



**Universidad Autónoma de Sinaloa**  
**Facultad de Ciencias Químico Biológicas**  
**Programa de Posgrado Integral en Biotecnología**  
**Doctorado en Ciencia en Biotecnología Ambiental**

**Evaluación del efecto de Zinc y Calcio sobre la  
producción de etanol y la acumulación de  
proteínas a partir de xilosa por *Mucor* spp.**

# **T E S I S**

Que presenta:

**M.C. Héctor Manuel Fonseca Peralta**

Para obtener el grado de

**Doctor en Ciencias en Ciencias en Biotecnología Ambiental**

Director(es) de Tesis

**Dr. Ignacio Contreras Andrade**

**Dra. Karen Virginia Pineda Hidalgo**

Culiacán, Sinaloa, México

Noviembre, 2022



Dirección General de Bibliotecas  
Ciudad Universitaria  
Av. de las Américas y Blvd. Universitarios  
C. P. 80010 Culiacán, Sinaloa, México.  
Tel. (667) 713 78 32 y 712 50 57  
dgbuas@uas.edu.mx

## UAS-Dirección General de Bibliotecas

### Repositorio Institucional Buelna

#### Restricciones de uso

Todo el material contenido en la presente tesis está protegido por la Ley Federal de Derechos de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

Queda prohibido la reproducción parcial o total de esta tesis. El uso de imágenes, tablas, gráficas, texto y demás material que sea objeto de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente correctamente mencionando al o los autores del presente estudio empírico. Cualquier uso distinto, como el lucro, reproducción, edición o modificación sin autorización expresa de quienes gozan de la propiedad intelectual, será perseguido y sancionado por el Instituto Nacional de Derechos de Autor.

Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons Atribución-No Comercial  
Compartir Igual, 4.0 Internacional



## **Presentación**

El proyecto de tesis “*Evaluación del efecto de Zinc y Calcio sobre la producción de etanol y la acumulación de proteínas a partir de xilosa por Mucor spp.*” se realizó en las instalaciones de la Facultad de Ciencias Químico Biológicas dentro de los laboratorios de biocombustibles y catálisis heterogénea n.22 y, de Bioquímica y Biología Molecular bajo la dirección del Dr. Ignacio Contreras Andrade (UAS) y de la Dra. Karen Virginia Pineda Hidalgo (UAS). Así como en el Departamento de Biotecnología Agrícola del Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional (CIIDIR) Unidad Sinaloa del Instituto Politécnico Nacional (IPN), bajo la asesoría externa de la Dra. Claudia Castro Martínez (IPN).

El Estudiante Hector Manuel Fonseca Peralta fue apoyado con una beca para Estudios de Doctorado en el Programa Regional de Posgrado en Biotecnología de la Universidad Autónoma de Sinaloa por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT).

## **AGRADECIMIENTOS**

A las personas más importante en mi vida, mis padres Clara y Hector. Por su amor incondicional, sus enseñanzas y motivación a superarme día a día.

A mis hermanas Andrea y Briseida por su apoyo durante estos cuatro años, sus consejos y complicidad. Mis sobrinos Karla y Arturo por motivarme a hacer algo bueno por el mundo. Y mis cuñados Iván y Randy por su apoyo en diferentes circunstancias. Gracias por ser mi familia.

A mi director de tesis, Dr. Ignacio Contreras Andrade por creer, aceptar y apoyar mis ideas que se han convertido en este gran proyecto tesis. Por su verdadera amistad en estos últimos 7 años y por estar acompañándome durante mi crecimiento como profesional desde maestría hasta doctorado en el laboratorio de biocombustibles, mi segunda casa.

A mi directora de Tesis Dra. Karen Virginia Pineda Hidalgo. Primero por arriesgarse a aceptarme como su estudiante de doctorado y tomar la responsabilidad ante la coordinación del posgrado para graduarme en tiempo y forma. Por estar hombro a hombro para cada duda durante estos 4 años. Se agradece cada segundo que me prestó para asesorías, revisiones o solo para convivir. Y principalmente por su gran humanidad, empatía y amistad, realmente esas actitudes me inspiran mucho al tipo de investigador que quiero llegar a ser.

Si los Ángeles existen, uno muy grande cuida mi espalda. A la Dra. Claudia Castro Martínez, no me alcanza la vida para agradecerle todas las atenciones que me ha brindado. Por su amistad y por hacer muy acogedora mis estancias en Guasave. La calidad de investigador y la calidad humana que tiene es algo que admiro mucho de usted y se lo agradezco.

A la Dra. Bianca Anabel Amézquita López, por su acompañamiento en estos 7 años de posgrado, sus consejos, asesorías y amistad. Por apoyarnos con los estudiantes de licenciatura a culminar sus tesis y estar siempre al pie del cañón para nuevos retos.

Amistades genuinas la de la futura Maestra en Ciencias Denisse Aylin

Norzagaray Quevedo. Gracias por tu compañerismo en el laboratorio, por tu apoyo, por las aventuras, tus ocurrencias, por creer en mí, tus consejos y sobre todo por la confianza y paciencia para escucharme siempre.

A mis compañeros y amigos del Laboratorio de Biocombustibles n. 22, algunos estudiantes de tesis de licenciatura, por darme la oportunidad y creer en mi potencial para ayudarlos a desarrollar sus proyectos.

A mis compañeros del Laboratorio de Bioenergéticos del CIIDIR, gracias por hacer tan acogedora y calida mis estancias fuera de casa, ustedes hicieron que le tomara amor a Guasave.

A mis compañeros del Laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular de la FCQB. Gracias por apoyarme e incluirme rápidamente como familia.

A mi mejor amigo y compadre Pablo, Mil Gracias por tus ánimos, apoyo, confianza y consejo.

A mis amigos Edgar y Yuri, por adoptarme en cada mudanza entre Guasave y Culiacán, e incluirme como familia. Les prometo que ya seré más estable o eso espero.

A Maricarmen, por su apoyo en los momentos más difíciles en estos 4 años de posgrado. Realmente valoro mucho tu amistad.

A mis amigos de la ingeniería Arely, Jocelyn, Jay y Lizeth, gracias por tantos años de amistad, por ayudarme a distraerme cada que el doctorado presionaba demasiado.

Al Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional, Unidad Sinaloa, del Instituto Politécnico Nacional. Por abrirme las puertas de sus laboratorios, apoyarme en la realización de este proyecto y enseñarme lo que significa hacer investigación de calidad.

Finalmente a la Facultad de Ciencias Químico Biológicas de la Universidad Autónoma de Sinaloa. Por ser mi segunda casa y por proveer espacios para realizar investigación.

## ÍNDICE GENERAL

|  | Pág. |
|--|------|
| ÍNDICE DE FIGURAS  | xi   |
| ÍNDICE DE CUADROS  | xv   |
| I RESUMEN  | 1    |
| II INTRODUCCIÓN  | 2    |
| III REVISIÓN DE LITERATURA   | 5    |
| A. BIOETANOL   | 5    |
| 1. Producción global   | 5    |
| 2. Clasificación del bioetanol                                     | 6    |
| B. BIOMASA LIGNOCELULOSICA   | B    |
| 1. Celulosa  | 14   |
| 2. Hemicelulosa  | 14   |
| 3. Lignina   | 14   |
| C. FERMENTACIÓN ALCOHÓLICA   | 15   |
| 1. Transporte celular de azúcares                                  | 16   |
| 2. Glucólisis  | 18   |
| 3. Isomerización de xilosa y ruta de pentosas                      | 19   |
| D. <i>Mucor</i> sp.  | 21   |
| 1. Taxonomía   | 21   |
| 2. Crecimiento y morfología  | 23   |
| 3. Características del género                                      | 23   |
| 4. Producción de etanol con <i>Mucor</i> sp.                       | 25   |
| E. ESTRATEGIAS PARA OPTIMIZAR LA PRODUCCIÓN DE ETANOL              | 26   |
| 1. Optimización por modelos cinéticos, estadísticos y metabólicos. | 26   |
| 2. Optimización de la ruta metabólica                              | 30   |
| 3. Tecnologías “-ómicas”   | 32   |

|             |   |    |
|-------------|---|----|
| <b>IV</b>   | <b>JUSTIFICACIÓN</b>  | 41 |
| <b>V</b>    | <b>HIPÓTESIS</b>  | 42 |
| <b>VI</b>   | <b>OBJETIVOS</b>  | 43 |
|             | A. OBJETIVO GENERAL   | 43 |
|             | B. OBJETIVOS ESPECÍFICOS  | 43 |
| <b>VII</b>  | <b>MATERIALES Y METODOS</b>   | 44 |
|             | A. MATERIALES   | 44 |
|             | 1. Material biológico   | 44 |
|             | 2. Hidrolizado de olote   | 44 |
|             | B. MÉTODOS  | 44 |
|             | 1. Identificación molecular de <i>Mucor</i> sp.                                     | 44 |
|             | 2. Fermentación en diferentes fuentes de carbono                                    | 46 |
|             | 3. Evaluación del Zinc y Calcio en la producción de etanol                          | 48 |
|             | 4. Optimización de ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O y CaCl <sub>2</sub> por MSR | 51 |
|             | 5. Fermentación por <i>Mucor</i> sp. (C1502) en HAOM                                | 53 |
|             | 6. Acumulación de Proteínas   | 56 |
| <b>VIII</b> | <b>RESULTADOS Y DISCUSIONES</b>   | 58 |
|             | A. IDENTIFICACIÓN MOLECULAR   | 58 |
|             | B. FERMENTACIÓN EN DIFERENTES FUENTES DE CARBONO                                    | 66 |
|             | 1. Fermentación de glucosa, xilosa y glucosa: xilosa                                | 66 |
|             | 2. Identificación de nutrientes limitantes  | 68 |
|             | 3. Estandarización de medio de cultivo  | 70 |
|             | C. EFECTO DEL ZINC Y CALCIO EN LA FERMENTACIÓN DE GLUCOSA Y XILOSA                  | 70 |
|             | 1. Preliminar en glucosa  | 70 |
|             | 2. Preliminar en Glucosa: Xilosa  | 76 |
|             | 3. Preliminar en Xilosa   | 78 |
|             | D. OPTIMIZACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE ETANOL  | 80 |
|             | 4. Análisis de varianza (ANOVA) de los modelos                                      | 80 |

|           |   |     |
|-----------|---|-----|
|           | 5. Comprobación experimental  | 87  |
|           | E. FERMENTACIÓN EN HIDROLIZADO ÁCIDO DE OLOTE DE MAÍZ (HAOM)                | 90  |
|           | 1. Efecto del Zn-Ca en el crecimiento                                       | 91  |
|           | 2. Efecto del Zn-Ca en la producción de etanol                              | 94  |
|           | 3. Consumo de xilosa (qs)   | 96  |
|           | 4. Productividad específica de Luedeking-Piret                              | 99  |
|           | 5. Efecto del Zn-Ca en la asimilación de xilitol, glicerol y ácido acético. | 102 |
|           | 6. Balance de masa  | 107 |
|           | F. ACUMULACIÓN DE PROTEÍNAS   | 111 |
| <b>IX</b> | <b>CONCLUSIONES</b>   | 115 |
| <b>X</b>  | <b>BIBLIOGRAFIA</b>   | 117 |
| <b>XI</b> | <b>ANEXOS</b>   | 131 |



## ÍNDICE DE FIGURAS

| Figura |  | Pág. |
|--------|--|------|
| 1      | Sistemas de producción de bioetanol 2G.  | 8    |
| 2      | Composición lignocelulósica de un cultivo energético.  | 13   |
| 3      | Mecanismos de transporte transmembranal de glucosa, xilosa y arabinosa en microorganismos.   | 17   |
| 4      | Isomerización de D-Xilosa a través de la ruta XI y XR-XDH                                    | 20   |
| 5      | Dimorfismo en <i>Mucor</i> spp.  | 24   |
| 6      | Región ribosomal ITS   | 35   |
| 7      | Electroforesis de ITS 1 y 2 de <i>M.circinelloides</i>                                       | 59   |
| 8      | Electroferograma parcial de ITS1 en <i>Mucor circinelloides</i> C1502.                       | 60   |
| 9      | Electroforegrama parcial de ITS4 en <i>Mucor circinelloides</i> C1502                        | 61   |
| 10     | Amplicón completo por iniciador ITS1 en <i>Mucor circinelloides</i> C1502.                   | 62   |
| 11     | Amplicón completo por iniciador ITS4 en <i>Mucor circinelloides</i> C1502.                   | 63   |
| 12     | Secuencia consenso <i>Mucor circinelloides</i> C1502 ITS1, 5.8S rARN e ITS2.                 | 64   |
| 13     | Secuencia ITS1, 5.8S rARN e ITS2 de <i>Mucor circinelloides</i> C1502 depositada en Genbank. | 65   |

|    |   |    |
|----|---|----|
| 14 | Consumo de diferentes azúcares por <i>M. circinelloides</i>   | 67 |
| 15 | Prueba de pulsos en xilosa por <i>M. circinelloides</i>   | 69 |
| 16 | Evaluación del consumo de xilosa por <i>M. circinelloides</i> por efecto del extracto de levadura   | 71 |
| 17 | Fermentación alcohólica de glucosa por <i>M. circinelloides</i>   | 72 |
| 18 | Morfología de <i>M. circinelloides</i> durante la fermentación de glucosa en matraces agitados  | 75 |
| 19 | Fermentación alcohólica de mezcla de glucosa: xilosa (2:1) por <i>M. circinelloides</i>   | 77 |
| 20 | Fermentación alcohólica en xilosa por <i>M. circinelloides</i>  | 79 |
| 21 | Gráficas de deseabilidades obtenidas en diferentes optimizaciones numéricas para obtener las mejores combinaciones de $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ and $CaCl_2$ y un máximo rendimiento de etanol | 84 |
| 22 | Gráfica de superficie de respuesta que muestra el efecto del zinc y calcio sobre el rendimiento de etanol.  | 85 |
| 23 | Gráfica de superficie de respuesta que muestra el efecto del zinc y calcio sobre el rendimiento de xilitol.   | 86 |
| 24 | Curvas de crecimiento entre la fermentación testigo y el tratamiento adicionado con 1.5 g/L de $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ y 0.168 g/L de $CaCl_2$ en HAOM.                                      | 92 |
| 25 | Curvas de producción de etanol entre la fermentación testigo y el tratamiento adicionado con 1.5 g/L de $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ y 0.168 g/L de $CaCl_2$ en HAOM.                             | 95 |

|    |   |     |
|----|---|-----|
| 26 | Curvas de consumo de xilosa entre la fermentación testigo y el tratamiento adicionado con 1.5 g/L de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ y 0.168 g/L de $\text{CaCl}_2$ en HAOM.                              | 97  |
| 27 | Modelo de fermentación calculado con la ecuación de Luedeking-Piret y datos experimentales de la fermentación testigo   | 100 |
| 28 | Modelo de fermentación calculado con la ecuación de Luedeking-Piret y datos experimentales de la fermentación con zinc y calcio   | 101 |
| 29 | Perfil de fermentación del tiempo 0 h (a) y 72 h (b) en la fermentación testigo de HAOM.  | 103 |
| 30 | Perfil de fermentación del tiempo 0 h (a) y 72 h (b) en la fermentación de HAOM adicionada con zinc y calcio.   | 104 |
| 31 | Curvas de producción de xilitol en la fermentación de HAOM, comparación entre el testigo y el tratamiento adicionado con 1.5 g/L de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ y 0.168 g/L de $\text{CaCl}_2$ .      | 105 |
| 32 | Curvas de producción de glicerol en la fermentación de HAOM, comparación entre el testigo y el tratamiento adicionado con 1.5 g/L de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ y 0.168 g/L de $\text{CaCl}_2$ .     | 106 |
| 33 | Curvas de degradación de ácido acético en la fermentación de HAOM, comparación entre el testigo y el tratamiento adicionado con 1.5 g/L de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ y 0.168 g/L de $\text{CaCl}_2$ | 108 |

|    |   |     |
|----|---|-----|
| 34 | Balance de masas del tratamiento testigo en la fermentación de HAOM.  | 109 |
| 35 | Balance de masas del tratamiento con $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ y $\text{CaCl}_2$ en la fermentación de HAOM.    | 110 |
| 36 | Electroforesis de proteínas SDS-PAGE de las fermentaciones con zinc y calcio (FZC) comparados con una fermentación control (FC) | 114 |



## ÍNDICE DE CUADROS

| Cuadro |  | Pág. |
|--------|--|------|
| 1      | Microorganismos empleados en el bioproceso para la producción de bioetanol   | 11   |
| 2      | Clasificación taxonómica del genero <i>Mucor</i>   | 22   |
| 3      | Prueba de pulsos identificación de nutrientes limitantes   | 49   |
| 4      | Rendimientos de etanol obtenidos en la fermentación de glucosa   | 73   |
| 5      | Diseño central compuesto (CCD) con 13 ensayos para la optimización de etanol en xilosa   | 81   |
| 6      | Valores óptimos sugeridos  | 83   |
| 7      | Comparación de los modelos experimentales después de la optimización.  | 88   |
| 8      | Comparación del crecimiento entre el testigo y la fermentación adicionada con 1.5 g/L de ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O y 0.168 g/L de CaCl <sub>2</sub> . | 93   |
| 9      | Velocidad específica de consumo de sustrato $q_s$  | 98   |
| 10     | Concentración de proteína en biomasa de <i>M. circinelloides</i>   | 113  |

## I RESUMEN

La fermentación de la xilosa para la producción de bioetanol 2G se ha convertido en todo un reto de bioingeniería. Por lo anterior, se propone optimizar e identificar procesos metabólicos clave en la fermentación alcohólica de xilosa utilizando  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  y  $\text{CaCl}_2$  y la cepa *Mucor* sp. (C1502). La secuenciación genómica de región espaciadora interna transcrita (ITS) permitió identificar la cepa como *Mucor circinelloides* bajo el número de acceso MN128960. Posteriormente, se optimizó la fermentación de xilosa mediante el método de superficie de respuestas (MSR) en un diseño central compuesto (DCC). Los mayores rendimientos fueron 0.36 g etanol/g xilosa a las 84 h y 0.35 g xilitol/g xilosa a las 60 h a concentración óptima de 1.5 g/L de  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  y 0.168 g/L de  $\text{CaCl}_2$ . Estos resultados dieron pauta para valorizar un hidrolizado ácido de olote de maíz (HAOM) con alto contenido en xilosa. La fermentación de HAOM se caracterizó por las siguientes constantes cinéticas: ( $Y_{P/S}$ ), tasa de crecimiento ( $\mu$ ), productividad específica ( $\alpha$ ) y, velocidad específica de consumo de sustrato ( $q_s$ ).  $Y_{P/S}$  = 0.29 y 0.36 g etanol/ g xilosa;  $\mu$  = 0.16 y 0.14;  $\alpha$  = 0.3 y 0.4 g etanol/ g biomasa h;  $q_s$  0.13 y 0.17; respectivamente para el control y el tratamiento con Zn-Ca. Se demostró que Zn-Ca incrementa el rendimiento y productividad de etanol, mientras que reducen la tasa de crecimiento. Finalmente, mediante SDS-PAGE se observó que el zinc y el calcio disminuyen la acumulación de proteínas con peso molecular de 100 kDa donde dichas proteínas probablemente participan en procesos relacionados al crecimiento y producción de biomasa. Se puede concluir de este trabajo que el suministro en condiciones óptimas de  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  y  $\text{CaCl}_2$  en la fermentación de xilosa incrementa la producción de etanol a través de la regulación de proteínas en el metabolismo del azúcar.

**Palabras clave:** *Mucor* spp., bioetanol, proteómica, xilosa, olote, optimización.

## II INTRODUCCIÓN

Las actividades humanas cada vez aumentan la emisión de dióxido de carbono y otros gases de efecto invernadero a la atmosfera. Por lo que el calentamiento global se ha convertido en la mayor amenaza existencial de nuestros tiempos. Entre los principales efectos se encuentra la disminución del hielo marino en el Ártico, el aumento del nivel del mar, una mayor frecuencia de incendios forestales y cambios en los patrones de migración de los animales. Una de las medidas consideradas contra el calentamiento global, por 195 países, fue el acuerdo de Paris en 2015; en la que se estableció 1.5°C como el límite máximo de temperatura global media. Las temperaturas globales en 2021 estuvieron 0.85°C por encima de la media del período de referencia de la NASA, según los científicos del Instituto Goddard de Estudios Espaciales (GISS por sus siglas en inglés), tomando como línea base o de referencia el periodo 1951-1980, para connotar cómo cambia la temperatura global a lo largo del tiempo. Se considera que para el año 2040, la temperatura global alcanzará los 1.5 °C, y los efectos serán más severos. De acuerdo con el panel intergubernamental de cambio climático (IPCC, por sus siglas en inglés), de los gases de efecto invernadero el dióxido de carbono representa el 65%, emitido por las actividades de transporte e industria, sumado a un 11% de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) por actividades agrícolas, el porcentaje restante está constituido por óxido de nitrógeno y metano. Representado en peso, anualmente se producen más de 30 millones de toneladas de CO<sub>2</sub>, comparado con los 5 y 10 millones producidos en la década de 1950's y 1980's respectivamente. El 15% del CO<sub>2</sub> emitido anualmente, proviene del sector transporte. Ya que el 95% del transporte global opera con combustibles fósiles como la gasolina y el diésel. Actualmente, se está desarrollando tecnología en motores para mejorar ahorro de combustible, el diseño de autos eléctricos e híbridos, así como el desarrollo de biocombustibles.



Los biocombustibles, como un caso particular de energía renovable figuraron como el 1% de la energía global en 2020, lo cual representa 151.5 mil millones entre biodiesel y bioetanol (REN21, 2017, 2016). La producción de biocombustibles líquidos como el bioetanol de primera generación se centra en procesos de bioconversión de biomasa azucarada y amilácea (arroz, maíz, y sorgo) (Lennartsson y col., 2014). Sin embargo, el uso de bioetanol de primera generación representa un riesgo para el sector alimentario al comprometer el suministro de alimentos y la seguridad alimentaria (Barros-Rios y col., 2015). El bioetanol de segunda generación producido a partir de biomasa lignocelulósica ha resultado ser una alternativa para no comprometer la demanda de alimentos (Ingale y col., 2014).

La producción de bioetanol de segunda generación en bioprocesos consolidados (CBP, por sus siglas en inglés) es una estrategia prometedora que permite reducir costos y el número de etapas del proceso (den Haan y col., 2015). Un CBP consiste en utilizar un solo microorganismo que lleve a cabo múltiples reacciones enzimáticas en una sola etapa de manera simultánea, desde la degradación enzimática de lignocelulosa hasta la fermentación de pentosas y hexosas en etanol (Horisawa y col., 2015; Paschos y col., 2015; Okamoto y col., 2014; Maehara y col., 2013). Las características enzimáticas de los hongos del género *Mucor* lo convierten en un sistema biológico ideal para llevar a cabo un CBP (Inokuma y col., 2013). Uno de los principales retos en un CBP es la fermentación simultánea de hexosas y pentosas (den Haan y col., 2015), dado que la transformación de xilulosa-5-P a gliceraldehído-3-P y/o fructosa-6-P a través de la ruta de pentosas fase oxidativa requiere de condiciones aerobias, de igual manera a la producción de celulasas y xilanasas (dos Reis y col., 2013; Actor, 2012; Kruger y von Schaewen, 2003; Kötter y Ciriacy, 1993). Para el caso de *Mucor* spp., esta circunstancia no necesariamente representa un reto, se ha reportado que especies de *Mucor circinelloides* son positivas para el efecto Crabtree, es decir que pueden producir etanol en un ambiente aerobio

condicionado a una alta concentración del azúcar (Lübbehüsen y col., 2004). En cierto modo este efecto es una regulación enzimática mediada por la concentración del sustrato, que favorece la producción de etanol (Abtahi y col., 2010). También se ha demostrado que manipular el balance carbono/nitrógeno permite regular el metabolismo en microorganismos como *M. circinelloides* donde se demostró que el efecto del nitrógeno en altas y bajas concentraciones regula la síntesis de ácidos grasos (Zhao y col., 2015). Actualmente, las ciencias “ómicas”, como la genómica y proteómica, permiten desarrollar bioprocesos de una manera puntual al permitir estudiar la tendencia o dirección del metabolismo en determinadas reacciones mediante la regulación enzimática (Costello y Martin, 2018; Rosnow y col., 2017). En el metabolismo de los hongos, el Zinc es un ión metálico de importancia debido a que presenta diversas funciones como la regulación enzimática y la regulación de expresión de genes (Staats y col., 2013). Estudios han reportado el uso del  $Zn^{2+}$  para incrementar la producción de etanol en levaduras (Zhao y col., 2009), debido a que el Zinc participa en la biocatálisis de acetaldehído a etanol, al formar parte del sitio activo de la enzima alcohol deshidrogenasa (Nelson y Cox, 2015; Staats y col., 2013). Además, Cuero y Ouellet (2005), han evaluado la expresión de genes como la *adh1* (gen para la enzima alcohol deshidrogenasa) por efecto del  $Zn^{2+}$ ,  $Fe^{+2}$ ,  $Cu^{+2}$  en hongos fitopatógenos. Por otro lado, se ha reportado que la adición de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) y algunos de metales trazas como  $CaCl_2$ ,  $ZnSO_4$ ,  $FeSO_4$ ,  $H_3BO_3$ ,  $MnCl_2$ ,  $Na_2MoO_4$ ,  $CoCl_2$ ,  $CuSO_4$  y  $KI$  incrementan los rendimientos en la producción de etanol en *Mucor indicus* (Sues y col., 2005). Con el fin de entender mejor el metabolismo en la cepa *Mucor* spp., y desarrollar un bioproceso direccionado principalmente al incremento del rendimiento en la producción de etanol, con esta investigación se pretende estudiar el efecto del Zn y Ca sobre la acumulación de proteínas

### III REVISIÓN DE LITERATURA

#### A BIOETANOL

El bioetanol es etanol anhidrido que se obtiene a partir de la fermentación microbiana de carbohidratos de plantas o algas (caña, maíz, trigo, lignocelulosa, etc.) y ha sido considerado como un combustible de transporte renovable y sustentable, que no causa un alto impacto sobre el medio ambiente comparado con la gasolina porque reduce la emisión de gases de efecto invernadero (GEI) que contribuyen al calentamiento global (Okamoto y col., 2014). Las ventajas del bioetanol destacan que es de naturaleza renovable y es un combustible relativamente seguro que puede ser usado en máquinas con pocas modificaciones. Además, incrementa la seguridad energética nacional y global dado a que las reservas de petróleo y sus derivados decrecen constantemente debido a que son una fuente no renovable. Comparado con el petróleo, el bioetanol es una fuente renovable que puede ser obtenido de la biomasa vegetal proveniente de residuos forestales, agroindustriales y cultivos energéticos. No es tóxico y es biodegradable lo que permite que en caso de existir un derrame se pueda degradar rápidamente, y convertirse en una sustancia inofensiva. Además los cultivos destinados a la producción de etanol reducen las emisiones de monóxido y dióxido de carbono atmosférico, siendo una potencial ventaja para contribuir con la disminución de GEI (Bajpai, 2013).

#### **1Producción global**

El bioetanol es el biocombustible de mayor impacto e importancia en el sector transporte. El 70.5 % de los 146.6 mil millones de litros de biocombustible producidos en 2019. Estados Unidos de América (EUA) y Brasil representan el 84% de la producción mundial siendo los productores de mayor importancia. Seguidos por la Unión Europea, China y Canadá, que solo representan el 5, 4 y 2% respectivamente (Sharma y col., 2020). El mercado del bioetanol como combustible ha incrementado y su distribución se lleva a cabo como mezcla en

E5, E10 y E85 (Bajpai, 2013). Una de las causas de este incremento en la demanda se debe a que en diversos países se cobra un menor impuesto en mezclas de etanol gasolina que en gasolina pura. Más del 94% del bioetanol producido por EUA es obtenido de almidón de maíz y el remanente es a partir de biomasa lignocelulósica. Mientras que en Brasil la fuente de azúcar es la caña y en menor proporción las biomásas ricas en almidón (Jatoi y col., 2021) .

## **2Clasificación del bioetanol**

La clasificación de bioetanol corresponde a la establecida por la FAO (2008), que de acuerdo con la fuente de la que proviene se puede clasificar en primera, segunda o tercera generación, al igual que la clasificación general de biocombustibles.

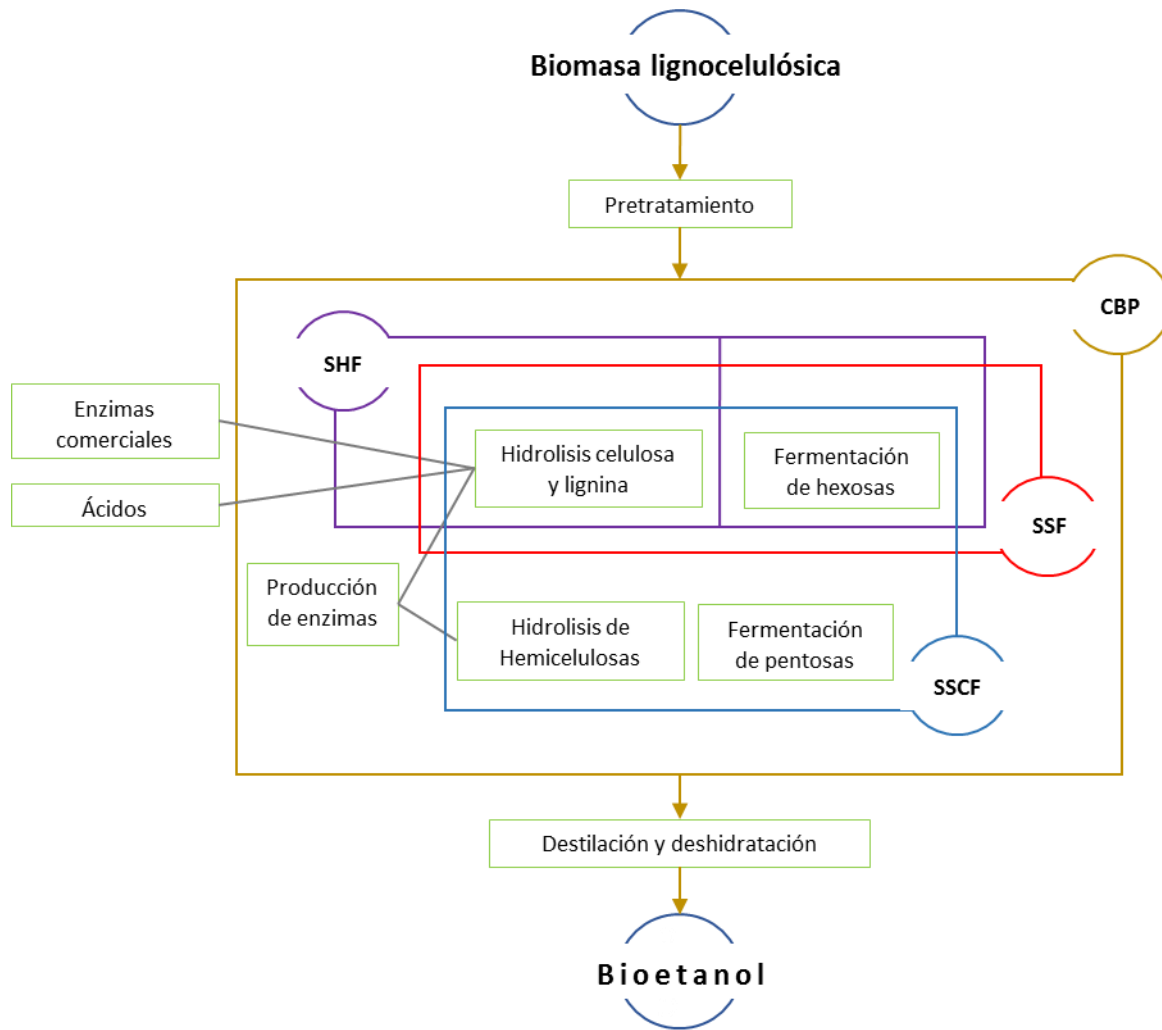
### **a Primera generación**

Los biocombustibles de primera generación provienen principalmente de cultivos alimenticios y se procesan por medios convencionales, como procesos de fermentación y destilación. En el caso del bioetanol, se obtiene de materiales ricos en azúcares simples, como caña de azúcar (Dantas y col., 2013) y sorgo dulce (Suryaningsih, 2014) y los abundantes en almidón como papa (Zhang y col., 2013; Zhang y col., 2010), y cereales como el maíz (Barros-Rios y col., 2015). Los principales productores de bioetanol de primera generación son Estados Unidos de América y Brasil, que utilizan como materia prima el maíz y la caña de azúcar respectivamente. Sin embargo, debido a que suponen un riesgo a la seguridad alimentaria, en algunos países está regulada su producción incluso se ha prohibido. Tal es el caso de México, donde no se puede producir biocombustibles a partir de alimentos. Sin embargo, la legislación de biocombustibles en México se encuentra en desfase con el desarrollo tecnológico. En 2008 se publicó en el diario oficial de la federación (DOF) la Ley de promoción y desarrollo de los bioenergéticos (L. D. P. Y. D., 2008), en 2009 su reglamento (R. L. A. E. R. F. T. E., 2009) y hasta 10 años después, en 2018, se publican en el DOF los lineamientos por los que se establecen las

especificaciones de calidad y características para etanol anhidro (bioetanol), biodiésel y bioturbosina puros. Recientemente, la comisión reguladora de energía ha implementado el desarrollo de etanol de primera generación a partir solamente de sorgo dulce. Dado a estas circunstancias se ha promovido la producción de biocombustibles a partir de otro tipo de materia prima o fuentes alternas.

## **b Segunda generación**

La producción de biocombustibles de segunda generación (2G) se elabora a partir de fuentes de lignocelulosa o materias primas que pueden convertirse en celulosa. Tal es el caso de desechos de los cultivos agrícolas, el aserrín, residuos urbanos o plantas con un alto contenido de materia lignocelulósica, denominadas cultivos energéticos (Lennartsson y col., 2014; Limayem y Ricke, 2012). Algunos ejemplos son la jatrofa y los pastos silvestres. Sin embargo, la desventaja de producir Biocombustibles 2G, radica en el uso de suelo arable. Los procesos de producción aún se encuentran en experimentación, pero se prevén resultados satisfactorios a corto plazo que permitan la implementación de estas tecnologías. Para la hidrólisis y fermentación de biomasa se pueden incluir diferentes estrategias como la hidrólisis y fermentación separadas (SHF, por sus siglas en inglés Separated Hydrolysis and Fermentation) y la sacarificación y fermentación simultánea (SSF, por sus siglas en inglés Simultaneous Saccharification and Fermentation), ambos procesos permiten disminuir la viscosidad del medio y mejorar la transferencia de masa durante la biorreacción, además que permiten obtener una mayor concentración de glucosa debido a que la hidrólisis enzimática se lleva en condiciones de temperatura y pH óptimos (den Haan y col., 2015). Sin embargo, ambas metodologías requieren la adición de enzimas exógenas implicando una etapa adicional al proceso. La sacarificación y cofermentación simultánea (SSCF, por sus siglas en inglés Simultaneous Saccharification and Cofermentation) implica la fermentación de hexosas y pentosas en una etapa reduciendo el número de etapas de tres a dos (Figura 1).



**Figura 1.** Sistemas de producción de bioetanol 2G. En el recuadro morado, se muestran las etapas de un sistema SHF, en color rojo para un SSF, la diferencia es que el primero requiere de dos contenedores y el segundo es en un solo contenedor. En color Azul se muestra un SSCF, incluye dos etapas adicionales a los anteriores. En color café está el CBP que además incluye la producción de enzimas en el proceso Adaptado de (den Haan y col., 2015).

Recientemente se ha estudiado la conversión de lignocelulosa a etanol en una sola etapa también conocido como bioproceso consolidado (CBP, por sus siglas en inglés Consolidated Bioprocessing) que es una estrategia promisoría para reducir costos y disminuir los requerimientos operarios (Du y col., 2015).

### **1) Hidrólisis y fermentación separada (SHF)**

Después del pretratamiento de biomasa las siguientes etapas son hidrólisis y fermentación, la cual puede llevarse a cabo de manera separada o simultánea. Cuando la hidrólisis y la fermentación se llevan en diferentes recipientes se denomina SHF, en este proceso cada etapa se puede realizar en óptimas condiciones de pH y temperatura. Sin embargo, la alta concentración de glucosa y celobiosa inhiben la actividad enzimática de las celulasas (Tomás-Pejó y col., 2008).

### **2) Sacarificación y fermentación simultánea (SSF)**

Es uno de los métodos más estudiados para la producción de bioetanol, en este proceso la hidrólisis enzimática y la fermentación se llevan a cabo en el mismo contenedor.

Debido a que la glucosa obtenida en la hidrólisis se transforman en etanol por fermentación, la concentraciones de esta hexosa no son tan altas para provocar inhibición de celulasas (Tomás-Pejó y col., 2008). Bak (2015), propuso una estrategia para optimizar el bioproceso en la etapa downstream en la que emplearon al hongo *Mucor indicus* durante la sacarificación y *S. cerevisiae* en la fermentación. El proceso consistió en optimizar el crecimiento de *Mucor indicus*, empleando variaciones de glucosa, extracto de levadura y fosfato de potasio, por consiguiente evaluaban la bioconversión del sustrato en etanol en las diferentes preparaciones.

### **3) Sacarificación y cofermentación simultánea (SSCF)**

Este método consiste en la hidrólisis de celulosa y hemicelulosa que se realiza por enzimas y la posterior fermentación de pentosas y hexosas por levaduras

como *Pichia stipitis* y *Saccharomyces cerevisiae*, respectivamente para cada azúcar. Aunque se ha reportado que se han empleado cepas de *Saccharomyces cerevisiae* genéticamente modificadas para la fermentación de pentosas (Menon y Rao, 2012). Al igual que una SSF, la SSCF presenta la ventaja de llevarse a cabo en un mismo tanque, lo que le otorga la ventaja de disminuir el número de etapas en el proceso y costos (Anwar y col., 2014), además la producción de etanol es mayor comparada con los SHF, lo que impide la invasión de microorganismos endógenos al proceso (Brethauer y Wyman, 2010).

