

Universidad Autónoma De Baja California  
Facultad de Ingeniería, Mexicali  
Maestría y Doctorado en Ciencias e Ingeniería

---

Bioingeniería



HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DE LA PAJA DE TRIGO PARA LA PRODUCCIÓN DE  
BIOETANOL

Melgoza Sosa Ramiro Esaú

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO

PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS

**Director de Tesis: Dr. Fernando Amílcar Solís Domínguez**

**Codirectora de Tesis: Dra. Aseneth Herrera Martínez**

Mexicali, Baja California, Diciembre 2021.

“Todas las lecciones que nos  
brinda la vida, las vamos a agradecer,  
aunque no todas nos hayan gustado.”

-Ramiro Melgoza

## **Dedicatoria**

Este trabajo es dedicado a futuras investigaciones, que los resultados de esta faciliten la manera de mejorar y encontrar un mejor camino para la producción de biocombustibles. Dedico este logro también a mi familia, amigos, y docentes que estuvieron presentes durante el periodo de mi maestría y que siguen estando aún concluida.

## **Agradecimientos.**

A mis padres que me apoyaron durante el proyecto de maestría, pese a las dificultades del trayecto sus consejos me supieron guiar sumando otro logro en mi trayecto de vida, junto mis hermanos, que estuvieron sustituyéndome en mi ausencia. Muchas gracias.

Al Dr. Fernando Solís y Dra. Aseneth Herrera les agradezco y admiro por los consejos y su experiencia que compartieron conmigo durante la investigación. La paciencia que tuvieron para hacerme entender los errores que cometía, espero haberlos atendido bien. Muchas gracias.

A mis compañeros de maestría Najla R. Oscar R., Ana R., Sandra N., Guillermo S., Marco E., Noemí R., junto con mis compañeros de laboratorio Brenda B. y Elizabeth L. por el apoyo que me brindaron dentro y fuera de laboratorio. Por los momentos de risa y pánico que se llegaba a presentar en esos días. A las diferentes personalidades de cada quien, de las cuales me llevo diferentes aprendizajes, muchas gracias.

M.R.L. le agradezco que haya compartido su forma de ser y de ver la vida fuera del laboratorio. Comprendí que, aunque siendo totalmente opuestos, se puede mirar un mismo objetivo. Fue algo bueno el haber coincidido, me llevo una gran lección. Muchas gracias.

Esta tesis se realizó gracias al apoyo de la Universidad Autónoma de Baja California y CONACyT del programa MyDCI.

Esta tesis fue financiada mediante el proyecto 105/6/C/40/19, convocatoria 2017.

Doy gracias a todas las personas que me apoyaron durante esta investigación, varias pasamos por una situación que cambió el ritmo de vida, nos obligó a buscar diferentes maneras de seguir adelante, aunque no estábamos preparados para lo ocurridos en 2020, jamás perdimos la esperanza. A aquellos que compartieron sus experiencias y su manera de hacer saber que todo saldría bien y a los medios que me permitieron tener acceso a diversas bases de datos.

## Contenido

1.	<i>Resumen</i> .....	10
2.	<i>Introducción</i> .....	11
3.	<i>Justificación y planteamiento del problema</i> .....	14
4.	<i>Marco teórico</i> .....	15
4.1	<i>Bioetanol</i> .....	15
4.2	<i>Aprovechamiento de los residuos agrícolas, un recurso biodisponible</i> .....	16
4.3	<i>Agricultura actual en Mexicali</i> .....	19
4.4	<i>Desechos agrícolas, tratamiento y consecuencias</i> .....	22
4.5	<i>Composición de la paja de trigo</i> .....	29
4.5.1	<i>Celulosa</i> .....	30
4.5.2	<i>Hemicelulosa</i> .....	31
4.5.3	<i>Lignina</i> .....	31
4.6	<i>Pretratamiento biológico a la lignocelulosa</i> .....	31
4.7	<i>Enzimas degradadoras de materiales lignocelulósicos en pretratamiento biológico</i> 35	
4.7.1	<i>Enzimas que degradan celulosa (celulasas)</i> .....	35
4.7.2	<i>Enzimas que degradan hemicelulosa (xilanasas)</i> .....	36
4.7.3	<i>Enzimas que degradan lignina</i> .....	37
4.8	<i>Microorganismos extremófilos</i> .....	37
5.	<i>Objetivos</i> .....	39
5.1	<i>Objetivo general</i> .....	39
5.2	<i>Objetivos específicos</i> :.....	39
6.	<i>Hipótesis</i> .....	40
7.	<i>Metodología</i> .....	41

7.1	<i>Recolección de sustratos</i> .....	41
7.2	<i>Reactivación de microorganismos</i> .....	41
7.3	<i>Determinación del porcentaje de humedad en paja de trigo</i> .....	42
7.4	<i>Búsqueda de microorganismos productores de celulasas</i> .....	43
7.5	<i>Cuantificación de microorganismo por curva de McFarland</i> .....	44
7.6	<i>Presencia de azúcares reductores en muestras de paja de trigo tratada con los aislados bacterianos</i> .....	44
7.7	<i>Producción de glucosa a partir del pretratamiento de la paja de trigo con los aislados bacterianos</i> .....	46
7.7.1	<i>Análisis de varianza (ANOVA)</i> .....	47
7.8	<i>Fermentación alcohólica</i> .....	47
7.9	<i>Determinación de fibra cruda de la paja de trigo</i> .....	48
7.10	<i>Determinación de cenizas de la paja de trigo</i> .....	49
7.11	<i>Prueba para identificar microorganismos aerobios facultativos</i> .....	50
8.	<i>Resultados</i> .....	52
8.1	<i>Recolección de sustratos</i> .....	52
8.2	<i>Reactivación de microorganismos</i> .....	52
8.3	<i>Determinación del porcentaje de humedad en paja de trigo</i> .....	53
8.4	<i>Búsqueda de microorganismos productores de celulasas</i> .....	53
8.5	<i>Presencia de azúcares reductores en paja de trigo tratada con los aislados bacterianos</i> 60	
8.6	<i>Producción de glucosa a partir del pretratamiento de la paja de trigo con los aislados bacterianos</i> .....	66
8.6.1	<i>Análisis de varianza (ANOVA)</i> .....	68
8.6.2	<i>Comparación múltiple de medias contra un control (Dunnett)</i> .....	69
8.7	<i>Fermentación alcohólica</i> .....	72
8.8	<i>Determinación de fibra cruda</i> .....	74
8.9	<i>Determinación de cenizas</i> .....	74
8.10	<i>Prueba para detectar microorganismos aerobios facultativos</i> .....	75
9.	<i>Discusión de resultados</i> .....	76

10.	<i>Conclusiones</i> .....	82
11.	<i>Referencias</i> .....	84

## INDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Distribución mundial de los residuos agrícolas generados.....	17
<b>Tabla 2.</b> Residuos estimados anualmente; toneladas por año en Mexicali 2018.....	17
<b>Tabla 3.</b> Aprovechamiento de los residuos agrícolas a escala mundial.....	19
<b>Tabla 4.</b> Cultivos de provenientes de Mexicali y total de hectáreas destinadas y programadas del año 2017.....	20
<b>Tabla 5.</b> Cultivos de provenientes de Mexicali y total de hectáreas destinadas y programadas del año 2018.....	21
<b>Tabla 6.</b> Periodos de siembra del 2014 al 2018.....	22
<b>Tabla 7.</b> Regiones de México donde el trigo es sembrado.....	23
<b>Tabla 8.</b> Emisiones de las quemas agrícolas (mg kg <sup>-1</sup> incinerado).....	26
<b>Tabla 9.</b> Composición de lignocelulosa en la paja de trigo.....	29
<b>Tabla 10.</b> Aislados bacterianos proporcionados por el equipo de.....	42
<b>Tabla 11.</b> Reactivos para preparar medio CMC.....	43
<b>Tabla 12.</b> Reactivos empleados para preparar el reactivo A y B del.....	45
<b>Tabla 13.</b> Aislados reactivados y almacenados en placas Petri de plástico con.....	53
<b>Tabla 14.</b> Producción de celulasas en medio CMC por los aislados bacterianos. La decoloración indica prueba positiva para la producción de celulasas.....	54
<b>Tabla 15.</b> Valoración cualitativa en el medio CMC de la producción de celulasas.....	59
<b>Tabla 16.</b> Valoración cualitativa de cada aislado.....	60
<b>Tabla 17.</b> Precipitación del óxido de cobre tras reaccionar con el.....	61
<b>Tabla 18.</b> Concentración de glucosa en paja de trigo hidrolizada. Los.....	66
<b>Tabla 19.</b> Glucosa presente en los T <sub>th</sub> después de la fermentación.....	72

<b>Tabla 20:</b> Glucosa consumida por <i>S. cerevisiae</i> .....	73
<b>Tabla 21.</b> Bioetanol teórico obtenido con base la glucosa consumida por la levadura. ....	73
<b>Tabla 22.</b> Resultados del análisis de cenizas en la paja de trigo.....	74
<b>Tabla 23.</b> Resumen de las pruebas de Dunnett.....	77
<b>Tabla 24.</b> Composición química de diferentes materiales lignocelulósicos.....	80

## INDICE DE FIGURAS

<b>Fig. 1.</b> Distribución de los residuos principales en México (a) restos de maíz y mazorcas, (b) paja de sorgo, (c) paja de cebada y (d) paja de trigo. Nota: los colores indican los residuos secos en toneladas por año. Tomado de Valdez-Vazquez et al., 2010. ....	25
<b>Fig. 2.</b> Estructura de 20 PAH. Fuente: Pérez Morales et al. 2016.....	28
<b>Fig. 3.</b> Estructura de la lignocelulosa. Tomada y adaptada de Menon y Rao, 2012. ....	30
<b>Fig. 4.</b> Distintos pretratamientos usados para disponer de los carbohidratos. (GP: grado de polimerización, AFEX: explosión de fibra de amoniaco; por sus siglas en ingles). Tomado y modificado de Talebnia et al., 2010. ....	33
<b>Fig. 5.</b> Parcela de trigo postcosecha, los residuos quedan “disponibles” (izquierda). Paja de trigo molida y tamizada con tamaño de partícula de 1mm (derecha).....	52
<b>Fig. 6.</b> Generación de glucosa por aislados bacterianos a partir de paja de trigo. Los puntos azules representan la media de cada aislado (n=4) y la línea vertical representan la desviación estándar. ....	68
<b>Fig. 7.</b> Comparación de medias contra el grupo control. El 0.00 (línea verde vertical punteada) marca el valor del control usado (c. blanco).....	69
<b>Fig. 8.</b> Comparación de medias contra el grupo control. El 0.00 (línea verde vertical punteada) marca el valor del nivel del control usado ( <i>S. cerevisiae</i> ). ....	70
<b>Fig. 9.</b> Comparación de medias contra el grupo control. El 0.00 (línea verde vertical punteada) marca el valor del nivel del control usado (5.b.3). ....	71
<b>Fig. 10.</b> Crecimiento de colonias en ausencia de oxígeno después de 18 horas. Aislado 5.b.3 .....	75
<b>Fig. 11.</b> Presencia de colonias sobre medio paja de trigo.....	83

## 1. Resumen

La paja de trigo presenta un volumen mundial aproximado de 854.34 millones de toneladas. En México se generan entre 62 y 75 millones de toneladas de paja de trigo, que tienen fines para el forraje (15%) o clásicamente es incinerada. Por esto, se optó por buscar una manera de transformarlos biológicamente, empleando aislados bacterianos (caracterizados como extremófilos) nativos de la región, a azúcares simples y después a bioetanol. Debido a la composición de la estructura de la paja de trigo (celulosa, hemicelulosa y lignina), donde la lignina, siendo el principal método de defensa, actúa como barrera ante la hidrólisis enzimática. Se requiere una deslignificación e hidrólisis previa, para poder obtener azúcares simples y poder fermentarlos. Los microorganismos extremófilos, fueron estudiados para ver su capacidad en la producción de celulasas empleando como sustrato carboximetilcelulosa (CMC), donde el 25% de los aislados microbianos estudiados fueron muy efectivos en la producción de celulasas. Para ver la efectividad de los microorganismos productores de celulasas en la degradación de celulosa se empleó paja de trigo molida como sustrato y se inocularon con los aislados microbianos, se incubaron a 40 °C por 7 días y después se tomó lectura de azúcares empleando el método de ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS). El aislado microbiano 5.b.3 produjo la mayor producción de azúcares derivado de la hidrólisis de la celulosa de la paja de trigo, con un rendimiento del 78 % de producción de glucosa y un rendimiento teórico del 14 % en la producción de bioetanol.

## 2. Introducción

En la búsqueda por nuevas alternativas para la producción de combustibles, se realizó una investigación para la obtención de bioetanol a partir de los residuos de la cosecha del trigo. Mexicali y su valle es una zona agrícola, donde su principal producción es el trigo (OEIDRUS; 2018; Coronado et al., 2012; Gobierno del Estado de Baja California), siendo el que más desechos produce al momento de cosecharse (Valdez-Vazquez et al., 2010), y, donde el método más utilizado para reducir los rastrojos de trigo, es la incineración, de esta manera se preparan los campos para la siguiente cosecha (Coronado et al., 2012; OEIDRUS, 2010; Quintero y Moncada, 2008). No solo los desechos de trigo son reducidos por medio de la incineración, también hay otros cultivos que requieren el mismo proceso, sin embargo, la incineración de los campos de cultivo conlleva a la emisión de contaminantes de tipo compuestos orgánicos volátiles (VOC), hidrocarburos policíclicos aromáticos (PAH) y las dibenzodioxinas y dibenzofuranos policlorados (PCDD/F). Los cuales varios de ellos tienen efectos nocivos para el ser humano (Lemieux et al., 2004).

El bioetanol, derivado de material lignocelulósico (por ejemplo: paja de trigo) es una solución prometedora, ya que el empleo de esta materia prima es renovable, extensa; con un alto potencial de para la manufactura de productos, y no compite con los cultivos alimenticios (Qiu et al., 2018). El bioetanol es el biocombustible con mayor empleo a nivel mundial para uso en los automóviles, su producción generalmente proviene de cultivos como los granos de maíz (EUA) y la caña de azúcar (Brasil), sin embargo se debe buscar recursos alternativos para su elaboración (Balat, 2011). Se han buscado diversas fuentes sustentables para reducir el consumo de combustibles fósiles (Sarkar et al., 2012), que no compitan con los productos alimenticios y exista una eficiencia en el rendimiento de elaboración (Salvachúa et al., 2011)

e implementar nuevas alternativas disminuyendo el impacto ambiental que conlleva la quema de los combustibles fósiles y quemas agrícolas.

La combustión de bioetanol no produce dióxido de carbono, reduce el material particulado así como los óxidos de nitrógeno (NOx), se puede agregar puro (en el caso de que haya modificaciones al motor) o mezclado para aumentar el octanaje y rendimiento (la mayoría de los motores toleran mezclas de 30% en adelante), y es considerado una alternativa adecuada contra los combustibles fósiles (Talebnia et al., 2010; DEMİRBAŞ, 2005).

Los materiales lignocelulósicos se encuentran principalmente en la pared celular de muchas plantas, es un material fibroso compuesto de lignina, hemicelulosa y celulosa (Cuervo et al., 2009). Los desechos agrícolas están compuestos por este tipo de moléculas, y poseen una alta concentración de polisacáridos. De esta manera el aprovechar los residuos de trigo en Mexicali para la producción de bioetanol tendría como consecuencia una reducción en el impacto ambiental debido a la disminución de quemas de agrícolas, disminución en las emisiones por combustión interna de los combustibles fósiles y mejorará la producción agrícola evitando problemas como erosión del suelo por incineración (Kim y Dale, 2004).

