



DOI: <https://doi.org/10.29298/rmcf.v10i51.336>

Artículo

## Pretratamiento fúngico de biomasa de *Agave lechuguilla* Torr. para la producción de etanol

### Fungal pretreatment of *Agave lechuguilla* Torr. biomass to produce ethanol

Ricardo Reyna Martínez<sup>1</sup>, Thelma K. Morales Martínez<sup>1</sup>, David Castillo Quiroz<sup>2</sup>, Juan C. Contreras Esquivel<sup>3</sup> y Leopoldo J. Ríos González<sup>1\*</sup>

#### Abstract:

Recently, the biomass of *Agave lechuguilla* has been reported as a raw material with potential for the production of ethanol. However, the high energy expenditure in the pretreatment used, requires the search for methods that minimize this parameter and favor an improvement in the economic feasibility of the process. Compared to traditional pretreatment technologies, biological pretreatment offers an alternative in which lignin removal enzymes are able to unfold the complex structures of lignin, without the use of chemicals and with lower energy expenditure. In this work the biological pretreatment of biomass of *Agave lechuguilla* with *Phanerochaete chrysosporium* H-298 was evaluated. The two factors assessed for the optimization of the process were: the incubation time and the concentration of the nitrogen source. The results showed a maximum delignification (36.15 %), preserving cellulose without significant changes. The optimal pretreatment conditions were: 60 days of incubation and a nitrogen concentration of 1 M. The enzymatic hydrolysis of the pretreated material using the Cellic® CTec3 enzymatic complex showed a maximum glucose release of 44.9 g L<sup>-1</sup> at 92 hours, corresponding to hydrolysis yield of 93.09 %, higher than that obtained in the hydrolysis of the biomass without pretreatment (37.92 %). The concentration of ethanol at 10 h of fermentation was 16.53 g L<sup>-1</sup> (equivalent to an ethanol concentration >2 v/v), observing 5.7 g L<sup>-1</sup> of glucose remainder at this incubation time.

**Key words:** *Agave lechuguilla* Torr., biofuels ethanol, optimization, biological pretreatment, arid land.

#### Resumen:

Recientemente la biomasa del cogollo de *Agave lechuguilla* ha sido establecida como materia prima con potencial para la producción de etanol, sin embargo, el alto gasto energético en el pretratamiento requiere la búsqueda de métodos que lo minimicen y propicie una mejora en la factibilidad económica del proceso. En comparación con las tecnologías tradicionales, el pretratamiento biológico ofrece una alternativa en la que las enzimas de remoción de la lignina son capaces de desdoblar las estructuras complejas de la misma, sin el uso de químicos y con menor gasto energético. En este trabajo se probó el uso de *Phanerochaete chrysosporium* H-298 en la biomasa de *Agave lechuguilla*. Los dos factores ensayados para la optimización del proceso fueron el tiempo de incubación y la concentración de la fuente de nitrógeno. Los resultados mostraron una máxima deslignificación (36.15 %), se preservó la celulosa sin cambios significativos. Las condiciones óptimas de pretratamiento fueron: 60 días de incubación y una concentración de nitrógeno de 1M. La hidrólisis enzimática del material pretratado con el complejo enzimático Cellic® CTec3 mostró una máxima liberación de glucosa de 44.9 g L<sup>-1</sup> a las 92 horas, con rendimiento de hidrólisis de 93.09 %, mayor al obtenido en la hidrólisis de la muestra sin pretratar (37.92 %). La concentración de etanol a las 10 horas de fermentación fue de 16.53 g L<sup>-1</sup> (equivalente a una concentración >2 % v/v de etanol) con 5.7 g L<sup>-1</sup> de glucosa remanente a ese tiempo de incubación.

**Palabras clave:** *Agave lechuguilla* Torr., biocombustibles, etanol, optimización, pretratamiento biológico, zonas áridas.

Fecha de recepción/Reception date: 6 de mayo de 2018

Fecha de aceptación/Acceptance date: 23 de noviembre de 2018

<sup>1</sup>Departamento de Biotecnología, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de Coahuila. Saltillo, Coah.

<sup>2</sup>Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), Campo Experimental Saltillo. Saltillo, Coah.

<sup>3</sup>Departamento de Investigación en Alimentos, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de Coahuila. Saltillo, Coah.  
Correo-e: leopoldo.rios@uadec.edu.mx

## Introducción

La comercialización de biocombustibles es actualmente una realidad en varios países. Por ejemplo, en Brasil el etanol de primera generación (1G) se produce a partir de caña de azúcar y en Estados Unidos de América, del maíz. Sin embargo, la incorporación de materias primas de uso comestible conlleva una serie de consecuencias indeseables, en particular a la escasez y el aumento de los precios de los alimentos (Buruiana *et al.*, 2014). Para evitar problemas de seguridad alimentaria por el aprovechamiento de recursos que contienen almidón o sacarosa, los lignocelulósicos (MLCs) son la base más adecuada para la producción de etanol de segunda generación (2G) (Althuri *et al.*, 2017).

Se han logrado enormes avances en la industria lignocelulósica en los últimos diez años. Actualmente, cinco plantas comerciales han sido inauguradas en los años recientes: tres de estas en Estados Unidos de América (una en Kansas y dos en Iowa), las cuales fabrican etanol a partir de rastrojo de maíz. Las otras dos se ubican en Alagoas, Brasil y elaboran dicho producto del bagazo de caña de azúcar; y en Crecentino, Italia, con paja de trigo (González *et al.*, 2017).