#### **4) Bioproceso consolidado (CBP)**

El CBP es una metodología que emplea una sola especie de microorganismo capaz de transformar en una etapa la conversión de biomasa lignocelulosa a etanol (Okamoto y col., 2014). No existen muchas cepas silvestres capaces de realizar una bioconversión de celulosa a etanol pero se han diseñado algunas cepas mediante el uso de ingeniería genética. Para la obtención de cepas idóneas para un CBP se disponen de dos opciones o categorías la primera es transformar cepas productoras de celulasas en etanologénicas y la segunda es transformar cepas etanologénicas en celulolíticas (Amore y Faraco, 2012).

En el Cuadro 1, se muestran los hongos que han sido evaluados en un CBP entre ellos se reportan algunos basidiomicetos del genero *Trametes* y *Flamulina*, ascomicetos del genero *Fusarium* y Zygomycetos del genero *Mucor*.

#### **c Tercera generación**

Los biocombustibles de tercera generación (3G) provienen de cultivos específicos no alimentarios, utilizan biomasa producida de microorganismos rica en azúcares y/o lípidos. Las microalgas son los representantes de esta generación. Sin embargo, se ha reportado algunos microorganismos oleaginosos como los hongos y levaduras son productores de lípidos (Jacob y col., 2021).



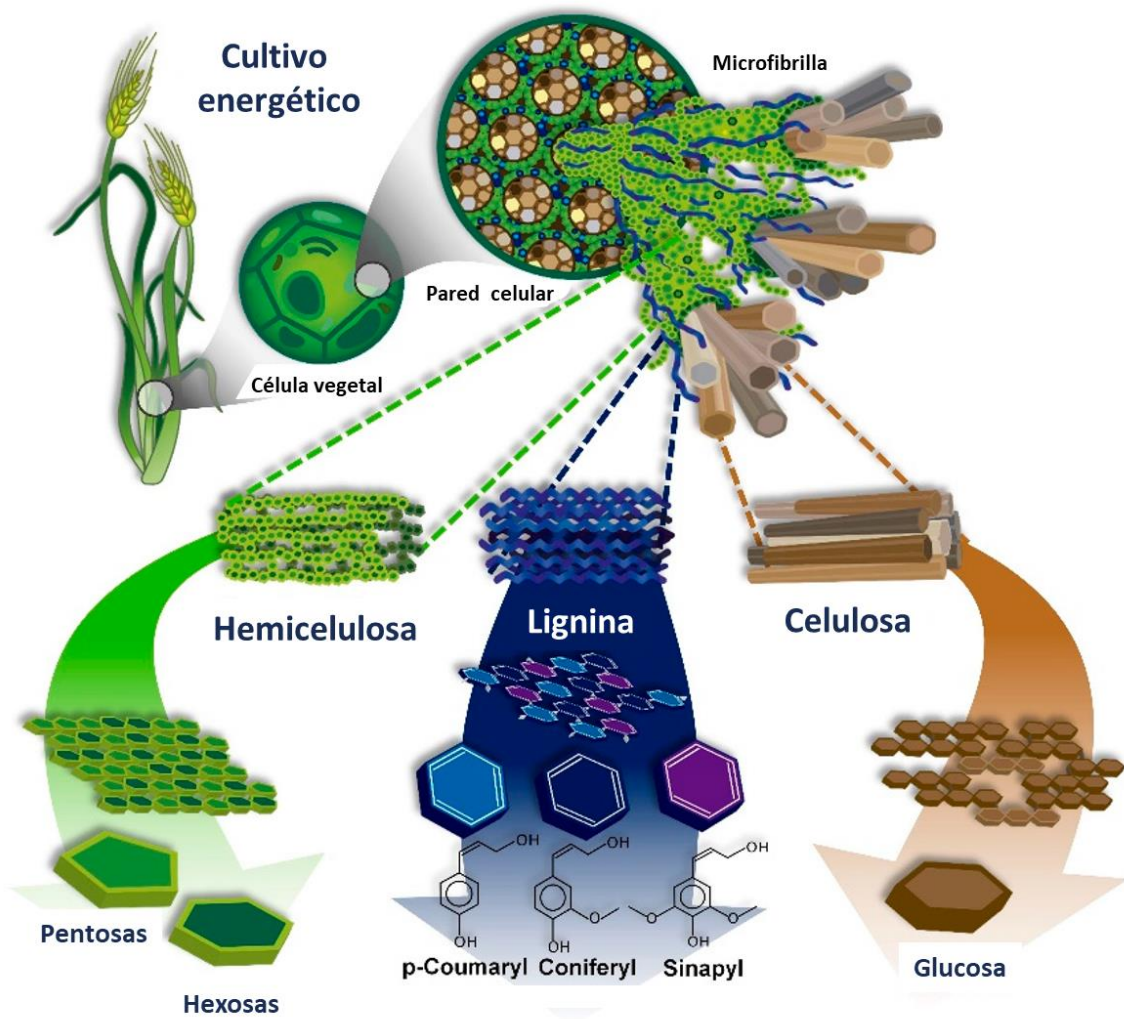
**Cuadro 1.** Microorganismos empleados en un CBP para la producción de bioetanol.

| Microorganismo                  | Referencia  |
|---------------------------------|---|
| <i>Fusarium oxysporum</i>       | Anasontzis y col., 2011. Xu y col., 2015. Paschos y col., 2015. |
| <i>Schizophyllum commune</i>    | Horisawa y col., 2015.  |
| <i>Flammulina velutipes</i>     | Maehara y col., 2013.   |
| <i>Mucor circinelloides</i>     | Inokuma y col., 2013.   |
| <i>Paecilomyces variotii</i>    | Zerva y col., 2014.   |
| <i>Fusarium verticillioides</i> | De Almeida y col., 2013.  |
| <i>Acremonium zeae</i>          |   |
| <i>Peniophora cinérea</i>       | Okamoto y col., 2010.   |
| <i>Trametes suaveolens</i>      |   |
| <i>Trametes hirsuta</i>         | Okamoto y col., 2011.   |
| <i>Trametes versicolor</i>      | Okamoto y col., 2014.   |
| <i>Phlebia</i> sp.              | Khuong y col., 2014.  |

Algunos reportes, muestran la capacidad para producir ácidos grasos en *Mucor circinelloides* y de *Yarrowia lipolitica* (Naveira-Pazos y col., 2022; Carvalho y col., 2018). Este tipo de biocombustibles tienen ventajas potenciales muy concretas; como no requieren uso de suelos arables, sino de biorreactores en los que en algunos casos solo es necesario la luz del sol y CO<sub>2</sub>. Lo que lo convierte en un proceso muy sustentable y amigable con el medio ambiente. Las algas, que tienen un potencial energético que puede llegar a ser 30 veces mayor que el de los cultivos energéticos en tierra, capturan una gran cantidad de energía solar y se reproducen rápidamente (Doan y col., 2012; Behera y col., 2011; Harun y col., 2010). Sin embargo, uno de los principales retos al igual que los biocombustibles 2G, es la conversión de la biomasa a etanol o biodiesel. Dependiendo, de la composición de la biomasa la tecnología empleada en la conversión de lignocelulosa puede ser aplicada para los biocombustibles de 3G. El desarrollo y optimización de bioprocesos es el principal reto.

## **B BIOMASA LIGNOCELULOSICA**

La biomasa lignocelulósica es considerada fuente de carbono renovable y de gran potencial para la producción de biocombustibles y compuestos de alto valor. La lignocelulosa es un biopolímero de disponibilidad predominante que se obtiene de las plantas (Roy y col., 2020). Está compuesta principalmente por tres polímeros celulosa, hemicelulosa y lignina (Figura 2), donde los porcentajes de estos dependen principalmente de la edad de la planta, el ambiente y la temporada de cultivo (Khan y col., 2022). La biomasa lignocelulosa se puede obtener de pastos, ramas, arboles, y residuos agrícolas y de la industria del papel (Suman y col., 2022). Cada año se producen en el mundo 200 mil millones de toneladas de biomasa lignocelulósica, por lo que el Departamento de Energía de EUA la reconoce como fuente sustentable (Jatoi y col., 2021). A partir de residuos agroindustriales se pueden aprovechar el rastrojo de maíz, el bagazo de caña y la paja de trigo (Belorkar y Jogaiah, 2022). Algunos otros pueden ser árboles muertos, madera y ramas.



**Figura 2.** Composición lignocelulósica de un cultivo energético (Khan y col., 2022).

También se utilizan una gran variedad de pastos como *prairie*, *miscanthus*, *switch* y *bluestern* (Xie y col., 2019). Por otro lado, los residuos urbanos pueden ser aprovechados. Es importante conocer la estructura química, interacciones intramoleculares y cristalinidad de la biomasa a emplear para usar un pretratamiento adecuado para obtener los azúcares que pueden ser fermentados. Debido a que la lignocelulosa es un biopolímero complejo muestra recalcitrancia a tratamientos químicos y enzimáticos (Zhou y Tian, 2022). Generalmente se combinan pretratamientos químicos, físicos, fisicoquímicos y biológicos. La celulosa, hemicelulosa y lignina representan el 90% en peso seco de la planta (Roy y col., 2020).

### **1 Celulosa**

La celulosa es el biopolímero más abundante y su estructura principal se constituye en fibras naturales. Está disponible en árboles, plantas y pastos. La celulosa es un biopolímero semicristalino ya que contiene zonas amorfas y cristalinas en su estructura. Es un polímero de cadena homogénea con repetidos monómeros de glucosa unidos por enlaces  $\beta$ -1,4. A diferencia del almidón la celulosa es insoluble al agua y resistente a la despolimerización. Se considera que a un mayor contenido de celulosa en la biomasa su rentabilidad es mejor para la producción de biocombustibles (Jatoi y col., 2021).

### **2 Hemicelulosa**

La hemicelulosa es un polisacárido heterogéneo compuesto por arabinosa, xilosa, glucosa, galactosa, manosa y azúcares ácidos. El componente más predominante es el xilano. Representa entre el 20 al 40% del material lignocelulósico, dependiendo de la naturaleza del cultivo energético o residuo agroindustrial. El xilano está constituido por monómeros de xilosa y arabinosa en menor proporción aproximada en una relación 9:1 (Jatoi y col., 2021).

### **3 Lignina**

La lignina es un complejo biopolímero formado por compuestos

aromáticos. Es la mayor estructura de las paredes secundarias en las células vegetales. Tiene enlaces cruzados con la celulosa y hemicelulosa para formar estructuras rígidas que juegan un papel importante en los roles biológicos como transporte de agua y nutrientes (Jatoi y col., 2021). La lignina es el segundo y más abundante polímero natural, después de la celulosa y el porcentaje en las plantas varía de un 15 a un 40% de la biomasa total (Roy y col., 2020). Su estructura está formada por unidades monoméricas de fenilpropanoides como los alcoholes p-coumaril, coniferil y sinapil (Khan y col., 2022).

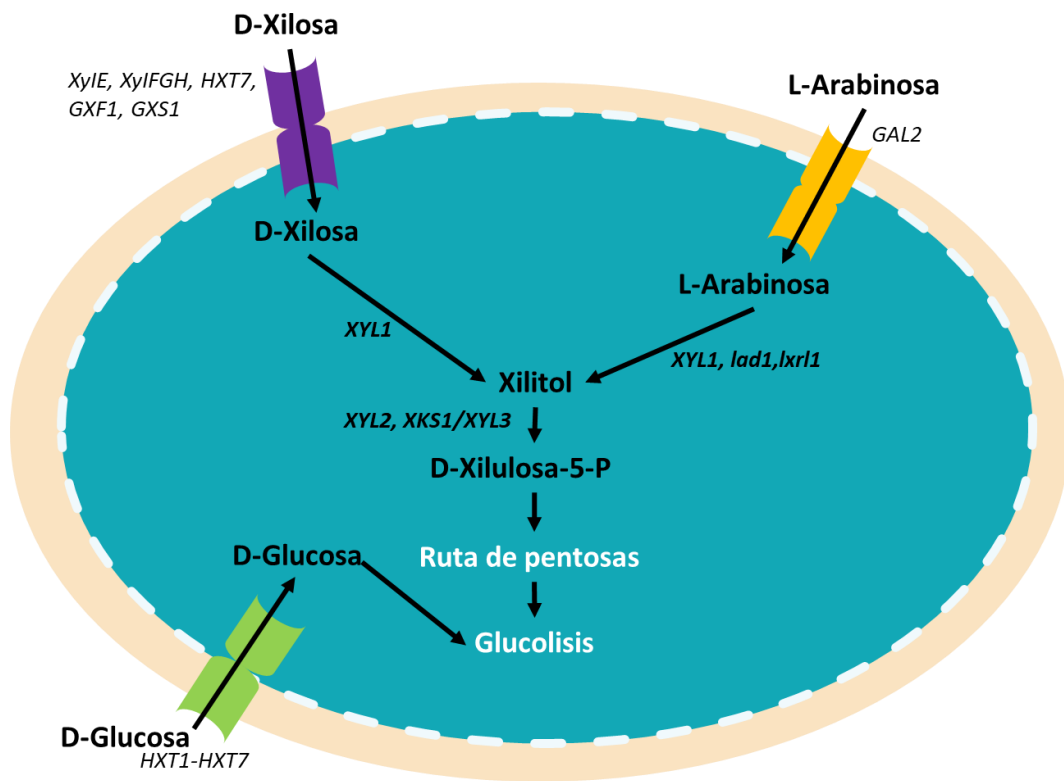
### **C FERMENTACIÓN ALCOHÓLICA**

La biomasa lignocelulósica es fuente de carbohidratos, en especial de hexosas y pentosas (He y col., 2022). Los monosacáridos más abundantes y de mayor importancia son la glucosa y la xilosa. Estos azúcares pueden ser transformados en bioetanol a partir de un proceso de fermentación (Zhou y Lü, 2021). El concepto de fermentación ha adquirido diferentes significados para los bioquímicos y los microbiólogos industriales (Doelle, 1975). Desde la perspectiva bioquímica es un proceso bioquímico causado por el catabolismo anaeróbico de azúcares para la producción de energía (Tamime y Robinson, 2007). En este proceso una molécula de NADH es regenerada por la reducción de pirúvico. Las fermentaciones pueden ser para producir ácido láctico, ácido butírico, ácido propiónico, iso-propanol, butanol, etanol, acetato, 2,3- butanodiol (Ji y col., 2011). Sin embargo, dentro de la perspectiva de la microbiología industrial una fermentación es un proceso para la producción de un producto a partir de un cultivo microbiano, donde se incluyen procesos metabólicos aerobios y anaerobios. En este sentido otros autores definen esta idea como biorreacción. Entre los metabolitos que se pueden producir se encuentran la biomasa microbiana, enzimas, metabolitos y productos recombinantes (Hocking, 2005). En este sentido denominar la fermentación alcohólica a la producción de etanol es correcto desde el punto de vista de la bioquímica y la microbiología. Sin embargo, la fermentación alcohólica no solo consiste en transformar el piruvato

en etanol. La cantidad de reacciones metabólicas para llegar a este punto dependerá de la naturaleza del azúcar. En el caso de las pentosas las reacciones metabólicas son un mayor número que en las hexosas, incluso las pentosas se transforman en hexosas para continuar en la glucolisis.

## **1 Transporte celular de azúcares**

El transporte entre membranas es el primer paso para la fermentación de azúcares. Las levaduras, así como los hongos, tienen dos mecanismos para el transporte de monosacáridos. En el caso de las hexosas como glucosa y galactosa se utiliza un mecanismo de difusión facilitada (Queiroz y Oliva, 2022). En especies como *Saccharomyces cerevisiae*, existen transportadores codificados por los genes *hxt1-hxt7* (Chattopadhyay y col., 2020; Sharma y col., 2018). Las proteínas Hxt tienen una alta afinidad por monosacáridos como la glucosa comparados con respecto a la xilosa. Por lo tanto, en presencia de glucosa el metabolismo la xilosa se ve reprimido en presencia de glucosa en muchos microorganismos. Este fenómeno se conoce como represión catabólica del carbono (CCR, por sus siglas en inglés). La xilosa por otra parte podemos encontrar que en los microorganismos nativos, como *E.coli* incluyen proteínas MFS (Major Facilitator Superfamily, por sus siglas en inglés) XylE y la transportadora ABC (ATP binding cassette, por sus siglas en inglés) XylFGH. La proteína XylE es un simportador de D-xilosa/protón. La proteína XylFGH tiene una alta afinidad a la xilosa comparada con XylE. En hongos filamentosos como *Aspergillus nidulans* y *Trichoderma reesei* se han encontrado 357 y 164 proteínas pertenecientes a las MFS, respectivamente, que pueden ser candidatas a transportadores de xilosa (Zhao y col., 2020; Young y col., 2010) (Figura 3).



**Figura 3.** Mecanismos de transporte transmembranal de glucosa, xilosa y arabinosa en microorganismos. Adaptado de:(Young y col., 2010)

## 2Glucólisis

La glucosa es transportada dentro de la célula donde se transforma en piruvato o ácido pirúvico. Existen dos rutas para llevar a cabo este proceso (Najafpour, 2015). La principal ruta metabólica para la fermentación de etanol es la glucólisis Embden-Meyerhof-Parnas (EMP), en la que una molécula de glucosa es metabolizada en dos moléculas de piruvato, que bajo condiciones anaerobias el piruvato se puede transformar en etanol (Bai y col., 2008). Durante la glucólisis se producen 2 moléculas de adenosin trifosfato (ATP) que son usadas para la biosíntesis de biomasa celular. Teóricamente el rendimiento de la fermentación alcohólica por la ruta EMP es de 0.551 g de etanol y 0.489 g de CO<sub>2</sub> para una masa base 1 g de glucosa. Sin embargo, en la práctica se obtiene un rendimiento del 90-95% del teórico máximo (Kuyper y col., 2004).

La otra opción es la ruta Entner-Doudoroff (ED) es una ruta metabólica empleada por bacterias gram-negativas como *Z. mobilis* que fermenta etanol a partir de la glucosa y al igual que la ruta EMP, se acoplan a las reacciones catalizadas por la enzima piruvato carboxilasa y alcohol deshidrogenasa (Bai y col., 2008).

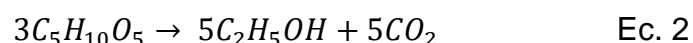
En comparación de la ruta EMP, la ruta ED permite la conversión de glucosa a piruvato en un número menor de reacciones. Además permite la incorporación de gluconato como una fuente alterna de carbono, considerando que la EMP solo incluye hexosas. Otras hexosas como D-manosa se transforman en D-glucosa mediante la isomerización llevada por la enzima 6-fosfato-manosa-isomerasa y la D-galactosa se transforma en D-glucosa por la ruta de Leloir (Gírio y col., 2010).



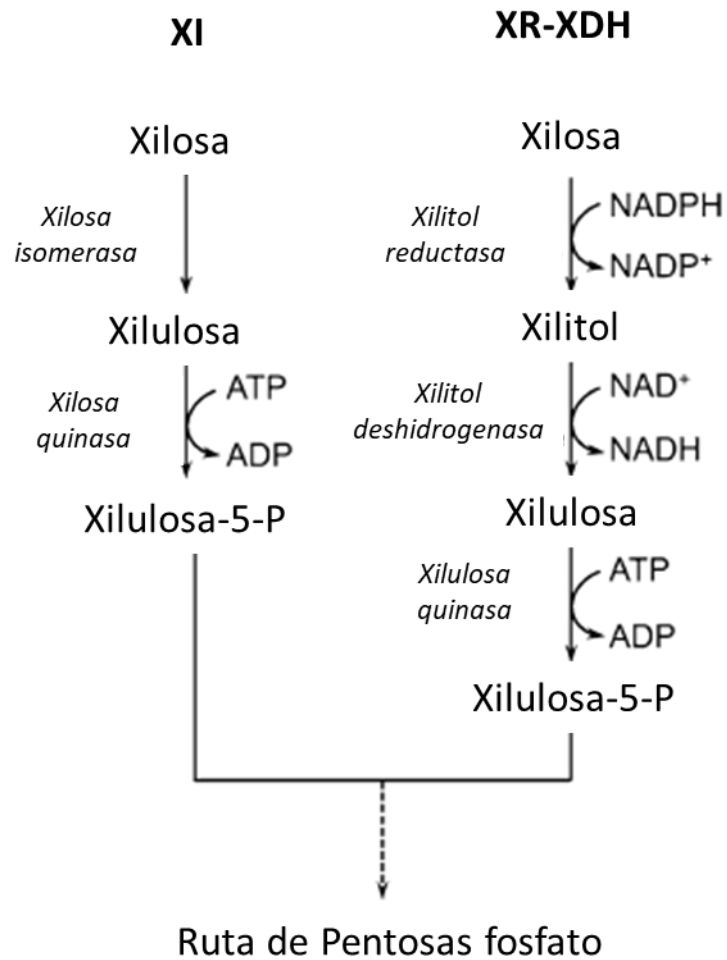
### 3Isomerización de xilosa y ruta de pentosas

Una vez que la hemicelulosa se degrada en D-xilosa este azúcar es metabolizado a través de la ruta de pentosas, para que estos monosacáridos puedan ser incorporados a dicha ruta es necesario la previa intervención de algunas enzimas con actividad de isomerasas (Zhao y col., 2020). Existen dos principales rutas para la isomerización de xilosa (**Figura 4**), en la primera conocida como Xilosa Isomerasa (XI) debido a que interviene la D-xilosa isomerasa y la D-Xilosa quinasa, esto sucede en el caso de bacterias como *E. coli* (Shi y col., 2022). Sin embargo, se ha reportado que esta ruta existe putativamente en algunos zygomycetos del genero *Mucor*, aunque también se menciona que puede seguir la ruta XR-XDH (xilosa reductasa-xilitol deshidrogenasa) (Chu y col., 2016). Al igual que levaduras principalmente del genero *Candida* y *Pichia* (Dussan y col., 2011). Al final de las reacciones de isomerización se obtiene como producto la D-xilulosa-5-P que se incorpora a la ruta de pentosas en la fase no oxidativa que como resultado final se obtiene fructosa-6-P y gliceraldehido 3-P.

A continuación se presenta la reacción general (Ec. 2) para la conversión de pentosas a etanol (Dionisi y col., 2015).



Microorganismos como las levaduras pueden fermentar la xilosa, ejemplo de ello se tiene a *Candida shehatae*, *Candida parapsilosis* y *Pichia stipitis* (Hickert y col., 2014; Balat, 2011; Buaban y col., 2010). No obstante, existen algunos hongos que pueden fermentar xilosas en etanol pertenecientes a los géneros *Fusarium*, *Flamulina*, *Trametes* y *Mucor*.



**Figura 4.** Isomerización de D-Xilosa a través de la ruta XI y XR-XDH. (Zhao y col., 2020)

## D *Mucor* sp.

*Mucor* es un hongo filamentoso encontrado en suelos, plantas y frutas en descomposición. Son hongos principalmente saprofitos, y se asocian con plantas, animales y humanos como patógenos oportunistas. El género tiene diversas especies, las más comunes son *M. amphibiorum*, *M. circinelloides*, *M. hiemalis*, *M. indicus* y *M. racemosus* (Actor, 2012). Los hongos mucormycotas son poderosas “cell factories” en las biorrefinerías modernas. El concepto de “cell factories” se ha desarrollado en los últimos años como células en las que el metabolismo esta direccionado prioritariamente hacia la producción de un metabolito específico con una alta eficiencia (Hasunuma y Kondo, 2012). Este tipo de hongos, pueden ser empleados para valorizar residuos materiales de bajo costo, mediante la fermentación. Tienen una amplia versatilidad metabólica, dado su capacidad para producir lípidos, pigmentos, quitina y quitosano, etanol, ácidos orgánicos, enzimas, entre otros. Estos productos pueden ser aplicados en diferentes áreas como nutrición, química o producción de biocombustibles (Dzurendova y col., 2022).

### 1Taxonomía

La clasificación taxonómica con base en estudios genéticos, características morfológicas y bioquímicas del género *Mucor* se agrupan en el reino *Fungi*, división *Zygomycota*, clase *Zygomycetes*, orden *Mucorales*, familia *Mucoraceae* y género *Mucor* (**Cuadro 2**) (Karimi y Zamani, 2013; Lübbehüsen y col., 2003). La primera observación microscópica de un espécimen de *Mucor* data de 1665 por Robert Hooke, a la fecha cientos de especies han sido reportadas. Las especies de *Mucor* son el orden más estudiado de la división *Zygomycota*. Sin embargo, el género *Mucor* ha recibido mucha atención sobre ascomicetos y basidiomicetos. Actualmente, existe mucha atención por su importancia como patógeno y su amplio potencial biotecnológico.(Morin-Sardin y col., 2017)

**Cuadro 2.** Clasificación taxonómica del genero *Mucor*

| <b>Taxonomía</b> |                    |
|------------------|--------------------|
| <b>Reino</b>     | <i>Mycota</i>      |
| <b>División</b>  | <i>Zygomycota</i>  |
| <b>Clase</b>     | <i>Zygomycetes</i> |
| <b>Orden</b>     | <i>Mucorales</i>   |
| <b>Familia</b>   | <i>Mucoraceae</i>  |
| <b>Género</b>    | <i>Mucor</i>       |

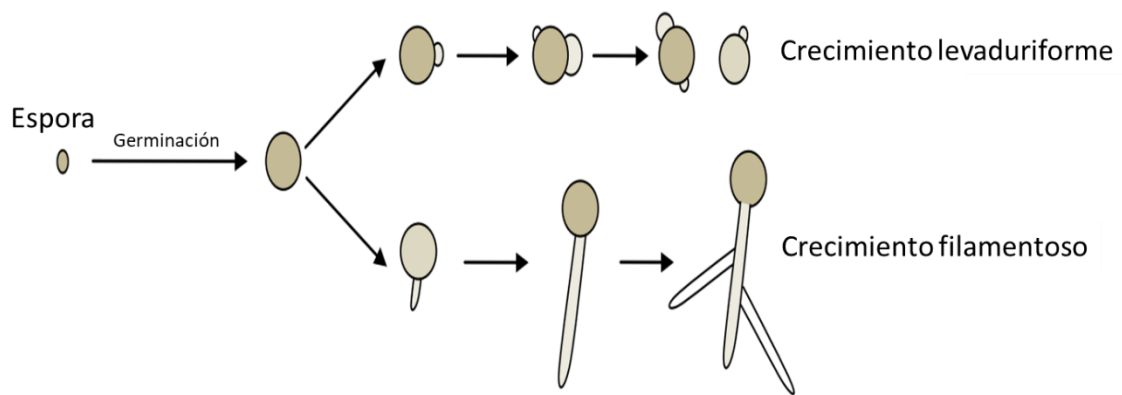
(Lübbehüsen y col., 2003)

## 2Crecimiento y morfología

Usualmente *Mucor* es conocido como un hongo filamentoso, aunque es un hongo dimórfico. En su forma filamentosa, *Mucor* puede crecer de forma típica formando micelio. Macroscópicamente puede formar filamentos libres, agrupados y/o pellets. Por otro lado, *Mucor* puede crecer como levadura, formando células esféricas con pequeños brotes. Además, el hongo puede crecer en ambas formas simultáneamente. En la Figura 5, se puede ver las diferentes morfologías posibles.

## 3Características del género

El género *Mucor* es un hongo que tiene un impacto negativo y positivo en las actividades humanas. Ciertas especies son una amenaza para la salud humana y animal, y se identifican con mayor frecuencia como agentes causantes de micosis, especialmente en pacientes diabéticos e inmunocomprometidos (Bouza y col., 2006). Solo unas pocas especies son actualmente conocidas por causar enfermedades en humanos, entre ellas se encuentran las termotolerantes como *Mucor indicus* y *Mucor ramosissimus* (Chayakulkeeree y col., 2006). Por Las especies de *Mucor* tienen un alto potencial para la producción de enzimas. Se han reportado que especies como *M. circinelloides*, *M. hiemalis*, *M. genevensis*, *M. piriformis*, *M. racemosus* y *M. variosporus* producen poligalacturonasas, amilasas, proteasas y lipasas de manera significativa (Ülker y Karaoğlu, 2012; Alves y col., 2005; Alves y col., 2002; Antczak y col., 2002; Mohapatra y col., 1998). *Mucor circinelloides* por su parte produce  $\beta$ -glucosidasa, celulasas, xilanasas, y poligalactunorasas (Saha, 2004). Además, se ha reportado que *M. circinelloides* es un hongo oleaginoso lo que lo hace atractivo como fuente de lípidos para la producción de biodiesel (Zhao y col., 2015). Otras aplicaciones son la producción de terpenoides y carotenoides a nivel industrial (Csernetics y col., 2011).



**Figura 5.** Dimorfismo en *Mucor* sp. En la parte superior se esquematiza el crecimiento levaduriforme y en la parte inferior el crecimiento filamentososo (Lübbehusen y col., 2003).

Recientemente, *Mucor sp.*, ha sido evaluado como una cepa con potencial para la biorremediación debido a su amplia capacidad enzimática (Cui y col., 2017). En cuanto a la producción de etanol se han reportado cepas del genero *Mucor* que son utilizadas en diversos bioprocesos para la producción de bioetanol (Inokuma y col., 2013; Sues y col., 2005).

#### **4. Producción de etanol con *Mucor sp.***

Existen reportes de cepas de *Mucor* que son productoras de etanol, se ha demostrado que la especie de *Mucor indicus* sigue la ruta de Emden-Meyerhof; durante la fermentación de hexosas los principales metabolitos son etanol y CO<sub>2</sub>, mientras que como coproductos glicerol y biomasa, y otros metabolitos como ácido, succínico, pirúvico, láctico, y acético. Sues y col. (2005), han evaluado el efecto de nutrientes en *M. indicus*, el experimento consistió en la combinación de nutrientes ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, EDTA, CaCl<sub>2</sub>, ZnSO<sub>4</sub>, FeSO<sub>4</sub>, y MgSO<sub>4</sub>), metales trazas (EDTA, CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, MnCl<sub>2</sub>, Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>, CoCl<sub>2</sub>, CuSO<sub>4</sub> y KI) y una solución de vitaminas y precursores (ácido p-Aminobenzoico, ácido Nicotínico, Pantotenato de calcio, Piridoxina, Tiamina, D-Biotina y m-Inositol). Como resultado obtuvieron que la adición de Zinc disminuye el tiempo de fermentación. De igual manera se observó efecto por la adición de metales trazas y extracto de levadura.

Fonseca-Peralta (2017), evaluó la capacidad de la cepa de *Mucor sp.*, para producir etanol en un CBP a partir de residuos lignocelulósicos de *Moringa oleifera*. Además, Verdugo-Camorlinga (2019) encontró que la cepa de *Mucor sp.* (C1502) tiene la capacidad de metabolizar ácido oxálico. El ácido oxálico es un metabolito considerado inhibidor de la enzima lactato deshidrogenasa lo que en ciertas circunstancias podrían favorecer la producción de etanol (Novoa y col., 1959). Asimismo, Arce-Martinez (2017) reportó las variables óptimas para aumentar la producción de azúcares en *Mucor sp.* (C1502) a partir de residuos lignocelulósicos de *M. oleifera*, siendo 28°C, 160 rpm de agitación y 21 h de tiempo de cultivo. Por otro lado, Martinez-Sillas (2019), evaluó la actividad

catalítica de celulasas y xilanasas de la cepa C1502, utilizando iones como Zinc, Calcio, Hierro, Cobre y Manganese. Armenta-Martinez (2020) evaluó la capacidad de la cepa para producir ácidos grasos en presencia de Cobre y Zinc, encontrando ácidos grasos de interés como el oleico, palmítico y linoléico. Urias-Ramos (2019), evaluó residuos de biomasa provenientes de la fermentación de lignocelulosa de Moringa, como alimento para codornices, teniendo resultados muy favorables comparados con alimentos comerciales. Finalmente, Contreras-Montoya (2019), evaluó el efecto del zinc en la fermentación de xilosa para obtener bioetanol, obteniendo efectos positivos en el incremento de los rendimientos.

## **E ESTRATEGIAS PARA OPTIMIZAR LA PRODUCCIÓN DE ETANOL**

### **1 Optimización por modelos cinéticos, estadísticos y metabólicos.**

Los modelos celulares son una herramienta utilizada para el diseño, optimización y escalamiento de procesos basados principalmente en la producción de biomasa y metabolitos por el microorganismo. Diferentes tipos de modelos celulares y estrategias han sido utilizados para evaluar el crecimiento celular y la fermentación en bioprocesos para la producción de etanol lignocelulósico.

#### **a Modelamiento cinético**

Los modelos cinéticos para crecimiento son substancialmente capaces de predecir la formación de producto. Los modelos matemáticos, proporcionan una estrategia para solucionar problemas encontrados en los procesos de fermentación. Mientras que la ingeniería bioquímica nos permite localizar estos problemas, los modelos matemáticos nos ayudan no solo a entender el sistema sino a predecir y desarrollar estrategias que facilitan la optimización, ahorrando tiempo y costo al desarrollar experimentos (Chambi Rodriguez y Torres Jiménez, 2021). El crecimiento microbiano durante la fase exponencial (Log) es muy importante de analizar debido a la división celular. Cada clase de microorganismo



tiene una fase tiene un patrón de crecimiento basado en su ciclo celular y si división celular. Entender las cinéticas de crecimiento permite lograr una óptima concentración de producto. Los modelos de crecimiento son una reacción autocatalítica que implica que la tasa de crecimiento  $\mu$  es directamente proporcional a la concentración celular. La concentración celular puede ser medida por métodos directos e indirectos. Los métodos directos son basados en el peso seco, turbidez, conteo en placa, etc. Mientras que los indirectos son relacionados en base a la concentración de proteínas, ATP o ADN. Los modelos de crecimiento cinéticos explican la relación entre la tasa específica del crecimiento del microbio y la concentración de sustrato en el medio de cultivo. Además, de la relación con el sustrato, se explica la relación con la concentración de productos formados durante la fermentación y permite predecir la tasa de conversión a producto. Las cinéticas de crecimiento se clasifican en base a la síntesis de productos y la generación de energía en la célula, y son: asociados a crecimiento, no asociados a crecimiento, asociados a crecimiento mixto (Escobedo y col., 2021; Sakthiselvan y col., 2019; Suarez Ospina, 2018)

### **1) Asociados a crecimiento**

El crecimiento está ligado a los productos formados por el crecimiento celular o los metabolitos primarios. Esto significa que la concentración del producto incrementa con la concentración celular. Y se describe en la siguiente ecuación:

$$\frac{dP}{dt} = r_p = q_p X$$

Donde P =concentración de producto

$q_p$ = tasa específica de formación de producto

X=concentración de biomasa

### **2) No asociados a crecimiento**

En estos modelos la formación de producto no está relacionada con el

crecimiento celular. A los productos se les denomina metabolitos secundarios. Sin embargo, si están en función de la concentración celular. Y se describe en la siguiente ecuación:

$$q_p = \beta = \text{constante}$$

### 3) Cinéticas de producción

La relación entre la tasa específica de crecimiento ( $\mu$ ) de un microorganismo y la concentración de sustrato ( $s$ ), es una herramienta indispensable en todos los campos de la microbiología, genética, ecología o biotecnología. Los modelos utilizados para estudiar esta relación basan sus principios en la ecuación de Monod. Posteriormente, surgen la ecuación logística, el modelo logístico modificado y Luedeking-Piret, que son utilizados para describir las cinéticas de crecimiento celular.

El modelo cinético de Monod está dado por la siguiente ecuación:

$$\mu = \frac{\mu_{max} S}{K_s + S}$$

Donde  $\mu$  es la tasa específica de crecimiento (h-1),  $S$  es la concentración del sustrato (g/L) y  $K_s$  y  $\mu_{max}$  son constantes de Monod (g/L) y la máxima tasa específica de crecimiento (h-1), respectivamente.

En la formación de producto por célula se utiliza el modelo de Leudeking-Piret

$$\frac{dP}{dt} = \beta X + \alpha \frac{dX}{dt}$$

Donde  $\alpha$  y  $\beta$  están asociados a factores asociados y no asociados al crecimiento, respectivamente.  $X$  y  $P$  muestran la concentración celular y de producto.

Por otro lado, la ecuación logística es usada para analizar el crecimiento en la fase exponencial.

## **b Metodología de Superficie de Respuesta (MSR)**

Existen modelos para el diseño y optimización de procesos que pueden ser objetivo multivariable, ortogonales o de superficie de respuesta. Ambos ofrecen determinadas ventajas al momento de optimizar en algunos casos (Ng y col., 2010; Montgomery, 1991).

### **1) Los diseños factoriales completos**

Estos diseños generalmente emplean MSR. Los factores y niveles se combinan de una manera que el diseño tenga todas las posibles combinaciones. Este tipo de diseños de experimentos proporciona los efectos principales y los efectos de interacciones. Diseños con 2 niveles  $2^k$ , son la forma más simple de un diseño ortogonal. Diseños con tres o más niveles son frecuentemente para construir superficies de respuesta porque muestran los efectos no solo como factores lineales, sino también como cuadráticos. Los diseños factoriales completos pueden no ser viables para un gran número de factores por la complejidad y los costos. En estos casos se puede considerar un diseño factorial fraccionado como alternativa (Pereira y col., 2021).

### **2) Diseño Factoriales Fraccionandos**

Estos diseños involucran una preconfiguración seleccionada de las condiciones experimentales de un diseño completo. En otras palabras, solo algunas condiciones, del diseño factorial completo se emplean. Sin embargo, disminuir el número de experimentos hace imposible distinguir algunos efectos en los factores de estudio (Pereira y col., 2021).

### **3) Plackett-Burman DPB**

Un DPB, utiliza un número de corridas experimentales  $N$  y permite probar factores hasta  $N-1$ . DPB no considera las interacciones entre factores. Solo provee los efectos principales involucrados en el proceso. No se puede utilizar para obtener una superficie de respuesta y optimizar procesos. Como en los diseños  $2^k$ , DPB permite utilizar dos niveles por factor  $k$  (-1,+1), pero requiere un número menor de experimentos. Wu (2019), utilizó DPB para evaluar siete factores nombrados

inicialmente como pH,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , concentración de inóculo, tiempo de fermentación, temperatura, agitación y efecto del consorcio de *Aspergillus niger* y *Candida shehatae*. Donde se utilizaron solo 12 experimentos. Comparado con un diseño  $2^7$  se necesitarían 128 experimentos (Pereira y col., 2021).

