



Revista Internacional de Investigación e Innovación Tecnológica

Página principal: www.riit.com.mx

Desarrollo de tecnología para producir bioetanol lignocelulósico en México, retos y oportunidades

Development of technology to produce lignocellulosic bioethanol in Mexico, challenges, and opportunities

del Moral-Ventura, S.T.^a, Carvajal-Zarrabal, O.^b, Navarro-Moreno, L.G.^c, Carrillo-Ahumada, J.^d Aguilar-Uscanga, M.G.^e, Nolasco-Hipolito, C.^{e*}

^a Tecnológico Nacional de México/Instituto Tecnológico de Veracruz, Czada. M. A. de Quevedo Núm. 2779, C.P. 91860, Veracruz, Veracruz, México.

^b Área de Química y Bioquímica. Universidad Veracruzana. SS Juan Pablo II s/n, Boca del Río, CP 94294 Veracruz, México.

^c Centro de Investigaciones Científicas. Universidad del Papaloapan. Circuito Central #200, Col. Parque Industrial, CP. 68301. Tuxtepec, Oaxaca. Mex.

^d Ingeniería en Alimentos. Universidad del Papaloapan. Circuito Central #200, Col. Parque Industrial, CP. 68301. Tuxtepec, Oaxaca. Mex.

^e Tecnológico Nacional de México/I. T. Veracruz, Departamento de Ing. Química y Bioquímica, Unidad de Investigación y Desarrollo en Alimentos (UNIDA), Czada. M. A. de Quevedo Núm. 2779, C.P. 91860, Veracruz, Veracruz, México.

sandra.dv@veracruz.tnm.mx; ocarvajal@uv.mx; lnavarro@unpa.edu.mx; jesuscarrillo18@yahoo.com; gaguilar@itver.edu.mx; cnolasco@unpa.edu.mx*

Innovación tecnológica: Desarrollo de tecnología para bioetanol de segunda generación.

Área de aplicación industrial: Tecnología ambiental.

Recibido: 15 marzo 2022

Aceptado: 14 febrero 2023

Abstract

The conversion of lignocellulosic materials (biomass) to ethanol is the reversed process of the energy released by the sun. Biomass has a lot of stored energy, but it is difficult to obtain it systematically if it is not through combustion. On the contrary, the sun generates all the energy necessary for the planet. Still, no one has invented a mechanism to store it and put it at the service of humanity. The problem with biomass is that a lot of energy is required to degrade its cellulolytic structure, the fibrous material that represents 40-60% of the plant and the rest is lignin and hemicellulose, which provide rigidity and flexibility to the plants. This review deals with the processes that lignocellulosic biomass must follow to obtain fermentable sugars. It is also described

what is being done in Mexico to use this material, the search for the availability of raw materials, the isolation of native microorganisms for fermentation processes, their genetic manipulation, tests at the laboratory and pilot plant level to produce second-generation bioethanol (2G), as well as exploiting its energy potential, with special reference to the research carried out by the Authors.

Keywords: Agricultural residuals, bioethanol 2G, cellulases, fermentation, pretreatments.

Resumen

La conversión de materiales lignocelulósicos (biomasa) a etanol es el proceso inverso de la energía liberada por el sol. La biomasa tiene mucha energía almacenada, pero es difícil obtenerla sistemáticamente si no es a través de la combustión. Por el contrario, el sol genera toda la energía necesaria para el planeta. Aun así, nadie ha inventado un mecanismo para almacenarlo y ponerlo al servicio de la humanidad. El problema de la biomasa es que se requiere mucha energía para degradar su estructura celulolítica, el material fibroso que representa el 40-60% de la planta y el resto es lignina y hemicelulosa, que aportan rigidez y flexibilidad a las plantas. Esta revisión trata sobre los procesos que debe seguir la biomasa lignocelulósica para obtener azúcares fermentables. También se describe lo que se está haciendo en México para el aprovechamiento de este material, la búsqueda de la disponibilidad de materia prima, el aislamiento de microorganismos nativos para procesos de fermentación, su manipulación genética, pruebas a nivel de laboratorio y planta piloto para producir bioetanol de segunda generación (2G), así como el aprovechamiento de su potencial energético, con especial referencia a las investigaciones realizadas por los autores.

Palabras clave: Bioetanol 2G, celulosas, fermentación, pretratamientos, residuos agrícolas.

1. Introducción

El bioetanol a nivel industrial se produce por fermentación de sustratos con alto contenido de glucosa: jugos, melazas, almidones de diverso origen; a este etanol se le llama de primera generación (1G) debido a que la tecnología que se emplea es convencional. Cuando el bioetanol es producido partiendo de sustratos lignocelulósicos, se le llama de segunda generación (2G) (Lennartsson et al., 2014). La producción de bioetanol 1G si bien es la que se realiza a nivel mundial, las materias primas se ven comprometidas con la alimentación humana y animal, por lo que se han desarrollado otros procesos como la tecnología 2G. La biomasa lignocelulósica es abundante en el planeta, sin embargo, uno de sus inconvenientes es el difícil acceso al

azúcar fermentable, para ello es necesario sacarla de las microfibrillas mediante procesos químicos (pretratamiento químico) y enzimáticos. Estos procesos demandan un alto consumo de energía durante el pretratamiento químico, además la etapa de hidrólisis enzimática emplea enzimas celulíticas y xilanolíticas poco disponibles en el mercado que encarecen el proceso disminuyendo la viabilidad comercial. Por otro lado, estudios sociales y de seguridad alimentaria indican que el bioetanol 2G es muy promisorio. De 1 tonelada de caña obtienen alrededor de 500 L de jugo de caña, que produce de 65-70 L de bioetanol 1G, en cambio, del bagazo de caña se producen más de 100 L de bioetanol, es decir 1.5 veces más de bioetanol 2G. Además, la producción de

bioetanol 2G no compromete la soberanía alimentaria. Sin embargo, la pertinencia de producción de bioetanol 2G está en función del costo energético del pretratamiento del residuo y el alto costo de las enzimas (celobiohidrolasas) utilizadas, ya que su costo puede alcanzar hasta el 50% del costo de producción. En esta revisión se pone sobre la mesa los retos y oportunidades que tiene actualmente la producción de bioetanol 2G y el desarrollo científico y tecnológico que se está realizando en México dentro del contexto mundial.

Es evidente que la producción de etanol 2G se centra en reducir costos de producción y los balances de energía. Por lo tanto, toda la investigación que se realiza está enfocada en estos dos asuntos donde el objetivo central es dejar de dañar el ambiente. En una serie de estudios de 2016 conocidos colectivamente como el "informe de mil millones de toneladas", el Departamento de Energía estimó que 500 millones de toneladas de biomasa sin almidón podrían cosecharse o recolectarse anualmente en los EE. UU. sin afectar negativamente a los ecosistemas (Kramer, 2022). Sin embargo, es bien conocido que el problema principal es que el material lignocelulósico es de mucha resistencia a la degradación, tanto así que se le ha nombrado la "biomasa recalcitrante" (Lynd et al., 1999).

Avances en el conocimiento han resumido los factores que contribuyen a lo recalcitrante de la biomasa como "(i) el tejido epidérmico del cuerpo de la planta, especialmente la cutícula y las ceras epicuticulares, (ii) la disposición y densidad de los haces vasculares, (iii) la cantidad relativa de tejido esclerenquimatoso (pared gruesa), (iv) el grado de lignificación, (v) la heterogeneidad estructural y la complejidad de los constituyentes de la pared celular, como microfibrillas y polímeros de matriz, (vi) los desafíos para las enzimas que actúan sobre un sustrato insoluble, y (vii) los

inhibidores de fermentaciones posteriores que existen naturalmente en las paredes celulares o se generan durante los procesos de conversión" (Himmel et al., 2007). Debido a la obstinación inherente de la biomasa, la liberación de azúcares fermentables a través de la hidrólisis enzimática adecuada, así como la hidrólisis microbiana, es el cuello de botella de las biorrefinerías lignocelulósicas industriales.

2. Producción de bioetanol 2G en plantas comerciales en el mundo

Durante mucho tiempo se ha dicho que los residuos agrícolas tienen potencial para ser transformados en productos de mayor valor agregado. Principalmente, se ha mencionado que se pueden utilizar para producir bioetanol y que su mercado se expandiría en los siguientes años (OECD-FAO, 2021). La producción de bioetanol 2G a partir de residuos lignocelulósicos, ha pasado por una serie de situaciones y controversias en diversos rubros, desde los métodos de degradación de las estructuras biológicas, balances de materia y energía, hasta la disponibilidad de las materias mismas y su competencia con la cadena de suministro de alimentos para la humanidad (Ambye-Jensen et al., 2018; di Donato et al., 2019; Institute of Medicine, 2014; Pažitný et al., 2020; Pietrangeli & Lauri, 2021). Algunos de los enfoques prácticos que se pueden adoptar para hacer que la producción de bioetanol lignocelulósico sea económicamente factible, incluyen el uso de sustratos de bajo costo, técnicas de pretratamiento rentables, cepas mejoradas genéticamente y de sobreproducción para maximizar la tolerancia y el rendimiento del bioetanol, procesos de recuperación mejorados, integración eficiente de bioprocesos, explotación económica de productos secundarios y minimización de energía y desechos, todos ellos embebidos dentro de procesos robustos y sostenibles (Banerjee et al., 2010; Chen & Fu, 2016;

Solomon et al., 2007; Morales-Vera et al., 2022).