En el presente trabajo se usaron aislados bacterianos de una zona árida del municipio de Mexicali, proporcionados por el equipo de investigación del Dr. Fernando A. Solís Domínguez y la Dra. Aseneth Herrera Martínez encargados del laboratorio de investigación de bioingeniería UABC, caracterizados como extremófilos (Reséndiz, 2018; Saldaña, 2016). Los aislados se emplearon para realizar una posible deslignificación e hidrólisis a la paja de trigo (pt) con el fin de forzarlos a usar la pt como fuente de alimento o sustrato y liberar azúcares fermentables. La producción de bioetanol de segunda generación implica la

eliminación de la lignina que cubre las cadenas de celulosa y hemicelulosa para después hidrolizar los polisacáridos a monosacáridos. Debido al incremento en el interés de trabajar con microorganismos extremófilos (Di Donato et al., 2019; Manisha y Yadav, 2017; Gonzalo et al., 2016; Madigan et al., 2015;) ya que presentan “ventajas” ante los microorganismos mesófilos, que pueden ser: actividad biológica a altas temperaturas, altas concentraciones de sal, pH alto ( $\geq 8$ ) y/o bajo ( $\leq 6$ ), y producción de extremo-enzimas (Manisha y Yadav, 2017).

El objetivo de esta investigación es la deslignificación e hidrólisis de la celulosa de la paja de trigo para disponer de azúcares fermentables como pretratamiento, empleando bacterias extremófilas aisladas de una zona árida en Mexicali y posterior generación de bioetanol.

### 3. **Justificación y planteamiento del problema**

La seguridad energética y ambiental son dos problemas importantes en el mundo actual que han impulsado la demanda de una fuente de energía alternativa y ecológica. Además, la quema de combustibles fósiles contribuye a las emisiones de gases de efecto invernadero, así como al calentamiento global que causa el cambio climático, el aumento del nivel del mar, la pérdida de biodiversidad y la contaminación urbana (Zabed et al., 2017), problemas que están siendo aún más constantes. Mexicali cuenta con un recurso capaz de enfrentar estos problemas, se trata de materiales lignocelulósicos desechados durante las cosechas agrícolas, principalmente la paja de trigo. En su mayoría no tienen gran interés postcosecha y suelen ser incinerados. El aprovecharlos y transformarlos mediante técnicas biotecnológicas puede generar productos útiles como biocombustibles o productos antisépticos. El bioetanol, un biocombustible amigable con el medio ambiente capaz de actuar como aditivo para la gasolina de los automóviles, aumentando el rendimiento, y mejorando la combustión interna del motor (Zabed et al., 2017; DEMİRBAŞ, 2005). Además de disminuir las emisiones de carbono y presenta un potencial para aplicación industrial en la zona.

Debido a la naturaleza recalcitrante de los materiales lignocelulósicos relacionados con la integridad estructural de la lignina, la hemicelulosa y la celulosa, es esencial aplicar un tratamiento previo para facilitar la conversión de la lignocelulosa en azúcares fermentables (Saha et al., 2016).

## 4. Marco teórico

### 4.1 Bioetanol

Se denomina bioetanol al producto del etíl-alcohol ( $C_2H_5OH$ ) obtenido a través de un proceso fermentativo empleando como sustrato materia prima de fuentes altas en azúcares fermentables y algún microorganismo capaz de convertir los azúcares a alcohol (Mohd Azhar et al., 2017; Zabed et al., 2017; Aditiya et al., 2016). El bioetanol es un combustible líquido que promete solucionar la crisis de los combustibles fósiles, tiene ventajas ambientales ante la gasolina y es biodegradable, también su combustión es menos tóxica (Aditiya et al., 2016), posee mayor número de octanaje (108), amplio límite de flamabilidad, mayor velocidad de llama y mayor calor de vaporización (Mansouri et al., 2016). Es un compuesto oxigenado ya que contiene un 34.7% de oxígeno, haciéndolo amigable al ambiente, mientras que el oxígeno está ausente en la gasolina. Resultando ser 15% más eficiente en la combustión del etanol que la de la gasolina, lo que reduce la emisión de partículas y óxidos de nitrógeno. En comparación con la gasolina, el etanol contiene una cantidad insignificante de azufre, y la mezcla de estos dos compuestos ayuda a disminuir el contenido de azufre en el combustible, evitando la emisión de óxidos de azufre que es un carcinógeno y contribuye a la lluvia ácida (Zabed et al., 2017; Mansouri et al., 2016; DEMİRBAŞ, 2005).

Según la RFA, 2019 la producción de bioetanol en 2018 alcanzó un total de 107.99 GL, siendo Estados Unidos de América y Brasil los principales productores de bioetanol en el mundo, con un monto de 60.71 GL y 29.93 GL, respectivamente. El 84% de la producción de etanol se emplea para el sector de transporte (Di Donato et al., 2019).

México cuenta con dos empresas productora de bioetanol donde lo comercializan para el área de transporte; OXIFUEL® y FUELFLEX®. Según (Sánchez, 2014), México produjo

645 millones de litros de bioetanol en 2014 a partir de la caña de azúcar y sorgo; una cantidad sin comparación con los principales países productores a nivel mundial.

La idea que radica en la producción de biocombustibles, es que deben ser producidos a partir de materia prima que no compita con los productos alimenticios. Actualmente existen cuatro clasificaciones (generaciones) en la producción de los biocombustibles, esta clasificación la reciben a partir de la materia empleada para producir los biocombustibles. Los biocombustibles de primera generación son aquellos que provienen de fuentes alimenticias directas para el ser humano (maíz, caña de azúcar, remolacha etc.) teniendo un impacto negativo al emplear como fuentes de azúcares alimentos primarios. Los biocombustibles de segunda generación son aquellos que provienen de fuentes no comestibles, como desechos agrícolas; materiales lignocelulósicos (paja de trigo, rastrojo de maíz, bagazo de caña de azúcar, desechos leñosos etc.). La tercera generación de biocombustibles proviene de algas y la cuarta generación a partir de los aceites vegetales; las últimas tres generaciones siguen en investigación, al no encontrar un método que permita aprovecharlos al máximo y el costo-beneficio sea viable (Di Donato et al., 2019; Bhatia et al., 2017; Zabed et al., 2017; Aditiya et al., 2016; Gupta y Verma, 2015;).

#### 4.2 Aprovechamiento de los residuos agrícolas, un recurso biodisponible

La mayoría de los residuos agrícolas en Mexicali se encuentran disponibles, aquellos que tienen fines para forraje son recolectados después de las cosechas. Sarkar et al., 2012 mencionan que los mejores residuos agrícolas que se encuentran como materia prima disponible para una producción anual de bioetanol son: paja de arroz, paja de trigo, paja de maíz, y bagazo. En la tabla 1 se muestra la producción mundial de los principales 4 residuos generados tras la cosecha.

**Tabla 1. Distribución mundial de los residuos agrícolas generados (millones de toneladas).**

Residuos agrícolas	África	Asia	Europa	América	Oceanía
Paja de arroz	20.90	667.60	3.90	37.20	1.70
Paja de trigo	5.34	145.20	132.59	62.64	8.57
Rastrojo de maíz	0.00	33.90	28.61	140.86	0.24
Bagazo de caña de azúcar	11.73	74.88	0.01	87.62	6.49

Fuente: Kim y Dale, 2004.

La paja de trigo (pt) es el segundo residuo con mayor biodisponibilidad seguido del arroz. Enfocándose en la capital de Baja California, el trigo se encuentra ampliamente distribuido por las zonas agrícolas, por lo tanto, los residuos de pt presentan un alto potencial para la producción de bioetanol (Qiu et al., 2018; Wang et al., 2013; Sarkar et al., 2012; Talebnia et al., 2010). Sin embargo, la producción de bioetanol a partir de residuos agrícolas, como pt, presenta adversidades debido a su composición denominado como materiales lignocelulósicos.

La (Delegación SAGARPA Baja California, 2018a) reportó un total de 191,686 toneladas de cosecha de trigo, con una relación de 1.3 entre residuo/cultivo (Talebnia et al., 2010), se puede estimar un total de 249,191.8 toneladas anuales de paja de trigo. Valdez-Vazquez et al., 2010 proponen una relación entre residuo/cultivo de 1.5; (ver tabla 2, donde se aprecian diferentes relaciones residuo-cultivo).

**Tabla 2. Residuos estimados anualmente; toneladas por año en Mexicali 2018.**

Relación	Autor	Producción anual (t)	Residuos estimados (t)
1.3	(Kim y Dale, 2004; Talebnia et al., 2010)	191,686.00	249,191.80
1.5	(Valdez-Vazquez et al., 2010)	191,686.00	287,529.00
1.4	Valor promedio	191,686.00	268,360.40

(t): Toneladas

Es importante aclarar el destino de los residuos y entender que estos no compiten con la industria alimentaria dirigida a la población. Estos recursos no son aprovechados y en su mayoría tienden a ser incinerados. Varios trabajos de investigación mencionan que el aprovechamiento de los residuos disminuirá el impacto ambiental (Qiu et al., 2018; Zabed et al., 2017; Wang et al., 2013; Sarkar et al., 2012; Balat, 2011; DEMİRBAŞ, 2005) también mencionan un mejoramiento en la economía, y así, se estaría refiriendo al concepto de desarrollo sustentable. El aprovechar los residuos de los cultivos para convertirlos en una fuente de energía, podrá sustentar e incluso sustituir el uso cotidiano de diversas fuentes de energías no renovables, se convertiría en una idea potencial y tendría un fuerte impacto en la sociedad. DEMİRBAŞ, 2005 menciona como el biocombustible líquido más utilizado en toda la historia, el etanol, y una de las formas de obtenerlo es a partir de materiales celulósicos. También dice que el etanol puede ser producido con diferentes materias primas, identificadas como residuos agrícolas: azúcares simples, almidón y celulosa. Los materiales celulósicos, provenientes de residuos agrícolas son también llamados lignocelulósicos los cuales pueden sustituir varias fuentes para la elaboración de etanol a un bajo costo e incluso son externos a la cadena alimenticia del hombre.

Kim y Dale, 2004 hablan de la producción de bioetanol, aproximadamente 491 GL (gigalitros) de bioetanol podrían producirse a partir de los cultivos desperdiciados y sus residuos lignocelulósicos, lo que podría sustituir 353 GL de gasolina (equivalente al 32% del consumo global) empleando el uso del E85 en los tanques (combinación de 85% bioetanol y 15% gasolina). El bioetanol como combustible de transporte puede ser introducido al motor ya sea de manera combinada (bioetanol-gasolina) o de forma pura (bioetanol 100%). La mezcla más común es el uso de E85 (DEMİRBAŞ, 2005).

Globalmente, la paja de arroz puede producir 205 GL de bioetanol siendo el de mayor cantidad por su alta biodisponibilidad, el segundo es la paja de trigo, con una producción de 104 GL de bioetanol y el bagazo de caña de azúcar podría producir 53 GL de bioetanol (Kim y Dale, 2004). Una tonelada de paja de trigo puede producir aproximadamente 304-323 litros de bioetanol (OEIDRUS, 2010). En la tabla 3 se aprecia la producción de bioetanol aprovechando algunos residuos agrícolas.

**Tabla 3. Aprovechamiento de los residuos agrícolas a escala mundial.**

<b>Desechos</b>	<b>Producción total (Tg)</b>	<b>Residuos aprovechados (Tg)</b>	<b>Producción de bioetanol (GL)</b>
<b>Maíz</b>	520.00	203.60	58.60
<b>Cebada</b>	124.00	3.70	1.50
<b>Sorgo</b>	53.00	10.30	2.80
<b>Trigo</b>	529.00	354.00	104.00
<b>Arroz</b>	526.00	731.00	205.00
<b>Caña de azúcar</b>	328.00	180.00	51.00

\*Fuente: (Kim y Dale, 2004). (Tg): Teragramos. (GL): Gigalitros

### 4.3 Agricultura actual en Mexicali.

Una de las zonas agrícolas más importantes del Municipio de Mexicali, es el Valle de Mexicali ubicado en el estado de Baja California al noroeste de México. El cultivo principal es el trigo y es el de mayor rendimiento comercial en el país, con una productividad media en los últimos años de 6.3 toneladas por hectárea (Coronado et al., 2012). Los principales cultivos en la zona del Valle de Mexicali son: trigo, cebada, algodón, alfalfa, avena, ajonjolí, cártamo, sorgo forrajero, rye-grass (Gobierno del Estado de Baja California). En el periodo de 2017-2018, se programaron un total de 79,178 hectáreas de cultivos, en los cuales el trigo fue el principal producto de las actividades agrícolas, a los cuales se le otorgó un total de: 62,609 hectáreas, cártamo 897 hectáreas, cebada 220 hectáreas, rye-grass 1,943 hectáreas,

cebollín 3,127 hectáreas, avena forrajera 3,500 hectáreas, maíz grano 1,000 hectáreas y cultivos varios 5,582 hectáreas (Delegación SAGARPA Baja California, 2018a, 2018b). El trigo, así como es el principal cultivo de producción en Mexicali, también es el segundo cultivo agrícola con mayor producción en el mundo después del arroz (Kim y Dale, 2004).

**Tabla 4. Cultivos de provenientes de Mexicali y total de hectáreas destinadas y programadas del año 2017.**

Ciclo 2016-2017	Cultivo	Hectáreas		
		Programada	Sembrada	%
Otoño - invierno	Trigo	84,392	67,757	80.29
	Cártamo	1,700	1,113	65.47
	Cebada	130	18	13.85
	Rye-grass	2,000	1,922	96.1
	Cebollín `	2,900	2,568	88.55
	Avena forrajera	3,500	3,590	102.57
	Maíz grano	1,000	974	97.4
	Varios	5,160	5,646	109.42
	Subtotal:	100,782	83,588	82.94
Perennes	Alfalfa (2017-2017)	30,475	29,874	98.03
	Espárrago	*(2,462)	2,422	98.37
	Vid	*(254)	283	111.41
	Frutales y otros	*(2215)	1,326	59.86
	Bermuda	2,281	2,378	104.25
	Palma datilera	*848	1,049	123.7
	Subtotal:	38,535	37,332	96.88
Primavera – verano	Algodón	18,464	25,789	139.67
	Sorgo grano (temprano)	1,305	342	26.21
	Sorgo grano (tardío)	1,766	623	35.28
	Sudan forrajero (temprano)	1,110	2,200	198.2
	Sudan forrajero (tardío)	3,703	1,446	39.05
	Maíz blanco (temprano)	1,000	777	77.7
	Maíz blanco (tardío)	813	86	10.58
	Cebollín (p.v.)	785	1,563	199.11
	Cebollín (tardío)	627	1,111	177.19
	Varios	1,512	562	37.17
	Subtotal:	31,085	34,399	110.98
Total:	170,402	155,419	91.21	

\*Incluye cultivos perennes de Laguna Salada, Mesa de Andrade y Valle Chico. Fuente OEIDRUS, 2017.

En el periodo 2016-2017 la cantidad programada de cultivos de trigo en Mexicali fue de 84,392 hectáreas (ver tabla 4) y se habían sembrado un total de 67,757 hectáreas según la cédula de cultivos del 11 de octubre del 2017 (OEIDRUS, 2017). Según la cédula de cultivos del periodo 2017-2018; ver tabla 5, se programó un total de 62,909 hectáreas para el trigo y con un total de 48,282 hectáreas sembradas (OEIDRUS, 2018).

**Tabla 5. Cultivos de provenientes de Mexicali y total de hectáreas destinadas y programadas del año 2018.**

Ciclo 2017-2018	Cultivo	Hectáreas		
		Programada	Sembrada	%
Otoño - invierno	Trigo	62,909	48,282	76.75
	Cártamo	897	29	3.23
	Cebada	220	6	2.73
	Rye-grass	1,943	2,424	124.76
	Cebollín	3,127	3,468	110.91
	Avena forrajera	3,500	6,078	173.66
	Maíz grano	1,000	822	82.2
	Varios	5,582	6,433	115.24
	Subtotal:	79,178	67,542	85.3
Perennes	Alfalfa (2017-2017)	30,596	30,573	99.92
	Espárrago	*(1,705)	2,772	98.37
	Vid	*(75)	300	111.41
	Frutales y otros	*(515)	1,326	59.86
	Bermuda	2,639	2,099	79.54
	Palma datilera	*1,135	1,371	123.7
	Subtotal:	36,665	38,441	104.84
Primavera – verano (2018-2018)	Algodón	29,141	31,993	109.79
	Sorgo grano (temprano)	682	705	103.37
	Sorgo grano (tardío)	1,638	146	8.91
	Sudan forrajero (temprano)	2,157	2,801	129.86
	Sudan forrajero (tardío)	3,417	3,276	95.87
	Maíz blanco (temprano)	1,619	775	47.87
	Maíz blanco (tardío)	647	271	41.89
	Cebollín (p.v.)	1,770	1,715	96.89
	Cebollín (tardío)	1,112	484	43.53
	Varios	1,717	687	40.01
	Subtotal:	43,900	42,853	97.62
	Total:	159,743	148,835	93.17

\*Se incluyen 1,818 hectáreas de cultivos perennes de Laguna Salada, José Saldaña, Mesa de Andrade y Valle Chico. Fuente: OEIDRUS, 2018.

