

Fermentación de los fructanos del *Agave tequilana* Weber Azul por *Zymomonas mobilis* y *Saccharomyces cerevisiae* en la producción de bioetanol

José L. Montañez⁽¹⁾, Juan C. Victoria⁽¹⁾, Rebeca Flores⁽¹⁾ y María Á. Vivar⁽²⁾

(1) Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional, Justo Sierra 28, C.P. 59510, Jiquilpan, Mich.-México. (e-mail: montasoto@yahoo.com.mx).

(2) Instituto Tecnológico de Tuxtepec, Av. Dr. Víctor Bravo Ahuja S/N. Col. 5 de Mayo, Tuxtepec, C.P. 68350, Oaxaca-México

Recibido Feb. 24, 2011; Aceptado Abr. 27, 2011; Versión Final recibida May. 09, 2011

Resumen

Fructanos contenidos en las bases de las hojas del agave fueron extraídos y utilizados como fuente de carbono a varias concentraciones para la producción de bioetanol. Se usaron dos microorganismos etanolgénicos: la levadura *Saccharomyces cerevisiae* CDBB-L-331 y la bacteria *Zymomonas mobilis* CDBB-B-603. Las hojas del agave tequilero (*Agave tequilana* Weber Azul) constituyen los residuos agrícolas del cultivo y a pesar de su alto contenido de azúcares reductores totales (ART) y a los grandes volúmenes que anualmente se generan, actualmente no se utilizan. Los resultados muestran que la bacteria *Zymomonas mobilis* es capaz de crecer a mayores concentraciones de ART, produce mayor cantidad de etanol y tolera mayores concentraciones del mismo. El rendimiento en la producción de etanol, la eficiencia de conversión y la productividad volumétrica también fueron mayores cuando la fermentación se llevó a cabo con *Zymomonas mobilis* a una concentración de 20% de ART.

Palabras clave: agave, fructanos, bioetanol, tequila, fermentación

Fermentation of *Agave tequilana* Weber Azul fructans by *Zymomonas mobilis* and *Saccharomyces cerevisiae* in the production of bioethanol

Abstract

Fructans contained in the base of agave leaves were extracted, hydrolyzed and used as carbon source at several concentrations for the production of bioethanol through two different ethanolgenic microorganisms: the yeast *Saccharomyces cerevisiae* CDBB-L-331 and the bacterium *Zymomonas mobilis* CDBB-B-603. The leaves of agave tequilana (*Agave tequilana* Weber Azul) constitute the agricultural crop residues and despite its high content of total reducing sugars (TRS) and the large volumes generated each year, they are not currently used. The results show that *Zymomonas mobilis* is able to grow to higher levels of TRS produces more ethanol and tolerate higher concentrations of it. The yield in ethanol production, conversion efficiency and volumetric productivity were also higher when fermentation was carried out with *Zymomonas mobilis* at a concentration of 20% of TRS.

Keywords: agave, fructans, bioethanol, tequila, fermentation

INTRODUCCION

La disminución de las reservas mundiales de petróleo ha derivado en un constante incremento en el precio de este combustible fósil y ha generado una creciente preocupación por la seguridad energética y el cambio climático mundial, lo que ha motivado a que científicos de todo el mundo se den a la búsqueda de fuentes alternas de energía renovables, entre las que destaca el uso de la biomasa agrícola para la producción de biocombustibles, actividad que ha sido catalogada como la industria del futuro (Mathews, 2007). Entre los biocombustibles más desarrollados se encuentran el bioetanol y el biodiesel; el bioetanol se obtiene a partir de materias primas ricas en carbohidratos entre las que destacan el maíz, sorgo, caña de azúcar y remolacha azucarera principalmente, mientras que el biodiesel se elabora a partir de materias primas ricas en aceites vegetales como la palma aceitera, canola, soya y algodón (Avinash, 2007). Las tecnologías para la producción de bioetanol vía caña de azúcar y maíz son las más conocidas y maduras. Actualmente Brasil y Estados Unidos son los principales países productores de bioetanol en el mundo; el primero lo obtiene a partir de la caña de azúcar mientras que el segundo a partir del almidón de maíz (Wheals et al., 1999; Torney et al., 2007).

Debido a que la mayoría de los cultivos que se utilizan o se proponen para la producción de biocombustibles también son empleados como, o para la elaboración de alimentos y piensos, esta diversidad de aplicaciones ocasiona una competencia entre los distintos usuarios de dichos cultivos agrícolas, lo que inminentemente tendrá repercusiones directas en la seguridad alimentaria a través de sus efectos en los precios de los productos básicos. Una alternativa viable para la producción de biocombustibles sin afectar la seguridad alimentaria, consiste en utilizar como fuente de carbohidratos fermentables, aquellas materias primas que conforman los residuos agrícolas de los cultivos, pastos, aserrín, virutas de madera, así como residuos sólidos de los animales y los desechos industriales (Prasad et al., 2007).

Dado que la biomasa lignocelulósica constituye la materia orgánica más abundante en el planeta, su utilización para la producción de bioetanol sería la mejor alternativa posible, desafortunadamente esta tecnología aún está en desarrollo (Sánchez y Cardona 2008). Recientemente se ha propuesto el uso de plantas que producen y acumulan fructanos como fuentes más viables para la producción industrial de biocombustibles (Cáceres, 2008; Hernández et al., 2009). Los fructanos constituyen los principales carbohidratos de reserva en algunas familias del reino vegetal; son polímeros de fructosa de cadena lineal unidas por enlaces glucosídicos $\beta(2,1)$ y $\beta(2,6)$, sólo contienen un residuo de glucosa en el extremo reductor de la molécula y pueden alcanzar grados de polimerización hasta de 200 unidades de fructosa, lo cual depende de la fuente botánica así como de las condiciones agronómicas del cultivo y la edad de la planta (López et al., 2003). Entre las principales fuentes potenciales de fructanas destacan los tubérculos de la planta de alcachofa de Jerusalén (*Helianthus tuberosus*), las raíces de la planta de achicoria (*Chicory intybus*), los tubérculos de la planta de dalia (*Dahlia variabilis*) y las cabezas o piñas de las plantas del género *Agave* como el agave tequilero (*Agave tequilana* Weber Azul), el cual se cultiva de manera intensiva en nuestro país en una superficie cercana a las 100 mil hectáreas (López et al., 2003).