#### 4) Central Compuesto (CCD)

Los CCD son los más utilizados para obtener superficies de repuestas. Permiten obtener modelos cuadráticos de segundo orden. Este tipo de diseños aplica cuando la distancia de los puntos axiales, como los puntos factoriales del diseño central compuesto, tienen la misma distancia central. Permitiendo respuestas disponibles en todos los puntos centralizados de la esfera al origen. La ecuación de segundo orden lo representa:

$$y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i x_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} x_i^2 + \sum_{i=1}^k \sum_{j=1}^k \beta_{ij} x_i x_j + \varepsilon$$

Dónde:  $y$  es la respuesta,  $\beta_0$  el intercepto,  $\beta_i$  representa los coeficientes de los efectos principales,  $\beta_{ij}$  los efectos de los coeficientes de las interacciones,  $\beta_{ii}$  son los términos de segundo orden y  $\varepsilon$  el componente de error aleatorio. El diseño consiste de puntos factoriales (-1,+1) y axiales  $(-\alpha, +\alpha)$  y de repeticiones al punto central (Pereira y col., 2021)..

#### 5) Box-Behnken

La diferencia entre un Box-Behnken y un CCD, es que el primero utiliza un tres niveles para el estudio de factores (-1, 0,+1) mientras que el segundo utiliza 5 niveles  $(-\alpha, -1, 0, +1, +\alpha)$ . El diseño Box-Behnken también emplean para obtener un modelo de segundo orden. El cual permite optimizar el proceso. Este diseño evita combinaciones de tratamientos innecesarios (Pereira y col., 2021).

## 2 Optimización de la ruta metabólica

### a Ingeniería metabólica

Las estrategias para mejorar la producción de metabolitos en un Bioproceso pueden ir desde la optimización por modelos matemáticos hasta la aplicación de ingeniería metabólica, aunque ambas ramas se relacionan estrechamente (Hansen y col., 2017; Unrean, 2016). Esta última ha sido utilizada

principalmente para el diseño de “microbial cell factories”, es decir células en las que el metabolismo esta direccionado prioritariamente hacia la producción de un metabolito específico con una alta eficiencia (Nielsen y Keasling, 2016). Existen dos métodos de ingeniería metabólica, el primero y más moderno se basa en la manipulación genética de rutas metabólicas. Mientras que el segundo manipula la absorción de nutrientes y flujo metabólico. A través del uso de inhibidores/inductores químicos o ajuste de parámetros físicos. Como la luz, temperatura, agitación, pH, etc. (Biggs y col., 2014).

### **1) Manipulación genética de rutas metabólicas**

Para la producción de etanol en un CBP, se ha empleado la ingeniería metabólica basada en alteraciones genéticas para para producir enzimas en microorganismos que de manera silvestre no lo hacen y para sobreexpresar enzimas a partir de promotores genético (Anasontzis y col., 2011). La ingeniería genética como apoyo a la ingeniería metabólica, es una de la estrategia novedosa y mayormente utilizada para el diseño de microorganismos productores de etanol lignocelulósico (Anasontzis y col., 2016; Papanek, 2016; Wang, 2015; Thirumalai Vasan y col., 2011; Kuyper y col., 2004).

### **2) Manipulación paramentos químicos, físicos y fisicoquímicos**

Además de la manipulación genética, la manipulación y ajuste de parámetros físicos y químicos dentro de la ingeniería metabólica, es muy utilizado. Para la producción de bioetanol 2G con microorganismos nativos esta estrategia es la mejor opción, debido a que el microorganismo no requiere de genes exógenos para realizar la bioconversión (Biggs y col., 2014). Sino, una optimización del flujo metabólico para incrementar los rendimientos del metabolito de interés (Zhao y col., 2015). Las condiciones físicas y fisicoquímicas como la agitación, temperatura, oxígeno disuelto y pH, son muy interesantes debido a que las condiciones a las que operan las enzimas dentro de las rutas metabólicas son muy específicas. Y la tasa catalítica ( $K_m$ ) y tasa de recambio ( $K_{kat}$ ), son muy susceptibles a estos cambios (Méndez-Hernández y col., 2019).

En cuanto a la manipulación química de los parámetros, principalmente está vinculada con la concentración de nutrientes, fuente de carbono y nitrógeno, la variación principalmente de estos nutrientes pueden redirigir la ruta de un producto a otro. Por ejemplo, altas concentraciones de nitrógeno inducen la producción de etanol en hongos como *M. circinelloides*, mientras que bajas concentraciones inducen a la formación de lípidos (Zhao y col., 2015). En el caso de la fuente de carbono, altas concentraciones de azúcares pueden desarrollar efectos metabólicos, como el efecto crabtree, donde se favorece la fermentación antes que la formación de biomasa a través del ciclo de Krebs (Lübbenhüsen y col., 2004). Otra estrategia química menos estudiada es el uso de micronutrientes que pueden participar como inductores o inhibidores de ruta. Ya sea por inducción catalítica, sobreexpresión de enzimas a través de la regulación de un gen promotor o a nivel celular regulando las bombas de transporte de nutrientes, facilitando mejor la absorción de la fuente de carbono.

### **3Tecnologías “-ómicas”**

Las Tecnologías -ómicas, recientemente han sido de gran apoyo dentro de la optimización de procesos. Pues permiten identificar diversas características, desde diferentes perspectivas. Un microorganismo capaz de producir etanol de la lignocelulosa directamente, necesita una gran variedad de enzimas específicas. Sin embargo, debido a la recalcitrancia y toxicidad biológica de lignocelulosa su degradación se dificulta (Chen y Dou, 2016). Por lo tanto, se ha requerido de microorganismos modificados y de comunidades de microorganismos para aumentar la eficiencia y estabilidad del proceso (Dionisi y col., 2015; Amore y Faraco, 2012). En los bioprocesos consolidados existen dos opciones, el diseño de microorganismos mediante ingeniería genética y metabólica, o la búsqueda de microorganismos silvestres que sean bioquímicamente competentes (Amore y Faraco, 2012). La primera opción parece ser la más conveniente, pero desarrollar un microorganismo puede llevar muchos años de investigación, y en algunos casos el comportamiento no es tan

exacto a lo predicho en una simulación. Por otra parte un microorganismo aislado de la naturaleza con estas capacidades disminuye el tiempo de investigación y técnicas como la genómica, transcriptómica, proteómica y metabolómica permiten hacer esto posible (Rosnow y col., 2017; Biggs y col., 2014). La genómica permite principalmente identificar microorganismos y enzimas efectivas para la producción de bioetanol de segunda generación (Krumova y col., 2018). La transcriptómica y proteómica permiten la caracterización adicional a los genes como la actividad enzimática e identificación de proteínas (den Haan y col., 2013; Cuero y Ouellet, 2005). Los análisis transcriptómicos permiten enfocar qué genes están activos durante la degradación de lignocelulosa y puede identificar qué cambios en la expresión de genes se presentan cuando se manipulan condiciones de crecimiento o sustrato (Daly y col., 2017). La genómica y transcriptómica permiten revelar el potencial basado en la función, pero la actividad funcional es pobremente inferida por correlación del contenido de genes o transcritos expresados. La identificación de proteínas durante la degradación de lignocelulosa o durante la fermentación permite identificar cuándo y dónde las proteínas clave son producidas. Otras de las tecnologías emergentes utilizadas en la producción de etanol son la metabolómica que permite identificar reacciones en las rutas metabólicas que se pueden mejorar, así como flujos metabólicos (Rosnow y col., 2017).

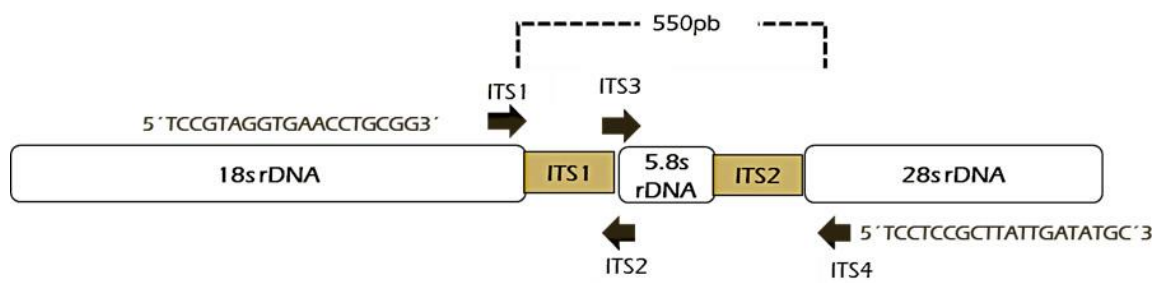
#### **a Genómica**

La genómica es la generación y análisis de secuencias de nucleótidos a partir del genoma o colecciones de cDNA. En el más básico nivel la genómica revela la estructura y organización del DNA, el metabolismo activo. La secuenciación genómica ha permitido la identificación de comunidades de microorganismos con potencial para ser usados en la producción de biocombustibles. Tal es el caso de las cepas de *Trametes* aisladas, identificadas y evaluadas por Okamoto y col. (2014). El método de identificación más aplicado es a través de la región ribosomal ITS (internal transcribed spacer, por sus siglas

en inglés), véase **Figura 6**, (Trabelsi y col., 2019). Además de la identificación de microorganismos, la secuenciación completa del genoma, ha permitido conocer el metabolismo de estos de manera putativa a través de análisis bioinformáticos. Teniendo como objetivo la producción de etanol se han generado secuencias del genoma de *Saccharomyces cerevisiae* y *Pichia stipitis*, entre otros hongos (Lebreton y col., 2020; Küberl y col., 2011). Pero también en bacterias como *Clostridium thermocellum*, una bacteria con un alto potencial para degradar lignocelulosa (Brown y col., 2007). Esta bacteria es un termófilo anaerobio, lignocelulolítico y etanológico. Al ser un microorganismo que puede transformar la biomasa directa en etanol. Para entender mejor el metabolismo en la producción de biocombustibles por el microorganismo Roberts y col. (2010), desarrollaron un modelo a partir del genoma de *C. thermocellum* (ATCC 27405), que consiste en 577 reacciones, 525 metabolitos intracelulares, 432 genes, y una representación de su proteóma y celulosoma. En un CBP la regulación genética se ha utilizado no solo para aumentar la producción de etanol, que es el principal objetivo, sino también para aumentar la tolerancia de los microorganismos a altas concentraciones de alcohol. Además, la identificación de genes puede estar relacionada con regiones conservadas o con rutas metabólicas. La regulación genética puede ser utilizada para sobreexpresar enzimas en alguna etapa del bioproceso que este siendo deficiente, durante la hidrólisis o la fermentación (Biggs y col., 2014).

*Saccharomyces cerevisiae* es el sistema biológico más utilizado para la producción de etanol (Lin y col., 2021). También es una levadura muy utilizada para la manipulación genética. En un estudio se integraron genes para expresar la enzima amilasa provenientes de *Thermomyces lanuginosus* para expresar la glucoamilasa (TLG1) y *Saccharomyces fibuligera* para expresar la  $\alpha$ -amilasa (SFA1), logrando obtener el 99% de consumo de almidón y el 73% del teórico máximo de etanol (Favaro y col., 2015).





**Figura 6.** Región ribosomal ITS (internal transcribed spacer). A la derecha se muestra la región ITS1, seguida de la 5.8s y al final la región ITS2 (Lafuente Rincón y col., 2015).

Se han reportados otros estudios en los que se ha sobreexpresado la producción de xilanasas en *Fusarium oxysporum* (Anasontzis y col., 2016). En las fermentaciones se observó que en las cepas modificadas existían una mayor actividad de xilanasas y mayor producción de etanol. Además de la sobreexpresión de enzimas, la genómica puede ser para el estudio de mutaciones en cepas silvestres. En un estudio realizado en *Clostridium phytofermentans*, se realizó una comparación genómica entre cepas silvestres y mutantes con tolerancia a altas concentraciones de etanol. Se observó que las cepas mutantes que tenían mayor tolerancia a etanol que las silvestres tenían deficiencia en el consumo de glucosa y un crecimiento más prolongado que en las silvestres. Por lo tanto concluyeron que aumentar la tolerancia a etanol en *C. phytofermentus* puede bajar los rendimientos de producción de etanol (Tolonen y col., 2015). Actualmente algunas herramientas de edición genómica como el CRISPR/Cas9 y MAGE/eMAGE facilitan la ingeniería genética, y no han pasado desapercibidos para ser utilizados en la producción de biocombustibles (Das y col., 2020; Javed y col., 2019). Con el surgimiento de métodos rápidos y directos, los investigadores se han visto en la necesidad de aplicarlos para mejorar rendimientos en la producción de metabolitos. Aunando a que la secuenciación de genomas ha reducido el costo en los últimos años. El empleo de análisis *in silico* permite proponer modelos basados en la intervención genómica para optimizar o diseñar rutas metabólicas. Además de las herramientas de edición y análisis de genes, la ingeniería metabólica se ha visto soportada por otras técnicas como el análisis de flujo metabólico y <sup>13</sup>C análisis de flujo metabólico. (Zhao y col., 2015). A pesar de que la genómica provee información sobre genes putativos o arreglos de genes, no provee una imagen completa de todo el proceso celular.

## **b Transcriptómica**

La transcriptómica puede ser utilizada para aumentar la producción de biocombustibles. Se define como la expresión global de genes de manera

cuantitativa mediante niveles de mRNA. Generalmente tiene 3 objetivos el primero es identificar todos los componentes del transcriptoma incluidos mRNAs, sRNAs y RNAs no codificantes. El segundo es identificar que genes están transcritos de 3-5' y, el tercero es cambios en los niveles de transcritos bajo cambios de condiciones fisiológicas o ambientales (Joshi y Mishra, 2022). Para entender las rutas metabólicas en la producción de biocombustibles la transcriptómica permite entender las regulaciones de los genes bajo diferentes variables inducidas al sistema. Las técnicas más utilizadas son los microarreglos, PCR tiempo real y la secuenciación de nucleótidos (Zhang y col., 2013). Estudiar la transcriptómica permite identificar genes no conocidos responsables de ciertos fenotipos, rutas metabólicas y procesos biológicos. Uno de los aspectos más estudiados en la producción de bioetanol es la tolerancia a etanol por las cepas.

Un estudio transcriptómico para comparar cepas silvestres y dos cepas tolerantes a etanol de *S. cerevisiae*, revela que durante la exposición a altas concentraciones de etanol las cepas tolerantes activan genes relacionados con la producción de lípidos (Oaf1p, Ino2p, y Adr1p) que muy probablemente se expresan para estabilizar la membrana celular. No obstante, estudiar la expresión de genes relacionados con el metabolismo de un microorganismo permite entender más allá de las modificaciones post traduccionales (Kasavi y col., 2016). De esta manera se demuestra que las ciencias –ómicas no trabajan por separado sino se complementan para obtener mejores resultados.

### **c Proteómica**

La Proteómica permite estudiar la acumulación de proteínas en un microorganismo, su localización celular, la abundancia y modificaciones post traduccionales. El empleo de geles de geles de poliacrilamida (PAGE) ha permitido evolucionar en el campo de Proteómica. La técnica más común es la dodecyl sulfato de sodio (SDS)- PAGE, que permite separar proteínas basado en su peso molecular. Sin embargo, esto solo permite separar una pequeña proporción de proteínas del proteóma completo. La técnica de electroforesis 2D

permite separar proteínas en base a su punto isoeléctrico como primera dimensión, seguida por la separación de peso molecular como una segunda dimensión. Dependiendo de la complejidad del extracto proteico, se pueden detectar cientos de proteínas. Para determinar la secuencia de aminoácidos, las proteínas pueden ser analizadas por diversas técnicas de espectro de masa (MS). Las más comunes son MALDI-TOF y cromatografía líquida acoplada a masas (LC-MS/MS). Las técnicas de Masas han facilitado la identificación de proteínas pero además la Proteómica puede verse asistida por las técnicas genómicas de secuenciación masiva (Ndimba y col., 2013). El proteoma depende mucho de las condiciones ambientales y de las fisiológicas del microorganismo. Dentro del cambio de bioenergía, específicamente en la producción de etanol, se han realizado algunos estudios, tal es el caso de *Kluveromyces marxianus* CCT 7735. Se observó la abundancia de algunas proteínas relacionadas como respuesta al estrés oxidativo provocado por altas concentraciones de etanol. Enzimas relacionadas con la producción de NADH fueron detectadas, que ayudan a eliminar las especies reactivas de oxígeno (ROS) (Alvim y col., 2019). De esta manera esta herramienta permite deducir si un gen se convierte en una proteína. La información generada a partir de un análisis proteómico puede ser utilizada para desarrollar estrategias de ingeniería genética.

#### **d Metabolómica**

La metabolómica es el estudio de metabolitos, se incluye la identificación y cuantificación en un nivel global dentro del sistema biológico. Las moléculas analizadas van desde ácidos orgánicos, ácidos grasos, aminoácidos, lípidos, carbohidratos y otros compuestos. Entender el metaboloma permite revelar flujos metabólicos en cualquier punto del tiempo. A su vez esto permite entender cómo funciona el metabolismo del microorganismo (Segers y col., 2019). Para la identificación de metabolitos se usan dos técnicas principalmente: Resonancia Magnética Nuclear (NMR) y/o espectro de masas (MS). La ventaja de la primera es que no destruye la naturaleza de la molécula y no se ve afectada por la

naturaleza química de las moléculas. La segunda tiene una alta sensibilidad y especificidad y se acopla a técnicas como cromatografía líquida LC o de gases GC (Giera y Walker, 2018). Muchos de los microorganismos utilizados en los bioprocesos consolidados no son muy aceptados debido a sus bajos rendimientos en cuanto a producción de etanol. El principal factor es la producción de otros metabolitos innecesarios que interfieren en el rendimiento y son pueden llegar a ser tóxicos para el mismo microorganismo. Por este motivo *Saccharomyces cerevisiae* ha sido muy estudiada y se ha modificado genéticamente para la producción de celulasas (Liu y col., 2017). Sin embargo, los microorganismos productores de celulasas también han sido estudiados para producir etanol. La idea de utilizar ciencias –ómicas en este contexto solucionaría mucho el paradigma. La metabolómica por su parte ofrece herramientas como el análisis de flujo metabólico, además de la identificación de metabolitos. El cual permite entender los puntos clave en el metabolismo de un microorganismo para inducir o atenuar una ruta en específico, y en consecuencia aumentar el rendimiento del metabolito de interés, en este caso etanol. *Zymomonas mobilis*, es una bacteria con altos rendimientos en la producción de etanol, la diferencia con *Saccharomyces cerevisiae* radica en que la primera produce menor biomasa aprovechando mejor el sustrato. Sin embargo, solo puede metabolizar glucosa, fructosa y sacarosa. Se han desarrollado recombinantes para metabolizar xilosa e hidrolizar celulosa y hemicelulosa (Xia y col., 2019). El principal reto en la fermentación con mutantes de *Z. mobilis* es la sobreproducción de ácido succínico. Sin embargo, en análisis de flujo se ha evaluado la posibilidad de que un *knockout* en las enzimas lactato deshidrogenasa y piruvato descarboxilasa puede reducir la síntesis de este metabolito innecesario (Lee y col., 2010).

El diseño de *microbial cell factories*, es decir células en las que el metabolismo esta direccionado prioritariamente hacia la producción de un metabolito específico con una alta eficiencia es una de las estrategias donde las ciencias –ómicas son aplicadas, especialmente la metabolómica (Nielsen y

Keasling, 2016). Claes y col. (2020), diseñaron una cepa de *Saccharomyces cerevisiae* que expresa 7 enzimas lignocelulolíticas como endoglucanasas,  $\beta$ -glucosidasas, celobiohirolasa I y II, xylanasa,  $\beta$ -xylosidasa y acetylxylan esterasa haciendo posible la conversión de lignocelulosa directamente en etanol. Sin embargo, en un sistema biológico que un microorganismo sea capaz de hidrolizar y fermentar hexosas y pentosas a la vez no es suficiente, también se presentan otros retos como los inhibidores que alteran el flujo metabólico, principalmente de ácidos orgánicos y derivados de furano por la degradación de lignina (Jönsson y col., 2013). La producción de ácidos orgánicos como el acético, fórmico o levulínico son capaces de disminuir el pH del sistema biológico y reducir la actividad de las ATPasa y por consecuencia la actividad de las enzimas hexoquinasa y fosfofrutoquinasa en la glucólisis que son dependientes de ATP, causando inhibición del flujo metabólico (den Haan y col., 2015). Por otro, lado los derivados de furano o furfural pueden ser tóxicos para las células del microorganismo tras la ruptura de la lignina (Wang y col., 2022). Se ha estudiado en *S. cerevisiae* que la sobreexpresión del gen *zwf1* que codifica para la glucosa-6-phosphato deshidrogenasa permite el crecimiento de la levadura en concentraciones normalmente tóxicas de derivados de furano (Paramasivan y col., 2022)

#### IV JUSTIFICACIÓN

El bioetanol como combustible se ha introducido rápidamente en el mercado energético debido a la alta demanda que existe principalmente en el sector transporte. Además, es un producto interesante por ser amigable con el ambiente y de bajo costo comparado con los combustibles fósiles. Sin embargo, la producción de bioetanol de segunda generación es una tecnología en transición que aún requiere de adecuaciones, principalmente en la hidrólisis de celulosa y hemicelulosa, y en fermentación de hexosas y pentosas. La cepa *Mucor* sp. (C1502), es capaz de desarrollar un CBP, aunado, a que es una cepa nativa y por lo tanto no requiere de ingeniería metabólica para rediseñar su metabolismo para la producción de etanol lignocelulósico. No obstante, aún se requiere de la regulación enzimática para poder direccionar el metabolismo durante la fermentación de hexosas y pentosas y obtener altos rendimientos de etanol. En este trabajo se propone evaluar el efecto de iones metálicos como el Zn y Ca para mejorar los rendimientos en la producción de etanol en *Mucor* sp. Una vez optimizado el proceso se podrá caracterizar el perfil de proteínas para analizar el efecto de los iones Zn y Ca sobre la acumulación de las proteínas. Además, será evaluado en un medio robusto proveniente de residuos agroindustriales, para determinar la viabilidad del bioproceso.

## **V HIPÓTESIS**

El suministro en condiciones óptimas de Zinc y Calcio en la fermentación de xilosa incrementa la producción de etanol a través de la regulación de proteínas en el metabolismo del azúcar.



## VI OBJETIVOS

### A OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de Zinc y Calcio en concentraciones óptimas para la producción de etanol en xilosa a partir de *Mucor* sp. (C1502) sobre la acumulación de proteínas y aplicarlo en un medio robusto proveniente de residuos agroindustriales.

### B OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Identificar molecularmente la cepa etanológica de *Mucor* sp. (C1502) nativa de Sinaloa a partir de la región espaciadora interna transcrita (ITS) y el gen 5.8S del ácido desoxirribonucleico ribosomal (ADNr).
2. Determinar nutrientes limitantes en el medio de cultivo para el consumo de glucosa y xilosa por la cepa de *Mucor* sp (C1502)
3. Evaluar el efecto del  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$  y  $CaCl_2$  de manera individual sobre la producción de etanol y xilitol en la fermentación xilosa.
4. Optimizar la concentración de los iones  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$  y  $CaCl_2$  a la que se produce mayor concentración de etanol en la fermentación de xilosa por *Mucor* sp. (C1502).
5. Aplicar el medio optimizado con  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$  y  $CaCl_2$  en la fermentación de *Mucor* sp. (C1502) empleando un hidrolizado ácido de xilosa de olote de maíz.
6. Evaluar el efecto de la concentración óptima de Zinc y Calcio sobre la acumulación de proteínas durante la fermentación xilosa por *Mucor* sp.

## VII MATERIALES Y METODOS

### A MATERIALES

#### 1Material biológico

La cepa *Mucor* sp. (C1502), fue proporcionada por la colección de hongos del laboratorio de Biocombustibles N. 22 de la Facultad de Ciencias Químico Biológicas de la Universidad Autónoma de Sinaloa, en Culiacán, Sinaloa. Para reactivar la cepa, se inoculó en medio de cultivo agar papa dextrosa (PDA, por sus siglas en inglés) 100  $\mu$ L de esporas y micelio suspendidos en agua estéril, provenientes de un tubo de ensayo en el que se encuentra preservada la cepa de *Mucor* spp. (C1502). Una vez cultivado en la placa con el medio de cultivo, se incubó a 28°C durante 7 días.

#### 2Hidrolizado de olote

Para evaluar la aplicación del medio de cultivo optimizado en un medio robusto se utilizó un residuo de hidrolizado ácido de olote de maíz (HAOM) donado por el laboratorio de bioenergéticos, del Centro interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral y Regional Unidad Sinaloa (CIIDIR, IPN). El HAOM se entregó caracterizado con una concentración de xilosa de 20 g/L.

### B MÉTODOS

#### 1Identificación molecular de *Mucor* sp.

##### a Extracción de ácido desoxirribonucleico (ADN)

El procedimiento para la extracción de ADN se realizó a partir de micelio cultivado en caldo YPD (extracto de levadura 10 g/L, peptona 20 g/L y glucosa 20g/L) a 28°C, 150 rpm por 7 días. Posteriormente, el micelio se recuperó por centrifugación a 3030 x g por 5 min (centrifuga Eppendorf, 5702 r, US) descartando el sobrenadante. En un tubo de 1.5 mL se añadieron 50 mg de micelio y 500  $\mu$ L de solución DNAzol® (Invitrogen, US). Se maceró con un pistilo y se dejó reposar durante 10 min. Enseguida, se centrifugó (centrifuga

spectrafuge 16M, US) por 10 min a 11430 x g. Una vez centrifugados en un tubo nuevo se añadieron 500 µL del sobrenadante y 1 mL de etanol absoluto, y se dejó reposar por 5 min a temperatura ambiente. Se centrifugó a 13715 x g por 5 min. El sobrenadante obtenido se descartó y se realizó un lavado agregando 1 mL de etanol al 75% a la pastilla y se dejó reposar 5 min. Posteriormente, se centrifugó a 13,715 x g por 2 min y se repitió nuevamente un segundo lavado. Al finalizar se descartó nuevamente el sobrenadante y se dejó secar la pastilla a temperatura ambiente. La pastilla se resuspendió con 250 uL de agua ultrapura (mili-Q). La calidad del ADN se visualizó por electroforesis en gel de Agarosa al 1% (p/v) con amortiguador TAE 1X (Tris-Acetato 40 mM, pH 8.0, EDTA 1 mM) a 100 V, 400 mA, por 25 min. El gel se tiñó con una solución de bromuro de etidio (0.01 µg/mL) y los productos se digitalizaron en presencia de luz ultravioleta con un fotodocumentador Chemidoc XRS (BIO-RAD, CA, USA).

#### **b Amplificación de la región ITS por PCR**

Para el coctel de reacción se utilizaron 0.5 µL de polimerasa 5 U/L (go taq DNA polimerasa, US), 10 µL de buffer 5X (go taq flexi buffer, US), 2.5 µL de solución de MgSO<sub>4</sub> 25 mM, 33 µL de agua libre de nucleasas y 1 µL de los oligos ITS1 (5«-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3«) e ITS4 (5«-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3«) reportados por (Güzeldağ y Colak, 2007), para amplificar el fragmento que abarca las regiones ITS1, 5.8 S e ITS2. La amplificación se realizó en un termociclador MULTIGENE (LabNet, USA), programado con un período inicial de desnaturalización a 95°C por 2 min, seguido de 30 ciclos de 1 min a 95°C (desnaturalización), 1 min a 55°C (unión de iniciadores) y 1 min a 72°C (extensión), con un período final de extensión a 72°C por 5 min (Suárez-Medellín y col., 2012; Moncalvo y col., 1995; Vilgalys y Hester, 1990; Pineda-Hidalgo y col. 2011). El producto amplificado se separó por electroforesis en gel de agarosa al 1% (p/v) y bromuro de etidio, bajo las condiciones de 100 V 400 mA por 25 min. El producto amplificado correspondiente al amplicón esperado se cortó del gel y se purificó utilizando kit

QIAquick (Qiagen, US). Se evaluó la cantidad y calidad del ADN purificado por espectrometría mediante la relación O.D. 260/280nm este en un rango de 1.7-2.0 utilizando Nanodrop 2000 utilizando como blanco la solución EB del kit de purificación.

### **c Secuenciación de ADN**

Las muestras se secuenciaron por el método de terminación de cadena de Sanger y col. (1977), en la Unidad de secuenciación del LANGEBIO, Cinvestav en Irapuato, Guanajuato.

### **d Análisis de secuencia por BLAST**

El análisis de la secuencia obtenida se realizó en un programa informático de alineamiento de secuencias de ADN, denominado BLAST (Basic Local Alignment Search Tool).

## **2 Fermentación en diferentes fuentes de carbono**

El desempeño de la cepa de *Mucor* sp. (C1502) para consumir hexosas y pentosas, se realizó en un medio de cultivo específico para el género y para la producción de etanol. Se utilizaron dos diferentes fuentes de carbono glucosa y xilosa, y la combinación de ambos. Se evaluó el consumo de azúcares. A partir de los datos obtenidos, se identificó el azúcar o azúcares en los que hay una limitación en el consumo por efecto de un nutriente. Considerando como condición: *si la concentración de azúcar es constante en un lapso considerable de tiempo, existe un nutriente limitante*. Posteriormente, se realizó una prueba pulsos o de sustracción de nutrientes, para identificar el o los nutrientes que limitaban el consumo del azúcar. Posteriormente, reajusta la concentración del nutriente mediante un diseño factorial.

### **a Fermentación**

La fermentación se realizó en un matraz Erlenmeyer de 125 mL. Primero se prepararon 50 mL de caldo de glucosa, xilosa o glucosa/xilosa (1:2) a 50 g/L; extracto de levadura 5 g/L;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  3.5 g/L;  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  7.5 g/L; y  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

0.75 g/L (Millati y col., 2005). El medio de cultivo se ajustó a pH de 5.5 con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> utilizando potenciómetro (Thermoscientific, ORION STAR A211, USA). Posteriormente, se esterilizó en autoclave (YAMATO, SK110c JP) a 121°C, 1.1 Kg/cm<sup>2</sup> por 15 min. Para la inoculación se agregó el 10% correspondiente al volumen total del caldo de cultivo. El inóculo se preparó con 48 h de anticipación en un matraz de 250 mL utilizando glucosa como fuente de carbono a 50 g/L; extracto de levadura 5 g/L; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 3.5 g/L; (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 7.5 g/L; y MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.75 g/L), se añadieron 3 cuadros de micelio de *Mucor* sp. (C1502), de aproximadamente 1 cm<sup>2</sup>, por cada 100 mL de caldo. El hongo se cultivó 7 días previos a utilizarse en el inóculo, en placas petri de 9 mm con PDA. Las condiciones de cultivo para el inóculo y fermentaciones fueron una temperatura de 28°C y agitación de 150 rpm. El tiempo de fermentación fue indeterminado hasta que la concentración de los azúcares sea ~0 g/L. La toma de muestras se realizó cada 12 horas, tomando 1.5 mL del cultivo en un microtubo por cada replica y se almacenó a -20°C en congelador.

#### **b Cuantificación de azúcar**

La cuantificación de azúcares reductores se realizará por el método de DNS (Miller, 1959). Se preparará una solución de DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico) 7.06 g/L, NaOH 13.47 g/L, sal Rochelle 216.10 g/L, metasulfito de sodio 5.86 g/L. La solución se deja en agitación por 24 horas. Se preparará una curva de calibración con estándar de glucosa a concentraciones de 0.5, 1, 1.5, 2, 3 mg/ml. Posteriormente se toman 90 µL de cada estándar y se le agregaron 180 µL de solución de DNS. Se colocará a baño maría a 100°C por 5 min. Enseguida se detendrá la reacción en refrigerador a 4°C por un min. Finalmente, se tomarán 225 µL y se aforará a 1 mL con agua destilada, se leerá la absorbancia a 540 nm de longitud de onda en espectrofotómetro (Thermoscientific, Genesys 10S UV VIS, USA). Las muestras serán centrifugadas a 3030 x g para precipitar los sólidos por 15 min. El sobrenadante se tratará de igual manera que los estándares y se determinará la concentración utilizando la curva de calibración

en mg/mL.

### **c Identificación de nutrientes limitantes**

Una vez identificadas las fermentaciones donde su consumo de azúcar es limitado. Se realizó nuevamente una serie de fermentaciones, excluyendo uno de los nutrientes en cada experimento, obteniendo diferentes combinaciones (**Cuadro 3**). A partir de un análisis en las curvas de consumo de azúcar, una disminución lenta y prolongada representaba una limitación por el nutriente.

### **d Reajuste de la concentración de nutrientes**

A partir de los nutrientes identificados se propusieron modelos unifactoriales para regular el consumo del azúcar en el medio de cultivo. Los resultados obtenidos a partir de este diseño se compararon para determinar si existen diferencias significativas mediante una ANOVA unifactorial y mediante la prueba paramétrica de Tukey con un nivel de significancia de  $\alpha = 0.05$ , se compararon en el software estadístico Minitab 17.

## **3 Evaluación del Zinc y Calcio en la producción de etanol**

Se evaluaron mediante diseños unifactoriales el efecto individual del  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  y  $\text{CaCl}_2$ , en la fermentación de glucosa, xilosa y la combinación de glucosa/xilosa (2:1). Se manejaron 2 niveles por cada sal, para  $\text{CaCl}_2$  2 y 1.5 g/L y para  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  1 y 0.5 g/L. Ambos se contrastaron contra un testigo, que no cometía las sales. Como variable de respuesta de considero el rendimiento g xilitol/g xilosa y g etanol/g xilosa.

### **a Fermentación**

La fermentación se realizó en un matraz Erlenmeyer de 125 mL. Primero se prepararon 50 mL de caldo de glucosa, xilosa o glucosa/xilosa (1:2) a 50 g/L; extracto de levadura 5 g/L;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  3.5 g/L;  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  7.5 g/L; y  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.75 g/L (Millati y col., 2005). El medio de cultivo se ajustó a pH de 5.5 con  $\text{H}_2\text{SO}_4$  utilizando potenciómetro (Thermoscientific, ORION STAR A211, USA).

**Cuadro 3.** Prueba de pulsos identificación de nutrientes limitantes

| TRATAMIENTOS | NUTRIENTES (g/L)     |                              |                          |   |
|--------------|----------------------|------------------------------|--------------------------|---|
|              | Extracto de levadura | $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ | $\text{KH}_2\text{PO}_4$ | $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ |
| 1            | 0                    | 7.5                          | 3.5                      | 0.75                                      |
| 2            | 5                    | 0                            | 3.5                      | 0.75                                      |
| 3            | 5                    | 7.5                          | 0                        | 0.75                                      |
| 4            | 5                    | 7.5                          | 3.5                      | 0   |

Posteriormente, se esterilizó en autoclave (YAMATO, SK110c JP) a 121°C, 1.1 Kg/cm<sup>2</sup> por 15 min. Para la inoculación se agregó el 10% correspondiente al volumen total del caldo de cultivo. El inóculo se preparó con 48 h de anticipación en un matraz de 250 mL utilizando glucosa como fuente de carbono a 50 g/L; extracto de levadura 5 g/L; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 3.5 g/L; (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 7.5 g/L; y MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.75 g/L), se añadieron 3 cuadros de micelio de *Mucor* sp. (C1502), de aproximadamente 1 cm<sup>2</sup>, por cada 100 mL de caldo. El hongo se cultivó 7 días previos a utilizarse en el inóculo, en placas petri de 9 mm con PDA. Las condiciones de cultivo para el inóculo y fermentaciones fueron una temperatura de 28°C y agitación de 150 rpm. El tiempo de fermentación fue indeterminado hasta que la concentración de los azúcares sea ~0 g/L. La toma de muestras se realizó cada 12 horas, tomando 1.5 mL del cultivo en un microtubo por cada replica y se almacenó a -20°C en congelador.

#### **b Cálculo de rendimientos**

Los rendimientos se calcularon en cada tiempo a partir de las 12 h, utilizando las siguientes formula:

$$Y_{P/S} = \frac{(g \text{ etanol} - g \text{ etanol}_{t=0})}{(g \text{ azúcar} - g \text{ azucar}_{t=0})}$$

$$Y_{P/S} = \frac{(g \text{ xilitol} - g \text{ xilitol}_{t=0})}{(g \text{ azúcar} - g \text{ azucar}_{t=0})}$$

#### **c Cuantificación de azúcares, etanol y xilitol**

La concentración de etanol, xilitol, glucosa y xilosa se cuantificaron por UHPLC (Ultra-High-Pressure Liquid Chromatography, por sus siglas en inglés) en un equipo de la marca Acquity Arc (WATERS, Milford, MA, USA). Se utilizó como fase móvil una solución de ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) al 0.005 M preparada en agua grado HPLC. El flujo utilizado fue de 0.6 mL/min en una columna de exclusión de iones Aminex HPX-87H (300 × 7.8 mm) (BIO-RAD, Hercules, CA, USA). Las muestras se descongelaron, se filtraron en filtros de 45 μm y se



introdujeron al muestreador del equipo.

#### **d Análisis estadístico**

Los resultados obtenidos a partir de este diseño se compararon para determinar si existen diferencias significativas mediante una ANOVA unifactorial y mediante la prueba paramétrica de Tukey con un nivel de significancia de  $\alpha=0.05$ , en software estadístico Minitab 17.

### **4 Optimización de $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ y $CaCl_2$ por MSR**

#### **a Diseño de experimentos**

Para determinar la concentración óptima de Zinc y Calcio, se realizó una optimización por metodología de superficie de respuesta (MSR) utilizando el software Design-Expert 10.0. Para evaluar el efecto de estas dos variables independientes (X) se empleó un diseño central compuesto (DCC) donde  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$  (X1, 0.0 a 1.5 g/L) y  $CaCl_2$  (0.0 a 2.5 g/L) fueron las concentraciones en el caldo de fermentación. Las variables dependientes (Y) fueron el rendimiento de etanol (Y1, g etanol/g xilosa) y rendimiento de xilitol (Y2, g xilitol, g xilosa). Los rendimientos se calcularon a partir de la concentración de etanol, xilitol y xilosa (g/L), esta última se obtuvo como la media de un triplicado en cada experimento. Una vez que se registraron los valores para (Y), se seleccionó un modelo para cada variable independiente basado en la sugerencia del software. Posteriormente, se realizó el análisis de varianza (ANOVA, por sus siglas en inglés) para verificar la significancia del modelo bajo el criterio estadístico determinado donde la probabilidad es mayor a F ( $p>F$ ). Aplicando un procedimiento de regresión, los términos no significativos ( $p>0.1$ ) fueron eliminados de la ecuación de segundo orden polinomial y se diseñó una nueva ecuación para obtener el modelo predictivo para cada variable de respuesta. A partir del método numérico se evaluó la deseabilidad que permitió visualizar la mejor combinación para un máximo rendimiento de etanol. El modelo se configuró para evaluar las variables  $X=(X_1, X_2)$  en cualquier punto de la zona experimental, donde el modelo predecía los valores para las variables de

respuesta Y1 (X) y Y2 (X). Finalmente, Yi (X) se transformó en valores de di (X) (0,1) donde 1 representa el valor óptimo de deseabilidad (D), sin embargo un valor de 0.6 a 0.9 puede ser considerado una estimación aceptable.

