



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCION DE ENSEÑANZA E INVESTIGACION EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS CÓRDOBA

**PROGRAMA DE POSGRADO EN INNOVACIÓN AGROALIMENTARIA
SUSTENTABLE**

**EFFECTO DE DIFERENTES PRETRATAMIENTOS SOBRE LA SACARIFICACIÓN DE
BAGAZO DE CAÑA PARA LA PRODUCCIÓN DE BIOETANOL**

SERAFÍN PÉREZ CONTRERAS

TESIS

**PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE**

MAESTRO EN CIENCIAS

AMATLÁN DE LOS REYES, VERACRUZ, MÉXICO

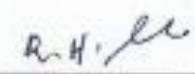
2023

La presente tesis, titulada: **Efecto de diferentes pretratamientos sobre la sacarificación de bagazo de caña para la producción de bioetanol**, realizada por el alumno: **Serafin Pérez Contreras**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS

MAESTRÍA EN INNOVACIÓN AGROALIMENTARIA SUSTENTABLE

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO: 
DR. RICARDO HERNÁNDEZ MARTÍNEZ

ASESOR: 
DR. FRANCISCO HERNÁNDEZ ROSAS

ASESOR: 
DR. JOSÉ ANDRÉS HERRERA CORREDOR

ASESOR: 
DRA. ELIZABETH DEL CARMEN VARELA SANTOS

Amatlán de los Reyes, Veracruz, México, febrero 2023.

EFFECTO DE DIFERENTES PRETRATAMIENTOS SOBRE LA SACARIFICACIÓN DE BAGAZO DE CAÑA PARA LA PRODUCCIÓN DE BIOETANOL

Serafín Pérez Contreras, M.C.

RESUMEN

La caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L.) es uno de los principales cultivos en México, no obstante, cada año se producen cerca de 15 millones de toneladas de bagazo, de las cuales su mayoría son destinadas a la producción de energía eléctrica mediante combustión, convirtiendo cerca del 25% de su peso en gases de efecto invernadero (GEI). Por esta razón, es necesario diversificar los usos del bagazo para la obtención de productos con valor agregado, alineados a los ejes del desarrollo sustentable (ambiental, social y económico). Una propuesta interesante es la producción de bioetanol de segunda generación, en la que se puede reducir el uso de combustibles fósiles, valorizar el bagazo y fomentar la economía circular. Sin embargo, es necesario desarrollar procesos de pretratamiento y sacarificación eficientes, para alcanzar la viabilidad económica del bioetanol de segunda generación. Por lo cual, el objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto de dos pretratamientos (peróxido de hidrógeno y microondas), sobre la sacarificación de bagazo de caña con extractos enzimáticos producidos por fermentación en estado sólido (FES), para la producción de bioetanol. La producción de extractos enzimáticos con actividad celulasa y xilanasas fue realizada por fermentación en estado sólido utilizando bagazo de caña como soporte-sustrato y cepas fúngicas autóctonas como inóculo. Para la sacarificación enzimática el bagazo de caña fue sometido a pretratamiento con peróxido de hidrógeno a distintas condiciones de tiempo (0, 1, 3 y 6 h), relación peróxido de hidrógeno:bagazo (100, 33.33 y 16.66 mL/g), temperatura (26, 50 y 70 °C) concentración de peróxido de hidrógeno (1, 3 y 5% v/v) y pretratamiento con microondas a distintas condiciones de potencia (p30, p50 y p80) y

tiempo (5 y 10 min), evaluando la liberación de azúcares totales de bagazo de caña. Para la etapa de sacarificación enzimática fueron utilizados extractos enzimáticos con actividad celulasa y xilanasa; producidos por fermentación en estado sólido utilizando bagazo de caña como soporte-sustrato y bagazo pretratado con microondas y peróxido de hidrógeno. Por último, los azúcares fermentables obtenidos de la sacarificación enzimática de bagazo de caña, fueron empleados como única fuente de carbono en un sistema de fermentación alcohólica. Los resultados de la fermentación en estado sólido mostraron que los extractos enzimáticos presentaron actividad celulasa (2 U/g) y xilanasa (61 U/g). Por otro lado, los resultados del pretratamiento de bagazo de caña con peróxido de hidrógeno indicaron que la liberación de azúcares totales máxima en las condiciones de ensayo (6 h, 26°C, 16.66 mL/g y 5% v/v) fue de 0.261 g/g. Por otro lado, los resultados del pretratamiento de bagazo de caña con microondas indicaron que la liberación de azúcares totales máxima en las condiciones de ensayo (p80 y 5 min) fue de 0.027 g/g. Los resultados de la sacarificación enzimática de bagazo de caña indicaron que el rendimiento de azúcares reductores máximo se obtuvo cuando el bagazo de caña fue pretratado con peróxido de hidrógeno alcalino obteniendo 0.41 g/g. Por último, la concentración máxima de etanol (4.52 g/L) fue obtenida tras 48 horas de fermentación con *Saccharomyces cerevisiae*.

Palabras Clave: Fermentación en estado sólido, hidrólisis enzimática, pretratamiento, biomasa lignocelulósica, Etanol.

EFFECT OF DIFFERENT PRETREATMENTS ON THE SACCHARIFICATION OF SUGARCANE BAGASSE FOR BIOETHANOL PRODUCTION.

Serafin Perez Contreras, M.C.

ABSTRACT

Sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) is one of the main crops in Mexico, however, each year about 15 million tons of bagasse are produced, most of which are destined to the production of electricity through combustion, converting about 25% of its weight in greenhouse gases (GHG). For this reason, it is necessary to diversify the uses of bagasse to obtain value-added products, aligned with the axes of sustainable development (environmental, social and economic). An interesting proposal is the production of second-generation bioethanol, in which the use of fossil fuels can be reduced, bagasse can be valorized and the circular economy can be promoted. However, it is necessary to develop efficient pretreatment and saccharification processes to achieve the economic viability of second generation bioethanol. Therefore, the objective of the present work was to evaluate the effect of two pretreatments (hydrogen peroxide and microwaves) on the saccharification of sugarcane bagasse with enzymatic extracts produced by solid state fermentation (SSF) for bioethanol production. The production of enzymatic extracts with cellulase and xylanase activity was carried out by solid state fermentation using sugarcane bagasse as support-substrate and autochthonous fungal strains as inoculum. For enzymatic saccharification the sugarcane bagasse was subjected to hydrogen peroxide pretreatment at different conditions of time (0, 1, 3 and 6 h), hydrogen peroxide:bagasse ratio (100, 33.33 and 16.66 mL/g), temperature (26, 50 and 70 °C) hydrogen peroxide concentration (1, 3 and 5% v/v) and microwave pretreatment at different power conditions (p30, p50 and p80) and time (5 and 10 min), evaluating the release of total sugars from sugarcane bagasse. For the enzymatic saccharification

stage, enzymatic extracts with cellulase and xylanase activity were used; produced by solid state fermentation using sugarcane bagasse as support-substrate and bagasse pretreated with microwaves and hydrogen peroxide. Finally, fermentable sugars obtained from the enzymatic saccharification of sugarcane bagasse were used as the sole carbon source in an alcoholic fermentation system. The solid state fermentation results showed that the enzymatic extracts presented cellulase (2 U/g) and xylanase (61 U/g) activity. On the other hand, the results of pretreatment of sugarcane bagasse with hydrogen peroxide indicated that the maximum total sugars release under test conditions (6 h, 26 °C, 16.66 mL/g and 5% v/v) was 0.261 g/g. On the other hand, the results of the microwave pretreatment of sugarcane bagasse indicated that the maximum total sugars release under the test conditions (p80 and 5 min) was 0.027 g/g. The results of enzymatic saccharification of sugarcane bagasse indicated that the maximum reducing sugars yield was obtained when the sugarcane bagasse was pretreated with alkaline hydrogen peroxide obtaining 0.41 g/g. Finally, the maximum ethanol concentration (4.52 g/L) was obtained after 48 hours of fermentation with *Saccharomyces cerevisiae*.

Keywords: Solid state fermentation, enzymatic hydrolysis, pretreatment, lignocellulosic biomass, Ethanol.

Agradecimientos

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)** por el apoyo económico brindado en la beca 2022-000013-01NACF-00038.

Al **Colegio de Postgraduados Campus Córdoba** en particular al **laboratorio de Biotecnología Microbiana Aplicada (BIOMA)** por permitirme trabajar en sus instalaciones y brindarme las condiciones necesarias para el desarrollo de mi proyecto.

A la Línea de Generación y Aplicación del Conocimiento (LGAC-2): Innovación y desarrollo de procesos agroalimentarios para el bienestar social (INDEPROA) del Programa de Posgrado en Innovación Agroalimentaria Sustentable.

A todo el **Consejo Particular**, por todos sus consejos y aportaciones a la investigación.

Al **Dr. Ricardo Hernández Martínez**, por su atinada dirección y enseñanzas en la investigación, así como su enorme paciencia.

A mis compañeros de laboratorio y amigos del colegio: **Karla y Yamilet**, por siempre apoyarme, pasar momentos agradables en el laboratorio y aprender mutuamente,

A mi prometida **Fátima** por estar siempre a mi lado y apoyarme en todas las etapas que viví durante este proceso de aprendizaje,

A mi **familia**, a mis **padres** por creer en mi capacidad, a mis **hermanos** por su buen humor y compañía los fines de semana

Contenido

1	Introducción	14
1.1	Bioetanol	15
1.2	Pretratamiento	17
1.2.1	Pretratamiento con peróxido de hidrógeno alcalino	18
1.2.2	Pretratamiento con Microondas	20
1.3	Hidrólisis de la biomasa lignocelulósica	22
1.3.1	Hidrólisis Química	22
1.3.2	Hidrólisis enzimática	23
1.3.3	Producción de enzimas hidrolíticas	26
1.4	Fermentación alcohólica	27
2	Justificación.....	28
3	Hipótesis.....	31
4	Objetivos	31
4.1	Objetivo General	31
4.2	Objetivos específicos.....	31
5	Materiales y métodos	32
5.1	Material biológico	32
5.1.1	Determinación de la capacidad de producción de enzimas hidrolíticas en caja Petri	35
5.2	Fermentación en estado sólido	36
5.2.1	Pretratamiento del sustrato para la fermentación en estado sólido	36
5.2.2	Condiciones para la Fermentación en estado sólido	36
5.3	Evaluación de pretratamientos sobre bagazo de caña previos a la sacarificación enzimática	38
5.3.1	Pretratamiento de bagazo de caña con peróxido de hidrógeno alcalino.	38
5.3.2	Pretratamiento de bagazo de caña con Microondas	39
5.4	Sacarificación enzimática de bagazo de caña con extractos enzimáticos, para la liberación de azúcares fermentables	40
5.5	Producción de bioetanol utilizando azúcares fermentables obtenidos del bagazo de caña sacarificado	40
5.5.1	Fermentación alcohólica	40
5.5.2	Cuantificación de etanol y azúcares reductores residuales	41
6	Resultados y discusión	41

6.1.1	Aislamiento y caracterización de cepas fúngicas.....	41
6.2	Determinación de la capacidad de producción de enzimas hidrolíticas en caja Petri	43
6.3	Fermentación en estado sólido	46
6.4	Evaluación de pretratamientos sobre bagazo de caña previos a la sacarificación enzimática	49
6.4.1	Pretratamiento de bagazo de caña con peróxido de hidrógeno alcalino.	49
6.4.2	Pretratamiento de bagazo de caña con Microondas	54
6.5	Sacarificación enzimática de bagazo de caña con extractos enzimáticos, para la liberación de azúcares fermentables	56
6.6	Producción de bioetanol utilizando azúcares fermentables obtenidos del bagazo de caña sacarificado	58
7	Conclusiones	63
8	Referencias bibliográficas	64
9	Anexos.....	76
9.1	A. Curva patrón de azúcares reductores (Rango de detección: 0.1 - 1 g/L glucosa)	76
9.2	B. Curva patrón de azúcares reductores (Rango de detección: 0.039 – 1.25 g/L Xilosa).....	77
9.3	C. Curva patrón de azúcares totales (Rango de detección: 10 - 100 ug/L equivalentes de glucosa).....	78
9.4	D. Composición del reactivo DNS (Miller, 1959)	79
9.5	E. Curva estándar para etanol (Rango de detección: 1-50 g/L)	79
9.6	F. Composición de medios de cultivo	80

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estructuras químicas de los principales componentes de la biomasa lignocelulósica (Reproducido de Wu <i>et al.</i> , 2020)	17
Figura 2. Principales reacciones producidas por el peróxido de hidrógeno en medio alcalino (Reproducido de Ho <i>et al.</i> , 2019).	19
Figura 3. Mecanismo implicado en el pretratamiento por microondas de la biomasa lignocelulósica. (Reproducido de Haldar y Purkait, 2021)	21
Figura 4. Diagrama esquemático del proceso de hidrólisis enzimática de la biomasa lignocelulósica: 1) difusión de la enzima, 2) adsorción y 3) hidrólisis (Reproducido de Zhang <i>et al.</i> , 2021)	25
Figura 5. Evaluación del efecto del pretratamiento, sobre la sacarificación con extractos enzimáticos, de bagazo de caña para la producción de bioetanol (Elaboración propia).	32
Figura 6. Colonias de las cepas fúngicas aisladas sobre medio agar cloranfenicol rosa bengala y diclorán después de 5 días de desarrollo. a) cepa aislada de hojas de caña de azúcar (HCA) y b) cepa aislada de bagazo de caña de azúcar (BCA)	42
Figura 7. Hifas, conidios y conidióforos observados mediante tinción con azul de algodón de las cepas fúngicas aisladas, a) cepa aislada de hojas de caña de azúcar, b) cepa aislada de bagazo de caña de azúcar.	43
Figura 8. Halos de actividad hidrolítica de cepas fúngicas, en medio para la detección de actividad celulasa, y xilanasa en caja Petri. Cepa HCA: a) actividad celulasa, b) actividad xilanasa; cepa BCA: c) actividad celulasa, d) actividad xilanasa.	44

Figura 9. Cinética de actividad celulasa obtenida por los aislados BCA y HCA en FES.	47
Figura 10. Cinética de actividad xilanasa de los aislados BCA y HCA en FES.	48
Figura 11. Liberación de azúcares totales a partir de muestras de bagazo de caña pretratadas con peróxido de hidrógeno alcalino y diferentes tiempos de tratamiento. Letras diferentes en las barras indican diferencias estadísticas significativas entre tratamientos ($P \leq 0.05$).	49
Figura 12. Liberación de azúcares totales a partir de muestras de bagazo de caña pretratadas con diferentes relaciones peróxido:bagazo. Letras diferentes en las barras indican diferencias estadísticas significativas entre tratamientos ($P \leq 0.05$).	50
Figura 13. Liberación de azúcares totales a partir de muestras de bagazo de caña pretratadas con H_2O_2 alcalino a diferentes temperaturas. Letras diferentes en las barras indican diferencias estadísticas significativas entre tratamientos ($P \leq 0.05$).	51
Figura 14. Liberación de azúcares totales a partir de muestras de bagazo de caña pretratadas con H_2O_2 alcalino a diferentes concentraciones. Letras diferentes en las barras indican diferencias estadísticas significativas entre tratamientos ($P \leq 0.05$).	53
Figura 15. Efecto de la potencia de las microondas, sobre el pretratamiento de bagazo de caña de azúcar. Letras diferentes en las barras indican diferencias estadísticas significativas entre tratamientos ($P \leq 0.05$).	54
Figura 16. Efecto del tiempo de pretratamiento con microondas, sobre el pretratamiento de bagazo de caña de azúcar. Letras diferentes en las barras indican diferencias estadísticas significativas entre tratamientos ($P \leq 0.05$).	56

Figura 17. Hidrólisis enzimática de bagazo de caña con distintos pretratamientos, empleando extractos enzimáticos (celulasas y xilanasas) obtenidos por FES.....	57
Figura 18. Morfología del aislado de levadura (L1) proveniente de la agroindustria azucarera	60
Figura 19. Producción de etanol por aislado de levadura proveniente de una alcoholera local, usando azúcares reductores obtenidos de bagazo de caña sacarificado enzimáticamente.	61
Figura 20. Producción de etanol por <i>Saccharomyces cerevisiae</i> comercial, usando azúcares reductores obtenidos de bagazo de caña sacarificado enzimáticamente.	62

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Índice de potencia para cepas fúngicas.	44
Tabla 2. Características macroscópicas presentes en las colonias del aislado de levadura (L1).....	59

1 Introducción

El cultivo de caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L.) es de gran importancia económica en México. Tan solo, en la zafra 2021-2022 fueron industrializadas 54.6 millones de toneladas de caña bruta, posicionando a México como el sexto lugar en producción de caña de azúcar a nivel mundial (CONADESUCA, 2023).

Sin embargo, durante la industrialización de la caña de azúcar se generan coproductos como la vinaza, cachaza, melaza, residuos de cosecha o el bagazo, que no son valorizados adecuadamente o se hace un uso inadecuado de los mismos generando problemas al medio ambiente. En México, la industrialización de la caña de azúcar está centrada en la producción de sacarosa (azúcar refinada) por lo que existe oportunidad para la diversificación de los coproductos de la agroindustria azucarera que puede incrementar el valor comercial (Aguilar-Rivera *et al.*, 2017).

La agregación de valor a productos y coproductos de la industria azucarera se realiza de manera cotidiana en países como Australia (concepto de biorrefinería (Bell, 2017), Brasil (Albarelli *et al.*, 2018) y Tailandia. Lo que ha traído consigo una mejora en las condiciones de comercialización, calidad y variedad de productos además, repercute de forma directa en la generación de empleos y la consolidación de procesos sustentables (LLanes-Gil-López *et al.*, 2017).

Uno de los principales coproductos de la industria de la caña de azúcar es el bagazo de caña que es obtenido tras la limpieza y la extracción del jugo de la caña de azúcar. El bagazo de caña es un residuo fibroso compuesto por celulosa (32-35%), hemicelulosa (20-32%), lignina (17-32%) cenizas (1-9%) y algunos otros componentes. Sin embargo, el potencial interno del bagazo de caña no se aprovecha generalmente. En su lugar, se

utiliza para producir electricidad y vapor de alta presión a través de la combustión, lo que resulta en la emisión de gases de efecto invernadero (GEI), uno de los principales factores que contribuyen al cambio climático. No obstante, el bagazo de caña de azúcar es un sustrato prometedor para la obtención de productos de valor agregado a gran escala, ya que es una fuente de carbono sostenible, de bajo costo y con potencial para la producción de azúcares, electricidad, enzimas y biocombustibles como el bioetanol (Kumar *et al.*, 2021).

1.1 Bioetanol

El bioetanol es el biocombustible con mayor producción anual, tan solo en 2018, la producción mundial ascendió a los 110 mil millones de litros, y se espera que para 2022 llegue a los 140 mil millones. Este panorama en el mercado refleja una creciente demanda, misma que necesita el desarrollo de procesos viables tecnológicamente y económicamente, en los que se aproveche de forma sostenible el carbono contenido en la biomasa. La producción de biocombustibles, entre ellos el bioetanol, se clasifica en cuatro generaciones de acuerdo a las diferentes materias primas y la tecnología empleada en su producción (Dincer, 2018).

La primera generación de biocombustibles se basa en su producción a partir de semillas, granos y materias primas basadas en el almidón, como la papa, la yuca, la caña de azúcar o el maíz. Sin embargo, el uso de cultivos alimentarios para la producción de energía requiere el uso de tierras cultivables y entra en conflicto con el uso alimentario de las materias primas (cultivos). Por lo tanto, a pesar de generarse por esta vía el porcentaje mayoritario de los biocombustibles (96% en 2020), esta metodología no será viable a largo plazo (Sharma *et al.*, 2020).

La segunda generación de biocombustibles toma su materia prima de residuos de cultivos, cultivos leñosos o hierbas y está cobrando cada vez más importancia. El uso de biomasa lignocelulósica (por ejemplo: paja de arroz, mazorca de maíz, paja de trigo, tallo de algodón, bagazo de caña) es una alternativa más prometedora, ya que en su mayoría se trata de recursos abundantes, renovables y relativamente baratos (Sharma *et al.*, 2020).