El *Agave tequilana* Weber Azul es una planta que requiere de 7 a 10 años para su desarrollo y sus ciclos de cultivo se ven afectados por las condiciones ambientales, manejo y diferencias genéticas de las plantaciones. La planta del agave tequilero está conformada por dos partes principales que son: la cabeza o piña y las hojas (Fig. 1). La cabeza representa la parte comercial de la planta y se utiliza como materia prima en el proceso de elaboración de "tequila", principal bebida alcohólica mexicana de consumo mundial. El peso promedio de la cabeza del agave va de 30 a 70 kg., aunque se han obtenido cultivos cuyas cabezas han llegado a pesar entre 80 y 120 kg., y dentro de estos, cabezas de hasta 150 kg y con un contenido de azúcares reductores totales que oscila entre 16 a 28% en peso fresco. Por su parte, las hojas o pencas constituyen los residuos agrícolas del cultivo, representan del 45 al 50% del peso total de la planta, miden de 90-120 cm de longitud y de 8 a 12 cm de ancho y su contenido de azúcares reductores totales oscila entre 3.3 a 16.1% en peso fresco, lo cual depende de la edad de la planta, las condiciones agronómicas del cultivo, y de la proximidad de las hojas hacia la cabeza o piña de la planta (Iñiguez et al., 2001).



Fig. 1: Cosecha del *Agave tequilana* Weber Azul, plantas completas, hojas y cabeza o piña

Se han aplicado tres diferentes estrategias para la obtención de bioetanol por fermentación de los fructanos. La primera consiste en la fermentación directa de estos polímeros mediante el uso de microorganismos productores de enzimas inulinasas tales como *Kluyveromyces fragilis* (Rosa et al., 1986), *Kluyveromyces marxianus* (Guiraud et al. 1982) y *Saccharomyces rosei* (Margaritis et al., 1983). La segunda consiste en hidrolizar previamente de los fructanos mediante el empleo de ácidos minerales y su posterior fermentación a etanol por microorganismos que no producen inulinasas como *Saccharomyces cerevisiae* (Díaz et al., 2008; Hernández et al., 2009) y *Zymomonas mobilis* (Toran et al., 1985). La tercera consiste en realizar previamente la sacarificación de los fructanos mediante un microorganismo productor de inulinasas (*Aspergillus niger*) y posteriormente fermentar los azúcares con un microorganismo productor de etanol como lo es la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (Nakamura et al., 1996).

Anualmente la industria tequilera demanda aproximadamente un millón de toneladas de piñas de agave, actividad que genera una cantidad similar de hojas que constituyen los residuos agrícolas del cultivo y que no son utilizadas en la actualidad (Iñiguez et al., 2001). Aunado a ello, hoy en día existe una sobreproducción de agave tequilero que ocasiona pérdidas anuales cercanas a las 100,000 toneladas (Narváez y Sánchez 2009). Por lo anterior, la finalidad de este trabajo consistió en utilizar los residuos agrícolas del cultivo del agave tequilero (*Agave tequilana* Weber Azul), como materia prima fuente de azúcares fermentables para la producción de bioetanol, mediante el empleo de dos diferentes microorganismos etanolgénicos; la levadura *Saccharomyces cerevisiae* y la bacteria *Zymomona mobilis* y comparar los resultados obtenidos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Recolección, acondicionamiento y análisis de las hojas del agave

En un cultivo de *Agave tequilana* Weber Azul de ocho años de edad, localizado en el municipio de Venustiano Carranza, Mich., veinte plantas de agave fueron seleccionadas al azar, al momento de efectuarse la cosecha. Las hojas fueron separadas y cortadas por su mitad longitudinal, obteniendo así tres fracciones: cabeza o piña, bases y puntas de hojas; las bases corresponden a la porción de la hoja que va unida a la cabeza o piña de la planta. Se determinó el peso de cada fracción, así como su contenido de humedad (AOAC, 1995) y azúcares reductores totales (Miller, 1959).

Extracción de los fructanos

Las bases de las hojas del agave fueron lavadas a chorro de agua y después fueron cocinadas en autoclave a 100°C durante 4 horas, a fin de hidrolizar los fructanos y facilitar la extracción del jugo. Enseguida las bases de las hojas fueron prensadas en un trapiche para obtener el jugo que después fue filtrado a través de papel filtro y posteriormente concentrado a 25% de ART en un evaporador rotatorio y a una temperatura de 70°C.

Microorganismos empleados

Se utilizó una cepa de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (CDBB-L-331) y una cepa de la bacteria *Zymomona mobilis* (CDBB-B-603), las cuales fueron obtenidas de la Colección Nacional de Cepas Microbianas y Cultivos Celulares del CINESTAV-IPN México. Ambos microorganismos fueron resembrados mensualmente; la levadura se resembró en placas de agar YM cuya formulación es: glucosa 10 g/L, extracto de levadura 3 g/L, extracto de malta 3 g/L, peptona 5 g/L; agar 20 g/L y agua destilada 1000 mL; mientras que la bacteria se resembró en placas con medio YPG cuya formulación es: glucosa 20 g/L, peptona 10 g/L, extracto de levadura 3 g/L y agua destilada 1000 mL. El pH de los medios de cultivo se ajustó a 5 con HCl 0.1M y después de la resiembra, los medios se incubaron a 30°C/ 24 hrs y posteriormente se almacenaron en refrigeración a 5°C.