Debido a las complejas estructuras de la pared celular de la planta en los MLCs, se ha demostrado que existen varios métodos físico-químicos de pretratamiento, entre ellos la explosión de vapor, la explosión de fibra con amonio, ácido diluido y álcali. Además, existen los pretratamientos con solventes orgánicos, que han mostrado su capacidad de disminuir la recalcitrancia de los MLCs y mejorar la subsecuente etapa de hidrólisis enzimática para la obtención de biocombustibles o productos de alto valor agregado (Pérez-Pimienta *et al.*, 2017).

En comparación con las tecnologías actuales de pretratamiento, el método biológico ofrece una alternativa en la que las enzimas de tipo oxidasas son capaces de desdoblar las estructuras que forman la lignina (Arora *et al.*, 2016) de una manera amigable con el medio ambiente, debido a la ausencia de solventes químicos y al menor gasto energético (Sindhu *et al.*, 2016). Este método de pretratamiento se

realiza por la acción de hongos de podredumbre blanca que expresan este tipo de enzimas (lignina peroxidasa, lacasa, manganeso peroxidasa) como: *Phanerochaete chrysosporium* Burds, *Oxysporus* sp. y *Ganoderma* sp. (Wan y Li, 2012). Esta opción ha demostrado una mejora en la hidrólisis enzimática y en la fermentación de etanol, lo que la convierte en un proceso que puede reemplazar a los métodos termoquímicos (alcalino, ácido diluido, líquidos iónicos y organosolvente), siempre y cuando sea lo suficientemente rápido (Yang y Savage, 2016; Huang *et al.*, 2017).

Hay que destacar que los métodos termoquímicos enfocados a la remoción de lignina varían en las condiciones de pretratamiento, incluyendo el tiempo de operación. Yang y Pan (2012) llevaron a cabo el proceso en hojas de *Agave americana* L. con NaOH al 8 % a 180 °C por 30 min, de lo que resultó que el material pretratado se enriqueció en glucanos hasta en 58.8 %. Pérez *et al.* (2013, 2015) y Pérez-Pimienta *et al.* (2017) confirmaron que el contenido de glucanos se incrementó (en el rango de 41 a 66 %) después del pretratamiento de bagazo de *Agave tequilana* F. A. C. Weber con líquidos iónicos de acetato de 1-etil-3-metilimidazolio [C<sub>2</sub>mim][OAc] a 120 o 160 °C por 3 h. Finalmente, Caspeta *et al.* (2014) encontraron el mejor contenido de glucanos (79.8 %) en muestras de sólidos de bagazo de *Agave tequilana* pretratado por un método etanosolvente a 160 °C con 0.5 % (p/p) de ácido sulfúrico y 50 % (p/p) de etanol por 10 min.

Una de las principales actividades económicas de los pobladores de las zonas áridas y semiáridas del Altiplano Mexicano, es la recolección, acopio y comercialización de plantas silvestres. Entre ellas destaca *Agave lechuguilla* Torr., la cual es considerada entre los recursos forestales no maderables con mayor valor social y económico (Pando *et al.*, 2004; Narcia *et al.*, 2012). Su recolección es un factor importante en la economía de numerosas familias del área rural, por los ingresos netos que representa, donde la fibra es la materia prima importante para diversas empresas nacionales y extranjeras, que la utilizan en la elaboración de diferentes productos, principalmente en la industria cepillera (Castillo *et al.*, 2008, 2013). Actualmente, la biomasa de *A. lechuguilla* ha sido reportada como una materia prima potencial para la producción de etanol (Carmona *et al.*, 2017; Morales *et al.*, 2017; Ortiz *et al.*, 2017; Díaz *et al.*, 2018).

Sin embargo, el alto gasto energético en la etapa de pretratamiento por autohidrólisis (190 °C por 30 min) o con ácido diluido (180 °C, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 1.24 % p/v) ha promovido el estudio de otros métodos que minimicen este parámetro y propicien una mejora en la factibilidad económica del proceso.

Los mecanismos para la obtención de la materia prima de *A. lechuguilla* para la obtención de etanol, podrían tener dos vías. Una sería el aprovechamiento de las poblaciones naturales que ocupan en el país cerca de 20 millones de hectáreas (Castillo *et al.*, 2011), y la segunda mediante el establecimiento de plantaciones comerciales en áreas abandonadas al cultivo o ecosistemas degradados.

Si la biomasa de los cogollos de plantaciones es el insumo principal y alcanza una mezcla de etanol de 5.8 %, para el estado de Coahuila se requerirían alrededor de 72 000 ha, ambas rutas generarán la creación de nuevos empleos, aparte del aprovechamiento de la lechuguilla para la obtención de fibra que se realiza actualmente de poblaciones silvestres. Bajo un sistema de producción comercial, el rendimiento de biomasa por hectárea sería de 10 ton ha<sup>-1</sup>. Con base en resultados previos obtenidos por Morales *et al.* (2017), el rendimiento de producción de etanol a partir de biomasa pretratada por autohidrólisis es de 66 L ton<sup>-1</sup> de biomasa seca. El gasto energético en la etapa de pretratamiento y el costo de complejo enzimático durante la hidrólisis enzimática son los factores de mayor impacto en el costo de producción.

Por lo anterior, el objetivo del presente trabajo fue optimizar el pretratamiento biológico de biomasa de *Agave lechuguilla* con *Phanerochaete chrysosporium* H-298 y evaluar la producción de etanol a partir de los hidrolizados enzimáticos obtenidos.



## **Materiales y Métodos**

### **Materia prima**

Los cogollos están constituidos por una estructura cónica formada por las hojas más tiernas agrupadas al centro de la planta y se regenera después del corte, por lo que se puede recolectar de la misma planta varias veces. Los ejemplares de *Agave lechuguilla* (10 cogollos) fueron recolectados en el municipio Ramos Arizpe, Coah.