La cantidad de hectáreas destinadas a los cultivos de trigo disminuyó en 16,635 hectáreas. En la tabla 4 y 5 se puede observar la cantidad de hectáreas destinadas para los diversos cultivos del Mexicali y su valle. En el periodo del 2017-2018 disminuyó la cantidad de hectáreas programadas destinadas a los cultivos, en el periodo 2016-2017 se programaron 170,402 hectáreas y se logró sembrar solo el 91.33%; tabla 6.

**Tabla 6. Periodos de siembra del 2014 al 2018.**

Periodo	2014-2015		2015-2016		2016-2017		2017-2018	
Acción	Programadas	Sembradas	Programadas	Sembradas	Programadas	Sembradas	Programadas	Sembradas
Hectáreas	177,102	162,981	175,621	166,875	170,402	155,725	159,743	148,781

Fuente: (OEIDRUS, 2015, 2016, 2017, 2018)

#### 4.4 Desechos agrícolas, tratamiento y consecuencias.

En la extensa distribución agrícola de Mexicali, tras cada cosecha se producen residuos de los cultivos, ciertos residuos requieren procesos simples para reducir su volumen, como pasar el arado de discos para voltear la tierra unos 20 a 30 cm de profundidad aprovechando los residuos para la siguientes siembras (OEIDRUS, 2010), o simplemente su valor residual es despreciable y/o insignificante. En la tabla 7 se muestran estados de la república mexicana, en donde el trigo, algodón y sorgo son partes de los principales cultivos.

Por otra parte, existen otros cultivos que para reducir su volumen por métodos simples no es sostenible, ya que su composición complica su ingreso a la tierra, requieren más de una pasada con el arado, amontonarlos e incluso se requieren riegos para suavizar la composición del mismo residuo, tal es el caso como los desechos de trigo y sus similares en composición (Quintero y Moncada, 2008), esto provoca que el método más eficaz para reducir los desechos sea por medio de incineración.

**Tabla 7. Regiones de México donde el trigo es sembrado.**

Estado	Municipio	Principales cosechas
Baja California	Mexicali	Trigo, Algodón, Sorgo
Chihuahua	Chihuahua	Maíz, Trigo, Frijol
Guanajuato	Abasolo, Irapuato, Pénjamo, Salamanca, Valle de Santiago	Maíz, Trigo, Sorgo, Cebada, Frijol
Jalisco	La Barca, San Martín de Hidalgo	Maíz, Trigo, Sorgo, Cebada, Caña de azúcar
Sinaloa	Ahome, Angostura, Culiacán, Guasave, Navolato, Sinaloa,	Maíz, Caña de azúcar, Sorgo, Frijol, Algodón, Trigo
Sonora	Cajeme, Etchojoa, Navojoa	Trigo, Maíz, Algodón, Sorgo, Frijol.

Modificado de Valdez-Vazquez et al., 2010.

La comisión para la cooperación ambiental (CCA, 2014) menciona que en muchos países, la quema de residuos agrícolas como: tallos, pastos, hojas y cáscaras, entre otros, continúa siendo la manera más económica y fácil de deshacerse o reducir el volumen de materiales combustibles producto de las actividades agrícolas, limpiando y despejando las zonas de cultivo para nuevas siembras (CCA, 2014). Se estimó que 8,700 Tg (teragramos) de residuos secos son quemados anualmente en el mundo y esto repercute en el cambio climático (Koppmann et al., 2005).

En el 2006 se estimó que México tuvo una producción de 75.73 millones de toneladas de residuos agrícolas en peso seco (Valdez-Vazquez et al., 2010), que tienen el potencial de ser transformados en bioenergías. Los principales residuos en México son (en orden descendente) los tallos de maíz, pajas de sorgo, hojas de caña de azúcar y paja de trigo, con un peso seco de 60.13 millones de toneladas (Valdez-Vazquez et al., 2010). En la fig. 1, se aprecia la distribución de los residuos de cada estado del país. Como se mencionó, el trigo es el mayor cultivo producido en Mexicali y su valle, (fig. 1 (d); color rojo), y es el que más desechos arroja al momento de la cosecha, con un monto aproximado de 280,320 toneladas a 2,181,021 toneladas por año. El 85% de los residuos de trigo son incinerados para preparar

la siguiente siembra, el otro 15% tiene diversos fines como el forraje (Quintero y Moncada, 2008). Estas prácticas, llamadas tradicionales, se han considerado, porque además de incinerar residuos, también se eliminan malezas, enfermedades y plagas, pero de manera contraria, se ha demostrado que la incineración elimina propiedades de la tierra como: nitrógeno, fósforo y materia orgánica del suelo, lo que conlleva al uso de fertilizantes (Coronado et al., 2012).

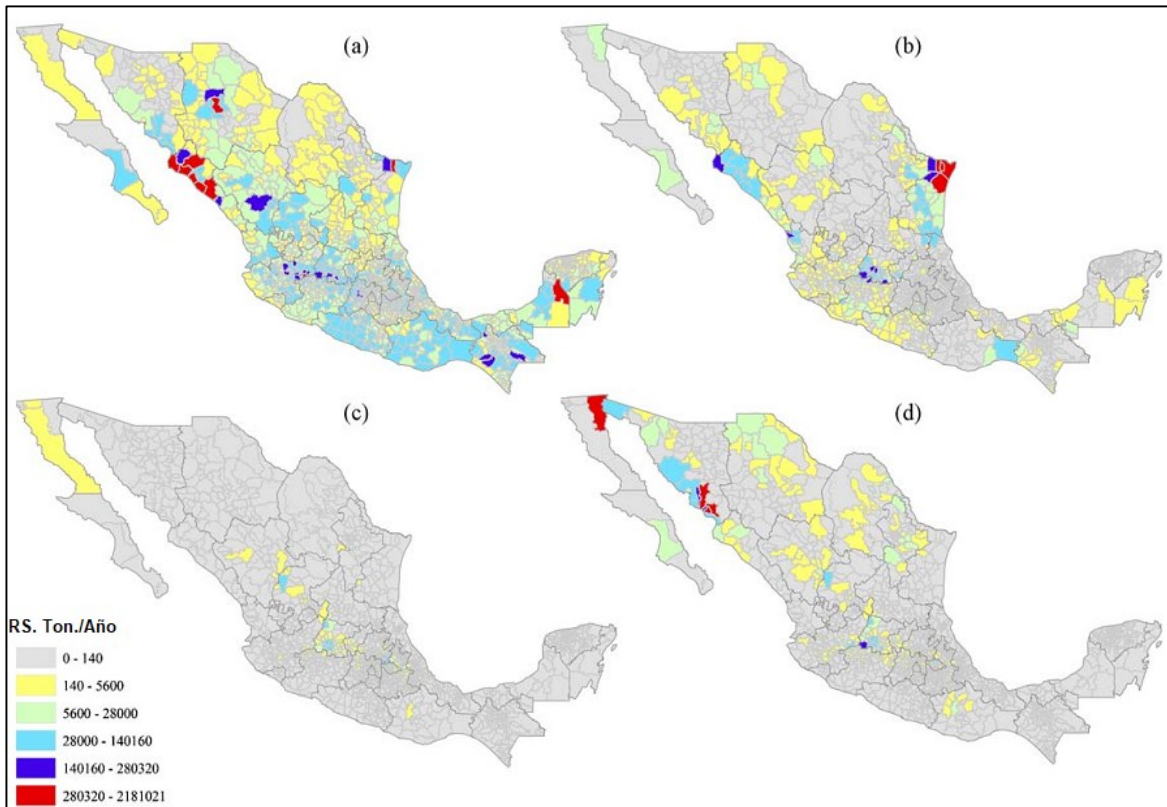
Las quemas de biomasa como árboles, hojas y pastos (incluidos los residuos agrícolas), producen a nivel mundial según CCA, 2014:

- 40% del dióxido de carbono.
- 32% del monóxido de carbono.
- 20% de la materia particulada o partículas de materia suspendidas (PM).
- 50% de los hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAH).

También (Lemieux et al., 2004), tienen diversos efectos en la salud pública, por estas razones:

- El humo producto de las quemas agrícolas se libera cerca de la superficie en áreas generalmente pobladas, lo que procede a una alta interacción con los contaminantes y la población colindante.
- Estas quemas se realizan por temporadas específicas del año, y puede dar lugar a altas concentraciones de contaminantes.
- Son fuentes no puntuales de contaminantes atmosféricos y se realizan en áreas muy extensas, por lo que resulta difícil medir y regular este tipo de emisiones.
- Las condiciones de la combustión y los combustibles varían e incluyen la posible presencia de plaguicidas.

- Contribuyen al cambio climático, ya que entre los compuestos emitidos se encuentran gases de efecto invernadero y contaminantes climáticos de vida corta, como el carbono negro.



**Fig. 1. Distribución de los residuos principales en México (a) restos de maíz y mazorcas, (b) paja de sorgo, (c) paja de cebada y (d) paja de trigo. Nota: los colores indican los residuos secos en toneladas por año. Tomado de Valdez-Vazquez et al., 2010.**

Lemieux et al., 2004, realizaron una investigación donde muestra las emisiones que producen la quema de los desechos de cebada, maíz, trigo, y arroz (tabla 8). Las emisiones se dividen en grupos; cada uno representado con sus siglas en inglés: compuestos orgánicos volátiles (VOC), hidrocarburos policíclicos aromáticos (PAH), y las dibenzodioxinas y dibenzofuranos policlorados (PCDD/F). Menciona también que las quemas a cielo abierto son un método rápido para reducir los residuos agrícolas y que a su vez nutren la tierra y la preparan para la siguiente temporada.

**Tabla 8. Emisiones de las quemas agrícolas (mg kg<sup>-1</sup> incinerado).**

Clase	Compuesto	Paja de cebada	Rastrojo de maíz	Paja de arroz	Paja de trigo
VOC	Acetona	3.77	4.34	4.01	4.39
	2-Metil-2-ciclopentano-1	--	36	127	48
	2-Clorofenol	52	81	173	--
	Benzaldehído	82	46	77	52
	Estireno	36	26	35	35
	Benzofurano	18	--	16	26
PAH	Naftalina	80.3	4.48	8.39	196.19
	2-Metilnaftalina	2.7	2.63	5.43	1.07
	Acenaftalina	11.75	0.4	1.06	1.5
	Acenafteno	9.31	0.66	0.31	0.17
	Fluoreno	2.7	0.12	0.36	0.32
	Fenantreno	17.35	1.61	1.54	4.09
	Antraceno	3	0.19	27	1.07
	Fluoranteno	2.3	0.8	0.45	3.93
	Pireno	3.58	0.77	0.35	2.47
	Dibenzo [ah] antraceno	1.13	0.19	0.15	1.3
	Criceno	1.43	0.27	0.17	1.37
	Benzo [b]fluoranteno	2.4	4.66	0.15	1.14
	Benzo [k] fluoranteno	0.6	2.85	0.1	0.48
	Benzo [a] pireno	0.78	9.56	0.08	0.41
	Benzo [e] pireno	1.01	11.26	0.11	0.59
	Perileno	0.23	2.08	0.02	0.44
	Benzo [ghi] perileno	0.52	0.57	0.04	1.05
Indeno [1,2,3- cd] pireno	0.59	9.67	0.06	0.67	
PCDD/F	TEQ PCDDs/Fs	--	--	5.37 X10 <sup>-7</sup>	4.52 X 10 <sup>-7</sup>

Modificado de Lemieux et al., 2004.

La clase de contaminantes VOC, tiene un impacto sobre la salud humana, y depende del compuesto y de su grado de toxicidad, así como el tipo de exposición a la cual sea sometida; ingesta, inhalación, contacto directo con la piel (Hernández, 2017), pudiendo causar lesiones como:

- A corto plazo: irritación de ojos y vías respiratorias, dolor de cabeza, mareo, trastornos visuales, náuseas, fatiga, alergias.

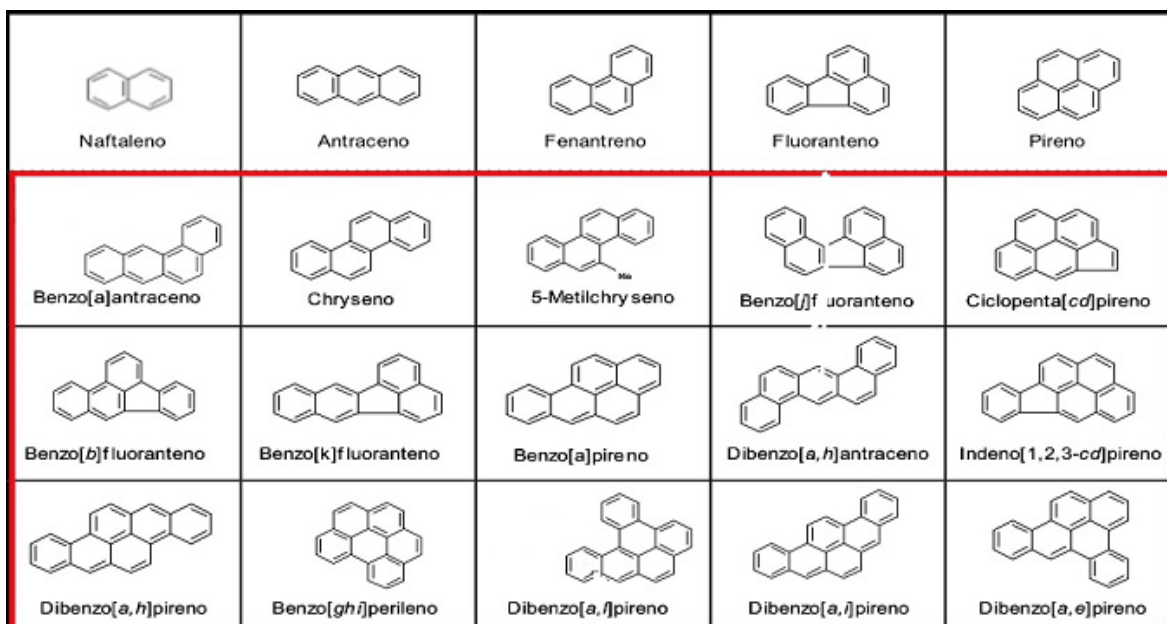
- A largo plazo: lesión de hígado, riñones, sistema nervioso central y desarrollo de cáncer.

Según Hernández, 2017, el impacto ambiental que procede de las emisiones VOC:

- Agotamiento del ozono troposférico: Si los compuestos en su estructura poseen cloro o bromo, los procesos de fotólisis pueden conducir a la liberación de compuestos responsables de la destrucción de ozono.
- Formación fotoquímica de ozono troposférico: La presencia de óxidos de nitrógeno y luz solar ante VOC reaccionan formando ozono. El ozono además de afectar la salud humana también afecta los cultivos y vegetación.
- Potenciación del efecto invernadero global: El efecto invernadero puede ser potenciado por la absorción de radiación infrarroja tras la acumulación de VOC en la troposfera.
- Acumulación y persistencia en el ambiente. Algunos VOC pueden ser adsorbidos sobre partículas y trasladados a grandes distancias superando el proceso de oxidación volviéndose persistentes.