## **b Fermentación**

En un matraz Erlenmeyer de 125 mL se prepararon 30 mL de caldo de glucosa o xilosa a 50 g/L; extracto de levadura 5 g/L (para glucosa) y 7.5 g/L (para xilosa);  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  3.5 g/L;  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  7.5 g/L; y  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.75 g/L (Millati y col., 2005), más la concentración de Zinc en  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  y Calcio en CaCl indicada en el diseño de experimento. El medio de cultivo se ajustó a pH de 5.5 con  $\text{H}_2\text{SO}_4$  utilizando potenciómetro (Thermoscientific, ORION STAR A211, USA). Posteriormente, se esterilizó en autoclave (YAMATO, SK110c JP) a 121°C, 1.1 Kg/cm<sup>2</sup> por 15 min. Para la inoculación se agregó el 10% correspondiente al volumen total del caldo de cultivo. El inóculo se preparó con 48 h de anticipación en un matraz de 250 mL utilizando glucosa como fuente de carbono a 50 g/L; extracto de levadura 5 g/L;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  3.5 g/L;  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  7.5 g/L; y  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.75 g/L), se añadieron 3 cuadros de micelio de *Mucor* sp. (C1502), de aproximadamente 1 cm<sup>2</sup>, por cada 100 mL de caldo. El hongo se cultivó 7 días previos a utilizarse en el inóculo, en placas petri de 9 mm con PDA. Las condiciones de cultivo para el inóculo y fermentaciones fueron una temperatura de 28°C y agitación de 150 rpm. El tiempo de fermentación fue determinado en base a la primera fermentación. La toma de muestras se realizó cada 12 horas, tomando 1.5 mL del cultivo en un microtubo por cada replica y se almacenaron a -20°C.

## **c Análisis analíticos**

La concentración de etanol, xilitol, glucosa y xilosa se cuantificaron por UHPLC (Ultra-High-Pressure Liquid Chromatography, por sus siglas en inglés) en un equipo de la marca Acquity Arc (WATERS, Milford, MA, USA). Se utilizó como fase móvil una solución de ácido sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) al 0.005 M preparada en agua grado HPLC. El flujo utilizado fue de 0.6 mL/min en una columna de

exclusión de iones Aminex HPX-87H (300 × 7.8 mm) (BIO-RAD, Hercules, CA, USA). Las muestras se descongelaron, se filtraron en filtros de 45 µm y se introdujeron al muestreador del equipo.

#### **d Comprobación del modelo**

Una vez optimizadas las concentraciones  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$  y  $CaCl_2$  se realizó nuevamente la fermentación para comprobar los rendimientos de etanol y xilitol y se compararon contra un control que no contenía Zinc y Calcio.

#### **e Análisis estadísticos**

Los resultados obtenidos a partir de la comprobación se compararon para determinar si existen diferencias significativas mediante una ANOVA unifactorial y posteriormente mediante la prueba paramétrica de Tukey con un nivel de significancia de  $\alpha = 0.05$ , en software estadístico Minitab 17.

### **5 Fermentación por *Mucor* sp. (C1502) en HAOM**

#### **a Fermentación**

En un matraz Erlenmeyer de 125 mL se agregaron 20 mL de hidrolizado ácido de olote con una concentración de xilosa de 20 g/L; extracto de levadura 7.5 g/L;  $KH_2PO_4$  3.5 g/L;  $(NH_4)_2SO_4$  7.5 g/L; y  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.75 g/L (Millati y col., 2005), más la concentración de  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$  y  $CaCl_2$  optimizadas. El medio de cultivo se ajustó a pH de 4.85 con  $H_2PO_4$  utilizando potenciómetro (Thermoscientific, ORION STAR A211, USA). Posteriormente, se esterilizó en autoclave (YAMATO, SK110c JP) a 121°C, 1.1 Kg/cm<sup>2</sup> por 15 min. Para la inoculación se agregó el 10% correspondiente al volumen total del caldo de cultivo. El inóculo se preparó con 48 h de anticipación en un matraz de 250 mL utilizando glucosa como fuente de carbono a 50 g/L; extracto de levadura 5 g/L;  $KH_2PO_4$  3.5 g/L;  $(NH_4)_2SO_4$  7.5 g/L; y  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.75 g/L), se añadieron 3 cuadros de micelio de *Mucor* sp. (C1502), de aproximadamente 1 cm<sup>2</sup>, por cada 50 mL de caldo. El hongo se cultivó 7 días previos a utilizarse en el inóculo, en placas petri de 9 mm con PDA. Las condiciones de cultivo para el inóculo y fermentaciones fueron una temperatura de 28°C y agitación de 150 rpm. La toma

de muestras se realizó cada 12 horas, tomando 1.5 mL del cultivo en un microtubo por cada replica y se almacenaron a -20°C.

#### **b Cuantificación de biomasa**

La biomasa generada en el cultivo se evaluó mediante la técnica de peso seco al final de la fermentación. El micelio contenido en cada muestra se filtró al vacío en papel Whatman N.1, el cual era previamente secado a peso constante (12 horas, 80°C) y tarado. Las muestras filtradas se secaron en el horno, durante 12 horas, la diferencia en peso entre el papel filtro tarado y con biomasa es la concentración en g/L.

#### **c Cuantificación de metabolitos**

La concentración de glucosa, xilosa, xilitol, glicerol, ácido acético y etanol, se cuantificaron por UHPLC (Ultra-High-Pressure Liquid Chromatography, por sus siglas en inglés) en un equipo de la marca Acquity Arc (WATERS, Milford, MA, USA). Se utilizó como fase móvil una solución de ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) al 0.005 M preparada en agua grado HPLC. El flujo utilizado fue de 0.6 mL/min en una columna de exclusión de iones Aminex HPX-87H (300 x 7.8 mm) (BIO-RAD, Hercules, CA, USA). Las muestras se descongelaron, se centrifugaron a 13 000 x g, seguido de una filtraron en filtros de 45 µm y se introdujeron al muestreador del equipo.

#### **d Tasa específica de crecimiento $\mu$ y coeficiente de productividad específica $\alpha$ .**

Para determinar el efecto del zinc y calcio sobre la fermentación del hidrolizado de olote, así como la cantidad de etanol por biomasa por h, se demostrará mediante el coeficiente específico de productividad por la ecuación de Luedeking y Piret.. Para determinar el coeficiente de productividad previamente debe ser calculada la tasa específica de crecimiento por la ecuación logística como se expresa en la siguiente ecuación:

$$\frac{dx}{dt} = f(x) = \mu X(1.0 - X/X_{max}) \quad (1)$$

Donde  $\mu$  y  $X_{max}$  son tasa específica de crecimiento y máxima concentración de biomasa obtenida, respectivamente. La forma integrada usando  $X_0=X$  ( $t=0$ ) presenta una variación sigmoidea en  $X(t)$  [ec. (2)] que puede representar empíricamente la fase exponencial y la fase estacionaria (Ollis & Weiss, 1980).

$$X(t) = \frac{X_0 e^{\mu t}}{1.0 - \left(\frac{X_0}{X_{max}}\right)(1.0 - e^{\mu t})} \quad (2)$$

Reordenando se obtiene la ec. (3):

$$\mu t = -\ln \left[ \left( \frac{X_{max}}{X_0} \right) - 1.0 \right] + \ln \left[ \left( \frac{\bar{X}}{1 - \bar{X}} \right) \right] \quad (3)$$

Donde  $\bar{X} = X(t)/X_{max}$ . La gráfica de  $\ln \left[ \left( \frac{\bar{X}}{1 - \bar{X}} \right) \right]$  contra el tiempo produce una línea de pendiente  $\mu$  y intercepto igual a  $-\ln \left[ \left( \frac{X_{max}}{X_0} \right) - 1.0 \right]$  (Ollis & Klimek, 1980).

Se utilizó el modelo matemático de Ludecking-Piret para determinar el coeficiente de productividad específica  $\alpha$  y  $\beta$ .

$$\frac{dp}{dt} = \beta X + \alpha \frac{dX}{dt} \quad (4)$$

Donde  $\alpha$  y  $\beta$  son constantes que pueden modificarse con las condiciones de fermentación (temperatura, pH, etc.). La comodidad de este modelo es que  $\beta$  puede ser evaluado en la fase estacionaria para evaluar la productividad de metabolitos secundarios y  $\alpha$  en la fase exponencial para evaluar la productividad de metabolitos primarios (Ollis & Weiss, 1980).

Integrando la ec. (4), usando la ec. (2) para  $X(t)$ , da una ecuación con dos condiciones iniciales ( $X_0, P_0$ ), una condición final ( $X_{max}$ ) y tres parámetros ( $\mu, \alpha$  y  $\beta$ ):

$$P(t) = P_0 + \alpha X_0 \left( \frac{e^{\mu t}}{1 - \left(\frac{X_0}{X_{max}}\right)(1 - e^{\mu t})} - 1 \right) + \beta \frac{X_{max}}{\mu} \ln \left( 1 - \frac{X_0}{X_{max}} (1 - e^{\mu t}) \right) \quad (5)$$

La pendiente de esta ecuación  $\alpha$ , se obtiene al comparar  $P(t)-P_0$  contra

$$A = X_0 \left( \frac{e^{ut}}{1 - \left( \frac{X_0}{X_{max}} (1 - e^{ut}) \right)} - 1 \right), \beta \text{ en la fase exponencial se considera } 0.$$

## 6 Acumulación de Proteínas

### a Extracción de proteínas

La extracción de proteínas se realizó a partir de micelios y caldo liofilizados, obtenidos a partir de un cultivo de xilosa a la concentración de óptima de zinc y calcio, acorde a la metodología de Tang y col. (2017) con modificaciones. Se consideró el tiempo al que se produce un mayor rendimiento de etanol y al que se produce mayor rendimiento de xilitol. Se tomaron 200 mg de muestra y se homogenizaron con una solución de TCA-acetona al 10%. Posteriormente, se dejó en reposo a -20°C por 1 h. En el siguiente paso se centrifugó a 14,000 x g por 15 min a 4°C, se descartó el sobrenadante y la pastilla se lavó con acetona fría y se almacenó nuevamente a -20° por 1 h, repitiendo el proceso 2 veces más. Las pastillas se secaron a temperatura ambiente y se resuspendieron en amortiguador de extracción (Sacarosa 0.7 M; NaCl 0.1M; Tris-HCl 0.5 M pH 7.5; EDTA 50 mM, DTT 0.2% p/v), enseguida se agregó un volumen igual de fenol saturado (pH 7.5) y se homogenizó por 30 min a 4°C. La mezcla se centrifugó a 5,000 x g por 10 min a 4°C para separar la fase fenólica, este proceso se repitió dos veces más y se combinaron las fases fenólicas obtenidas, se agregaron 5 volúmenes de acetato de amonio 0.1 M en metanol y se dejaron precipiar las proteínas a -20 °C durante 1 h. Las proteínas se recuperaron por centrifugación a 14 000 x g durante 35 min a 4°C; las pastillas obtenidas se lavaron con metanol frío y se centrifugaron a 14 000 x g durante 15 min a 4°C, se descartó el sobrenadante y se repitió el procedimiento dos veces más. Posteriormente, se realizaron lavados con acetona fría y se centrifugaron a 14, 000 x g durante 15 min a 4°C, el procedimiento se repitió dos veces más, la pastilla obtenida se secó a temperatura ambiente para eliminar los residuos de los solventes. Finalmente, se resuspendieron las proteínas en 200 µL de amortiguador de rehidratación (Urea 8 M, DTT 0.01 M, CHAPS 2% p/v)

**b Cuantificación de proteínas**

La concentración de proteínas se determinó colorimétricamente utilizando el método descrito por Bradford (1976). Se utilizó albúmina de suero bovino (BSA) como estándar en la construcción de la curva de calibración

**c Separación por SDS PAGE**

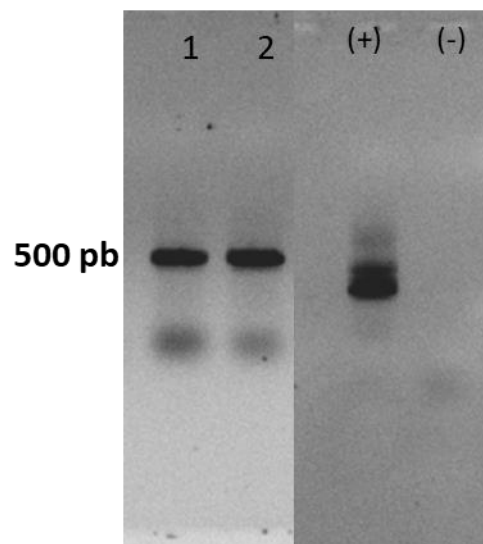
La separación se realizó de acuerdo con Laemmli (1970). Se utilizó una unidad electroforética vertical MP3 (Bio-Rad, Hércules, CA, EUA) y una fuente de poder EC600-90 (Thermo EC, Waltham, MA, USA). Los extractos de proteínas de cada una de las muestras se mezclaron con un amortiguador de muestra [Tris-HCl 62.5 mM, pH 6.8, SDS 2% (p/v), glicerol 25% (v/v), 2-mercaptoetanol 5% (v/v), azul de bromofenol 0.01%] y después se aplicaron en los pozos de geles de 12.5% (p/v); para su separación a voltaje constante (100 V) durante aproximadamente 1.5 h. Las proteínas se visualizaron por tinción con una solución de azul brillante de Coomassie R-250 0.25% (p/v) (Sigma, St Louis, MO, USA) en metanol 40% (v/v) y ácido acético 10% (v/v). Las imágenes de los geles se adquirieron con un sistema de fotodocumentación XRS (Bio-Rad, Hércules, CA, EUA).

## VIII RESULTADOS Y DISCUSIONES

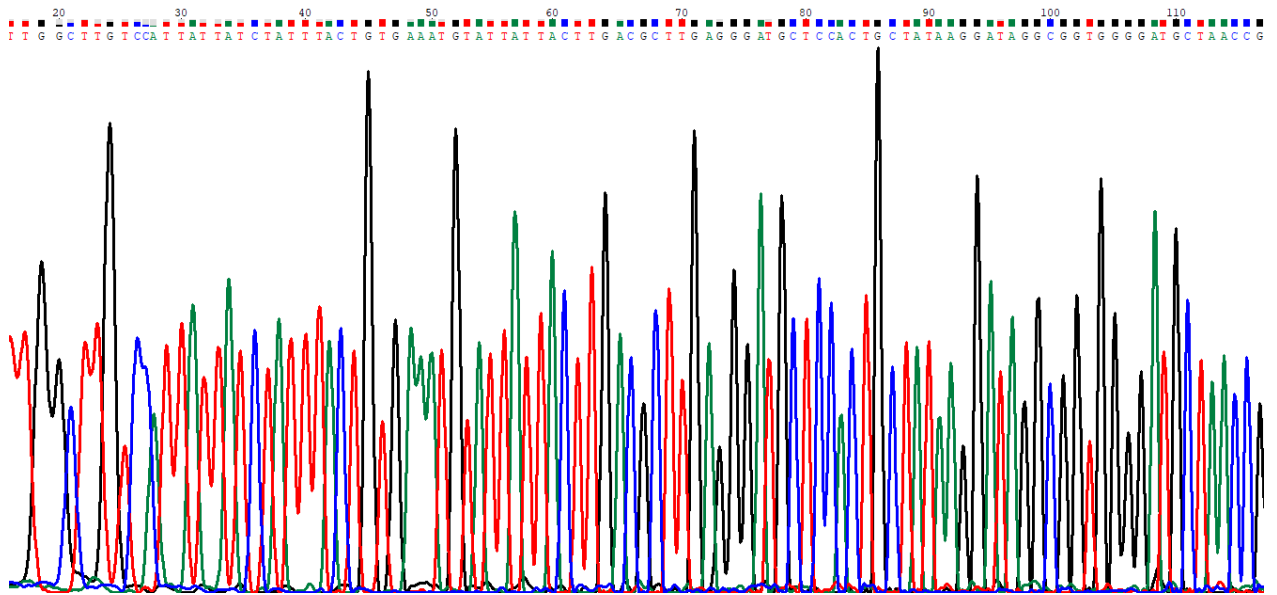
### A IDENTIFICACIÓN MOLECULAR

La extracción de ADN genómico de los aislados de *Mucor* (C1502) se realizó utilizando el protocolo DNAzol® (Invitrogen, US). Posteriormente, se verificó la integridad del ADN mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%. Como resultado de la amplificación de regiones ITS1/ITS4 se obtuvieron productos de PCR cuyo peso molecular fue aproximadamente de 500 pb usando el marcador de peso molecular. En la Figura 7, se muestran los amplicones en gel de agarosa, se presenta un control positivo y uno negativo. En el caso de *Mucor* existen reportes que puede variar entre 306 a 750 pb (Ziaee, 2016). En la Figura 8 y 9 se muestra el electroferograma para los amplicones de ITS 1 e ITS4 de la cepa C1502. Estos gráficos muestran un pico por color para cada nucleótido, solo se consideraron los picos altamente definidos, y se descartaron los que perdían definición o forma, generalmente los nucleótidos se consideraron a partir de las 50 pb secuenciadas y terminaban alrededor de aproximadamente 500 pb, descartando los más de 1000 pb obtenidos en la secuencia cruda. A través de estos electroferogramas se obtuvieron las secuencias en formato FASTA, tal como aparecen en las Figuras 10 y 11. Al realizar el análisis bioinformático de este par de secuencias, ITS1 e ITS4, se obtuvo la secuencia consenso de 514 pb. En la Figura 12 se muestra la secuencia consenso ITS1, 5.8S rARN e ITS2. La secuencia ITS1, 5.8S rARN e ITS2 fue depositada en Genbank se muestra en la Figura 13. La secuencia consenso se ingresó al banco de genes del NCBI a través de la plataforma *Bank it* Una vez aceptada se originó un reporte con el número de acceso y características que describen la secuencia. La secuencia obtenida contiene el gen ITS1 y 5.8S ARNr completas y el gen ITS2 parcial. La secuencia de *Mucor* se registró como ITS1 y 5.8S ARNr completas y el gen ITS2 parcial.

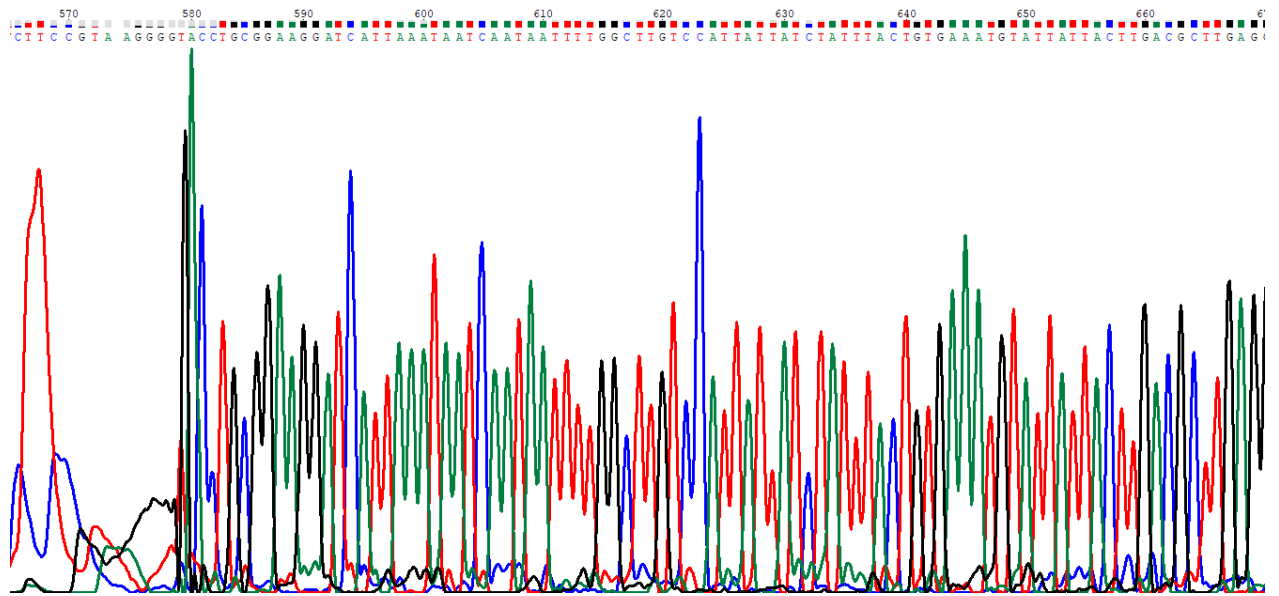




**Figura 7.** Electroforesis de ITS 1 y 2 como producto de PCR de en *Mucor circinelloides* C1502.



**Figura 8.** Electroferograma parcial de ITS1 en *Mucor circinelloides* C1502.



**Figura 9.** Electroforegrama parcial de ITS4 en *Mucor circinelloides* C1502.

```
GTGCTTATTCATAAATTTGGCTTGTCCATTATTATCTATTTACTGTGAAATGTATTATTACTTGACGCTTGAGGGATGCT
CCACTGCTATAAGGATAGGCGGTGGGGATGCTAACCGAGTCATAATCAAGCTTAGGCTTGGTATCCTATTATTATTTACC
AAAAGAATTCAGAAATTAATATTGTAACATAGACCTAAAAAATCTATAAAACAACTTTAAACAACGGATCTCTTGGTTCTC
GCATCGATGAAGAACGTAGCAAAGTGCATAACTAATGTGAATTGCATATTCAGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCAAC
TTGCGCTCATTGGTATPCCAATGAGCACGCCTGTTTCAGTATCAAAACAAACCCCTCTATCCAACATTTGTTGAATAGGA
ATACTGAGAGTCTCTTGATCTATTCTGATCTCGAACCTCTTGAAATGTACAAAGGCCTGATCTTGTGTTGAATGCCTGAAC
TTTTTTTAAATATAAAGAGAAGCTCTTGCGGTAAACTGTGCTGGGGCCTCCCAAATAACTTTTTTTAAATTTGATCTG
AAATCAGGCGGGATTACCCGCTGAACTTAAGCATATCATGACCCGCGGAAAAAGAAAAGTTCAATTAATAATCAATAAT
TTTGGCTTGTCAATTATTATCTATTTACTGTGAAATGTATTATTACTTGACGCTGAGGGATGCTCACTGCTATAGGATAGG
CGGTGGGGATGCTAACGAGTCATAATCAAGCTTAGGCTTGGTATCTATTATTATTTACAAAAGAATTCAGAATTAATATT
GTACATAGACTAAAAATCTATAAACACTTTTAAACAACGGATCTCTGGTTCTCGCATCGATAAGAACGTAGCAAAGTGCGA
TACTAAGTGATTGCATATTCGTGAATCATCAGTCTTTGACGCAC TGGCTCATGTATTTCATGAGCAGCTGTTTCAGTATCA
AACAAACCTCTTTCCACATTTTTTTGTATAGGAAGACGAGAGAAGCTCGGGTGTTC TTATTTCAGATCTCGCTAAGTAAAG
CCGACACGTGTTGTGATGCCTGACCATATTTTTTATATTAGTAAAAGACTCGCTGGTGCAGAGCTGTGGGGCGGCCACAC
AAATTTATCGACACGCGGGCGTCCACGCTAGTACGATACCGAGAGATGATAT
```

**Figura 10.** Amplicón completo por iniciador ITS1 en *Mucor circinelloides* C1502.

AATGACTGGGCATCCGCTGATTTTCAGATCAATTTAAAAAAGTATTATTTGGGAGGCCCCAGCACAGTTTACCGCAAGA  
GCTTCTCTTTATATTTAAAAAAGTTTCAGGCATTCAAACAAGATCAGGCCCTTTGTACATTTCAAGAGGTTTCGAGATCAGA  
ATAGATCAAGAGACTCTCAGTATTCCTATTCAACAAAATGTTGGATAGAGGGTTTGTGTTTACTGAAACAGGCCTGCT  
CATTGGAATACCAATGAGCGCAAGTTGCGTTCAAAGACTCGATGATTCACTGAATATGCAATTCACATTAGTTATCGCAC  
TTTGTACGTTCTTCATCGATGCGAGAACCAAGAGATCCGTTGTTAAAAGTTGTTTTATAGATTTTTTAGGTCTATGTTA  
CAATATTAATCTGAATTCTTTTGGTAAATAATAATAGGATACCAAGCCTAAGCTTGATTATGACTCGGTTAGCATCCCC  
ACCGCCTATCCTTATAGCAGTGGAGCATCCCTCAAGCGTCAAGTAAATAACATTTTCACAGTAAATAGATAATAATGGAC  
AAGCCAAAATATTGATTATTTAATGATCCTTCCGCAGGTACCCCTTACGGAAGAAGAGTCATTAATAATCAATAATTT  
TGGCTTGTCATTATTATCTATATACTGTGAAATGTATTATTACTTTGACGCTGAGGGATGCTCACTGCTATAGGATAGGC  
GGTGGGGATGCTACGAGTCATAATCAAGCTAGGCTTGGTATCTATTATTATTACAAAAGAATTCAGAATAATATGTAACA  
TAGACTAAAAATCTATAAAACAACTTTACAACGGACTTGGTTCGTCATCGATAAGAACGTAGCAAGTGCAGTACTAAGTGA  
AATGCAATTCGTGAATCATGAGTCTTTGACGCACTGCGCTCATGGTATTCATGAGCAGGCGTTTCAGTATCAAACAACCC  
TCTTCTCACCATTTTTTTGTATATAGAAGATCAGAGAGGACCTCGTGCGATTCTCGAGCTCTGGTCACTCGGCAGATCA  
AGAGCAGGACTACTCTTTTTATCGTCGACACATCACTATTTATTTATTTGGAGGGCGTATCGCTGACAATACGTGGCGCGCG  
TGCAAACATCGTTTTTGTGACTACGACCGATGCACTCTCAACTAGACTCCGGGAGGAGAA

**Figura 11.** Amplicón completo por iniciador ITS4 en *Mucor circinelloides* C1502.

```
TCCGTAGGTGAACCTGCGGTTACTGTGAAATGTATTATTACTTGACGCTTGAGGGATGCTCCACTGCTATAAGGATAGGC  
GGTGGGGATGCTAACCGAGTCATAATCAAGCTTAGGCTTGGTATCCTATTATTATTACCAAAGAATTCAGAATTAATA  
TTGTAACATAGACCTAAAAATCTATAAAACAACCTTTTAAACAACGGATCTCTTGGTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGC  
AAAGTGCGATAACTAATGTGAATTGCATATTCAGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCAACTTGCGCTCATTGGTATTCCA  
ATGAGCACGCCTGTTTCAGTATCAAAACAACCCCTCTATCCAACATTTTGGTTGAATAGGAATACTGAGAGTCTCTTGATC  
TATTCTGATCTCGAACCTCTTGAAATGTACAAAGGCCTGATCTTGTGTTGAATGCCTGAACTTTTTTTTAATATAAAGAGA  
AGCTCTTGCGGTAAGCATATCAATAAGCGGAGGA
```

**Figura 12.** Secuencia consenso *Mucor circinelloides* C1502 ITS1, 5.8S rARN e ITS2.

**Mucor circinelloides strain C1502 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1 and 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence**

GenBank: MN128960.1

[FASTA](#) [Graphics](#)

[Go to:](#) 

```
LOCUS       MN128960                514 bp    DNA     linear   PLN 09-JUL-2019
DEFINITION  Mucor circinelloides strain C1502 small subunit ribosomal RNA gene,
partial sequence; internal transcribed spacer 1 and 5.8S ribosomal
RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2,
partial sequence.
ACCESSION   MN128960
VERSION     MN128960.1
KEYWORDS    -
SOURCE      Mucor circinelloides
ORGANISM    Mucor circinelloides
            Eukaryota; Fungi; Fungi incertae sedis; Mucoromycota;
            Mucoromycotina; Mucoromycetes; Mucorales; Mucorineae; Mucoraceae;
            Mucor.
REFERENCE   1 (bases 1 to 514)
AUTHORS     Fonseca-Peralta,H.M., Pineda-Hidalgo,K., Castro-Martinez,C.,
            Perez-Angel,R. and Contreras-Andrade,I.
TITLE       Zinc effect in xylose consumption and ethanol fermentation
JOURNAL     Unpublished
REFERENCE   2 (bases 1 to 514)
AUTHORS     Fonseca-Peralta,H.M., Pineda-Hidalgo,K., Castro-Martinez,C.,
            Perez-Angel,R. and Contreras-Andrade,I.
TITLE       Direct Submission
JOURNAL     Submitted (03-JUL-2019) Facultad de Ciencias Quimico Biologicas,
            Universidad Autonoma de Sinaloa, Calz de las Americas Norte 2771,
            Culiacan Rosales, Sinaloa 80030, Mexico
COMMENT     ##Assembly-Data-START##
            Sequencing Technology :: Sanger dideoxy sequencing
            ##Assembly-Data-END##
FEATURES             Location/Qualifiers
     source            1..514
                     /organism="Mucor circinelloides"
                     /mol_type="genomic DNA"
                     /strain="C1502"
                     /db_xref="taxon:36080"
                     /country="Mexico"
     misc RNA          <1..514
                     /note="contains small subunit ribosomal RNA, internal
                     transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA, and internal
                     transcribed spacer 2"
ORIGIN
1 tccgtagggtg aacctgaggc tactgtgaaa tgtattatta ctgacgctt gagggatgct
61 ccactgctat aaggataggc ggtggggatg ctaaccgagt cataatcaag cttaggcttg
121 gtatctctatt attatttacc aaaagaattc agaattaata ttgtaacata gacctaataa
181 atctataaaa caacttttaa caacggatct ctggtttctc gcctcgatga agaactgtagc
241 aaagtgcgat aactaatgtg aattgcatat tcagtgaate atcgagtctt tgaacgcaac
301 ttgcgctcat tggtattcca atgagcagc ctgtttcagt atcaaaacaa accctctatc
361 caacattttg ttgaatagga atactgagag tctcttgatc tattctgac tcgaacctct
421 tgaaatgtac aaaggcctga tcttgtttga atgcctgaac ttttttttaa tataaagaga
481 agctcttggc gtaagcatat caataagcgg agga
```

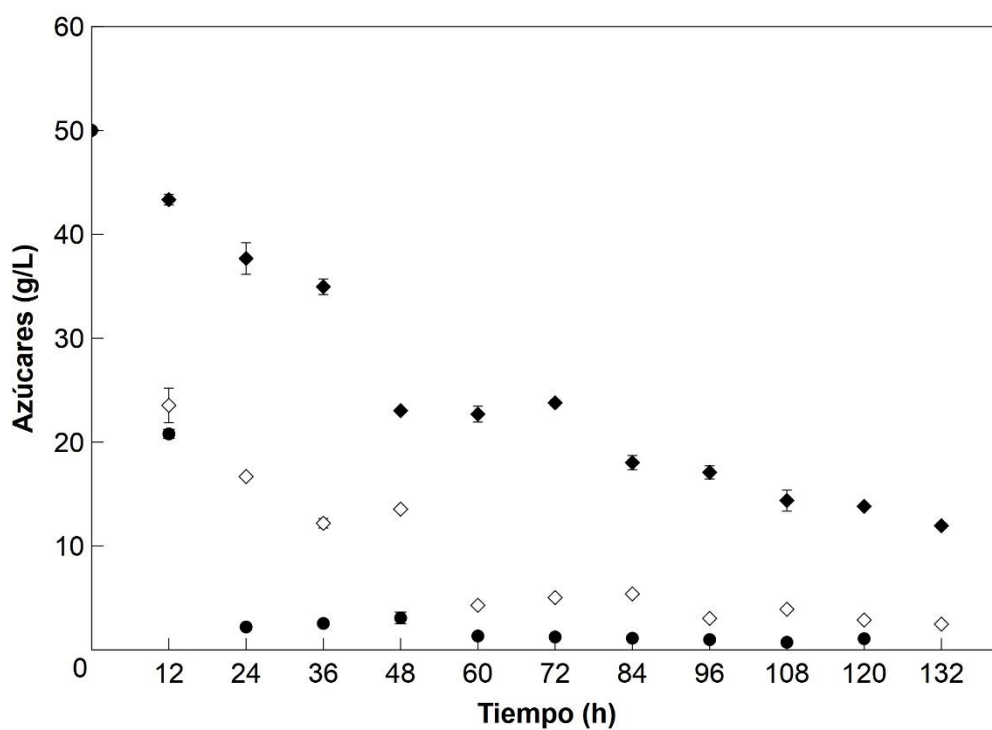
**Figura 13.** Secuencia ITS1, 5.8S rARN e ITS2 de *Mucor circinelloides* C1502 depositada en Genbank.

## **B FERMENTACIÓN EN DIFERENTES FUENTES DE CARBONO**

### **1 Fermentación de glucosa, xilosa y glucosa:xilosa**

Se evaluó la capacidad de la cepa de *Mucor circinelloides* (C1502) para consumir azúcares como glucosa y xilosa, con la finalidad de comprobar si podría ser capaz de metabolizarlos para la producción de etanol. En la Figura 14 se observa que el consumo de glucosa (círculos negro), es muy similar al comportamiento de reportado en especies de *Saccharomyces cerevisiae* el hongo modelo. La gráfica indica que la glucosa se consumió en su totalidad (50 g/L) en un tiempo de 24 (Sharma y col., 2022; Erkan y col., 2021). En el caso de la xilosa (rombo negro) el consumo se limitó a las 84 h y se mantuvo constante hasta las 132h, lo que indica que durante este lapso de tiempo no se consumió el azúcar probablemente por el efecto de otro nutriente en el medio de cultivo, que no fue suficiente y limitó el consumo de la xilosa. Respecto a la combinación de glucosa:xilosa (2:1, círculo blanco), se consumieron los azúcares casi en su totalidad, quedando solo 2g/L de azúcares, en un tiempo de 84 h. Se observa que el consumo de azúcares dentro de las primeras 24 horas es más acelerado, y posteriormente el consumo se vuelve paulatinamente más lento. Esto se debe a que la cepa de *M. circinelloides* tiene prioridad en la selección de los azúcares, considerando en primer lugar la glucosa, y posterga el consumo de xilosa. A esto se le conoce como represión catabólica del carbono (CCR). Y está muy vinculado con el transporte de glucosa en la célula. Mientras exista glucosa en el medio de cultivo los transportadores de glucosa y otros azúcares como pentosas, se ven afectados disminuyendo su actividad, o se reprimen (Zhao y col., 2020). Por otra parte, el consumo de xilosa no se limitó en presencia de glucosa, en primer lugar porque la concentración de xilosa representa 1/3 del contenido total de azúcares, y en segundo se puede especular que la producción de NADH durante la glucólisis contribuye en la transformación de la xilosa.

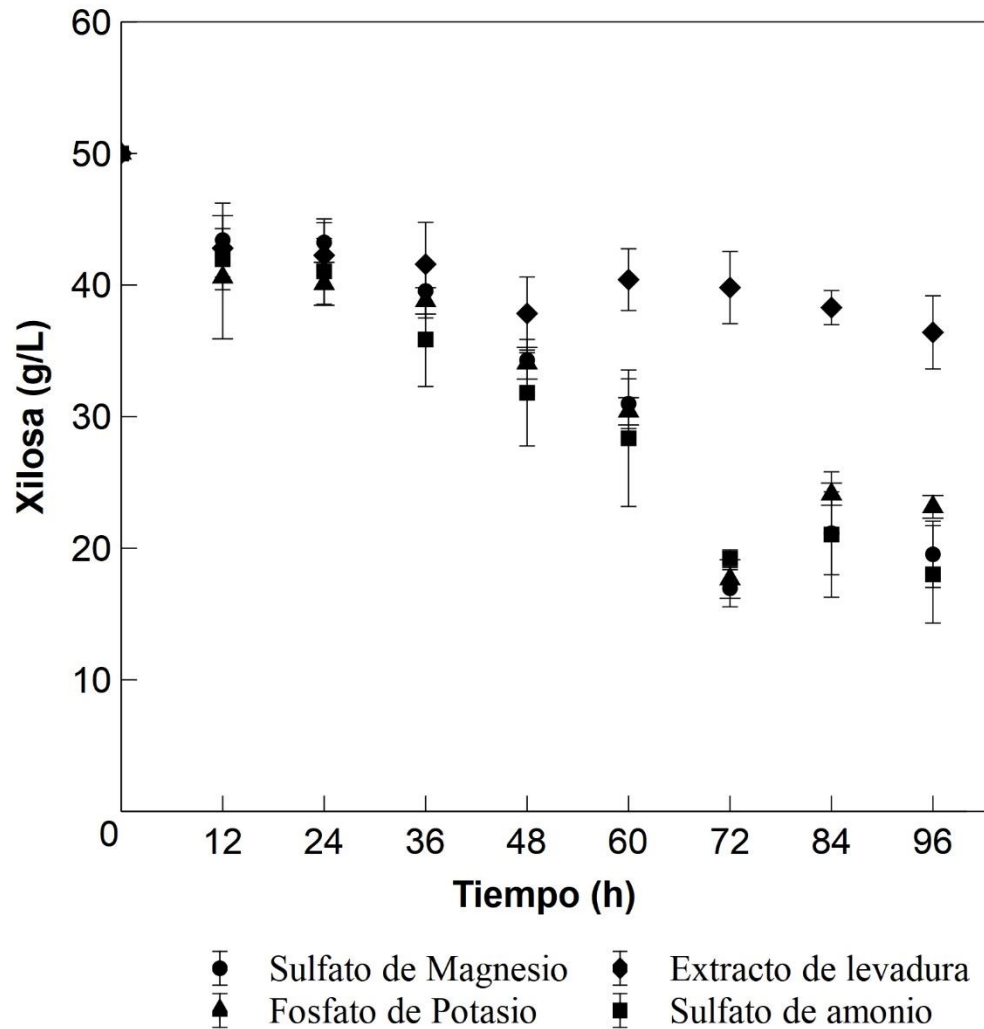




**Figura 14.** Consumo de diferentes azúcares por *M. circinelloides* en matraces agitados a 150 rpm, 28°C y pH 5.5: glucosa (●), xilosa (◆), Glucosa:xilosa 2:1 (◇)

## 2 Identificación de nutrientes limitantes

A partir de los resultados presentados en la Figura 14, se observó que solamente el consumo de xilosa se limitó por efecto de un nutriente. Para esto se llevó a cabo una prueba de pulsos, para identificar el o los nutrientes limitantes. En la Figura 15 se presentan los resultados obtenidos, donde se evaluó el consumo de xilosa en ausencia de cada nutriente. Durante las primeras 48 horas de fermentación no se aprecia diferencia en el consumo de xilosa en ausencia del nutriente evaluado. En el lapso de tiempo de 60 a 96 h, se denotó que el consumo de xilosa se limita por la ausencia de extracto de levadura. Mientras que en los tratamientos donde se excluyó el sulfato de magnesio, el sulfato de amonio y el fosfato de potasio monobásico, el consumo de xilosa permanecía en declive significativamente. Por lo tanto, se determinó que el extracto de levadura es un nutriente limitante en el consumo de xilosa. Este nutriente, generalmente es una fuente de nitrógeno orgánico que se utiliza en medio de cultivos microbiológicos. Es una mezcla en la que aproximadamente el 60% de su contenido son proteínas y aminoácidos. El 6% son ácidos nucleicos, el 3 % son azúcares y el resto son lípidos, vitaminas y minerales trazas. En este sentido se entiende que cualquier componente del extracto de levadura pudiese tener efecto en el consumo de xilosa. No obstante, al ser nitrógeno orgánico el que represente el mayor contenido en este nutriente. El efecto puede deberse principalmente a esto. Estudios revelan que la transformación de xilosa a xilitol puede incrementar a causa de fuentes de nitrógeno orgánico como peptona y extracto de levadura, y fuentes inorgánicas como el sulfato de amonio (Bedó y col., 2021).