La producción de bioetanol de segunda generación se deriva de cultivos no alimentarios o residuos de cultivos, cuyo componente principal es la biomasa lignocelulósica (Figura 1). Esta biomasa está compuesta de celulosa, hemicelulosa y lignina, incluyendo también una pequeña porción de agua y algunas trazas de proteínas, minerales y otros componentes. La celulosa es un polisacárido en forma de fibrillas (al menos 1,000-50,000 unidades de glucosa unidas por enlaces beta 1,4 glucosídico) unidos por fuerzas de Van der Waals y puentes de hidrógeno. La hemicelulosa es un polímero heterogéneo ramificado de pentosas (xilosa y arabinosa) y hexosas (manosa, galactosa y glucosa), este biopolímero suele contar con 500-3,000 monómeros de carbohidratos, y se sitúa en la pared celular primaria. Por otra parte, la lignina es un polímero compuesto de anillos aromáticos, ubicado entre la celulosa y la hemicelulosa, encargado de mantener a la matriz lignocelulósica unida (Robak y Balcerek, 2018).

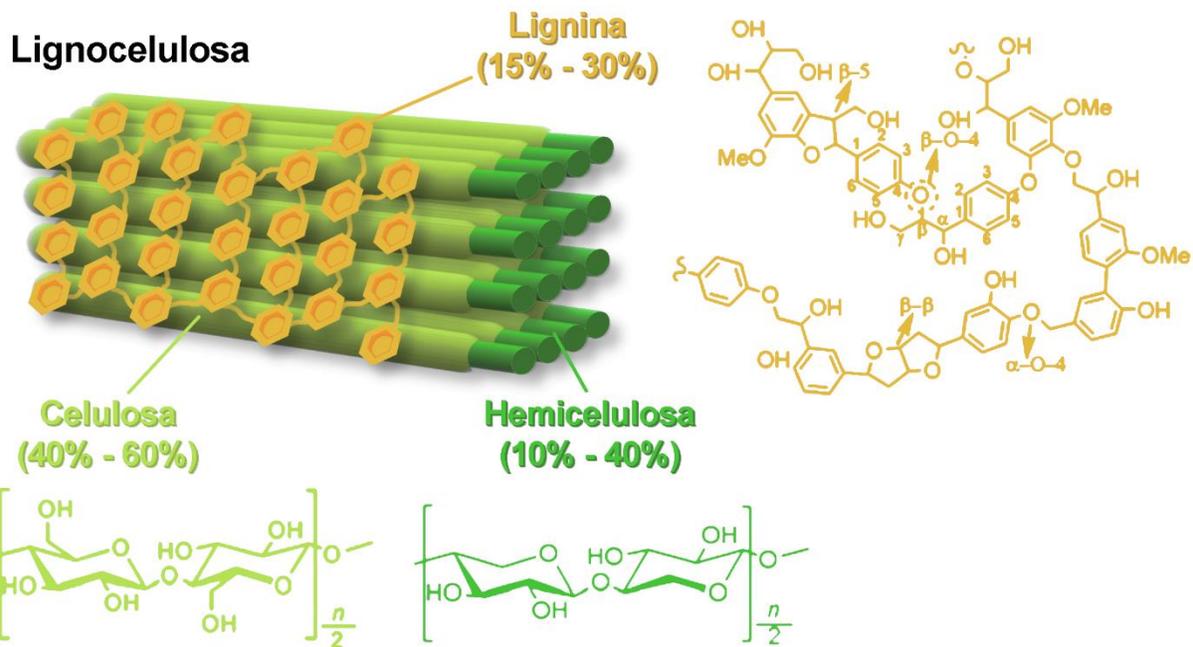


Figura 1. Estructuras químicas de los principales componentes de la biomasa lignocelulósica (Reproducido de Wu *et al.*, 2020)

La producción de bioetanol de segunda generación suele comenzar con la recolección de materia lignocelulósica y una etapa de pre-procesamiento adecuado (triturado, molienda) para obtener un tamaño de partícula conveniente, en caso de que la materia prima lo requiera. Posteriormente se requieren las tres etapas principales para la obtención de bioetanol de segunda generación: 1) Pretratamiento, 2) hidrólisis de la biomasa y 3) fermentación (Su *et al.*, 2020).

1.2 Pretratamiento

El primer paso es el pretratamiento, cuyo objetivo es la destrucción de la estructura recalcitrante de la biomasa, haciendo disponibles la celulosa y hemicelulosa al aumentar su superficie, disminuir la cristalinidad de la celulosa y disminuir el contenido de lignina

(Sheng *et al.*, 2021). Además, el pretratamiento de la matriz lignocelulósica es esencial para optimizar la degradación de la lignina, mejorar la accesibilidad de las enzimas hacia la celulosa y aumentar la eficiencia en la etapa de hidrólisis. Este proceso puede ser logrado a través de diferentes métodos, como la decristalización, la solubilización de la hemicelulosa, o la modificación de la estructura de la lignina (Bychkov *et al.*, 2019).

En este contexto, La hidrólisis enzimática de la celulosa está influenciada por factores como el contenido de lignina, la composición química de la hemicelulosa, y los grupos acetilo. Por esta razón, se han investigado diferentes tecnologías de pretratamiento con el fin de mejorar la eficiencia de la conversión de la biomasa lignocelulósica. Estos procesos incluyen técnicas mecánicas, biológicas, alcalinas, con ácidos diluidos, pretratamiento por explosión con fibras de amonio, tratamientos hidrotérmicos (vaporización, agua caliente), entre otras (Sankaran *et al.*, 2020).

Sin embargo, el pretratamiento de la biomasa lignocelulósica utilizando enfoques tradicionales requiere altas temperaturas y un alto consumo energético, lo que ha generado un interés cada vez mayor en el desarrollo de tecnologías más eficientes en términos energéticos y que reduzcan la producción de inhibidores (como el furfural). Algunas de estas tecnologías emergentes incluyen el pretratamiento con microondas (Haldar y Purkait, 2021) y el pretratamiento con peróxido de hidrógeno alcalino (Niju *et al.*, 2020).

1.2.1 Pretratamiento con peróxido de hidrógeno alcalino

En los últimos años, se ha investigado el uso del peróxido de hidrógeno alcalino como alternativa para el pretratamiento de biomasa lignocelulósica, ya que puede llevarse a cabo a temperatura y presión ambiente. Este proceso oxidativo deslignifica la biomasa,

aumentando la eficiencia de la recuperación de azúcares en la fase líquida de la hidrólisis enzimática. Además, este pretratamiento es energéticamente eficiente y no genera la formación de inhibidores como el furfural y el hidroximetil furfural. El peróxido de hidrógeno es un compuesto natural presente en muchos organismos y participa en procesos biológicos relacionados con la descomposición de la lignina. Este agente oxidante, no inflamable y soluble en agua, se utiliza como estrategia de pretratamiento para biomasa lignocelulósica en condiciones alcalinas. Bajo estas condiciones, el peróxido de hidrógeno sufre una disociación (Figura 2) que conduce a la formación del anión hidroperóxido (HOO^-), mismo que reacciona con parte del peróxido de hidrógeno, dando lugar a la formación de superóxido y el radical hidroxilo (Dutra *et al.*, 2018).

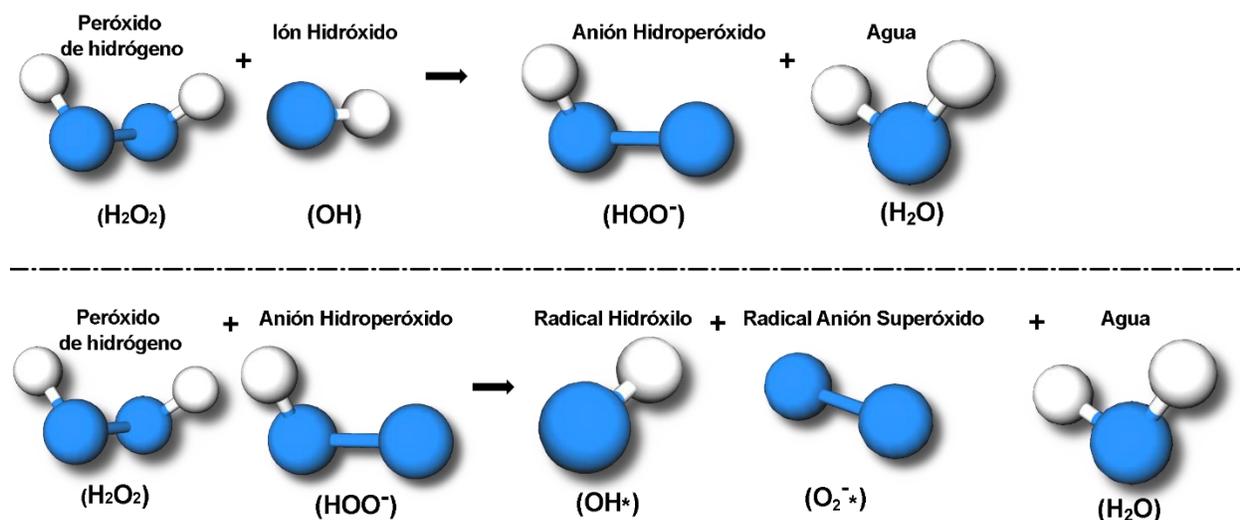


Figura 2. Principales reacciones producidas por el peróxido de hidrógeno en medio alcalino (Reproducido de Ho *et al.*, 2019).

El ataque de los radicales generados por el peróxido de hidrógeno, se centran principalmente en la lignina. Sin embargo, también existe evidencia de cambios en características físicas y morfológicas de las fibras de la celulosa, observadas mediante

microscopía electrónica. Además, se ha demostrado que este pretratamiento, puede desproteger la celulosa contenida en la fracción sólida de la biomasa, mejorando el rendimiento de la hidrólisis enzimática (Dutra *et al.*, 2018).

Los resultados de Li *et al.* (2018) indican que el pretratamiento con peróxido de hidrógeno alcalino es efectivo en la mejora de la hidrólisis enzimática. Debido a que este método logra eliminar significativamente la lignina, y al mismo tiempo, aumentar la porosidad y accesibilidad de la celulosa, lo que conduce a una mayor eficiencia en la conversión de la biomasa lignocelulósica en azúcares fermentables. Además, Owolabi *et al.* (2017) demostró mediante FTIR, que este pretratamiento tiene capacidad para eliminar con éxito la lignina presente en la fibra de palma aceitera.

Los estudios de Yang *et al.* (2021) demostraron que el uso de peróxido de hidrógeno alcalino como pretratamiento puede mejorar significativamente la hidrólisis enzimática de hojas de palma aceitera. Debido a que este proceso despolimeriza parcialmente la estructura de la pared celular, al reducir la presencia de lignina y romper los puentes de hidrógeno y las fuerzas de Van der Waals en la estructura lignocelulósica. Resultando en una mayor proporción de polisacáridos disponibles en la superficie de las hojas de palma

1.2.2 Pretratamiento con Microondas

El uso de microondas ha atraído la atención de la investigación al proponerse como una tecnología verde. Este pretratamiento ofrece ventajas como el calentamiento volumétrico, menor tiempo requerido para la reacción, uso mínimo de disolventes y la reducción de reacciones secundarias. El desarrollo del proceso de pretratamiento con

microondas en la deconstrucción de la biomasa, es un enfoque prometedor para los fines del modelo de biorefinería (Zaker *et al.*, 2019).

El uso de microondas sobre la biomasa lignocelulósica genera vibración sobre las zonas polares de la misma, generando puntos calientes. La Figura 3 representa el impacto combinado del calor generado y los puntos calientes sobre los componentes de la biomasa, que resultan en una substancial alteración de la celulosa, reduciendo su cristalinidad. Este proceso tiene lugar de manera continua debido a la formación constante de nuevos puntos calientes dentro de las partículas de biomasa, causando una reacción en cascada. La mayor intensidad de las explosiones que ocurren dentro de las partículas, intensifica la reubicación de la estructura cristalina y contribuye al éxito del pretratamiento con microondas (Halder y Purkait, 2021).

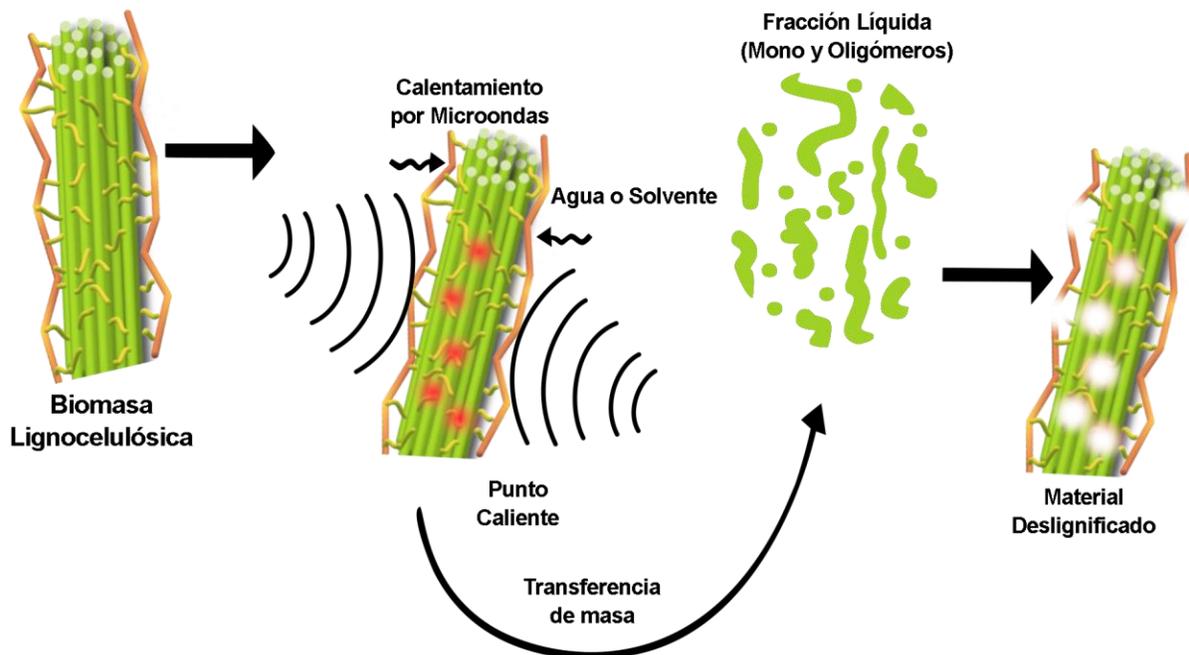


Figura 3. Mecanismo implicado en el pretratamiento por microondas de la biomasa lignocelulósica. (Reproducido de Halder y Purkait, 2021)

Otra hipótesis acerca de la deconstrucción lignocelulósica mediante microondas, es la generación de presión dentro de los componentes de la biomasa resultado de su rápida expansión. Principalmente los grupos hidroxilo (OH) presentes en la biomasa absorben mayor porción de microondas ocasionando un rápido calentamiento y aumento de la presión. Por otro lado, los componentes menos hidratados o los grupos menos polares son insensibles a la expansión, lo que genera más tensión que ayuda a la ruptura de la estructura lignocelulósica (Haldar y Purkait, 2021).

1.3 Hidrólisis de la biomasa lignocelulósica

Como segunda etapa en la producción de bioetanol es necesaria una etapa de hidrólisis, cuyo objetivo está encaminado a despolimerizar la celulosa, hemicelulosa y oligosacáridos de cadena corta, en azúcares fermentables simples. Debido a la naturaleza cristalina de la celulosa, la hidrólisis es más complicada en comparación con la hidrólisis de la hemicelulosa. Por lo tanto, la hidrólisis de la celulosa requiere ser catalizada por un ácido (hidrólisis química) o por enzimas específicas, este último proceso denominado como hidrólisis enzimática o sacarificación enzimática (Abo *et al.*, 2019).

1.3.1 Hidrólisis Química

El proceso de hidrólisis química puede realizarse con ácidos diluidos o ácidos fuertes. La hidrólisis con ácido diluido es un proceso en el que se emplea ácido sulfúrico en concentraciones entre 1-3% durante periodos cortos de tiempo (en torno a 3 min) y a temperaturas entre 180-240 °C. Los rendimientos obtenidos con esta metodología están en torno al 60% y conlleva a la producción de inhibidores como el furfural por

transformación de las pentosas. Una alternativa que se ha explorado para evitar la formación de estos inhibidores, y mejorar el rendimiento, es el uso de la hidrólisis en dos etapas: una primera etapa a 140-160 °C para solubilizar las hemicelulosas, y la segunda en torno a 160-180 °C en la que se transforma la celulosa. Siguiendo esta estrategia se pueden alcanzar tasas de recuperación del 80%. La hidrólisis con ácidos fuertes se conduce de forma similar, con la diferencia de emplear ácidos en concentraciones de 20-40% a temperaturas más bajas (50-100 °C) (Abo *et al.*, 2019). Sin embargo, ambas estrategias involucran el uso de agentes químicos potencialmente contaminantes y conducen a la formación de inhibidores en mayor o menor proporción. Por lo que es interesante el uso de alternativas que eviten estos inconvenientes.

1.3.2 Hidrólisis enzimática

La hidrólisis enzimática, también conocida como sacarificación enzimática, tiene como finalidad liberar monosacáridos de la celulosa y la hemicelulosa. Esta etapa es crucial para la producción de productos valiosos a partir de la biomasa lignocelulósica, ya que los monosacáridos son la fuente de carbono de los microorganismos fermentadores. La hidrólisis de la celulosa y la hemicelulosa es catalizada por las enzimas celulasas y xilanasas, respectivamente. Las celulasas incluyen endoglucanasas que hidrolizan los enlaces beta-1,4 glucosídicos internos, las exoglucanasas que hidrolizan los extremos reductores de las cadenas de celulosa, y las beta-glucosidasas que hidrolizan los dímeros de glucosa (celobiosa) en moléculas monoméricas de glucosa (Łukajtis *et al.*, 2018).

La hidrólisis de la celulosa puede ser complicada si las microfibras se encuentran unidas entre sí, por puentes de hidrógeno internos y externos, y si se encuentran rodeados por

polisacáridos de hemicelulosa como el xilano y el manano. Las celulasas son muy importantes porque catalizan la hidrólisis de la celulosa en azúcares fermentables, y su acción comienza con la adsorción en la superficie de la celulosa, seguida de la hidrólisis de la celulosa en oligosacáridos y azúcares fermentables y la desorción de la celulosa de la superficie de la biomasa (Figura 4). Por otra parte, la estructura de la hemicelulosa puede deconstruirse por la acción sinérgica de la endoxilanasas y la beta xilosidasas, que catalizan la hidrólisis del xilano a xilooligosacáridos. Adicionalmente a la especificidad de las enzimas hidrolíticas empleadas, la digestión de la celulosa y la hemicelulosa está influenciada por factores como el pH, la temperatura, el tiempo y la porosidad del soporte, el grado de cristalización de la celulosa y su grado de polimerización (Łukajtis *et al.*, 2018).

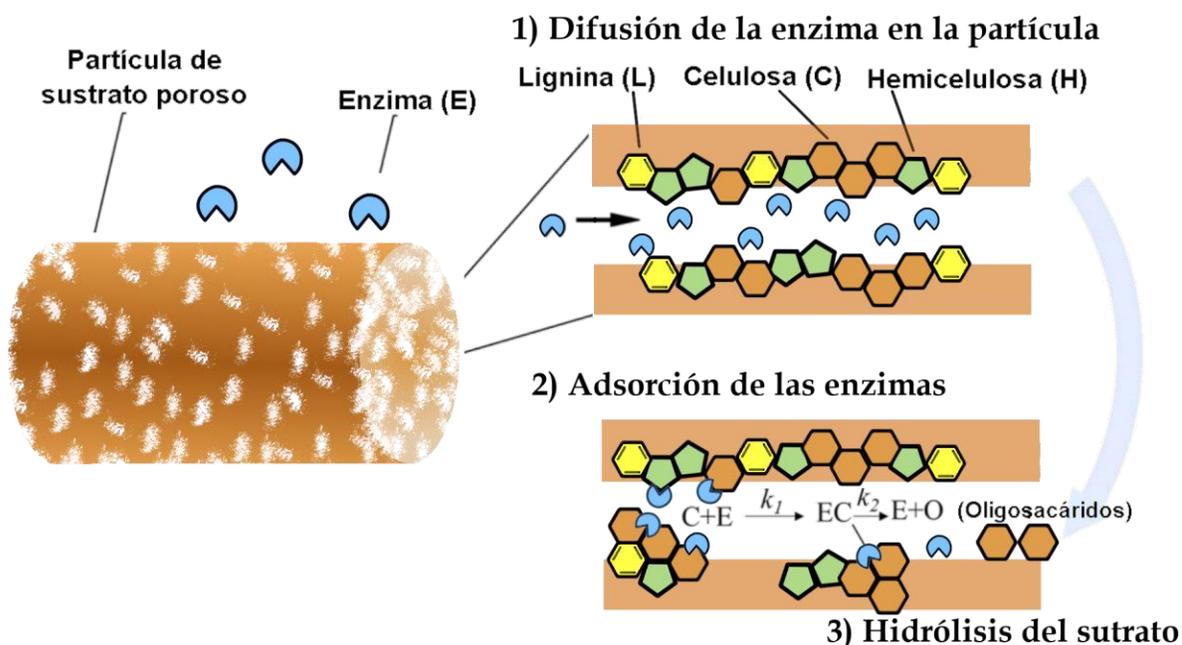


Figura 4. Diagrama esquemático del proceso de hidrólisis enzimática de la biomasa lignocelulósica: 1) difusión de la enzima, 2) adsorción y 3) hidrólisis (Reproducido de Zhang *et al.*, 2021)

La producción de enzimas celulasas y xilanasas a nivel industrial, hace uso de hongos filamentosos como *Aspergillus nidulans*, *A. niger*, *Penicillium spp.* y *Trichoderma reesei*, debido a la capacidad de estos organismos para la producción de distintos tipos de enzimas como las endoglucanasas, exo-cellobiohidrolasas y beta glucosidasas. Sin embargo, el costo de producción de enzimas comerciales es alto, por lo que se puede optar por la producción de extractos enzimáticos con actividad hidrolítica empleando la propia biomasa lignocelulósica como sustrato (Mejias *et al.*, 2018; Robak y Balcerek, 2018).