Para su conservación y almacenamiento en el laboratorio de Biotecnología Ambiental de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Coahuila, los cogollos se secaron en un deshidratador de charolas Marca Koleff Mod. KL10, a 45 °C por 24 h y posteriormente fueron desojados, molidos y tamizados en un molino de corte Retsch SM100, hasta alcanzar 2 mm promedio de tamaño de la partícula. Finalmente, el material fue mezclado y almacenado a temperatura ambiente en 28 °C en recipientes de plástico (30 × 15 × 15 cm) hasta su pretratamiento.

### **Caracterización química de la biomasa de *Agave lechuguilla* Torr.**

El contenido de humedad se precisó con un analizador de humedad (OHAUS BL-MB23). Los extractivos y cenizas se separaron por medio de los métodos analíticos del Laboratorio Nacional de Energía Renovable de los Estados Unidos de América (NREL): NREL/TP-510-42619 (Sluiter *et al.*, 2005) y NREL/TP-510-42622, respectivamente (Sluiter *et al.*, 2008). La determinación de celulosa (glucano), hemicelulosa (xilano) y lignina se realizó de acuerdo con el procedimiento analítico de laboratorio (LAP): NREL/TP-510-42618) modificado por Mussatto *et al.* (2011). Se hidrolizaron 500 mg del material con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 72 % (p/p) durante 7 min a 50 °C. Posteriormente, el hidrolizado obtenido se diluyó hasta 4 % con agua destilada.

Se hizo una segunda hidrólisis de la mezcla de reacción por autoclave a 121 °C durante 1 h. La solución sometida a la autoclave se pasó por filtros PVDF de 0.2 µm para su análisis por cromatografía líquida de alta eficacia (*high performance liquid*

*chromatography*) (HPLC). Los residuos sólidos derivados de la filtración se usaron para calcular la lignina insoluble en ácido (lignina Klason). El contenido de proteínas se determinó por el método de *Kjeldahl* (Nielsen, 1994).

### **Obtención de esporas de *Phanerochaete chrysosporium* H-298**

El cultivo de la cepa *P. chrysosporium* H-298 fue obtenida de la Colección de Cultivos Microbianos (CDBB) del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV/IPN), México. Su propagación se hizo en papa dextrosa agar (PDA) por 2 días a 30 °C. Las esporas fueron recolectadas y resuspendidas en agua destilada estéril y almacenadas a 4 °C hasta su uso.

### **Pretratamiento de *A. lechuguilla* con *P. chrysosporium* H-298**

Para el efecto se utilizaron nueve matraces Erlenmeyer de 125 mL con 5 g de cogollo seco y molido de *A. lechuguilla* previamente esterilizado con un volumen de solución de medio de *Kirk* modificado (en g L<sup>-1</sup>: 2.0 de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.5 g L<sup>-1</sup> MgSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O, 0.1 de CaCl<sub>2</sub>·H<sub>2</sub>O, 0.03 de MnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.012 de extracto de levadura, 0.2 de tartrato de amonio y 1mg L<sup>-1</sup> de tiamina), hasta obtener una humedad inicial de 60 %. El medio fue inoculado con 5 µL de la solución de esporas de *P. chrysosporium* H-298, bajo condiciones estériles en una campana de flujo laminar. Los matraces se colocaron en una incubadora orbital New Brunswick™ 124/24R a 30 °C por un tiempo de incubación de 10, 15 y 20 días. Después de cada ensayo, la biomasa de *A. lechuguilla* fue lavada con agua destilada y secada en un horno a 45 °C por 24 h. De cada muestra se determinó el contenido de celulosa, hemicelulosa y lignina de acuerdo con los protocolos descritos.

## **Optimización del proceso de deslignificación de biomasa de *A. lechuguilla* con *P. chrysosporium* H-298**

Los experimentos se realizaron en 21 matraces Erlenmeyer de 250 mL, en los cuales se colocaron 10 g de cogollo de *Agave lechuguilla* previamente esterilizados, 50 mL de solución de medio *Kirk* y 10  $\mu$ L de inóculo de esporas de *P. chrysosporium* H-298. Los matraces se colocaron en un agitador orbital (New Brunswick™ 124/24R) a 30 °C y 150 rpm.

La optimización se hizo mediante un diseño factorial  $3^2$ , con el paquete estadístico Minitab® versión 17 (Minitab Inc., 2010), en el cual los factores de interés fueron: 1) el tiempo de incubación (20, 40 y 60 días) y; 2) la concentración de nitrógeno (tartrato de amonio) en medio (1M, 2M y 3M) (cuadros 1 y 2). Después de cada ensayo, la biomasa de *A. lechuguilla* fue lavada con agua destilada y secada en un horno (Koleff Mod. KL10) a 45 °C por 24 h. Al concluir el procedimiento, a cada muestra se le determinó su contenido de celulosa, hemicelulosa y lignina de acuerdo con el protocolo descrito.

## **Hidrólisis enzimática de la biomasa de *Agave lechuguilla* pretratada con *P. chrysosporium* H-298**

Igual que en los ensayos anteriores, se trabajó con tres matraces Erlenmeyer de 125 mL en los cuales se colocaron 10 g (base seca) de biomasa de *A. lechuguilla* pretratada bajo condiciones óptimas con *P. chrysosporium* H-298. Posteriormente se adicionaron 40 g de una solución amortiguadora de citratos a pH de 4.8, lo que corresponde a una carga de sólidos de 25 % (p/p). En los matraces se incorporó el complejo enzimático comercial Cellic® CTec3 a una carga de enzima de 25 Unidades de Papel Filtro (UPF)g<sup>-1</sup> de glucanos. La hidrólisis se llevó a cabo a 50 °C y una velocidad de agitación de 200 rpm durante 92 h. A tiempos de hidrólisis de 12, 24, 48, 72 y 92 h, se tomaron muestras del hidrolizado y se centrifugaron a 10 000 rpm durante 10 min (Haraus™ Megafuge™ 16 R). La fracción líquida fue filtrada a través de filtros de PVDF de 0.22  $\mu$ m. Las muestras se analizaron en un cromatógrafo de líquidos (HPLC) Agilent 1260 Infinity

equipado con detector de índice de refracción a 45 °C, con una columna Agilent Hi-Plex H a 35 °C (7.7 × 300 mm), con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5 mM como fase móvil, a una velocidad de flujo de 5.0 mL min<sup>-1</sup>. El rendimiento de hidrólisis enzimática (sacarificación) fue expresado como g de glucosa liberados g<sup>-1</sup> de glucanos iniciales en el material pretratado.