**Figura 15.** Prueba de pulsos en xilosa por *M. circinelloides* en matraces agitados a 150 rpm, 28°C y pH 5.5. La curva identificada con el nombre del nutriente indica su ausencia en el medio de cultivo: sulfato de magnesio (●), fosfato de potasio monobásico (▲), Extracto de levadura (◆) y, sulfato de amonio (■).

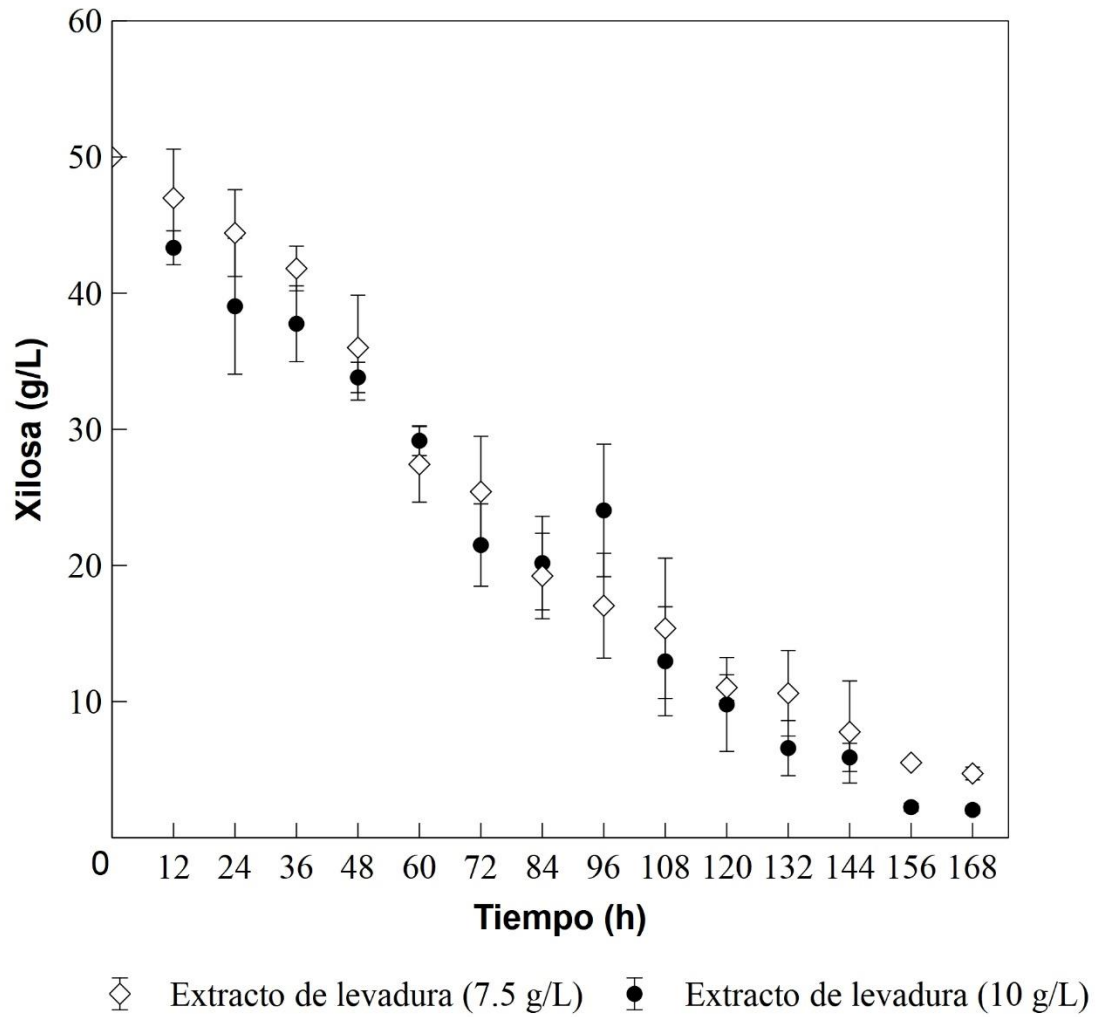
### 3Estandarización de medio de cultivo

Se identificó el extracto de levadura como un nutriente limitante en el medio de cultivo utilizado para la fermentación de xilosa. Para ajustarlo a una concentración adecuada se utilizó un modelo unifactorial de 2 niveles. Donde se varió la concentración de extracto de levadura en 7.5 g/L y 10 g/L (**Figura 16**). Durante 168 h de fermentación se evaluó el consumo de xilosa en los dos tratamientos, en ambos se observó que la xilosa se consumió en su totalidad. Además, no se presentó diferencia significativa entre una y otra, hasta el tiempo de 156 h, favoreciendo el consumo del azúcar el de mayor concentración del nutriente. Sin embargo, se seleccionó la menor concentración de 7.5 g/L, en función de un posterior escalamiento en el que implicaría un menor costo a nivel producción en cantidad de insumos.

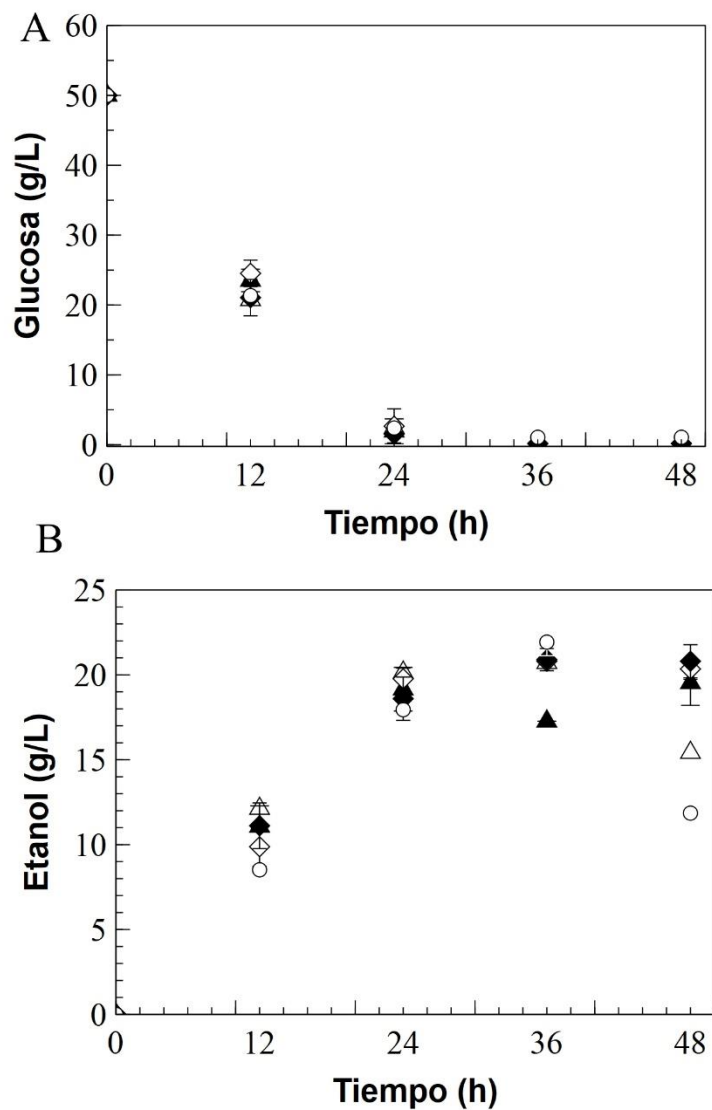
## C EFECTO DEL ZINC Y CALCIO EN LA FERMENTACIÓN DE GLUCOSA Y XILOSA

### 1Preliminar en glucosa

Se evaluó el efecto del  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$  y el  $CaCl_2$  en la fermentación de glucosa por cepa de *M. circinelloides* (C1502). Se utilizaron 2 diferentes concentraciones de cada nutriente y se compararon contra un control no contenía ninguna de ellas. En la **Figura 17** (A), no se observa diferencia significativa en el consumo de glucosa entre los tratamientos y el control, durante las primeras 24 h. Sin embargo, los rendimientos mantienen diferencia significativa en relación con el control (**Cuadro 4**). El fenómeno ocurre principalmente en los tratamientos con altas concentraciones de  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$  y  $CaCl_2$ . Este alto rendimiento puede deberse a que se favoreció mejor el transporte de azúcar dentro de la célula, permitiendo aceptar más moléculas al interior de la célula, y mantener una presión osmótica por parte de las sales. También, puede deberse al efecto del zinc como cofactor de la ADH para producir etanol.



**Figura 16.** Evaluación del consumo de xilosa por *M. circinelloides* en matraces agitados a 150 rpm, 28°C y pH 5.5: 10 g/L de extracto de levadura (●) y 7.5 g/L de extracto de levadura (◇).



**Figura 17.** Fermentación alcohólica de glucosa por *M. circinelloides* en matraces agitados a 150 rpm, 28°C y pH 5.5. (A) consumo de glucosa (B) producción de etanol: Control (○), 0.5 g/L ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (◆) 1 g/L ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (◇), CaCl<sub>2</sub> 2 g/L (▲), y CaCl<sub>2</sub> 1.5 g/L (△).

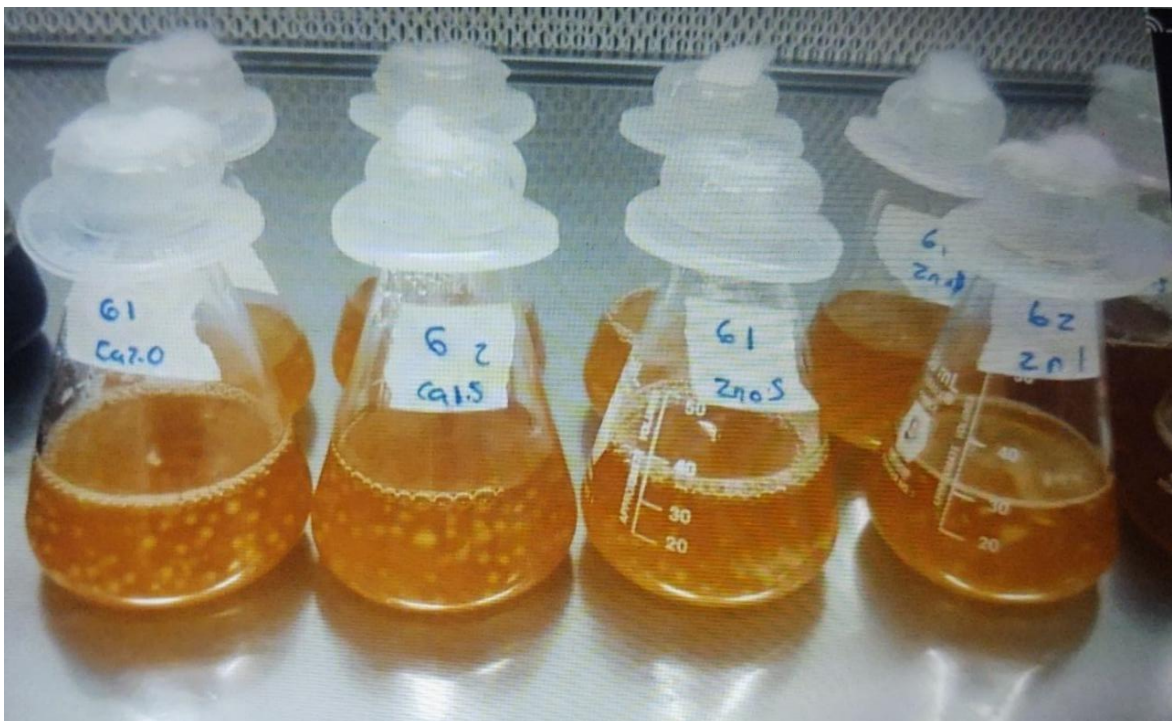
**Cuadro 4.** Rendimientos de etanol obtenidos en la fermentación de glucosa

| Tratamiento                                       | Tiempo (h)        |                   |                   |
|---|-------------------|-------------------|-------------------|
|   | 24                | 36                | 48                |
| <b>CaCl<sub>2</sub></b> (1.5 g/L)                 | 0.42 <sup>a</sup> | 0.42 <sup>a</sup> | 0.31 <sup>a</sup> |
| <b>CaCl<sub>2</sub></b> (2 g/L)                   | 0.40 <sup>a</sup> | 0.35 <sup>b</sup> | 0.39 <sup>a</sup> |
| <b>ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O</b> (0.5 g/L) | 0.38 <sup>b</sup> | 0.42 <sup>a</sup> | 0.42 <sup>a</sup> |
| <b>ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O</b> (1 g/L)   | 0.42 <sup>a</sup> | 0.42 <sup>a</sup> | 0.41 <sup>a</sup> |
| <b>Control</b>                                    | 0.36 <sup>b</sup> | 0.44 <sup>a</sup> | 0.24 <sup>b</sup> |

\*Letras diferentes indican diferencia significativa entre columnas. Tukey ( $\alpha=0.05$ ).

En cuanto al calcio el efecto a nivel de crecimiento se ha reportado que puede llegar a modificar la morfología en *Mucor*, en algún modo puede incrementar el consumo de energía y responder rápidamente mediante la producción de NADH a través de la fermentación alcohólica. En el tiempo de 36 h, se obtuvieron los rendimientos máximos de producción de etanol, sin diferencias significativas en la producción de etanol, exceptuando el tratamiento con  $\text{CaCl}_2$  que disminuye conforme avanza la fermentación. Aun así, el rendimiento promedio en los tratamientos fue de 0.44 g etanol/ g glucosa muy cercano al teórico máximo de 0.511 g etanol/ g glucosa. En términos porcentuales representa un 88 % de la eficiencia de la fermentación. Experimentalmente, la eficiencia en microorganismos como *Saccharomyces cerevisiae* es de un 90% debido a que se tiene que generar biomasa. Lo que convierte a *M. circinelloides* en un buen candidato para la fermentación de azúcares. El comportamiento más interesante durante la fermentación de glucosa con la cepa de *M. circinelloides* (C1502), se observa en la Figura 13 (B) a las 48 h, donde los tratamientos no disminuyen el rendimiento y la producción de etanol, pero el control disminuye significativamente. Esto es un indicativo que el zinc y el calcio de manera individual inhiben la degradación del etanol y no permiten que se transforme en otros metabolitos como el ácido acético, ácido láctico o continúe a ruta de síntesis de lípidos, es decir bloquean el metabolismo río abajo. Existen reportes donde este comportamiento se observó en fermentaciones con *Mucor indicus* al adicionarle  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , donde se asume que el calcio permite la conservación del etanol por lapsos de tiempo prolongados, lo que en términos industriales es una ventaja relevante para evitar pérdidas por oxidación de etanol (Sues y col., 2005). Además, se observaron cambios en la morfología del cultivo (**Figura 18**), ya que el  $\text{CaCl}_2$  indujo la formación de pellets, que a diferencia en un cultivo sin este nutriente, el micelio se vuelve una película de alta viscosidad.



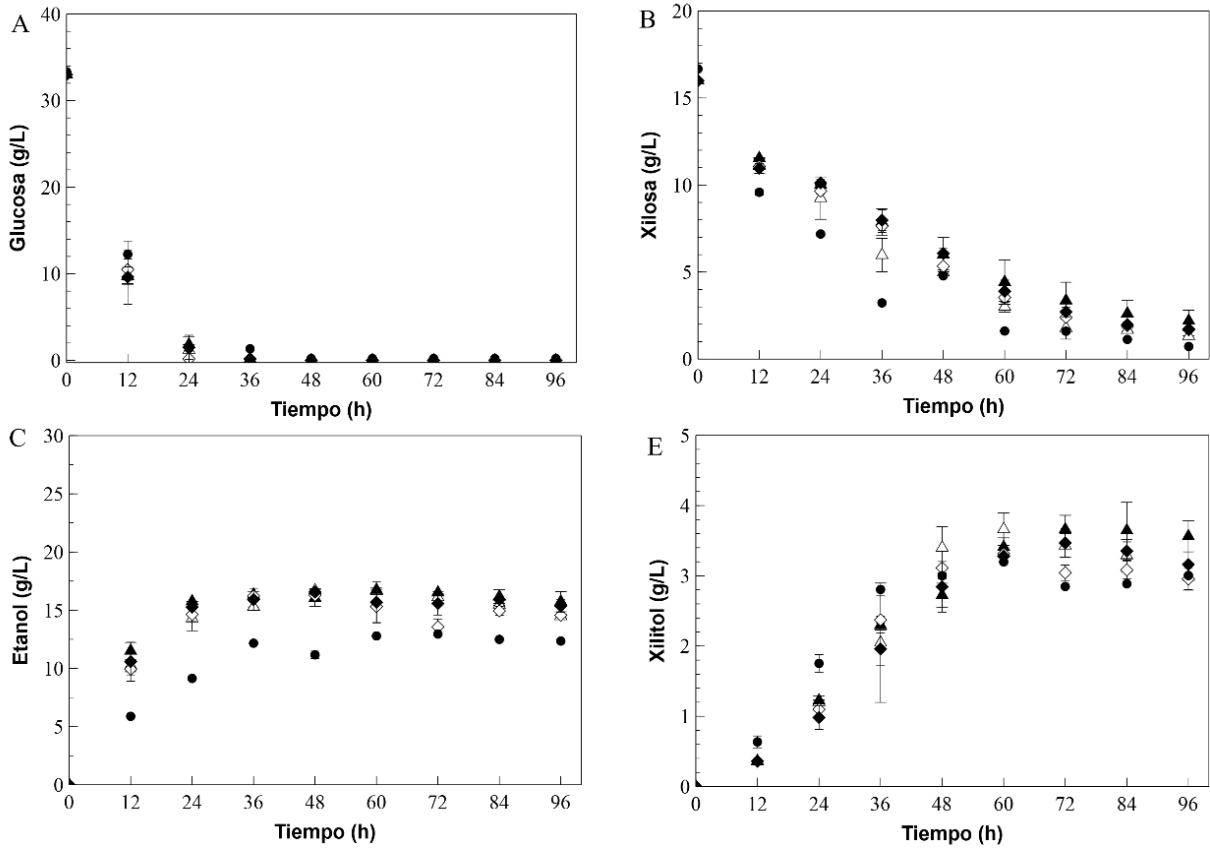


**Figura 18.** Morfología de *M. circinelloides* durante la fermentación de glucosa en matraces agitados a 150 rpm, 28°C y pH 5.5. 0.5 g/L  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (Zn 0.5), 1. g/L  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (Zn1),  $\text{CaCl}_2$  2 g/L (Ca 2.0), y  $\text{CaCl}_2$  1.5 g/L (Ca 1.5).

Se ha reportado que el comportamiento de *M. circinelloides* en biorreactores lo vuelve complicado al reducir la eficiencia en los impelentes del agitador (Zorn y col., 2022).

## **2Preliminar en Glucosa: Xilosa**

La fermentación simultánea de glucosa y xilosa, permitió evaluar desde una perspectiva metabólica el efecto del zinc y el calcio sobre la producción de etanol. De igual manera como sucedió en la fermentación de solo glucosa, el consumo no se vio afectado por el uso de sales en la fermentación, y no se encontraron diferencias significativas entre los puntos del control y los evaluados como se observa en la **Figura 19** (A). Respecto al consumo de xilosa durante las primeras 36 h la xilosa se consumió de manera más rápido con respecto a los que contenían zinc y calcio (Figura 19 B). Durante este tiempo la producción de xilitol también incrementó de manera significativa (Figura 19 D). No obstante, la producción de xilitol en el control se redujo a partir de las 48 h. Mientras que las fermentaciones con zinc aumentaron la producción de xilitol sin comprometer la producción de etanol. Se puede asumir que este efecto está asociado al sitio catalítico de la enzima xilitol deshidrogenasa que requiere de zinc para su activación. A simple vista se podría asumir que el zinc y el calcio no favorecieron la transformación de xilosa. Sin embargo, al comparar la producción de etanol, el control era el de menor producción (Figura 19 C). Por lo tanto, la baja producción de xilitol se debió a que este metabolito se siguió transformando hasta convertirse en etanol. Por otro lado, la transformación de xilitol a xilulosa resultó ser un “cuello de botella” en la ruta metabólica para la producción de etanol, el cual se puede optimizar con la adición de  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$  y  $CaCl_2$ . Esta fermentación permitió conocer más a fondo el metabolismo del hongo. El xilitol también es un metabolito de importancia económica en el sector alimenticio.

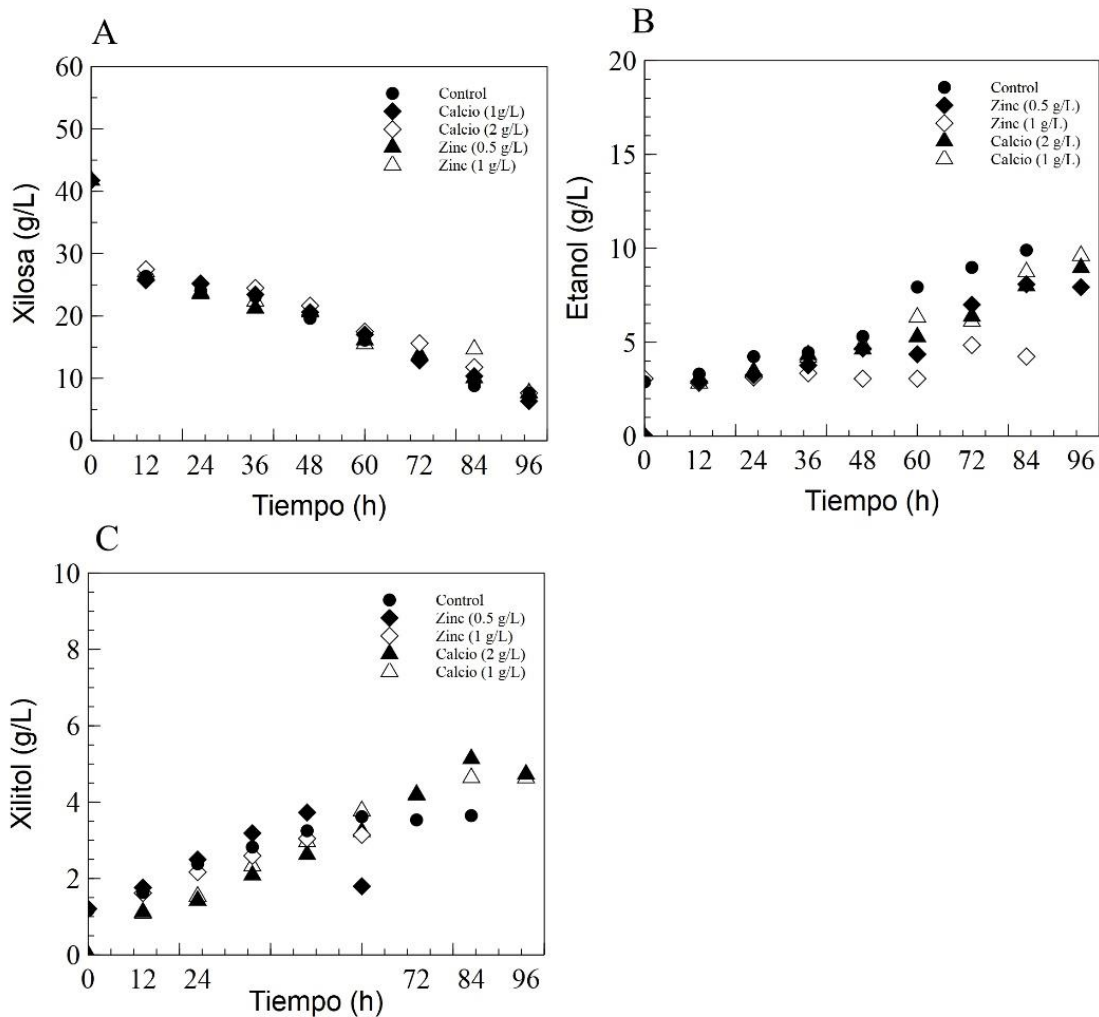


**Figura 19.** Fermentación alcohólica de mezcla de glucosa: xilosa (2:1) por *M. circinelloides* en matraces agitados a 150 rpm, 28°C y pH 5.5. (A) consumo de glucosa (B) Consumo de xilosa, (C) producción de etanol y (D) producción de xilitol: Control (●), 0.5 g/L ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (◆) 1 g/L ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (◇), CaCl<sub>2</sub> 2 g/L (▲), y CaCl<sub>2</sub> 1.5 g/L (△).

Conocer como regular su producción también influye mucho para el diseño de nuevos bioprocesos utilizando la cepa de *M. circinelloides*, teniendo en cuenta que esto solo sucede en combinación con glucosa, donde se producen moléculas de NADH y precursores como la fructosa 6P y el gliceraldehido 3P que conectan a la ruta de pentosas.

### **3Preliminar en Xilosa**

En la fermentación de xilosa, la producción de etanol fue menor solo en uno de los tratamientos con zinc a la concentración de 1 g/L (0.17 g etanol/g xilosa) con respecto al control y el resto de los tratamientos  $\text{CaCl}_2$  1g/L,  $\text{CaCl}_2$  2g/ y  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.5 g/L, teniendo como rendimientos 0.27, 0.27, 0.28 y 0.26 g etanol /g xilosa, respectivamente. Sin embargo, las sales  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  y  $\text{CaCl}_2$  incrementaron la producción de xilitol y los rendimientos fueron significativamente mayo al control, exceptuando la concentración alta en sulfato de zinc. La acumulación de xilitol puede deberse al efecto de zinc y calcio sobre las enzimas XR y XDH. De este trabajo se pudo observar que el zinc y el calcio pueden regular el consumo de xilosa para transformarlo en xilitol que puede ser utilizado como precursor. Esto indica el potencial de utilizar  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  y  $\text{CaCl}_2$  para aprovechar mejor la xilosa, dado que el xilitol obtenido puede alimentar potencialmente la ruta metabólica hasta transformarse en etanol. Por lo que combinar ambas sales en las concentraciones adecuadas podría incrementar el rendimiento con respecto al control, si se considera que una interacción y el efecto a nivel de transporte celular.



**Figura 20.** Fermentación alcohólica en xilosa por *M. circinelloides* en matraces agitados a 150 rpm, 28°C y pH 5.5. (A) consumo de glucosa (B) Consumo de xilosa, (C) producción de etanol y (D) producción de xilitol: Control (●), 0.5 g/L ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (◆) 1.5 g/L ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (◇), CaCl<sub>2</sub> 2 g/L (▲), y CaCl<sub>2</sub> 1.5 g/L ( ).

## D OPTIMIZACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE ETANOL

Para determinar las concentraciones óptimas (g/L) de  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  y  $\text{CaCl}_2$  en el medio de cultivo que contenía xilosa como fuente de carbono, se siguieron los siguientes experimentos en el orden de corrida que aparecen en el **Cuadro 5**.

### 1 Análisis de varianza (ANOVA) de los modelos

#### a Rendimiento de etanol

El efecto de cada factor y sus interacciones se analizaron mediante un análisis de varianza (ANOVA, por sus siglas en inglés). Para la variable rendimiento de etanol la ANOVA mostró significancia en modelo cuadrático ( $p < 0.0342$ ). El análisis muestra que el rendimiento de etanol depende en términos lineales de  $[\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}]$  ( $p < 0.2350$ )  $[\text{CaCl}_2]$  ( $p < 0.0743$ ), y en términos cuadráticos para  $[\text{CaCl}_2]^2$  ( $p < 0.0208$ ). Por lo tanto el modelo para la predicción del máximo rendimiento de etanol fue:

Factores codificados:

$$Y = 0.22 - 6.707 \times 10^{-003} * (X1) + 0.011 * (X2) - 0.016 (X2)^2$$

Factores reales:

$$Y = 0.18424 - 0.012646 [\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}] + 0.062196 [\text{CaCl}_2] - 0.020065 [\text{CaCl}_2]^2.$$

El modelo de regresión explica el 60% ( $R^2 = 0.6004$ ) mientras que la  $R^2$  fue de 0.4672. La baja diferencia entre  $R^2$  y  $R^2$  ajustada significa que el modelo se ajusta bien a los datos. En cuanto al falta de ajuste resultó no significativo ( $p = 0.9352$ ) lo que indica una buena adaptación del modelo.

#### b Rendimiento de xilitol

Para la variable rendimiento de xilitol, el análisis de ANOVA mostró significancia en modelo lineal ( $p < 0.0210$ ). El análisis muestra que el rendimiento de xilitol depende en términos lineales de  $[\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}]$  ( $p < 0.3531$ ) y  $[\text{CaCl}_2]$  ( $p < 0.0084$ ).

**Cuadro 5** Diseño central compuesto (CCD) con 13 ensayos para la optimización de etanol en xilosa

| Estandar <sup>2</sup> | Factores (g/L)                       |                   | Variables de respuesta (g/g)            |  |
|-----------------------|--------------------------------------|-------------------|---|--|
|                       | ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O | CaCl <sub>2</sub> | Etanol<br>Y <sub>p/s</sub> <sup>3</sup> | Xilitol<br>Y <sub>p/s</sub> <sup>4</sup> |
| 1                     | 0.220                                | 0.366             | 0.208                                   | 0.159                                    |
| 2                     | 1.280                                | 0.366             | 0.175                                   | 0.197                                    |
| 3                     | 0.220                                | 2.134             | 0.217                                   | 0.114                                    |
| 4                     | 1.280                                | 2.134             | 0.204                                   | 0.139                                    |
| 5                     | 0                                    | 1.250             | 0.223                                   | 0.146                                    |
| 6                     | 1.500                                | 1.250             | 0.217                                   | 0.147                                    |
| 7                     | 0.750                                | 0                 | 0.178                                   | 0.196                                    |
| 8                     | 0.750                                | 2.500             | 0.211                                   | 0.114                                    |
| 9                     | 0.750                                | 1.250             | 0.200                                   | 0.120                                    |
| 10                    | 0.750                                | 1.250             | 0.244                                   | 0.160                                    |
| 11                    | 0.750                                | 1.250             | 0.225                                   | 0.139                                    |
| 12                    | 0.750                                | 1.250             | 0.207                                   | 0.136                                    |
| 13                    | 0.750                                | 1.250             | 0.242                                   | 0.162                                    |

1 El orden de los estándares no corresponde al orden de procesamiento.

2 Rendimiento de etanol (g etanol/g xilosa) a 84 h

3 Rendimiento de xilitol (g xilitol/g xilosa) a 60 h

Por lo tanto el modelo para la predicción del máximo rendimiento de etanol fue:

Factores codificados:

$$Y=0.16 + 8.157 \times 10^{-003} * (X1) - 0.027 * (X2)$$

Factores reales:

$$Y=0.17249 + 0.015381 [\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}] - 0.031004 [\text{CaCl}_2]$$

El modelo de regresión explica el 76% ( $R^2=0.7616$ ) mientras que la  $R^2$  fue de 0.7139. La poca diferencia entre  $R^2$  y  $R^2$  ajustada significa que el modelo se ajusta bien a los datos. En cuanto la falta de ajuste resultó no significativo ( $p = 0.8283$ ) lo que indica una buena adaptación del modelo.

### **c Optimización numérica**

EL modelo desarrollado permitió realizar la optimización numérica. Como estrategia para incrementar el rendimiento de etanol al máximo. Se utilizaron diferentes criterios de optimización, una vez validado se seleccionó el mejor. Que resultó en maximizar el rendimiento de xilitol. En el **Cuadro 6**, se pueden observar los diferentes criterios, así como su deseabilidad, Las condiciones óptimas para  $X1 \text{ ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  y  $X2 \text{ CaCl}_2$ , y los rendimientos esperados.

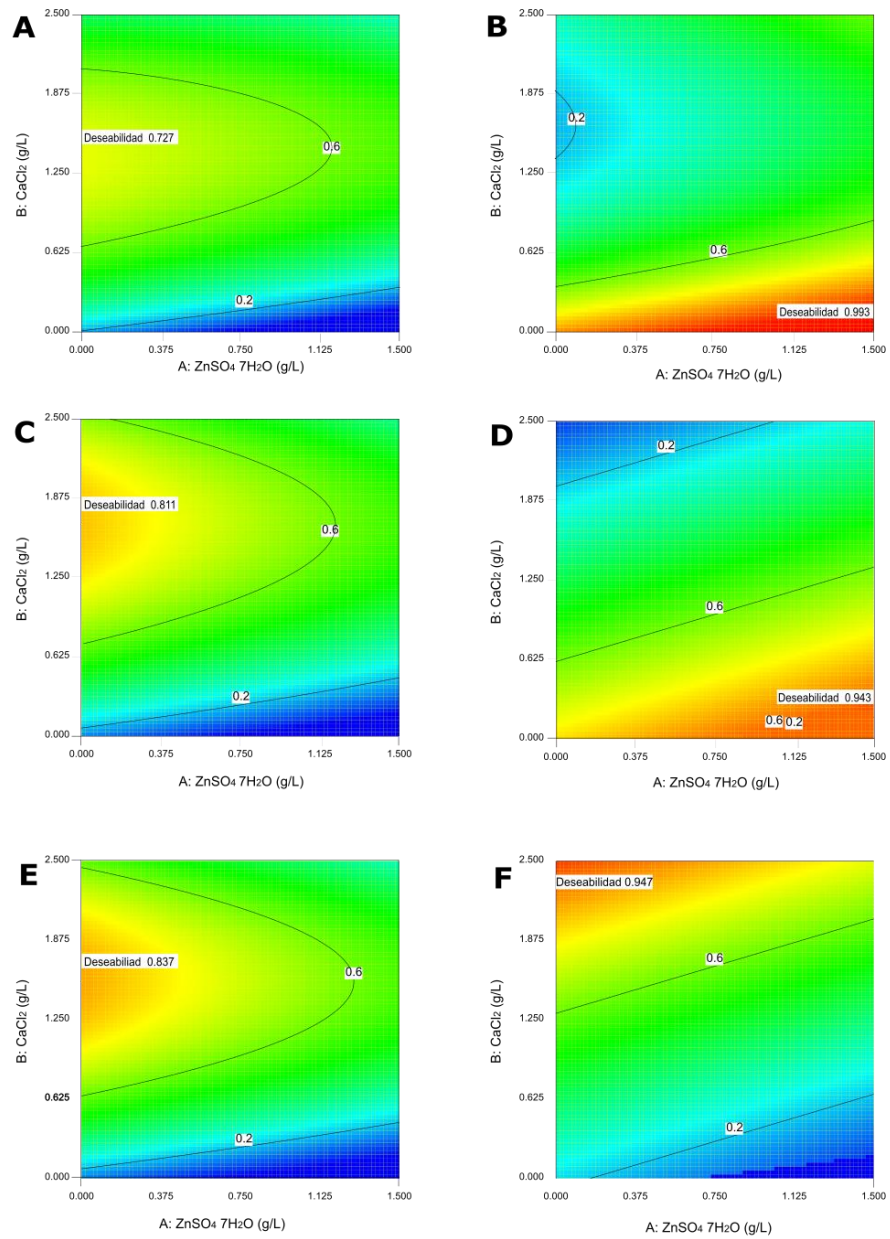
En la **Figura 21** se muestran las deseabilidades globales de cada criterio en función de la concentración de  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  y  $\text{CaCl}_2$ . La zona roja-anaranada de las gráficas indica la zona optima de para cada variable, mientras que la zona intermedia y baja están representadas en color amarillo y verde-azul respectivamente.

En las **Figuras 22 y 23**, se muestra una gráfica 3D que muestra el efecto de ambos iones en el rendimiento de etanol y xilitol respectivamente.