Pérez-Morales et al., 2016 mencionaron que los PAH también son contaminantes volátiles (dependiendo de su masa molecular), y con una gran capacidad de adsorción de partículas atmosféricas, lo cual favorece su traslado a largas distancias de su fuente emisora. En fuentes directas de combustión se pueden extender por el medio ambiente y alcanzan elevadas concentraciones en el aire. Se ha demostrado mediante estudios experimentales que muchas de las moléculas PAH son genotóxicos, mutagénicos y/o cancerígenos. En la fig. 2, se muestran los 15 compuestos PAH (remarcado en rojo) designados como cancerígenos mutagénicos. El dibenzo [ah] antraceno, criceno, benzo [b] fluoranteno, benzo [k]

fluoranteno, benzo [a] pireno, benzo [e] pireno, benzo [ghi] perileno, indeno [1,2,3- cd] pireno, son moléculas que se forman durante las quemadas agrícolas; ver tabla 8.



**Fig. 2. Estructura de 20 PAH. Fuente: Pérez Morales et al. 2016.**

Hay muchos estudios de los efectos de las dibenzodioxinas policloradas (PCDD) en seres humanos. La mayoría de estos estudios evaluaron a trabajadores expuestos durante la manufactura de sustancias químicas y plaguicidas contaminados con 2, 3, 7, 8-tetraclorodibenzo-p-dioxina (DDTC). De los padecimientos más comunes, al tener altas concentraciones de 2, 3, 7, 8-DDTC en el organismo, se presenta la enfermedad de cloracné. Esta afecta gravemente la piel, con síntomas similares al acné, manifestándose generalmente en la cara y parte superior del cuerpo, pudiendo también presentarse en otras zonas del cuerpo. A diferencia del acné, el cloracné es difícil de tratar, y puede provocar severas desfiguraciones. El departamento de Salud y Servicios Humanos (DHHS), determino que el 2, 3, 7, 8-DDTC puede producir cáncer. La Agencia de Protección del Medio Ambiente de EE. UU (EPA) también afirmó que una mezcla de PCCD con 6 átomos de cloro, podría ser carcinogénica en seres humanos (ATSDR, 2016).

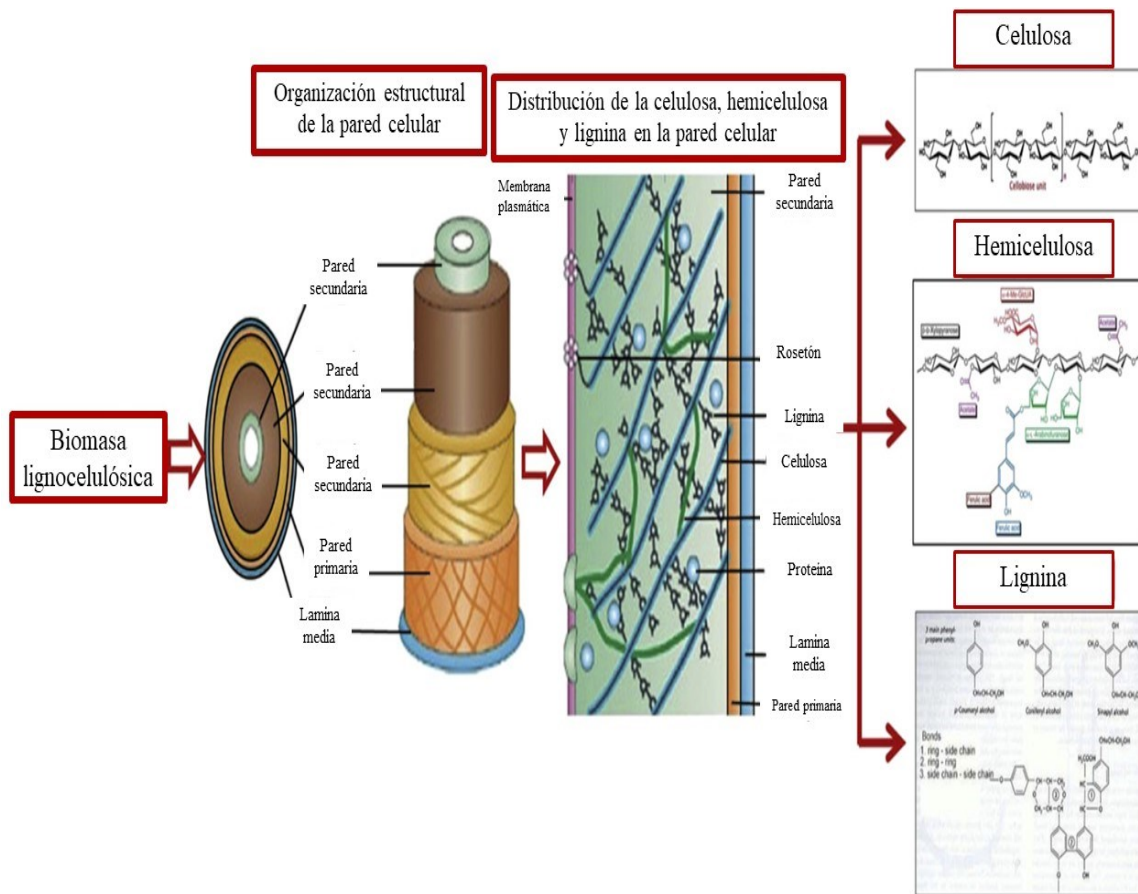
#### 4.5 Composición de la paja de trigo

La materia lignocelulósica es el componente principal de la pared celular de plantas (Hosseini et al., 2019), se compone principalmente de celulosa (30-50%), hemicelulosa (15-35%) y lignina (10-30%); otros compuestos son extractivos y cenizas (Krasznai et al., 2018). Los residuos de las actividades agrícolas tienden a acumular grandes cantidades de estos materiales y es la fuente orgánica más abundante en el mundo (Hosseini et al., 2019; Zheng et al., 2014). En la tabla 9, se muestra la composición de la paja de trigo (pt) descritas en 4 investigaciones; la composición es similar en cada una. Montero et al., 2016 realizó estudios de la composición de la pt de *Triticum aestivum* procedentes de las actividades agrícolas del Valle de Mexicali en Baja California, México. Sus resultados difieren un poco de otros trabajos publicados debido al método de análisis empleado.

**Tabla 9. Composición de lignocelulosa en la paja de trigo.**

Sustrato	% Celulosa	% Hemicelulosa	% Lignina	Referencia
Paja de trigo	35-45	20-30	8-15	(Qiu et al., 2017)
	37-41	27-32	13-15	(Balat, 2011)
	33-38	26-32	17-19	(Zabed et al., 2017)
	57.09	18.81	19.10	(Montero et al., 2016)

Los componentes de la lignocelulosa están enredados y emplastados unos sobre otros. Siendo la celulosa el compuesto de estructura seguido de la hemicelulosa formando lo que se conoce como holocelulosa, la lignina se encuentra “enredada” en las cadenas, evitando la entrada de enzimas capaces de hidrolizar la celulosa y hemicelulosa. En la Fig. 3 se muestra la estructura de la lignocelulosa y su distribución (Menon y Rao, 2012).



**Fig. 3 Estructura de la lignocelulosa. Tomada y adaptada de Menon y Rao, 2012.**

#### 4.5.1 Celulosa

La celulosa es el componente principal de la lignocelulosa (Zheng et al., 2014), es un polisacárido de “n” glucosas unidas por enlaces glucosídicos  $\beta$  1-4 formando el disacárido celobiosa y con un peso molecular alrededor de 100 kDa (kiloDaltons). En el carbono 4 se encuentra presente un grupo hidroxilo, lo que lleva a la formación de enlaces de hidrógeno en la misma cadena o cadenas vecinas. Las moléculas de glucosa están unidas por enlaces de hidrogeno y fuerzas de van der Waals formando microfibrillas y las uniones originan diferentes orientaciones a través de la estructura generando diferentes niveles de cristalinidad y esto a su vez, la hace insoluble y resistente a la despolimerización (Krasznai et al., 2018; Zabed et al., 2017; Zheng et al., 2014).

### 4.5.2 Hemicelulosa

La hemicelulosa es un polímero heterogéneo aleatorio y ramificado de diferentes sacáridos que incluyen pentosas ( $\beta$ -D-xilosa y  $\alpha$ -L-arabinosa), hexosas ( $\beta$ -D-glucosa,  $\alpha$ -D-galactosa y  $\beta$ -D-manosa) y ácidos de azúcar, su peso molecular oscila entre los 30kDa, (Zheng et al., 2014). Las cadenas cortas y ramificadas de hemicelulosa ayudan a construir una red con microfibrillas de celulosa e interactúan con la lignina, haciendo que la matriz de lignina de holocelulosa sea extremadamente rígida (Hosseini et al., 2019).

### 4.5.3 Lignina

Segundo compuesto orgánico más abundante en la naturaleza, después de la celulosa. Es un heteropolímero amorfo de gran tamaño, complejo, aromático e hidrófobo, y está constituido de unidades de fenilpropano, como el alcohol coniferílico y el alcohol sinapílico con grupos funcionales hidroxilo, metoxilo y carbonilo. La lignina desempeña el papel del “cemento” para la reticulación entre la celulosa y la hemicelulosa formando una estructura tridimensional rígida de la pared celular llamado matriz lignocelulósica (Zabed et al., 2017; Zheng et al., 2014). Debido a su estructura altamente ramificada e irregular formada por la radicalización oxidativa aleatoria de los fenoles, la lignina presenta una barrera formidable para la digestión a través de rutas enzimáticas (Krasznai et al., 2018).

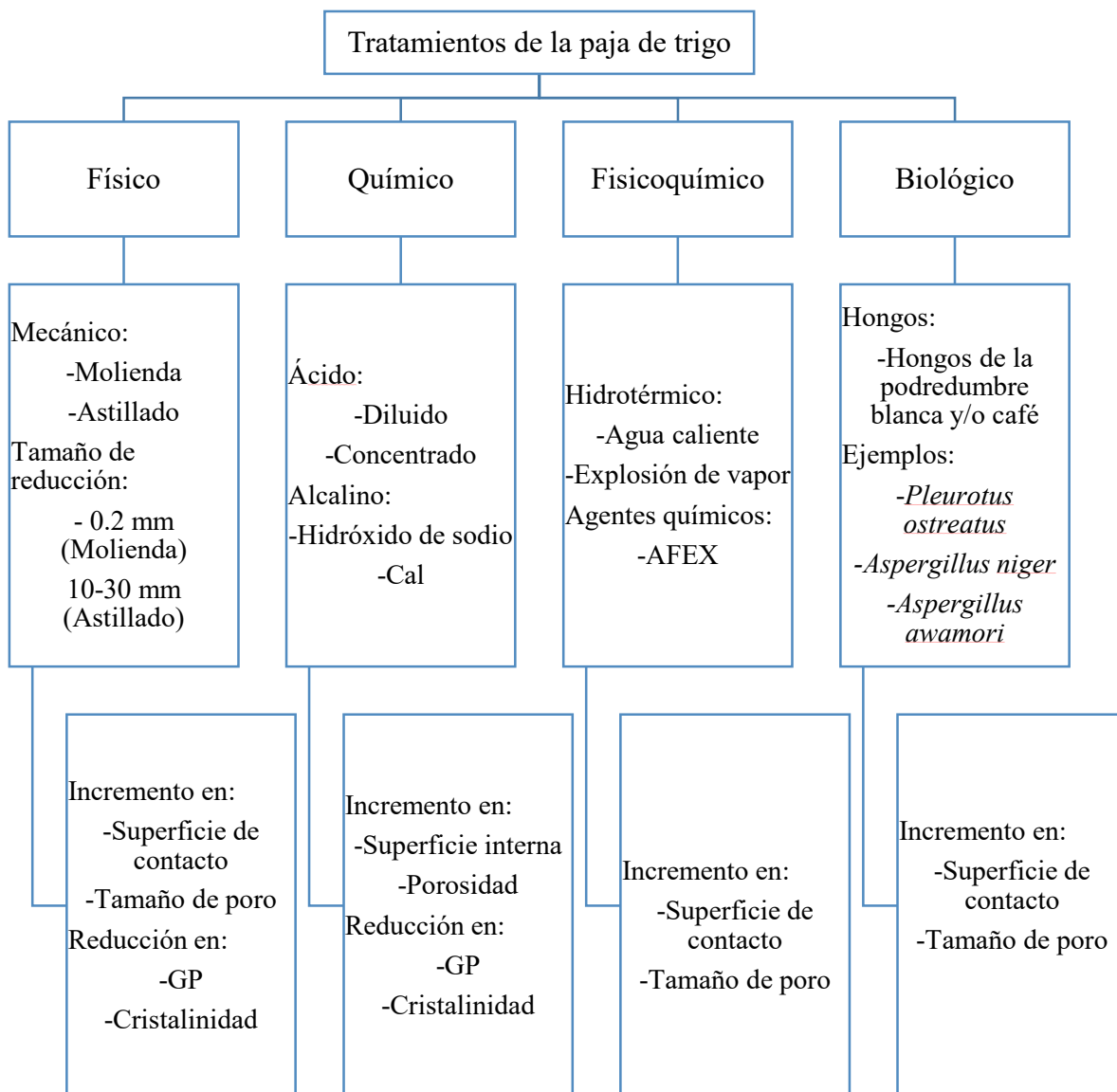
## 4.6 Pretratamiento biológico a la lignocelulosa

Un pretratamiento previo a los materiales lignocelulósicos mejora la disposición de los carbohidratos capaces de hidrolizarse y formar azúcares fermentables, de no haber un pretratamiento previo a la fermentación, los materiales lignocelulósicos no producirían una cantidad significativa de producto de interés, de hecho, al querer llevar a cabo un proceso de

fermentación con estos materiales empleando algún microorganismo capaz de fermentar como *Saccharomyces cerevisiae* (empleada en procesos de fermentación industrial) no se produciría alcohol; su metabolismo y crecimiento se vería inhibido, ya que la naturaleza recalcitrante de los materiales lignocelulósicos no cuentan con azúcares simples para suministrar energía (Hosseini et al., 2019; Mohd Azhar et al., 2017).

Existen diversos tipos de pretratamientos como: químicos, físicos, fisicoquímicos y biológicos. En la figura 4 se puede ver las 4 clasificaciones. El proceso de pretratamiento puede usarse para romper la compleja estructura de la lignina y remover parte de la hemicelulosa (Hosseini et al., 2019).

Paudel et al., 2017 mencionaron que, para alcanzar el objetivo de biocombustible de segunda generación, el uso de un tratamiento previo es el enfoque más efectivo para mejorar la producción de biocombustibles como biogás a partir de residuos agrícolas con un alto contenido de biomasa lignocelulósica. El tratamiento previo más eficiente es una digestión anaerobia en estado sólido (solid state anaerobic digestion; SS-AD por sus ingles) donde los estudios de Paudel et al. 2017, trataron los residuos agrícolas y lo compararon con una digestión anaeróbica en estado líquido.



**Fig. 4. Distintos pretratamientos usados para disponer de los carbohidratos. (GP: grado de polimerización, AFEX: explosión de fibra de amoniaco; por sus siglas en ingles). Tomado y modificado de Talebnia et al., 2010.**

Aunque el objetivo del pretratamiento es liberar la celulosa por vía sacarificación enzimática y fraccionarla en componentes de interés, esta acción involucra reacciones que producen subproductos derivados de la lignocelulosa y que pueden inhibir los procesos bioquímicos del pretratamiento (Jönsson y Martín, 2016).

En pretratamientos biológicos, lo que es afectados por los subproductos derivados de la lignocelulosa son los microorganismos empleados, su crecimiento se ve afectado debido a la generación de moléculas como: furfural, 5-hidroximetil-2-furaldehído (HMF), hidroxibenzaldehído y ácido acético (Bhatia et al., 2017). El furfural es el compuesto más tóxico en comparación con otros inhibidores, ya que induce agentes reactivos de oxígeno dentro de las células y afecta las mitocondrias, la membrana exterior de la vacuola y el citoesqueleto. En presencia de furfural, los grupos de nicotinamida-adenina dinucleótido fosfato (NADPH) de la *Escherichia coli* se agotan, debido a la acción de alcohol deshidrogenasa del gen YqhD. Una reducción en los grupos de NADPH afecta aún más la asimilación de sulfato e inhibe el crecimiento microbiano. Las modificaciones genéticas en el metabolismo de las células pueden hacer de estos resistentes a los subproductos (Bhatia et al., 2017; Jönsson y Martín, 2016).

