por la levadura *H. uvarum*. La glucosa obtenida por la hidrólisis enzimática del parénquima dio un 95.3 % de rendimiento, mientras que el jugo de agave un 74.5 %. La levadura aislada mostró tener un potencial comparable al de otras levaduras utilizadas en la producción de etanol.

La levadura aislada *Hanseniaspora uvarum*, también mostró resistencia a las saponinas presentes en las hojas de agave, en comparación con las levaduras comerciales, las cuales se vieron inhibidas.

## REFERENCIAS

1. Peña-Castro, J. M., Del Moral, S., Núñez-López, L., Barrera-Figueroa, B. E. & Amaya-Delgado, L. Biotechnological Strategies to Improve Plant Biomass Quality for Bioethanol Production. *Biomed Res. Int.* **2017**, (2017).
2. Mohd Azhar, S. H. *et al.* Yeasts in sustainable bioethanol production: A review. *Biochem. Biophys. Reports* **10**, 52–61 (2017).
3. Albers, S. C., Berklund, A. M. & Graff, G. D. The rise and fall of innovation in biofuels. *Nat. Biotechnol.* **34**, 814–821 (2016).
4. Ramos, J. L., Valdivia, M., García-Lorente, F. & Segura, A. Benefits and perspectives on the use of biofuels. *Microb. Biotechnol.* **9**, 436–440 (2016).
5. Láinez, M., Ruiz, H. A., Arellano-Plaza, M. & Martínez-Hernández, S. Bioethanol production from enzymatic hydrolysates of *Agave salmiana* leaves comparing *S. cerevisiae* and *K. marxianus*. *Renew. Energy* **138**, 1127–1133 (2019).
6. Goršek, A. & Pečar, D. The Influence of Cellulose Type on Enzymatic Hydrolysis Efficiency. *Chem. Eng. Trans.* **43**, (2015).
7. George, J. & SN, S. Cellulose nanocrystals: synthesis , functional properties , and applications. *Nanotechnol. Sci. Appl.* 45–54 (2015).
8. Lynd, L. R., Weimer, P. J., Zyl, W. H. van & Pretorius, I. S. Microbial Cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology. *Microbiol. Mol. Biol.*

- Rev.* **66**, 506–577 (2002).
9. Henrissat, B. & Bairoch, A. New families in the classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochem. J.* **293**, 781–788 (1993).
  10. Yan, S. & Wu, G. Secretory pathway of cellulase: A mini-review. *Biotechnol. Biofuels* **6**, 1–12 (2013).
  11. Yoon, L. W., Ang, T. N., Ngoh, G. C. & Chua, A. S. M. Fungal solid-state fermentation and various methods of enhancement in cellulase production. *Biomass and Bioenergy* **67**, 319–338 (2014).
  12. Dhillon, G. S., Kaur, S., Brar, S. K. & Verma, M. Potential of apple pomace as a solid substrate for fungal cellulase and hemicellulase bioproduction through solid-state fermentation. *Ind. Crops Prod.* **38**, 6–13 (2012).
  13. Nava-Cruz, N. Y. *et al.* Agave atrovirens fibers as substrate and support for solid-state fermentation for cellulase production by *Trichoderma asperellum*. *3 Biotech* **6**, (2016).
  14. Galindo-Leva, L. Á. *et al.* Growth, ethanol production, and inulinase activity on various inulin substrates by mutant *Kluyveromyces marxianus* strains NRRL Y-50798 and NRRL Y-50799. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* (2016). doi:10.1007/s10295-016-1771-5
  15. I, I. M. L., I, P. L. & Julián-, D. M. C. Avances en la producción de inulina Advances on the inulin production. **XXXVII**, 352–366 (2017).