Preparación del preinoculo

En dos matraces Erlenmeyer se adicionaron 500 mL de extracto de agave con 14% de ART, 1.5 g de extracto de levadura, 1.5 g de extracto de malta y 2.5 g de peptona. El pH del medio fue ajustado a 5 con HCl 0.1M. Los medios de cultivo fueron esterilizados en autoclave a 121°C/15min. Al matraz donde se propagará la bacteria *Z. mobilis* se le adicionó también 0.1 g/l de ciclohexamida. Cada matraz fue inoculado con dos asadas del microorganismo correspondiente y posteriormente incubados a 30°C/24 hrs. Al término de la incubación se determinó la concentración de microorganismos por el método de vaciado en placa. Se repitió el procedimiento anterior incrementando el número de asadas de cada microorganismo, hasta alcanzar una concentración de 2×10^6 UFC/mL.

Preparación del medio de fermentación

Se prepararon 10 litros de jugo de agave con 10, 15, 20, 25% de ART. A cada concentración se le adicionó 1g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y su pH se ajustó a 5.0 con HCl 0.1M. Posteriormente se prepararon dos series de matraces Erlenmeyer de 250 ml, en los que se adicionaron 150 mL de jugo de agave a las distintas concentraciones. Los matraces se taparon con algodón y se esterilizaron en autoclave a 121°C/15 min. Posteriormente una serie de matraces fue inoculada con la levadura *S. cerevisiae* y la otra con la bacteria *Z. mobilis*; a esta última también se le adicionó 0.1 g/l de ciclohexamida. La cantidad de inóculo adicionado en ambos casos fue de 5%_{v/v}. Después de la inoculación, los matraces fueron incubados a 30°C durante 24 horas en la oscuridad y con agitación constante a 100 rpm en un agitador rotatorio. Al término de la incubación, en el caldo de fermentación se determinó la concentración de microorganismos por el método de vaciado en placa y después de filtrar el caldo fermentado a través de una membrana de acetato de celulosa de 0.45 micras de diámetro, también se determinó su contenido de ART (Miller, 1959), etanol (ebulloscopia) y pH. El mismo procedimiento fue aplicado para mayores tiempos de fermentación (48, 72, 96, y 120 horas) y todas las determinaciones se hicieron por triplicado.

Métodos analíticos

El contenido de humedad se evaluó de acuerdo al método 14.003 (AOAC, 1997). El contenido de sólidos solubles (°Brix) se determinó mediante un refractómetro PCE 032 (PCE Ibérica S.L.). El contenido de azúcares reductores directos (ARD) y azúcares reductores totales (ART) se determinó por el método de Miller (1959). La concentración de biomasa celular se determinó por el método de vaciado en placa. La concentración de etanol en las muestras de mosto fermentado

se determinó mediante un ebullómetro Dujardin-Salleron Modelo 359, equipado con regulación electrónica de calefacción 110 V - CE (Laboratories Dujardin-Salleron, Francia), los valores de productividad de etanol se calcularon dividiendo el contenido de alcohol por el tiempo de fermentación, teniendo en cuenta una densidad 0.789g/mL de etanol a 20 °C. El pH del medio se determinó con un potenciómetro (Condustronic pH20, México).

Análisis estadístico

El diseño experimental se basó en un arreglo factorial con distribución al azar. Se probaron dos diferentes microorganismos etanolgénicos (*S. cerevisiae* y *Z. mobilis*), la fermentación se llevó a cabo a cuatro diferentes concentraciones de azúcares (10, 15, 20, 25% de ART) y a 5 diferentes tiempos de fermentación (24, 48, 72, 96, y 120 horas). La combinación de estas variables produjo 40 arreglos distintos y se hicieron tres replicas de cada uno de ellos. Como variables de respuesta se midió la concentración de etanol producido, así como el contenido de ART residuales y la concentración de microorganismos. Se realizó un análisis de ANOVA para cada microorganismo con el software Statgraphics plus versión 5.1. Copyright 1994-2001 por Statical Graphics Corp.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La cabeza o piña del agave tequilero constituye el $51.45 \pm 2.85\%$ del peso total de la planta; el restante 48.55% está comprendido por las hojas o pencas (puntas de hojas $16.40 \pm 1.25\%$, bases de hojas $32.15 \pm 1.85\%$), las cuales representan los residuos agrícolas del cultivo. En la Tabla 1 se muestran valores promedio de tres determinaciones \pm desviación estándar. Las letras diferentes entre columnas del mismo renglón indican diferencias estadísticas significativas ($p < 0.05$).

El mayor contenido de ART se localiza en la piña, razón por la que esta fracción constituye la parte comercial de la planta y se utiliza como materia prima fuente de azúcares fermentables en el proceso de elaboración de tequila. Una importante cantidad de ART está contenida en las bases de las hojas del agave ($52.45 \pm 2.45\%$) y a pesar de la alta contribución de ésta fracción en el peso total de la planta ($32.15 \pm 1.85\%$) y a los grandes volúmenes de producción (aproximadamente un millón de toneladas anuales) (Valenzuela, 2000), actualmente no se aprovechan.