Saha et al., 2016 sometieron rastrojo de maíz con hongos de la podredumbre blanca (basidiomicetos) a pretratamiento para deshacer la mayor parte de lignina durante 30 días; estos hongos producen lignino-peroxidasas y manganeso peroxidasas que son capaces de oxidar la lignina y desdoblarla dejando libre a la celulosa. Seguido, emplearon un coctel de 3 enzimas (celulasa,  $\beta$ -glucosidasa y hemicelulasa) donde, de los 26 hongos ensayados, *Cyathus stercoreus* (NRRL-6573) produjo la mayor concentración de azúcares totales ( $394 \pm 13$  mg/g de rastrojo de maíz pretratado). En el estudio se relató que los desechos del maíz contienen  $36.3 \pm 0.2\%$  de celulosa,  $31.4 \pm 0.5\%$  de hemicelulosa y  $17.2 \pm 0.2\%$  de lignina (similar a la composición de paja de trigo). Así, el NRRL-6573 pudo degradar  $46.2 \pm 0.8\%$  de lignina,  $51.8 \pm 1.8\%$  de hemicelulosa y aproximadamente un 30% de celulosa (dato no

disponible, solo en gráficas). Estos hongos no se vieron afectados por los subproductos generados durante el proceso de sacarificación descrito por Jönsson y Martín, 2016.

#### 4.7 Enzimas degradadoras de materiales lignocelulósicos en pretratamiento biológico

Para degradar los compuestos lignocelulósicos a azúcares fermentables es necesario que el microorganismo empleado para el pretratamiento biológico sea capaz de producir enzimas específicas para atacar los compuestos lignocelulósicos

Existen diversos consorcios enzimáticos para degradar la lignocelulosa. Las celulasas y xilanasas convierten la celulosa y la hemicelulosa a azúcares fermentables (Binod et al., 2019). Hay un vasto grupo de enzimas hidrolíticas divididas en 13 clases (EC 1-13) y cada una dividida en varias subclases. Sin embargo, la clase comúnmente usados para transformar la biomasa lignocelulósica de los residuos agrícolas es el grupo EC 3.2. Estas incluyen celulasas,  $\beta$ -glucosidasas, lacasas, xilanasas, y mananasas (Manisha y Yadav, 2017)

##### 4.7.1 Enzimas que degradan celulosa (celulasas)

Debido a la naturaleza insoluble de la celulosa, se requiere un consorcio enzimático para la completa degradación hasta monosacáridos de glucosa. Los principales microorganismos productores de celulasas son: *Clostridium*, *Cellulomonas*, *Thermomonospora*, *Trichoderma* y *Aspergillus* (Manisha y Yadav, 2017).

- **Endoglucanasas (Endocelulasas):** Hidrolizan los enlaces glucosídicos internos  $\beta$ -1,4 de la cadena amorfa de celulosa empleando una molécula de agua, formando nuevas cadenas y más cortas (oligosacáridos) con extremos reductores y no reductores.

- **Celobiohidrolasas (Exocelulasas):** Estas se encargan de degradar los oligosacáridos formados por las endoglucanasas alterando los extremos reductores y no reductores de las nuevas cadenas formadas de celobiosa (disacárido de glucosa).
- **$\beta$ -Glucosidasas:** Hidrolizan los enlaces glucosídicos presentes en la celobiosa para así formar los monómeros de glucosa.

#### 4.7.2 Enzimas que degradan hemicelulosa (xilanasas)

Las enzimas para degradar la hemicelulosa son mucho más complejas y específicas. Aunque, a diferencia de la celulosa es mucho más fácil hidrolizar debido a sus propiedades amorfas (Binod et al., 2019; Aditiya et al., 2016; Jönsson y Martín, 2016). El xilano es el polisacárido principal en las cadenas de hemicelulosa, está constituido principalmente por xilosa (pentosa).

- **Endo 1,4- $\beta$ -xilanasas:** Se clava en los enlaces glucosídicos del xilano, liberando xilooligosacáridos, oligómeros de  $\beta$ -D-xilopiranosilo. Del  $\beta$ -D-xilopiranosilo se producen mono, di y tri sacáridos de xilanopiranosilo.
- **$\beta$ -xilosidasa:** Estas enzimas hidrolizan los xilooligosacáridos y xilobiosa a xilosa generando residuos de  $\beta$ -D-xilopiranosilo.

Esta es la manera de reducir el xilano, sin embargo, en su degradación se forman compuestos ramificados que no pueden ser hidrolizados por las enzimas mencionadas, por otra parte es necesario un grupo específico de enzimas llamadas enzimas xilanolíticas accesorias; que incluyen la feruloil esterasa,  $\alpha$ -L-arabinofuranosidasa,  $\alpha$ -glucuronidasa y la acetilxilano esterasa (Binod et al., 2019; Aditiya et al., 2016)

### 4.7.3 Enzimas que degradan lignina

Los principales productores de enzimas capaces de degradar lignina son los hongos de la podredumbre blanca del género basidiomiceto que poseen un complejo sistema ligninolítico (Saha et al., 2016). Las enzimas responsables de la degradación de lignina son: lignino peroxidasas, manganeso peroxidasas, y lacasas.

Las lignino peroxidasas (LiP) y manganeso peroxidasas (MnP) son enzimas oxido-reductoras. La LiP actúa en los compuestos aromáticos y no aromáticos produciendo cationes radicales, mientras que las MnP cataliza la oxidación de  $Mn^{+2}$  a  $Mn^{+3}$  y a su vez oxida los compuestos fenólicos (Binod et al., 2019; Gonzalo et al., 2016).

Las lacasas actúan en un amplio margen de sustratos como: los difenoles, polifenoles, alifáticos y aminas aromáticas. Son enzimas que contienen átomos de cobre y son oxidativas.

## 4.8 Microorganismos extremófilos

El uso de microorganismo extremófilos ha despertado un gran interés en la obtención de metabolitos primarios y/o secundarios (Chen y Jiang, 2018). Los microorganismos extremófilos se refieren a aquellos que pueden seguir teniendo actividad biológica a diferencia de los mesófilos, donde el rango de crecimiento, por ejemplo, de temperatura es de mayor de 8 °C y menor de 40 °C (Madigan et al., 2015). De las ventajas que ofrecen microorganismos termófilos (pertenecientes a los extremófilos) según Di Donato et al., 2019 en la producción de bioetanol, es que sus enzimas permiten procesos viables y competitivos en la conversión de biomasa residual (materiales lignocelulósicos) en bioetanol, además, la producción de bioetanol a partir de materiales de segunda generación pueden generar beneficios en términos de sustentabilidad e impacto ambiental.

Los microorganismos extremófilos producen una serie de enzimas que, gracias a sus propiedades únicas, son resistentes a las duras condiciones del proceso industrial de producción de bioetanol. Existen microorganismos halófilos que cuentan con la capacidad hidrolítica de celulosa, algunos de estos aislados pertenecientes a de sitios con altas concentraciones de sal pertenecen al género: *Halomonas*, *Chromohalobacter*, *Bacillus*, *Salinivibrio*, *Marinococcus*, *Solibacillus* *Salinococcus* y *Nesterenkonia* (Manisha y Yadav, 2017). Un concepto usado por Chen y Jiang, 2018 es: biotecnología industrial de próxima generación (NGIB por sus siglas en ingles), donde habla de los microorganismos extremófilos y menciona a los alcalófilos, halófilos y termófilos (entre otros). Los alcalófilos presentan un enfoque prometedor y resistencia a la contaminación para los tratamientos de una amplia gama de carbohidratos en agua de mar no potable y no esterilizada. Suelen encontrarse en ambientes con altas concentraciones de sal o en el mar. Muchas de las bacterias halófilas son tanto alcalófilas como halófilas, proporcionan “doble protección” para evitar contaminación microbiana. Las *Halomonas* spp. con características ácido-alcalófilas han sido explotados para NGIB. Se espera que los acidófilos extremos combinados con propiedades termófilas sean un soporte prometedor para la producción química a granel empleando como sustratos biopolímeros como almidón, celulosa o grasas, ya que a un pH bajo y una temperatura alta acelerarán la degradación de los sustratos (Di Donato et al., 2019; Chen y Jiang, 2018).

En este trabajo se estudiaron bacterias consideradas extremófilas para conocer su capacidad para hidrolizar celulosa y poder emplearse en un futuro en el proceso de producción de bioetanol.

## 5. Objetivos

### 5.1 Objetivo general

Seleccionar microorganismos extremófilos que hidrolicen celulosa de la paja de trigo y producir bioetanol.

### 5.2 Objetivos específicos:

- Recolectar residuos de trigo provenientes de las actividades agrícolas de Mexicali para realizar pretratamientos biológicos y cuantificar los azúcares reductores que se puedan liberar.
- Identificar aquellos aislados bacterianos que tengan una mayor producción de celulasas.
- Establecer las condiciones de laboratorio que permitan la mayor producción de bioetanol a partir de la paja de trigo.
- Evaluar la factibilidad para el escalamiento de la producción de bioetanol y la pertinencia de la producción a pequeña escala.

## 6. Hipótesis

Las bacterias extremófilas utilizadas en este proyecto para el pretratamiento biológico de la paja de trigo optimizan la producción de azúcares fermentables y la producción de bioetanol.

## 7. Metodología

### 7.1 Recolección de sustratos.

Se recolectaron residuos de trigo *T. aestivum* provenientes de las actividades agrícolas en Mexicali. Se realizó una reducción mecánica a la paja de trigo con molino metálico (Waring 33BL79) de alta velocidad y aspas de acero y se tamizó en malla de 1 mm. Los residuos que no pasaron por la malla fueron colectados para volverlos a someter a reducción mecánica. En adelante, los procesos que conlleven trabajar con paja de trigo es aquella que pasó por la malla de 1 mm.

### 7.2 Reactivación de microorganismos.

Se reactivaron 42 microorganismos del banco de microorganismos del laboratorio de Investigación de Bioingeniería, estos microorganismos son provenientes de una zona árida en los alrededores de Mexicali y tienen la característica de ser extremófilos, fueron reactivados en cajas Petri de plástico para su almacenamiento con agar R2A (Reasoner's 2A de Laboratorios Conda). En cajas Petri de vidrio de 90 x10 mm, se vertió medio R2A sin modificar (-) y R2A modificado (+) a pH 8.5 y 12% de cloruro de sodio (Reséndiz, 2018; Saldaña, 2016). Se incubaron durante 2 días a 35 °C en una incubadora ECOSHEL 9052. En la tabla 10 se muestran los aislados seleccionados, el grupo y código que recibieron tras haber sido aislados y el medio donde fueron reactivados.

**Tabla 10. Aislados bacterianos proporcionados por el equipo de investigación de bioingeniería.**

Medio R2A	Aislado		Medio R2A	Aislado	
	Grupo	Código		Grupo	Código
-	A	B.1.M.8	-	V	2.2.b.4
-	B	B.2.M.7	-	VI	5.1.b.2
+		E	+	VII	9.1.b.1
+	G	B.5.M.6	+	IX	5.b.4
+	H	B.1.M.7	+	X	5.b.3
+	L	B.2.M.9	-	XI	6.2.b.4
-	M	B.4.M.7	+	XIII	6.b.3
-	N	B.5.M.8	-	XIV	3.b.2
-		Q1	+	XV	4.2.b.3
+		Q2	+	XVI	4.2.b.1
+		Q4	+	XVII	8.1.b.1
+		Q5	-	XVIII	P.3.1 bac 1
-		R3	+	XX	6.1.b.1
-		R4	+	XXI	5.1.b.5
-		S1	+	XXII	1.3.b.5
-		S2	+	XXV	P.9.1 bac 3
+		S3	+	XXVI	7.b.2
+	I	P.3.1 bac 2	+	XXVIII	5.1.b.4
+	II	1.3.b.6	+	XXXI	8.1.b.4
+	III	5.1.b.1	+	XXXIV	2.2.b.1
+	IV	P.8 bac 2	+	XXX	6.b.4

(+): medio R2A modificado (12% NaCl, pH de 8.5).

(-): medio R2A sin modificar.

### 7.3 Determinación del porcentaje de humedad en paja de trigo

Con el fin de reportar los resultados en peso seco, se procedió a tratar la paja de trigo molida según Montero et al., 2016 donde usaron residuos de trigo procedente de la región de Baja California y emplearon la metodología descrita en las especificaciones ASTM E871. Se realizaron triplicados donde se pesaron 3 gramos de paja de trigo molido en balanza analítica METTLER TOLEDO® modelo ML204/03 con 0.1mg de precisión en crisoles previamente pesados. Seguido, se colocaron en estufa de secado a 105 °C durante 12 horas. Pasado el periodo se tomó lectura del peso.

La ecuación 1 (Ec. 1) se empleó para determinar el porcentaje de humedad una vez obtenidos los resultados tras el proceso

$$\%H = \frac{[A-B]}{A} * 100 \quad (\text{Ec. 1})$$

Donde: H= Porcentaje de humedad (%), A= Masa de la muestra sin calentar (g), B= Masa de la muestra después de calentar (g)

#### 7.4 Búsqueda de microorganismos productores de celulasas

Los ensayos fueron realizados en cajas Petri de vidrio de 90 x10 mm, por triplicado, los materiales para preparar el medio de carboximetil celulosa (CMC) son los descritos por Kasana et al., 2008 y se mencionan en la tabla 11. Cada caja fue dividida en 4 cuadrantes (A, B, C y D), con el fin de tener tres cuadrantes estriados con un mismo microorganismo y un cuarto sin microorganismo (control negativo) donde no ocurre decoloración del medio, después se incubaron durante 48 horas a 35 °C en una incubadora ECOSHEL 9052. Pasado el periodo de incubación, cada caja Petri fue inundadas con 10 ml de yodo Lugol y se dejaron reaccionar durante 5 minutos, posteriormente se vació el exceso de yodo y se dejaron reposar 4 horas. Se consideró como prueba positiva el cambio de color en el medio de cultivo, de un tono café del yodo Lugol (control) a una decoloración del medio de cultivo alrededor del crecimiento del aislado bacteriano, adquiriendo un tono amarillento.

**Tabla 11. Reactivos para preparar medio CMC.**

Relación peso / volumen	
0.20%	Nitrato de sodio
0.05%	Sulfato de magnesio
0.10%	Fosfato dipotásico
0.05%	Cloruro de potasio
0.02%	Peptona proteasa
0.20%	CMC
1.70%	Agar bacteriológico

## 7.5 Cuantificación de microorganismo por curva de McFarland

Para cuantificar los microorganismos inoculados en los ensayos, se elaboró la curva de McFarland empleando el método de mínimos cuadrados para el ajuste de la recta. Se prepararon soluciones de cloruro de bario ( $\text{BaCl}_2$ ) y ácido sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ), ambas al 1%, y se utilizaron para elaborar una serie de estándares de McFarland contenidos en tubos de ensayo de 15 mL. La mezcla de  $\text{BaCl}_2$  y  $\text{H}_2\text{SO}_4$  produce cantidades conocidas de sulfato de bario ( $\text{BaSO}_4$ ), que asemejan la turbidez en suspensiones con microorganismos.

Las mezclas fueron realizadas para crear diferentes concentraciones de  $\text{BaSO}_4$  y se tomó lectura a una longitud de onda de 600 nm en un espectrofotómetro SmartSpec™ Plus Bio-Rad (Reséndiz, 2018).

La curva generada se ve a continuación en la ecuación 2.

$$y = 8 \times 10^{-10} x + 0.0888 \quad (\text{Ec. 2})$$

$$R^2 = 0.993$$

Donde: y representa la absorbancia (abs), x representa la densidad bacteriana (%).