16. Gou, Y., Li, J., Zhu, J., Xu, W. & Gao, J. Enhancing inulinase yield by irradiation mutation associated with optimization of culture conditions. *Brazilian J. Microbiol.* **46**, 911–920 (2015).
17. Gong, F., Sheng, J., Chi, Z. & Li, J. Inulinase production by a marine yeast *Pichia guilliermondii* and inulin hydrolysis by the crude inulinase. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **34**, 179–185 (2007).
18. Huitrón, C. *et al.* Bioconversion of Agave tequilana fructans by exo-inulinases from indigenous *Aspergillus niger* CH-A-2010 enhances ethanol production from raw Agave tequilana juice. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **40**, 123–132 (2013).
19. Jain, S. C., Jain, P. C. & Kango, N. Production of inulinase from *Kluyveromyces marxianus* using *Dahlia* tuber extract. *Brazilian J. Microbiol.* 62–69 (2012).
20. Shen, J. *et al.* Characterization of an exo-inulinase from *Arthrobacter*: A novel NaCl-tolerant exo-inulinase with high molecular mass. *Bioengineered* **6**, 99–105 (2015).
21. Yousefi-Mokri, M. *et al.* Enzymatic hydrolysis of inulin by an immobilized extremophilic inulinase from the halophile bacterium *Alkalibacillus filiformis*. *Carbohydr. Res.* **483**, 107746 (2019).
22. Baeyens, J. *et al.* Challenges and opportunities in improving the production of bio-ethanol. *Prog. Energy Combust. Sci.* **47**, 60–88 (2015).
23. Kang, Q., Appels, L., Tan, T. & Dewil, R. Bioethanol from lignocellulosic

- biomass: Current findings determine research priorities. *Sci. World J.* **2014**, (2014).
24. Tamang, J. P., Watanabe, K. & Holzapfel, W. H. Review: Diversity of microorganisms in global fermented foods and beverages. *Frontiers in Microbiology* (2016). doi:10.3389/fmicb.2016.00377
  25. Papalexandratou, Z. *et al.* *Hanseniaspora opuntiae*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Lactobacillus fermentum*, and *Acetobacter pasteurianus* predominate during well-performed Malaysian cocoa bean box fermentations, underlining the importance of these microbial species for a successful cocoa . *Food Microbiol.* **35**, 73–85 (2013).
  26. Martin, V., Jose Valera, M., Medina, K., Boido, E. & Carrau, F. Oenological impact of the *Hanseniaspora/Kloeckera* yeast genus on wines — A review. *Fermentation* **4**, (2018).
  27. Keshtkar, S., Mezenova, O. Y., Hosseini, S. & Romiani, E. Isolation and Identification of the *Hanseniaspora opuntiae* MK 460485 as an efficient strain for ethanol production. *Process. Food Prod. Equip.* 10–19 (2019). doi:10.17586/2310-1164-2019-12-1-10-19
  28. Canilha, L. *et al.* Bioconversion of sugarcane biomass into ethanol: An overview about composition, pretreatment methods, detoxification of hydrolysates, enzymatic saccharification, and ethanol fermentation. *J. Biomed. Biotechnol.* **2012**, (2012).
  29. Bolivar-Telleria, M. *et al.* Second-Generation Bioethanol from Coconut

- Husk. *Biomed Res. Int.* **2018**, 4916497 (2018).
30. Somerville, C., Youngs, H., Taylor, C., Davis, S. C. & Long, S. P. Feedstocks for. *Security* **790**, 790–793 (2010).
  31. Pérez-Pimienta, J. A., López-Ortega, M. G. & Sanchez, A. Recent developments in Agave performance as a drought-tolerant biofuel feedstock: agronomics, characterization, and biorefining. *Biofuels, Bioprod. Biorefining* **11**, 732–748 (2017).
  32. Delgado-Lemus, A., Casas, A. & Téllez, O. Distribution, abundance and traditional management of Agave potatorum in the Tehuacán Valley, Mexico: bases for sustainable use of non-timber forest products. *J. Ethnobiol. Ethnomed.* **10**, 1–12 (2014).
  33. Colunga-garciamarin, P. *En lo Ancestral hay Futuro: Del Tequila , los Mezcales y Otros Agaves.* (2015).
  34. Praznik, W., Löppert, R., Cruz, J. M., Zangger, K. & Huber, A. Structure of fructo-oligosaccharides from leaves and stem of Agave tequilana Weber , var . azul. *Carbohydr. Res.* **381**, 64–73 (2013).
  35. Close, D., Rodriguez, M., Hu, R. & Yang, X. Disposition and bioavailability of inulin and free sugar in untreated and dilute acid pretreated Agave tequilana leaves. *Biomass and Bioenergy* **106**, 176–181 (2017).
  36. Láinez, M., Ruiz, H. A., Castro-Luna, A. A. & Martínez-Hernández, S. Release of simple sugars from lignocellulosic biomass of Agave salmiana leaves subject to sequential pretreatment and enzymatic saccharification.