### **Fermentación de hidrolizado enzimático de biomasa de *A. lechuguilla***

La fermentación de los hidrolizados se llevó a cabo en tres matraces Erlenmeyer de 125 mL, con 30 mL de hidrolizado enzimático. Los hidrolizados fueron suplementados con los siguientes nutrientes (en g L<sup>-1</sup>): extracto de levadura 10, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.17, CaCl<sub>2</sub> 0.09, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.36, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 4.14. El medio fue complementado con 15 mL L<sup>-1</sup> de una solución salina (solución de sales *stock*) que contiene NaCl 1.26, CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O 0.26, FeSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O 0.22, MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O 0.12 y ZnCl<sub>2</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.32. Las condiciones de fermentación fueron: pH del medio 5.5, temperatura de 30 °C, velocidad de agitación 100 rpm, 10 % (v/v) de inóculo (*Saccharomyces cerevisiae* ATCC 4126), durante 10 h de incubación (Cuadro 3). Se tomó una muestra del caldo de fermentación a las 0, 2, 4, 6, 8 y 10 h, mismas que se centrifugaron a 10 000 rpm por 10 min, y la fracción líquida fue filtrada a través de filtros de PVDF para la cuantificación de etanol y glucosa por HPLC.

### **Análisis**

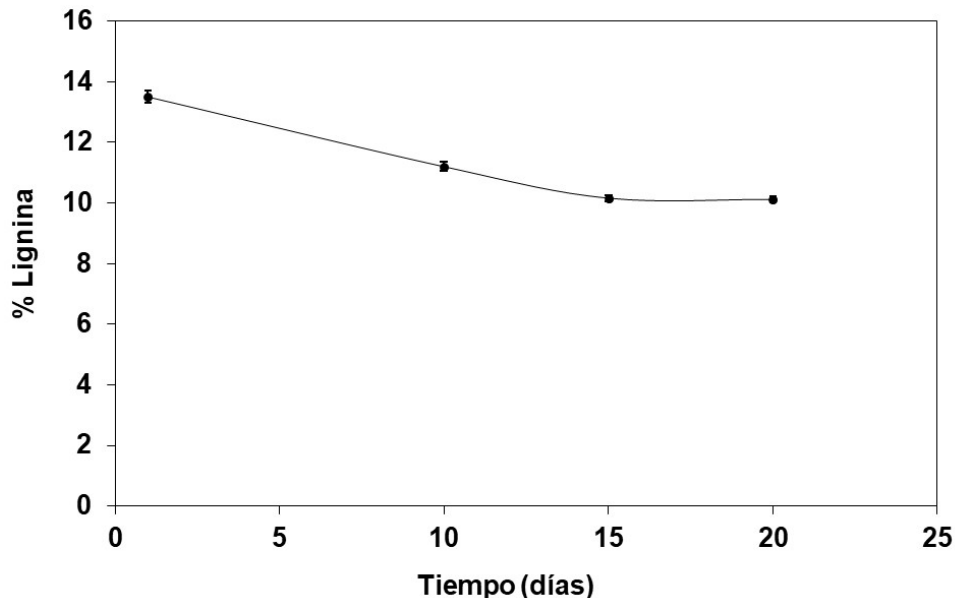
La glucosa y el etanol fueron determinados por HPLC (Agilent 1260) equipado con un detector de índice de refracción a 45 °C, con una columna Agilent Hi-Plex H a 35 °C (7.7 × 300 mm) y como fase móvil una solución de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5 mM a un flujo de 0.5 mL min<sup>-1</sup>. Todos los experimentos se hicieron por triplicado y se registraron los valores promedio. El análisis de varianza (ANOVA) aplicó junto a una prueba de Fisher F con un valor de p < 0.05 con el paquete estadístico Minitab<sup>®</sup> version 17 (Minitab Inc., 2010).



## Resultados y Discusión

### Pretratamiento de *A. lechuguilla* con *P. chrysosporium* H-298

La cinética de degradación de la lignina durante los estudios exploratorios del pretratamiento de biomasa de *A. lechuguilla* con *P. chrysosporium* H-298 se ilustra en la Figura 1. Los resultados obtenidos indican una máxima degradación de lignina (15.9 %) a los 15 días de tratamiento a una temperatura de 30 °C, que se mantiene sin cambios significativos después de los 20 días. La celulosa y hemicelulosa permanecen sin cambios a través de este proceso.



**Figura 1.** Cinética de degradación de lignina de biomasa de *Agave lechuguilla* Torr. con *Phanerochaete chrysosporium* H-298 a 30 °C.

Zeng *et al.* (2013) llevaron a cabo un estudio de purificación y caracterización bioquímica de dos enzimas extracelulares de *P. chrysosporium* (lignina peroxidasa-LiP y manganeso peroxidasa-MnP) responsables de la degradación de lignina, lo que dio como resultado que ambas peroxidases mostraron una máxima actividad a los 30 °C.