1.3.3 Producción de enzimas hidrolíticas

En el proceso de producción de enzimas hidrolíticas, el sustrato puede representar entre un 30 y 40% del costo total del proceso. Sin embargo, este porcentaje puede reducirse considerablemente, empleando sustratos de bajo costo como los residuos agroalimentarios (biomasa lignocelulósica). La FES es una tecnología con potencial para la valorización de residuos, que ha demostrado ser muy eficiente en términos de rendimiento y productividad. La FES es una fermentación heterogénea de tres fases (sólido-líquido-gas), basada en inocular microorganismos que crecen sobre un sustrato sólido poroso, con suficiente humedad para mantener el crecimiento y el metabolismo microbiano. El sustrato (estado sólido) representa la fase principal, y el proceso se lleva a cabo en ausencia o casi ausencia de agua visible entre las partículas del sustrato (Marzo *et al.*, 2019).

Los hongos filamentosos son organismos modelo para sistemas de FES, debido a su capacidad para crecer en espacios entre partículas de matrices sólidas, y su capacidad para secretar una gran diversidad de enzimas hidrolíticas. Los residuos agroindustriales-lignocelulósicos son sustratos prometedores para la FES, debido a que son abundantes en azúcares poliméricos, como la celulosa y hemicelulosa, los cuales pueden ser hidrolizados por hongos para emplearse como fuente de carbono, además de fungir como inductores para la producción de enzimas hidrolíticas. Entre los géneros más empleados para la FES se encuentran: *Aspergillus*, *Plerotus* y *Trichoderma* (Mansour *et al.*, 2016; Marzo *et al.*, 2019). Los sistemas de FES destacan por ser considerados procesos rentables, ecológicos, con bajo consumo energético, baja producción de aguas

residuales, tiempos de fermentación cortos, bajo riesgo de contaminación bacteriana y baja autohidrólisis de enzimas por acción de proteasas (Leite *et al.*, 2021).

1.4 Fermentación alcohólica

En la última etapa de la producción de Bioetanol a partir de biomasa lignocelulósica, se requiere de fermentar los azúcares liberados en moléculas de etanol. Esta etapa repercute en la viabilidad económica del proceso, y requiere el uso de cepas con capacidad de metabolizar una variedad de fuentes de carbono, junto con resistencia frente a compuestos tóxicos derivados de la biomasa lignocelulósica. La levadura *Saccharomyces cerevisiae*, es un organismo modelo para la producción de etanol a nivel industrial, y se propone como opción para alcanzar la factibilidad económica del bioetanol de segunda generación, en un futuro próximo (Ko y Lee, 2018). *S. cerevisiae*, se emplea para la producción de etanol a partir de caña de azúcar y almidón de maíz. Así mismo, esta levadura también posee capacidad para la fermentación de los azúcares obtenidos de biomasa lignocelulósica hidrolizada (Oh y Jin, 2020).

2 Justificación

Actualmente, algunos de los problemas ambientales están asociados al uso de combustibles fósiles, cuya combustión genera alrededor del 70% del total de las emisiones de GEI en forma de CO₂ (Johnsson *et al.*, 2019). Debido a ello, se han realizado esfuerzos para generar energías alternas que permitan mitigar los efectos perjudiciales de los combustibles fósiles. Una propuesta prometedora, es el uso de energías renovables como la energía geotérmica, la energía eólica, la energía solar y la energía basada en la biomasa; como el biohidrógeno, el biodiesel, y el bioetanol (Panahi *et al.*, 2020).

En este contexto, el bioetanol posee propiedades similares a la gasolina o el diésel, como un alto octanaje que lo hace un combustible favorable para motores de combustión interna. Debido a su alto contenido de oxígeno, la combustión del bioetanol es más limpia y puede reducir hasta un 70-90% las emisiones de GEI, en comparación con los combustibles fósiles. Además, es considerado un recurso renovable debido a que puede producirse a partir de diversas fuentes de biomasa. En la actualidad, el bioetanol es el biocombustible de mayor producción y se produce principalmente a partir de cultivos como el maíz y la caña de azúcar. Sin embargo, la utilización de estos cultivos como materia prima para la producción de bioetanol entra en conflicto con su uso alimentario. Un aumento en la demanda de los cultivos alimentarios puede generar desequilibrios en los precios y, por lo tanto, afectar la seguridad alimentaria (Roukas y Kotzekidou, 2022). Por lo cual, la producción de bioetanol a partir de biomasa

lignocelulósica, se propone como una alternativa con mayor expectativa a futuro, para la obtención de bioetanol (Sharma *et al.*, 2020).

En este contexto, el bagazo de caña de azúcar es un coproducto lignocelulósico obtenido en grandes cantidades en la agroindustria azucarera, en donde puede ser empleado para la producción de energía eléctrica y vapor de alta presión mediante su combustión, generando la emisión de grandes cantidades de GEI. Sin embargo, el bagazo de caña posee un alto porcentaje de azúcares poliméricos que pueden aprovecharse para la obtención de azúcares fermentables. Sin embargo, muchos de los métodos empleados para liberar azúcares fermentables del bagazo de caña requieren pretratamientos que implican un consumo elevado de temperatura y energía (Valladares-Diestra *et al.*, 2021). Esta situación ha provocado, que se exploren estrategias emergentes, que ayuden a reducir el gasto energético y la producción de inhibidores, tales como el pretratamiento con microondas, y el pretratamiento con peróxido de hidrógeno alcalino (Haldar y Purkait, 2021; Niju *et al.*, 2020).

Adicionalmente al pretratamiento, la producción de biocombustibles de segunda generación requiere una etapa de sacarificación enzimática. Esta etapa requiere el uso de enzimas apropiadas que permitan hidrolizar la matriz lignocelulósica en azúcares fermentables. La sacarificación enzimática es una de las etapas más costosas del proceso, por lo que es fundamental mejorar el rendimiento, para alcanzar la viabilidad económica en la producción de bioetanol (Roukas y Kotzekidou, 2022; Zhang *et al.*, 2021).

Es por ello, que en el presente trabajo fue propuesto el uso de pretratamientos emergentes de microondas y peróxido de hidrógeno alcalino, para evaluar su efecto sobre la sacarificación de bagazo de caña, para la producción de bioetanol. Además, fue propuesto el uso de cepas fúngicas autóctonas de bagazo de caña, para la producción de extractos enzimáticos por FES, para conseguir enzimas con especificidad hacia el sustrato, y ofrecer una alternativa eficiente en costos, para la etapa de sacarificación.

3 Hipótesis

Los pretratamientos con peróxido de hidrógeno y microondas permitirán la sacarificación enzimática de bagazo de caña y su posterior conversión a bioetanol.

4 Objetivos

4.1 Objetivo General

Determinar el efecto de la sacarificación enzimática de bagazo de caña pretratado para la producción de bioetanol.

4.2 Objetivos específicos

- Producir extractos enzimáticos por FES, utilizando una cepa fúngica autóctona de bagazo de caña
- Realizar pretratamientos de bagazo de caña con peróxido de hidrógeno y microondas a diferentes condiciones.
- Determinar la eficiencia de la sacarificación de bagazo de caña, utilizando extractos enzimáticos y bagazo con distintas condiciones: Sin pretratar, pretratado con peróxido de hidrógeno y pretratado con microondas.
- Producir bioetanol utilizando azúcares fermentables obtenidos de bagazo de caña sacarificado.

5 Materiales y métodos

A continuación, se presenta el resumen gráfico de la estrategia empleada para evaluar el efecto del pretratamiento sobre la sacarificación de bagazo de caña de azúcar para la producción de bioetanol (Figura 5).

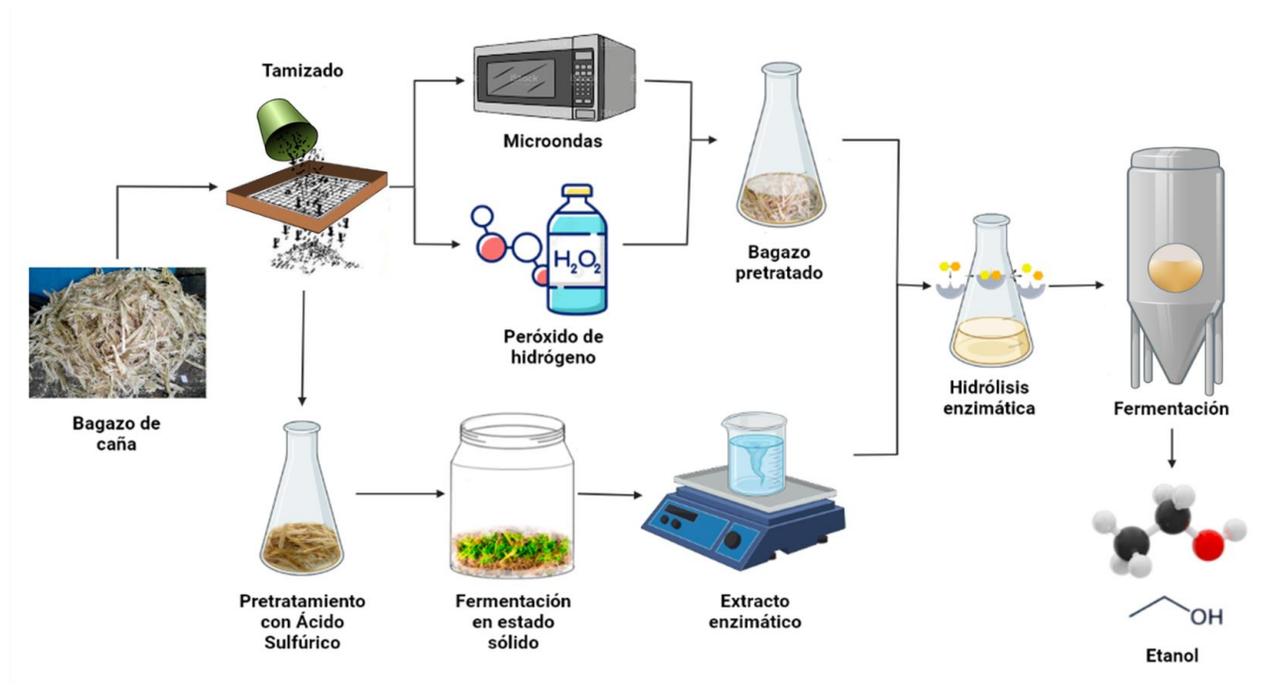


Figura 5. Evaluación del efecto del pretratamiento, sobre la sacarificación con extractos enzimáticos, de bagazo de caña para la producción de bioetanol (Elaboración propia).

5.1 Material biológico

Las cepas fúngicas empleadas para la producción de enzimas hidrolíticas por FES, fueron aisladas a partir de bagazo de caña de azúcar (BCA) proveniente de un ingenio azucarero local, y hojas de caña de azúcar (HCA) de la variedad Mex 72-2086, colectadas en el Colegio de Postgraduados, Campus Córdoba.

Para el aislamiento de cepas fúngicas, las fuentes de aislamiento (BCA, HCA) fueron sometidas a una cámara húmeda a 30 °C por 7 días. Transcurrido este tiempo, las

muestras fueron sembradas mediante la técnica de siembra directa en cajas Petri con agar cloranfenicol, rosa de bengala y diclorán (CRBD, anexo F) (Afolabi *et al.*, 2020; Martínez-Salgado *et al.*, 2021). Fueron seleccionadas y purificadas cepas fúngicas mediante la técnica de punta de hifa en cajas Petri con CRBD, incubándolas a 30 °C durante 5 días. Posteriormente, fueron realizados subcultivos en Agar papa y dextrosa (APD, anexo F) con esta metodología, hasta observar cultivos puros en el microscopio (Lacerda *et al.*, 2018). Las cepas puras fueron caracterizadas mediante la observación de sus características microscópicas, como la morfología de hifas, conidios y conidióforos, utilizando la tinción con azul de algodón. Además, fueron analizadas las características macroscópicas, tales como la apariencia y el color de las colonias (Savín-Molina *et al.*, 2021).

La metodología empleada para la preparación de inóculos (para conservación y FES) consistió en sembrar las cepas fúngicas en tubos inclinados de APD, incubándolos a 30°C durante 3 días. Posteriormente, los tubos fueron cosechados con 5 mL de solución estéril de Tween 20 (0.02% v/v) y fueron inoculados con 1 mL de suspensión de esporas en matraces Erlenmeyer de 250 mL, adicionados con 50 mL de APD. Los matraces inoculados fueron incubados a 30 °C durante 5 días. Transcurrido el tiempo, los matraces fueron cosechados con 10 mL de solución de Tween 20, la concentración de esporas/mL fue cuantificada en cámara de Neubauer. Esta suspensión de esporas fue considerada como inóculo para el sistema de FES.

Para la conservación de cepas fúngicas en glicerol, fueron cosechados matraces Erlenmeyer de 250 mL con desarrollo de esporas (descritos previamente), con 10 mL de

solución estéril de Tween 20 (0.02% v/v), de la suspensión de esporas obtenida (al menos 2×10^8 esporas/mL), fue agregado un mL en crioviales con solución de glicerol al 50% (v/v) y cinco esferas plásticas. Los conservados fueron mantenidos a 4 °C y la viabilidad de los mismos fue comprobada reactivándolos en tubos inclinados de PDA (Castilla-Marroquín *et al.*, 2020).

Para la conservación de cepas fúngicas en leche descremada, fueron cosechados matraces Erlenmeyer de 250 mL con desarrollo de esporas (descritos previamente), con 10 mL de solución estéril de leche descremada (10% p/v), la suspensión de esporas obtenida (al menos 2×10^8 esporas/mL) fue separada en crioviales y fueron congelados a -72 °C. Posteriormente, la suspensión fue liofilizada en un equipo FreeZone Plus 4.5 Liter Cascade Benchtop Freeze Dry System (Labconco, Kansas City, Missouri, USA) a -42 °C y 0.189 mBar durante 24-48 h. Los preservados fueron mantenidos a -4 °C, y su viabilidad fue comprobada reactivándolos en cajas Petri de PDA (Stefanello *et al.*, 2019).

Por otra parte, fue aislada una levadura a partir de muestras de la agroindustria azucarera. Para ello, fueron realizadas diluciones seriadas de la fuente de aislamiento, y las diluciones 10^{-3} y 10^{-5} fueron sembradas sobre cajas Petri con agar YM (extracto de levadura 3 g/L, extracto de malta 3 g/L, peptona 5 g/L, dextrosa 10 g/L y Agar 15 g/L). Fueron seleccionadas cepas con apariencia de levadura, mismos que fueron subcultivados en agar YM adicionado con 0.1 g/L de Cloranfenicol, hasta la obtención de cultivos puros. El aislado fue preservado mediante liofilización con leche descremada (10% p/v) como agente crioprotector.

Para el inóculo inicial de la fermentación alcohólica, se comenzó por reactivar la levadura en tubos inclinados de agar YM, incubandolos a 30 °C por 24 h. Posteriormente los tubos fueron cosechados con 5 mL de solución estéril de Tween 20 al 0.01% (v/v) y agitación por 15 s, seguido se procedió a inocular 1 mL de la suspensión de biomasa en matraces Erlenmeyer (capacidad 250 mL) con 100 mL de caldo YM. Los matraces inoculados fueron incubados a 30 °C con agitación constante (150 rpm) durante 24 h. Transcurrido el tiempo se procedió a separar el contenido de los matraces en tubos Corning (25 mL/tubo) y a centrifugar a 10,000 rpm por 15 min, el sobrenadante fue desechado y la pastilla fue lavada con 15 mL de agua estéril tres veces, repitiendo el proceso de centrifugado entre cada lavado. Finalmente, la biomasa fue resuspendida en 10 mL de agua estéril y la concentración (células/mL) fue cuantificada en cámara de Neubauer.

5.1.1 Determinación de la capacidad de producción de enzimas hidrolíticas en caja Petri

Para evaluar cualitativamente el potencial de los aislados fúngicos para la producción de enzimas hidrolíticas del tipo celulasas, fueron inoculados discos miceliales (5 mm) en cajas Petri con medio para detección de actividad celulasa (DTC) y medio para detección de actividad xilanasa (DTX), descritos en el anexo F. Las cajas petri inóculadas fueron incubadas a 30 °C durante tres días. Transcurridas las 72 h el halo de hidrólisis fue revelado con solución rojo congo (1% durante 15 min) y lavados con NaCl (1 M, 12 min). Adicionalmente, el índice de potencia (IP) fue calculado, este índice es la relación entre los diámetros de colonia y halo de hidrólisis, tal como se puede apreciar en la ecuación 1 (Herrera, 2003; Soria-Noroña y López-Almeida, 2020):

Ecuación 1:

$$IP = \frac{\text{Diámetro del Halo de Hidrólisis}}{\text{Diámetro de la Colonia}}$$

5.2 Fermentación en estado sólido

5.2.1 Pretratamiento del sustrato para la fermentación en estado sólido

Para la FES fue empleado bagazo de caña de azúcar como soporte-sustrato, mismo que fue suministrado por un ingenio local. El bagazo fue lavado para eliminar impurezas y secado a 50 °C durante 24 h en un horno, seguido de un tamizado con un tamiz de malla 16 (1.1 mm) recuperando la fracción retenida en el tamiz. El bagazo lavado y tamizado fue sometido a pretratamiento añadiendo 20 mL de H₂SO₄ al 1% (v/v) por cada gramo de bagazo. Por último, el bagazo fue secado en horno a 50 °C hasta alcanzar un porcentaje de humedad constante (inferior al 10% en promedio) (Figueroa-Torres *et al.*, 2020).

5.2.2 Condiciones para la Fermentación en estado sólido

La FES fue realizada en recipientes de geometría uniforme de 100 mL de capacidad, con 2.5 g de bagazo de caña pretratado. Las condiciones iniciales para la FES fueron: pH 5.5, porcentaje de humedad 70%. El porcentaje de humedad fue ajustado impregnando el sustrato con medio Pontecorvo (1953, Anexo F) en solución amortiguadora citrato de sodio (0.1 M). El soporte-sustrato fue inoculado con suspensión de esporas de los aislados fúngicos, ajustando la concentración a 2x10⁷ esporas/g de sustrato. La fermentación fue desarrollada durante 96 h a 30 °C en una cámara húmeda, evaluando la actividad enzimática cada 12 h (Arana-Cuenca *et al.*, 2019).

La recuperación del extracto enzimático fue realizado de acuerdo a la metodología descrita por Arana-Cuenca *et al.* (2019) y Figueroa-Torres *et al.* (2020)- Fueron agregados 20 mL de agua embotellada (Bonafont®) por cada gramo de sustrato fermentado, la mezcla fue agitada durante 10 min a temperatura ambiente. Posteriormente la mezcla fue filtrada al vacío y centrifugada a 10,000 rpm por 15 min, el sobrenadante fue recuperado y mantenido en congelación (-72 °C), hasta su uso para la determinación de la actividad enzimática y/o sacarificación enzimática.