- Biomass and Bioenergy* **118**, 133–140 (2018).
37. Silva-Mendoza, J., Cantú-Cárdenas, M. E., Vazquez-Rodriguez, S., Toxqui-Terán, A. & Chávez-Guerrero, L. Biopolymeric films obtained from the parenchyma cells of *Agave salmiana* leaves. *Cellulose* **26**, 1869–1879 (2019).
  38. Chávez-Guerrero, L. *et al.* Enzymatic hydrolysis of cellulose nanoplatelets as a source of sugars with the concomitant production of cellulose nanofibrils. *Carbohydr. Polym.* **210**, 85–91 (2019).
  39. Li, H. *et al.* Agave proves to be a low recalcitrant lignocellulosic feedstock for biofuels production on semi-arid lands. *Biotechnol. Biofuels* **7**, 50 (2014).
  40. Corbin, K. R. *et al.* Prospecting for energy-rich renewable raw materials: Agave leaf case study. *PLoS ONE* (2015). doi:10.1371/journal.pone.0135382
  41. Chávez-Guerrero, L. *et al.* Isolation and characterization of cellulose nanoplatelets from the parenchyma cells of *Agave salmiana*. *Cellulose* **24**, 3741–3752 (2017).
  42. Chávez-Guerrero, L., Sepúlveda-Guzmán, S., Silva-Mendoza, J., Aguilar-Flores, C. & Pérez-Camacho, O. Eco-friendly isolation of cellulose nanoplatelets through oxidation under mild conditions. *Carbohydr. Polym.* **181**, (2018).
  43. Sun, Y. & Cheng, J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresour. Technol.* **83**, 1–11 (2002).

44. Meinita, M. D. N., Hong, Y. K. & Jeong, G. T. Comparison of sulfuric and hydrochloric acids as catalysts in hydrolysis of *Kappaphycus alvarezii* (cottonii). *Bioprocess Biosyst. Eng.* **35**, 123–128 (2012).
45. Mukherjee, V. *et al.* Phenotypic evaluation of natural and industrial *Saccharomyces* yeasts for different traits desirable in industrial bioethanol production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **98**, 9483–9498 (2014).
46. Corbin, K. R. *et al.* Low-Input Fermentations of Agave tequilana Leaf Juice Generate High Returns on Ethanol Yields. *BioEnergy Res.* 1142–1154 (2016). doi:10.1007/s12155-016-9755-x
47. Hernández-hernández, H. M., Chanona-pérez, J. J., Vega, A. & Ligeró, P. Acetosolv treatment of fibers from waste agave leaves: Influence of process variables and microstructural study. *Ind. Crop. Prod.* **86**, 163–172 (2016).
48. Yang, Q. & Pan, X. Bioresource Technology Pretreatment of Agave americana stalk for enzymatic saccharification. *Bioresour. Technol.* **126**, 336–340 (2012).
49. Perez-pimienta, J. A. *et al.* Comparison of the impact of ionic liquid pretreatment on recalcitrance of agave bagasse and switchgrass. *Bioresour. Technol.* **127**, 18–24 (2013).
50. Henry, R. *et al.* Optimization of alkaline and dilute acid pretreatment of agave bagasse by response surface methodology. *Front. Bioeng. Biotechnol* **3**, (2015).

51. Michel-Cuello, C. *et al.* Study of Enzymatic Hydrolysis of Fructans from Agave salmiana Characterization and Kinetic Assessment. *Sci. World J.* **863432**, (2012).
52. Flores, J. A. *et al.* Simultaneous saccharification and fermentation of agave tequilana fructans by *kluveromyces marxianus* yeasts for bioethanol and tequila production. *Bioresour. Technol.* (2013). doi:10.1016/j.biortech.2013.07.078
53. Segura-garcía, L. E., Taillandier, P., Brandam, C. & Gschaedler, A. Fermentative capacity of *Saccharomyces* and non- *Saccharomyces* in agave juice and semi-synthetic medium. *LWT - Food Sci. Technol.* **60**, 284–291 (2015).
54. Mielenz, J. R., Rodriguez Jr, M., Thompson, O. A., Yang, X. & Yin, H. Development of Agave as a dedicated biomass source: production of biofuels from whole plants. doi:10.1186/s13068-015-0261-8
55. Villegas-Silva, P. A., Toledano-Thompson, T., Canto-Canché, B. B., Larqué-Saavedra, A. & Barahona-Pérez, L. F. Hydrolysis of Agave fourcroydes Lemaire (henequen) leaf juice and fermentation with *Kluveromyces marxianus* for ethanol production. *BMC Biotechnol.* **14**, 1–10 (2014).
56. Panagiotou, G., Christakopoulos, P. & Olsson, L. Simultaneous saccharification and fermentation of cellulose by *Fusarium oxysporum* F3 — growth characteristics and metabolite profiling. **36**, 693–699 (2005).

