**PRODUCCIÓN DE BIOETANOL 2G POR SACARIFICACIÓN Y FERMENTACIÓN SIMULTANEA (SFS) DE BIOMASA DE *Agave lechuguilla***

*Deniss Ithzel Díaz Blancoa, Leopoldo J. Ríos Gonzáleza\*, José A. Rodríguez de la Garzaa, Yolanda Garzaa*

aDepartamento de Biotecnología, Universidad Autónoma de Coahuila, Blvd. V. Carranza, Saltillo, Coahuila, 25010, México. tkmorales@uadec.edu.mx

Email: [leopoldo.rios@uadec.edu.mx](mailto:leopoldo.rios@uadec.edu.mx), [ygarza@uadec.com.mx](mailto:ygarza@uadec.com.mx) [antonio.rodriguez@uadec.com.mx](mailto:antonio.rodriguez@uadec.com.mx)

[deniss.diaz@uadec.com.mx](mailto:deniss.diaz@uadec.com.mx)

## Resumen

En este estudio se llevó a cabo la evaluación de la producción de etanol 2G a partir de hidrolizados enzimáticos de biomasa de *Agave lechuguilla* pretratada por autohidrólisis como medio de fermentación para la producción de bioetanol por *Sacharomyces cerevisae* ATCC 4126, en este trabajo se abordaron diferentes configuraciones del proceso, hidrólisis y fermentación separada y sacarificación y fermentación simultáneas, se realizaron en contenido de carga de sólidos (25%), los resultados muestran que la mayor concentración de etanol (17.8 g/L) se obtuvo de la sacarificación y fermentación por separado, a diferencia de un rendimiento de etanol de (5g/L) obtenido como resultado de la sacarificación y fermentación simultánea con una concentración inicial de glucosa diferente para cada tratamiento y un tiempo constante de 19 h para todos los casos.

**Introducción**

El *Agave lechuguilla* pertenece a la familia de las agaváceas, es una planta rústica que prospera en terrenos secos áridos y montañosos, crece generalmente sobre suelos calizos, calcáreos rocosos y arcillosos.[1]. Su área de distribución nacional cubre una superficie aproximada a los 20 millones de hectáreas, que corresponden a 10% del territorio; comprende los estados de Coahuila, Chihuahua, Nuevo León, Durango, San Luis Potosí, Tamaulipas y Zacatecas [2]. Las composiciones relativas de lignina, celulosa y hemicelulosa en algunas especies de *Agave*, nos da una proyección positiva de procesamiento en comparación con otros cultivos, mostrándonos la gran oportunidad de aprovechar la biomasa de esta planta que crece intensivamente en gran parte del Noreste de México, para la producción de bioetanol.

La producción de bioetanol puede llevarse a cabo bajo configuraciones de proceso diferentes, dos de ellas son la sacarificación y fermentación por separado y la sacarificación y fermentación simultáneas, de las cuales se comprobara cuál de ellas presenta una mayor productividad de etanol (PE).

**Metodología**

**Sacarificación y fermentación por separado.**

**Hidrólisis:** La optimización del proceso de hidrólisis de la fibra pretratada se realizó mediante el complejo enzimático comercial Cellic CTec3 (Novozymes A / S, Dinamarca), con una carga de solidos del 25 % y 25 FPU/ g de glucanos respectivamente, todos los ensayos fueron realizados en matraces Erlenmeyer de 125 ml con una concentración inicial de glucosa de 40 g/L en un Shaker New Brunswick ™ 124/24R a una velocidad de agitación de 200 rpm, 50°C, con una masa total de reacción de 50 g, en buffer de citratos a pH 4.8 durante 24h. La variable de respuesta fue el rendimiento de hidrólisis relacionada con la concentración de glucosa liberada en los tratamientos evaluados.

**Fermentación**: El hidrolizado procedente de la biomasa pretratada fue suplementado con los nutrientes esenciales para el crecimiento de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 4126 a un pH 5.5. La fermentación fue llevada a cabo a 32 ° C y 100 rpm con un 5% de inoculo de levadura durante 19 h. Las muestras obtenidas fueron analizadas por HPLC para determinar la concentración de etanol.