Es sorprendente que desde hace 202 años el Químico Francés Henri Braconnot descubrió cómo transformar la pulpa de madera en caucho y azúcar mediante ácido sulfúrico o hidróxido de potasio a lo que se llamarían posteriormente tratamientos ácidos y alcalinos (Braconnot, 1819). Inmediatamente vinieron los primeros intentos de comercializar esos hallazgos y se instalaron varias plantas comerciales hasta la segunda guerra mundial. Después de ese periodo, las plantas fracasaron por no ser redituables económicamente en ese tiempo y se dejaron de operar (Sherrard & Kressman, 1945). En tiempos modernos la producción de bioetanol 2G es una realidad en varios países como Italia, España, India, Brasil, Estados Unidos. Sin embargo, aún existen retos técnicos que resolver (Ning et al., 2021).

La planta de bioetanol celulósico de escala comercial Beta Renewables en Crescentino, Italia, se inauguró oficialmente el 9 de octubre del 2013. Actualmente es la refinería de biocombustibles avanzados más grande del mundo con una capacidad de producción de 75 millones de litros de bioetanol 2G al año, que representa solamente alrededor de 0.3% de la demanda mundial de bioetanol (RFA, 2021). Los accionistas de Beta Renewables son Biochemtex, una empresa del Grupo Mossi & Ghisolfi (M&G), TPG Capital y Novozymes (Biochemtex, 2013). Novozymes es la empresa transnacional más importante en la producción de enzimas. Lo que señala la importancia entre la producción de enzimas y las plantas de bioetanol 2G.

Otra planta identificada como El Proyecto LIBERTY (EE. UU.) convierte olotes, hojas, cáscaras y tallos de maíz empacados en combustible renovable. La planta comenzó oficialmente sus operaciones procesando su primer lote de biomasa en bioetanol

celulósico y avanza hacia una operación continua. A plena capacidad, convertirá 770 ton de biomasa por día para producir bioetanol a una tasa de 80 millones de L/año, y luego aumentará hasta 100 millones de L/año. Los Departamentos de Energía y Agricultura junto con el Estado de Iowa de los Estados Unidos, han sido socios importantes para llevar esta tecnología a escala comercial. Desafortunadamente en 2019, anunciaron que requieren más tiempo para ajustar detalles técnicos en ciertas tecnologías, así como algunas licencias que aún se encuentran en trámite de patentes (Kyle, 2019).

En junio del 2013, Abengoa inauguró su planta de transformación de Residuos Sólidos Urbanos (RSU) a bioetanol celulósico con la tecnología denominada “Waste to Biofuels - W2B” en Salamanca, España. La planta tiene capacidad para tratar 25,000 toneladas de RSU de los que obtendrá hasta 1.5 millones de litros de bioetanol para su uso como combustible. La planta de demostración ubicada en Babilafuente (Salamanca, España) utiliza la tecnología W2B desarrollada por Abengoa para producir biocombustibles de segunda generación a partir de RSU mediante un tratamiento de fermentación e hidrólisis enzimática. Por el lado de Latinoamérica, Brasil se ha destacado comercialmente en la producción de etanol 2G. GranBio, una empresa de biotecnología industrial 100% brasileña, inició su producción en la primera planta de etanol 2G a escala comercial. Bioflex 1, unidad construida en São Miguel dos Campos, Alagoas, tiene una capacidad de producción inicial de 82 millones de litros de etanol por año. GranBio ha cambiado el concepto donde los residuos de caña de azúcar que solían dejarse en el campo o quemarse, ahora se recolectan, empacan y almacenan para transformarlos en etanol de segunda generación y otros productos renovables. GranBio reporta que operan la planta con alto rendimiento / bajo consumo de

enzimas y alto rendimiento de la productividad de las levaduras en convertir sustrato a producto (GranBio, 2020). Esta es solo una de las tecnologías utilizadas para producir biocombustibles y bioquímicos de una manera más sostenible. Durante el proceso de transformación, la materia orgánica se trata de diversas formas para producir fibra orgánica rica en celulosa y hemicelulosa, que posteriormente se convierte en bioetanol. Los retos técnicos siguen siendo verdaderos desafíos, lo cual incentiva a que se siga desarrollando tecnología para disminuir los costos de producción de bioetanol 2G. En ese sentido se han desarrollado en distintas latitudes cultivos, árboles, cepas hidrolíticas y fermentativas mejoradas genéticamente, así como mejoras en el proceso de obtención de celulosa (Lamichhane et al., 2021).

3. Producción de bioetanol 2G en México.

La situación en México con respecto a la producción de bioetanol a partir de lignocelulósicos dista mucho de tener plantas comerciales. Sin embargo, se está haciendo investigación a nivel laboratorio y planta piloto trayendo consigo investigación en todos los aspectos para contribuir al desarrollo de esta tecnología.

La producción de bioetanol mundial, incluyendo a México se hace principalmente a partir de jugo y melazas de caña de azúcar (Castañeda-Ayarza & Cortez, 2017;

CONADESUCA, 2021) debido a su fácil manejo y procesamiento. Adversamente, el uso de lignocelulósicos en cualquiera de sus orígenes requiere de un tratamiento previo para después fermentarse. Existen dos rutas de procesamiento para convertir la biomasa lignocelulósica en bioetanol y biocombustibles de 2G; estas son la ruta termoquímica y la ruta bioquímica (Robak & Balcerk, 2018). El proceso termoquímico convierte la biomasa en un gas intermedio (gas de síntesis) o líquido utilizando catalizadores no biológicos (por ejemplo, calor) en un reactor. El producto intermedio se transforma en opciones de combustible: metanol, bioetanol lignocelulósico, otros alcoholes superiores de más carbonos, hidrógeno y diésel sintético/diésel Fischer-Tropsch (FT) o combustible de aviación, dependiendo la tecnología empleada (Jiajun Zhang & Zhang, 2019). En este reporte no se analiza esta tecnología. Nos enfocamos en la conversión bioquímica, que es una técnica común para producir bioetanol, debido a la alta selectividad y eficiencia de la conversión de biomasa (Duque et al., 2021). En general, el uso de biomasa para producir bioetanol sigue el proceso como se muestra en la Fig. 1, la cual inicia con la selección de la biomasa, seguida del pretratamiento químico y enzimático, para producir el bioetanol por fermentación y posteriormente purificarlo (destilación y deshidratación). Inclusive las empresas más avanzadas en esta tecnología siguen el mismo patrón de investigación y aplicación industrial de estos procesos.



Figura 1. Proceso general para la producción de bioetanol de biomasa lignocelulósica.

3.1. Selección de la biomasa

En México la opción más viable para producir bioetanol a partir de biomasa es utilizando bagazo de caña (BC) de azúcar. Esto se debe

a que es el cultivo agrícola más abundante en México y por lo tanto es el que más biomasa genera. Datos de la zafra 2020-2021 indican que se produjeron casi 5.8 millones de

toneladas de caña, lo que daría una generación de biomasa lignocelulósica aproximada de 2.9 millones de toneladas (CONADESUCA, 2021). La producción de caña se mantiene en aumento desde hace varios años. Ha sido evidente que la razón principal de utilizar materiales lignocelulósicos es reducir el costo de producción y evitar la controversia de afectar la cadena de alimentos para consumo humano. Utilizando simulación de bioprocesos y el análisis de sensibilidad por diseño de experimentos, se ha demostrado que usar BC podría ser factible, pero es necesario hacer un pretratamiento para liberar la celulosa contenida en el BC, para que después las hexosas y pentosas sean fermentadas. Por ejemplo, si el pretratamiento es la ozonólisis, este debe mantenerse a un nivel de 100% para que permita la hidrólisis de la lignina y la liberación de la celulosa y hemicelulosa para poder llevar a cabo la sacarificación y después la fermentación (Aburto et al., 2008). En forma similar, otro estudio reporta que es posible utilizar el BC y que puede ser económicamente viable asumiendo que se construye una planta para producir 253 millones de litros de bioetanol anhidro con una inversión de 167.8 millones de dólares. El costo del bioetanol se estimó en 0.27 dólares/L (Cabrera et al., 2017).

En 2017 el Fondo Sectorial CONACYT-Secretaría de Energía-Sustentabilidad Energética, publicó un reporte sobre inteligencia tecnológica exclusivo para el bioetanol. Reportan que los factores que más impactan para determinar las condiciones y configuración del proceso de producción de bioetanol a partir de material lignocelulósico son el tipo de materia prima, el tipo de pretratamiento y la estrategia del proceso. Hasta el 2017 no reportan que haya alguna planta produciendo bioetanol a partir de lignocelulósicos, pero se aclara que la utilización de estos depende de la situación geográfica y de su disponibilidad. Reportan

que la madera pudiera ser el material más atractivo por su contenido de fermentables que se puede obtener, pero que también tiene restricciones por localidad y disponibilidad (CONACYT-SENER, 2017). Es evidente que la selección de la materia prima es de acuerdo con la distribución geográfica de los cultivos que pudieran generar residuos aprovechables. Por ejemplo, con el objetivo de desarrollar un biocombustible de 2G a partir de residuos de agave, científicos del Departamento de Biotecnología en la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Coahuila desarrollaron tecnología para la generación de bioetanol carburante como alternativa energética para el país. El proyecto de producción de bioetanol inició en 2012, a partir de un proyecto financiado por el Fondo Sectorial SAGARPA-CONACYT, se desarrolló tecnología para la producción de bioetanol carburante a partir de un insumo que se deriva de una especie de agave silvestre que crece en toda la región noreste de México, conocido como lechuguilla (Agave lechuguilla). Esta tecnología está en proceso de estudios de escalamiento (Sánchez-Banda, 2017). La Fig.2, muestra los materiales lignocelulósicos más representativos en México y que tienen gran potencial de ser convertidos a azúcares fermentables (CONACYT-SENER, 2017). El caso del bagazo de sorgo dulce (BSD) es viable como residuo agrícola para producir los azúcares fermentables, es ventajoso porque el sorgo dulce puede cultivarse en tierras de bajo nivel de fertilidad (Espinosa-Paz et al., 2019). Desafortunadamente su producción a nivel nacional todavía está en muy bajo nivel porque las tierras cultivables no se dedican a este cultivo, aunque, se están desarrollando líneas celulares que produzcan altas concentraciones de azúcares fermentables y biomasa. Se tendría que realizar una tarea muy efectiva para convencer a los agricultores que cambien o que hagan rotación de cultivos y que incluyan al sorgo dulce. Aunque, un estudio de costo-beneficio

demonstró que el costo de producción de bioetanol a partir de sorgo dulce es más competitivo que los costos de producción a partir de caña de azúcar y sorgo grano

(CONACYT-SENER, 2017). Después de la selección de la biomasa lignocelulósica sigue la hidrólisis de ésta.