Tabla 1: Análisis químico proximal de las diferentes fracciones del *Agave tequilana* Weber Azul

Parámetro	Fracción de la planta		
	Puntas de hojas	Bases de hojas	Cabeza o piña
Proporción (% _{Base Húmeda})	16.40 ± 1.25^a	32.15 ± 1.85^b	51.45 ± 2.85^c
Humedad (% _{Base Húmeda})	80.25 ± 1.45^d	78.65 ± 1.55^d	72.50 ± 1.25^e
ART (% _{Base seca})	25.75 ± 2.35^f	52.45 ± 2.45^g	80.35 ± 2.25^h

Consumo de azúcares

La evolución del proceso de fermentación de los azúcares extraídos de las bases de las hojas del *Agave tequilana* Weber Azul fue diferente para cada microorganismo (Fig. 2). El máximo consumo de ART se alcanzó dentro de las primeras 72 horas del proceso de fermentación y fue mayor cuando la fermentación se llevó a cabo con *Z. mobilis* que con *S. cerevisiae*. Altas concentraciones de ART inhiben el crecimiento de ambos microorganismos, especialmente de *S. cerevisiae* donde la inhibición fue manifiesta a concentraciones de ART mayores de 15%. Scopes y Griffiths, (1986) señalan que *Z. mobilis* tolera mayores concentraciones de azúcares debido a que las enzimas de su ruta metabólica Enter-Doudoroff no se inhiben por las altas concentraciones de azúcares, como consecuencia de una rápida conversión de glucosa a etanol en este microorganismo. Por el contrario, se ha demostrado que *S. cerevisiae* es poco osmotolerante y fermenta mejor a bajas concentraciones de azúcares, que en este caso fue a una concentración de ART menor al 15%, resultado que concuerda con lo reportado por Alfenore *et al.* (2002).

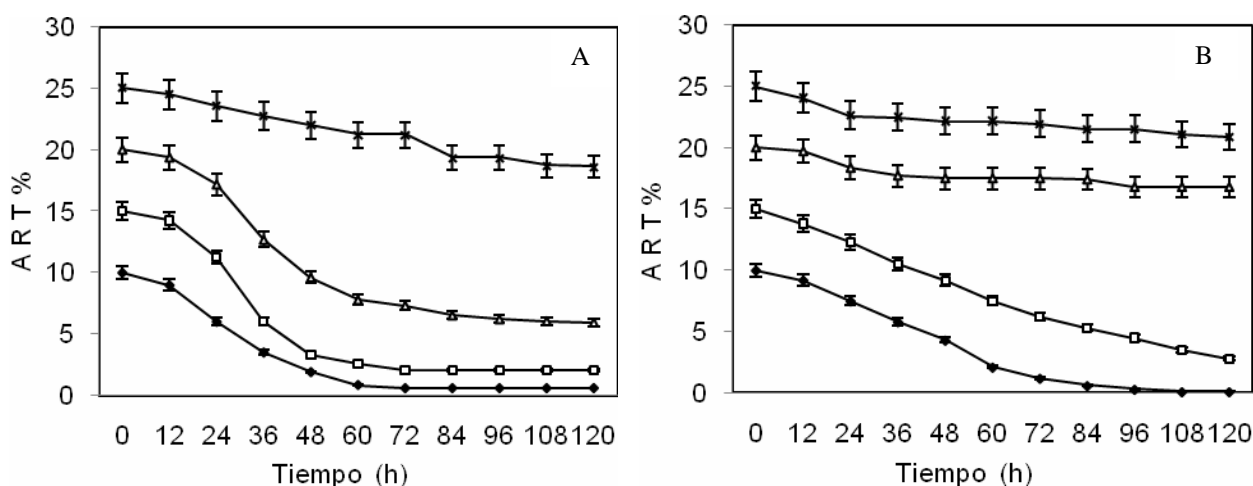


Fig. 2: Consumo de azúcares por *Zymomonas mobilis* (A) y *Saccharomyces cerevisiae* (B) en función del tiempo de fermentación y a diferentes concentraciones de azúcares reductores totales, pH=5.0 y T=30°C. En la figura: ■ es 10% ART; □ es 15% ART; Δ es 20% ART y x es 25% ART.

La alta concentración de azúcares residuales en el medio muestra que la fermentación fue incompleta, especialmente cuando ésta fue llevada a cabo con la levadura *S. cerevisiae*, lo cual indica una posible inhibición del crecimiento celular que ha sido atribuible a la falta de elementos esenciales como nitrógeno y fósforo (Bai *et al.*, 2004), aminoácidos y vitaminas (Winter *et al.*, 1989; Taherzadeh *et al.*, 1996). Se ha reportado también que el jugo de agave contiene sustancias conocidas como saponinas, las cuales inhiben el crecimiento de algunos microorganismos (Montaño *et al.*, 2007). Por otra parte, durante el tratamiento térmico aplicado a las bases de las hojas del agave para extraer, hidrolizar, concentrar y esterilizar el jugo, se degradan vitaminas termolábiles y nitrógeno asimilable a causa de las reacciones de Maillard, en las cuales se generen compuestos de furfural que han demostrado ser tóxicos para las levaduras (Mancilla y López 2002).

Producción de bioetanol

En ambos casos la máxima producción de bioetanol se obtuvo dentro de las primeras 72 horas de iniciado el proceso de fermentación, pues no hubo diferencias estadísticas significativas ($p > 0.05$) en la producción de bioetanol a mayores tiempos de fermentación. Cuando la fermentación se lleva a cabo con la bacteria *Z. mobilis*, la máxima producción de bioetanol ($8.2 \pm 0.3\%_{v/v}$) se obtuvo a una concentración del 20% de ART, mientras que cuando la fermentación es llevada a cabo con la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, la máxima producción de bioetanol ($5.1 \pm 0.25\%_{v/v}$) se obtuvo en un tiempo de a una concentración de 15% de ART (Fig. 3).