**Sacarificación y fermentación simultánea.**

**Hidrólisis y Fermentación:**

De forma similar se utilizó como sustrato la fibra pretratada de *Agave lechuguilla* con una carga de sólidos de 25 % y una relación E/S de 25 FPU/ g de glucano, la cual fue colocada en matraces de 125 ml a una concentración inicial de glucosa de 35 g/L en buffer citratos a pH de 4.8 en un volumen total de reacción de 50 g a los cuales fueron enriquecidos con los nutrientes esenciales para el crecimiento de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 4126 a un pH 5.5. Inoculado al 5% del volumen total. La sacarificación y fermentación simultánea fue llevada a cabo a 32 °C y 150 rpm en el mismo equipo Shaker New Brunswick ™ 124/24R durante 19h. De igual manera las muestras resultantes fueron analizadas por HPLC para determinar la concentración de azucares y etanol correspondientes a las variables de respuesta.

Simultáneamente se colocó una fermentación con medio estándar de *Saccharomyces cerevisiae* tomado como control, el cual se corrió bajo los mismos estándares y condiciones que los tratamientos anteriores, con una concentración de glucosa inicial de 48 g/L, tomando como variable de respuesta de igual manera la concentración de etanol producido.

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Resultados**  Los mejores resultados de etanol producido fueron generados en la sacarificación y fermentación por separado, mostrando un a una máxima producción de bioetanol de 17.8 g/L, equivalente a 93 % de rendimiento de etanol. | *Figura 1.- Cinética de fermentación, muestra la producción de etanol y la glucosa degradada a las 19h de tratamiento donde,* *Etanol-H y Glu-H, corresponde a la Sacarificación y fermentación separada, el Etanol-C y Glu-C corresponden al medio control de Sc y el Etanol-SFS, Glu-SFS representan los valores obtenidos por Sacarificación y fermentación simultánea.* | |
|  | *.* |
|  |  |

En la sacarificación y fermentación simultánea se obtuvo 5 g/L de producción de bioetanol, correspondiente a un 26% de rendimiento de etanol y el control con medio estándar de *Saccharomyces cerevisiae* se obtuvieron 19 g/L de etanol correspondiente a un rendimiento del 100 % a un tiempo constante de 19 h, con 25 % de sólidos y una relación E/S de 25 FPU/ g de glucano para todos los tratamientos.

**Conclusión**

La biomasa de *Agave lechuguilla* es una atractiva fuente de azucares para generar bioetanol de segunda generación. En este trabajo se obtuvo un mayor rendimiento de fermentación con la sacarificación y fermentación de manera separada (93%), que en forma simultánea (26%), las cargas de sólidos mayores pueden limitar la viabilidad celular de *Saccharomyces cerevisiae* y someterla a condiciones de estrés, además de la simbiosis con la que debe trabajar con el complejo enzimático para el caso de sacarificación y fermentación simultánea, mientras que en la forma separada la principal limitación para la productibilidad será la actuación de las enzimas. Según lo informado por Stenberg et al. [4], demuestra que la levadura es más sensible a la inhibición bajo condiciones simultáneas de sacarificación y fermentación de azucares en comparación con el proceso por separado, en el cual se trabaja de forma óptima las condiciones de funcionamiento de las enzimas y los microorganismos. Sin embargo desde el punto de vista industrial el proceso simultáneo puede crear ventajas en cuanto a tiempos de tratamiento

**Referencias.**

1. Hernández S.R., Eugenia C.L.C., Lourdes D.J., Socorro V. “Extraction and indirect quantification of saponins from the *Agave lechuguilla* Torrey”. *Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal. Redacy*, 3, 1-9. (2005).

2. Mares A.O., Villavicencio G.E. E. “Lechuguilla (*Agave lechuguilla* Torr.) planta suculenta de importancia económica y socialde las zonas áridas y semiáridas de México”. *Boletín de la Sociedad de Cactáceas y Suculentas*. 23 p.(2011).

3. Satu Sipponen 1, Mika H. Sipponen, Ossi Pastinen, Simo Laakso. Enzymatic saccharification of pretreated wheat straw: Comparison of solids-recycling, sequential hydrolysis and batch hydrolysis. *Bioresource Technology* 153 15–22. (2014)

4. Stenberg K, Bollók M, Réczey K, Galbe M, Zacchi G. Effect of substrate and cellulase concentration on simultaneous saccharification and fermentation of steam-pretreated softwood for ethanol production. Biotechnol Bioeng 2000;68:204–10.