## **Optimización del proceso de deslignificación de biomasa de *A. lechuguilla* con *P. chrysosporium* H-298**

En el Cuadro 1 se describe la degradación de lignina de biomasa de *A. lechuguilla* con *P. chrysosporium* H-298 a diferentes tiempos de tratamiento y a diferentes concentraciones de tartrato de amonio como fuente de nitrógeno. Se puede apreciar una máxima remoción de lignina (36.15 %) a los 60 días de tratamiento a una concentración 1 M de tartrato de amonio; las que rebasaron 1 M provocaron una baja degradación de lignina (máximo 6 % en los ensayos a 2M y 3M), comportamiento que también fue observado en el estudio realizado por Haddadin *et al.*(2009) quienes concluyeron que altas concentraciones de nitrógeno logran inhibir la producción de ligninas peroxidadas y lacas, así como bajos rendimientos de remoción de lignina; sin embargo pequeñas concentraciones de nitrógeno son necesarias para el óptimo crecimiento de *P. chrysosporium*.

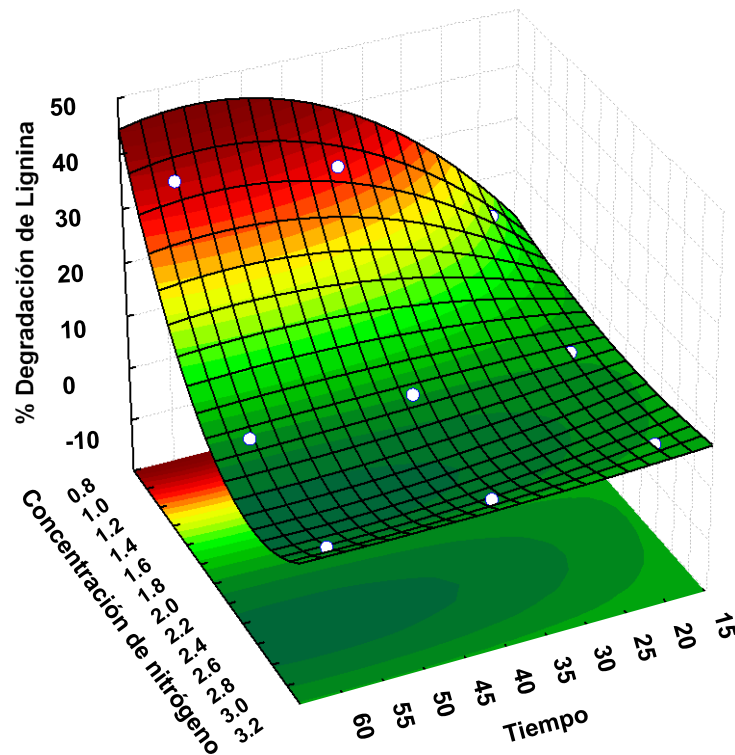


**Cuadro 1.** Composición de biomasa de *Agave lechuguilla* Torr. después pretratamiento con *Phanerochaete chrysosporium* H-298 a diferentes tiempos de tratamiento y concentración de nitrógeno.

<b>Tiempo (días)</b>	<b>Lignina (%)</b>	<b>Celulosa (%)</b>	<b>Hemicelulosa (%)</b>	<b>Degradación de lignina (%)</b>
1M				
0	19.07 ± 0.85	17.95 ± 0.94	11.31 ± 0.42	-
20	16.02 ± 0.61	17.97 ± 0.91	11.29 ± 0.21	16.0 ± 0.61
40	12.91 ± 0.53	17.88 ± 0.84	11.16 ± 0.48	32.3 ± 0.53
60	12.18 ± 0.68	17.54 ± 0.89	11.12 ± 0.40	36.15 ± 0.68
2M				
0	19.07 ± 0.85	17.95 ± 0.94	11.31 ± 0.42	-
20	17.85 ± 0.55	17.98 ± 0.13	11.30 ± 0.18	6.4 ± 0.55
40	17.92 ± 0.48	17.97 ± 0.28	11.27 ± 0.23	6.0 ± 0.48
60	18.00 ± 0.62	17.92 ± 0.41	11.14 ± 0.52	5.6 ± 0.62
3M				
0	19.07 ± 0.85	17.95 ± 0.94	11.31 ± 0.42	-
20	17.83 ± 0.15	17.97 ± 0.35	11.12 ± 0.32	6.5 ± 0.15
40	18.26 ± 0.24	17.96 ± 0.39	11.29 ± 0.31	4.2 ± 0.24
60	18.39 ± 0.28	17.88 ± 0.28	11.27 ± 0.36	3.6 ± 0.28

Durante el pretratamiento se pudo observar que el contenido de celulosa y hemicelulosa se mantiene sin cambios importantes, con una pérdida de solo 2 % de celulosa, lo que demuestra la eficiencia del pretratamiento, el cual además de incrementar la digestibilidad mediante la degradación de lignina, permite preservar los azúcares estructurales para su hidrólisis en la etapa de sacarificación. Algunos estudios realizados por Zhang *et al.* (2012) probaron que el tiempo de pretratamiento es el factor más importante para la degradación de lignina con *P. chrysosporium* en paja de arroz.

La Figura 2 ilustra el incremento de la remoción de lignina de 16 % a 36.15 % en los tratamientos a 20 y 60 días respectivamente, lo que corrobora que el tiempo de tratamiento resultó el factor más importante para este proceso (Zhang *et al.*, 2012).



**Figura 2.** Gráfico de superficie de respuesta del estudio de optimización del proceso de deslignificación de biomasa de *Agave lechuguilla* Torr. con *Phanerochaete chrysosporium* H-298.