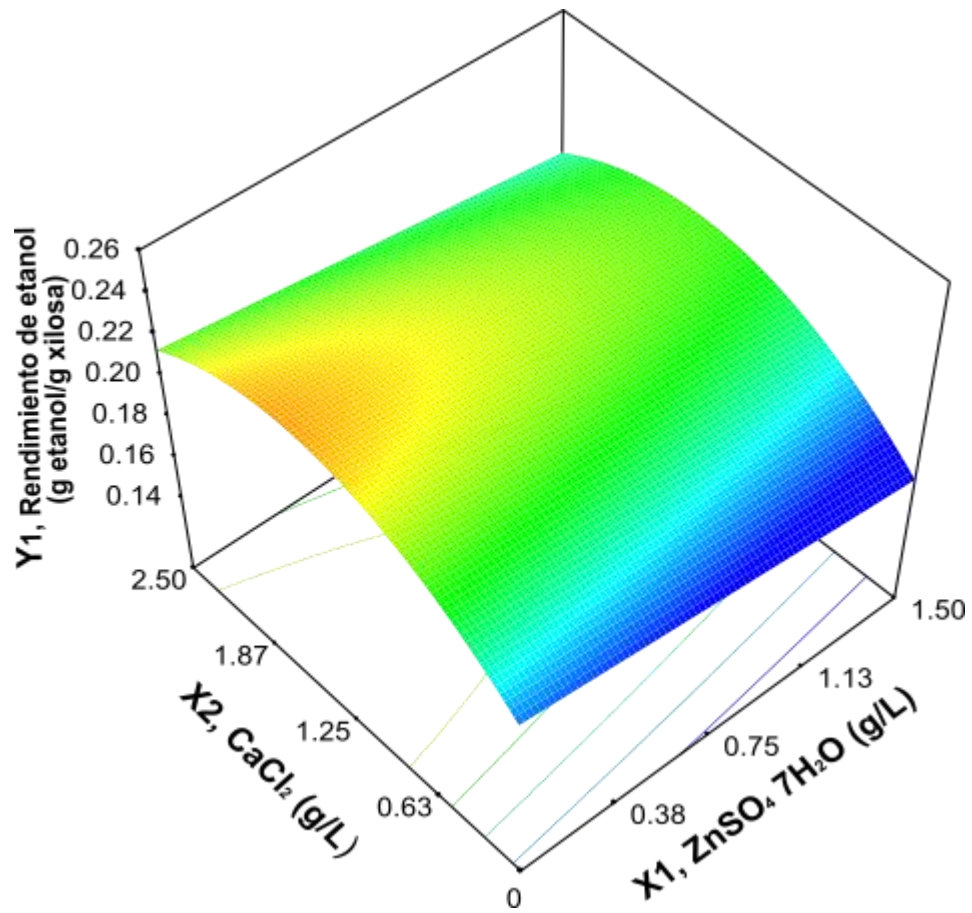


**Cuadro 6.** Valores óptimos sugeridos

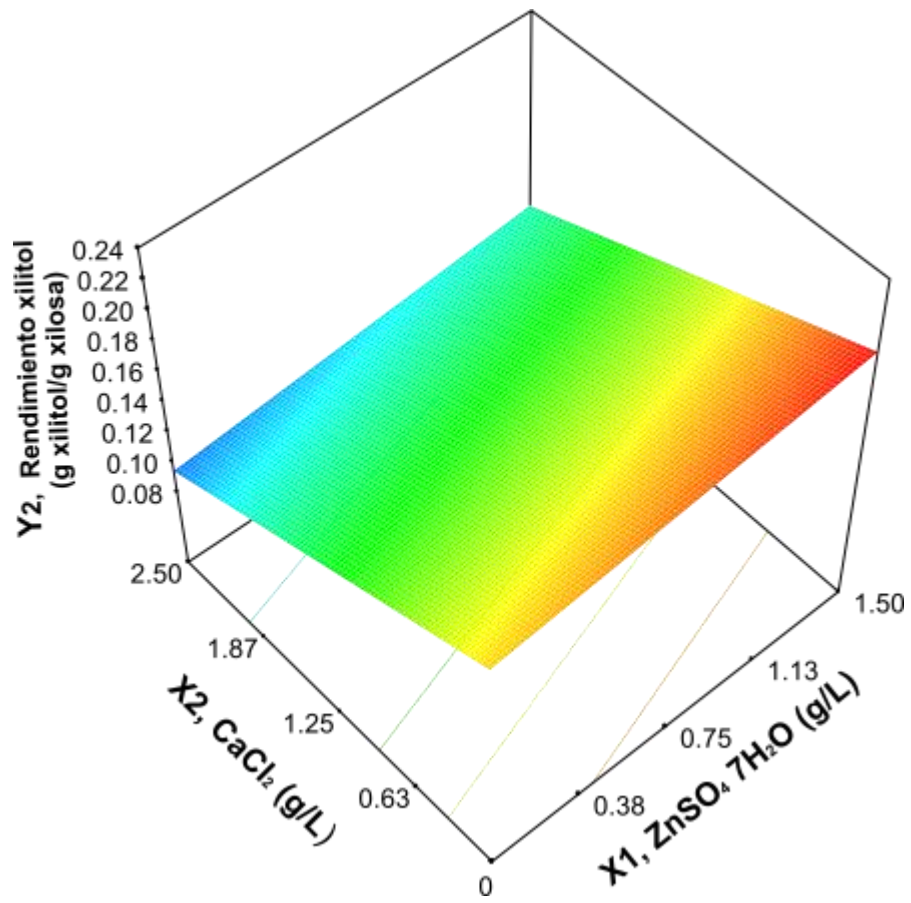
| <b>Condición</b> |                | <b>Calcio (g/L)</b> | <b>Zinc (g/L)</b> | <b>Y p/s etanol</b> | <b>Y p/s xilitol</b> | <b>Deseabilidad</b> |
|------------------|----------------|---------------------|-------------------|---------------------|----------------------|---------------------|
| <b>Etanol</b>    | <b>Xilitol</b> |                     |                   |                     |                      |                     |
| maximizar*****   | maximizar*     | 1.37                | 0                 | 0.23                | 0.13                 | 0.727               |
| minimizar*       | maximizar*     | 0                   | 1.5               | 0.2                 | 0.17                 | 0.993               |
| maximizar*****   | minimizar*     | 1.665               | 0                 | 0.23                | 0.12                 | 0.802               |
| mantener         | maximizar*     | 0.168               | 1.5               | 0.19                | 0.18                 | 0.942               |
| maximizar*       | mantener       | 1.55                | 0                 | 0.23                | 0.13                 | 0.838               |
| mantener         | minimizar*     | 2.5                 | 0                 | 0.021               | 0.09                 | 0.947               |



**Figura 21.** Gráficas de deseabilidades obtenidas en diferentes optimizaciones numéricas para obtener las mejores combinaciones de ZnSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O and CaCl<sub>2</sub> y un máximo rendimiento de etanol



**Figura 22.** Gráfica de superficie de respuesta que muestra el efecto del zinc y calcio sobre el rendimiento de etanol.



**Figura 23.** Gráfica de superficie de respuesta que muestra el efecto del zinc y calcio sobre el rendimiento de xilitol.

## 2Comprobación experimental

Los resultados obtenidos a partir de la fermentaciones a diferentes concentraciones sugeridas de  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$  y  $CaCl_2$  aparecen en el **Cuadro 7**. Los valores óptimos para el rendimiento de etanol fueron 0.34 (g etanol/g xilosa) comparados contra el control (fermentación no optimizada) de 0.27. Además el xilitol también incremento con respecto al rendimiento obtenido en el control 0.35 y 0.20 g xilitol/g xilosa, respectivamente. Esto significa que al incrementar la producción de xilitol incrementa también la producción de etanol en presencia de zinc y calcio. Durante 96 h de fermentación cada 12 h se calculó el rendimiento, y se pudo observar que a las 48 h se obtuvo el rendimiento más alto en la fermentación con un valor de 0.36 g etanol/g xilosa, incluso mayor que a las 84 h. Esto se interpreta que el tiempo de fermentación también puede ser disminuido por efecto de la optimización.

Generalmente los zygomycetos son hongos con alta afinidad a la producción de ácidos orgánicos. Sin embargo, bajo ciertas condiciones las especies del genero *Mucor*, pueden producir etanol incluso de fuentes de carbono como la xilosa (Lübbehüsen y col., 2004). También depende mucho de la composición del medio de cultivo que permite mejorar los rendimientos de producción de este metabolito. En esta optimización se observaron dos fenómenos. El primero está relacionado con el efecto del zinc y el calcio en concentraciones altas (>1g/L) puede incrementar la producción de etanol, por sí mismo, el zinc aparentemente disminuye la producción de etanol, pero en presencia de calcio ocurre lo contrario. El calcio está relacionado con muchos mecanismos a nivel celular, como el transporte de iones y cambios morfológicos en especies del genero *Mucor*. Por otro lado, el zinc puede causar oxidación por acumulación en las membranas celulares y como resultado estresar al microorganismo. Sin embargo, el segundo fenómeno que se vuelve de interés es acerca del incremento en el rendimiento de xilitol por efecto del zinc.

**Cuadro 7.** Comparación de los modelos experimentales después de la optimización.

| Tratamientos |            | Deseabilidad | Respuesta optima (g/g) |                   |
|--------------|------------|--------------|------------------------|-------------------|
| Calcio (g/L) | Zinc (g/L) | (D)          | Y1 <sup>1</sup>        | Y2 <sup>2</sup>   |
| 0            | 1.37       | 0.74         | 0.21 <sup>c</sup>      | 0.19 <sup>c</sup> |
| 0            | 1.5        | 0.993        | 0.30 <sup>b</sup>      | 0.29 <sup>b</sup> |
| 1.665        | 0          | 0.802        | 0.24 <sup>c</sup>      | 0.20 <sup>c</sup> |
| 0.168        | 1.5        | 0.942        | 0.34 <sup>a</sup>      | 0.35 <sup>a</sup> |
| 1.55         | 0          | 0.838        | 0.23 <sup>c</sup>      | 0.13 <sup>d</sup> |
| 2.5          | 0          | 0.882        | 0.28 <sup>b</sup>      | 0.14 <sup>d</sup> |
| 1.55         | 0          | control      | 0.27 <sup>b</sup>      | 0.20 <sup>c</sup> |

\*Letras diferentes indican diferencia significativa entre columnas. Tukey ( $\alpha=0.05$ ).

1 Rendimiento de etanol (g etanol/g xilosa) at 84 h

2 Rendimiento de xilitol (g xilitol/g xilosa) at 60 h

Existe una relación entre el zinc y el calcio al exponerlos juntos en la cepa de *M. circinelloides* (C1502). Hipotéticamente, se puede especular que el zinc es transportado a la célula por efecto del calcio a óptimas condiciones. Además de que pudiera jugar roles como cofactor enzimático, de transcripción y homeostasis. Moreno y col., (2020) reportaron rendimientos de etanol y xilitol similares utilizando clonas de *Candida intermedia* alrededor de 0.22 a 0.33 g etanol/g xilosa y 0 a 0.29 g xilitol/ g de xilosa a las 72 h de fermentación. Takano y col., (2012), también reportaron rendimientos aproximados, 0.34 g de etanol/g de xilosa a las 96 h de fermentación, utilizando la cepa de *Mucor circinelloides* NBRC 4572 y las mismas condiciones de medio de cultivo. Sin embargo, añadieron 1 g/L de  $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ . Incluso aunque estos resultados son muy aproximados a los nuestros. Se observó que el máximo rendimiento durante la optimización fue de 0.36 g etanol/g xilitol a las 48 h, la mitad del tiempo de fermentación, lo que significa que la productividad es el doble a lo reportado. Por este motivo es por lo que el RSM se ha convertido en una herramienta útil que permite explorar efectos notables en los bioprocesos con un limitado diseño experimental. En este caso efectos relacionados a la actividad catalítica o enzimas relacionadas con la fermentación de xilosa. Es recomendable realizar análisis moleculares para esclarecer los efectos de estos iones durante la optimización. Hay muchas estrategias para desarrollar y escalar a nivel piloto.

## **E FERMENTACIÓN EN HIDROLIZADO ÁCIDO DE OLOTE DE MAÍZ (HAOM)**

En el pretratamiento de residuos lignocelulosa por hidrólisis ácida, generalmente se utiliza la celulosa para la fermentación alcohólica. Sin embargo, la fracción ácida de hemicelulosa es descartada, la cual contiene un alto contenido en xilosa. Para evaluar el efecto de la composición del medio optimizado con Zinc y Calcio en un medio robusto, se sustituyó la xilosa sintética por xilosa de olate de Maíz proveniente de un hidrolizado ácido, con una concentración inicial de 15 g/L de xilosa. La caracterización del HAOM por UHPLC permitió conocer la composición teniendo, glucosa <2g/L, arabinosa < 1g/L y ácido acético 2g/L.

El ácido acético en concentraciones mayores a 2 g/L puede resultar un inhibidor de la fermentación alcohólica en levaduras. Sin embargo, reportado que especies como *M. indicus* pueden llegar a tener una tolerancia hasta 10 g/L. Y que la tolerancia es mayor cuando el hongo crece en forma de hifa que levaduriforme (Lennartsson y col., 2009). Además, se demostró que no había diferencia significativa en los rendimientos de etanol en fermentaciones que utilizaron glucosa como fuente de carbono.

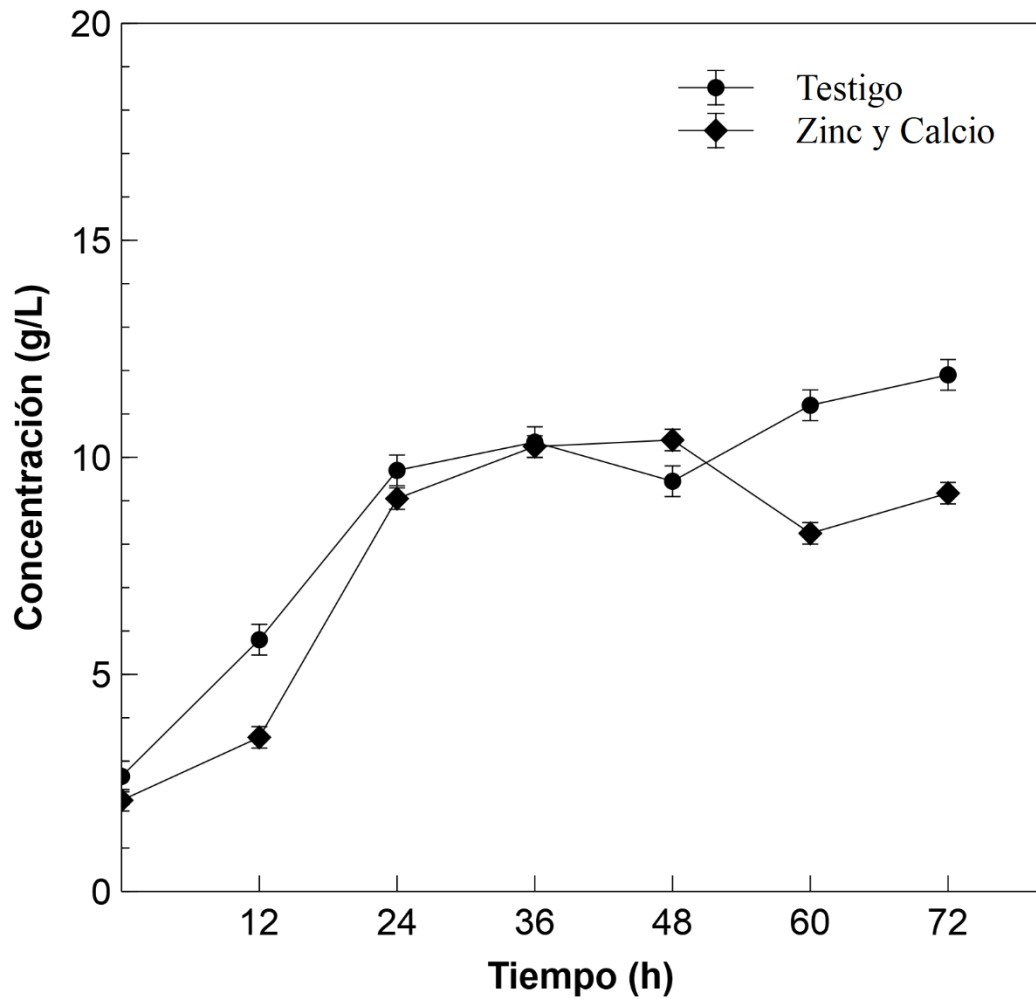
En esta fermentación se evaluaron dos experimentos el primero con 1.5 g/L de  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$  y 0.168 g/L de  $CaCl_2$  y el segundo fue un testigo sin estos nutrientes. Se evaluaron diferentes parámetros, como crecimiento, producción de etanol, xilitol y glicerol. Así como el consumo de xilosa y ácido acético. Los resultados se muestran a continuación.



## 1 Efecto del Zn-Ca en el crecimiento

El crecimiento evaluado por peso seco (g), fue comparado entre los dos tratamientos. En la **Figura 24**, se observa diferencia significativa dentro de las primeras horas de fermentación. La producción de biomasa es mayor en el tratamiento testigo. Esto significa que el zinc y el calcio retardan el crecimiento del hongo. En el **Cuadro 8** se presentan los valores mínimos y máximos de biomasa durante la fase exponencial en ambos tratamientos. Sin embargo, Para valorar un efecto real entre los tratamientos se calculó la tasa de crecimiento  $\mu$  ( $h^{-1}$ ). Así, mediante este cálculo se consideró todos los puntos de la fase exponencial en una ecuación general, la ecuación logística. En el testigo el resultado fue una  $\mu$  de  $0.16 h^{-1}$ , significativamente mayor que la  $\mu$  obtenida en el tratamiento con zinc y calcio de  $0.14 h^{-1}$ . Esta diferencia es relevante, dado que en la producción de metabolitos primarios vinculados al crecimiento como el etanol, es preferible que la conversión de la fuente de carbono sea en el producto de interés que en biomasa del microorganismo. La cepa de *M. circinelloides* (C1512) como caso particular tiene una tasa de crecimiento muy baja comparada con otras cepas en fermentaciones de xilosa como la ATCC1216B, que tiene  $\mu$  de  $0.23$  a  $0.24 h^{-1}$ . Considerando que la fuente de carbono se agota en ambos cultivos. Por lo que la cepa C1502 puede llegar a tener mejores productividades.

Es discutible también, el uso de la ecuación logística para calcular la  $\mu$  en este experimento. Otros modelos pudieron ser utilizados como el modelo sigmoideo de Gompertz. No obstante, al tratar solo la región de importancia en la cinética de crecimiento, que es la fase exponencial, debido a la naturaleza del etanol al ser un metabolito primario, que se produce en esta fase, un modelo lineal es más asertivo en esta situación. Además, que puede acoplarse a modelos de productividad específica como el de Luedeking-Piret que también estudia las cinéticas microbianas por fases que pueden ser exponencial o estacionaria.



**Figura 24.** Curvas de crecimiento entre la fermentación testigo y el tratamiento adicionado con 1.5 g/L de  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$  y 0.168 g/L de  $CaCl_2$  en HAOM.

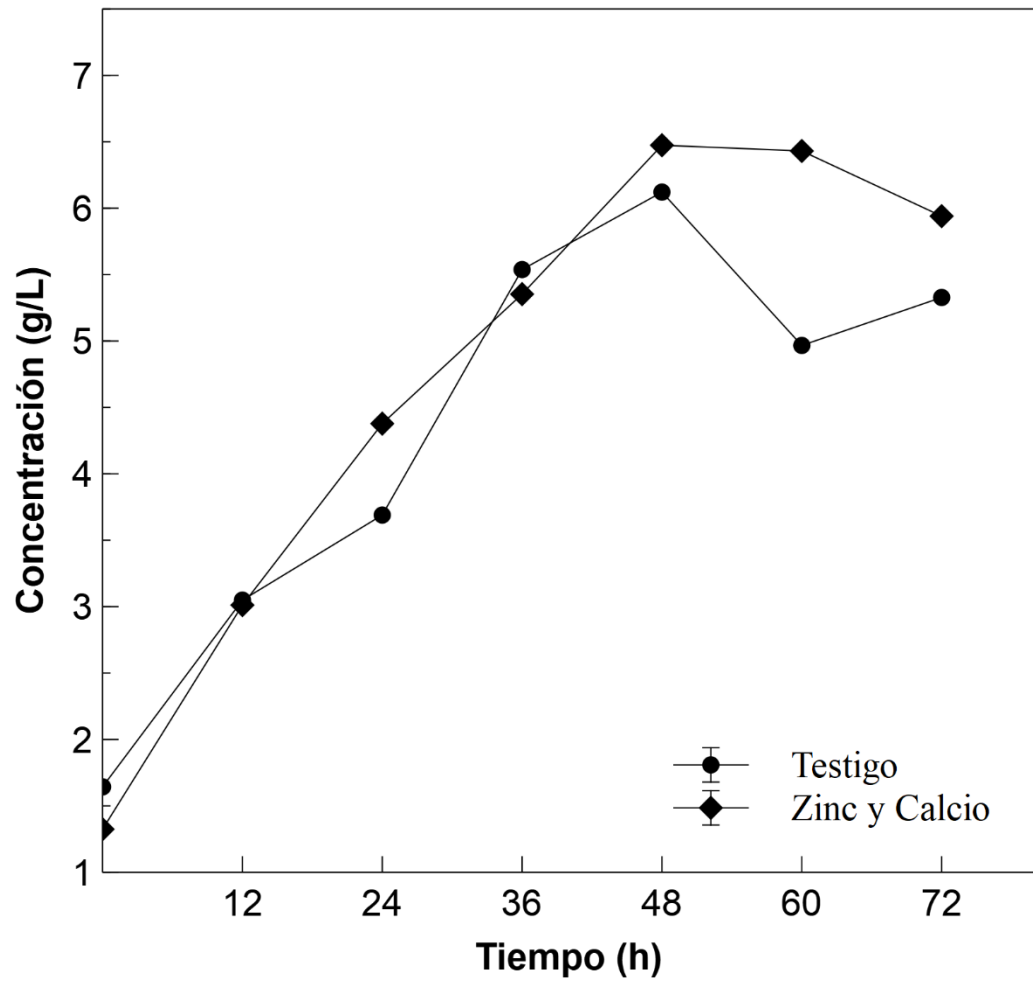
**Cuadro 8** Comparación del crecimiento entre el testigo y la fermentación adicionada con 1.5 g/L de ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O y 0.168 g/L de CaCl<sub>2</sub>.

|                    | $\mu$ (h <sup>-1</sup> ) | X <sub>0</sub> (g) | X <sub>max</sub> (g) |
|--------------------|--------------------------|--------------------|----------------------|
| <b>Testigo</b>     | 0.16 <sup>a</sup>        | 1.25 <sup>a</sup>  | 10.35 <sup>a</sup>   |
| <b>Zinc-Calcio</b> | 0.14 <sup>b</sup>        | 1.61 <sup>a</sup>  | 10.25 <sup>a</sup>   |

\*Letras diferentes indican diferencia significativa entre columnas. Tukey ( $\alpha=0.05$ ).

## 2Efecto del Zn-Ca en la producción de etanol

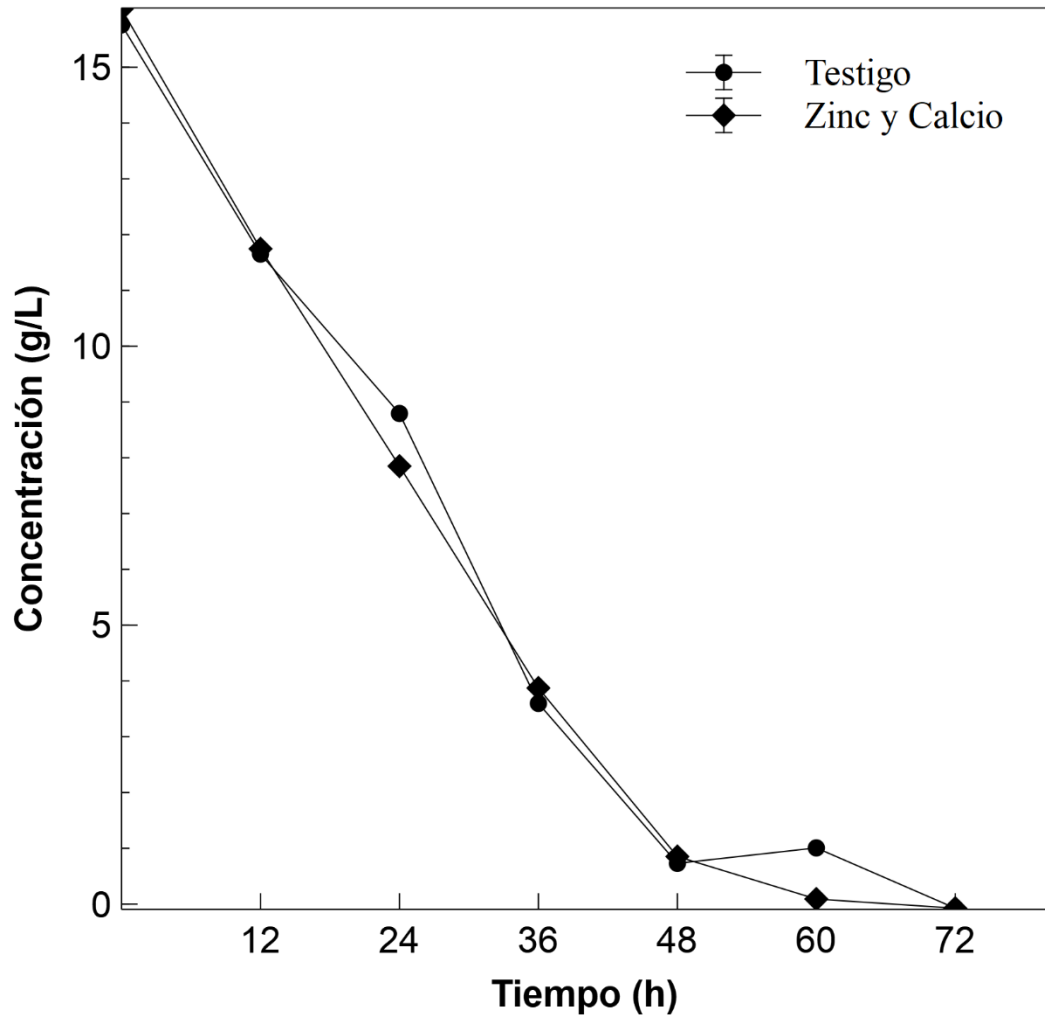
La producción de etanol por *Mucor circinelloides* (C1502) se muestra de manera general en la **Figura 25**. La máxima concentración se obtuvo a las 48 h, teniendo en el testigo una concentración de 6.12 g/L y en el tratamiento de 6.47 g/L. En términos de tiempo la fermentación fue mucho más corta comparada con la llevada a cabo en la validación con xilosa sintética de 84 h. Sin embargo, los mejores rendimientos durante la optimización en el medio de cultivo sintético se obtuvieron a las 48 h con 0.36 g etanol/g xilosa. Aun así, se puede especular que uno de los factores que pueden estar implicados en la reducción del tiempo es la concentración de xilosa en el medio de cultivo. Por otro lado, al comparar en términos de rendimientos g etanol/g xilosa, en la fermentación con Zn y Ca fue 0.37 g etanol/g xilosa. Este rendimiento resultó ser idéntico al que se obtuvo en el medio sintético optimizado. La única diferencia es el tiempo de fermentación en el optimizado se calculó a las 48 h y en el medio robusto con HAOM se calculó a las 24 h. El tratamiento testigo en HAOM se comportó similar al optimizado con xilosa sintética 0.29 y 0.26 g etanol/g xilosa respectivamente. Sin embargo, al igual que en el tratamiento de zinc y calcio el tiempo de cálculo fue a las 24 h. De esta manera se pudo comprobar que el  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  y el  $\text{CaCl}_2$  tienen un efecto significativo en el rendimiento (g/g) de etanol en xilosa. Estos rendimientos son muy superiores a los obtenidos por Lübbenhüsen (2004) en *M. circinelloides* en xilosa que fueron de 0.004 g etanol/g xilosa. Resultados más semejantes fueron en hemicelulosa de arroz teniendo 0.24 g etanol/g xilosa o en términos de porcentaje respecto al teórico máximo se reporta el 46.96 % (Karimi y col., 2006). Comparando con el porcentaje teórico obtenido en este trabajo de 72.40%, la diferencia eficiencia es del 25.44 % en cuanto a la conversión de xilosa a etanol.



**Figura 25.** Curvas de producción de etanol entre la fermentación testigo y el tratamiento adicionado con 1.5 g/L de  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$  y 0.168 g/L de  $CaCl_2$  en HAOM.

### 3Consumo de xilosa ( $q_s$ )

En la **Figura 26** se puede observar la tendencia del hongo para consumir la xilosa presente en el HAOM. Aparentemente, no se observa diferencia significativa entre cada uno de los tiempos de consumo de ambas fermentaciones. El tiempo en el que se consumió la xilosa en su totalidad fue de 48 h. Sin embargo, al relacionar estos valores a los valores de crecimiento se puede obtener la velocidad específica de consumo de sustrato, el cual está relacionado con la producción de biomasa. En el **Cuadro 9** se comparan las velocidades entre la fermentación testigo en HAOM y la fermentación adicionada con Zn y Ca, durante la fase log. La cual está representada durante las primeras 24 horas de la fermentación. En los dos tiempos mostrados, 12 y 24 h,  $q_s$  fue mayor. 0.17 y 0,09 (g xilosa/g biomasa·h) en la fermentación adicionada con Zn y Ca, respecto a la fermentación testigo, que tuvo un  $q_s$  de 0.13 y 0.04 (g xilosa/g biomasa·h), para 12 y 24 h, respectivamente. Esto representa la capacidad del microorganismo para consumir la xilosa en una mayor velocidad en presencia de las sales. Lo que puede estar relacionado a múltiples factores. Como actividad catalítica y/o sobreexpresión de las enzimas implicadas en el metabolismo de xilosa. Así como también, podrían estar relacionados con el transporte del azúcar dentro de la célula. Aunque también, puede deberse a la represión de algún mecanismo que favorece el consumo de xilosa por parte del hongo. Múltiples hipótesis surgen ante estos resultados, que pueden ser resueltas con técnicas de alto nivel molecular como la proteómica o metabolómica, incluso con microscopia confocal. Esto no solo es una situación que sucede solo en hongos del genero *Mucor*. Los mecanismos de consumo de xilosa no están del todo dilucidados en diversos microorganismo, y toma importancia sobre todo en aquellos con potencial industrial y para la producción de biocombustibles como el etanol (Ribeiro y col., 2021).



**Figura 26.** Curvas de consumo de xilosa entre la fermentación testigo y el tratamiento adicionado con 1.5 g/L de  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  y 0.168 g/L de  $\text{CaCl}_2$  en HAOM.

**Cuadro 9.** Velocidad específica de consumo de sustrato ( $q_s$ )

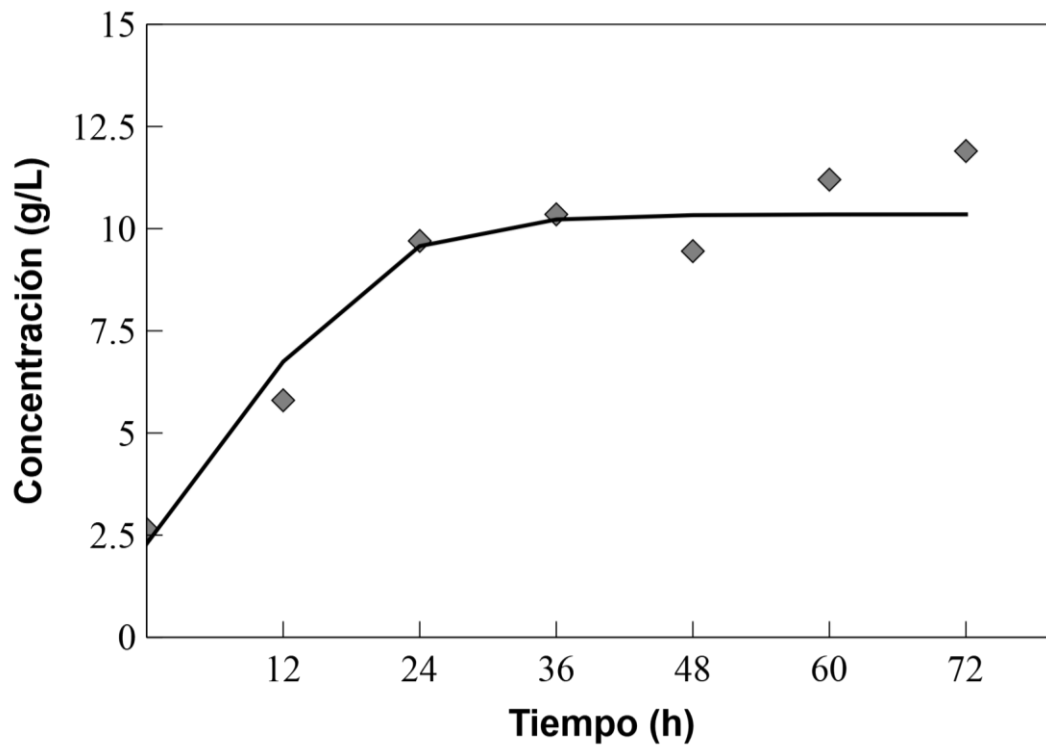
| Tiempo (h) | Tratamientos                      |   |
|------------|-----------------------------------|---|
|            | Testigo (g xilosa/g<br>biomasa·h) | Zinc y calcio (g<br>xilosa/g biomasa·h) |
| 12         | 0.13 <sup>b</sup>                 | 0.17 <sup>a</sup>                       |
| 24         | 0.04 <sup>b</sup>                 | 0.09 <sup>a</sup>                       |

\*Letras diferentes indican diferencia significativa entre filas. Tukey ( $\alpha=0.05$ ).

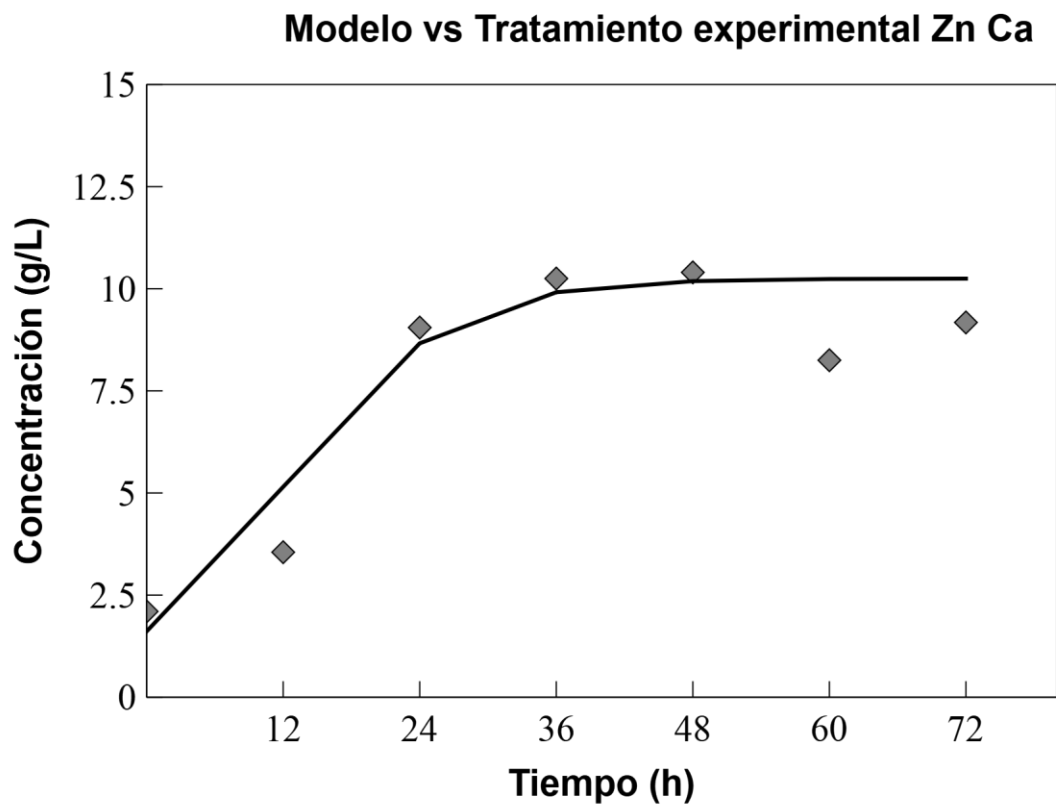


#### 4Productividad específica de Luedeking-Piret

Uno de los parámetros más importantes de escalamiento es la productividad específica, que puede ser calculada a través del modelo de Luedeking-Piret. Este modelo relaciona la producción de etanol, y la biomasa durante el tiempo de fermentación. Para esto, se utilizó la tasa de crecimiento calculada con la ecuación logística. Y se relacionaron con los datos experimentales en la fase exponencial de la fermentación, es decir durante las primeras 24 h. La productividad específica calculada fue mayor en el tratamiento con zinc y calcio de 0.4 g etanol/g biomasa·h y de 0.3 g etanol/g biomasa·h en el tratamiento testigo. Este parámetro de escalamiento es muy importante, debido a que se muestra la capacidad de 1 g de micelio de hongo, para producir etanol en 1 h. Además, facilita la optimización del inóculo sin utilizar modelos estadísticos y múltiples experimentos, incluso el identificar este valor puede reducir el tiempo de fermentación al recalcular la concentración de inóculo. En las **Figuras 27 y 28**, se presenta el modelo predicho en línea junto a los datos experimentales en puntos. El modelo se logra ajustar hasta la fase estacionaria que son las 48 h de fermentación, en ambos casos. La diferencia entre las productividades es de 0.1 g etanol/g biomasa·h, lo que pudiera parecer no ser una diferencia significativa. Pero durante los escalamientos, extrapolar estos valores en toneladas es altamente significativo en la cantidad de producto y costo.



**Figura 27.** Modelo de fermentación calculado con la ecuación de Luedeking-Piret (--) y datos experimentales de la fermentación testigo (♦),  $\alpha=0.3$  g etanol/g biomasa h.