Figura 2. Residuos agrícolas existentes en México útiles para producir azúcares fermentables. A) Olotes de maíz; B) Rastrojo de maíz; C) Bagazo de caña de azúcar; D) Hojas de caña de azúcar; E) Cáscara de café; F) Cáscara de coco; G) Cáscara de arroz; H) Rastrojo de amaranto; I) Bagazo de piña; y J) Bagazo de agave.

3.2. Pretratamientos químico y enzimático de lignocelulósicos

Este reporte podría ser exclusivamente sobre el tema de pretratamientos. La literatura es basta en diversos métodos para degradar la estructura de los lignocelulósicos (Haq et al., 2021; Hashemi et al., 2021; Kumar et al., 2009; Mekala et al., 2014; Jinxu Zhang et al., 2021). La Fig. 3, muestra las estructuras de la α -glucosa, β -glucosa y la glucosa en la celulosa, la cual en la pared celular de plantas está muy bien empacada debido a los puentes de hidrógeno que se forman entre las distintas cadenas de glucosa.

En realidad, hay una razón natural por lo cual los lignocelulósicos tienen una estructura muy resistente a la degradación. Esta resistencia es férrea porque es la única forma que usan las plantas para defenderse contra las inclemencias del tiempo, ataque de insectos y animales, ataque microbiano y la fuerza de la naturaleza. Como se ha explicado, se podría hacer una revisión de todo lo que la ciencia ha investigado para romper las ligaduras atómicas de estos materiales, sin embargo, la hidrólisis de los materiales lignocelulósicos está ampliamente ligada con la complejidad estructural del material; en cómo está organizada la celulosa y cómo se encuentra entrelazada con la hemicelulosa y lignina.

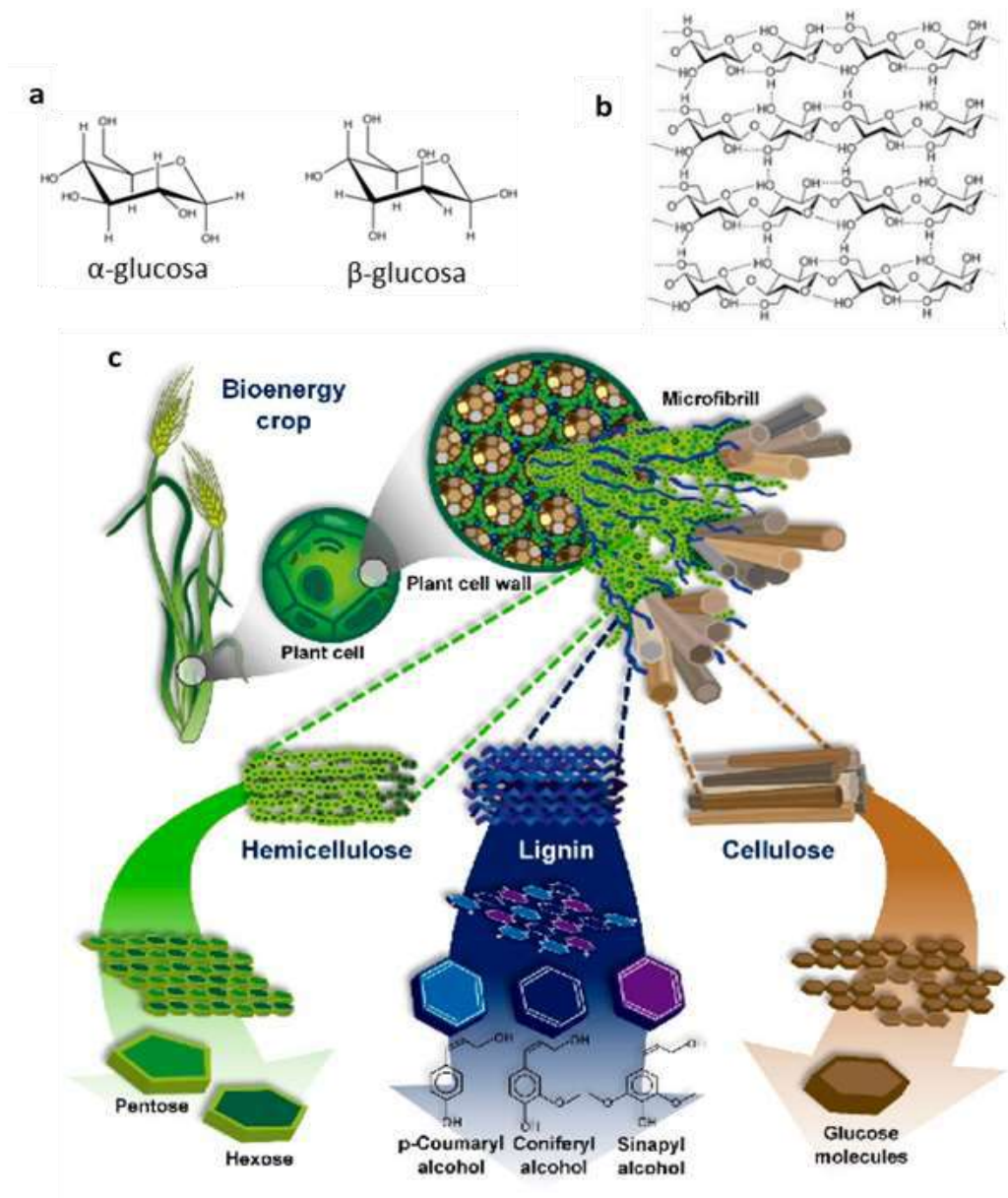


Figura 3. Esquema de la estructura molecular de la glucosa en su conformación α y β (a), la estructura de una fracción de celulosa (b) y la conformación del material lignocelulósico (Hernández-Beltrán et al., 2019).

La Fig. 4 resume el procesamiento de materiales lignocelulósicos en la producción de bioetanol, que pueden ser físicos, químicos, una combinación de los primeros dos y biológicos. Se observa que se puede dar una amplia gama de combinaciones con el único objetivo de liberar la celulosa. Los tratamientos más efectivos para la degradación de la lignina son los alcalinos, perteneciente a los químicos. Es importante señalar que es necesario optimizar el proceso

de hidrólisis de acuerdo con el tipo de material lignocelulósico empleado. Durante la hidrólisis alcalina, la hemicelulosa y la lignina son degradadas, los oligómeros formados (ácido ferúlico, ácido cumárico) pueden emplearse como aditivos en alimentos en cosméticos y en productos farmacéuticos por su alta actividad antioxidante (Oriez et al., 2020). En cambio, las pentosas libres podrían sumarse a la vía fermentativa para la producción de etanol. El

residuo sólido restante es la celulosa, la cual tiene regiones cristalinas, debido al denso empaquetamiento de sus cadenas, y amorfas, donde el empaquetamiento es menor. La resistencia de la celulosa radica es su orientación espacial y el enlace tipo beta, el cual le permite flexionarse y formar microfibrillas para formar nanocapas que finalmente producen una estructura cristalina altamente organizada y resistente (Holtzaple, 2003). Las microfibrillas son muy estables en muchas condiciones químicas, no son solubles en agua, ni en muchos disolventes orgánicos, ácidos débiles o bases (Deguchi et al., 2006). La estructura cristalina se puede destruir y convertir en forma amorfa a alta temperatura ($> 300\text{ }^{\circ}\text{C}$) y presión (25 MPa) (Ling et al., 2017).

Una vez con la celulosa libre de lignina y hemicelulosa el siguiente reto es producir glucosa. Normalmente, hay dos formas de hidrolizar la celulosa: química y enzimáticamente. El método químico consiste en utilizar ácidos fuertes concentrados para hidrolizar la celulosa a alta temperatura y presión (Chen, 2015). Sin embargo, este método no es el preferido por la industria de los biocombustibles, porque los subproductos tóxicos que se generan en la hidrólisis llegan hasta la etapa de fermentación, lo que afectará a las bacterias / levaduras fermentadoras. Por tanto, el método enzimático es el método con mayor potencial para hidrolizar la celulosa (Vasić et al., 2021).