A bajas concentraciones de azúcares reductores totales (10% de ART), la cinética de fermentación y por lo tanto la producción de bioetanol es similar entre ambos microorganismos, pero a mayores concentraciones de azúcares (15-25%), la utilización de azúcares y por lo tanto, la producción de bioetanol es mayor cuando la fermentación se lleva a cabo con la bacteria *Z. mobilis*, lo que indica que este microorganismo tolera mayores concentraciones de azúcares y de bioetanol en el medio, lo cual se atribuye a que dicho microorganismo presenta tanto un sistema de difusión facilitada que le permite un rápido equilibrio entre las concentraciones celulares internas y externas de estos compuestos (Struch *et al.*, 1991; Nowak 2001), así como un sistema enzimático más resistente a altas concentraciones de bioetanol, lo que ha permitido alcanzar concentraciones de bioetanol hasta de un 15% p/v (Algar y Scopes, 1985). Otros estudios indican que la mayor tolerancia y producción de bioetanol por *Z. mobilis* se debe a la composición de ácidos grasos que presenta la membrana celular de este microorganismo, dichos ácidos grasos contrarrestan los efectos adversos del bioetanol sobre la membrana celular (Buchholz *et al.*, 1987). Por otro lado, la menor producción de bioetanol por la levadura *S. cerevisiae* se atribuye al efecto tóxico que tiene el alcohol sobre la membrana celular de este microorganismo (Chi & Arneborg, 1999).

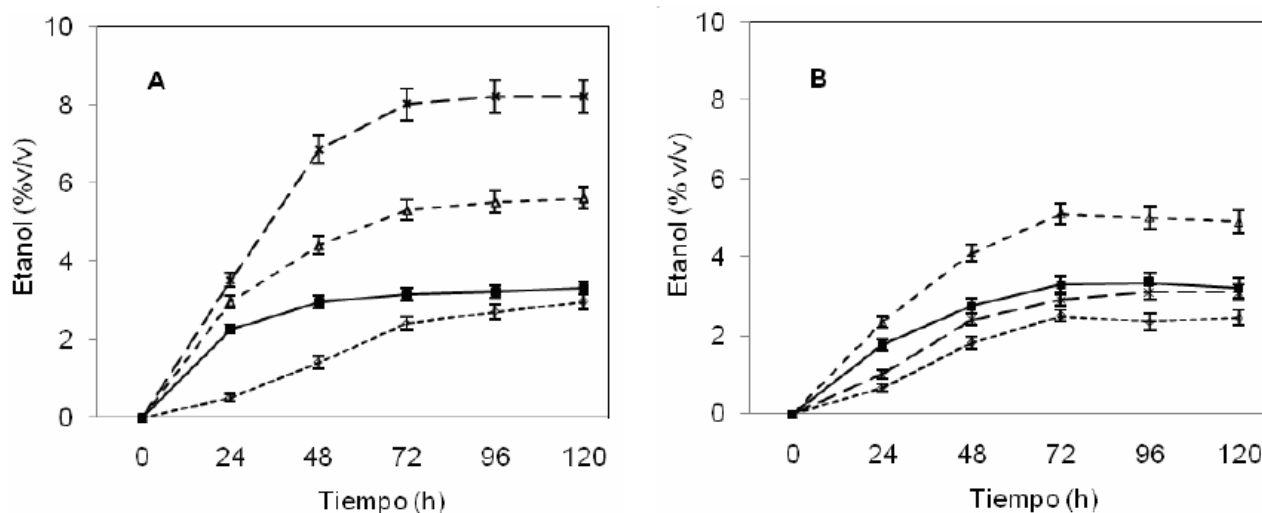


Fig. 3: Producción de etanol por *Zymomonas mobilis* (A) y por *Saccharomyces cerevisiae* (B) en función del tiempo de fermentación y a diferentes concentraciones de azúcares reductores totales, pH=5.0 y T=30°C. En la figura: ■ es 10% ART; □ es 15% ART; Δ es 20% ART y x es 25% ART.

Crecimiento celular

Contrario a lo sucedido con el consumo de azúcares reductores y con la producción de bioetanol, el crecimiento celular de *S. cerevisiae* fue mayor que el de *Z. mobilis*; en ambos casos el máximo crecimiento celular se alcanzó en un tiempo de 72 horas (Fig. 4) y la máxima concentración celular de *Z. mobilis* fue de $6.8 \pm 0.54 \times 10^7$ UFC/ml y se obtuvo a una concentración de ART de 20%, mientras que la máxima concentración celular de *S.cerevisiae* fue de $3.52 \pm 0.24 \times 10^8$ UFC/ml, y se obtuvo a una concentración de 15% de ART. Se ha comprobado que en condiciones de anaerobiosis, el menor crecimiento celular de la bacteria *Zymomonas mobilis* se debe a que este microorganismo sólo convierte el 2% de la fuente de carbono en biomasa y fermenta el 98% restante (Rogers *et al.*, 1986).