## **Hidrólisis enzimática de biomasa de *A. lechuguilla* pretratada con *P. chrysosporium***

En el Cuadro 2 se presentan los datos que indican una máxima liberación de glucosa de 44.90 g L<sup>-1</sup> que corresponde a 93.09 % de rendimiento de hidrólisis del material pretratado a las 92 h. Este rendimiento fue más de 2 veces mayor que el obtenido con la biomasa sin pretratar (37.92 %, con una liberación de glucosa de 18.72 g L<sup>-1</sup>). Dicho incremento no fue significativo a partir de las 48 h de incubación para ambos casos. Es probable que en este período, las celulasas comenzaron a ser inhibidas. Este resultado puede ser atribuido a un aumento de la limitación difusional de las celulasas por una alta carga de sólidos, o la lignina afectó la acción de las enzimas, al bloquear el acceso a la celulosa (Rios-González *et al.*, 2017).

**Cuadro 2.** Hidrólisis enzimática de biomasa de *Agave lechuguilla* Torr. pretratada con *Phanerochaete chrysosporium* H-298 bajo condiciones óptimas y biomasa sin pretratar.

<b>Tiempo (horas)</b>	<b>Biomasa sin pretratar</b>		<b>Biomasa pretratada</b>	
	<b>Glucosa (g L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Rendimiento de hidrólisis (%)<sup>a</sup></b>	<b>Glucosa (g L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Rendimiento de hidrólisis (%)<sup>b</sup></b>
0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
12	8.93 ± 0.16	18.09 ± 0.16	34.07 ± 0.47	70.64 ± 0.47
24	11.59 ± 0.31	23.48 ± 0.31	36.19 ± 0.52	75.03 ± 0.52
48	17.85 ± 0.25	36.16 ± 0.25	43.09 ± 0.91	89.34 ± 0.91
72	18.10 ± 0.64	36.66 ± 0.64	43.74 ± 0.73	90.69 ± 0.73
92	18.72 ± 0.32	37.92 ± 0.32	44.90 ± 1.14	93.09 ± 1.14

<sup>a</sup>Glucanos iniciales en muestra sin pretratar = 17.95 %; <sup>b</sup>Glucanos iniciales en muestra pretratada = 17.54 %

Al comparar el máximo rendimiento de hidrólisis obtenido, con resultados previos por Ortíz *et al.* (2017), con biomasa de *A. lechuguilla* pretratada por autohidrólisis y el complejo enzimático Celluclast 1.5 L (60.85 %, con una liberación de glucosa de 59 g L<sup>-1</sup>), se puede comprobar que la efectividad del pretratamiento biológico con *P. chrysosporium* H-298. Sin embargo, al contrastar este mismo parámetro con el mismo complejo enzimático (Cellic<sup>®</sup> CTec3), el estudio previo de Morales *et al.* (2017) alcanzó un rendimiento similar (96.5 %, con una liberación de glucosa de 108.0 g L<sup>-1</sup>). En ambos casos en los que el material fue pretratado por autohidrólisis, la liberación de glucosa fue más alta que lo que resultó en el presente trabajo. Esto se debe a que durante el pretratamiento hidrotérmico, la totalidad de los extractivos son removidos y más de 90 % de la hemicelulosa es hidrolizada, lo que permite que el material sea enriquecido en celulosa y duplica su composición con respecto al material sin crudo (> 40 %).

### **Fermentación de hidrolizado enzimático de biomasa de *A. lechuguilla* pretratada con *P. chrysosporium* H-298.**

En el Cuadro 3 se reúnen los resultados del proceso de fermentación del hidrolizado enzimático obtenido mediante *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 4126. La máxima producción de etanol fue de 16.53 g L<sup>-1</sup>, en un tiempo de fermentación de 10 h, equivalente a una concentración de etanol de 2 % v/v. La eficiencia de conversión máxima de acuerdo al valor teórico (EC) fue de 90.03 % a las 6 h de incubación; después de dicho periodo, la EC disminuyó a 82.69 % a las 10 h. Este comportamiento es normal debido a la reducción de la concentración de glucosa en el medio de fermentación.



**Cuadro 3.** Parámetros cinéticos de estudio de fermentación de hidrolizados enzimáticos de biomasa de *Agave lechuguilla* Torr. pretratada con *P. chrysosporium* H-298.

Tiempo (h)	Glucosa (g L <sup>-1</sup> )	Etanol (g L <sup>-1</sup> )	Y <sub>E/G</sub> <sup>a</sup>	%EC <sup>b</sup>
0	45.2 ± 0.84	0.0 ± 0.0	0.0	0.0
2	25.1 ± 0.25	8.49 ± 0.17	0.42	82.82
4	20.4 ± 0.43	10.34 ± 0.22	0.39	77.17
6	15.9 ± 0.19	12.59 ± 0.28	0.50	98.03
8	10.3 ± 0.11	14.59 ± 0.16	0.35	70.02
10	5.7 ± 0.15	16.53 ± 0.29	0.42	82.69

<sup>a</sup>Y<sub>E/G</sub> = Rendimiento de etanol (g etanol/g glucosa consumida); EC = Eficiencia de conversión (Rendimiento de etanol/Rendimiento de etanol máximo teórico \* 100); Rendimiento de etanol máximo teórico = 0.51 g etanol/g glucosa.

La concentración del etanol obtenido se atribuye a que puede ser mayor al aumentar el tiempo de fermentación, ya que se advirtió un consumo constante de glucosa hasta las 10 h. Sin embargo, este lapso no fue suficiente para detectar un consumo total de glucosa (glucosa remanente de 5.7 g L<sup>-1</sup>). En la fermentación de hidrolizados enzimáticos de biomasa de *Agave lechuguilla* tratada por autohidrólisis, Ortiz *et al.* (2017) registraron una máxima eficiencia de conversión de 91 %, inferior a la obtenida en este estudio. Esta diferencia en la EC puede atribuirse a que el pretratamiento biológico con *P. chrysosporium* H-298 no genera subproductos inhibitorios de la etapa fermentativa, a diferencia del proceso de autohidrólisis, en el que se producen inhibidores como ácido acético, furfural e hidroximetilfurfural (HMF) durante el pretratamiento.