La actividad xilanasas fue determinada mezclando 0.1 mL de extracto enzimático con 0.9 mL de una solución al 0.25% (p/v) de Xilano de abedul en solución amortiguadora citrato de sodio 0.1 M a pH 5.5. La mezcla fue mantenida a 40 °C por 15 min, la reacción fue detenida agregando 1 mL de solución de ácido 3,5-Dinitrosalicílico (DNS, anexo D), la absorbancia fue determinada a 575 nm de acuerdo a la metodología reportada por Miller (1959), utilizando una curva patrón con xilosa (sigma) como estándar (ANEXO B). La actividad celulasas fue medida mezclando 0.1 mL de extracto enzimático con 0.9 mL de solución 0.25% (p/v) de Carboximetil Celulosa en solución amortiguadora citrato de sodio 0.1 M a pH 5.5; la mezcla fue incubada a 40 °C durante 30 min, transcurrido el tiempo, la reacción fue detenida agregando 1 mL de reactivo de DNS, la absorbancia fue determinada a 575 nm de acuerdo a la metodología reportada por Miller (1959), utilizando una curva patrón con glucosa como estándar (ANEXO A).

Para la actividad celulasas y xilanasas, fue definida una unidad enzimática (U) como la cantidad de enzima necesaria para liberar 1 μmol de azúcares reductores (glucosa para celulasas, y xilosa para xilanasas) por minuto. Las actividades enzimáticas fueron

reportadas como unidades por gramo de materia seca (U/gms) (Figuroa-Torres *et al.*, 2020; Kumar y Shukla, 2018).

5.3 Evaluación de pretratamientos sobre bagazo de caña previos a la sacarificación enzimática

5.3.1 Pretratamiento de bagazo de caña con peróxido de hidrógeno alcalino.

Para evaluar el efecto del pretratamiento de bagazo de caña con peróxido de hidrógeno alcalino sobre la liberación de azúcares, el pretratamiento fue realizado con bagazo de caña lavado, secado y tamizado (tamaño de partícula ≤ 0.5 mm, malla 30) y peróxido de hidrógeno alcalinizado a pH 11.5 con hidróxido de sodio. Y se evaluaron las variables tiempo, relación peróxido:bagazo y concentración del peróxido en tres niveles: bajo, medio y alto. El tratamiento se inició con una relación peróxido:bagazo de 33.33 mL/g, temperatura de 26 °C, y por 1, 3 y 6 h. Una vez establecido el tiempo de pretratamiento más adecuado fue evaluado el efecto de la relación peróxido:bagazo (16.6, 33.33 y 100mL/g) a 26 °C y concentración del peróxido de hidrógeno 3% (v/v). Posteriormente se realizó el tratamiento a tres temperaturas 26, 50 y 70°C a las condiciones de tiempo y relación de peróxido:bagazo fijadas anteriormente y una concentración del peróxido de hidrógeno 3% (v/v). Por último, se evaluaron tres concentraciones de peróxido de hidrogeno 1, 3 y 5% a las condiciones determinadas anteriormente.

El bagazo pretratado obtenido, fue adicionado con 20 mL de agua por gramo y agitado por 1 min. A continuación, la mezcla fue filtrada con papel whattman® #1. El sobrenadante recuperado fue mantenido en congelación para la determinación de azúcares totales con el método fenol-sulfúrico (Lam *et al.*, 2021), y una curva patrón usando glucosa como estándar (ANEXO C), mientras que la fracción sólida fue secada

a 50 °C por 24 h, y almacenada para el proceso de sacarificación. Todos los ensayos fueron realizados por triplicado, y los resultados obtenidos se analizaron con un ANOVA de una sola vía, con separación de medias por prueba de Tukey ($\alpha= 0.5$) en RStudio.

5.3.2 Pretratamiento de bagazo de caña con Microondas.

Para evaluar el efecto del pretratamiento de bagazo de caña con microondas sobre la liberación de azúcares, el pretratamiento fue realizado con bagazo de caña lavado, secado y tamizado (tamaño de partícula ≤ 0.5 mm, malla 30), y un microondas comercial (General Electric®). El pretratamiento fue realizado humedeciendo el bagazo de caña con 20 mL de agua destilada por gramo de bagazo, durante 30 min, posteriormente, el bagazo humedecido fue irradiado con microondas. Las condiciones de pretratamiento evaluadas fueron: Tiempo del pretratamiento (5 y 10 min) y potencia de las microondas (p30, p50 y p80).

El bagazo pretratado obtenido, fue adicionado con 20 mL de agua por gramo y agitado por 1 min. A continuación, la mezcla fue filtrada con papel whattman #1. El sobrenadante recuperado fue mantenido en congelación para la determinación de azúcares totales con el método fenol-sulfúrico (Lam *et al.*, 2021), y una curva patrón usando glucosa como estándar (ANEXO C), y para la determinación de azúcares reductores mediante el método DNS (Miller, 1959) y una curva patrón con glucosa como estándar (ANEXO A). Por otro lado, la fracción sólida fue secada a 50 °C por 24 h, y almacenada para el proceso de sacarificación. Todos los ensayos fueron realizados por triplicado, y los resultados obtenidos fueron analizados con un ANOVA de una sola vía con separación de medias por prueba de Tukey ($\alpha= 0.5$) en RStudio.

5.4 Sacarificación enzimática de bagazo de caña con extractos enzimáticos, para la liberación de azúcares fermentables

Para determinar la eficiencia en la sacarificación de bagazo de caña (tres condiciones: sin pretratar, pretratado con peróxido de hidrógeno o pretratado con microondas). La sacarificación fue realizada con 50 mg de bagazo, en un volumen de reacción de 10 mL, ajustando el pH a 5.5 con solución amortiguadora de citrato de sodio (0.1 M). La actividad enzimática fue ajustada a 36 U por gramo de bagazo a sacarificar, y la reacción fue mantenida en agitación constante (150 rpm) y 40 °C durante 48 h. Transcurrido el tiempo, los azúcares reductores de todas las reacciones fueron cuantificados con el método DNS (Miller, 1959). Para todos los experimentos se consideraron muestras de control, que consistieron en el mismo sistema, sustituyendo el extracto enzimático con agua estéril.

5.5 Producción de bioetanol utilizando azúcares fermentables obtenidos del bagazo de caña sacarificado

5.5.1 Fermentación alcohólica

La producción de etanol fue llevada a cabo utilizando los azúcares fermentables obtenidos del bagazo de caña pretratado y sacarificado, como única fuente de carbono. La fermentación alcohólica fue llevada a cabo en medio de cultivo líquido (1 g/L extracto de levadura, 2 g/L NH_4SO_4 , 2g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), inoculado con 1×10^6 células de levadura (aislado o comercial), por mililitro de medio de cultivo. La fermentación fue mantenida a 30 °C durante 48 h con agitación constante a 150 rpm (con muestreos cada 12 h). Transcurrido el tiempo de cada muestra, el caldo fermentado fue centrifugado a 10,000 rpm durante 15 min, el sobrenadante obtenido fue filtrado (0.45 μm) y resguardado para la cuantificación de etanol y azúcares reductores.

5.5.2 Cuantificación de etanol y azúcares reductores residuales

El contenido de etanol resultante de la fermentación fue cuantificado por un método espectrofotométrico (Isarankura-Na-Ayudhya *et al.*, 2007), usando solución 0.1 M de dicromato de potasio en ácido sulfúrico 5 M. La reacción fue llevada a cabo mezclando 300 µL de las muestras a analizar, con 3 mL de solución de dicromato, las mezclas fueron mantenidas a temperatura ambiente por 30 min. Entonces la absorbancia fue medida a 600 nm, y la concentración de etanol fue calculada usando una curva con etanol como estándar (ANEXO E). Así mismo, los azúcares reductores residuales, presentes en las muestras de la fermentación, fueron cuantificados con el método de azúcares reductores DNS (Miller, 1959).

6 Resultados y discusión

6.1.1 Aislamiento y caracterización de cepas fúngicas

De los muestreos fueron aisladas dos cepas fúngicas (Figura 6a, Figura 6b), una proveniente de HCA, otra proveniente de BCA. Las características macroscópicas de la cepa HCA fueron desarrollo micelial algodonoso de color amarillo después de 3 días, una coloración del medio de cultivo amarilla-café y la presencia de conidios amarillos-verdes después de 5 días. Esto concuerda con algunas características reportadas por Asis *et al.* (2021) para especies del género *Trichoderma*, como la presencia de micelio blanco, una pigmentación del medio amarilla-marrón (en APD) y la presencia de conidios amarillos después de 5 días de cultivo.

Por otra parte, la cepa BCA presentó desarrollo micelial de color blanco-amarillo después de 3 días, presencia de un ligero color amarillo sobre el medio de cultivo (en PDA) y la

presencia de conidios verdes después de 5 días. Así mismo, estas características son similares a las reportadas por (Asis *et al.*, 2021; Unartngam *et al.*, 2020) para algunas especies del género *Trichoderma*, como el desarrollo de micelio amarillo transparente, presencia de conidios verdes en el cultivo maduro y la pigmentación del medio en color amarillo.

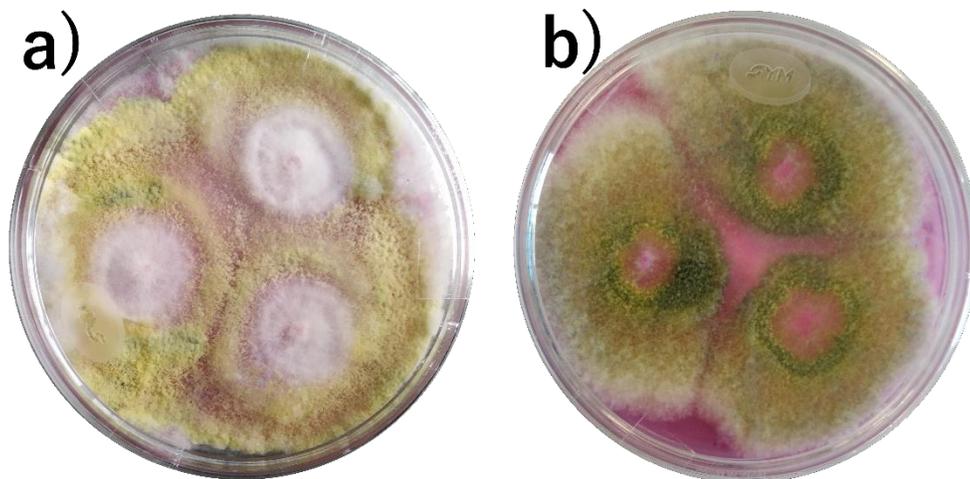


Figura 6. Colonias de las cepas fúngicas aisladas sobre medio agar cloranfenicol rosa bengala y diclorán después de 5 días de desarrollo. **a)** cepa aislada de hojas de caña de azúcar (HCA) y **b)** cepa aislada de bagazo de caña de azúcar (BCA)

Así mismo las dos cepas aisladas (HCA y BCA) fueron caracterizadas microscópicamente mediante una tinción con azul de algodón, tal y como se puede observar en la Figura 7. La estructura microscópica de los aislados mostró conidios globosos nacidos en racimos, fiálides en forma de botella alargada, y conidióforos ramificados. Estas características similares a las reportadas por diversos autores para *Trichoderma* (Asis *et al.*, 2021; Barnett y Hunter, 1972; Naher *et al.*, 2021), presentando fiálides en forma de botella, conidióforos ramificados, y conidios ovoides nacidos en pequeños racimos terminales para especies como *T. reesei*, *T. harzianum* y *T. viride*.

Además, autores como da Silva *et al.* (2018) y Rukmana *et al.* (2020) han reportado la presencia del género *Trichoderma* en paja y bagazo de caña de azúcar.

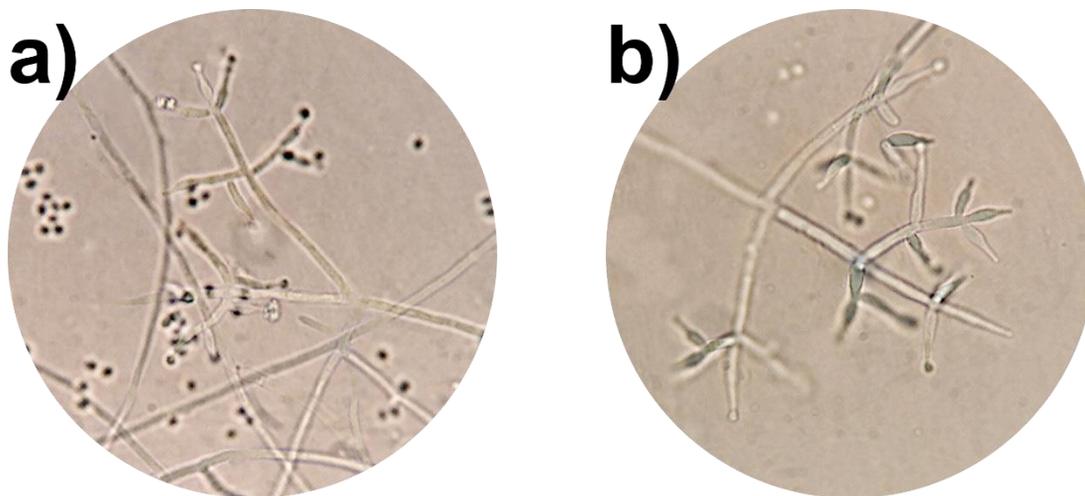


Figura 7. Hifas, conidios y conidióforos observados mediante tinción con azul de algodón de las cepas fúngicas aisladas, **a)** cepa aislada de hojas de caña de azúcar, **b)** cepa aislada de bagazo de caña de azúcar.

6.2 Determinación de la capacidad de producción de enzimas hidrolíticas en caja Petri

Para determinar el potencial de las cepas fúngicas BCA y HCA para la expresión de actividad enzimática celulasa y xilanasa, fue medido el crecimiento radial de las colonias fúngicas y del halo de hidrólisis en cajas petri con agar suplementado con CMC y XA (Figura 8), respectivamente.

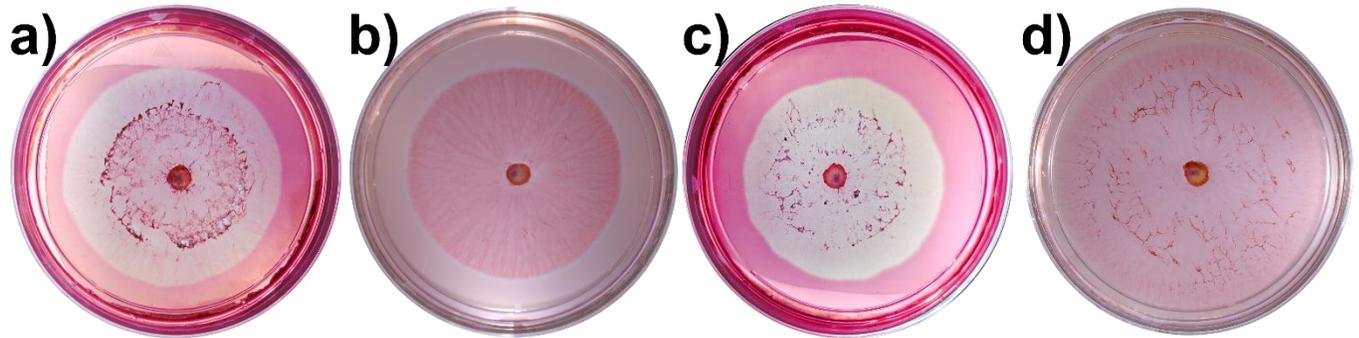


Figura 8. Halos de actividad hidrolítica de cepas fúngicas, en medio para la detección de actividad celulasa, y xilanasa en caja Petri. Cepa HCA: **a)** actividad celulasa, **b)** actividad xilanasa; cepa BCA: **c)** actividad celulasa, **d)** actividad xilanasa.

La presencia de halo de hidrólisis (área sin teñir) en las cajas petri inoculadas con ambas cepas (HCA y BCA), es indicativo de su capacidad para expresar la actividad celulasa y xilanasa. Adicionalmente, el índice de potencia de los aislados fue calculado para tener un valor cuantitativo del potencial de ambas cepas para la producción de extractos enzimáticos con actividad hidrolítica, los resultados pueden observarse en la tabla 1.

Tabla 1. Índice de potencia para cepas fúngicas.

Fuente de Carbono	Cepa	Diámetro Colonia* (cm)	Diámetro del Halo de hidrólisis* (cm)	IP* ± Error Estándar
CMC	BCA	3.13	3	0.95 ± 0.010
	HCA	2.33	2.31	0.99 ± 0.025
XA	BCA	3.93	3.63	0.92 ± 0.024
	HCA	3.13	3.26	1.04 ± 0.011

BCA: bagazo de caña; HCA: Hojas de caña; CMC: Carboximetil Celulosa; XA: Xilano de Abedul; *Nota: datos promedio de 3 repeticiones

Los resultados observados en la tabla 1 indican que la cepa HCA mostró valores de IP mayores a la cepa BCA, esto demuestra un mayor potencial de la cepa HCA para la expresión de actividad celulasa y xilanasas en FES, en comparación con la cepa BCA. A su vez, el IP calculado para la cepa HCA denota un mayor potencial para la expresión de actividad de hidrolítica extracelular, ya que el IP es una relación que compara la producción de enzimas (halo de hidrólisis) en relación a su crecimiento-desarrollo (micelio), entre mayor sea el IP obtenido se espera mayor actividad hidrolítica, en comparación a su tasa de crecimiento-desarrollo. Además, autores como Florencio *et al.* (2012) demostraron que cepas con un IP mayor, obtenido en pruebas en caja Petri, también presentaron una mayor actividad enzimática en sistemas de FES (pruebas cuantitativas).

Asimismo, la producción de enzimas hidrolíticas (celulasas y xilanasas) en presencia de CMC y XA por las cepas HCA y BCA, se evidenció por la presencia de zonas claras alrededor de las colonias después del revelado con rojo congo, este colorante tiene fuertes interacciones con los polisacáridos unidos por enlaces β 1-3, al producirse la hidrólisis de estos compuestos, las interacciones entre el colorante y los polisacáridos se pierde, al igual que la coloración del área en la que las cepas secretaron las enzimas (Matos *et al.*, 2018). La técnica de detección de actividad enzimática en caja Petri ha sido empleada con éxito en la selección de cepas productoras de enzimas celulasas y xilanasas para sistemas de FES (Arana-Cuenca *et al.*, 2019; Gordillo-Fuenzalida *et al.*, 2019; Ire *et al.*, 2018), y fermentación sumergida (Abd Elrsoul y Bakhiet, 2018; Saroj *et al.*, 2018; Vázquez-Montoya *et al.*, 2020).

6.3 Fermentación en estado sólido

Los resultados de la FES para la recuperación de extractos enzimáticos con actividad celulasa y xilanasas se muestran en las Figuras 9 y 10. La mayor actividad celulasa fue obtenida después de 48 h (2.07 U/gms) de cultivo en estado sólido para el aislado HCA, mientras que el aislado BCA obtuvo la máxima actividad celulasa a las 48 h (0.79 U/gms), teniendo que la actividad celulasa obtenida por la cepa HCA fue significativamente mayor a la del aislado BCA. Este tiempo fue inferior a lo reportado por autores como Figueroa-Torres *et al.* (2020) y Arana-Cuenca *et al.* (2019) para la producción de estas mismas enzimas con una cepa del género *Trichoderma*. Sin embargo, en este estudio fue empleado otro sustrato (lirio acuático) y otro sistema (columna empacada), así mismo la actividad enzimática obtenida fue inferior, lo cual puede deberse entre otros factores a la diferencia en la cepa empleada, o las propias ventajas referentes al sistema de columna empacada (mejorar aireación, suministro de O₂ y humedad, mejor disipación del calor y CO₂) (Rocha *et al.*, 2021).