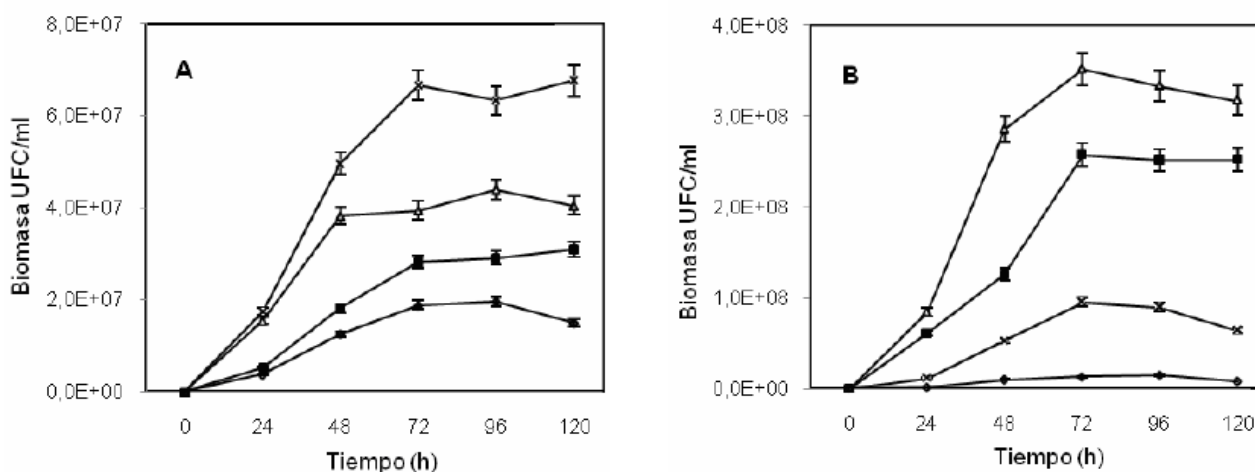


Figura 4: Crecimiento celular de *Zymomonas mobilis* (A) y de *Saccharomyces cerevisiae* (B) en función del tiempo de fermentación a diferentes concentraciones de azúcares reductores totales, pH=5.0 y T=30°C. En la figura: ■ es 10% ART; □ es 15% ART; Δ es 20% ART y x es 25% ART.

En la tabla 2 se muestra el resumen de los parámetros cinéticos obtenidos bajo las condiciones óptimas de fermentación para ambos microorganismos. En la Tabla, los valores representan el promedio de tres determinaciones ± desviación estándar. Letras diferentes entre columnas del mismo renglón indican diferencias estadísticas significativas (p< 0.05). 1: Gramos de etanol

producido / gramo de ART consumidos; 2: Gramos de etanol producido x 100 / 0.511 x gramo de ART consumidos; 3: Gramos de etanol producido / tiempo óptimo de la fermentación.

Se puede observar que la bacteria *Z. mobilis* tuvo un mayor consumo de azúcares (139 ± 3.5 g/L), así como una mayor producción de etanol (80 ± 3.5 g/L) que la *S.cerevisiae*. También se observa que *Z. mobilis* tuvo mayor rendimiento en la producción de etanol (0.58 ± 0.02 gramos de etanol producido / gramo de ART consumido), así como mayor eficiencia de la conversión de azúcar a etanol (112.67 ± 2.9 gramos de etanol obtenido / gramo de azúcar metabolizado) y una mayor productividad volumétrica (1.1 ± 0.01 gramos de etanol producido /L x h).

Tabla 2: Parámetros cinéticos óptimos de la fermentación de los azúcares del *Agave tequilana* Weber Azul por *Zymomonas mobilis* y por *Saccharomyces cerevisiae* a pH=5 y T=30°C

Parámetro	<i>Zymomonas mobilis</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Concentración inicial de ART (g/L)	200 ± 3.1^a	150 ± 2.3^b
Tiempo de fermentación óptimo (h)	72 ^a	72 ^a
Concentración final de ART (g/L)	61 ± 3.1^a	48 ± 2.9^b
Consumo de ART (g/L)	139 ± 3.5^a	102 ± 3.8^b
Crecimiento celular (UFC/mL)	$6.7 \pm 0.5 \times 10^{7a}$	$3.5 \pm 0.3 \times 10^{8b}$
Producción de bioetanol (g/L)	80 ± 3.5^a	51 ± 2.8^b
Rendimiento de bioetanol ¹	0.58 ± 0.02^a	0.50 ± 0.01^b
Eficiencia de conversión ²	112.6 ± 2.9^a	98.1 ± 1.8^b
Productividad volumétrica ³	1.1 ± 0.01^a	0.71 ± 0.01^b

Un estudio similar fue realizado por Cáceres *et al.*, (2008), quienes al fermentar el jugo de las hojas del henequén (*Agave fourcroydes* Lem.) mediante la bacteria *Z. mobilis*, obtuvieron una producción máxima de etanol de 5.22 ± 1.09 %v/v, inferior a la obtenida en nuestro estudio. Resultados similares a los obtenidos en nuestro estudio fueron obtenidos por Canseco *et al.*, (2008), quienes al emplear la bacteria *Z. mobilis* para fermentar los azúcares presentes en los residuos agroindustriales del cultivo del papayo (*Caricae papaya*) obtuvieron una producción máxima de etanol de 8.9 %v/v. Por su parte, Kannan, et al., (1998) encontraron que *Z. mobilis* presenta ventajas sobre *Saccharomyces cerevisiae* en la producción de etanol, tanto en cultivo por lote como en cultivo continuo; dichas ventajas son: tolera mayores concentraciones tanto de sustrato como de etanol en el medio; presenta mayor rendimiento de etanol producido por mol de glucosa fermentada; genera un bajo nivel de biomasa; además, *Z. mobilis* es un microorganismo tanto homo como heterofermentador.

Buscando optimizar las condiciones de fermentación en el proceso de producción de mezcal a partir de los fructanos contenidos en la cabeza del *Agave salmiana*, De León et al., (2008) demostraron que las condiciones del proceso fermentativo afectan la calidad del mezcal, así como la cantidad de etanol producido. Obtuvieron la mayor producción de etanol (37.7 g/L) a una temperatura de 28°C y una concentración inicial de azúcares de 105 g/L, sin embargo, la máxima productividad del proceso la obtuvieron a 34.6°C y 90 g/L de azúcares, mientras que el máximo rendimiento de producto y la mejor calidad del mezcal la obtuvieron cuando la fermentación la llevaron a cabo a una temperatura de 28°C y a una concentración inicial de azúcares de 77 g/L. Concluyen que la mayor producción de etanol y la mayor velocidad de crecimiento del microorganismo no son compatibles, debido a que para obtener una mayor producción de etanol se requiere de altas concentraciones de sustrato, lo que a su vez inhibe la velocidad de crecimiento del microorganismo.