## Conclusiones

Al aumentar la deslignificación de biomasa de *A. lechuguilla* con *P. chrysosporium* de 15.9 % hasta 36.15 % es posible al extender el tiempo de pretratamiento y la adición de una fuente de nitrógeno (tartrato de amonio) a baja concentración (1 M). La deslignificación del material por este método propicia un incremento en la digestibilidad enzimática de casi 100 % (rendimiento de hidrólisis) en comparación con la muestra sin pretratar (40 %), con la producción de hidrolizados con un alto contenido de glucosa sin presencia de inhibidores; esto favorece los altos rendimientos de etanol.

Los estudios que se realicen en el futuro deberán enfocarse en evaluar la degradación de la lignina de la fracción fibrosa del material, con la separación de la fracción rica en extractivos por medio de tamices; con ello será posible tener un mayor contenido de celulosa inicial y de potencial para obtener azúcares y etanol.

## Agradecimientos

Los autores agradecen al Fondo Sectorial SAGARPA-CONACyT por el apoyo financiero otorgado al proyecto Núm. 175404 titulado "Desarrollo de tecnologías de producción de etanol a partir de biomasa de plantaciones de lechuguilla (*Agave lechuguilla*) existentes y nuevas plantaciones de la región semidesértica del norte de México".

## Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener conflicto de intereses.





## Contribución por autor

Ricardo Reyna-Martínez: desarrollo de experimentos, análisis de resultados y elaboración del manuscrito; Thelma K. Morales Martínez: colaboración en el análisis de muestras por HPLC, análisis de resultados y escritura del manuscrito; David Castillo Quiroz: colaboración en la colecta y caracterización de la materia prima, análisis de resultados y escritura del manuscrito; Juan C. Contreras Esquivel: asesoría de pretratamiento con *Phanerochaete chrysosporium* H-298; Leopoldo J. Ríos González: asesoría y análisis de cada una de las etapas del trabajo de investigación y escritura del manuscrito.

## Referencias

- Althuri, A., L. K. S. Gujjala and R. Banerjee. 2017. Partially consolidated bioprocessing of mixed lignocellulosic feedstocks for ethanol production. *Bioresource Technology*. 245: 530–539. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.08.140>
- Arora, A., S. Priya, P. Sharma, S. Sharma and L. Nain. 2016. Evaluating biological pretreatment as a feasible methodology for ethanol production from paddy straw. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* 8: 66–72. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2016.08.00>.
- Buruiana, C. T., C. Vizireanu, G. Garrote and J. C. Parajó. 2014. Optimization of corn stover biorefinery for coproduction of oligomers and second-generation bioethanol using non-isothermal autohydrolysis. *Industrial Crops and Products* 54: 32–39. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.01.003>.
- Carmona, J. M., T. K. Morales M., S. I. Mussatto, D. Castillo Q. y L. J. Ríos G. 2017. Propiedades químicas, estructurales y funcionales de la lechuguilla (*Agave lechuguilla* Torr.) *Revista Mexicana de Ciencias Forestales* 8 (42): 100- 122. <https://doi.org/10.29298/rmcf.v8i42.21>.
- Caspeta, L., M. A. Caro B., T. Ponce N. and A. Martinez. 2014. Enzymatic hydrolysis at high-solids loadings for the conversion of agave bagasse to fuel ethanol. *Applied Energy*. 113: 277-286. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2013.07.036>.

Castillo, Q. D., C. A. Berlanga R., M. Pando M., y A. Cano P. 2008. Regeneración del cogollo de *Agave lechuguilla* de cinco procedencias bajo cultivo. *Revista Ciencia Forestal en México* 3(103): 27-40.

Castillo Q., D., O. Mares A. y E. E. Villavicencio G. 2011. Lechuguilla (*Agave lechuguilla* Torr.) planta suculenta de importancia económica y social de las zonas áridas y semiáridas de México. *Boletín de la Sociedad Latinoamericana y del Caribe de Cactáceas y otras Suculentas*. 8(2):6-9.

Castillo Q., D., J. T. Sáenz R., M. Narcia V. y J. A. Vázquez R. 2013. Propiedades físico-mecánicas de la fibra de *Agave lechuguilla* Torr. de cinco procedencias bajo plantaciones. *Revista Mexicana de Ciencias Forestales* 4(19): 78-91.  
<https://doi.org/10.29298/rmcf.v4i19.380>.

Díaz B., D. I., J. R. de La Cruz, J. C. López L., T K. Morales M., E. Ruiz, L J. Ríos G., I. Romero and E. Castro. 2018. Optimization of dilute acid pretreatment of *Agave lechuguilla* and ethanol production by co-fermentation with *Escherichia coli* MM160. *Industrial Crops Products* 114: 154-163.  
<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.01.074>.

González B., E., J. C. Santana M., F. J. Ríos F., H. M Poggi V., A. C. Ramos V., E. Cristiani U. and T. Ponce N. 2017. Phenolic compounds inhibit cellulase and xylanase activities of *Cellulomonas flavigena* PR-22 during saccharification of sugarcane bagasse. *Fuel* 196: 32–35. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2017.01.080>.

Haddadin, M. S. Y., J. Haddadin, O. I. Arabiyat and B. Hattar. 2009. Biological conversion of olive pomace into compost by using *Trichoderma harzianum* and *Phanerochaete chrysosporium*. *Bioresource Technology* 100(20): 4773–4782.  
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.04.047>.