A pesar de la complejidad estructural biológica de la celulosa existen microorganismos que pueden degradar esa estructura con enlaces β , aunque lo hacen a una velocidad de degradación menor en

comparación a los almidones que son glucosas unidas por enlaces alfa (Polman et al., 2021). No obstante, sabiendo que los microorganismos poseen celulasas, se ha descubierto que no es una sola enzima la que realiza la degradación de la celulosa, sino que existe un consorcio de enzimas específicas (β -glucosidasas, endocelulasas, exocelulasas) y que por lo general no todos los microorganismos poseen estos sistemas enzimáticos (Scarcella et al., 2021). Del 2000 a la fecha ha habido un aumento exponencial en la búsqueda de microorganismos poseedores de sistemas enzimáticos para degradar material lignocelulósico. Los cocteles enzimáticos están compuestos de celulasas (β -glucosidasas, endocelulasas, exocelulasas) donde guardan relaciones entre sus actividades, así como de enzimas accesorias que favorecen la estabilidad de las enzimas o ayudan a la degradación de polímero, entre ellas se encuentran las xilanasas, lacasas, esterases, entre otras, que se ha observado que remueven residuos de lignina y hemicelulosa, por ende, mejoran el acceso de las celulasas y la liberación de glucosa. De los efectos combinados de los pretratamientos que se muestran en la Fig. 4, por ejemplo, se ha estudiado la hidrólisis enzimática asistida por ozono la cual permitió alcanzar rendimientos de glucosa y xilosa tan altos como 45 y 37.8%, respectivamente. La relación azúcares libres / ozono gastado, osciló entre 2.3 y 5.7 g azúcares / g O_3 , aplicando una relación de 50 mg O_3 / g BC con tamaño de partícula de 420 μm y 60% de humedad (Osuna-Laveaga et al., 2020). Otros tratamientos como el blanqueo de la biomasa lignocelulósica hacen más accesibles el material a la hidrólisis (Vargas-Radillo et al., 2016).



Figura 4 Panorama del procesamiento de materiales lignocelulósicos hasta la producción de bioetanol.

Esto sucede porque las especies de reacción blanqueadas con peróxido de hidrógeno alcalino son el anión per-hidroxilo (HOO^-) y sus intermediarios de descomposición como hidroxilo (HO^-) y anión superóxido (O^{2-}). Los radicales hidroxilos pueden reaccionar con las cadenas de carbohidratos en varias posiciones, siendo las principales la oxidación de los grupos hidroxilo secundarios o el carbono anomérico (Gierer, 1997). La oxidación de los grupos hidroxilo secundarios se inicia mediante la abstracción de hidrógeno del carbono respectivo, seguida de una adición de oxígeno y la posterior formación de una cetona. Una aplicación práctica de este principio de oxidación es en la industria del papel donde se utiliza el blanqueo de la pulpa con peróxido de hidrógeno, éstos radicales, generalmente tienen una influencia indeseable en la estructura del papel porque también atacan las cadenas de celulosa dando como resultado la pérdida de resistencia de las fibras lignocelulósicas (Potůček & Milichovský,

2000). Sin embargo, este efecto de debilitamiento es positivo cuando se trata de degradar a la celulosa porque a cambio favorece a la reacción enzimática para producir glucosa para procesos fermentativos.

La Fig. 5 muestra la microestructura del bagazo de caña de azúcar después de la hidrólisis enzimática con diferentes pretratamientos (Castañón-Rodríguez et al., 2015). Se observa que después del pretratamiento la estructura de la celulosa cambia mucho con respecto a la forma más cristalizada antes del tratamiento. Cualquiera que sea el método de pretratamiento que se proponga para hidrolizar los materiales lignocelulósicos, se tendrán tres retos: incrementar la eficiencia de la conversión, mejorar la operación técnica y disminuir el consumo de energía (Haq et al., 2021). La producción de bioetanol 2G actualmente es aún costoso comparado con la producción de bioetanol 1G, principalmente por el gasto energético durante el pretratamiento y la

disponibilidad de las enzimas, por ello se requiere del desarrollo tecnológico de esta etapa.

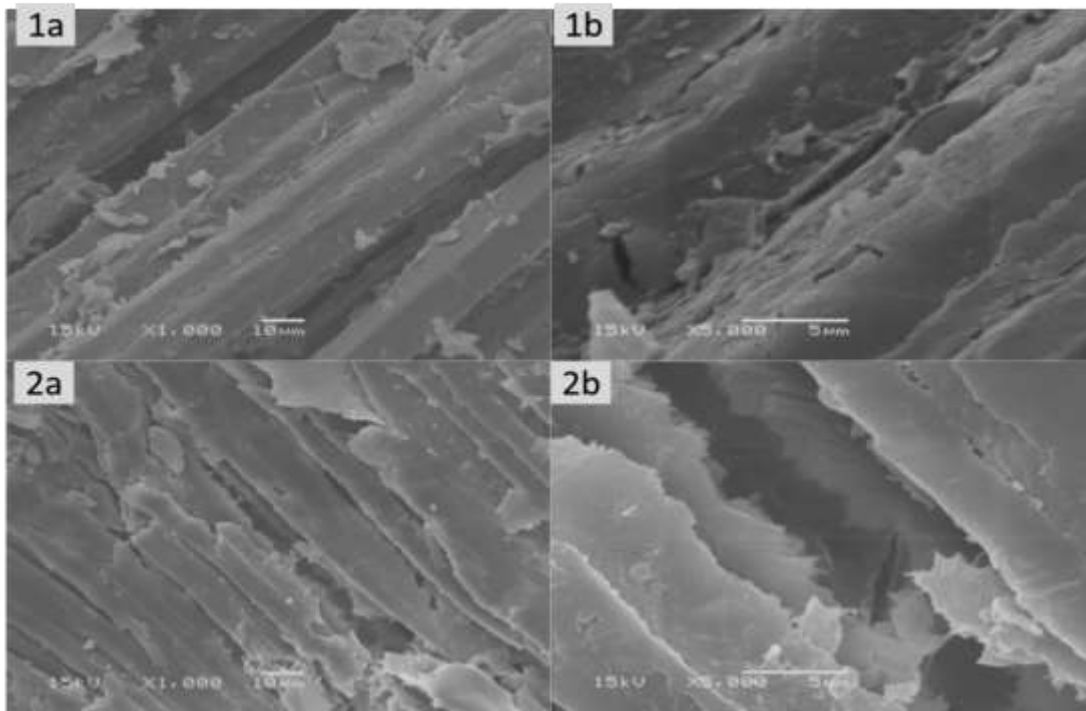


Figura 5. Microestructura observada después de la hidrólisis enzimática de bagazo normal (1) y bagazo prehidrolizado (2) presurizado a 450 MPa con NaOH 3%. (a) 1000X resolución; (b) 5000X resolución (Castañón-Rodríguez et al., 2015).

3.3. Microorganismo en la producción de bioetanol

Gran parte del éxito de la fermentación de sustratos obtenidos a partir de lignocelulósicos para producir bioetanol depende del microorganismo utilizado. Está muy documentado que el microorganismo más utilizado para producir bioetanol es *Saccharomyces cerevisiae* (Nielsen, 2019). Esto se debe principalmente a que esta levadura es capaz de utilizar diferentes sustratos, soporta altas concentraciones de bioetanol, se reproduce a una velocidad alta, soporta un rango amplio de temperaturas y puede ser reutilizada con gran facilidad. Sin embargo, no tiene la habilidad de fermentar pentosas y esta es una desventaja, ya que las pentosas son parte de los productos obtenidos de los lignocelulósicos (hemicelulosa). Para

resolver esta situación se utilizan microorganismos fermentativos que puedan utilizar eficientemente pentosas (xilosa), como algunas especies de *Pichia*. En forma similar a los pretratamientos, existe una gran cantidad de reportes tratando de resolver y explicar esta situación (Abreu-Cavalheiro & Monteiro, 2013; López-Hidalgo et al., 2021; Nielsen, 2019; Tsolcha et al., 2021). Los estudios se centran en las rutas metabólicas empleadas por los microorganismos y de esto derivan las estrategias genómicas para modificarlos mediante la interrupción de los intermediarios o bloqueando enzimas importantes, derivando el flujo de carbono hacia la producción de bioetanol. La otra ruta es modificar la genética original del microorganismo, mediante la inserción de material genéticos de otros microorganismos.

Por ejemplo, el consorcio de codificadores ligninolíticos producido por hongos blancos de la pudrición es uno de los sistemas oxidativos más eficientes que se encuentran en la naturaleza, con muchas aplicaciones potenciales que van desde la producción de biocombustibles 2G hasta la síntesis de químicos. Estos estudios incluyen el fusionar dos oxidoreductasas de alto potencial redox (lacasa -Lac- y peroxidasa versátil -Vp-) de hongos y ser reensamblados en *Saccharomyces cerevisiae* (Gonzalez-Perez & Alcalde, 2014). Como se observa, en todas las etapas de producción se están realizando mejoras con la finalidad de que el proceso de producción de bioetanol 2G sea factible.

4. Trabajos sobre la producción de bioetanol 2G

Esta sección se refiere a los trabajos de investigación en que los autores se han involucrado para contribuir al conocimiento y aplicación de resultados experimentales para producir bioetanol a partir de materiales lignocelulósicos. En todos los trabajos han participado numerosos estudiantes de nivel licenciatura, maestría y doctorado, profesores expertos en el área, así como distintas instituciones nacionales como el CIIDIR-IPN, INIFAP y diversos campus del Tecnológico Nacional de México.