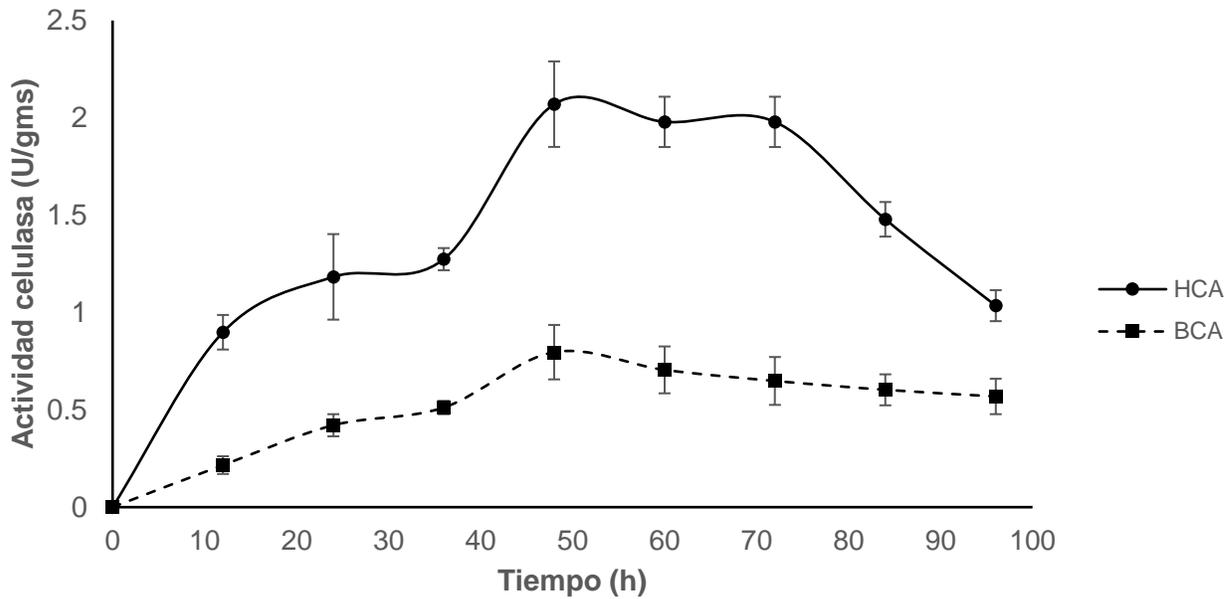


Figura 9. Cinética de actividad celulasa obtenida por los aislados BCA y HCA en FES.

La mayor actividad xilanasas fue obtenida después de 48 h (61.62 U/gms) de cultivo en estado sólido con el aislado HCA, mientras que el aislado BCA obtuvo la máxima actividad xilanasas a las 72 h (23.7 U/gms), teniendo que la actividad xilanasas obtenida por la cepa HCA fue significativamente mayor a la del aislado BCA. Este tiempo fue inferior a lo reportado por autores como Marques *et al.* (2018), quienes encontraron el punto de mayor producción de xilanasas a las 192 h, empleando una mezcla de bagazo de caña con salvado de trigo e inoculado con distintos hongos endófitos. Por otra parte, la actividad xilanasas también se observa muy inferior a lo obtenido por autores como Marques *et al.* (2018) (77.8 U/gms en promedio) o los obtenidos por Moran-Aguilar *et al.*(2021) (648 U/gms en promedio) con bagazo de caña sometido a distintos pretratamientos (Autoclave, NaOH y Agua caliente) con distintas cepas de *A. niger*. Estas diferencias pueden deberse entre muchos otros factores a las diferencias en el tipo de inóculo (discos miceliales), el pretratamiento del bagazo, el uso de una mezcla de

sustratos y a las cepas empleadas para fermentar, todos estos factores influyen en la producción de enzimas hidrolíticas (da Silva *et al.*, 2018; Marques *et al.*, 2018; Xu *et al.*, 2018; Yoon *et al.*, 2014). No obstante, el objetivo de la recuperación de extractos enzimáticos por FES con microbiota autóctona de bagazo de caña fue obtener enzimas con especificidad hacia el sustrato a sacarificar (bagazo de caña). La especificidad de la enzima hacia el sustrato es crucial para una reacción enzimática eficiente, ya que la enzima debe unirse específicamente con el sustrato para catalizar la reacción. La actividad enzimática, o la velocidad a la que la enzima cataliza la reacción, es importante, pero es secundaria a la especificidad. Si la enzima no es específica hacia el sustrato, puede unirse a otras moléculas que no son sustratos y no producirá ningún cambio en la reacción.

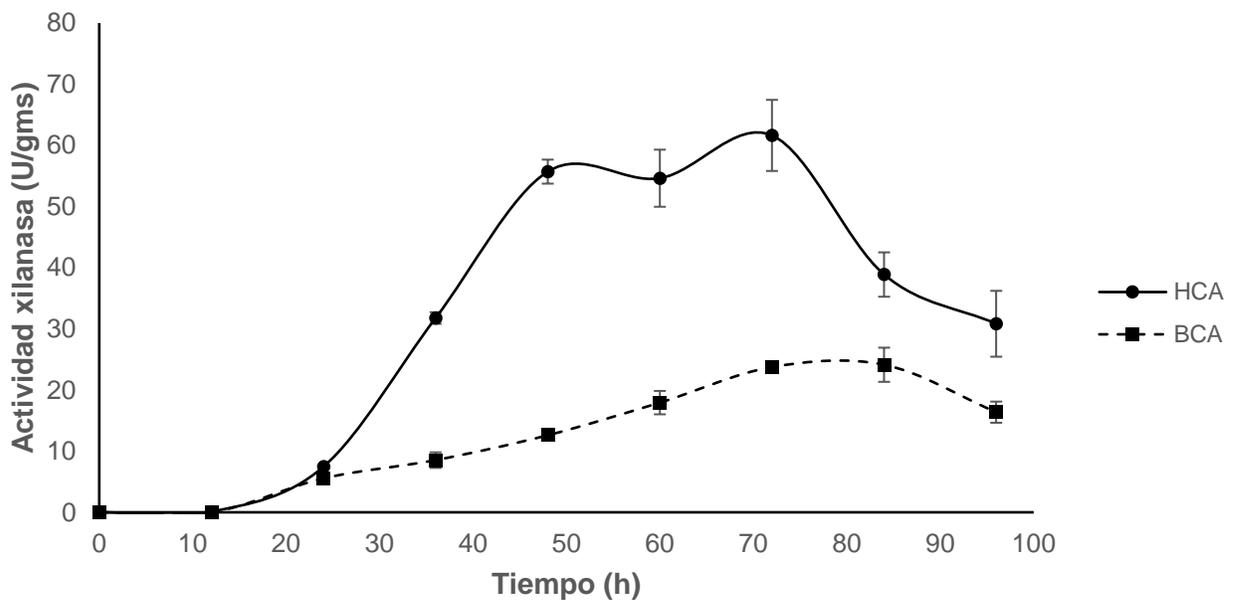


Figura 10. Cinética de actividad xilanasa de los aislados BCA y HCA en FES.

6.4 Evaluación de pretratamientos sobre bagazo de caña previos a la sacarificación enzimática

6.4.1 Pretratamiento de bagazo de caña con peróxido de hidrógeno alcalino.

El pretratamiento con peróxido de hidrógeno alcalino a 0, 1, 3, y 6 h (Figura 11), mostraron diferencias estadísticamente significativas entre sí, obteniéndose el valor máximo de liberación de azúcares totales en el tiempo de 6 h (0.18 g/g).

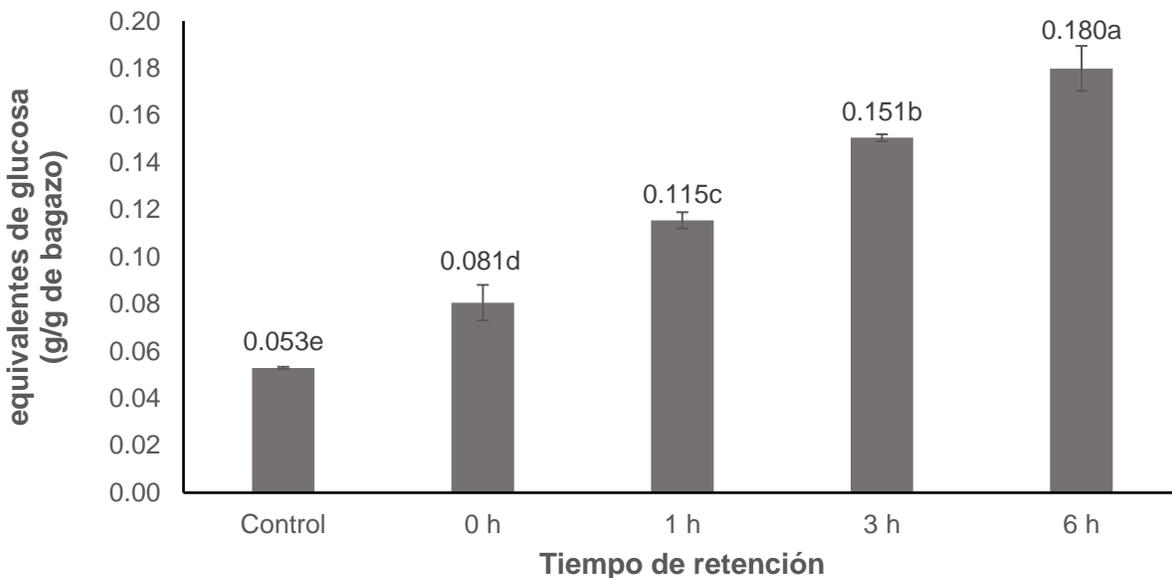


Figura 11. Liberación de azúcares totales a partir de muestras de bagazo de caña pretratadas con peróxido de hidrógeno alcalino y diferentes tiempos de tratamiento. Letras diferentes en las barras indican diferencias estadísticas significativas entre tratamientos ($P \leq 0.05$).

Este resultado es similar a lo reportado por Başar *et al.* (2021), quienes reportaron tiempos de 6 y 24 h de pretratamiento con peróxido de hidrógeno alcalino (3% v/v, pH 11.5), como los más adecuados para aumentar la solubilización de azúcares (40.5 y 43.3 mg/g sólidos volátiles), en el sobrenadante de pasto varilla.

Una vez establecido el tiempo de pretratamiento más adecuado (6 h) de los ensayados en esta investigación, se procedió a evaluar el efecto de la relación peróxido:bagazo (100, 33.33 y 16.6 mL/g). el control consistió en correr la reacción con 33.33 mL de agua por gramo de bagazo de caña, los resultados obtenidos se ilustran en la Figura 12.

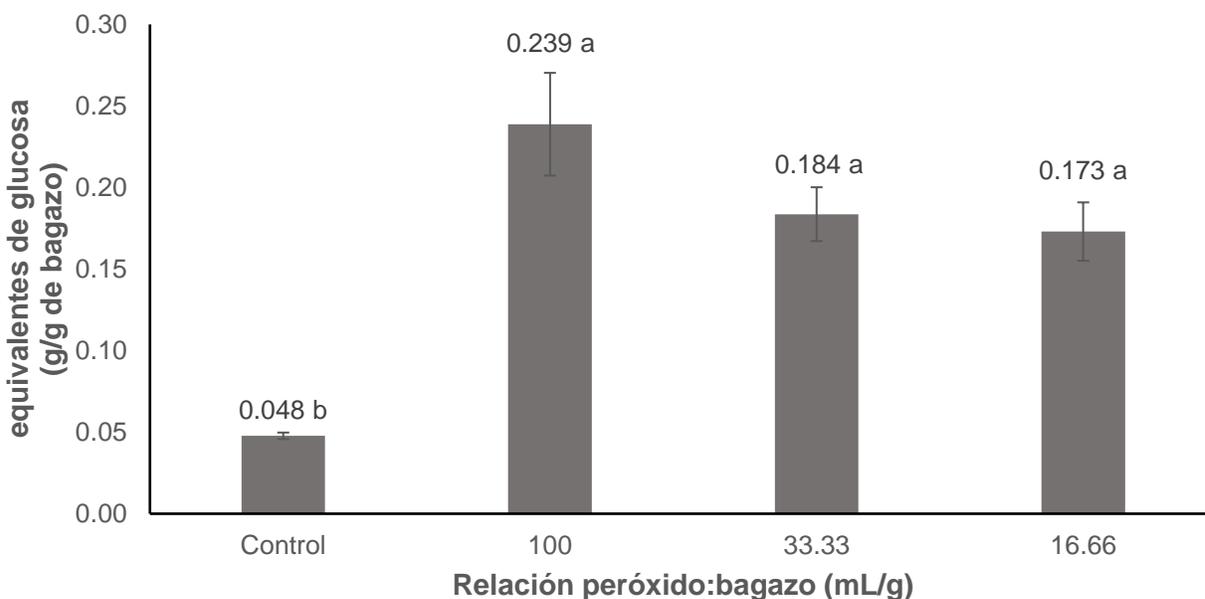


Figura 12. Liberación de azúcares totales a partir de muestras de bagazo de caña pretratadas con diferentes relaciones peróxido:bagazo. Letras diferentes en las barras indican diferencias estadísticas significativas entre tratamientos ($P \leq 0.05$).

Las distintas relaciones peróxido:bagazo, no mostraron diferencias significativas en la liberación de azúcares totales entre ellos. Este resultado difiere de lo reportado por Başar *et al.* (2021), quienes obtuvieron una mayor solubilización de azúcares empleando 13.33 mL/g (Peróxido de hidrógeno alcalino/pasto varilla), en comparación con el pretratamiento con 14.28 mL/g. evidenciando un efecto significativo de la relación peróxido:bagazo sobre la solubilización de azúcares. No obstante, la composición del

pasto varilla (34% hemicelulosa, 40% celulosa) difiere en gran medida a la del bagazo de caña (10-40% lignina, 40-60% celulosa) (Başar *et al.*, 2021; Wu *et al.*, 2020).

La relación peróxido:bagazo con mayor liberación de azúcares fermentables fue 100 mL/g, por lo que se estableció como la más adecuada para realizar los siguientes experimentos.

Para evaluar el efecto de la temperatura (26, 50 y 70 °C) sobre el pretratamiento con peróxido de hidrógeno, se continuó con las condiciones establecidas hasta el momento.

Los resultados se muestran en la Figura 13.

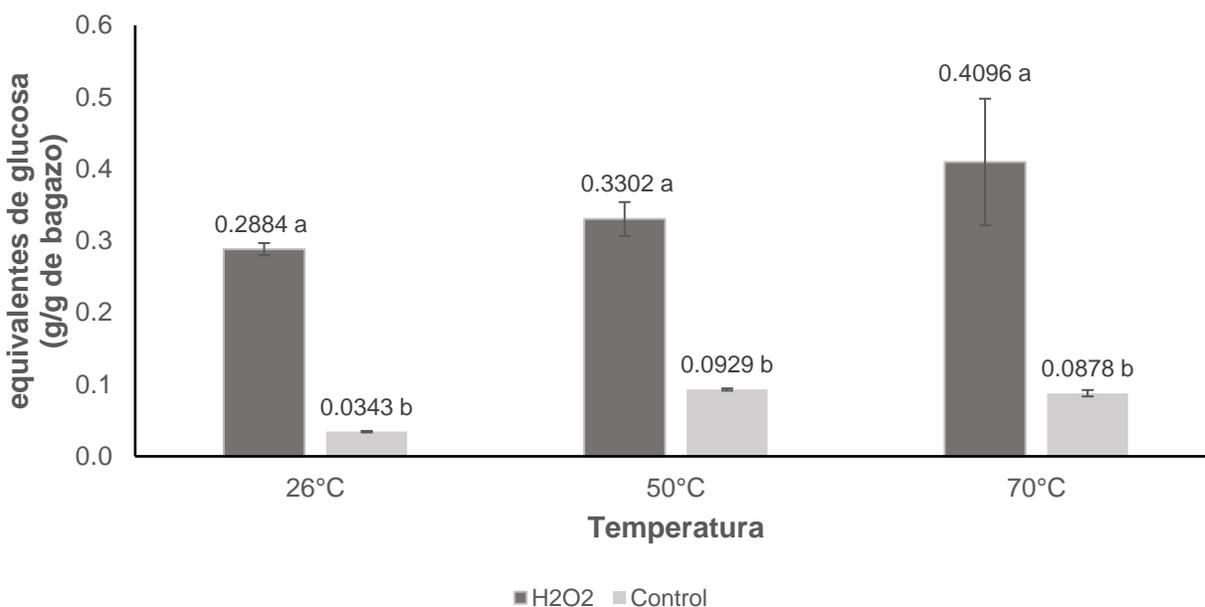


Figura 13. Liberación de azúcares totales a partir de muestras de bagazo de caña pretratadas con H₂O₂ alcalino a diferentes temperaturas. Letras diferentes en las barras indican diferencias estadísticas significativas entre tratamientos ($P \leq 0.05$).

La temperatura de 70 °C obtuvo el promedio de azúcares totales más alto (0.4 g/g), sin embargo, Las distintas temperaturas en el pretratamiento no mostraron diferencias estadísticamente significativas entre sí. Por otro lado, las muestras de control

corroboraron que el peróxido de hidrógeno tiene un efecto significativo en la liberación de azúcares totales del bagazo de caña de azúcar. Esto debido a la ruptura de enlaces entre la lignina y la celulosa ocasionados por la acción oxidante de las especies reactivas del oxígeno (Dutra *et al.*, 2018). Estos resultados difieren de los obtenidos por Başar *et al.* (2021), quienes obtuvieron resultados significativamente mayores en la solubilización de azúcares, conduciendo un pretratamiento con peróxido de hidrógeno (3% v/v) a 100 °C (40.5 mg/g sólidos volátiles), en comparación a los resultados obtenidos con el mismo pretratamiento a 50 °C (aprox. 7 mg/g sólidos volátiles), lo que denota un efecto significativo de la temperatura, sobre el pretratamiento con peróxido de hidrógeno alcalino.

Para los posteriores experimentos se optó por establecer la temperatura en 26°C, ya que fue la condición en la que la variable respuesta tuvo una menor variabilidad (error estándar). Con esto se pretendió reducir el error en el pretratamiento con distintas concentraciones de peróxido.

Por último, el efecto de la concentración del peróxido de hidrógeno alcalino (0, 1, 3 y 5% v/v) fue evaluado, para este punto las demás variables se ajustaron de acuerdo a los resultados obtenidos, teniendo un tiempo de reacción de 6 h, relación peróxido:bagazo de 100 mL/g y temperatura ambiente (26 °C). Los resultados se presentan en la Figura 14.

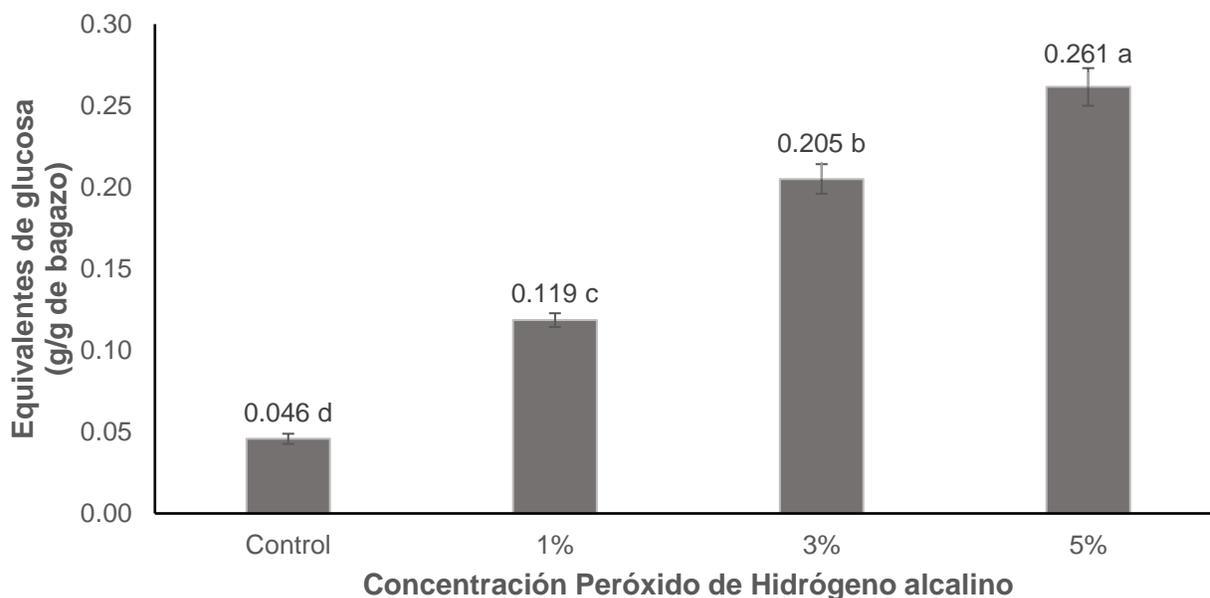


Figura 14. Liberación de azúcares totales a partir de muestras de bagazo de caña pretratadas con H₂O₂ alcalino a diferentes concentraciones. Letras diferentes en las barras indican diferencias estadísticas significativas entre tratamientos ($P \leq 0.05$).