Los resultados obtenidos en este estudio como son: producción de etanol, rendimiento, consumo y asimilación de altas concentraciones de de azúcar y el menor crecimiento celular de la bacteria *Z. mobilis* con respecto a la *S.cerevisiae*, coinciden con los obtenidos por otros investigadores (Kannan, et al., 1998 y Nowak, 2001).

El empleo del *Agave tequilana* Weber Azul como materia prima para la producción de bioetanol, presenta importantes ventajas sobre otras metodologías como son: dado que esta planta no es utilizada en la alimentación humana ni animal, su utilización en la producción de bioetanol no atenta contra la seguridad alimentaria de la población. Por otro lado, el cultivo del agave demanda menor cantidad de agua y fertilizantes, es capaz de crecer en suelos pobres y no aptos para los cultivos alimentarios y resiste temperaturas extremas. Otra ventaja más lo constituyen los altos rendimientos del cultivo de esta planta, cuyo rendimiento promedio nacional actualmente es de 160 ton/ha, que repartidas en los diez años que dura el ciclo del cultivo, arroja un rendimiento promedio de 16 ton/ha x año, y un volumen similar de hojas o pencas que actualmente no son utilizadas. Este rendimiento del cultivo del agave se encuentra muy por arriba de los rendimientos que se obtienen de otros cultivos como el maíz por ejemplo, principal materia prima empleada en la producción de bioetanol en los Estados Unidos de América (Wheals et al., 1999) y cuyo rendimiento nacional de su cultivo es de sólo 3 ton/ha (Valenzuela, 2000). Finalmente, la utilización de las hojas del *Agave Tequilana* Weber Azul como materia prima para la producción industrial de bioetanol, no requiere de fuertes inversiones tecnológicas debido a que este bioproceso es simple y su tecnología es similar a la que se utiliza actualmente en el proceso de producción de tequila.

CONCLUSIONES

Debido a su alto contenido de azúcares reductores totales ($52.45 \pm 2.45\%$ en peso seco) y a los elevados volúmenes de producción (aproximadamente un millón de toneladas anuales), las hojas o pencas del *Agave tequilana* Weber Azul constituyen una prometedora materia prima para la producción industrial de bioetanol.

En el proceso de producción de bioetanol por fermentación de las fructanas del agave, la bacteria *Zymomonas mobilis* presentó ciertas ventajas sobre la levadura *Saccharomyces cerevisiae* como son: mayor rendimiento en la producción de etanol, mayor eficiencia de conversión de azúcares en etanol, mayor productividad volumétrica y una menor inhibición a altas concentraciones de etanol y de azúcares en el medio. Es por ello que, dadas las ventajas mencionadas, la bacteria *Zymomonas mobilis* presenta un gran potencial para la producción industrial de etanol por fermentación.

La utilización de las hojas o pencas del *Agave tequilana* Weber Azul para la producción de bioetanol es una alternativa viable y sustentable que no pone en riesgo la seguridad alimentaria de la población, debido a que éstos residuos agrícolas no forman parte de la alimentación humana ni animal, y su utilización en este proceso contribuye al aprovechamiento integral del cultivo

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos al Instituto Politécnico Nacional que a través de la Secretaría de Investigación y Posgrado, nos haya brindado el apoyo económico para la realización de este proyecto con clave SIP: 20090367.

REFERENCIAS

AOAC. *Official Methods of Analysis Fourteenth edition*. Association of Official Analytical Chemists. Pags: 131, 211 y 858. Washington, U.S.A. (1997).

Alfenore, S., L. Benbadis, C. Bideux y G. Goma, *Improving ethanol production and viability of Saccharomyces cerevisiae by a vitamin feeding strategy during fed batch processes*. Appl Microbial Biotechnol., 60, 67-72 (2002).

Algar, E. y R. Scopes, *Studies on cell-free metabolism: ethanol production by extracts of Zymomonas mobilis*. J. Biotechnol., 2, 275–287 (1985).

Avinash, K., *Biofuels applications as fuels for internal combustion engines*. Progress in Energy and Combustion Science, 33 (3), 233-271 (2007).

Bai, F., L. Chen, Z. Zhang, W. Anderson y Y. Moo, *Continuous ethanol production and evaluation of yeasts cell lysis and viability loss under very high gravity medium conditions*, J. Biotechnol., 110:287-293 (2004).

Buchholz, S., M. Dooley y D. Eveleigh, *Zymomonas: an alcoholic enigma*. Trends Biotechnol., 5:199-204 (1987).

Cáceres, F., P. Lappe, S. Larque, M. Magdub y P. Barahona, *Ethanol production from henequen (Agave fourcroydes Lem.) juice and molasses by a mixture of two yeasts*. Bioresource Technology, 99, 9036-9039 (2008).

Canseco, M., B. Couder, Y. Pérez, P. Álvarez y T. Saldaña. *Producción de etanol a partir de desechos agroindustriales*. Cuerpo académico de Investigación y Desarrollo Agroindustrial. Universidad politécnica de Chiapas. XIII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería, (2008).

Chi, Z., y N. Arneborg, *Relationship between lipid composition, frequency of ethanol-induced respiratory deficient mutants, and ethanol tolerance in Saccharomyces cerevisiae mutants, and ethanol tolerance in Saccharomyces cerevisiae*. J. Appl. Microbiol., 86, 1047-1052 (1999).