Huang, S., D. Huang, Q. Wu, M. Hou, X. Tang and J. Zhou. 2017. The effects of environmental C/N on the activities of lignin-degrading enzymes produced by *Phanerochaete chrysosporium*. *Pedosphere* 160. [https://doi.org/10.1016/S1002-0160\(17\)60391-6](https://doi.org/10.1016/S1002-0160(17)60391-6).

Minitab, Inc. 2010. Minitab 17 Statistical Software. Ver. 17. Minitab, INC. State College, PA USA n/p.

Morales M., T. K., D. I. Díaz B., J. A. Rodríguez de la G., J. Morlett Ch., A. J. Castro M., J. Quintero and L.J. Ríos González. 2017. Assessment of different saccharification and fermentation configurations for ethanol production from *Agave lechuguilla*. *BioResources* 12(4): 8093–8105.

Mussatto, S. I., L. M. Carneiro, J. P. A. Silva, I. C. Roberto and J. A. Teixeira. 2011. A study on chemical constituents and sugars extraction from spent coffee grounds. *Carbohydrate Polymers* 83(2): 368–374.

Narcia, V. M., D. Castillo Q., J. A. Vázquez R. y C.A. Berlanga R. 2012. Turno Técnico de la lechuguilla (*Agave lechuguilla* Torr.) en el noreste de México. *Revista Mexicana de Ciencias Forestales* 3(9): 81-88.

Nielsen, S. S. 1994. Introduction to the chemical analysis of foods. Jones and Bartlett publishers. New York, NY USA. pp. 209-212.

Ortiz M., O. H., T. K. Morales M., L. J. Ríos G., J. A. Rodríguez de la G. J. Quintero y G. E. Aroca. 2017. Bioethanol production from *Agave lechuguilla* biomass pretreated by autohydrolysis. *Revista Mexicana de Ingeniería Química* 16(2): 467–476.

Pando M., M., O. Eufrazio, E. Jurado and E. Estrada. 2004. Post-harvest growth of lechuguilla (*Agave lechuguilla* Torr. Agavaceae) in northeastern Mexico. *Economic Botany* 58(1): 78–82.

[https://doi.org/10.1663/00130001\(2004\)058\[0078:PGOLAL\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1663/00130001(2004)058[0078:PGOLAL]2.0.CO;2).

Pérez P., J. A., M. G. Lopez O., P. Varanasi, V. Stavila, G. Cheng, S. Singh and B. A. Simmons. 2013. Comparison of the impact of ionic liquid pretreatment on recalcitrance of agave bagasse and switchgrass. *Bioresource Technology* 127: 18-24. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.09.124>.

Pérez P., J. A., M. G. Lopez O., J. A. Chávez C., P. Varanasi, V. Stavila, G. Cheng, S. Singh and B. A. Simmons. 2015. Characterization of agave bagasse as a function of ionic liquid pretreatment. *Biomass & Bioenergy*. 75: 180-188.

<https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2015.02.026>.

Pérez-Pimienta, J. A., A. Vargas-Tah, K. M. López-Ortega, Y. N. Medina-López, J. A. Mendoza-Pérez, S. Avila, S. Singh, B. A. Simmons, I. Loaces y A. Martínez. 2017. Sequential enzymatic saccharification and fermentation of ionic liquid and organosolv pretreated Agave bagasse for ethanol production. *Bioresource Technology* 225:191-198.

Rios-González, L. J., T. K. Morales-Martínez, M. F. Rodríguez-Flores, J. A. Rodríguez-De la Garza, D. Castillo-Quiroz, A. J. Castro-Montoya y A. Martinez. 2017. Autohydrolysis pretreatment assessment in ethanol production from agave bagasse. *Bioresource Technology* 242:184-190.

Sindhu, R., P. Binod and A. Pandey. 2016. Biological pretreatment of lignocellulosic biomass – an overview. *Bioresource Technology* 199:76-82.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2015.08.030>.

Sluiter, A., R. Ruiz, C. Scarlata, J. Sluiter and D. Templeton. 2005. Determination of extractives in biomass. Report No. TP-510-42619. Golden, CO USA. pp. 1-9.

Sluiter, A., B. Hames, R. Ruiz, C. Scarlata, J. Sluiter and D. Templeton. 2008. Determination of ash in biomass. National Renewable Energy Laboratory. Report No. TP-510-42622. Golden, CO USA. pp. 1-5.

Wan, C. and Y. Li. 2012. Fungal pretreatment of lignocellulosic biomass. *Biotechnology Advances* 30: 1447-1457.

<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2012.03.003>.

Yang, L., Y. Land P. E. Savage. 2016. Near and supercritical ethanol treatment of biocrude from hydrothermal liquefaction of microalgae. *Bioresource Technology* 211: 779-782. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.03.151>.

Yang, Q. and X. Pan. 2012. Pretreatment of *Agave americana* stalk for enzymatic saccharification. *Bioresource Technology* 126: 336-340. <https://doi-org.proxy.infosal.uadec.mx/10.1016/j.biortech.2012.10.018>.

Zeng, G. M., M. H. Zhao, D. L. Huang, C. Lai, C. Huang, Z. Wei and M. Cheng. 2013. Purification and biochemical characterization of two extracellular peroxidases from *Phanerochaete chrysosporium* responsible for lignin biodegradation. *International Biodeterioration and Biodegradation* 85: 166–172. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2013.07.005>.

Zhang, S., M. Jiang, Z. Zhou, M. Zhao and Y. Li. 2012. Selective removal of lignin in steam-exploded rice straw by *Phanerochaete chrysosporium*. *International Biodeterioration and Biodegradation* 75: 89–95