57. Paschos, T., Xiros, C. & Christakopoulos, P. Ethanol effect on metabolic activity of the ethalogenic fungus *Fusarium oxysporum*. *BMC Biotechnol.* **15**, 1–13 (2015).
58. Karla L. Vega-Ramos, J. Xavier Uvalle-Bueno, J. F. G.-L. Molecular Variability among Isolates of *Fusarium oxysporum* Associated with Root Rot Disease of *Agave tequilana*. *Biochem. Genet.* **51**, 243–255 (2013).
59. Muthaiyan, A., Limayem, A. & Ricke, S. C. Antimicrobial strategies for limiting bacterial contaminants in fuel bioethanol fermentations. *Prog. Energy Combust. Sci.* **37**, 351–370 (2011).
60. Velázquez-martínez, J. R. *et al.* Prebiotic Potential of *Agave angustifolia* Haw Fructans with Different Degrees of Polymerization. 12660–12675 (2014). doi:10.3390/molecules190812660
61. Alcázar, M. *et al.* Effect of steroidal saponins from *Agave* on the polysaccharide cell wall composition of *Saccharomyces cerevisiae* and *Kluyveromyces marxianus*. *LWT - Food Sci. Technol.* **77**, 430–439 (2017).
62. Lorenz Miller, G. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Analytical Chemistry* **31**, 426–428 (1959).
63. Visagie, C. M. *et al.* Studies in Mycology. *Stud. Mycol.* **78**, 343–371 (2014).
64. Houbraken, J. *et al.* Studies in Mycology. *Stud. Mycol.* **78**, 373–451 (2014).
65. Wang, X., Chen, K., Zeng, Z. & Zhuang, W. Phylogeny and morphological analyses of *Penicillium* section *Sclerotiora* ( *Fungi* ) lead to the discovery of

- five new species. *Sci. Rep.* 1–14 (2017). doi:10.1038/s41598-017-08697-1
66. Visagie, C. M. *et al.* Fifteen new species of *Penicillium*. 247–280 (2016).
67. Singha, I. M., Kakoty, Y., Unni, B. G., Das, J. & Kalita, M. C. Identification and characterization of *Fusarium* sp. using ITS and RAPD causing fusarium wilt of tomato isolated from Assam, North East India. *J. Genet. Eng. Biotechnol.* **14**, 99–105 (2016).
68. Martin, K. J. & Rygielwicz, P. T. Fungal-specific PCR primers developed for analysis of the ITS region of environmental DNA extracts. *BMC Microbiol.* **5**, (2005).
69. Adame-García, J., Rodriguez-Guerra, R., Iglesias-Andreu, L. G., Ramos-Prado, J. M. & Luna-Rodríguez, M. Molecular identification and pathogenic variation of *Fusarium* species isolated from *Vanilla planifolia* in Papantla Mexico. *Bot. Sci.* **93**, 669–678 (2015).
70. Gibson, L. J. The hierarchical structure and mechanics of plant materials. *J. R. Soc. Interface* **9**, 2749–2766 (2012).
71. Dinarvand, M. *et al.* Effect of C/N ratio and media optimization through response surface methodology on simultaneous productions of intra- and extracellular inulinase and invertase from *Aspergillus Niger* ATCC 20611. *Biomed Res. Int.* **2013**, (2013).
72. Dinarvand, M., Rezaee, M. & Foroughi, M. Optimizing culture conditions for production of intra and extracellular inulinase and invertase from *Aspergillus niger* ATCC 20611 by response surface methodology (RSM). *Brazilian J.*