De León, R., P. Escalante, A. Barba, H. Blaschek, *Optimization of fermentation conditions for the production of the mescal from Agave salmiana using response surface methodology*. Chemical Engineering and Processing 47, 76–82 (2008).

Diaz, M., L. Marie, E. Estarrón y P. Strehaiano, *Fermentative capability and aroma compound production by yeast strains isolated from Agave tequilana Weber juice*. Enzyme and Microbial Technology, 42, 608-616 (2008).

Guiraud, J., J. Caillaud y P. Galzy, *Optimization of alcohol production from Jerusalem artichokes*. Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol., 14, 81-85 (1982).

Hernández, S., M. Villa, J. Veloz, K. Rivera, R. González, M. Plasencia y E. Trejo. *Comparative hydrolysis and fermentation of sugarcane and agave bagasse*. Bioresource Technology, 100, 1238-1245 (2009).

Idarraga, G., J. Ramos, V. Zúñiga y T. Sahin, *Pulp and paper from agave waste from tequila production*. J. Agric. Food Chem., 47, 4450-4455 (1999).

Iñiguez, G., R. Díaz, R. Sanjuan, J. Anzaldo y R. Rowell, *Utilization of by-products from the tequila industry. Part 2: potential value of Agave tequilana Weber azul leaves*. Bioresource Technology, 77, 101-108 (2001).

John, M., *Seven steps to curb global warming*. Energy Policy. 355(8), 4247-4259 (2007).

Kannan, T., G. Sangiliyandi y P. Gunasekaran, *Improved ethanol production from sucrose by a mutant of Zymomonas mobilis lacking sucrases in immobilized cell fermentation*. Enzyme Microbial Technology, 22(3),179-184 (1998).

López, G., M. Mancilla y D. Mendoza, *Molecular structures of fructans from Agave tequilana Weber azul*. J. Agric. Food Chem., 51,7835-7840 (2003).

Mancilla, M. y M. López, *Generation of Maillard compounds from inulin during thermal processing of Agave tequilana blue variety*. J. Agric. Food Chem., 50, 806-812 (2002)

Margaritis, A., F. Merchant y I. Veliky, *Fermentation of polyfructans to ethanol by Saccharomyces rosei*. Biotechnol. Lett., 5, 271-276 (1983).

- Miller, G., *Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar*. Anal. Chem., 31, 426-428 (1959).
- Montaño, D., M. Line, E. Espinosa y P. Strehaiano, *Fermentative capability and aroma compound production by yeast strains isolated from Agave tequilana Weber juice*. Enzyme and Microbial Technol., 42, 608-616 (2007).
- Nakamura, T., Y. Ogata, A. Shitara y K. Ohta, *Ethanol production from Jerusalem artichoke tubers by Aspergillus niger and Saccharomyces cerevisiae*. Journal of Fermentation and Bioengineering, 81(6), 564-566 (1996).
- Narvaez, Z.J. y T.F. Sanchez, *Agaves as a raw material, recent technologies and applications*. Recent Patents on Biotechnology, 3 (3), 1-7 (2009).
- Nowak, J., *Comparison of polish industrial distillery yeast with ethanol producing bacteria Zymomonas mobilis*. Food Science and Technol., 4, 2-6 (2001).
- Prasad, S., A. Singh y H. Joshi, *Ethanol as an alternative fuel from agricultural, industrial and urban residues*. Resources, Conservation and Recycling, 50, 1-39 (2007).
- Rogers, P., A. Strzelecki y A. Goodman, *Commercial potential of Zymomonas process for ethanol production*. Found. Biotechnol. Industr. Ferm. Res., 4, 63-79 (1986).
- Rosa, M., A. Vieira y M.L. Bartolomeu, *Production of high concentration of ethanol from mash, juice and pulp of Jerusalem artichoke tubers by Kluyveromyces fragilis*. Enzyme Microbiol. Technol., 8, 673-676 (1986).
- Sanchez, O. y C. Cardona, *Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks*. Bioresource Technology, 99, 5270-5295 (2008).
- Scopes, R. y S. Griffiths, *Fermentation capabilities of Zymomonas mobilis glycolytic enzymes*. Biotechnol. Lett., 8, 653-656 (1986).
- Struch, T., B. Neuss y M. Bringer, *Osmotic adjustment of Zymomonas mobilis to concentrated glucose solution*. Appl. Microbiol. Biotechnol., 23, 201-211 (1991).
- Taherzadeh, M., G. Liden y C. Klasson, *The effects of pantothenato deficiency and acetate addition on anaerobic batch fermentation of glucose by Saccharomyces cerevisiae*. Appl Microbiol Biotechnol., 46, 176-182 (1996).
- Toran, D., V. Jain, J. Allais y J. Baratti, *Effect of acid or enzymatic hydrolysis on ethanol production by Zymomonas mobilis growing on Jerusalem artichoke juice*. Biotech. Lett., 7, 527-530 (1985).
- Valenzuela, Z. A., *El agave tequilero: su cultivo e industria*. 10-35. Litteris Editores 2ª Edición. México, (2000).
- Torney F, L. Moeller, A. Scarpa and K. Wang, *Genetic engineering approaches to improve bioethanol production from maize*. Current opinion in Biotechnology, 18 (3), 193-199 (2007).
- Wheals, A., L. Basso, D. Alves y H. Amorim, *Fuel ethanol after 25 years*. TIBTECH, 17(12), 482-487 (1999).
- Winter, J., M. Loret y J. Uribelarrea, *Inhibition and growth factor deficiencies in alcoholic fermentation by Saccharomyces cerevisiae*. Curr. Microbiol., 18, 247-252 (1989).