4.1. Sustratos lignocelulósicos y pretratamientos

En el Laboratorio de Bioingeniería del Instituto Tecnológico de Veracruz desde hace más de 20 años la Dra. María Guadalupe Aguilar Uscanga con su grupo de investigación se ha dedicado a la generación de conocimiento y desarrollo de tecnología para la producción de etanol de 1G y 2G. Durante los primeros años se optimizaron los procesos de producción de bioetanol 1G, lo cual incluye selección de materia prima, selección de microorganismo fermentador, escalamiento de nivel laboratorio a nivel

matraz. Posteriormente se incursionó en el estudio de producción de bioetanol 2G, a partir del 2010, se ha analizado la hidrólisis de diversos materiales lignocelulósicos que se han seleccionado por su bajo costo y/o disponibilidad: BC, BSD, rastrojo de maíz, cascarilla de cebada, olote de maíz, agave, residuo de coco, pastos, residuos maderables como aserrín, viruta y por considerarse un material que está causando un daño ambiental, el sargazo.

En olote de maíz se demostró que un tratamiento con peróxido de hidrógeno en condiciones alcalinas podría reducir los costos de producción y eventualmente escalar el proceso a nivel industrial. Las mejores condiciones que usaron son una concentración de ácido del 1.56% aplicado durante 33 min para obtener un 89.9% de rendimiento de xilosa. Por el lado de la glucosa se produjo una concentración de 62.4 g / L usando 5% de una solución alcalina de peróxido de hidrógeno en una relación sólido/líquido de 1:13.47 con un tiempo de contacto de los reactivos de 20.7 h (Domínguez-Gómez et al., 2021). Otro posible sustrato que también puede tener alto potencial como proveedor de azúcares fermentables es el bagazo de sorgo dulce (BSD). El estudio se hizo para optimizar la hidrólisis del BSD para obtener la máxima concentración de glucosa y xilosa con el mínimo de producción de compuestos tóxicos. Mediante experimentación usando un diseño factorial Box-Benken demostraron que la concentración de ácido, la concentración de peróxido de hidrógeno, el tiempo de exposición del sustrato, la relación sólido / líquido afectan a la eficiencia de la reacción. Las mejores condiciones para el pretratamiento fueron una concentración de ácido de 1.365%, un tiempo de reacción de 36 min, y una relación de sólido/líquido de 1:4.9, lo cual produjo 11.55 g / L de glucosa y 41.27 g / L de xilosa. De esta mezcla de reacción se separó la fracción sólida y se trató con una

solución peróxido alcalino al 4.5% durante 45 h y una relación volumen / peso de 16:1. Bajo estas condiciones se obtuvo una concentración final de glucosa de 65.96 g / L (Partida-Sedas et al., 2017). Continuando con el espíritu de resolver problemas, se ha estudiado también la producción de bioetanol a partir de hidrolizados enzimáticos optimizados de *Agave tequilana* Weber var (AT) bagazos azul y *Agave karwinskii* (AK). Estos resultados mostraron que estos agaves tienen posibilidad de ser material para producir bioetanol. Además, se obtuvo una concentración de entre 77.6 y 84.29% en la hidrólisis alcalina para AT y AK respectivamente y en la hidrólisis enzimática se determinó una concentración de azúcares fermentables entre 100.06 y 98.08 para AT y entre 64.03 y 60.0 para AK (Delfin-Ruíz et al., 2020). Se han dedicado más esfuerzos al BC porque es un cultivo muy arraigado en el estado de Veracruz, y es una de las materias primas con mayor disponibilidad en México. Se han realizado estudios que involucran procesamiento a alta presión para pretratar el BC (Castañón-Rodríguez et al., 2015). Se ha estudiado también la producción de bioetanol a partir de BC pretratado mediante la inmovilización de *Saccharomyces cerevisiae* ITV-01 RD. El biorreactor consistió en un reactor de lecho empacado usando medio de glucosa, a una tasa de dilución (D) de 0.11 h^{-1} , se produjeron 48 g / L de bioetanol; mientras que a una D de 0.48 h^{-1} , la productividad de bioetanol fue de 12.1 g / L h. Usando jugo de caña de azúcar diluido a 100 g / L de azúcares totales, se logró una productividad de bioetanol de 5.03 g / L · h (Godoy-Salinas et al., 2021). La selección e implementación de un material se basa en el contenido de celulosa/lignina, la disponibilidad, y el costo de hidrólisis. Como se ha mencionado, la celulosa es el polímero objetivo en el bioetanol 2G, por ello se deben de buscar materiales con alto contenido celulósico y bajo contenido de lignina. Algunos de materiales que cumplen estos

requisitos son el BCA, BSD, y rastrojo de maíz. Se continúan haciendo estudios que involucran la optimización del proceso de hidrólisis con la finalidad de disminuir los costos económicos y energéticos.

4.2. Microorganismos productores de celulasas

Otro de los retos en la obtención de glucosa de residuos lignocelulósicos es la hidrólisis enzimática, debido a que las enzimas empleadas en la hidrólisis de la celulosa son de costo elevado, es por ello que también se ha investigado en la producción enzimas del tipo celulasas y xilanasas para resolver o contribuir con este reto. Por ejemplo, una línea de investigación se ha centrado en la optimización de la producción de enzimas y en la hidrólisis enzimática de biomasa lignocelulósica utilizando celulasas nativas producidas por distintos hongos autóctonos como *Aspergillus niger* ITV02 (Infanzón-Rodríguez et al., 2020b), *A. tamarii*, *Fusarium verticillioides* ITV03 en fermentación en estado líquido. Probando diferentes microorganismos productores de celulasas, se estudió la producción y caracterización de un extracto enzimático con actividad celulasa producido por una cepa autóctona de *F. verticillioides* ITV03 utilizando BSD. Después de la optimización, se logró una actividad endoglucanasa de 0.27 U / mL; posteriormente, se evaluaron tres fuentes de carbono (carboximetilcelulosa, celulosa de BSD y bagazo de sorgo dulce deslignificado (BSDD)). Los resultados mostraron que BSDD produjo las mayores actividades de endoglucanasa (0.28 U / mL) y β -glucosidasa (0.12 U / mL). Estas enzimas se mantuvieron estables a 50 °C durante 150.6 h y 8.5 h, con una energía de activación de 265.5 kJ / mol y 44.4 kJ / mol para β -glucosidasa y endoglucanasa, respectivamente. Se demostró que *F. verticillioides* ITV03 tiene un gran potencial como productor de celulasa para la hidrólisis

de residuos lignocelulósicos usando DSSB suplementado con nitrógeno (Infanzón-Rodríguez et al., 2020a). Recientemente, el grupo encamina sus esfuerzos para producir microorganismos genéticamente modificados con la finalidad de reducir los costos de producción, porque como se ha explicado, las enzimas celulolíticas comerciales son muy caras. Por lo tanto, modificar un microorganismo que no solo fermente las hexosas y pentosas, sino que también produzca las enzimas necesarias en un solo reactor, sería el objetivo ideal. Los estudios abarcan desde hacer un aislamiento y caracterización de microorganismos por ejemplo de suelos de zonas cañeras y dilucidar sus genomas (Gutiérrez-Lucas et al., 2014; Montor-Antonio et al., 2015).

4.3. Microorganismos productores de bioetanol

Unos de los primeros trabajos que se reportó fue el de seleccionar levaduras con alta productividad de bioetanol. Esto se logró mediante las visitas a las destilerías mexicanas, para aislar y seleccionar cepas superiores para fermentaciones industriales. Como resultado se tiene una colección de levaduras que soportan alta concentración de glucosa y de bioetanol, además estas cepas mostraron la actividad “killer”. Las toxinas “killer” son proteínas antifúngicas extracelulares que son producidas por una amplia variedad de hongos, incluidas las levaduras *Saccharomyces* (Fredericks et al., 2021). Estas cepas se aislaron de jugos de uva, jugo y melazas de caña de azúcar y en medio con melazas produjeron 0.46 g de bioetanol / g de sustrato (Ortiz-Zamora et al., 2009). Siguiendo con la búsqueda de microorganismos, se aisló una cepa de levadura de melazas de azúcar de caña que se designó como *Saccharomyces cerevisiae* ITV-01. Esta levadura es osmotolerante y soporta concentraciones desde 70 a 291 g / L de sustrato, con una producción final

promedio de 85 g / L cuando se suplementó con nutrientes como extracto de levadura, urea, y amonio (Fernández-López et al., 2012). El grupo de investigadores también hizo estudios sobre microorganismos que fueran capaces de utilizar pentosas. El tema es importante ya que durante la hidrólisis de los lignocelulósicos se producen pentosas que forman la hemicelulosa. Por lo tanto, se requieren microorganismos que conviertan eficientemente mezclas de glucosa y xilosa principalmente. Probaron la cepa *Pichia stipitis* NRRL Y-7124 que mostró una buena capacidad fermentativa en la mezcla de glucosa y xilosa. Esta cepa crecida en un co-cultivo con *S. cerevisiae* ITV-01 bajó su rendimiento no obstante sí consumieron la mezcla de glucosa y xilosa (Gutiérrez-Rivera et al., 2012). Se han desarrollado procesos a nivel fermentador y actualmente el proceso de producción de bioetanol 1G se encuentra escalado a nivel piloto, mostrando eficiencia de transformación del 95% con *S. cerevisiae* ITV-01. También se han desarrollado procesos de destilación y purificación de bioetanol.