- Microbiol.* **48**, 427–441 (2017).
73. Chávez-Guerrero, L. *et al.* Isolation and characterization of cellulose nanoplatelets from the parenchyma cells of *Agave salmiana*. *Cellulose* 1–12 (2017). doi:10.1007/s10570-017-1376-9
  74. Aro, N., Pakula, T. & Penttilä, M. Transcriptional regulation of plant cell wall degradation by filamentous fungi. *FEMS Microbiol. Rev.* **29**, 719–739 (2005).
  75. Kshirsagar, S. D., Saratale, G. D., Saratale, R. G., Govindwar, S. P. & Oh, M. K. An isolated *Amycolatopsis* sp. GDS for cellulase and xylanase production using agricultural waste biomass. *J. Appl. Microbiol.* **120**, 112–125 (2016).
  76. Escalante, A. *et al.* Pulque, a traditional Mexican alcoholic fermented beverage: Historical, microbiological, and technical aspects. *Frontiers in Microbiology* (2016). doi:10.3389/fmicb.2016.01026
  77. Isabel Enríquez-Salazar, M. *et al.* Microbial diversity and biochemical profile of aguamiel collected from *Agave salmiana* and *A. atrovirens* during different seasons of year. *Food Sci. Biotechnol.* **26**, 1003–1011 (2017).
  78. Lappe-Oliveras, P. *et al.* Yeasts associated with the production of Mexican alcoholic nondistilled and distilled *Agave* beverages. *FEMS Yeast Res.* **8**, 1037–1052 (2008).
  79. Zhang, S., Merino, N., Okamoto, A. & Gedalanga, P. Interkingdom microbial consortia mechanisms to guide biotechnological applications. *Microb.*

- Biotechnol.* **11**, 833–847 (2018).
80. Haruta, S. & Yamamoto, K. Model Microbial Consortia as Tools for Understanding Complex Microbial Communities. *Curr. Genomics* **19**, 723–733 (2018).
  81. Tapia-tussell, R. *et al.* PROTOCOL A Rapid and Simple Method for DNA Extraction From Yeasts and Fungi Isolated From Agave fourcroydes. **33**, (2006).
  82. Contreras-Hernández, M. G. *et al.* Enzymatic potential of native fungal strains of Agave residues. *BioResources* **13**, 569–585 (2018).
  83. Dashtban, M., Schraft, H. & Qin, W. Fungal bioconversion of lignocellulosic residues; Opportunities & perspectives. *Int. J. Biol. Sci.* **5**, 578–595 (2009).
  84. Vicini, J. L. *et al.* Effect of feeding supplemental fibrolytic enzymes or soluble sugars with malic acid on milk production. *J. Dairy Sci.* **86**, 576–585 (2003).
  85. Picart, P., Diaz, P. & Pastor, F. I. J. Cellulases from two *Penicillium* sp. strains isolated from subtropical forest soil: Production and characterization. *Lett. Appl. Microbiol.* **45**, 108–113 (2007).
  86. Li, B. *et al.* Preparation of lactose-free pasteurized milk with a recombinant thermostable  $\beta$ -glucosidase from *Pyrococcus furiosus*. *BMC Biotechnol.* **13**, 1 (2013).
  87. Oriente, A. *et al.* Characterization of a novel *Aspergillus niger* beta-

- glucosidase tolerant to saccharification of lignocellulosic biomass products and fermentation inhibitors. *Chem. Pap.* **69**, 1050–1057 (2015).
88. Sujatha, E. Optimization and characterization of cellulases from thermophilic strain of *Scytalidium thermophilum* SKESMBKU01. *Curr. Res. Environ. Appl. Mycol.* **4**, 236–249 (2014).
  89. Kanchanadumkerng, P., Sakka, M., Sakka, K. & Wiwat, C. Characterization of endoglucanase from *Paenibacillus* sp. M33, a novel isolate from a freshwater swamp forest. *J. Basic Microbiol.* **57**, 121–131 (2017).
  90. Robinson, P. K. Enzymes : principles and biotechnological applications. 1–41 (2015). doi:10.1042/BSE0590001
  91. Gurung, N., Ray, S., Bose, S., Rai, V. & K, W. F. A Broader View : Microbial Enzymes and Their Relevance in Industries , Medicine , and Beyond enzyme and its use were well known to the mankind but. **2013**, (2013).
  92. Bhalla, A., Bansal, N., Kumar, S., Bischoff, K. M. & Sani, R. K. Improved lignocellulose conversion to biofuels with thermophilic bacteria and thermostable enzymes. *Bioresour. Technol.* **128**, 751–759 (2013).
  93. Silveira Buckeridge, M. Update on Storage Cell Wall Biosynthesis and Degradation Seed Cell Wall Storage Polysaccharides: Models to Understand Cell Wall Biosynthesis and Degradation 1. doi:10.1104/pp.110.158642
  94. Deswal, D., Khasa, Y. P. & Kuhad, R. C. Optimization of cellulase production by a brown rot fungus *Fomitopsis* sp. RCK2010 under solid state