La concentración del peróxido de hidrógeno alcalino resultó un factor significativo en la liberación de azúcares totales, obteniéndose el valor más alto con 5% de peróxido (0.261 ± 0.011 g equivalentes de glucosa por g de bagazo pretratado). El efecto de la concentración del peróxido de hidrógeno en la solubilización de azúcares, ha sido demostrado por autores como Başar *et al.* (2021), quienes optimizaron el pretratamiento de peróxido de hidrógeno alcalino en pasto varilla, encontrando a la variable concentración, así como sus interacciones secundarias (con temperatura, carga de sólidos y tiempo) como significativas, en su modelo predictivo de azúcares solubilizados por acción del pretratamiento.

El pretratamiento con peróxido de hidrógeno alcalino ayuda a mejorar la eficiencia de la sacarificación, esto se consigue en parte, gracias a las especies reactivas como el

superóxido (O_2^-) y el anión hidroxilo (HO^*), que reducen el grado de polimerización de la celulosa y la hemicelulosa, mejorando la eficiencia de la hidrólisis enzimática (Ho *et al.*, 2019). Este efecto de despolimerización de la biomasa, fue monitoreado parcialmente al cuantificar los azúcares totales en el sobrenadante, ya que, la mayoría de polisacáridos requieren tener un grado de polimerización menor a 20, para poder ser solubles en agua (Guo *et al.*, 2017).

6.4.2 Pretratamiento de bagazo de caña con Microondas

En primer lugar, el efecto de la potencia de las microondas (p30, p50 y p80) sobre el pretratamiento de bagazo de caña de azúcar fue evaluado. Para ello, tanto azúcares reductores como azúcares totales liberados en el sobrenadante fueron cuantificados. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 15.

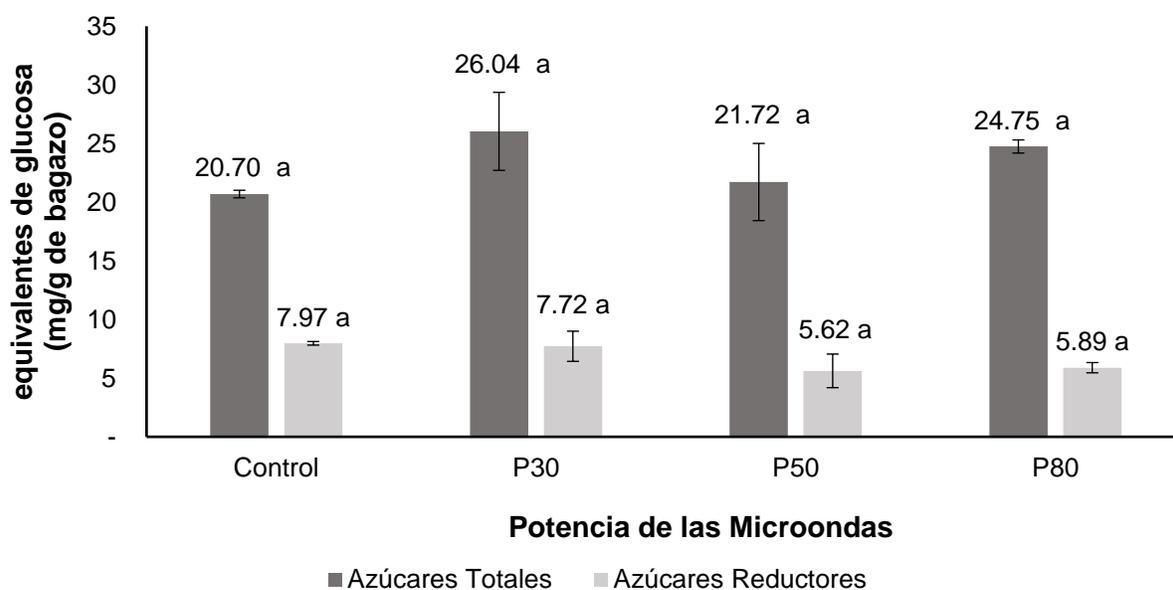


Figura 15. Efecto de la potencia de las microondas, sobre el pretratamiento de bagazo de caña de azúcar. Letras diferentes en las barras indican diferencias estadísticas significativas entre tratamientos ($P \leq 0.05$).

Los resultados obtenidos, no mostraron diferencias estadísticamente significativas en la liberación de azúcares reductores o azúcares totales, en ninguna de las muestras pretratadas, incluso comparándolas con las muestras de control (bagazo sin pretratar). Algunos de los propósitos del pretratamiento con Microondas, es romper los materiales lignocelulósicos, modificar los contenidos de lignina, hemicelulosa y celulosa, así como solubilizar otros compuestos orgánicos como proteínas, carbohidratos y lípidos (Hoang *et al.*, 2021). Por lo que, a pesar de no observar un incremento en la liberación de azúcares en el sobrenadante, pueden existir cambios estructurales en la biomasa (bagazo de caña) pretratada con microondas, que incrementen la eficiencia en la sacarificación enzimática.

Así mismo, el efecto del tiempo del pretratamiento con microondas (5 y 10 min), sobre la liberación de azúcares totales en el sobrenadante fue evaluado, ambos tiempos de pretratamiento, fueron evaluados a las distintas potencias (Figura 16).

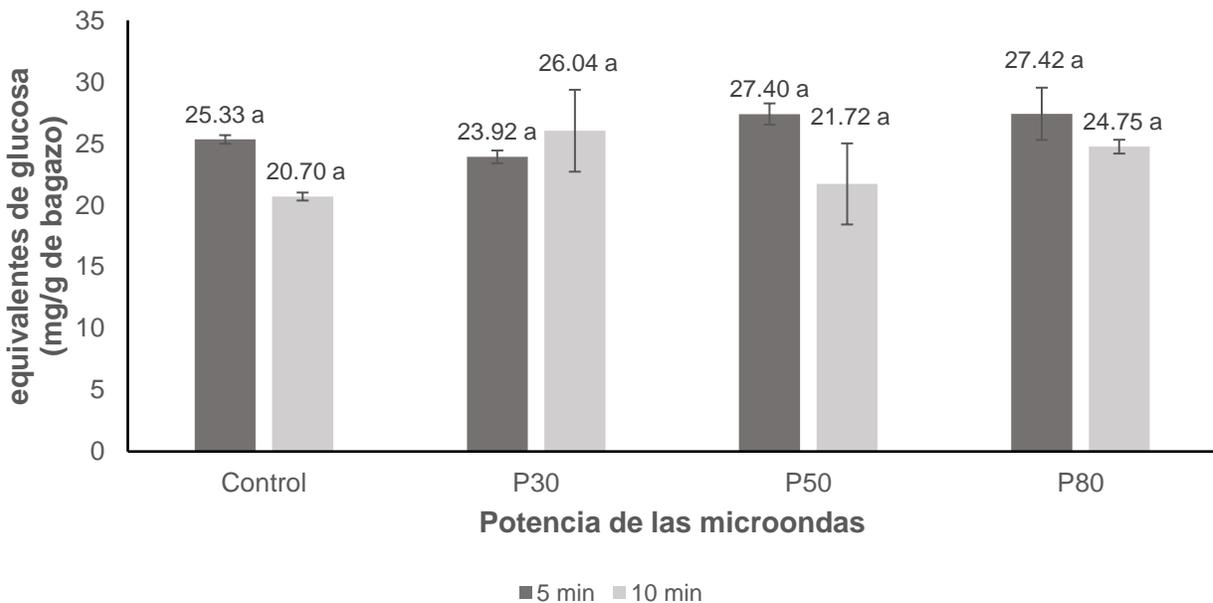


Figura 16. Efecto del tiempo de pretratamiento con microondas, sobre el pretratamiento de bagazo de caña de azúcar. Letras diferentes en las barras indican diferencias estadísticas significativas entre tratamientos ($P \leq 0.05$).

Los resultados obtenidos, no mostraron diferencias significativas en la liberación de azúcares totales, en el pretratamiento con microondas a distintas potencias (P30, P50 y P80) y tiempos (5 y 10 min). Sin embargo, a pesar de no haber cambios en la solubilización de carbohidratos en la fase líquida, el pretratamiento con microondas, puede reducir el índice de cristalinidad así como el grado de polimerización de la celulosa (Hoang *et al.*, 2021). Lo cual puede incrementar la eficiencia de la sacarificación enzimática en muestras de biomasa lignocelulósica.

6.5 Sacarificación enzimática de bagazo de caña con extractos enzimáticos, para la liberación de azúcares fermentables

Para la sacarificación de bagazo de caña, fueron empleados extractos enzimáticos obtenidos por FES con los dos aislados fúngicos (BCA y HCA). No obstante, los extractos obtenidos de BCA, no mostraron actividad catalítica en los ensayos de sacarificación con bagazo de caña (pretratado y sin pretratar). Únicamente el extracto enzimático del aislado HCA mostró actividad catalítica, la cual se presenta en la Figura 17.

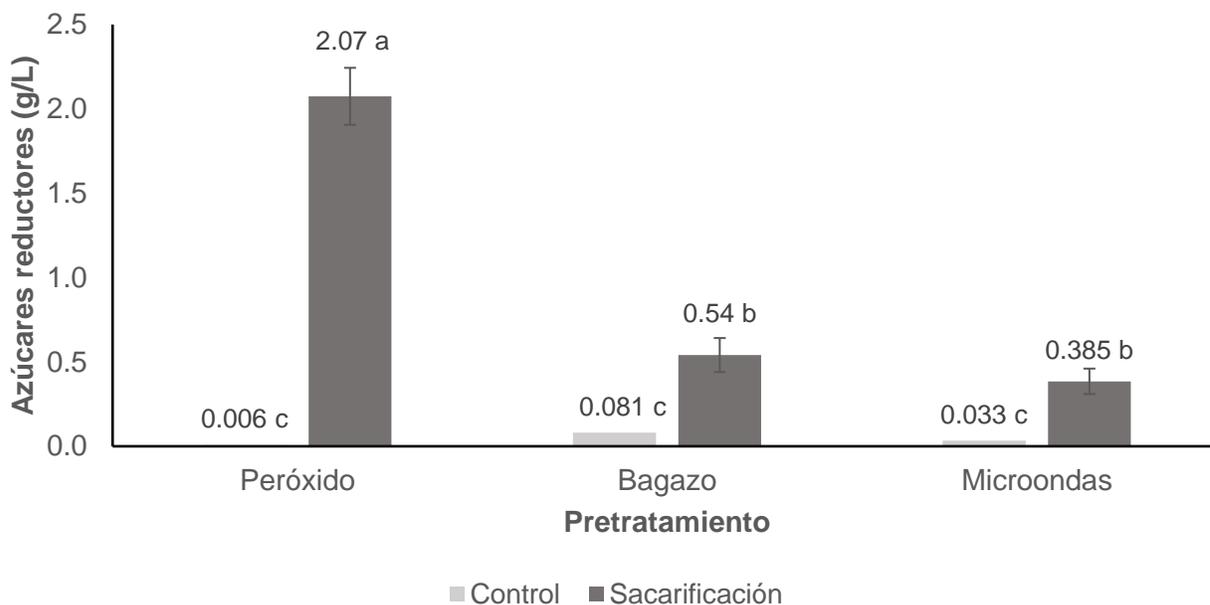


Figura 17. Hidrólisis enzimática de bagazo de caña con distintos pretratamientos, empleando extractos enzimáticos (celulasas y xilanasas) obtenidos por FES.

El uso de pretratamientos sobre la biomasa lignocelulósica (bagazo de caña de azúcar), es necesario para incrementar la eficiencia en el proceso de sacarificación, este efecto fue notorio en el ensayo con bagazo pretratado con peróxido de hidrógeno, en el cual fue obtenida la mayor liberación de azúcares fermentables (2.07 g/L), después del proceso de sacarificación. A su vez, este ensayo tuvo una eficiencia promedio de 0.41 g de azúcares reductores por gramo de bagazo (materia seca) sacarificado.

Este resultado es mayor al obtenido por Nogueira *et al.* en 2021, quienes alcanzaron una eficiencia de 0.061g de azúcares reductores por gramo de bagazo de piña pretratado con peróxido de hidrógeno, e hidrolizado enzimáticamente con celulasas comerciales (9 FPU/g), esta diferencia puede deberse al uso exclusivo de enzimas celulasas, en comparación al presente trabajo, en el que los extractos enzimáticos contaban con actividad xilanasas y celulasas.

Por otra parte, nuestros resultados fueron menores a los obtenidos por Figueroa-Torres *et al.* en 2020, quienes consiguieron la mayor eficiencia entre 0.46 y 0.51 g de azúcares reductores por gramo de lirio acuático sacarificado, empleando extractos enzimáticos (celulasas y xilanasas), obtenidos por FES. Sin embargo, cabe puntualizar, que en el trabajo de Figueroa-Torres *et al.* (2020) el lirio acuático fue pretratado por explosión de vapor, y que el sustrato hidrolizado también fue distinto al empleado en esta investigación.

Por otra parte, los ensayos con bagazo sin pretratar y pretratado con microondas, a pesar de haber liberado de azúcares fermentables (0.108 y 0.077 g/g de bagazo), no mostraron diferencias estadísticamente significativas entre sí, lo que pone de manifiesto que no existió un incremento en la eficiencia de la sacarificación, al someter el bagazo de caña al pretratamiento con microondas. Este resultado difiere de lo obtenido por Hu y Wen en (2008), quienes alcanzaron una eficiencia de 0.345 g de azúcares reductores por gramo de pasto varilla pretratado con microondas (2.45 GHz, 1000 W, 30 min, 190 °C), y sacarificado con enzimas comerciales (Celluclast 1.5-L y Novozyme 188). Este resultado puede deberse entre otras cuestiones, a la naturaleza de la biomasa sacarificada, y a las condiciones del pretratamiento (temperatura, tiempo). Por ejemplo, en el presente trabajo, la temperatura del pretratamiento no fue monitoreada por limitaciones en el equipo empleado.

6.6 Producción de bioetanol utilizando azúcares fermentables obtenidos del bagazo de caña sacarificado

Se consiguió aislar una levadura a partir de la muestra de la industria azucarera (aislado L1), este aislado presentó características macroscópicas (Tabla 2) y microscópicas

(Figura 18) similares a las reportadas para *Saccharomyces cerevisiae*, como la apariencia de sus células globosas, ovoides o cilíndricas, colonias color crema claro, superficie lisa y plana, reproducción por gemación, capacidad para fermentar sacarosa, y un crecimiento adecuado a temperaturas de entre 30 y 37 °C (Stewart, 2014).

Tabla 2. Características macroscópicas presentes en las colonias del aislado de levadura (L1)

Característica	Aislado
Color	Crema
Forma	Circular
Elevación	Plana
Borde	Entero
Superficie	Lisa
Tamaño	1-2 mm

Fuente: Elaboración propia

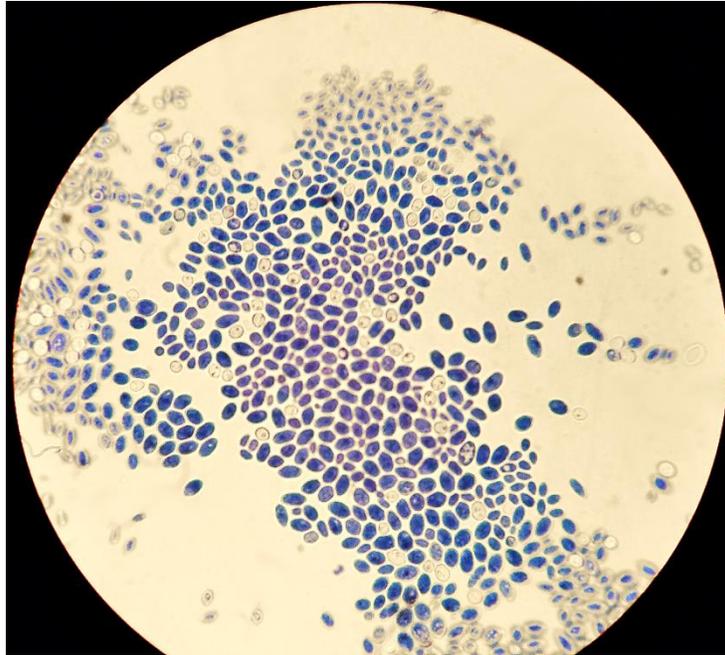


Figura 18. Morfología del aislado de levadura (L1) proveniente de la agroindustria azucarera

El punto de máxima producción de etanol a partir de azúcares fermentables, obtenidos por la sacarificación enzimática de bagazo de caña, fue obtenido a las 48 h. En el caso de la fermentación con el aislado L1, fue obtenida una concentración máxima de etanol de 4.59 g/L (Figura 19), que corresponde a un rendimiento de etanol de 0.18 g/g de materia seca (bagazo de caña), o 0.459 g/g de azúcares fermentables con más de un 90% de consumo.

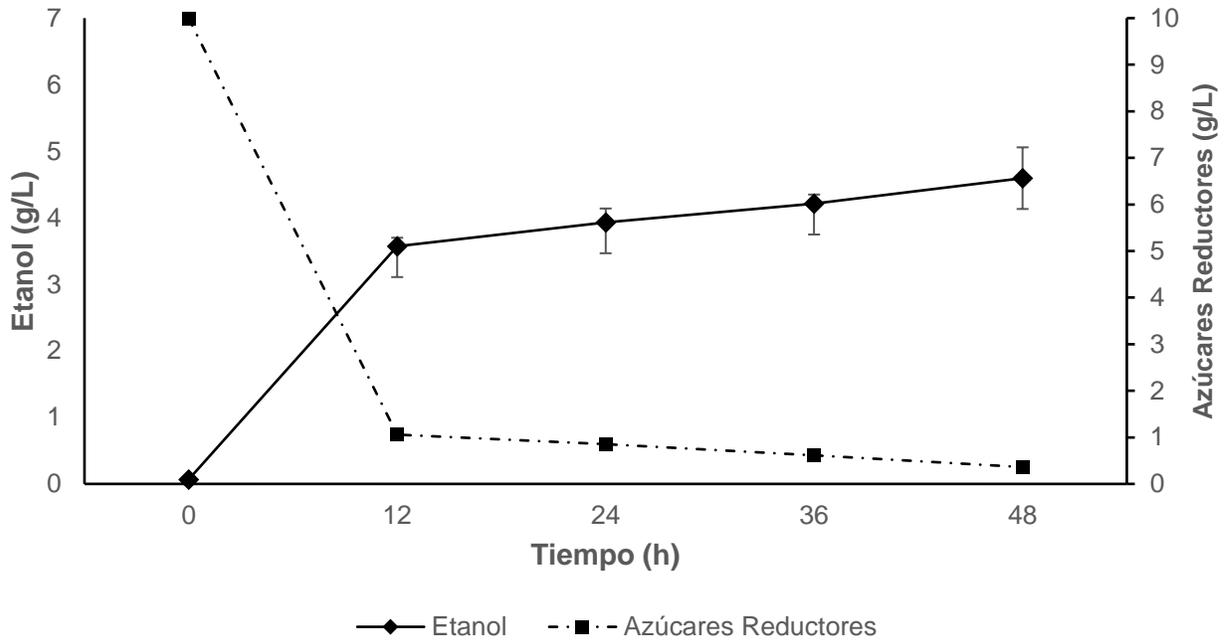


Figura 19. Producción de etanol por aislado de levadura proveniente de una alcoholera local, usando azúcares reductores obtenidos de bagazo de caña sacarificado enzimáticamente.

Para el caso de la levadura comercial, la concentración máxima de etanol fue de 4.32 g/L (Figura 20). Esto corresponde a un rendimiento de etanol de 0.17 g/g de materia seca (bagazo de caña), o 0.43 g/g de azúcares fermentables con más de un 90% de consumo.