## 7.6 Presencia de azúcares reductores en muestras de paja de trigo tratada con los aislados bacterianos

Se determinaron azúcares reductores por el método de Fehling NMX F-312-1978 en la paja de trigo hidrolizada mediante el tratamiento con los aislados bacterianos. Se seleccionaron 7 aislados de cada grupo productor de celulasas (muy efectivas, medianamente efectivas y poco efectivas) y dos aislados que no presentaron producción de celulasas (ver sección 7.4), se cultivaron en caldo R2B (-) y R2B (+) (modificado con 12% NaCl y pH 8.5); y se incubaron a 35 °C y 100 rpm durante 48 horas en incubadora Thermo SCIENTIFIC

MAXQ 4000. Se prepararon en viales de plástico de 15 mL (triplicados por aislado) 0.2 g peso seco de paja de trigo molido y 4 mL de agua purificada y se esterilizaron a 121 °C durante 15 minutos; estos tubos se identificaron como T<sub>th</sub> (tubo con paja de trigo molida y 4 mL agua purificada). Cada T<sub>th</sub> fue inoculado con un mililitro de alícuota de cada aislado previamente lavado con agua destilada estéril dejándolos libre de medio con nutrientes y ajustado a una turbidez de 1 (sección 8.5) y se utilizaron dos controles sin inóculo: control blanco (T<sub>th</sub> esterilizado) y un control negativo (T<sub>th</sub> sin esterilizar). Los T<sub>th</sub> inoculados y los controles se incubaron durante 7 días a 40 °C y 100 rpm en la incubadora con agitación mencionada anteriormente. Una vez terminado el periodo de incubación, cada T<sub>th</sub> fue agitado vigorosamente y centrifugado a 2400 rpm (velocidad 100) durante 30 min en centrifuga Clay Adams DYNAC. Se extrajo 1 mL de cada T<sub>th</sub> y se depositó en tubos de vidrio con capacidad de 6 ml, a estos tubos se les adicionó 1 mL del reactivo A y 1 mL de reactivo B (Fehling), se agitaron y se coloran a baño María hasta presenciar un cambio de color a rojo ladrillo como prueba positiva para azúcares reductores. En la tabla 12 se muestran los reactivos empleados para preparar el reactivo A y B de Fehling tomado de la norma mexicana NMX F-312-1978 determinación de reductores directos y totales en alimentos.

**Tabla 12. Reactivos empleados para preparar el reactivo A y B del licor de Fehling.**

Licor de Fehling			
Reactivo A		Reactivo B	
Reactivos	Cantidad	Reactivos	Cantidad
Sulfato de cobre penta hidratado. (CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O)	34.639 g	Tartrato de sodio y potasio. (C <sub>4</sub> H <sub>4</sub> KNaO <sub>6</sub> ·4H <sub>2</sub> O)	173 g
Agua destilada	500 mL	Hidróxido de sodio	50 g

## 7.7 Producción de glucosa a partir del pretratamiento de la paja de trigo con los aislados bacterianos

Se realizaron diluciones a partir de una solución de glucosa al 1% (analito). Se disminuyó la concentración de las diluciones 0.1% hasta llegar a 0%. Se tomó 0.5 mL de cada dilución y se depositaron en tubos de ensaye con capacidad de 6 mL, seguido se añadieron 0.5 mL de ácido 3,5 dinitrosalicílico (DNS); previamente preparado (Garriga et al., 2017). Los tubos con cada dilución y reactivo DNS fueron calentados a baño María (100 °C) durante 5 minutos. Pasado el tiempo de calentamiento, se dejaron enfriar a temperatura ambiente. A cada tubo se le añadió 4 mL de agua destilada y se tomó lectura de absorbancia en espectrofotómetro SmartSpec™ Plus Bio-Rad a 575 nm (Darwesh et al., 2020; Sethi et al., 2013). De esta manera se generó una curva de calibración a partir del método de mínimos cuadrados y se generó una ecuación (Ec. 3) que describe la concentración de glucosa con respecto a la absorbancia.

Glucosa (%):

$$y = 1.9691x + 0.0317 \quad (\text{Ec. 3})$$

$$R^2 = 0.9974$$

Donde: y representa la abs, x representa la concentración de glucosa (%).

Empleando la metodología descrita en Garriga et al., 2017 se llevó a cabo la cuantificación de glucosa generada a partir de la paja de trigo tratado con los aislados seleccionados; a diferencia del método de Fehling que es solo para determinar la presencia de azúcares reductores. Se utilizaron cuatro réplicas de  $T_{th}$  por cada aislado. Cada tubo fue inoculado con un 1 mL de alícuota lavado y ajustado a una densidad bacteriana con

absorbancia 1 (aproximadamente  $1.14 \times 10^9$  células/mL). De igual manera se utilizaron dos controles sin inocular: control blanco ( $T_{th}$  esterilizado) y un control negativo ( $T_{th}$  sin esterilizar), también se inoculó un  $T_{th}$  con *S. cerevisiae* con el mismo ajuste de absorbancia donde en varios artículos científicos mencionan que no es capaz de hidrolizar polisacáridos (Kumar y Chandra, 2020; Di Donato et al., 2019; Zhang et al., 2016; Zinnai et al., 2013). Se dejaron incubar 7 días a 40 °C y 100 rpm en incubadora Thermo SCIENTIFIC MAXQ 4000. Una vez terminado el periodo de incubación, cada  $T_{th}$  fue agitado vigorosamente y centrifugado a 2400 rpm en centrifuga Clay Adams DYNAC. En la campana de flujo laminar y condiciones de esterilidad, se extrajeron 0.4 mL de muestra que se depositaron en tubos de ensaye con capacidad de 6 mL, seguido se añadió 0.4 mL de reactivo DNS previamente preparado. Los tubos fueron sometidos a baño María (100 °C) durante 5 minutos, se dejaron enfriar a temperatura ambiente y se adicionaron 3.2 mL de agua destilada, se homogeneizó y se tomó lectura en espectrofotómetro SmartSpec™ Plus Bio-Rad a 575 nm.

#### 7.7.1 Análisis de varianza (ANOVA)

Se realizó el análisis de varianza empleando el software Minitab® 2017, con un nivel de significancia de  $\alpha=0.05$  para comparar los resultados obtenidos.

#### 7.8 Fermentación alcohólica.

Se seleccionaron las muestras de cada aislado que presentaron mayor producción de glucosa. De los  $T_{th}$  analizados en la sección 7.7, se extrajeron 2.5 mL y se depositaron en viales de plástico con capacidad de 15 mL y se inocularon con 1 mL de *S. cerevisiae*. También se incluyeron 2 controles, control positivo; con sobrenadante de  $T_{th}$  sin tratamiento biológico adicionado con 1 mL de la levadura empleada en este trabajo y, un control negativo similar

al control positivo, pero sin levadura. Se dejaron fermentando durante 3 días a 25 °C, 100 rpm. Pasado el periodo de fermentación se procedió a centrifugar las muestras a 2400 rpm en centrifuga Clay Adams DYNAC durante 30 min. Se tomaron 0.4 mL de muestra fermentada para analizarlos con el método DNS y calcular la cantidad de glucosa consumida por la levadura después de la fermentación y obtener el valor teórico de bioetanol en las muestras.

### 7.9 Determinación de fibra cruda de la paja de trigo.

Las pruebas para determinar fibra cruda se realizaron siguiendo la metodología descrita por la norma mexicana NMX F-090-S-1978 para la determinación de fibra cruda en alimentos. Se utilizó la prueba estadística T-Student para determinar la variación entre la harina tratada químicamente y sin tratamiento químico, con un nivel de significancia  $\alpha=0.05$ .

Se pesaron 2 g de paja de trigo molida y se depositó en un matraz Erlenmeyer de 500 mL y se armó el equipo de extracción Soxhlet con 200 mL de ácido sulfúrico ( $H_2SO_4$ ) al 1.25 %. Las muestras se calentaron hasta ebullición y agitación constante en un agitador magnético por 30 minutos. Posteriormente, se filtró la solución con un sistema de filtración haciendo vacío en un matraz Kitasato con embudo Buchner y papel filtro (Whatman #2) con retención de partículas de 8  $\mu m$ . Se realizaron cinco enjuagues con 60 mL de agua destilada caliente hasta alcanzar pH neutro; el pH se midió en el agua tras los enjuagues. Una vez neutralizada la muestra, en el equipo de extracción directa, se añadieron 200 mL de hidróxido de sodio (NaOH) al 1.25 %. Se dejó ebullición durante 30 minutos a agitación constante. En seguida, la solución se filtró en un sistema de filtración, previamente descrito, usando un nuevo papel filtro. Se realizaron cuatro enjuagues con 60 mL de agua destilada caliente hasta alcanzar pH neutro. Finalmente se realizó un enjuague con 60 mL de etanol al 76 %.

Los sólidos retenidos en el filtro se colocaron en un crisol de porcelana y se secaron a 130 °C durante 2 h en una estufa QL 10 Lab Oven y se llevó a peso constante. El peso de las muestras se determinó en una balanza analítica METTLER TOLEDO® modelo ML204/03. Posteriormente, las muestras en los crisoles se colocaron en una mufla Thermolyne ELED FB1410M y se incineraron a 600 °C durante 30 minutos. Las muestras se dejaron enfriar a temperatura ambiente dentro de un desecador y se determinó el peso de las muestras. El contenido de fibra cruda corresponde a la pérdida de peso después de la incineración.

Las muestras fueron evaluadas a partir de la siguiente ecuación

$$\% Fc = \left[ \frac{Ps - Pc}{M} \right] * 100 \quad (\text{Ec. 4})$$

Donde:

Fc= Porcentaje de fibra cruda, Ps = masa en gramos del residuo seco a 130 °C, M = masa de la muestra en gramos, Pc = masa en gramos de las cenizas.

#### 7.10 Determinación de cenizas de la paja de trigo

La determinación de cenizas en las muestras de paja de trigo se realizó con base en la norma mexicana Determinación de cenizas en alimentos NMX F-066-S-1978. Cada prueba se realizó por triplicado. Se utilizó la prueba estadística T-Student para determinar la variación entre la paja de trigo tratada (incinerada) y sin tratar (sin incinerar) con un nivel de significancia  $\alpha=0.05$ .

Se pesaron 3 g (peso seco) de paja de trigo molido en crisoles, en balanza analítica METTLER TOLEDO® modelo ML204/03. Las muestras se llevaron a 600 °C durante 12 horas dentro de una mufla. Pasada el tiempo de calcinación, se pasaron los crisoles a un

dsecador dejándose enfriar y se tomó la lectura del peso final. El porcentaje de cenizas de determinó en base a la ecuación 5:

$$\%C = \left[ \frac{P-p}{M} \right] * 100 \quad (\text{Ec. 5})$$

Donde:

$\%C$  = Porcentaje de cenizas,  $P$  = Masa del crisol con las cenizas en gramos,  $p$  = Masa de crisol vacío en gramos,  $M$  = Masa de la muestra en gramos.

### 7.11 Prueba para identificar microorganismos aerobios facultativos

Los aislados 5.b.3, 5.1.b.1, B.1.M.7, P.3.1.bac1, 5.b.4, 7.b.2, B.2.M.9 y B.2.M.7 fueron sembrados por vaciado en caja; pour-plate method en inglés (Madigan et al., 2015). En 8 viales de plástico de 15 mL, se vertieron 10 mL de caldo de cultivo R2B (Reasoner's 2B de Laboratorios Conda). Se esterilizaron en autoclave a 121 °C durante 15 minutos y después de 24 horas se inoculó un vial con medio de cultivo por cada aislado bacteriano. Se dejaron incubar durante 48 horas a 40 °C y 100 rpm en incubadora Thermo SCIENTIFIC MAXQ 4000. Pasado el periodo de incubación, se prepararon 600 mL de agar R2A (Reasoner's 2A de Laboratorios Conda) y se esterilizó en autoclave en las mismas condiciones. Se dejó enfriar hasta llegar a 50 °C en baño maría. En condiciones de esterilidad se hicieron 3 diluciones (hasta  $1 \times 10^{-3}$ ) con los viales inoculados y se tomaron 100  $\mu\text{L}$  de alícuota de cada dilución y se depositó en el fondo y al centro de cada caja Petri de vidrio de 90 x10 mm. Posteriormente, se vertió el medio de cultivo y se depositó con cuidado sobre el inóculo, se mezcló bien y se dejó solidificar, luego se agregó una capa de medio de cultivo sobre el medio solidificado y se dejó solidificar para después sellarlas e incubarlas a 40 °C en

incubadora ECOSHEL 9052. Una vez notado el crecimiento de colonias se retiraron las cajas.  
Las pruebas se hicieron por triplicado.

## 8. Resultados

### 8.1 Recolección de sustratos

Los residuos de trigo se recolectaron después de la cosecha en parcelas ubicadas en el ejido Islas Agrarias B (Figura 4, izq.). La paja de trigo recolectada fue molida y tamizada en malla de un milímetro.



**Fig. 5. Parcela de trigo postcosecha, los residuos quedan “disponibles” (izquierda). Paja de trigo molida y tamizada con tamaño de partícula de 1mm (derecha).**

### 8.2 Reactivación de microorganismos

El 85.7 % de los aislados bacterianos crecieron en los medios de cultivo utilizados para reactivarlos en un periodo de 2 días; ver tabla 13. Parte de estos microorganismos también han sido estudiados para la identificación en la producción de: auxinas, sideróforos, biosurfactantes y antibióticos por Reséndiz, 2018; Valenzuela Aviles; 2017; Flores Rendón, 2015; López Arreguin, 2015.

**Tabla 13. Aislados reactivados y almacenados en placas Petri de plástico con medio R2A.**

Aislado/Código	Morfología y tinción	Aislado/Código	Morfología y tinción
B.1.M.8	Bacilos Gram +	2.2.b.4	Bacilos Gram +
B.2.M.7	Cocos Gram +	5.1.b.1	Cocos Gram +
E	Bacilos Gram -	9.1.b.1	Cocos Gram +
B.5.M.6	Diplococos Gram +	5.b.4	Coco Gram +
B.1.M.7	Actinomicetos Gram +	5.b.3	Vibrios Gram -
B.2.M.9	Bacilos Gram -	6.2.b.4	Cocos Gram +
B.4.M.7	Actinomiceto Gram +	3.b.2	Cocos Gram -
B.5.M.8	Actinomiceto Gram +	4.2.b.3	Cocos Gram -
Q1	Bacilo Gram +	4.2.b.1	Cocos Gram +
Q2	Cocos Gram +	8.1.b.1	Cocos Gram +
Q4	Bacilos Gram+	P.3.1 bac 1	Cocos Gram -
Q5	Cocos Gram -	6.1.b.1	Cocos Gram -
R3	Cocos Gram +	5.1.b.5	Cocos Gram -
R4	Bacilos Gram +	1.3.b.5	Vibrio Gram +
S1	Bacilos Gram +	7.b.2	Cocos Gram +
S2	Bacilos Gram +	5.1.b.4	Cocos Gram +
S3	Bacilos Gram +	8.1.b.4	Cocos Gram +
P.3.1 bac 2	Cocos Gram -	P.8 bac 2	Bacilos Gram +

\*Gram +: Gram positivos. Gram -: Gram negativos

### 8.3 Determinación del porcentaje de humedad en paja de trigo

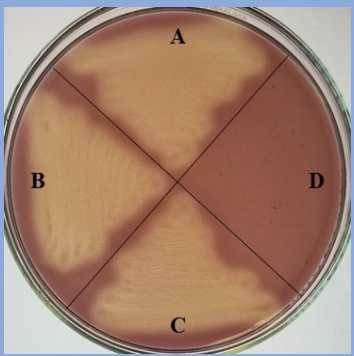
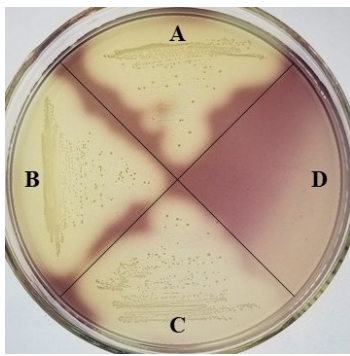
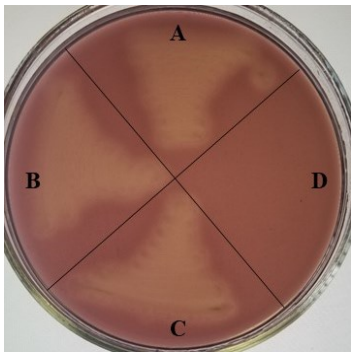
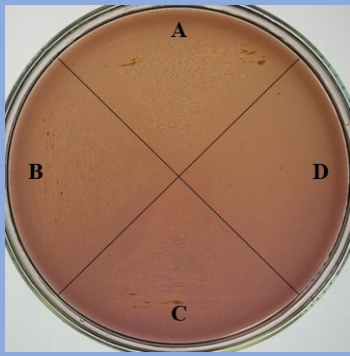
La paja de trigo tuvo un porcentaje de humedad promedio de 3.4587 %  $\pm$  0.0316. La prueba t-student ( $\alpha=0.05$ ), mostró diferencia significativa entre la paja de trigo deshidratada y la paja de trigo sin deshidratar.