- fermentation. *Bioresour. Technol.* **102**, 6065–6072 (2011).
95. Vitcosque, G. L. *et al.* Production of biomass-degrading multienzyme complexes under solid-state fermentation of soybean meal using a bioreactor. *Enzyme Res.* **2012**, (2012).
  96. Kumar, A., Dutt, D. & Gautam, A. Production of crude enzyme from *Aspergillus nidulans* AKB-25 using black gram residue as the substrate and its industrial applications. *J. Genet. Eng. Biotechnol.* **14**, 107–118 (2016).
  97. Santos, D. A., Oliveira, M. M., Curvelo, A. A. S., Fonseca, L. P. & Porto, A. L. M. Hydrolysis of cellulose from sugarcane bagasse by cellulases from marine-derived fungi strains. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* **121**, 66–78 (2017).
  98. Medina Morales, M.A. *et al.* Study of enzymatic saccharification of Agave leaves biomass to yield fermentable sugars. *3 Bitoech* **7**, (2017).
  99. Pérez-Pimienta, J.A. *et al.* Sequential enzymatic saccharification and fermentation of ionic liquid and organosolv pretreated agave bagasse for ethanol production. *Bioresour. Technol.* **225**, 191–198 (2017).
  100. Yépez Silva-Santisteban, B. O. & Maugeri Filho, F. Agitation, aeration and shear stress as key factors in inulinase production by *Kluyveromyces marxianus*. *Enzyme Microb. Technol.* **36**, 717–724 (2005).
  101. Verástegui, Á. *et al.* Species of Agave with antimicrobial activity against selected pathogenic bacteria and fungi. *World J Microbiol Biotechnol* **24**, 1249–1252 (2008).

102. Li, H. *et al.* Chemical composition and characterization of cellulose for Agave as a fast- growing, drought-tolerant biofuels feedstock. doi:10.1039/c2ra20557b.
103. Puente-Garza, C. A., Gutiérrez-Mora, A. & García-Lara, S. Micropropagation of Agave salmiana: Means to Production of Antioxidant and Bioactive Principles. *Front. Plant Sci* **6**, (2015).
104. Pegg GF, Woodward S. Synthesis and metabolism of a-tomatine in tomato isolines in relation to resistance to Verticillium albo-atrum. *Physiol Mol Plant Pathol* **28**, 333–338, (1986).
105. Cira L.A., González G.A., Torres J.C. et al. Heterologous expression of Fusarium oxysporum tomatinase in Saccharomyces cerevisiae increases its resistance to saponins and improves ethanol production during the fermentation of Agave tequilana Weber var. azul and Agave salmiana must. *Antonie Van Leeuwenhoek* **93**(3), 259–66, (2008).
106. Keshtkar S., Mezenova O.Y., Hosseini S. et al. Isolation and Identification of the Hanseniaspora opuntiae MK 460485 as an efficient strain for ethanol production. *NRU ITMO*, 1(39), (2019).

## APÉNDICE 1. DETERMINACIÓN DE AZÚCARES REDUCTORES

La determinación de azúcares reductores se llevó a cabo por el método del ácido 3, 5 Dinitrosalicílico<sup>56</sup>. El método consiste en la reducción de los grupos nitro del ácido a grupos amino por los azúcares reductores. El compuesto formado absorbe fuertemente la luz a una  $\lambda$  de 540 nm. Por lo tanto, la absorbancia será directamente proporcional a la cantidad de azúcares presentes.

Para la elaboración del reactivo se prepararon dos soluciones. La solución uno se preparó con 2 g de hidróxido de sodio y 2 g de ácido 3,5 DNS disueltos en 50 mL. La solución 2 se preparó con 40 g de tartrato de sodio y potasio tetra hidratado disuelto en 100 mL. Al final, ambas soluciones fueron mezcladas y aforadas a un volumen final de 200 mL. El reactivo fue conservado en un frasco ámbar.

Después de cada hidrólisis enzimática. Los tubos Eppendorf son calentados por 5 min a 100 °C, para desnaturalizar las enzimas. Posteriormente, se centrifugan a 14000 por 5 min. Para la reacción se toman entre 20 y 100  $\mu$ L del sobrenadante (el volumen tomado dependerá de la cantidad de azúcares esperados, también se pueden hacer diluciones) y se transfieren a un tubo con 200  $\mu$ L del reactivo. El tubo es calentado a 100 °C por 5 min. Al finalizar el tiempo, rápidamente se añade agua fría para detener la reacción y hasta completar un

volumen de 2 mL. Después se procede a leer las muestras a una Absorbancia de 540 nm.