Por la parte de biología molecular el grupo está en la etapa de generar microorganismos que posean habilidades que originalmente no tienen. ¿Qué es lo deseable en un microorganismo para que pueda considerarse industrialmente atractivo? Si hablamos de lignocelulósicos entonces debe metabolizar hexosas y pentosas en forma polimérica, por lo cual debe producir enzimas celulasas y xilanasas para degradar celulosa y hemicelulosa. Además, debe tolerar altas concentraciones de sustrato, preferentemente que sea un osmotolerante, con concentraciones de sustrato mayores de 200 g / L. La osmotolerancia le confiere la propiedad de que consecuentemente pueda soportar altas concentraciones de bioetanol. Sería por demás extraordinario que soportara un rango amplio de pH y temperatura lo cual es deseable en países calurosos como México

y más específicamente en la región de la Cuenca del Papaloapan en donde la disponibilidad de caña está asegurada. En la actualidad se cuenta con un proyecto para generar cepas fermentativas recombinantes con capacidad de hidrolizar sustratos complejos con potencial energético. La Fig. 6 muestra la estrategia que se puede seguir para producir microorganismos recombinantes. Para ello, esta propuesta plantea construir dos clases de cepas fermentativas, una con enzimas con actividad amilasa: α -amilasa y α -glucosidasa, y otra con actividad xilanasas y

celulasa: xilanasas, β -glucosidasa, exo y endoglucanasa, con el objetivo de disminuir etapas del proceso de producción y los costos de operación en la producción de etanol 2G. Así mismo, realizar un balance energético y económico para determinar la viabilidad del proceso. De esta manera se está empleando el conocimiento básico de biología molecular, enzimología y expresión de proteínas en la generación de biocombustibles de alta demanda en conjunto con balances energéticos y económicos.

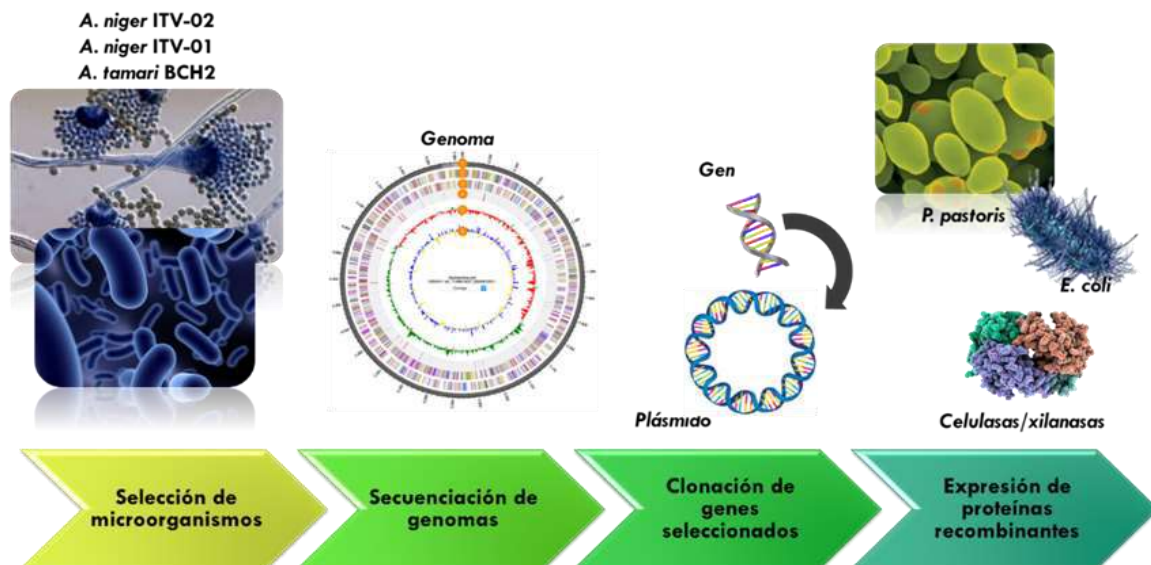


Figura 6. Estrategia para producir microorganismos recombinantes para la producción de bioetanol utilizando sustratos complejos en fermentación y sacarificación simultánea.

4.2. Producción de bioetanol en planta piloto

Como resultado de los estudios anteriores y muchos más, el grupo de investigadores logró exitosamente tener el financiamiento para la construcción de una planta piloto (PP) para producir bioetanol 1G. El 3 de septiembre del 2015 en el Instituto Tecnológico de Veracruz, la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA), en coordinación con el Instituto Nacional de Investigaciones

Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), el Instituto Tecnológico de Veracruz (ITVER) y el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) inauguraron la primera PP en México para la producción de bioetanol de sorgo dulce. Detalles del proceso es reportado por Gómez-Aguilar y colaboradores (2019). Esta planta fue concebida dentro del marco del proyecto 173411 financiado por SAGARPA-CONACYT titulado “Mejoramiento genético de sorgo dulce para generar variedades con

alto rendimiento agronómico y alto contenido de azúcares para la obtención de bioetanol” bajo la responsabilidad del Dr. Noé Montes García del INIFAP y de la Dra. Ma. Guadalupe Aguilar Uscanga del ITVER (Aguilar-Uscanga & Montes-García, 2017;

Gómez-Aguilar et al., 2019). La Fig. 7 muestra el exterior e interior de la PP. El interior se puede visualizar en video en el link de la internet <https://www.youtube.com/watch?v=9SwP9juYcfI>.



Figura 7. Planta piloto de Bioetanol del Instituto Tecnológico de Veracruz. (a) fachada principal, (b) molienda de caña de azúcar, (c) sistema de evaporación y destilación.

La PP tiene capacidad de procesar diversos materiales lignocelulósicos provenientes de variados residuos agrícolas como BC, BSD, rastrojo de maíz, olote, bagazo de cáscara de piña, cascara de café, residuos de agave, cascara de coco, entre otros. Esta versatilidad es una ventaja porque la PP se puede instalar en cualquier lugar de la República dependiendo de la disponibilidad de las materias primas. En el desarrollo de este artículo se puede establecer que el proceso de segunda generación es una opción viable, ya que puede aprovecharse el 100% de la materia prima alcanzando rendimientos finales del 0.46% (g / g) lo que puede generar bioetanol de calidad para usarse como combustible para motores de combustión interna o aditivos para las gasolinas.

Por otra parte, en el país existe la producción suficiente de bagazo de caña que tiene un gran potencial de producción de miles de millones de litros de bioetanol, ya que teóricamente por una tonelada de bagazo de caña se pueden producir desde 200 hasta 300 litros de bioetanol a una pureza de 96.5 y

99.6%. Desde la inauguración de la PP para la producción de bioetanol se han escalado procesos de pretratamiento e hidrólisis enzimática de BC, bagazo de sorgo, se han empleado enzimas comerciales (Cellic Ctec3 y Cellic Htec3, empresa Novozyme) y enzimas obtenidas de hongos autóctonos (*A. niger* ITV02, *F. verticilloides* ITV03) de las cepas de colección del Laboratorio de Bioingeniería del Instituto Tecnológico de Veracruz. Así mismo, para la fermentación se emplea *S. cerevisiae* ITV-01 aislada de la melaza de caña de azúcar por el grupo de investigación (Ortiz-Zamora et al., 2009). La PP está en una etapa de espera de inversionistas que aporten los recursos para hacer escalamiento a nivel comercial. Otros trabajos de investigación incluyen la producción de bioetanol 1G, utilizando almidones que no comprometen la alimentación de la población.

Conclusión

Los materiales lignocelulósicos como se ha reportado desde hace décadas pueden transformarse en azúcares fermentables. Los

problemas técnicos que aquejan a este proceso se han ido resolviendo paulatinamente. Queda mucho por resolver en cuanto a reducción del consumo de energía y reducción de costos de producción. Para esto, la biología molecular está teniendo progresos en producir microorganismos recombinantes que puedan realizar el proceso en una sola etapa con aplicación del concepto de sacarificación y fermentación simultánea para reducir consumo de energía y reducir costos de producción.

Referencias

- Abreu-Cavalheiro, A., & Monteiro, G. (2013). Solving ethanol production problems with genetically modified yeast strains. *Brazilian Journal of Microbiology*, 44(3). <https://doi.org/10.1590/S1517-83822013000300001>.
- Aburto, J., Martínez, T., & Murrieta, F. (2008). Evaluación técnico-económica de la producción de bioetanol a partir de residuos lignocelulósicos. In *Tecnol. Ciencia Ed. (IMIQ)* (Vol. 23, Issue 1). <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=48223104>.
- Aguilar-Uscanga, M. G., & Montes-García, N. (2017). Planta piloto para la producción de etanol a partir de sorgo dulce (*Sorghum bicolor* (L.) Moench). *Boletín de La Sociedad Química de México*, 11(2), 10–12. http://bsqm.org.mx/pdf-boletines/V11/V11N2/BSQM_11-2%20h%20Bioetanol.pdf.
- Ambye-Jensen, M., Balzarotti, R., Thomsen, S. T., Fonseca, C., & Kádár, Z. (2018). Combined ensiling and hydrothermal processing as efficient pretreatment of sugarcane bagasse for 2G bioethanol production. *Biotechnology for Biofuels*, 11(1). <https://doi.org/10.1186/s13068-018-1338-y>.
- Banerjee, S., Mudliar, S., Sen, R., Giri, B., Satpute, D., Chakrabarti, T., & Pandey, R. A. (2010). Commercializing lignocellulosic bioethanol: technology bottlenecks and possible remedies. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 4(1). <https://doi.org/10.1002/bbb.188>.
- Biochemtex. (2013). A new era Begins. Official Opening Ceremony of the World's 1st commercial-scale cellulosic ethanol plant: the Crescentino bio-refinery. <http://www.etipbioenergy.eu/images/crescentino-presentation.pdf>.
- Braconnot, H. (1819). Verwandlungen des Holzstoffs mittelst Schwefelsäure in Gummi, Zucker und eine eigne Säure, und mittelst Kali in Ulmin. *Annalen Der Physik Und Der Physikalischen Chemie*, 63(12). <https://doi.org/10.1002/andp.18190631202>.
- Cabrera, S. L., Aranda, E., Martínez, A., Gómez, A., & Quintero, R. (2017). Biocombustibles a partir de residuos lignocelulósicos, estudio económico del caso: bagazo de caña en México. https://smbb.mx/congresos%20smbb/puertovallarta03/TRABAJOS/AREA_XIII/CARTEL/CXIII-2.pdf.
- Castañeda-Ayarza, J. A., & Cortez, L. A. B. (2017). Final and B molasses for fuel ethanol production and some market implications. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 70. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2016.12.010>.
- Castañón-Rodríguez, J. F., Welti-Chanes, J., Palacios, A. J., Torrestiana-Sanchez, B., Ramírez de León, J. A., Velázquez, G., & Aguilar-Uscanga, M. G. (2015). Influence of high pressure processing and alkaline treatment on sugarcane bagasse hydrolysis. *CyTA - Journal of*