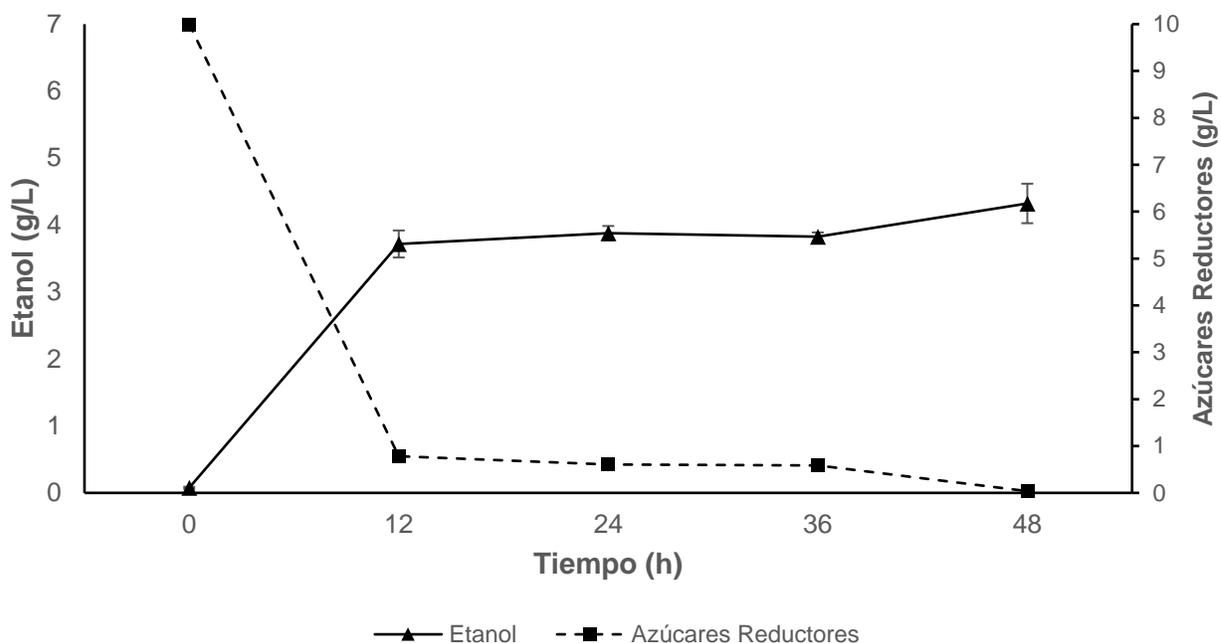


Figura 20. Producción de etanol por *Saccharomyces cerevisiae* comercial, usando azúcares reductores obtenidos de bagazo de caña sacarificado enzimáticamente.

Los rendimientos obtenidos en esta investigación, son inferiores a los reportados para la producción de bioetanol a partir de bagazo de caña, por autores como Prajapati *et al.* (2020) de 0.415 g etanol/g de bagazo pretratado, Jugwanth *et al.* (2020) de 0.49 g etanol/g glucosa, de Araujo-Guilherme *et al.* (2019) de 0.34 g etanol/g de glucosa, Huang *et al.* (2015) de 0.42 g etanol/g de celulosa. Estas diferencias pueden explicarse por diferencias en el microorganismo empleado para fermentar (cepas con capacidad para fermentar hexosas y pentosas), el pretratamiento empleado, el uso de enzimas comerciales, y el uso de sistemas de sacarificación y fermentación simultánea.

7 Conclusiones

La fermentación en estado sólido con bagazo de caña como soporte-sustrato, permitió la obtención de extractos enzimáticos con actividad enzimática xilanasa y celulasa, a partir de las cepas fúngicas hojas de caña de azúcar y bagazo de caña de azúcar (aparentemente del género *Trichoderma*). Sin embargo, la cepa de hojas de caña de azúcar expresó una mayor actividad hidrolítica.

Los resultados de las diferentes condiciones evaluadas para el pretratamiento de bagazo de caña con peróxido de hidrógeno, mostraron diferencias significativas, lo que permitió definir condiciones para mejorar la solubilización de azúcares. Sin embargo, los resultados obtenidos con las condiciones ensayadas para el pretratamiento con microondas, no mostraron diferencias significativas en la solubilización de azúcares.

La eficiencia de la sacarificación enzimática, fue mayor cuando se empleó bagazo de caña pretratado con peróxido de hidrógeno alcalino, aumentando en más de tres veces la liberación de azúcares reductores, en comparación con la sacarificación de bagazo sin pretratar. No obstante, los resultados de la sacarificación de bagazo pretratado con microondas, no mostraron diferencias significativas en el rendimiento.

El uso de azúcares fermentables, obtenidos del bagazo de caña pretratado (peróxido de hidrógeno alcalino) y sacarificado enzimáticamente, permitió la obtención de bioetanol tras 48 h de fermentación, sin encontrarse diferencias significativas entre los resultados obtenidos por el aislado L1 y la levadura comercial.

8 Referencias bibliográficas

- Abd Elrsoul, R., y Bakhiet, S. E. A. (2018). Optimization of factors influencing cellulase production by some indigenous isolated fungal species. *Jordan Journal of Biological Sciences*, 11(1), 31-36.
- Abo, B. O., Gao, M., Wang, Y., Wu, C., Ma, H., y Wang, Q. (2019). Lignocellulosic biomass for bioethanol: An overview on pretreatment, hydrolysis and fermentation processes. *Reviews on environmental health*, 34(1), 57-68.
- Afolabi, C. G., Ezekiel, C. N., Ogunbiyi, A. E., Oluwadairo, O. J., Sulyok, M., y Krska, R. (2020). Fungi and mycotoxins in cowpea (*Vigna unguiculata* L) on Nigerian markets. *Food Additives y Contaminants: Part B*, 13(1), 52-58.
<https://doi.org/10.1080/19393210.2019.1690590>
- Aguilar-Rivera, N., Debernardi-Vázquez, T. J., y Herrera-Paz, H. D. (2017). Byproducts, coproducts and derivatives of the sugar agroindustry. *Agroproductividad*, 10(11), 13-20.
- Albarelli, J. Q., Santos, D. T., Ensinas, A. V., Marechal, F., Cocero, M. J., y Meireles, M. A. A. (2018). Product diversification in the sugarcane biorefinery through algae growth and supercritical CO₂ extraction: Thermal and economic analysis. *Renewable energy*, 129, 776-785.
- Arana-Cuenca, A., Tovar-Jiménez, X., Favela-Torres, E., Perraud-Gaime, I., González-Becerra, A. E., Martínez, A., Moss-Acosta, C. L., Mercado-Flores, Y., y Téllez-Jurado, A. (2019). Use of water hyacinth as a substrate for the production of filamentous fungal hydrolytic enzymes in solid-state fermentation. *3 Biotech*, 9(1), 1-9.

- Asis, A., Shahriar, S. A., Naher, L., Saallah, S., Fatihah, H. N. N., Kumar, V., y Siddiquee, S. (2021). Identification patterns of Trichoderma strains using morphological characteristics, phylogenetic analyses and lignocellulolytic activities. *Molecular biology reports*, 48(4), 3285-3301.
- Barnett, H. L., y Hunter, B. B. (1972). Illustrated genera of imperfect fungi. *Illustrated genera of imperfect fungi.*, 3rd ed.
- Başar, İ. A., Çoban, Ö., Göksungur, M. Y., Eskicioğlu, Ç., y Perendeci, N. A. (2021). Enhancement of lignocellulosic biomass anaerobic digestion by optimized mild alkaline hydrogen peroxide pretreatment for biorefinery applications. *Journal of Environmental Management*, 298, 113539.
- Bell, G. (2017). Second-generation biorefineries: Optimization, opportunities, and implications for Australia. *Industrial Biotechnology*, 13(2), 76-84.
- Bychkov, A., Podgorbunskikh, E., Bychkova, E., y Lomovsky, O. (2019). Current achievements in the mechanically pretreated conversion of plant biomass. *Biotechnology and Bioengineering*, 116(5), 1231-1244.
- Castilla-Marroquín, J. D., Hernández-Martínez, R., de la Vequia, H. D., Ríos-Corripio, M. A., Hernández-Rosas, J., López, M. R., y Hernández-Rosas, F. (2020). Dextran synthesis by native sugarcane microorganisms. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 19(Sup. 1), 177-185.
- CONADESUCA. (2023). *CONADESUCA (Comité Nacional para el Desarrollo Sustentable de la Caña de Azúcar)*. CONADESUCA. <https://www.gob.mx/conadesuca/>

- da Silva, F. L., de Oliveira Campos, A., dos Santos, D. A., de Oliveira Júnior, S. D., de Araújo Padilha, C. E., de Sousa Junior, F. C., de Macedo, G. R., y dos Santos, E. S. (2018). Pretreatments of Carnauba (*Copernicia prunifera*) straw residue for production of cellulolytic enzymes by *Trichoderma reesei* CCT-2768 by solid state fermentation. *Renewable Energy*, 116, 299-308.
- de Araujo Guilherme, A., Dantas, P. V. F., de Araújo Padilha, C. E., Dos Santos, E. S., y de Macedo, G. R. (2019). Ethanol production from sugarcane bagasse: Use of different fermentation strategies to enhance an environmental-friendly process. *Journal of environmental management*, 234, 44-51.
- Dincer, I. (2018). *Comprehensive energy systems*. Elsevier. pp. 875-908
- Dutra, E. D., Santos, F. A., Alencar, B. R. A., Reis, A. L. S., de Souza, R. de F. R., Aquino, K. A. da S., Morais Jr, M. A., y Menezes, R. S. C. (2018). Alkaline hydrogen peroxide pretreatment of lignocellulosic biomass: Status and perspectives. *Biomass Conversion and Biorefinery*, 8(1), 225-234.
- Figueroa-Torres, L. A., Lizardi-Jiménez, M. A., López-Ramírez, N., Varela-Santos, E. C., Hernández-Rosas, F., Favela-Torres, E., y Hernández-Martínez, R. (2020). Saccharification of water hyacinth biomass by a combination of steam explosion with enzymatic technologies for bioethanol production. *3 Biotech*, 10(10), 432. <https://doi.org/10.1007/s13205-020-02426-8>
- Florencio, C., Couri, S., y Farinas, C. S. (2012). Correlation between agar plate screening and solid-state fermentation for the prediction of cellulase production by *Trichoderma* strains. *Enzyme research*, 2012.

- Gordillo-Fuenzalida, F., Echeverria-Vega, A., Cuadros-Orellana, S., Faundez, C., Kähne, T., y Morales-Vera, R. (2019). Cellulases production by a *Trichoderma* sp. Using food manufacturing wastes. *Applied Sciences*, 9(20), 4419.
- Guo, M. Q., Hu, X., Wang, C., y Ai, L. (2017). Polysaccharides: Structure and solubility. *Solubility of polysaccharides*, 2, 8-21.
- Haldar, D., y Purkait, M. K. (2021). A review on the environment-friendly emerging techniques for pretreatment of lignocellulosic biomass: Mechanistic insight and advancements. *Chemosphere*, 264, 128523.
- Herrera, O. (2003). *Obtención y selección de cepas de Aspergillus niger sobreproductoras de Fitasa* [Tesis para obtener el grado de Maestro en Biotecnología]. Universidad Autónoma Metropolitana.
- Ho, M. C., Ong, V. Z., y Wu, T. Y. (2019). Potential use of alkaline hydrogen peroxide in lignocellulosic biomass pretreatment and valorization – A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 112, 75-86.
<https://doi.org/10.1016/j.rser.2019.04.082>
- Hoang, A. T., Nižetić, S., Ong, H. C., Mofijur, M., Ahmed, S. F., Ashok, B., y Chau, M. Q. (2021). Insight into the recent advances of microwave pretreatment technologies for the conversion of lignocellulosic biomass into sustainable biofuel. *Chemosphere*, 281, 130878.
- Hu, Z., y Wen, Z. (2008). Enhancing enzymatic digestibility of switchgrass by microwave-assisted alkali pretreatment. *Biochemical Engineering Journal*, 38(3), 369-378.
- Huang, Y., Qin, X., Luo, X.-M., Nong, Q., Yang, Q., Zhang, Z., Gao, Y., Lv, F., Chen, Y., y Yu, Z. (2015). Efficient enzymatic hydrolysis and simultaneous saccharification

- and fermentation of sugarcane bagasse pulp for ethanol production by cellulase from *Penicillium oxalicum* EU2106 and thermotolerant *Saccharomyces cerevisiae* ZM1-5. *Biomass and Bioenergy*, 77, 53-63.
- Ire, F. S., Okoli, A. O., y Ezebuoro, V. (2018). Production and optimization of cellulase from *Penicillium* sp. Using corn-cob and pawpaw fibre as substrates. *Journal of Advances in Microbiology*, 8(2), 1-10.
- Isarankura-Na-Ayudhya, C., Tantimongcolwat, T., Kongpanpee, T., Prabkate, P., y Prachayasittikul, V. (2007). Appropriate Technology for the Bioconversion of Water Hyacinth (*Eichhornia crassipes*) to Liquid Ethanol: Future Prospects for Community Strengthening and Sustainable Development. *Excli J*, 61.
- Johnsson, F., Kjärstad, J., y Rootzén, J. (2019). The threat to climate change mitigation posed by the abundance of fossil fuels. *Climate Policy*, 19(2), 258-274.
- Jugwanth, Y., Sewsynker-Sukai, Y., y Gueguim Kana, E. B. (2020). Valorization of sugarcane bagasse for bioethanol production through simultaneous saccharification and fermentation: Optimization and kinetic studies. *Fuel*, 262, 116552. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2019.116552>
- Kasana, R. C., Salwan, R., Dhar, H., Dutt, S., y Gulati, A. (2008). A rapid and easy method for the detection of microbial cellulases on agar plates using Gram's iodine. *Current microbiology*, 57(5), 503-507.
- Ko, J. K., y Lee, S.-M. (2018). Advances in cellulosic conversion to fuels: Engineering yeasts for cellulosic bioethanol and biodiesel production. *Current opinion in biotechnology*, 50, 72-80.

- Kumar, A., Kumar, V., y Singh, B. (2021). Cellulosic and hemicellulosic fractions of sugarcane bagasse: Potential, challenges and future perspective. *International Journal of Biological Macromolecules*, 169, 564-582.
- Kumar, V., y Shukla, P. (2018). Extracellular xylanase production from *T. lanuginosus* VAPS24 at pilot scale and thermostability enhancement by immobilization. *Process Biochemistry*, 71, 53-60.
- Lacerda, L. T., Gusmão, L. F., y Rodrigues, A. (2018). Diversity of endophytic fungi in *Eucalyptus microcorys* assessed by complementary isolation methods. *Mycological Progress*, 17(6), 719-727.
- Lam, H.-H., Dinh, T.-H., y Dang-Bao, T. (2021). Quantification of total sugars and reducing sugars of dragon fruit-derived sugar-samples by UV-Vis spectrophotometric method. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 947(1), 012041.
- Leite, P., Sousa, D., Fernandes, H., Ferreira, M., Costa, A. R., Filipe, D., Gonçalves, M., Peres, H., Belo, I., y Salgado, J. M. (2021). Recent advances in production of lignocellulolytic enzymes by solid-state fermentation of agro-industrial wastes. *Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry*, 27, 100407.
- Li, J., Lu, M., Guo, X., Zhang, H., Li, Y., y Han, L. (2018). Insights into the improvement of alkaline hydrogen peroxide (AHP) pretreatment on the enzymatic hydrolysis of corn stover: Chemical and microstructural analyses. *Bioresource technology*, 265, 1-7.
- LLanes-Gil-López, D. I., Lois-Correa, J. A., Sánchez-Pardo, M. E., y Orta-Guzman, V. N. (2017). Panorámica en México de la utilización de los residuos agroindustriales:

- Residuos fibrosos de la caña de azúcar. *ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar*, 51(1), 39-42.
- Łukajtis, R., Rybarczyk, P., Kucharska, K., Konopacka-Łyskawa, D., Słupek, E., Wychodnik, K., y Kamiński, M. (2018). Optimization of saccharification conditions of lignocellulosic biomass under alkaline pre-treatment and enzymatic hydrolysis. *Energies*, 11(4), 886.
- Mansour, A. A., Arnaud, T., Lu-Chau, T. A., Fdz-Polanco, M., Moreira, M. T., y Rivero, J. A. C. (2016). Review of solid state fermentation for lignocellulolytic enzyme production: Challenges for environmental applications. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 15(1), 31-46.
- Marques, N. P., de Cassia Pereira, J., Gomes, E., da Silva, R., Araújo, A. R., Ferreira, H., Rodrigues, A., Dussán, K. J., y Bocchini, D. A. (2018). Cellulases and xylanases production by endophytic fungi by solid state fermentation using lignocellulosic substrates and enzymatic saccharification of pretreated sugarcane bagasse. *Industrial Crops and Products*, 122, 66-75.
<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.05.022>
- Martínez-Salgado, S. J., Andrade-Hoyos, P., Romero-Arenas, O., Villa-Ruano, N., Landeta-Cortés, G., y Rivera-Tapia, J. A. (2021). Control in vitro de *Fusarium* sp. Asociado al cultivo de cebolla mediante *Trichoderma harzianum*. *Revista Mexicana de Fitopatología, Mexican Journal of Phytopathology*, 39(2), Art. 2.
<https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2101-4>

- Marzo, C., Díaz, A. B., Caro, I., y Blandino, A. (2019). Valorization of agro-industrial wastes to produce hydrolytic enzymes by fungal solid-state fermentation. *Waste Management y Research*, 37(2), 149-156.
- Matos, M., Valdivia, A., Rodríguez, Z., Bocourt, R., Brizuela, M. A., Portilla, Y., Rubio, Y., y Ramírez, H. L. (2018). Production of xylanases by *Bacillus subtilis* E44 under submerged fermentation conditions. *Cuban Journal of Agricultural Science*, 52(3).
- Mejias, L., Cerda, A., Barrena, R., Gea, T., y Sánchez, A. (2018). Microbial strategies for cellulase and xylanase production through solid-state fermentation of digestate from biowaste. *Sustainability*, 10(7), 2433.
- Miller, G. L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical chemistry*, 31(3), 426-428.
- Moran-Aguilar, M. G., Costa-Trigo, I., Calderón-Santoyo, M., Domínguez, J. M., y Aguilar-Uscanga, M. G. (2021). Production of cellulases and xylanases in solid-state fermentation by different strains of *Aspergillus niger* using sugarcane bagasse and brewery spent grain. *Biochemical Engineering Journal*, 172, 108060.
- Naher, L., Fatin, S. N., Sheikh, M. A. H., Azeez, L. A., Siddiquee, S., Zain, N. M., y Karim, S. M. R. (2021). Cellulase Enzyme Production from Filamentous Fungi *Trichoderma reesei* and *Aspergillus awamori* in Submerged Fermentation with Rice Straw. *Journal of Fungi*, 7(10), 868.
- Niju, S., Nishanthini, T., y Balajii, M. (2020). Alkaline hydrogen peroxide-pretreated sugarcane tops for bioethanol production—A process optimization study. *Biomass Conversion and Biorefinery*, 10(1), 149-165.

- Nogueira, D. P., Vasconcelos, L. C., Castiglioni, G. L., Freitas, F. F., y Seolatto, A. A. (2021). Comparative study of the efficiency of pretreatment with alkaline hydrogen peroxide in pineapple bagasse in different granulometries submitted to acid and enzymatic saccharification. *Research, Society and Development*, 10(1), e4921019902-e4921019902.
- Oh, E. J., y Jin, Y.-S. (2020). Engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for efficient fermentation of cellulose. *FEMS yeast research*, 20(1), 89.
- Owolabi, A. F., Haafiz, M. M., Hossain, M. S., Hussin, M. H., y Fazita, M. N. (2017). Influence of alkaline hydrogen peroxide pre-hydrolysis on the isolation of microcrystalline cellulose from oil palm fronds. *International journal of biological macromolecules*, 95, 1228-1234.
- Panahi, H. K. S., Dehghani, M., Aghbashlo, M., Karimi, K., y Tabatabaei, M. (2020). Conversion of residues from agro-food industry into bioethanol in Iran: An under-valued biofuel additive to phase out MTBE in gasoline. *Renewable energy*, 145, 699-710.
- Prajapati, B. P., Jana, U. K., Suryawanshi, R. K., y Kango, N. (2020). Sugarcane bagasse saccharification using *Aspergillus tubingensis* enzymatic cocktail for 2G bioethanol production. *Renewable Energy*, 152, 653-663.
- Robak, K., y Balcerek, M. (2018). Review of second generation bioethanol production from residual biomass. *Food technology and biotechnology*, 56(2), 174.
- Rocha, L. M., Campanhol, B. S., y Bastos, R. G. (2021). Solid-state cultivation of *Aspergillus niger*–*Trichoderma reesei* from sugarcane bagasse with vinasse in

- bench packed-bed column bioreactor. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 193(9), 2983-2992.
- Roukas, T., y Kotzekidou, P. (2022). From food industry wastes to second generation bioethanol: A review. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 21(1), 299-329.
- Rukmana, S., Ansori, A. N., Kusala, M. K., Utami, U., Wahyudi, D., y Mandasari, A. A. (2020). Molecular identification of trichoderma isolates from sugarcane bagasse based on internal transcribed spacer (ITS) rDNA. *Research Journal of Pharmacy and Technology*, 13(7), 3300-3304.
- Sankaran, R., Cruz, R. A. P., Pakalapati, H., Show, P. L., Ling, T. C., Chen, W.-H., y Tao, Y. (2020). Recent advances in the pretreatment of microalgal and lignocellulosic biomass: A comprehensive review. *Bioresource technology*, 298, 122476.
- Saroj, P., Manasa, P., y Narasimhulu, K. (2018). Characterization of thermophilic fungi producing extracellular lignocellulolytic enzymes for lignocellulosic hydrolysis under solid-state fermentation. *Bioresources and Bioprocessing*, 5(1), 1-14.
- Savín-Molina, J., Hernández-Montiel, L. G., Ceiro-Catasú, W., Ávila-Quezada, G. D., Palacios-Espinosa, A., Ruiz-Espinoza, F. H., & Romero-Bastidas, M. (2021). Caracterización morfológica y potencial de biocontrol de especies de Trichoderma aisladas de suelos del semiárido. *Revista mexicana de fitopatología*, 39(3), 435–451.
- Sharma, B., Larroche, C., y Dussap, C.-G. (2020). Comprehensive assessment of 2G bioethanol production. *Bioresource technology*, 313, 123630.