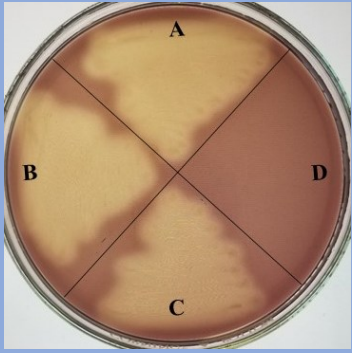
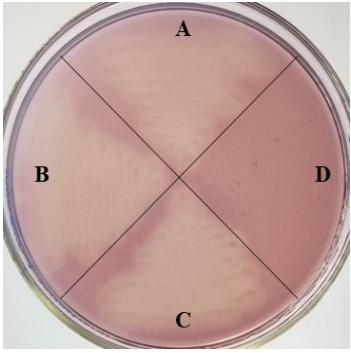
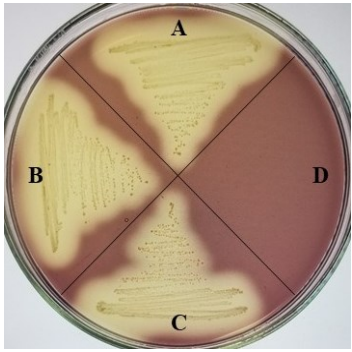
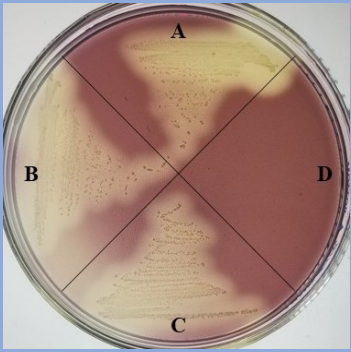
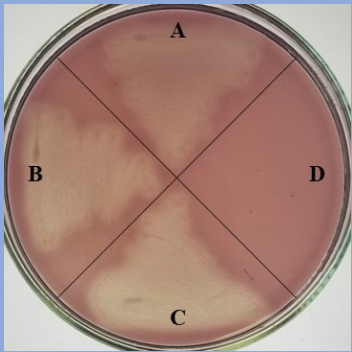
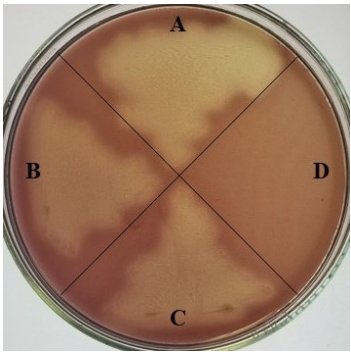
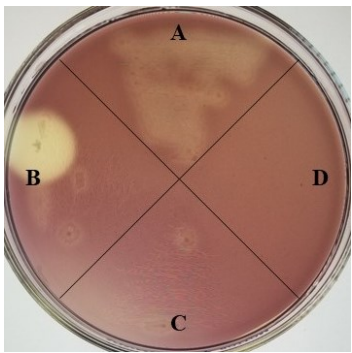
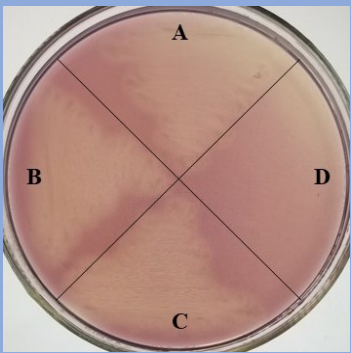
### 8.4 Búsqueda de microorganismos productores de celulasas

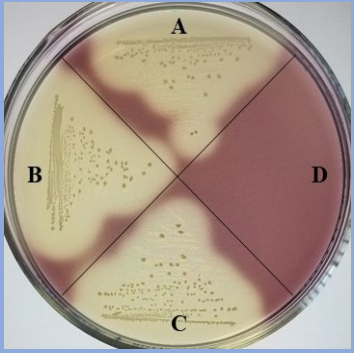
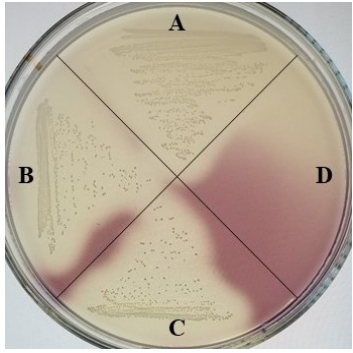
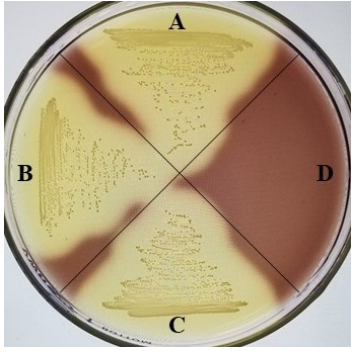
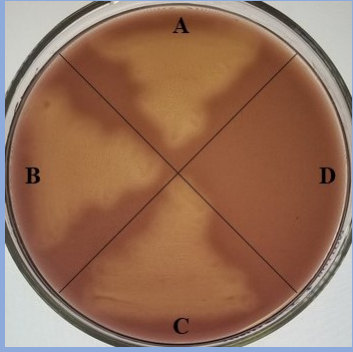
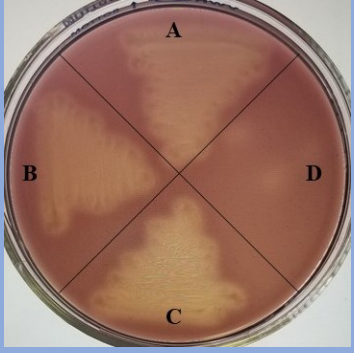
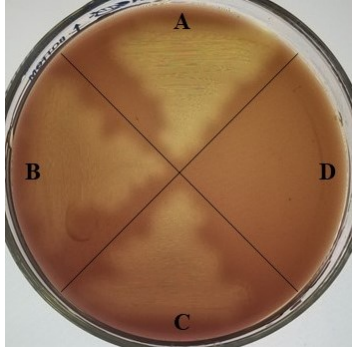
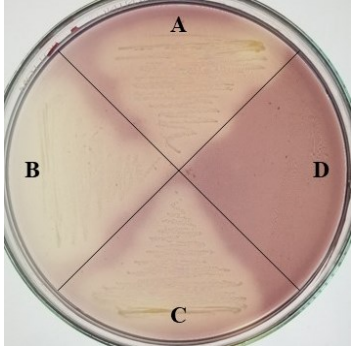
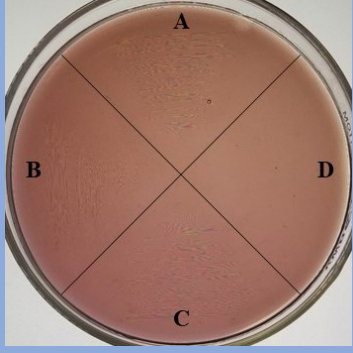
De los 36 aislados bacterianos de la sección 8.2, 34 de ellos (94.4%) produjeron celulasas bajo las condiciones ensayadas (ver tabla 14). Los resultados fueron valorados cualitativamente para clasificar los aislados microbianos según su capacidad para producir celulasas: alta producción (+++), mediana producción (++) y baja producción (+); ver tabla

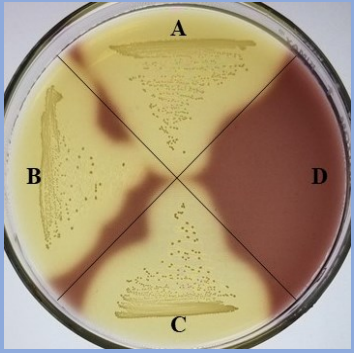
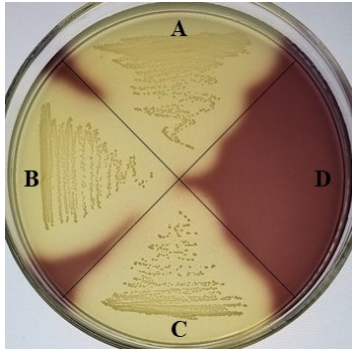
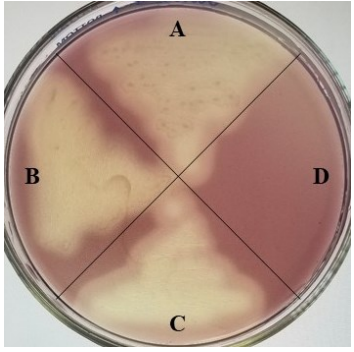
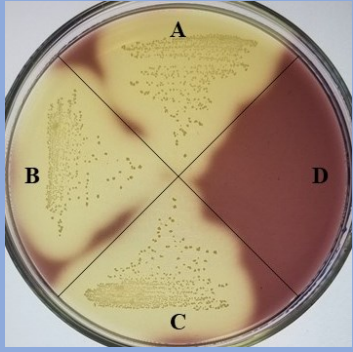
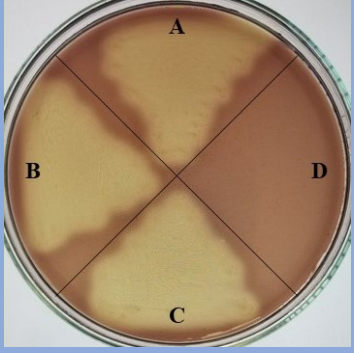
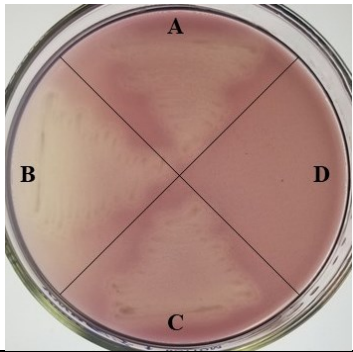
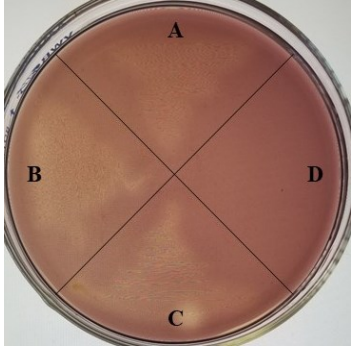
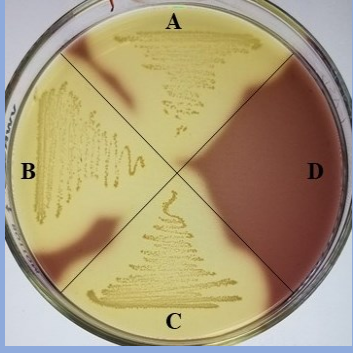
15. De acuerdo con la valoración cualitativa para producción de celulasas, el 33.33 % de los aislados fueron muy efectivos (alta producción); un 25 % de los aislados fueron medianamente efectivos (mediana producción), el 36.11 % de ellas fueron poco efectivas (baja producción) y solo un 5.56 % no presentó decoloración en las zonas estriadas, lo que indica con base en la prueba efectuada que no producen celulasas. Las bacterias con alta producción (+++) presentaron una decoloración total en la zona de crecimiento.

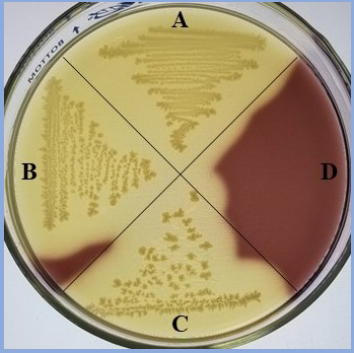
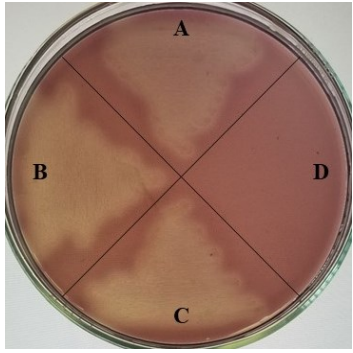
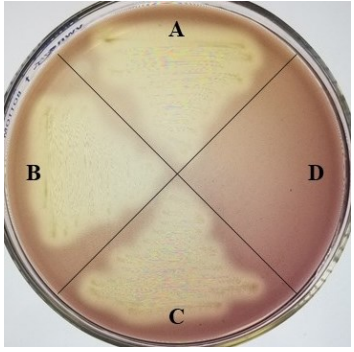
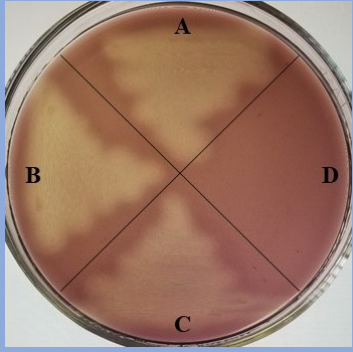
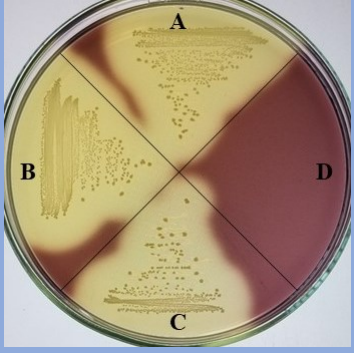
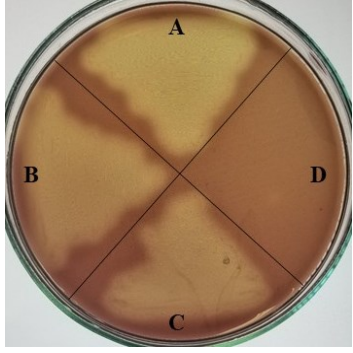
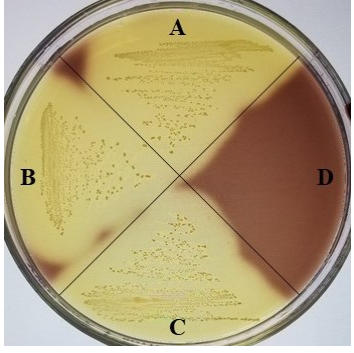
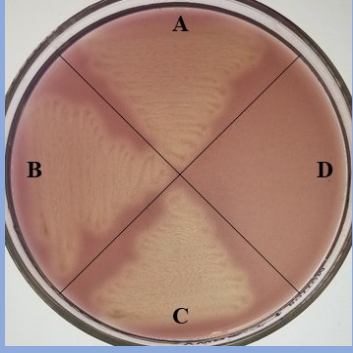
**Tabla 14. Producción de celulasas en medio CMC por los aislados bacterianos. La decoloración indica prueba positiva para la producción de celulasas.**

Grupo	Código	Placa	Grupo	Código	Placa
A	B.1.M.8		H	B.1.M.7	
B	B.2.M.7		L	B.2.M.9	

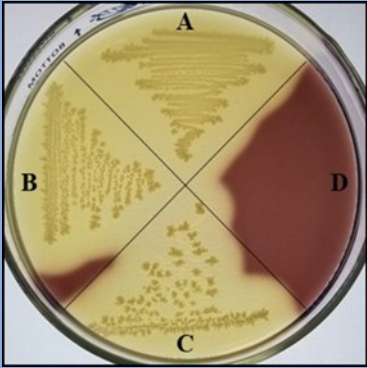
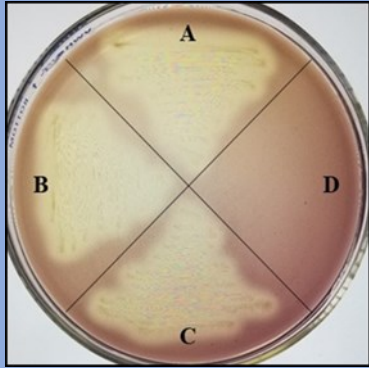
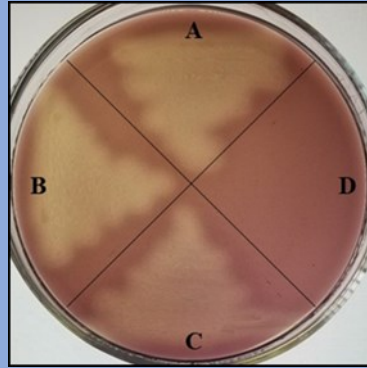
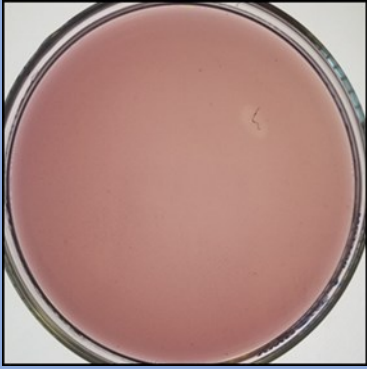


	E		M	B.4.M.7	
G	B.5.M.6		N	B.5.M.8	
	Q1			R3	
	Q2			R4	

	Q4			S1	
	Q5			S2	
	S3		V	2.2.b.4	
I	P.3.1 bac 2		VII	9.1.b.1	

III	5.1.b.1		IX	5.b.4	
IV	P.8bac2		X	5.b.3	
XI	6.2.b.4		XVII	8.1.b.1	
XIV	3.b.2		XVIII	P.3.1bac 1	

XV	4.2.b.3		XX	6.1.b.1	
XVI	4.2.b.1		XXI	5.1.b.5	
XXII	1.3.b.5		XXVIII	5.1.b.4	
XXVI	7.b.2		XXXI	8.1.b.4	

**Tabla 15. Valoración cualitativa en el medio CMC de la producción de celulosas.**

Muy efectivas (+++)	Medianamente efectivas (++)	Poco efectivas (+)
		
Control negativo	Control negativo sin yodo Lugol	Estriado y medio CMC sin yodo Lugol
		

En la tabla 16 se aprecia la valoración cualitativa que recibió cada aislado tras la decoloración que se generaba al reaccionar con el yodo Lugol en base al control negativo mostrado en la tabla 15 y los controles negativos del cuadrante D en las placas estriadas.