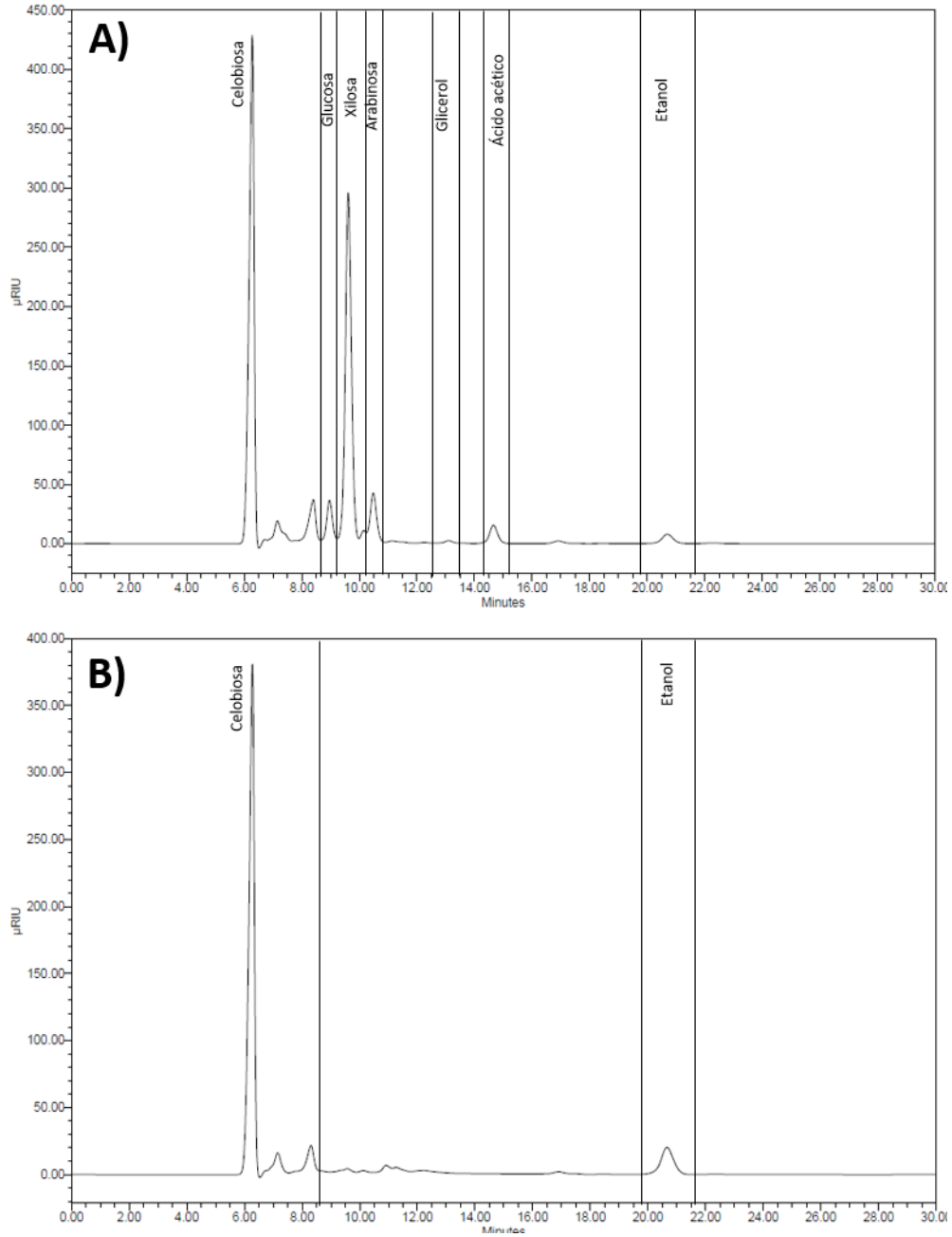


**Figura 28.** Modelo de fermentación calculado con la ecuación de Luedeking-Piret (--) y datos experimentales de la fermentación con zinc y calcio (♦),  $\alpha=0.4$  g etanol/g biomasa·h.

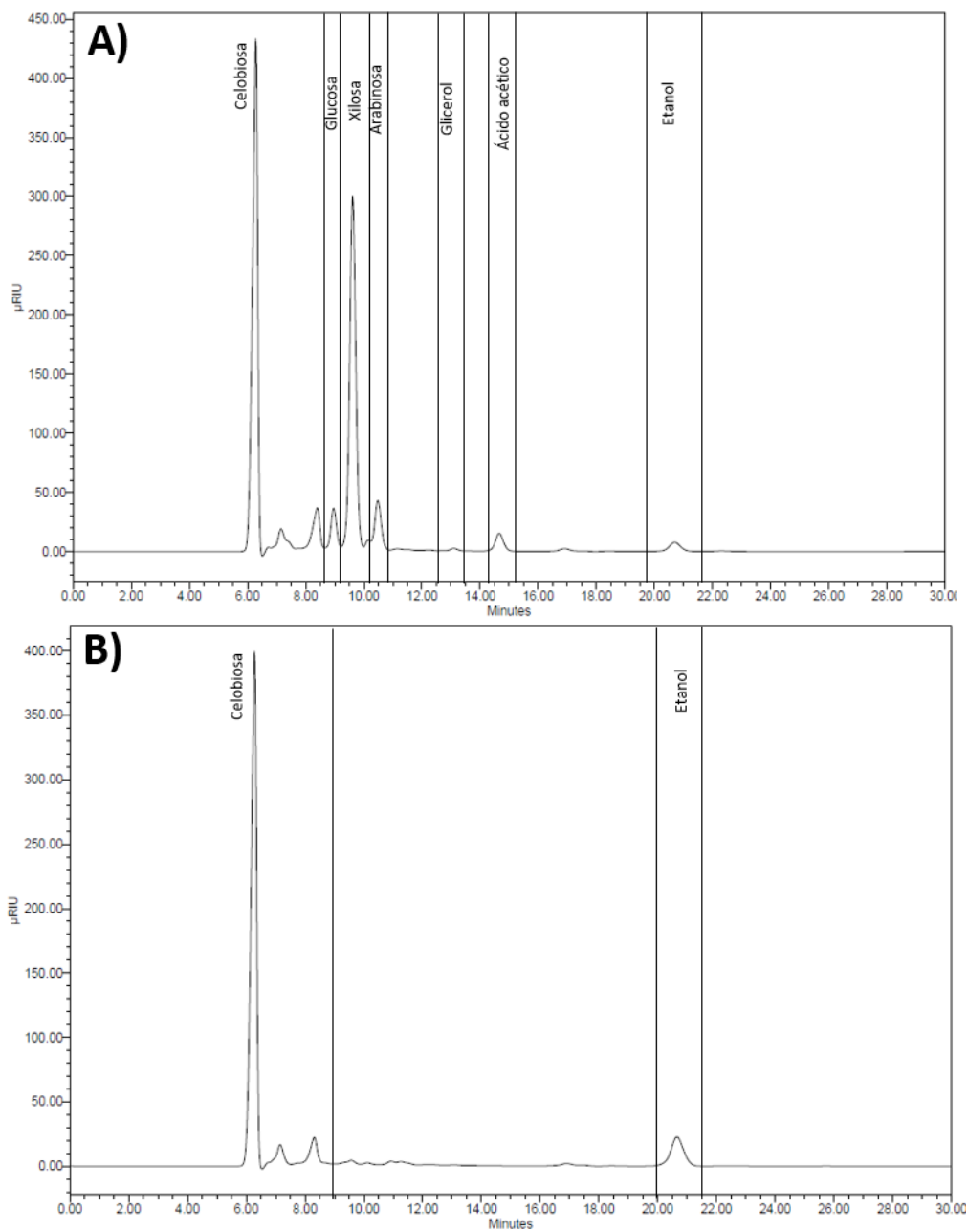
## 5Efecto del Zn-Ca en la asimilación de xilitol, glicerol y ácido acético.

Las **Figuras 29 y 30** muestran el perfil del medio de cultivo presentado en los cromatogramas, en el tiempo 0 h (29 a y 30 a) y el tiempo 72 h (29 b y 30b). Las características de composición son muy similares en ambos tratamientos. Inician de los mismos componentes y finalizan de una manera similar, donde solo quedó etanol. Hay diferencia entre las concentraciones a las 72 h, en el control es de 5.33 g/L y en el tratamiento con zinc y calcio de 5.94 g/L. representados en rendimientos como 0.23 y 0.29 g etanol/g xilosa. Este fenómeno se presentó en las fermentaciones iniciales de este trabajo con glucosa. El rendimiento se mantiene constante en los tratamientos con las sales al finalizar la fermentación y disminuye en el control. Esto puede deberse a que hay una inhibición en el metabolismo río abajo que no permite utilizar el etanol como precursor de otra ruta. Industrialmente, este comportamiento es muy bueno, debido a que no hay pérdidas por efectos metabólicos posteriores.

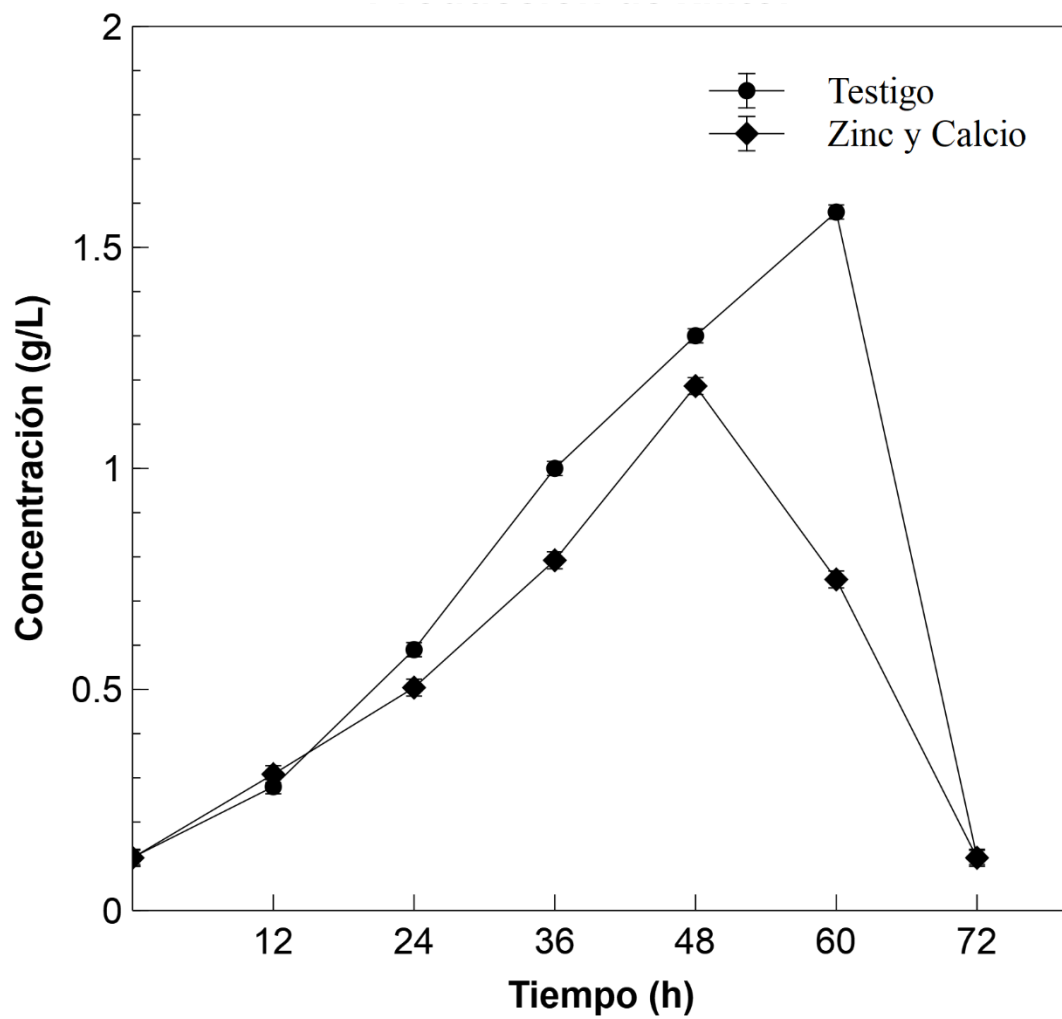
Durante la fermentación se cuantificaron algunos intermediarios como el xilitol y glicerol, hubo una acumulación ligeramente y prolongada de xilitol ( $< 1$  g/L) en el testigo respecto al tratamiento con zinc y calcio (**Figura 31**). Se puede especular, que durante la fermentación con las sales zinc y calcio el xilitol continuo el flujo metabólico para alimentar como la glucolisis. Probablemente se deba un efecto de optimización catalítica por parte del zinc al unirse al sitio activo de la XDH que participan en la bioconversión de xilitol a xilulosa (Zhao y col., 2020). De igual manera el glicerol se acumuló en mayor concentración en los tratamientos testigos con diferencias de  $< 0.2$  g/L a las fermentaciones HAOM con zinc y calcio. Se desconoce, si la enzima gliceraldehido 3-P deshidrogenasa, pudiera verse afectada por el efecto del zinc y el calcio. Pero esta reportado que *M. circinelloides* es capaz de usar como fuente de carbono el glicerol (Papanikolaou y col., 2017). Probablemente, el proceso de asimilación de xilitol, ocurrió de igual manera al agotarse las fuentes de carbono principales del HAOM, dado que es un metabolito intermediario del proceso.



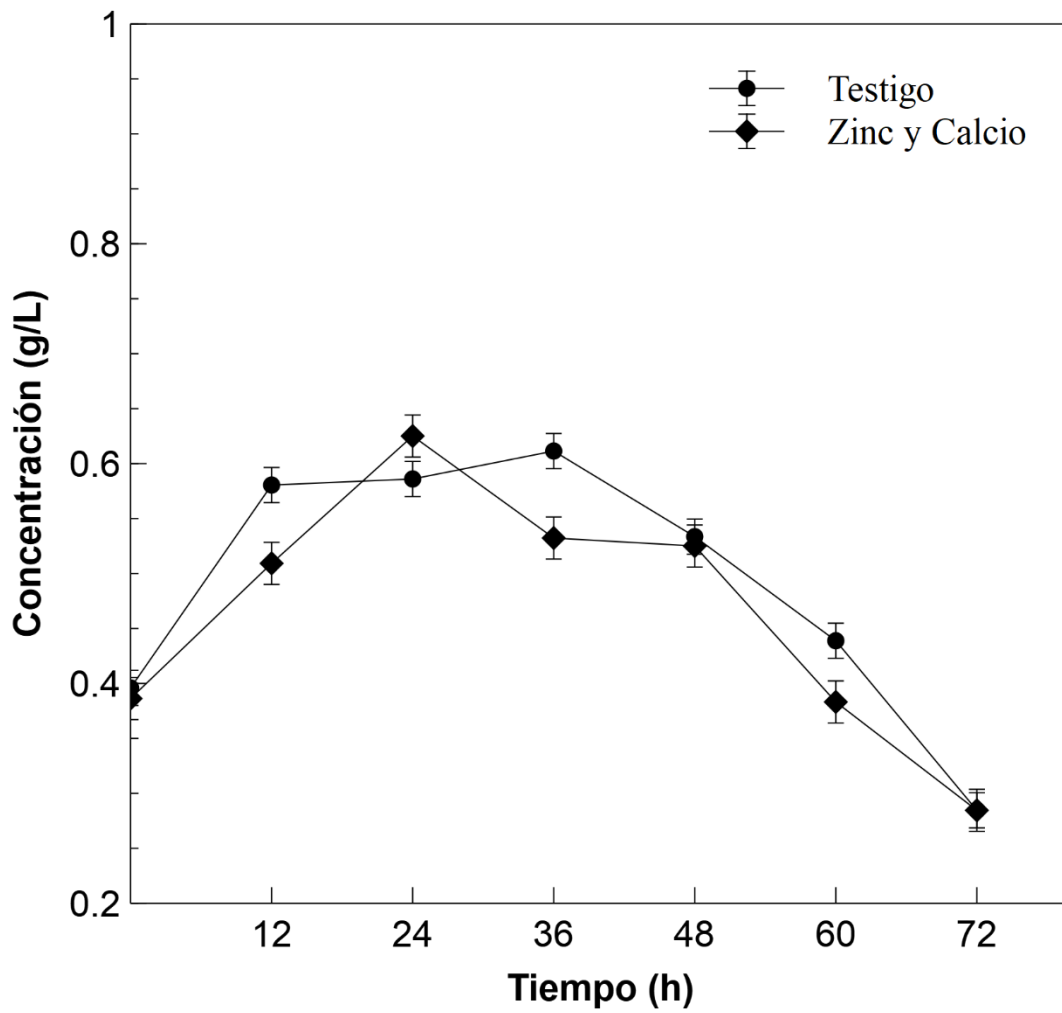
**Figura. 29.** Perfil de fermentación del tiempo 0 h (a) y 72 h (b) en la fermentación testigo de HAOM.



**Figura. 30.** Perfil de fermentación del tiempo 0 h (a) y 72 h (b) en la fermentación de HAOM adicionada con zinc y calcio.



**Figura 31.** Curvas de producción de xilitol en la fermentación de HAOM, comparación entre el testigo y el tratamiento adicionado con 1.5 g/L de  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$  y 0.168 g/L de  $CaCl_2$ .



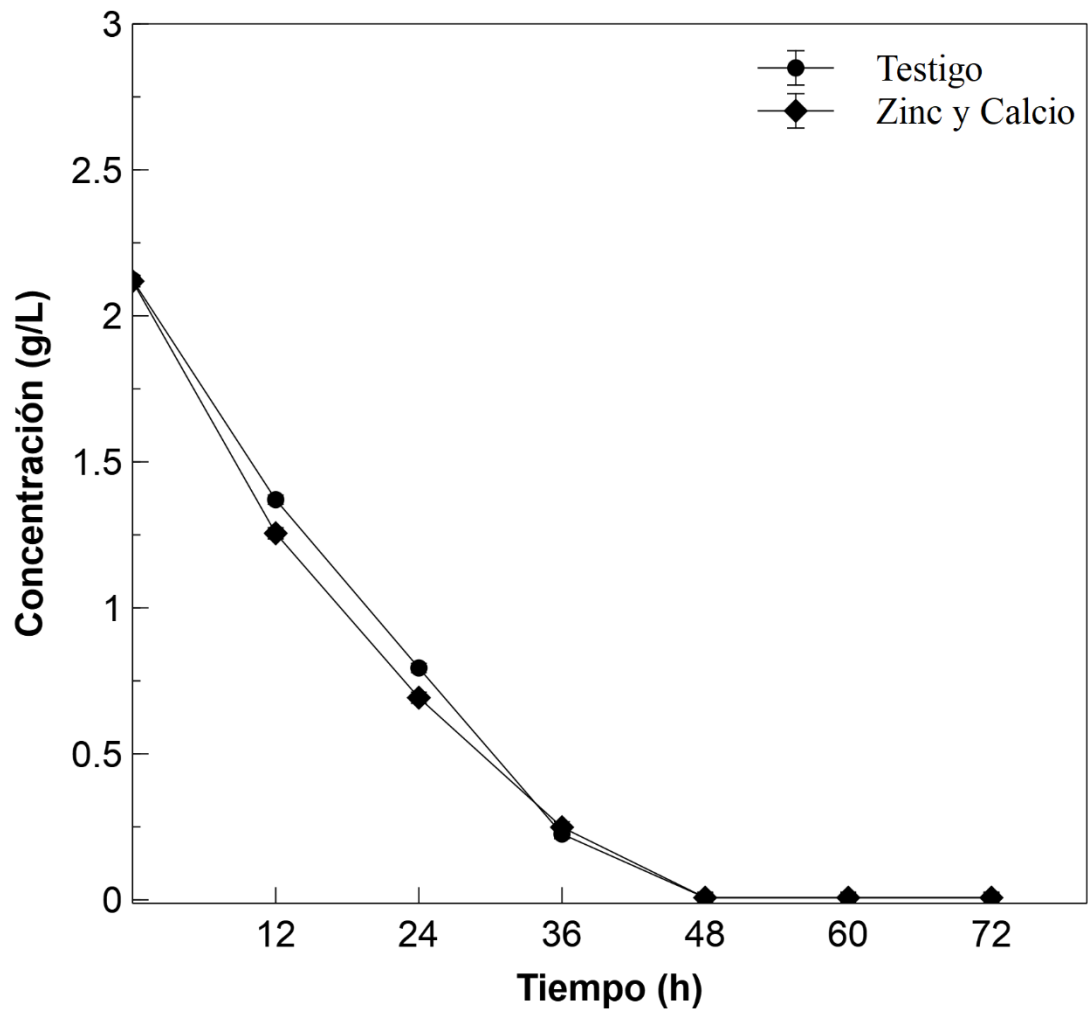
**Figura 32.** Curvas de producción de glicerol en la fermentación de HAOM, comparación entre el testigo y el tratamiento adicionado con 1.5 g/L de  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$  y 0.168 g/L de  $CaCl_2$ .



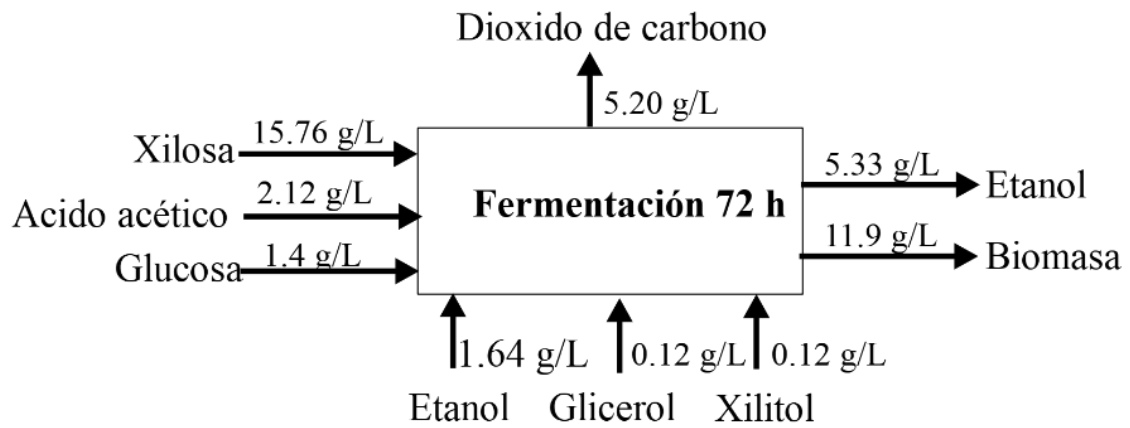
Aun demostrado que el zinc y el calcio tienen un efecto remarcable en la fermentación, el HAOM contenía un elemento que estaba reduciendo el tiempo de fermentación con respecto a las fermentaciones evaluadas en medio sintético. Por tal motivo, también se cuantificaron los intermediarios de la fermentación como xilitol, glicerol y el ácido acético, este último liberado debido a la hidrólisis ácida. En cuanto a estos análisis, el dato más relevante es que el ácido acético se consumió en su totalidad (**Figura 33**), lo que resulta un descubrimiento innovador debido a que las levaduras no tienen la capacidad de degradar esta sustancia. Además, el consumo de ácido acético se realizó de manera simultánea al de xilosa. Lo que significa que no hay represión catabólica como en el caso de la glucosa. Esto es muy importante en el desarrollo de bioprocesos, por lo que en algún momento se consideró a este ácido orgánico un inhibidor de fermentación, y en este caso particularmente pudo haber estimulado y/o acelerado la fermentación, sobre todo al considerarse una fuente de carbono que indujo el crecimiento. Se ha reportado que la tolerancia máxima en *Mucor indicus* puede llegar a ser 10 g/L (Sues y col., 2005). Por lo anterior, esto posibilita el desarrollo de nuevos pretratamientos más amigables con el medio ambiente, ya que el ácido acético puede ser usado para la hidrólisis y posteriormente degradado en la fermentación.

## **6Balance de masa**

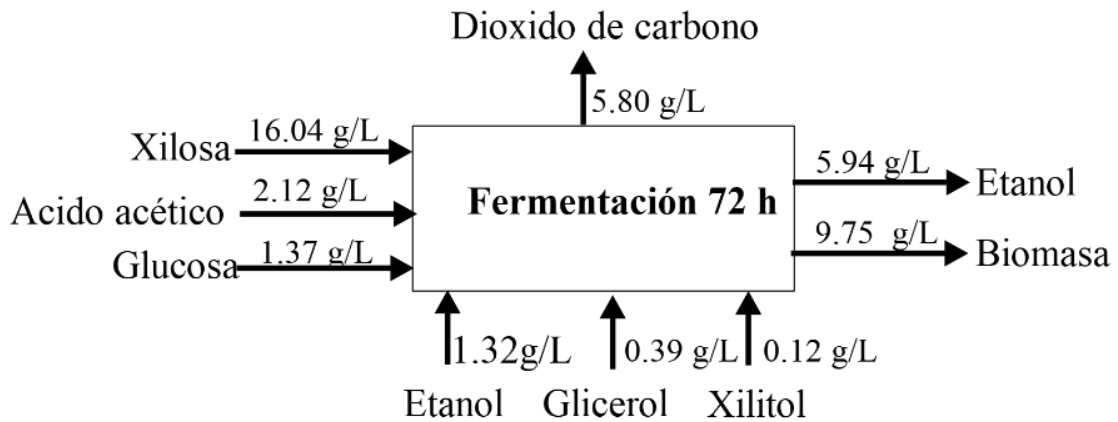
Para responder a algunas de las especulaciones anteriores, si el ácido acético fue considerado como una fuente de carbono y validar la producción de biomasa y etanol. Se presenta a continuación un balance de masas y se compara en el testigo (**Figura 34**) y el tratamiento con zinc y calcio (**Figura 35**), con respecto a la transformación del HAOM en biomasa y etanol, donde las entradas son los metabolitos calculados al tiempo 0 h y las salidas a las 72 h de fermentación.



**Figura 33.** Curvas de degradación de ácido acético en la fermentación de HAOM, comparación entre el testigo y el tratamiento adicionado con 1.5 g/L de  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  y 0.168 g/L de  $\text{CaCl}_2$ .



**Figura 34.** Balance de masas del tratamiento testigo en la fermentación de HAOM. Las entradas corresponden al tiempo de 0 h, donde se consideran metabolitos del inoculo, y las salidas son medidas obtenidas a las 72 h al finalizar la fermentación.



**Figura 35.** Balance de masas del tratamiento con  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  y  $\text{CaCl}_2$  en la fermentación de HAOM. Las entradas corresponden al tiempo de 0 h, donde se consideran metabolitos del inoculo, y las salidas son medidas obtenidas a las 72 h al finalizar la fermentación.

## F ACUMULACIÓN DE PROTEÍNAS

Se obtuvo la concentración de proteínas a partir del micelio liofilizado de *M. circinelloides* considerando los tiempos donde la producción de xilitol y etanol fueron mayor, 60 y 84 h respectivamente para cada metabolito. La concentración de proteína fue mayor en ambos tiempos, lo cual puede ser un indicativo que el zinc y el calcio restringieron la producción de proteínas durante el bioproceso. Estas proteínas pueden estar relacionadas con el crecimiento. Dado que se ha demostrado que el zinc y el calcio disminuyen la  $\mu$  en las fermentaciones con el hongo. Sin embargo, aunque los rendimientos de etanol y xilitol fueron mayores en presencia de zinc y calcio, también podría deberse a la inhibición de algunas proteínas que restringían la transformación de xilosa a etanol a través de la ruta de pentosas.

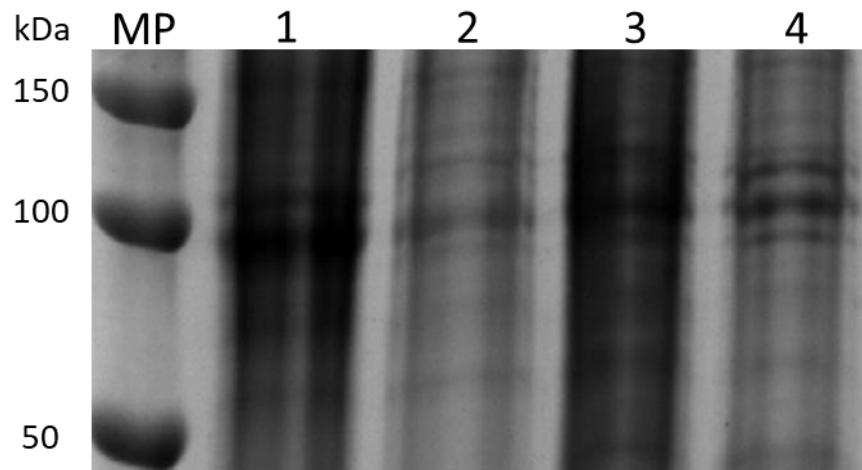
En la Figura 36 se muestra una comparación del perfil de proteínas por electroforesis SDS-PAGE. En los carriles 1 y 3 se presentan las fermentaciones controles (60 y 84 h, respectivamente), comparados con los perfiles de las fermentaciones con zinc y calcio en los carriles 2 y 4 (60 y 84 h, respectivamente). Las proteínas principales oscilan entre los 90 a 110 KDa aproximadamente. Sin embargo, la acumulación se hace más evidente en los tratamientos controles que en los tratamientos con zinc y calcio. Por lo que muestran concordancia con la concentración de proteína en las muestras. Para determinar con que proteínas estarían relacionadas se consideró el trabajo realizado por Tang y col. (2016), donde identificaron diversas proteínas relacionadas al metabolismo de la cepa *M. circinelloides* wj11. Estas proteínas están categorizadas por metabolismo de nitrógeno, aminoácidos, carbohidratos, proteínas, ácidos nucleicos, energía, transducción, chaperonas y homeostasis. Donde la única proteína de peso molecular similar (95.461 KDa) resultó ser la subunidad I de la ATPasa tipo-V Transportadora de H<sup>+</sup> (EPB85344.1). Mediante una comparación en el software CLC de esta secuencia aminoacídica con la de otras cepas del género *Mucor* (Anexo 1), se demostró que es una proteína altamente conservada y el peso

molecular oscila entre los 90 y 100 KDa. Considerando esta información, una probable explicación a la disminución de la acumulación de proteínas en las fermentaciones de xilosa en presencia de zinc y calcio. Es que el proceso de fosforilación oxidativa el funcionamiento de la subunidad I de la ATPasa pasa a segundo plano, debido a que no queda disponible ADP en el proceso de fermentación, sino NADH por la oxidación del acetaldehído en etanol, el cual es procesado en la subunidad II. Por lo tanto, se puede inferir que al producir más etanol por efecto del zinc y el calcio que actúan como cofactores enzimáticos de la enzima alcohol deshidrogenasa (ADH), la producción de energía a través de esta ruta metabólica, reprime las rutas metabólicas productoras de ATP, generalmente ciclo de Krebs (TCA). Este fenómeno es muy similar al efecto crabtree, que se ha evaluado en hongos del genero *Mucor*, la fermentación alcohólica en elevadas concentraciones de azúcares favorecen la producción de NADH por lo que se convierte en la única fuente de energía.

**Cuadro 10.** Concentración de proteína en biomasa de *M. circinelloides*

| Tratamientos | Concentración de proteína (mg/mL) |                    |
|--------------|-----------------------------------|--------------------|
|              | Tiempo (h)                        |                    |
|              | 60                                | 84                 |
| Control      | 3.653 <sup>a</sup>                | 3.472 <sup>a</sup> |
| Zinc-Calcio  | 2.464 <sup>b</sup>                | 2.480 <sup>b</sup> |

\*Letras diferentes por columna indican diferencia significativa Fisher ( $\alpha=0.05$ ).



**Figura 36.** SDS-PAGE de las fermentaciones con zinc y calcio (FZC) comparados con una fermentación control (FC). 1) FC a las 60 h, 2) FZC 60 h, 3) FC 84 h y, 4) FZC a las 84 h.



## IX CONCLUSIONES

La secuenciación de la región espaciadora interna transcrita (ITS) permitió la identificación de la secuencia completa de los genes ARN ribosomal ITS1 y 5.8S y parcial del gen ITS2, que permitió identificar la cepa C1502 como *Mucor circinelloides* otorgando el número de acceso MN128960 por el Centro Nacional de Biotecnología de la Información (NCBI).

Se demostró el potencial metabólico del hongo para producir etanol a partir de diferentes azúcares, obteniendo un resultado de 0.44 g de etanol/ g de glucosa y 0.36 g etanol/ g xilosa.

Se comprobó que el extracto de levadura es un nutriente de importancia para el metabolismo de xilosa en la cepa *M. circinelloides* C1502 y que una concentración de 7.5 g/L es suficiente para no limitar el consumo del azúcar hasta una concentración de 50 g/L.

El  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  y  $\text{CaCl}_2$  mantienen la concentración de etanol constante por un periodo prologando (12 h) en el medio de cultivo durante en la fermentación de glucosa.

La adición de  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  y  $\text{CaCl}_2$  en el medio de cultivo en condiciones óptimas, teniendo 1.5 y 0.168 g/L respectivamente, incrementan el rendimiento de etanol a partir de xilosa 0.34 g/etanol/ g xilosa. Además, incrementan el rendimiento en la producción de xilitol y reducen el tiempo de fermentación de 84 h a 48 h. Debido a que el tiempo de fermentación puede ser reducido, podría ser una ventaja para la reducción de los costos generales de producción en una escala mayor.

Existe una disminución en la acumulación de proteínas de peso molecular 100 KDa durante la fermentación de xilosa en los tiempos de 60 y 84 h, debido al tratamiento con zinc y calcio, la cual se ha identificado putativamente como subunidad I de la ATPasa tipo-V Transportadora de  $\text{H}^+$ .

En este proyecto queda en evidencia, que la optimización de la fermentación alcohólica de xilosa puede ser extrapolada en medios de cultivos

robustos provenientes de residuos agroindustriales. De este punto se puede concluir que los subresiduos ácidos de la hidrólisis de olote de maíz pueden ser valorizados. También se obtuvo un rendimiento de 0.37 g etanol/g xilosa a las 24 h y fue mayor debido al efecto del  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  y  $\text{CaCl}_2$  en concentraciones óptimas que el control 0.29 g de etanol/g xilosa. De los parámetros cinéticos se tiene que la tasa de crecimiento  $\mu$  ( $\text{h}^{-1}$ ) disminuye, la tasa específica de consumo  $q_s$  (g xilosa/g biomasa h) y la productividad específica  $\alpha$  (g etanol/g biomasa h) aumenta. Teniendo  $0.14 < 0.16 \text{ h}^{-1}$ ,  $0.17 > 0.13 \text{ g/g h}$  y  $0.4 > 0.3 \text{ g/g h}$ , respectivamente para cada constante cinética comparadas con su control. Adicionalmente a esto, *M. circinelloides* puede utilizar simultáneamente el ácido acético junto con la xilosa, sin que exista ningún mecanismo de represión catabólica.