Para calcular la concentración de los azúcares reductores en las muestras, fue necesario realizar curvas de calibración de glucosa y fructosa. Los estándares se prepararon a concentraciones de 0–10 mg/mL. Se utilizó un volumen de 100  $\mu$ L de cada estándar y 200  $\mu$ L del reactivo para la reacción. Fue necesario preparar el reactivo varias veces a lo largo de toda la tesis. Cada que se preparaba era necesario realizar las curvas de calibración nuevamente.

## APÉNDICE 2. CONDICIONES DE LA PCR

Para la amplificación de la región ITS del DNAr 5.8S de los microorganismos, se utilizó el kit de MyTaq™ DNA Polymerase de BioLine. Las reacciones de PCR se llevaron a cabo bajo las siguientes condiciones:

Reacción de la PCR:

Buffer de reacción 5x MyTaq	10 µL
DNA	2 µL
Primers 20 µM (cada uno)	1 µL (cada uno)
DNA polimerasa MyTaq	1 µL
Agua	36 µL

Condiciones de los ciclos de la PCR:

Paso	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	95 °C	1 segundo	1
Desnaturalización	95 °C	15 segundos	30
Alineación	56 °C	15 segundos	
Amplificación	72 °C	10 segundos	

APÉNDICE 3. SECUENCIAS DE LA REGIÓN AMPLIFICADA  
DEL ITS DE LOS MICROORGANISMOS

L1: 5'>3'

CTTGGAGTCCGAACCTCTCNCTTTCTAACCCTGTGCACTTGTTTGGGATAGT  
AACTCTCGCAAGAGAGCGAACTCCTATTCACTTATAAACACAAAGTCTATGA  
ATGTATTAATTTTATAACAAAATAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGCTC  
TCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGA  
ATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCGCTCCATGGTATTCC  
GTGGAGCATGCCTGTTTGAGTGTGCATGAATACTTCAACCCTCCTCTTTCTTA  
ATGATTGAAGAGGTGTTTGGTTTCTGAGCGCTGCTGGCCTTTACGGTCTAG  
CTCGTTTCGTAATGCATTAGCATCCGCAATCGAACTTCGGATTGACTTGGCG  
TAATAGACTATTGCTGAGGAATTCTAGTCTTCGGATTAGAGCCGGGTTGG  
GTTAAAGGAAGCTTCTAATCAGAATGTCTACATTTTAAGATTAGATCTCAAAT  
CAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATA

L2: 5'>3'

AATTTTTTAAAATAAACCAAATTCCTAACGGAAATTTTAAAATAATTTAAAC  
TTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGCGAATT  
GCGATAAGTAATGTGAATTGCAGATACTCGTGAATCATTGAATTTTTGAACG  
CACATTGCGCCCTTGAGCATTCTCAGGGGCATGCCTGTTTGAGCGTCATTT  
CCTTCTCAAAGATAATTTATTATTTTTTGGTTGTGGGCGATACTCAGGGTT  
AGCTTGAAATTGAAGATTGTTTCAATCTTTTTTAATTCAACACTTAGCTTCT  
TGGAGACGCTGTTCTCGCTGTGATGTATTTATGGATTTATTCGTTTTACTTT  
ACAAGGGAAATGGTAACGTACCTTAGGCAAAGGGTTGCTTTTTAATATTCATC  
AAGTTTGACCTCAAATCAGGTAGGANTACCCGCTGAACTTA

L3: 5'>3'

AATTTTTTAAAATAAACCAAATTCCTAACGGAAATTTTAAAATAATTTAAANC  
NNNCAACAACGGATCTCTTGGTTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGCGAATT  
GCGATAAGTAATGNGAATTGCAGATACTCGTGAATCATTGAATTTTTGAACG  
CACNNNGNCCCTNGANCATTCTCAGGGGNNGNCGNNTGAGCGNNNN  
NNNCTTCTCAAAGATAATTTATTATTTTTTGGTTGTGGGCGATACTCAGGG  
TTAGCTTGAAATTGAAGATTGTTTCAATCTTTTTTAATTCAACACTTAGCTTC  
TTTGGAGACGCTGTTCTCGCTGTGATGTATTTATGGATTTATTCGTTTTACTT  
TACAAGGGAAATGGTAACGTACCTTANGCAAAGGGTTGCTTTTTAATATTCAT  
CAAGTTTGACCTCAAATCAGGTAGGATTACCCGCTGAACTTA