- Food*.
<https://doi.org/10.1080/19476337.2015.1029523>.
- Chen, H. (2015). Lignocellulose biorefinery feedstock engineering. In *Lignocellulose Biorefinery Engineering*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100135-6.00003-X>.
- Chen, H., & Fu, X. (2016). Industrial technologies for bioethanol production from lignocellulosic biomass. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 57. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2015.12.069>.
- CONACYT-SENER. (2017). Reporte de inteligencia tecnológica "Bioetanol." https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/296708/IT_Bioetanol_01022018.pdf.
- CONADESUCA. (2021). Avance de Comercio Exterior Información Preliminar al 2 de Mayo de 2021 Ciclo 2020/21. https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/635835/Avance_comercio_exterior_al_2Mayo2021.pdf.
- Deguchi, S., Tsujii, K., & Horikoshi, K. (2006). Cooking cellulose in hot and compressed water. *Chemical Communications*, 31. <https://doi.org/10.1039/b605812d>.
- del Moral, S., Barradas-Dermitz, D. M., & Aguilar-Uscanga, M. G. (2018). Production and biochemical characterization of α -glucosidase from *Aspergillus niger* ITV-01 isolated from sugar cane bagasse. *3 Biotech*, 8(1). <https://doi.org/10.1007/s13205-017-1029-6>.
- Delfin-Ruíz, M. E., Calderón-Santoyo, M., Ragazzo-Sánchez, J. A., Gómez-Rodríguez, J., & Aguilar-Uscanga, M. G. (2020). Ethanol Production from Enzymatic Hydrolysates Optimized of *Agave tequilana* Weber var. azul and *Agave karwinskii* bagasses. *BioEnergy Research*. <https://doi.org/10.1007/s12155-020-10196-7>.
- di Donato, P., Finore, I., Poli, A., Nicolaus, B., & Lama, L. (2019). The production of second generation bioethanol: The biotechnology potential of thermophilic bacteria. *Journal of Cleaner Production*, 233. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2019.06.152>.
- Domínguez-Gómez, C. X., Nochebuena-Morando, L. E., Aguilar-Uscanga, M. G., & López-Zamora, L. (2021). Statistical optimization of dilute acid and H₂O₂ alkaline pretreatment using surface response methodology and tween 80 for the enhancement of the enzymatic hydrolysis of corncob. *Biomass Conversion and Biorefinery*. <https://doi.org/10.1007/s13399-021-01591-x>.
- Duque, A., Álvarez, C., Doménech, P., Manzanares, P., & Moreno, A. D. (2021). Advanced Bioethanol production: from novel raw materials to integrated biorefineries. *Processes*, 9(2). <https://doi.org/10.3390/pr9020206>.
- Espinosa-Paz, N., Montes-García, N., Martínez-Sánchez, J., Ariza-Flores, R., & Cadena-Iñiguez, P. (2019). Contenido de azúcares en variedades de sorgo (*Sorghum bicolor* L.) para etanol en el centro de Chiapas, México. *Agro Productividad*, 12(10). <https://doi.org/10.32854/agrop.vi0.1481>.
- Fernández-López, C. L., Torrestiana-Sánchez, B., Salgado-Cervantes, M. A., García, P. G. M., & Aguilar-Uscanga, M. G. (2012). Use of sugarcane molasses "B" as an alternative for ethanol production with

- wild-type yeast *Saccharomyces cerevisiae* ITV-01 at high sugar concentrations. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 35(4). <https://doi.org/10.1007/s00449-011-0633-9>.
- Fredericks, L. R., Lee, M. D., Crabtree, A. M., Boyer, J. M., Kizer, E. A., Taggart, N. T., Roslund, C. R., Hunter, S. S., Kennedy, C. B., Willmore, C. G., Tebbe, N. M., Harris, J. S., Brocke, S. N., & Rowley, P. A. (2021). The Species-Specific Acquisition and Diversification of a K1-like Family of Killer Toxins in Budding Yeasts of the Saccharomycotina. *PLOS Genetics*, 17(2). <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1009341>.
- Gierer, J. (1997). Formation and Involvement of Superoxide (O_2^-) and Hydroxyl ($OH\cdot$) Radicals in TCF Bleaching Processes: A Review. *Holzforschung*, 51(1). <https://doi.org/10.1515/hfsg.1997.51.1.34>.
- Godoy-Salinas, A. J., Ortiz-Muñiz, B., Rodríguez, J. G., Gutiérrez-Rivera, B., & Aguilar-Uscanga, M. G. (2021). Bioethanol production by *S. cerevisiae* ITV-01 RD immobilized on pre-treated sugarcane bagasse. *Biomass Conversion and Biorefinery*. <https://doi.org/10.1007/s13399-021-01602-x>.
- Gómez-Aguilar, J., Martínez-Castellanos, G., Santiago-Cruz, S., & Aguilar-Uscanga, M. G. (2019). Proceso de producción de bioetanol de segunda generación (2G) en planta piloto, una oportunidad para mitigar la contaminación ambiental en México. *Revista Ingeniantes*, 6 No. 2 Vol. 3, 6:3(2), 22–28. <http://citt.itsm.edu.mx/ingeniantes/pdfversion/ingeniantes6no2vol3.pdf>.
- Gonzalez-Perez, D., & Alcalde, M. (2014). Assembly of evolved ligninolytic genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioengineered*, 5(4). <https://doi.org/10.4161/bioe.29167>.
- GranBio. (2020, August 4). GranBio, NextChem partner on cellulosic ethanol. *Ethanol Producer*. <http://www.ethanolproducer.com/article/s/17427/granbio-nextchem-partner-on-cellulosic-ethanol#>.
- Gutiérrez-Lucas, L. R., Montor-Antonio, J. J., Cortés-López, N. G., & del Moral, S. (2014). Strategies for the Extraction, Purification and Amplification of Metagenomic DNA from Soil Growing Sugarcane. *Advances in Biological Chemistry*, 04(04). <https://doi.org/10.4236/abc.2014.44034>.
- Gutiérrez-Rivera, B., Waliszewski-Kubiak, K., Carvajal-Zarrabal, O., & Aguilar-Uscanga, M. G. (2012). Conversion efficiency of glucose/xylose mixtures for ethanol production using *Saccharomyces cerevisiae* ITV01 and *Pichia stipitis* NRRL Y-7124. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 87(2). <https://doi.org/10.1002/jctb.2709>.
- Haq, I. ul, Qaisar, K., Nawaz, A., Akram, F., Mukhtar, H., Zohu, X., Xu, Y., Mumtaz, M. W., Rashid, U., Ghani, W. A. W. A. K., & Choong, T. S. Y. (2021). Advances in Valorization of Lignocellulosic Biomass towards Energy Generation. *Catalysts*, 11(3). <https://doi.org/10.3390/catal11030309>.
- Hashemi, B., Sarker, S., Lamb, J. J., & Lien, K. M. (2021). Yield improvements in anaerobic digestion of lignocellulosic feedstocks. *Journal of Cleaner Production*, 288. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2020.125447>.