## X BIBLIOGRAFIA

- Abtahi, Z., Ria, M., Niklasson, C., y Taherzadeh, M. (2010). *Ethanol production by Mucor indicus at high glucose and ethanol concentrations* (Vol. 22).
- Actor, J. K. (2012). 15 - Mycology. In J. K. Actor (Ed.), *Elsevier's Integrated Review Immunology and Microbiology (Second Edition)* (pp. 139-146). Philadelphia: W.B. Saunders.
- Alves, M. H., Campos-Takaki, G. M., Porto, A. L. F., y Milanez, A. I. (2002). Screening of Mucor spp. for the production of amylase, lipase, polygalacturonase and protease. *Brazilian Journal of Microbiology*, 33, 325-330.
- Alves, M. H., de Campos-Takaki, G. M., Okada, K., Pessoa, I. H. F., y Milanez, A. I. (2005). Detección de proteasas extracelulares en especies de Mucor. *Revista Iberoamericana de Micología*, 22(2), 114-117. doi: [https://doi.org/10.1016/S1130-1406\(05\)70020-6](https://doi.org/10.1016/S1130-1406(05)70020-6)
- Alvim, M. C. T., Vital, C. E., Barros, E., Vieira, N. M., da Silveira, F. A., Balbino, T. R., Diniz, R. H. S., Brito, A. F., Bazzolli, D. M. S., y de Oliveira Ramos, H. J. (2019). Ethanol stress responses of Kluyveromyces marxianus CCT 7735 revealed by proteomic and metabolomic analyses. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 112(6), 827-845.
- Amore, A., y Faraco, V. (2012). Potential of fungi as category I Consolidated BioProcessing organisms for cellulosic ethanol production. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 16(5), 3286-3301. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.rser.2012.02.050>
- Anasontzis, G. E., Kourtoglou, E., Villas-Boâs, S. G., Hatzinikolaou, D. G., y Christakopoulos, P. (2016). Metabolic Engineering of Fusarium oxysporum to Improve Its Ethanol-Producing Capability. *Frontiers in Microbiology*, 7, 632. doi: 10.3389/fmicb.2016.00632
- Anasontzis, G. E., Zerva, A., Stathopoulou, P. M., Haralampidis, K., Diallinas, G., Karagouni, A. D., y Hatzinikolaou, D. G. (2011). Homologous overexpression of xylanase in Fusarium oxysporum increases ethanol productivity during consolidated bioprocessing (CBP) of lignocellulosics. *Journal of Biotechnology*, 152(1-2), 16-23. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiotec.2011.01.002>
- Antczak, T., Graczyk, J., Szczsna-Antczak, M., y Bielecki, S. (2002). Activation of Mucor circinelloides lipase in organic medium. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 19-20, 287-294. doi: [https://doi.org/10.1016/S1381-1177\(02\)00179-0](https://doi.org/10.1016/S1381-1177(02)00179-0)
- Anwar, Z., Gulfranz, M., y Irshad, M. (2014). Agro-industrial lignocellulosic biomass a key to unlock the future bio-energy: A brief review. *Journal of Radiation Research and Applied Sciences*, 7(2), 163-173.
- Arce-Martinez, T. A. (2017). *Hidrólisis enzimática de Moringa oleifera utilizando hongos etanológicos: evaluación del efecto de temperatura, agitación y*

- tiempo de fermentación* (Químico Farmaceutico Biologo), Universidad Autónoma de Sinaloa.
- Armenta-Martinez, K. (2020). Diseño de un Bioproceso para la producción de etanol a partir de Moringa oleifera y optimización de la etapa de pretratamiento. *TESIS. Universidad Autonoma de Sinaloa. Culiacan, Sinaloa Mexico.*
- Bajpai, P. (2013). Chemistry, Types, and Sources of Ethanol *Advances in Bioethanol* (pp. 13-20): Springer India.
- Bak, J. S. (2015). Downstream optimization of fungal-based simultaneous saccharification and fermentation relevant to lignocellulosic ethanol production. *SpringerPlus*, 4(1), 47.
- Balat, M. (2011). Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: A review. *Energy Conversion and Management*, 52(2), 858-875. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.enconman.2010.08.013>
- Barros-Rios, J., Romani, A., Garrote, G., y Ordas, B. (2015). Biomass, sugar, and bioethanol potential of sweet corn. *GCB Bioenergy*, 7(1), 153-160.
- Bedó, S., Fehér, A., Khunnonkwao, P., Jantama, K., y Fehér, C. (2021). Optimized Bioconversion of Xylose Derived from Pre-Treated Crop Residues into Xylitol by Using *Candida boidinii*. *Agronomy*, 11(1), 79.
- Behera, S., Mohanty, R. C., y Ray, R. C. (2011). Ethanol production from mahula (*Madhuca latifolia* L.) flowers with immobilized cells of *Saccharomyces cerevisiae* in *Luffa cylindrica* L. sponge discs. *Applied Energy*, 88(1), 212-215. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.apenergy.2010.07.035>
- Belorkar, S. A., y Jogaiah, S. (2022). Chapter 10 - Agroindustrial wastes for enzyme production. In S. A. Belorkar y S. Jogaiah (Eds.), *Protocols and Applications in Enzymology* (pp. 197-212): Academic Press.
- Biggs, B. W., De Paepe, B., Santos, C. N. S., De Mey, M., y Kumaran Ajikumar, P. (2014). Multivariate modular metabolic engineering for pathway and strain optimization. *Current Opinion in Biotechnology*, 29, 156-162. doi: <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2014.05.005>
- Bouza, E., Muñoz, P., y Guinea, J. (2006). Mucormycosis: an emerging disease? *Clinical Microbiology and Infection*, 12, 7-23. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2006.01604.x>
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72(1-2), 248-254.
- Brethauer, S., y Wyman, C. E. (2010). Review: Continuous hydrolysis and fermentation for cellulosic ethanol production. *Bioresource technology*, 101(13), 4862-4874. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2009.11.009>
- Brown, S. D., Raman, B., McKeown, C. K., Kale, S. P., He, Z., y Mielenz, J. R. (2007). Construction and evaluation of a *Clostridium thermocellum* ATCC 27405 whole-genome oligonucleotide microarray *Applied Biochemistry and Biotechnology* (pp. 663-674): Springer.
- Buaban, B., Inoue, H., Yano, S., Tanapongpipat, S., Ruanglek, V., Champreda,

- V., Pichyangkura, R., Rengpipat, S., y Eurwilaichitr, L. (2010). Bioethanol production from ball milled bagasse using an on-site produced fungal enzyme cocktail and xylose-fermenting *Pichia stipitis*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 110(1), 18-25. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiosc.2009.12.003>
- Carvalho, A. K. F., Bento, H. B. S., Rivaldi, J. D., y de Castro, H. F. (2018). Direct transesterification of *Mucor circinelloides* biomass for biodiesel production: Effect of carbon sources on the accumulation of fungal lipids and biofuel properties. *Fuel*, 234, 789-796. doi: <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2018.07.029>
- Claes, A., Deparis, Q., Foulquié-Moreno, M. R., y Thevelein, J. M. (2020). Simultaneous secretion of seven lignocellulolytic enzymes by an industrial second-generation yeast strain enables efficient ethanol production from multiple polymeric substrates. *Metabolic engineering*, 59, 131-141.
- Contreras-Montoya, C. A. (2019). Evaluación del efecto del Zinc en la síntesis de bioetanol a partir de glucosa y xilosa por *Mucor circinelloides*. TESIS. Universidad Autónoma de Sinaloa. Culiacan, Sinaloa Mexico.
- Costello, Z., y Martin, H. G. (2018). A machine learning approach to predict metabolic pathway dynamics from time-series multiomics data. *npj Systems Biology and Applications*, 4(1), 19. doi: 10.1038/s41540-018-0054-3
- Csernetics, Á., Nagy, G., Iturriaga, E. A., Szekeres, A., Eslava, A. P., Vágvölgyi, C., y Papp, T. (2011). Expression of three isoprenoid biosynthesis genes and their effects on the carotenoid production of the zygomycete *Mucor circinelloides*. *Fungal Genetics and Biology*, 48(7), 696-703. doi: <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2011.03.006>
- Cuero, R., y Ouellet, T. (2005). Metal ions modulate gene expression and accumulation of the mycotoxins aflatoxin and zearalenone. *Journal of applied microbiology*, 98(3), 598-605.
- Cui, Z., Zhang, X., Yang, H., y Sun, L. (2017). Bioremediation of heavy metal pollution utilizing composite microbial agent of *Mucor circinelloides*, *Actinomucor* sp. and *Mortierella* sp. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 5(4), 3616-3621. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jece.2017.07.021>
- Chambi Rodriguez, A. D., y Torres Jiménez, A. M. (2021). Modelos cinéticos sigmoidales aplicados al crecimiento de *Saccharomyces boulardii*. *Revista de Investigaciones Altoandinas*, 23(1), 47-54.
- Chattopadhyay, A., Singh, R., Das, A. K., y Maiti, M. K. (2020). Characterization of two sugar transporters responsible for efficient xylose uptake in an oleaginous yeast *Candida tropicalis* SY005. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 695, 108645. doi: <https://doi.org/10.1016/j.abb.2020.108645>
- Chayakulkeeree, M., Ghannoum, M. A., y Perfect, J. R. (2006). Zygomycosis: the re-emerging fungal infection. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 25(4), 215-229. doi: 10.1007/s10096-006-0107-1

- Chen, R., y Dou, J. (2016). Biofuels and bio-based chemicals from lignocellulose: metabolic engineering strategies in strain development. *Biotechnology Letters*, 38(2), 213-221.
- Chu, L., Zan, X., Tang, X., Zhao, L., Chen, H., Chen, Y. Q., Chen, W., y Song, Y. (2016). The role of a xylose isomerase pathway in the conversion of xylose to lipid in *Mucor circinelloides*. *RSC advances*, 6(81), 77944-77952.
- Daly, P., van Munster, J. M., Kokolski, M., Sang, F., Blythe, M. J., Malla, S., Velasco de Castro Oliveira, J., Goldman, G. H., y Archer, D. B. (2017). Transcriptomic responses of mixed cultures of ascomycete fungi to lignocellulose using dual RNA-seq reveal inter-species antagonism and limited beneficial effects on CAZyme expression. *Fungal Genetics and Biology*, 102, 4-21. doi: <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2016.04.005>
- Dantas, G. A., Legey, L. F. L., y Mazzone, A. (2013). Energy from sugarcane bagasse in Brazil: An assessment of the productivity and cost of different technological routes. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 21, 356-364. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.rser.2012.11.080>
- Das, M., Patra, P., y Ghosh, A. (2020). Metabolic engineering for enhancing microbial biosynthesis of advanced biofuels. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 119, 109562. doi: <https://doi.org/10.1016/j.rser.2019.109562>
- den Haan, R., Kroukamp, H., van Zyl, J.-H. D., y van Zyl, W. H. (2013). Cellobiohydrolase secretion by yeast: Current state and prospects for improvement. *Process Biochemistry*, 48(1), 1-12. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2012.11.015>
- den Haan, R., van Rensburg, E., Rose, S. H., Görgens, J. F., y van Zyl, W. H. (2015). Progress and challenges in the engineering of non-cellulolytic microorganisms for consolidated bioprocessing. *Current Opinion in Biotechnology*, 33, 32-38. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.copbio.2014.10.003>
- Dionisi, D., Anderson, J. A., Aulenta, F., McCue, A., y Paton, G. (2015). The potential of microbial processes for lignocellulosic biomass conversion to ethanol: a review. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 90(3), 366-383. doi: 10.1002/jctb.4544
- Doan, Q. C., Moheimani, N. R., Mastrangelo, A. J., y Lewis, D. M. (2012). Microalgal biomass for bioethanol fermentation: Implications for hypersaline systems with an industrial focus. *Biomass and Bioenergy*, 46, 79-88. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biombioe.2012.08.022>
- Doelle, H. W. (1975). 9 - Fermentation. In H. W. Doelle (Ed.), *Bacterial Metabolism (Second Edition)* (pp. 559-692): Academic Press.
- dos Reis, L., Fontana, R. C., da Silva Delabona, P., da Silva Lima, D. J., Camassola, M., da Cruz Pradella, J. G., y Dillon, A. J. P. (2013). Increased production of cellulases and xylanases by *Penicillium echinulatum* S1M29 in batch and fed-batch culture. *Bioresource technology*, 146, 597-603. doi: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.07.124>



- Du, R., Yan, J., Li, S., Zhang, L., Zhang, S., Li, J., Zhao, G., y Qi, P. (2015). Cellulosic ethanol production by natural bacterial consortia is enhanced by *Pseudoxanthomonas taiwanensis*. *Biotechnology for Biofuels*, 8(1), 10.
- Dussan, K. J., Machado, E., Silva, S. P., y Da Silva, S. S. (2011). Comparative study of xylose fermentation with *Candida shehatae* HM52.2 and *Pichia stipitis* NRRL Y-7124. *Current Opinion in Biotechnology*, 22, S148. doi: <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2011.05.494>
- Dzurendova, S., Losada, C. B., Dupuy-Galet, B. X., Fjær, K., y Shapaval, V. (2022). Mucoromycota fungi as powerful cell factories for modern biorefinery. *Applied microbiology and biotechnology*, 106(1), 101-115. doi: 10.1007/s00253-021-11720-1
- Erkan, S. B., Yatmaz, E., Germec, M., y Turhan, I. (2021). Effect of furfural concentration on ethanol production using *Saccharomyces cerevisiae* in an immobilized cells stirred-tank bioreactor with glucose-based medium and mathematical modeling. *Journal of Food Processing and Preservation*, 45(8), e14635. doi: <https://doi.org/10.1111/jfpp.14635>
- Escobedo, A. E. G., Bobadilla, J. L. M., Llúncor, J. A. G., Blas, C. V., y Espinoza, R. F. R. (2021). Una Simulación de la cinética de fermentación etanólica tipo lote alimentado utilizando el método Runge Kutta. *Alpha Centauri*, 2(3), 41-59.
- FAO. (2008). *EL ESTADO MUNDIAL DE LA AGRICULTURA Y LA ALIMENTACIÓN; BIOCOMBUSTIBLES: perspectivas, riesgos y oportunidades* (O. D. L. N. U. P. L. A. Y. L. ALIMENTACIÓN Ed.). Roma, Italia.
- Favaro, L., Viktor, M. J., Rose, S. H., Viljoen-Bloom, M., van Zyl, W. H., Basaglia, M., Cagnin, L., y Casella, S. (2015). Consolidated bioprocessing of starchy substrates into ethanol by industrial *Saccharomyces cerevisiae* strains secreting fungal amylases. *Biotechnol Bioeng*, 112(9), 1751-1760. doi: 10.1002/bit.25591
- Fonseca-Peralta, H. M. (2017). *Producción de Etanol a partir de Residuos de Moringa oleifera Utilizando un Bioproceso Consolidado*. (Maestro en Ciencias), Universidad Autónoma de Sinaloa.
- Giera, M., y Walker, J. M. (2018). *Clinical metabolomics: methods and protocols*: Springer.
- Gírio, F. M., Fonseca, C., Carvalheiro, F., Duarte, L. C., Marques, S., y Bogel-Łukasik, R. (2010). Hemicelluloses for fuel ethanol: A review. *Bioresource technology*, 101(13), 4775-4800. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2010.01.088>
- Güzeldağ, G., y Colak, O. (2007). Molecular identification of *Ganoderma lucidum* from Turkey. *International Journal of Agriculture and Biology*, 9(5), 767-770.
- Hansen, A. S. L., Lennen, R. M., Sonnenschein, N., y Herrgård, M. J. (2017). Systems biology solutions for biochemical production challenges. *Current Opinion in Biotechnology*, 45, 85-91.

- Harun, R., Danquah, M. K., y Forde, G. M. (2010). Microalgal biomass as a fermentation feedstock for bioethanol production. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 85(2), 199-203. doi: 10.1002/jctb.2287
- Hasunuma, T., y Kondo, A. (2012). Development of yeast cell factories for consolidated bioprocessing of lignocellulose to bioethanol through cell surface engineering. *Biotechnology advances*, 30(6), 1207-1218. doi: <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.10.011>
- He, B., Hao, B., Yu, H., Tu, F., Wei, X., Xiong, K., Zeng, Y., Zeng, H., Liu, P., Tu, Y., Wang, Y., Kang, H., Peng, L., y Xia, T. (2022). Double integrating XYL2 into engineered *Saccharomyces cerevisiae* strains for consistently enhanced bioethanol production by effective xylose and hexose co-consumption of steam-exploded lignocellulose in bioenergy crops. *Renewable Energy*, 186, 341-349. doi: <https://doi.org/10.1016/j.renene.2021.12.103>
- Hickert, L. R., Cruz, M. M., Dillon, A. J. P., Fontana, R. C., Rosa, C. A., y Ayub, M. A. Z. (2014). Fermentation kinetics of acid–enzymatic soybean hull hydrolysate in immobilized-cell bioreactors of *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida shehatae*, *Spathaspora arborariae*, and their co-cultivations. *Biochemical Engineering Journal*, 88, 61-67. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bej.2014.04.004>
- Hocking, M. B. (2005). 16 - Fermentation and other Microbiological Processes. In M. B. Hocking (Ed.), *Handbook of Chemical Technology and Pollution Control (Third Edition)* (pp. 505-556e). San Diego: Academic Press.
- Horisawa, S., Ando, H., Ariga, O., y Sakuma, Y. (2015). Direct ethanol production from cellulosic materials by consolidated biological processing using the wood rot fungus *Schizophyllum commune*. *Bioresource technology*, 197, 37-41. doi: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.08.031>
- Ingale, S., Joshi, S. J., y Gupte, A. (2014). Production of bioethanol using agricultural waste: banana pseudo stem. *Brazilian Journal of Microbiology*, 45(3), 885-892.
- Inokuma, K., Takano, M., y Hoshino, K. (2013). Direct ethanol production from N-acetylglucosamine and chitin substrates by *Mucor* species. *Biochemical Engineering Journal*, 72, 24-32. doi: <https://doi.org/10.1016/j.bej.2012.12.009>
- Jacob, A., Ashok, B., Alagumalai, A., Chyuan, O. H., y Le, P. T. K. (2021). Critical review on third generation micro algae biodiesel production and its feasibility as future bioenergy for IC engine applications. *Energy Conversion and Management*, 228, 113655. doi: <https://doi.org/10.1016/j.enconman.2020.113655>
- Jatoi, A. S., Abbasi, S. A., Hashmi, Z., Shah, A. K., Alam, M. S., Bhatti, Z. A., Maitlo, G., Hussain, S., Khandro, G. A., Usto, M. A., y Iqbal, A. (2021). Recent trends and future perspectives of lignocellulose biomass for biofuel production: a comprehensive review. *Biomass Conversion and Biorefinery*. doi: 10.1007/s13399-021-01853-8



- Javed, M. R., Noman, M., Shahid, M., Ahmed, T., Khurshid, M., Rashid, M. H., Ismail, M., Sadaf, M., y Khan, F. (2019). Current situation of biofuel production and its enhancement by CRISPR/Cas9-mediated genome engineering of microbial cells. *Microbiological Research*, 219, 1-11. doi: <https://doi.org/10.1016/j.micres.2018.10.010>
- Ji, X.-J., Huang, H., y Ouyang, P.-K. (2011). Microbial 2,3-butanediol production: A state-of-the-art review. *Biotechnology advances*, 29(3), 351-364. doi: <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.01.007>
- Jönsson, L. J., Alriksson, B., y Nilvebrant, N.-O. (2013). Bioconversion of lignocellulose: inhibitors and detoxification. *Biotechnology for Biofuels*, 6(1), 16. doi: 10.1186/1754-6834-6-16
- Joshi, S., y Mishra, S. (2022). Recent advances in biofuel production through metabolic engineering. *Bioresource technology*, 352, 127037. doi: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2022.127037>
- Karimi, K., Emtiazi, G., y Taherzadeh, M. J. (2006). Production of ethanol and mycelial biomass from rice straw hemicellulose hydrolyzate by *Mucor indicus*. *Process Biochemistry*, 41(3), 653-658. doi: <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2005.08.014>
- Karimi, K., y Zamani, A. (2013). *Mucor indicus*: Biology and industrial application perspectives: A review. *Biotechnology advances*, 31(4), 466-481. doi: <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013.01.009>
- Kasavi, C., Eraslan, S., Oner, E. T., y Kirdar, B. (2016). An integrative analysis of transcriptomic response of ethanol tolerant strains to ethanol in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular BioSystems*, 12(2), 464-476.
- Khan, M. U., Usman, M., Ashraf, M. A., Dutta, N., Luo, G., y Zhang, S. (2022). A review of recent advancements in pretreatment techniques of lignocellulosic materials for biogas production: Opportunities and Limitations. *Chemical Engineering Journal Advances*, 10, 100263. doi: <https://doi.org/10.1016/j.cej.2022.100263>
- Kötter, P., y Ciriacy, M. (1993). Xylose fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied microbiology and biotechnology*, 38(6), 776-783. doi: 10.1007/BF00167144
- Kruger, N. J., y von Schaewen, A. (2003). The oxidative pentose phosphate pathway: structure and organisation. *Current Opinion in Plant Biology*, 6(3), 236-246. doi: [https://doi.org/10.1016/S1369-5266\(03\)00039-6](https://doi.org/10.1016/S1369-5266(03)00039-6)
- Krumova, E., Kostadinova, N., Miteva-Staleva, J., Stoyancheva, G., Spassova, B., Abrashev, R., y Angelova, M. (2018). Potential of ligninolytic enzymatic complex produced by white-rot fungi from genus *Trametes* isolated from Bulgarian forest soil. *Engineering in Life Sciences*, 0(ja). doi: 10.1002/elsc.201800055
- Küberl, A., Schneider, J., Thallinger, G. G., Anderl, I., Wibberg, D., Hajek, T., Jaenicke, S., Brinkrolf, K., Goesmann, A., Szczepanowski, R., Pühler, A., Schwab, H., Glieder, A., y Pichler, H. (2011). High-quality genome sequence of *Pichia pastoris* CBS7435. *Journal of Biotechnology*, 154(4),

- 312-320. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2011.04.014>
- Kuyper, M., Winkler, A. A., van Dijken, J. P., y Pronk, J. T. (2004). Minimal metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for efficient anaerobic xylose fermentation: a proof of principle. *FEMS yeast research*, 4(6), 655-664. doi: 10.1016/j.femsyr.2004.01.003
- Lafuente Rincón, D. F., Hernandez-Terán, F., y Fuente-Salcido, N. M. (2015). Relevance of the Appropriate Control and Detection of Phytopathogens Fungi in Strawberries (*Fragaria* spp). *Acta Quimica Mexicana, AQM N.13*.
- Lebreton, A., Corre, E., Jany, J.-L., Brillet-Guéguen, L., Pèrez-Arques, C., Garre, V., Monsoor, M., Debuchy, R., Le Meur, C., Coton, E., Barbier, G., y Meslet-Cladière, L. (2020). Comparative genomics applied to *Mucor* species with different lifestyles. *BMC Genomics*, 21(1), 135. doi: 10.1186/s12864-019-6256-2
- Lee, K. Y., Park, J. M., Kim, T. Y., Yun, H., y Lee, S. Y. (2010). The genome-scale metabolic network analysis of *Zymomonas mobilis* ZM4 explains physiological features and suggests ethanol and succinic acid production strategies. *Microbial cell factories*, 9(1), 1-12.
- Lennartsson, P. R., Erlandsson, P., y Taherzadeh, M. J. (2014). Integration of the first and second generation bioethanol processes and the importance of by-products. *Bioresource technology*, 165, 3-8.
- Lennartsson, P. R., Karimi, K., Edebo, L., y Taherzadeh, M. J. (2009). Effects of different growth forms of *Mucor indicus* on cultivation on dilute-acid lignocellulosic hydrolyzate, inhibitor tolerance, and cell wall composition. *Journal of Biotechnology*, 143(4), 255-261. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2009.07.011>
- Limayem, A., y Ricke, S. C. (2012). Lignocellulosic biomass for bioethanol production: Current perspectives, potential issues and future prospects. *Progress in Energy and Combustion Science*, 38(4), 449-467. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.peccs.2012.03.002>
- Lin, Z., Luo, P., Huang, D., Wu, Y., Li, F., y Liu, H. (2021). Multi-omics based strategy for toxicity analysis of acrylamide in *Saccharomyces cerevisiae* model. *Chemico-Biological Interactions*, 349, 109682. doi: <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2021.109682>
- Liu, Z., Inokuma, K., Ho, S. H., den Haan, R., van Zyl, W. H., Hasunuma, T., y Kondo, A. (2017). Improvement of ethanol production from crystalline cellulose via optimizing cellulase ratios in cellulolytic *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology and bioengineering*, 114(6), 1201-1207.
- Lübbehüsen, T. L., Nielsen, J., y McIntyre, M. (2003). Characterization of the *Mucor circinelloides* life cycle by on-line image analysis. *Journal of applied microbiology*, 95(5), 1152-1160. doi: doi:10.1046/j.1365-2672.2003.02098.x
- Lübbehüsen, T. L., Nielsen, J., y McIntyre, M. (2004). Aerobic and anaerobic ethanol production by *Mucor circinelloides* during submerged growth. *Applied microbiology and biotechnology*, 63(5), 543-548. doi:

10.1007/s00253-003-1394-4

- Maehara, T., Ichinose, H., Furukawa, T., Ogasawara, W., Takabatake, K., y Kaneko, S. (2013). Ethanol production from high cellulose concentration by the basidiomycete fungus *Flammulina velutipes*. *Fungal Biology*, 117(3), 220-226. doi: <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2013.02.002>
- Martinez-Sillas, B. A. (2019). Evaluación del efecto de iones metálicos sobre la actividad enzimática de xilanasas y celulasas en *Mucor circinelloides*. TESIS. Universidad Autonoma de Sinaloa. Culiacan, Sinaloa Mexico.
- Méndez-Hernández, J. E., Loera, O., E.M., M.-H., Herrera, E., y Soto-Cruz, N. O. (2019). Coupling energy-production processes: The use of residues from bioethanol production to improve the anaerobic digestion of corn stover. *Biomass and Bioenergy*, 128, 105322. doi: <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2019.105322>
- Menon, V., y Rao, M. (2012). Trends in bioconversion of lignocellulose: Biofuels, platform chemicals & biorefinery concept. *Progress in Energy and Combustion Science*, 38(4), 522-550. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pecs.2012.02.002>
- Millati, R., Edebo, L., y Taherzadeh, M. J. (2005). Performance of *Rhizopus*, *Rhizomucor*, and *Mucor* in ethanol production from glucose, xylose, and wood hydrolyzates. *Enzyme and Microbial Technology*, 36(2), 294-300. doi: <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2004.09.007>
- Miller, G. L. (1959). Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Analytical Chemistry*, 31(3), 426-428. doi: 10.1021/ac60147a030
- Mohapatra, B. R., Banerjee, U. C., y Bapuji, M. (1998). Characterization of a fungal amylase from *Mucor* sp. associated with the marine sponge *Spirastrella* sp. *Journal of Biotechnology*, 60(1), 113-117. doi: [https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(97\)00197-1](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(97)00197-1)
- Montgomery, D. C. (1991). *Diseño y análisis de experimentos*: Grupo Editorial Iberoamérica.
- Morin-Sardin, S., Nodet, P., Coton, E., y Jany, J.-L. (2017). *Mucor*: A Janus-faced fungal genus with human health impact and industrial applications. *Fungal Biology Reviews*, 31(1), 12-32. doi: <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2016.11.002>
- Najafpour, G. D. (2015). Chapter 1 - Industrial Microbiology. In G. D. Najafpour (Ed.), *Biochemical Engineering and Biotechnology (Second Edition)* (pp. 1-18). Amsterdam: Elsevier.
- Naveira-Pazos, C., Veiga, M. C., y Kennes, C. (2022). Accumulation of lipids by the oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica* grown on carboxylic acids simulating syngas and carbon dioxide fermentation. *Bioresource technology*, 360, 127649. doi: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2022.127649>
- Ndimba, B. K., Ndimba, R. J., Johnson, T. S., Waditee-Sirisattha, R., Baba, M., Sirisattha, S., Shiraiwa, Y., Agrawal, G. K., y Rakwal, R. (2013). Biofuels

- as a sustainable energy source: An update of the applications of proteomics in bioenergy crops and algae. *Journal of Proteomics*, 93, 234-244. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2013.05.041>
- Nelson, D. L., y Cox, M. M. (2015). *Lehninger: principios de bioquímica*.
- Ng, I. S., Li, C.-W., Chan, S.-P., Chir, J.-L., Chen, P. T., Tong, C.-G., Yu, S.-M., y Ho, T.-H. D. (2010). High-level production of a thermoacidophilic  $\beta$ -glucosidase from *Penicillium citrinum* YS40-5 by solid-state fermentation with rice bran. *Bioresource technology*, 101(4), 1310-1317. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2009.08.049>
- Nielsen, J., y Keasling, Jay D. (2016). Engineering Cellular Metabolism. *Cell*, 164(6), 1185-1197. doi: 10.1016/j.cell.2016.02.004
- Novoa, W. B., Winer, A. D., Glaid, A. J., y Schwert, G. W. (1959). Lactic dehydrogenase V. Inhibition by oxamate and by oxalate. *Journal of Biological Chemistry*, 234(5), 1143-1148.
- Okamoto, K., Uchii, A., Kanawaku, R., y Yanase, H. (2014). Bioconversion of xylose, hexoses and biomass to ethanol by a new isolate of the white rot basidiomycete *Trametes versicolor*. *SpringerPlus*, 3(1), 121.
- Papanek, B. A. (2016). Improving Metabolic Engineering and Characterization of *Clostridium thermocellum* for Improved Cellulosic Ethanol Production.
- Papanikolaou, S., Rontou, M., Belka, A., Athenaki, M., Gardeli, C., Mallouchos, A., Kalantzi, O., Koutinas, A. A., Kookos, I. K., Zeng, A.-P., y Aggelis, G. (2017). Conversion of biodiesel-derived glycerol into biotechnological products of industrial significance by yeast and fungal strains. *Engineering in Life Sciences*, 17(3), 262-281. doi: <https://doi.org/10.1002/elsc.201500191>
- Paramasivan, K., Abdulla, A., Gupta, N., y Mutturi, S. (2022). In silico target-based strain engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for terpene precursor improvement. *Integrative Biology*, 14(2), 25-36.
- Paschos, T., Xiros, C., y Christakopoulos, P. (2015). Ethanol effect on metabolic activity of the ethalogenic fungus *Fusarium oxysporum*. *BMC Biotechnology*, 15, 15. doi: 10.1186/s12896-015-0130-3
- Pereira, L. M. S., Milan, T. M., y Tapia-Blácido, D. R. (2021). Using Response Surface Methodology (RSM) to optimize 2G bioethanol production: A review. *Biomass and Bioenergy*, 151, 106166. doi: <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2021.106166>
- Queiroz, S. S., y Oliva, B. (2022). Integrated bioinformatics, modelling, and gene expression analysis of the putative pentose transporter from *Candida tropicalis* during xylose fermentation with and without glucose addition. 106(12), 4587-4606. doi: 10.1007/s00253-022-12005-x
- REN21. (2016). *Renewables 2016 global status report*: REN21.
- REN21. (2017). *Renewables 2017 global status report*. Paris, Francia: REN21.
- Ribeiro, L. E., Albuini, F. M., Castro, A. G., Campos, V. J., de Souza, G. B., Mendonça, J. G. P., Rosa, C. A., Mendes, T. A. O., Santana, M. F., da Silveira, W. B., y Fietto, L. G. (2021). Influence of glucose on xylose

- metabolization by *Spathaspora passalidarum*. *Fungal Genetics and Biology*, 157, 103624. doi: <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2021.103624>
- Roberts, S. B., Gowen, C. M., Brooks, J. P., y Fong, S. S. (2010). Genome-scale metabolic analysis of *Clostridium thermocellum* for bioethanol production. *BMC Syst Biol*, 4, 31. doi: 10.1186/1752-0509-4-31
- Rosnow, J. J., Anderson, L. N., Nair, R. N., Baker, E. S., y Wright, A. T. (2017). Profiling microbial lignocellulose degradation and utilization by emergent omics technologies. *Critical Reviews in Biotechnology*, 37(5), 626-640. doi: 10.1080/07388551.2016.1209158
- Roy, R., Rahman, M. S., y Raynie, D. E. (2020). Recent advances of greener pretreatment technologies of lignocellulose. *Current Research in Green and Sustainable Chemistry*, 3, 100035. doi: <https://doi.org/10.1016/j.crgsc.2020.100035>
- Saha, B. C. (2004). Production, purification and properties of endoglucanase from a newly isolated strain of *Mucor circinelloides*. *Process Biochemistry*, 39(12), 1871-1876. doi: <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2003.09.013>
- Sakthiselvan, P., Meenambiga, S. S., y Madhumathi, R. (2019). Kinetic studies on cell growth. *Cell Growth*, 13.
- Sanger, F., Nicklen, S., y Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 74(12), 5463-5467.
- Segers, K., Declerck, S., Mangelings, D., Heyden, Y. V., y Eeckhaut, A. V. (2019). Analytical techniques for metabolomic studies: a review. *Bioanalysis*, 11(24), 2297-2318.
- Sharma, B., Larroche, C., y Dussap, C.-G. (2020). Comprehensive assessment of 2G bioethanol production. *Bioresource technology*, 313, 123630. doi: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123630>
- Sharma, J., Kumar, V., Prasad, R., y Gaur, N. A. (2022). Engineering of *Saccharomyces cerevisiae* as a consolidated bioprocessing host to produce cellulosic ethanol: Recent advancements and current challenges. *Biotechnology advances*, 56, 107925. doi: <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2022.107925>
- Sharma, N. K., Behera, S., Arora, R., Kumar, S., y Sani, R. K. (2018). Xylose transport in yeast for lignocellulosic ethanol production: Current status. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 125(3), 259-267. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2017.10.006>
- Shi, L.-L., Zheng, Y., Tan, B.-W., y Li, Z.-J. (2022). Establishment of a carbon-efficient xylulose cleavage pathway in *Escherichia coli* to metabolize xylose. *Biochemical Engineering Journal*, 179, 108331. doi: <https://doi.org/10.1016/j.bej.2021.108331>
- Staats, C. C., Kmetzsch, L., Schrank, A., y Vainstein, M. H. (2013). Fungal zinc metabolism and its connections to virulence. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 3, 65-65. doi: 10.3389/fcimb.2013.00065
- Suarez Ospina, D. (2018). *Análisis de datos cinéticos para la producción de ácido*

- láctico por la bacteria Lactobacillus acidophilus en un sustrato complejo.* Fundación Universidad de América.
- Sues, A., Millati, R., Edebo, L., y Taherzadeh, M. J. (2005). Ethanol production from hexoses, pentoses, and dilute-acid hydrolyzate by *Mucor indicus*. *FEMS Yeast Research*, 5(6-7), 669-676. doi: 10.1016/j.femsyr.2004.10.013
- Suman, S., Kumar Rai, S., Kumar Singh, R., Bhushan, A., y Kumar Rajak, D. (2022). Compositional Ligno-cellulosic behaviour of some residual biomass. *Materials Today: Proceedings*, 62, 392-397. doi: <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2022.04.396>
- Suryaningsih, R. (2014). Bioenergy Plants in Indonesia: Sorghum for Producing Bioethanol as an Alternative Energy Substitute of Fossil Fuels. *Energy Procedia*, 47, 211-216.
- Tamime, A. Y., y Robinson, R. K. (2007). 7 - Biochemistry of fermentation. In A. Y. Tamime y R. K. Robinson (Eds.), *Tamime and Robinson's Yoghurt (Third Edition)* (pp. 535-607): Woodhead Publishing.
- Tang, X., Chen, H., Gu, Z., Zhang, H., Chen, Y. Q., Song, Y., y Chen, W. (2017). Comparative proteome analysis between high lipid-producing strain *Mucor circinelloides* WJ11 and low lipid-producing strain CBS 277.49. *Journal of agricultural and food chemistry*, 65(24), 5074-5082.
- Thirumalai Vasan, P., Sobana Piriya, P., Immanuel Gilwax Prabhu, D., y John Vennison, S. (2011). Cellulosic ethanol production by *Zymomonas mobilis* harboring an endoglucanase gene from *Enterobacter cloacae*. *Bioresource technology*, 102(3), 2585-2589. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2010.09.110>
- Tolonen, A. C., Zuroff, T. R., Ramya, M., Boutard, M., Cerisy, T., y Curtis, W. R. (2015). Physiology, Genomics, and Pathway Engineering of an Ethanol-Tolerant Strain of *Clostridium phytofermentans*. *Appl Environ Microbiol*, 81(16), 5440-5448. doi: 10.1128/aem.00619-15
- Tomás-Pejó, E., Oliva, J. M., Ballesteros, M., y Olsson, L. (2008). Comparison of SHF and SSF processes from steam-exploded wheat straw for ethanol production by xylose-fermenting and robust glucose-fermenting *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Biotechnology and bioengineering*, 100(6), 1122-1131.
- Trabelsi, H., Neji, S., Hadrich, I., Khemakhem, N., Sellami, H., Makni, F., y Ayadi, A. (2019). Contribution of the internal transcribed spacer regions to the detection and identification of human fungal pathogens. *Current Research in Translational Medicine*, 67(3), 100-106. doi: <https://doi.org/10.1016/j.retram.2019.04.001>
- Ülker, S., y Karaoğlu, Ş. A. (2012). Purification and characterization of an extracellular lipase from *Mucor hiemalis* f. *corticola* isolated from soil. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 114(4), 385-390. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2012.04.023>



- Unrean, P. (2016). Bioprocess modelling for the design and optimization of lignocellulosic biomass fermentation. *Bioresources and Bioprocessing*, 3(1), 1. doi: 10.1186/s40643-015-0079-z
- Urias-Ramos, K. A. (2019). Valorización de residuos fermentados provenientes de la biorrefinería de Moringa oleifera: evaluación del efecto de inclusión en el crecimiento de codorniz japonesa (*Coturnix japonica*) TESIS. *Universidad Autonoma de Sinaloa. Culiacan, Sinaloa Mexico*.
- Verdugo-Camorlinga, C. S. (2019). Diseño de un Bioproceso para la producción de etanol a partir de Moringa oleifera y optimización de la etapa de pretratamiento. TESIS. *Universidad Autonoma de Sinaloa. Culiacan, Sinaloa Mexico*
- Wang, T.-Y. (2015). Engineering Yeast for Cellulosic Ethanol Production. *Austin Chem Eng*, 2(2), 1018.
- Wang, Y., Zhan, P., Shao, L., Zhang, L., y Qing, Y. (2022). Effects of Inhibitors Generated by Dilute Phosphoric Acid Plus Steam-Exploded Poplar on *Saccharomyces cerevisiae* Growth. *Microorganisms*, 10(7), 1456.
- Wu, Z. (2019). Mixed fermentation of *Aspergillus niger* and *Candida shehatae* to produce bioethanol with ionic-liquid-pretreated bagasse. *3 Biotech*, 9(2), 41. doi: 10.1007/s13205-019-1570-6
- Xia, J., Yang, Y., Liu, C.-G., Yang, S., y Bai, F.-W. (2019). Engineering *Zymomonas mobilis* for robust cellulosic ethanol production. *Trends in biotechnology*, 37(9), 960-972.
- Xie, L., MacDonald, S. L., Auffhammer, M., Jaiswal, D., y Berck, P. (2019). Environment or food: Modeling future land use patterns of miscanthus for bioenergy using fine scale data. *Ecological Economics*, 161, 225-236. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ecolecon.2019.03.013>
- Young, E., Lee, S.-M., y Alper, H. (2010). Optimizing pentose utilization in yeast: the need for novel tools and approaches. *Biotechnology for Biofuels*, 3(1), 24. doi: 10.1186/1754-6834-3-24
- Zhang, D., Ren, L., Yue, J.-h., Wang, L., Zhuo, L.-h., y Shen, X.-h. (2013). A comprehensive analysis of flowering transition in *Agapanthus praecox* ssp. *orientalis* (Leighton) Leighton by using transcriptomic and proteomic techniques. *Journal of Proteomics*, 80, 1-25. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2012.12.028>
- Zhang, L., Chen, Q., Jin, Y., Xue, H., Guan, J., Wang, Z., y Zhao, H. (2010). Energy-saving direct ethanol production from viscosity reduction mash of sweet potato at very high gravity (VHG). *Fuel Processing Technology*, 91(12), 1845-1850. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fuproc.2010.08.009>
- Zhang, P., Chen, C., Shen, Y., Ding, T., Ma, D., Hua, Z., y Sun, D. (2013). Starch saccharification and fermentation of uncooked sweet potato roots for fuel ethanol production. *Bioresource technology*, 128, 835-838. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2012.10.166>
- Zhao, L., Zhang, H., Wang, L., Chen, H., Chen, Y. Q., Chen, W., y Song, Y.

- (2015). <sup>13</sup>C-metabolic flux analysis of lipid accumulation in the oleaginous fungus *Mucor circinelloides*. *Bioresource technology*, 197, 23-29. doi: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.08.035>
- Zhao, X. Q., Xue, C., Ge, X. M., Yuan, W. J., Wang, J. Y., y Bai, F. W. (2009). Impact of zinc supplementation on the improvement of ethanol tolerance and yield of self-flocculating yeast in continuous ethanol fermentation. *Journal of Biotechnology*, 139(1), 55-60. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2008.08.013>
- Zhao, Z., Xian, M., Liu, M., y Zhao, G. (2020). Biochemical routes for uptake and conversion of xylose by microorganisms. *Biotechnology for Biofuels*, 13(1), 21. doi: 10.1186/s13068-020-1662-x
- Zhou, M., y Lü, X. (2021). Chapter 9 - Strategies on simultaneous fermentation of pentose and hexose to bioethanol. In X. Lü (Ed.), *Advances in 2nd Generation of Bioethanol Production* (pp. 161-211): Woodhead Publishing.
- Zhou, M., y Tian, X. (2022). Development of different pretreatments and related technologies for efficient biomass conversion of lignocellulose. *International Journal of Biological Macromolecules*, 202, 256-268. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.01.036>
- Zorn, S. M. F. E., da Silva, A. P. T., Bredda, E. H., Bento, H. B. S., Pedro, G. A., Carvalho, A. K. F., Silva, M. B., y Da Rós, P. C. M. (2022). In Situ Transesterification of Microbial Biomass for Biolubricant Production Catalyzed by Heteropolyacid Supported on Niobium. *Energies*, 15(4), 1591.



# XI ANEXOS

## A ANEXO 1

Alineamiento de la subunidad I de la ATPasa tipo-V Transportadora de H<sup>+</sup> de *M. circinelloides* wj11 con otras especies de Mucor.