L4: 5'>3'

AATCGAAAGGTTCAAGGCAAAAACAAACACAAACAATTTTATTTTATTATAA  
TTTTTTAAACTAAACCAAATTCCTAACGGAAATTTTAAAATAATTTAAACTT  
TCAACAACGGATCTCTTGGTTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGCGAATTGC  
GATAAGTAATGTGAATTGCAGATACTCGTGAATCATTGAATTTTTGAACGCA  
CATTGCGCCCTTGAGCATTCTCAAGGGCATGCCTGTTTGAGCGTCATTTCC

TTCTCAAAGATAATTTTTATTTTTGGTTGTGGGCGATACTCAGGGTTAG  
CTTGAAATTGGAGACTGTTTCAGTCTTTTTAATTCAACACTTAGCTTCTTTG  
GAGACGCTGTTCTCGCTGTGATGTATTTATGGATTTATTCGTTTTACTTTAC  
AAGGGAAATGGTAATGTACCTTANGCAAAGGGTTGCTTTTAATATTCATCAA  
GTTTGACCTCAAATCAGGTAGGATTACCCGCTGAACTTAA

L5: 5'>3'

AATCGAAAGGTTCAAGGCCAAAAACAACACAACAATTNNNNNNNATTATA  
ATTTTTAAACTAAACCAAATTCCTAACGGAAATTTAAAATAATTTAAACT  
TTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGCGAATTG  
CGATAAGTAATGTGAATTGCAGATACTCGTGAATCATTGAATTTTTGAACGC  
ACNTNGNNCCCTTGAGCATTCTCAAGGGNNGNCTGTTTGAGCGTCATTTG  
CTTCTCAAAGATAATTTTTATTTTTGGTTGTGGGCGATACTCANGGTTA  
GCTTGAAATTGGAGACTGTTTCAGTCTTTTTAATTCAACACTTAGCTTCTTT  
GGAGACGCTGTTCTCGCTGTGATGTATTTATGGATTTATTCGTTTTACTTTA  
CAAGGGAAATGGTAATGTACCTTANGCAAAGGGTTGCTTTTAATATTCATCA  
AGTTTGACCTCAAATCAGGTAGGANTACCCGCTGAACTTAA

H6A: 5'>3'

TACCNATTGTTGCCTCGGCGGATCAGCCCGCTCCCGGTAAAACGGGACGG  
CCCGCCAGAGGACCCCTAAACTCTGTTTCTATATGTAACCTCTGAGTAAAAC  
CATAAATAAATCAAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATG  
AAGAACGCAGCAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAAT  
CATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCATG  
CCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCCTCAAGCCCCGGGTTTGGTGTGGGG  
ATCGGCGAGCCCTTGCGGCAAGCCGGCCCCGAAATCTAGTGGCGGTCTC  
GCTGCAGCTTCCATTGCGTAGTAGTAAACCCTCGCAACTGGTACGCGGC  
GCGGCCAAGCCGTTAAACCCCAACTTCTGAATGTTGACCTCGGATCAGGT  
AGGAATACCCGCTGAACTTAAGCATAT

H7A: 5'>3'

CTCCNCCCGTGTTTATTTACCTTGTTGNTTCGGCGGGCCCGCCTTAACT  
GGCCGCCGGGGGGCTTACGCCCCGGGCCCGCGCCCGCCGAAGACACC  
CTCGAACTCTGTCTGAAGATTGTAGTCTGAGTGAAAATATAAATTATTTAAA  
ACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCCGGNATCGATGAANAACNCANCGAA  
ATGNNATACGTAATGTGAATTGCAAATTCAGTGAATCATCNAGNCTTTGAAC  
GCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCAT  
TTCTGCCCTCAAGCACGGCTTGTGTGTTGGGNCCCGNCCTCCNATCCCGG  
GGGACGGGNCCGAAAGGNANNGNNGNACCCGCGTCCGGNCCTCGAGCG  
TATGGGGCTTTGTACCCGNTCTGNAGGNCCGGNCGGCGCTTGCCGATCA  
ACCCAAATTTTTATCCNNGNTGACCTCNGATCANGNANGGATACCCNNTNA  
ACTTNGCATATCNNTANNNNGNANGANNNTGAACTTAAGCATATCAATAA  
GCGGAGGAA