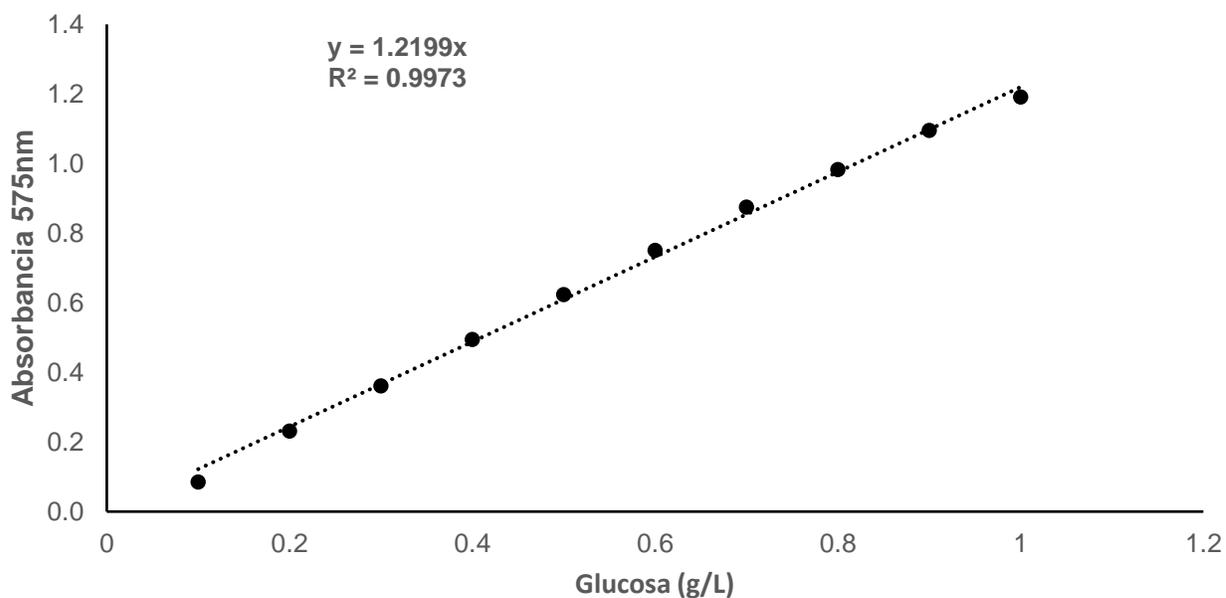
- Sheng, Y., Lam, S. S., Wu, Y., Ge, S., Wu, J., Cai, L., Huang, Z., Van Le, Q., Sonne, C., y Xia, C. (2021). Enzymatic conversion of pretreated lignocellulosic biomass: A review on influence of structural changes of lignin. *Bioresource technology*, 324, 124631.
- Soria-Noroña, L. C., y López-Almeida, J. V. (2020). Determinación del Índice de Potencia lipolítico y proteolítico en bacterias psicrótolerantes de las aguas termales de los Ilinizas. *Dominio de las Ciencias*, 6(2), 1091-1196.
- Stefanello, R. F., Nabeshima, E. H., Iamanaka, B. T., Ludwig, A., Fries, L. L. M., Bernardi, A. O., y Copetti, M. V. (2019). Survival and stability of *Lactobacillus fermentum* and *Wickerhamomyces anomalus* strains upon lyophilisation with different cryoprotectant agents. *Food Research International*, 115, 90-94.
- Stewart, G. G. (2014). SACCHAROMYCES | *Saccharomyces cerevisiae*. En C. A. Batt y M. L. Tortorello (Eds.), *Encyclopedia of Food Microbiology (Second Edition)* (pp. 309-315). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384730-0.00292-5>
- Su, T., Zhao, D., Khodadadi, M., y Len, C. (2020). Lignocellulosic biomass for bioethanol: Recent advances, technology trends, and barriers to industrial development. *Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry*, 24, 56-60.
- Unartngam, J., Srithongkum, B., Intanoo, W., Charoenrak, P., y Chamswarnng, C. (2020). Morphological and molecular based identification of *Trichoderma* CB-Pin-01 biological control agent of plant pathogenic fungi in Thailand. *IJAT*, 16(16), 175-188.
- Valladares-Diestra, K. K., de Souza Vandenberghe, L. P., Torres, L. A. Z., Nishida, V. S., Zandoná Filho, A., Woiciechowski, A. L., y Soccol, C. R. (2021). Imidazole green

- solvent pre-treatment as a strategy for second-generation bioethanol production from sugarcane bagasse. *Chemical Engineering Journal*, 420, 127708.
- Vázquez-Montoya, E. L., Castro-Ochoa, L. D., Maldonado-Mendoza, I. E., Luna-Suárez, S., y Castro-Martínez, C. (2020). Moringa straw as cellulase production inducer and cellulolytic fungi source. *Revista argentina de microbiología*, 52(1), 4-12.
- Wu, X., Luo, N., Xie, S., Zhang, H., Zhang, Q., Wang, F., y Wang, Y. (2020). Photocatalytic transformations of lignocellulosic biomass into chemicals. *Chemical Society Reviews*, 49(17), 6198-6223.
- Xu, X., Lin, M., Zang, Q., y Shi, S. (2018). Solid state bioconversion of lignocellulosic residues by *Inonotus obliquus* for production of cellulolytic enzymes and saccharification. *Bioresource Technology*, 247, 88-95.
- Yang, L., Ru, Y., Xu, S., Liu, T., y Tan, L. (2021). Features correlated to improved enzymatic digestibility of corn stover subjected to alkaline hydrogen peroxide pretreatment. *Bioresource Technology*, 325, 124688.
- Yoon, L. W., Ang, T. N., Ngho, G. C., y Chua, A. S. M. (2014). Fungal solid-state fermentation and various methods of enhancement in cellulase production. *Biomass and bioenergy*, 67, 319-338.
- Zaker, A., Chen, Z., Wang, X., y Zhang, Q. (2019). Microwave-assisted pyrolysis of sewage sludge: A review. *Fuel processing technology*, 187, 84-104.
- Zhang, H., Han, L., y Dong, H. (2021). An insight to pretreatment, enzyme adsorption and enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass: Experimental and modeling studies. *Renewable and sustainable energy reviews*, 140, 110758.

9 Anexos

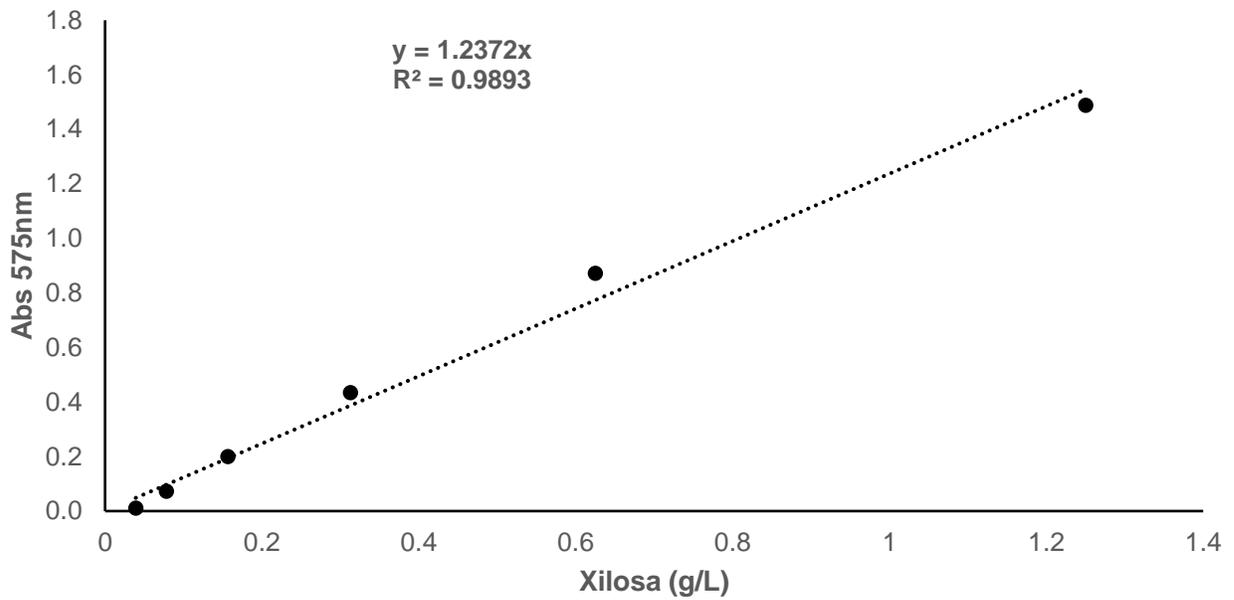
9.1 A. Curva patrón de azúcares reductores (Rango de detección: 0.1 - 1 g/L glucosa)

Concentración de glucosa (g/L)	Absorbancia a 575 nm					Desv. Est.	Error. Est.
	Repetición 1	Repetición 2	Repetición 3	Prom			
1	1.188	1.195	1.19	1.1910	0.00153	0.00088	
0.9	1.104	1.095	1.085	1.0947	0.00643	0.00371	
0.8	0.986	0.987	0.974	0.9823	0.01473	0.00850	
0.7	0.873	0.883	0.867	0.8743	0.00954	0.00551	
0.6	0.735	0.751	0.765	0.7503	0.00404	0.00233	
0.5	0.628	0.623	0.62	0.6237	0.01501	0.00867	
0.4	0.493	0.485	0.504	0.4940	0.00808	0.00467	
0.3	0.352	0.378	0.353	0.3610	0.00723	0.00418	
0.2	0.224	0.234	0.236	0.2313	0.00950	0.00549	
0.1	0.086	0.083	0.085	0.0847	0.00361	0.00208	



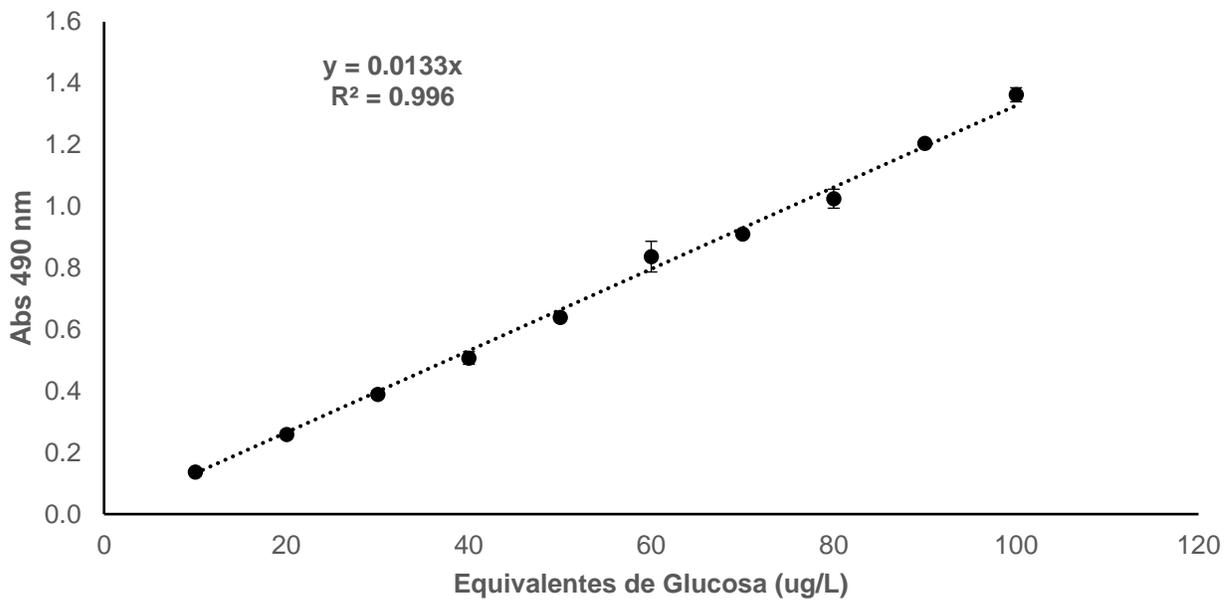
9.2 B. Curva patrón de azúcares reductores (Rango de detección: 0.039 – 1.25 g/L Xilosa)

Concentración de glucosa (g/L)	Absorbancia a 575 nm					
	Repetición 1	Repetición 2	Repetición 3	Prom	Desv. Est.	Error. Est.
1.25	1.496	1.496	1.471	1.488	0.002	0.0011
0.625	0.877	0.865	0.872	0.871	0.0017	0.001
0.3125	0.435	0.435	0.432	0.434	0.0005	0.0003
0.15625	0.2	0.199	0.199	0.199	0.0017	0.001
0.078125	0.071	0.071	0.074	0.072	0.0060	0.0034
0.03906	0.01	0.012	0.008	0.010	0.0144	0.0083



9.3 C. Curva patrón de azúcares totales (Rango de detección: 10 - 100 ug/L equivalentes de glucosa)

Concentración de glucosa (ug/L)	Absorbancia a 490 nm					Desv. Est.	Error. Est.
	Repetición 1	Repetición 2	Repetición 3	Prom			
100	1.400	1.321	1.367	1.363	0.040	0.023	
90	1.191	1.199	1.224	1.205	0.017	0.010	
80	0.986	1.003	1.086	1.025	0.054	0.031	
70	0.924	0.904	0.904	0.911	0.012	0.007	
60	0.932	0.764	0.814	0.837	0.086	0.050	
50	0.615	0.647	0.655	0.639	0.021	0.012	
40	0.545	0.476	0.501	0.507	0.035	0.020	
30	0.376	0.380	0.412	0.389	0.020	0.011	
20	0.246	0.244	0.286	0.259	0.024	0.014	
10	0.135	0.139	0.137	0.137	0.002	0.001	

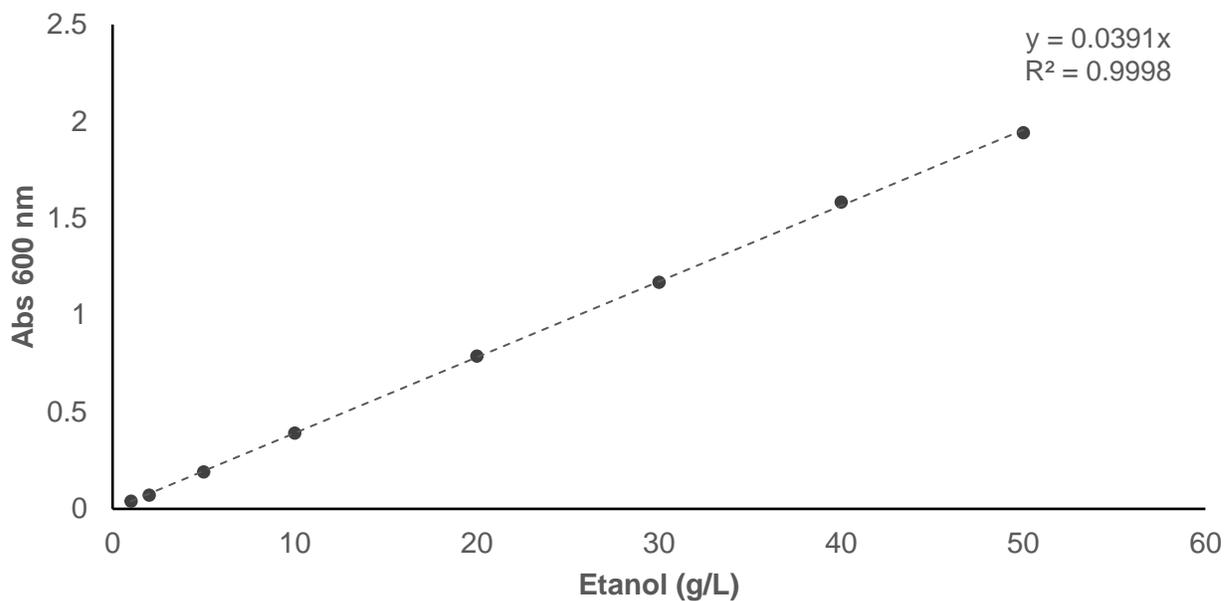


9.4 D. Composición del reactivo DNS (Miller, 1959)

Reactivo	Concentración (g/L)
DNS	10
Fenol	2
Sulfito de Sodio	0.5
Tartrato de Sodio y Potasio	200
NaOH	20

9.5 E. Curva estándar para etanol (Rango de detección: 1-50 g/L)

Concentración	Abs a 600 nm				Desv	Error
Etanol (g/L)	Repetición 1	Repetición 2	Repetición 3	Promedio	Std.	Std.
1	0.042	0.041	0.039	0.04	0.0015	0.0009
2	0.071	0.071	0.07	0.07	0.0006	0.0003
5	0.189	0.196	0.19	0.19	0.0038	0.0022
10	0.394	0.39	0.392	0.39	0.0020	0.0012
20	0.786	0.786	0.793	0.79	0.0040	0.0023
30	1.177	1.182	1.153	1.17	0.0155	0.0090
40	1.591	1.582	1.577	1.58	0.0071	0.0041
50	1.956	1.933	1.935	1.94	0.0127	0.0074



9.6 F. Composición de medios de cultivo

Agar papa dextrosa (PDA)

Componente	Concentración (g/L)
Extracto de papa	4
Dextrosa	20
Agar	15

Agar cloranfenicol rosa bengala y diclorán

Agar CRBD Difco™ 32.6 g/L, compuesto por: 5 g/L de proteosa peptona, 10 g/L de dextrosa, 1 g/L de fosfato monopotásico, 0.5 g/L de sulfato de magnesio, 2 mg/L de diclorán, 25 mg/L de rosa de bengala, 0.1 g/L de cloranfenicol y 15 g/L de agar.

Medio para detección de actividad celulasa (DTC)

compuesto por (% p/v) agar 1.5%, Carboximetil celulosa (CMC) 0.2%, NaNO_3 0.2%, K_2HPO_4 0.1%, MgSO_4 0.05%, KCl 0.05%, y peptona 0.2% (Arana-Cuenca *et al.*, 2019; Kasana *et al.*, 2008).

Medio para detección de actividad xilanasas (DTX)

compuesto por (% p/v) agar 1.5%, Xilano de abedul (XA) 0.2%, NaNO_3 0.2%, K_2HPO_4 0.1%, MgSO_4 0.05%, KCl 0.05%, y peptona 0.2% (Arana-Cuenca *et al.*, 2019; Kasana *et al.*, 2008).

Composición sales de Pontecorvo 1953.

1.8 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.5 g/L de urea, 0.5 g KH_2PO_4 , 0.2 g KCl, 0.2 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ y 0.3 mL de metales traza (100 mg/L $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ /L, 50 mg/L de $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 50 mg/L de $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 250 mg/L de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 85 g/L de FeCl_3 , y 100 mg/L de ZnSO_4).