- Hernández-Beltrán, J. U., Hernández-De Lira, I. O., Cruz-Santos, M. M., Saucedo-Luevanos, A., Hernández-Terán, F., & Balagurusamy, N. (2019). Insight into Pretreatment Methods of Lignocellulosic Biomass to Increase Biogas Yield: Current State, Challenges, and Opportunities. *Applied Sciences*, 9(18). <https://doi.org/10.3390/app9183721>.
- Himmel, M. E., Ding, S.-Y., Johnson, D. K., Adney, W. S., Nimlos, M. R., Brady, J. W., & Foust, T. D. (2007). Biomass Recalcitrance: Engineering Plants and Enzymes for Biofuels Production. *Science*, 315(5813), 804–807. <https://doi.org/10.1126/science.1137016>.
- Holtzapfel, M. T. (2003). Cellulose. In *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B0-12-227055-X/00185-1>.
- Infanzón-Rodríguez, I., Ragazzo-Sánchez, J. A., del Moral, S., Calderón-Santoyo, M., & Aguilar-Uscanga, M. G. (2020a). Production and characterization of an enzyme extract with cellulase activity produced by an indigenous strain of *Fusarium verticillioides* ITV03 using sweet sorghum bagasse. *Biotechnology Letters*, 42(11), 2271–2283. <https://doi.org/10.1007/s10529-020-02940-y>.
- Infanzón-Rodríguez, M. I., Ragazzo-Sánchez, J. A., del Moral, S., Calderón-Santoyo, M., Gutiérrez-Rivera, B., & Aguilar-Uscanga, M. G. (2020b). Optimization of Cellulase Production by *Aspergillus niger* ITV 02 from Sweet Sorghum Bagasse in Submerged Culture Using a Box–Behnken Design. *Sugar Tech*, 22(2), 266–273. <https://doi.org/10.1007/s12355-019-00765-2>.
- Institute of Medicine. (2014). The Nexus of Biofuels, Climate Change, and Human Health: Workshop Summary (R. Pool, Ed.). National Academies Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.17226/18493>.
- Kramer, D. (2022). Whatever happened to cellulosic ethanol? *Physics Today*, 75(7), 22–24. <https://doi.org/10.1063/PT.3.5036>
- Kumar, P., Barrett, D. M., Delwiche, M. J., & Stroeve, P. (2009). Methods for Pretreatment of Lignocellulosic Biomass for Efficient Hydrolysis and Biofuel Production. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 48(8). <https://doi.org/10.1021/ie801542g>.
- Kyle, G. (2019, November 24). Poet-DSM pausing production of cellulosic ethanol at Project Liberty, shifting to R&D; blames EPA. Green Car Congress. <https://www.greencarcongress.com/2019/11/20191124-poetdsm.html>.
- Lamichhane, G., Acharya, A., Poudel, D. K., Aryal, B., Gyawali, N., Niraula, P., Phuyal, S. R., Budhathoki, P., Bk, G., & Parajuli, N. (2021). Recent advances in bioethanol production from Lignocellulosic biomass. *International Journal of Green Energy*, 18(7) <https://doi.org/10.1080/15435075.2021.1880910>.
- Lennartsson, P. R., Erlandsson, P., & Taherzadeh, M. J. (2014). Integration of the first and second generation bioethanol processes and the importance of by-products. *Bioresource Technology*, 165, 3–8. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.01.127>
- Ling, Z., Chen, S., Zhang, X., Takabe, K., & Xu, F. (2017). Unraveling variations of crystalline cellulose induced by ionic

- liquid and their effects on enzymatic hydrolysis. *Scientific Reports*, 7(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-017-09885-9>.
- Lopez-Hidalgo, A. M., Magaña, G., Rodriguez, F., de Leon-Rodriguez, A., & Sanchez, A. (2021). Co-production of ethanol-hydrogen by genetically engineered *Escherichia coli* in sustainable biorefineries for lignocellulosic ethanol production. *Chemical Engineering Journal*, 406. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2020.126829>.
- Lynd, L. R., Wyman, C. E., & Gerngross, T. U. (1999). Biocommodity Engineering. *Biotechnology Progress*, 15(5), 777–793. <https://doi.org/10.1021/bp990109e>.
- Mekala, N. K., Potumarthi, R., Baadhe, R. R., & Gupta, V. K. (2014). Current Bioenergy Researches. In *Bioenergy Research: Advances and Applications*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-59561-4.00001-2>.
- Montor-Antonio, J. J., Sachman-Ruiz, B., Lozano, L., & del Moral, S. (2015). Draft Genome Sequence of *Bacillus amyloliquefaciens* JJC33M, Isolated from Sugarcane Soils in the Papaloapan Region, Mexico. *Genome Announcements*, 3(1). <https://doi.org/10.1128/genomeA.01519-14>.
- Morales-Vera, R., Vásquez-Ibarra, L., Scott, F., Puettmann, M., & Gustafson, R. (2022). Life Cycle Assessment of Bioethanol Production: A Case Study from Poplar Biomass Growth in the U.S. Pacific Northwest. *Fermentation*, 8(12), 734. <https://doi.org/10.3390/fermentation8120734>.
- Nielsen, J. (2019). Yeast Systems Biology: Model Organism and Cell Factory. *Biotechnology Journal*, 14(9). <https://doi.org/10.1002/biot.201800421>.
- Ning, P., Yang, G., Hu, L., Sun, J., Shi, L., Zhou, Y., Wang, Z., & Yang, J. (2021). Recent advances in the valorization of plant biomass. *Biotechnology for Biofuels*, 14(1). <https://doi.org/10.1186/s13068-021-01949-3>.
- OECD-FAO (2021). Agricultural Outlook. (2021-2030). <https://doi.org/10.1787/19428846-en>.
- Ortiz-Zamora, O., Cortés-García, R., Ramirez-Lepe, M., Gómez-Rodríguez, J., & Aguilar-Uscanga, M. G. (2009). Isolation and Selection of Ethanol-Resistant and Osmotolerant Yeasts from Regional Agricultural Sources in Mexico. *Journal of Food Process Engineering*, 32(5). <https://doi.org/10.1111/j.1745-4530.2008.00244.x>.
- Osuna-Laveaga, D. R., García-Depraect, O., Vallejo-Rodríguez, R., López-López, A., & León-Becerril, E. (2020). Integrated Ozonation-Enzymatic Hydrolysis Pretreatment of Sugarcane Bagasse: Enhancement of Sugars Released to Expended Ozone Ratio. *Processes*, 8(10). <https://doi.org/10.3390/pr8101274>.
- Partida-Sedas, G., Montes-García, N., Carvajal-Zarrabal, O., López-Zamora, L., Gómez-Rodríguez, J., & Aguilar-Uscanga, M. G. (2017). Optimization of Hydrolysis Process to Obtain Fermentable Sugars from Sweet Sorghum Bagasse Using a Box-Behnken Design. *Sugar Tech*, 19(3). <https://doi.org/10.1007/s12355-016-0461-y>.
- Pažitný, A., Russ, A., Boháček, Š., Šutý, Š., & Ihnát, V. (2020). Perspective

- pretreatment method of beech and poplar wood and wheat straw in 2G biofuel production processing. *Nova Biotechnologica et Chimica*, 19(1). <https://doi.org/10.36547/nbc.v19i1.581>.
- Pietrangeli, B., & Lauri, R. (2021). Occupational health issue in a 2G bioethanol production plant. In *Bioethanol*. *IntechOpen*. <https://doi.org/10.5772/intechopen.94485>.
- Polman, E. M. N., Gruter, G.-J. M., Parsons, J. R., & Tietema, A. (2021). Comparison of the aerobic biodegradation of biopolymers and the corresponding bioplastics: A review. *Science of the Total Environment*, 753. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.141953>.
- Potůček, F., & Milichovský, M. (2000). Kraft Pulp Bleaching with Hydrogen Peroxide and Peracetic Acid. *Chemical papers*, 546(406).
- Robak, K., & Balcerek, M. (2018). Review of Second-Generation Bioethanol Production from Residual Biomass. *Food Technology and Biotechnology*, 56(2). <https://doi.org/10.17113/ftb.56.02.18.5428>.
- Sánchez-Banda, F. (2017, February 8). Bioetanol el combustible alternativo para México. *Cienciamex Noticias*. <http://www.cienciamx.com/index.php/tecnologia/energia/12825-bioetanol-el-combustible-alternativo-para-mexico>.
- Scarcella, A. S. de A., Pasin, T. M., de Oliveira, T. B., de Lucas, R. C., Ferreira-Nozawa, M. S., Freitas, E. N. de, Vici, A. C., Buckeridge, M. S., Michelin, M., & Polizeli, M. de L. T. de M. (2021). Saccharification of different sugarcane bagasse varieties by enzymatic cocktails produced by *Mycothermus thermophilus* and *Trichoderma reesei* RP698 cultures in agro-industrial residues. *Energy*, 226. <https://doi.org/10.1016/j.energy.2021.120360>.
- RFA. (2020). Annual World Fuel Ethanol Production. <https://ethanolrfa.org/statistics/annual-ethanol-production/>.
- Sherrard, E. C., & Kressman, F. W. (1945). Review of Processes in the United States Prior to World War II. *Industrial & Engineering Chemistry*, 37(1). <https://doi.org/10.1021/ie50421a003>.
- Solomon, B. D., Barnes, J. R., & Halvorsen, K. E. (2007). Grain and cellulosic ethanol: History, economics, and energy policy. *Biomass and Bioenergy*, 31(6). <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2007.01.023>.
- Tsolcha, O. N., Patrinoú, V., Economou, C. N., Dourou, M., Aggelis, G., & Tekerlekopoulou, A. G. (2021). Utilization of Biomass Derived from Cyanobacteria-Based Agro-Industrial Wastewater Treatment and Raisin Residue Extract for Bioethanol Production. *Water*, 13(4). <https://doi.org/10.3390/w13040486>.
- Vargas-Radillo, J. J., Salazar-Ríos, E., Barrientos-Ramírez, L., Pérez-Centeno, A., Rentería-Urquiza, M., Rodríguez-Rivas, A., Navarro-Arzate, F., & Rutiaga-Quiñones, J. (2016). Pasta blanqueada y azúcares fermentables a partir de médula de bagazo de caña. *Madera y Bosques*, 21(2). <https://doi.org/10.21829/myb.2015.212449>.
- Vasić, K., Knez, Ž., & Leitgeb, M. (2021). Bioethanol Production by Enzymatic Hydrolysis from Different Lignocellulosic Sources. *Molecules*,

26(3).
<https://doi.org/10.3390/molecules26030753>.

Zhang, Jiajun, & Zhang, X. (2019). The thermochemical conversion of biomass into biofuels. In *Biomass, Biopolymer-Based Materials, and Bioenergy*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-102426-3.00015-1>.

Zhang, Jinxu, Zou, D., Singh, S., & Cheng, G. (2021). Recent developments in ionic liquid pretreatment of lignocellulosic biomass for enhanced bioconversion. *Sustainable Energy & Fuels*, 5(6). <https://doi.org/10.1039/D0SE01802C>.