**Tabla 16. Valoración cualitativa de cada aislado bacteriano después de 48 h de incubación.**

Aislado	Eficacia/ Producción	Aislado	Eficacia/ Producción
B.1.M.8	++	5.1.b.1	+++
B.2.M.7	+	P.8 bac 2	++
E	++	2.2.b.4	+
B.5.M.6	+++	9.1.b.1	S/P
B.1.M.7	+++	5.b.4	+++
B.2.M.9	S/P	5.b.3	+++
B.4.M.7	+	6.2.b.4	++
B.5.M.8	+	3.b.2	+
Q1	++	4.2.b.3	+++
Q2	++	4.2.b.1	++
Q4	+++	8.1.b.1	+
Q5	+++	P.3.1bac 1	+++
R3	+	6.1.b.1	++
R4	+	5.1.b.5	+
S1	+++	1.3.b.5	+++
S2	+	7.b.2	+++
S3	+	5.1.b.4	++
P.3.1bac 2	++	8.1.b.4	+

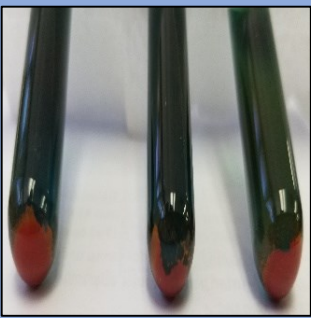


\*Decoloración del medio: (+++) alta producción, (++) mediana producción, (+) baja producción, (S/P) sin producción.

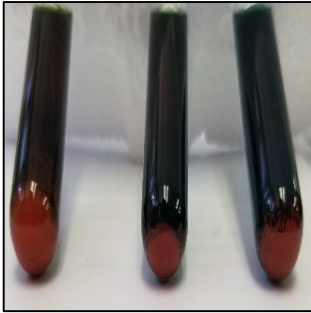
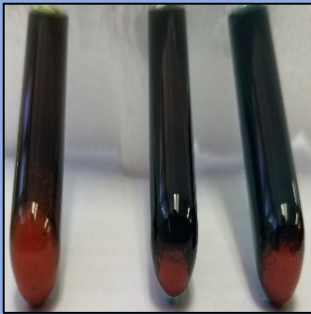
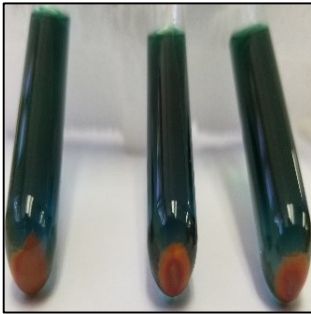
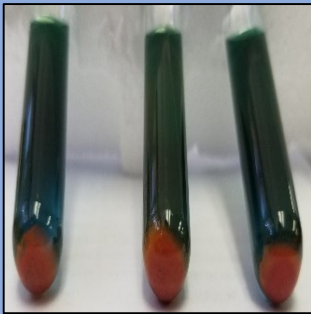
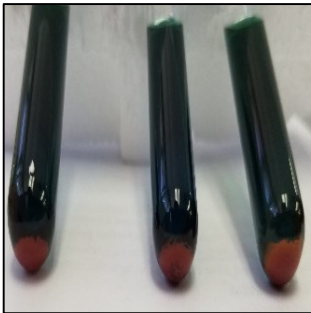
## 8.5 Presencia de azúcares reductores en paja de trigo tratada con los aislados bacterianos



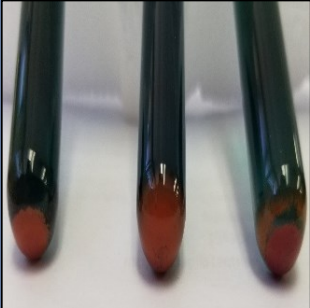

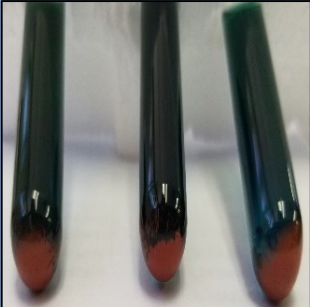
El 100% de los aislados empleados en esta prueba presentaron cambio de color (azul verdoso) y precipitado de óxido de cobre. En la tabla 17, se muestran los resultados obtenidos en la prueba. El T<sub>th</sub> blanco presentó las mismas características, debido a que al ser esterilizado ocurre un pretratamiento térmico lo que libera azúcares reductores presentes en los polisacáridos que componen la paja de trigo (Hosseini et al., 2019; Paudel et al., 2017). Sin embargo, de manera cualitativa se aprecia diferencia en la cantidad de precipitado de óxido


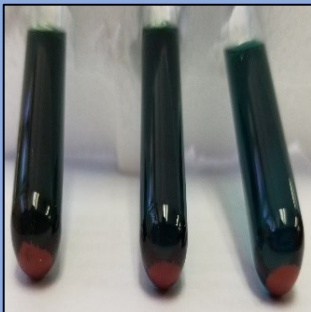
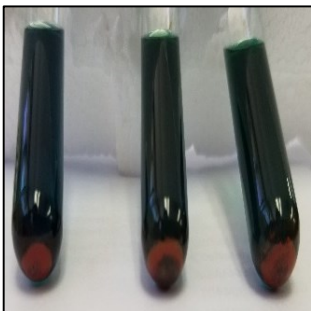
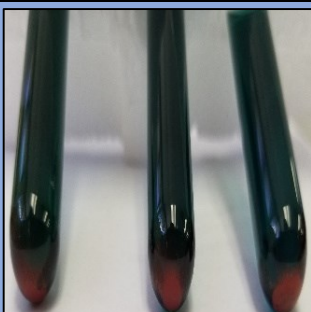

de cobre en algunos aislados contra el control blanco (c. blanco). El control negativo (c. negativo) no presentó precipitado de cobre ni cambio en la coloración.


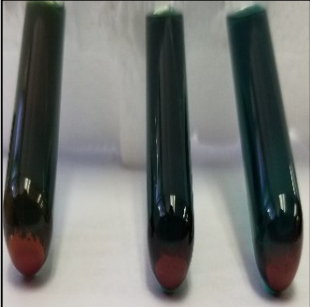
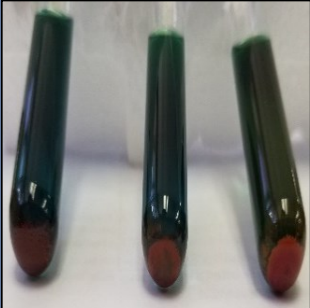


**Tabla 17. Precipitación del óxido de cobre tras reaccionar con el reactivo A y B de Fehling.**

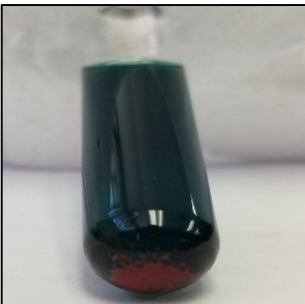
Efectividad	Cepa		Precipitado de cobre = Presencia de azúcares reductores
	Grupo	Código	
+	B	B.2.M.7	
++	E		
+++	G	B.5.M.6	

+++	H	B.1.M.7	
S/P	L	B.2.M.9	
+	N	B.5.M.8	
+		Q2	
+		R3	

+		S2	
++	IV	P.8bac2	
++	V	6.2.b.4	
S/P	VII	9.1.b.1	
+++	IX	5.b.4	

+++	X	5.b.3	
+	XIV	3.b.2	
+++	XV	4.2.b.3	
++	XVI	4.2.b.1	
+	XVII	8.1.b.1	

+++	XVIII	P.3.1bac1	
++	XX	6.1.b.1	
++	A	B.1.M.8	
+++	XXVI	7.b.2	
++	XXVIII	5.1.b.4	

<b>Control blanco</b>	Sobrenadante de paja de trigo sin inocular	
-----------------------	--	--

Debido a que se seleccionaron ciertos aislados de cada grupo productor y no productor de celulasas, no se puede afirmar que todos realizaron una deslignificación y/o hidrolisis en la paja de trigo, debido a que cada tubo fue sometido al tratamiento térmico. Se puede caer en un falso positivo. Es por eso que en la siguiente sección se llevó a cabo la cuantificación de glucosa de los 36 aislados.

### 8.6 Producción de glucosa a partir del pretratamiento de la paja de trigo con los aislados bacterianos

Con base en la ecuación 3, se realizó la conversión de absorbancia (abs) a porcentaje de glucosa y después se convirtió a gramos de glucosa por mililitro ( $\text{g mL}^{-1}$ ) presentes en las muestras tratadas. Los resultados se muestran en la tabla 18. Los resultados se presentan con su valor promedio.

**Tabla 18. Concentración de glucosa en paja de trigo hidrolizada. Los datos son valores promedios ( $n=4$ )  $\pm$  la desviación estándar.**

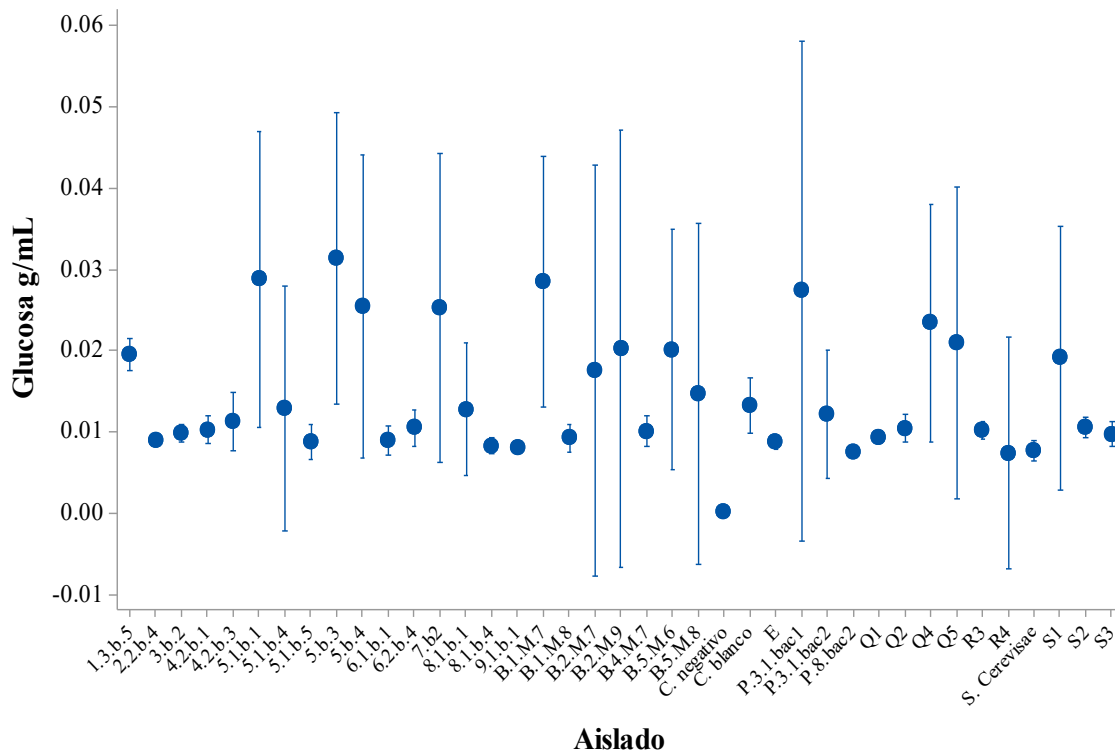
Aislado	abs	Glucosa %	$\text{g}_{\text{glucosa}} \text{mL}^{-1}$	$Y_{\text{pg/s}}$
B.1.M.7	0.591	0.2843	$0.0284 \pm 0.0097$	71%
Q4	0.491	0.2334	$0.0233 \pm 0.0092$	58%
Q5	0.443	0.209	$0.0209 \pm 0.0121$	52%
S1	0.405	0.190	$0.019 \pm 0.0102$	48%
5.1.b.1	0.596	0.287	$0.0287 \pm 0.0114$	72%
5.b.4	0.532	0.2541	$0.0254 \pm 0.0117$	64%
5.b.3	0.647	0.3125	$0.0312 \pm 0.0113$	78%
4.2.b.3	0.252	0.1119	$0.0112 \pm 0.0023$	28%

P.3.1bac1	0.568	0.2727	0.0273 ± 0.0193	68%
1.3.b.5	0.416	0.1953	0.0195 ± 0.0012	49%
7.b.2	0.526	0.2514	0.0251 ± 0.0119	63%
B.1.M.8	0.212	0.0916	0.0092 ± 0.0011	23%
E	0.201	0.0861	0.0086 ± 0.0005	22%
Q1	0.214	0.093	0.0093 ± 0.0004	23%
6.2.b.4	0.236	0.104	0.0104 ± 0.0014	26%
4.2.b.1	0.231	0.1016	0.0102 ± 0.0011	26%
P.3.1.bac2	0.270	0.1208	0.0121 ± 0.0050	30%
B.5.M.6	0.425	0.1999	0.020 ± 0.0093	50%
6.1.b.1	0.204	0.0879	0.0088 ± 0.0011	22%
5.1.b.4	0.282	0.1275	0.0127 ± 0.0095	32%
8.1.b.4	0.193	0.0823	0.0082 ± 0.0006	21%
B.2.M.9	0.428	0.2014	0.0201 ± 0.0169	50%
9.1.b.1	0.188	0.0795	0.008 ± 0.0005	20%
<i>S. cerevisiae</i>	0.182	0.0766	0.0077 ± 0.0008	19%
P.8.bac. 2	0.178	0.0746	0.0075 ± 0.0004	19%
Q2	0.235	0.1034	0.0103 ± 0.0011	26%
R3	0.23	0.1007	0.0101 ± 0.0007	25%
S2	0.237	0.1045	0.0105 ± 0.0008	26%
3.b.2	0.223	0.0972	0.0097 ± 0.0007	24%
8.1.b.1	0.43	0.2027	0.0203 ± 0.0203	51%
B.5.M.8	0.317	0.1453	0.0145 ± 0.0132	36%
B.2.M.7	0.376	0.1751	0.0175 ± 0.0159	44%
B.4.M.7	0.227	0.0994	0.0099 ± 0.0012	25%
S3	0.222	0.0966	0.0097 ± 0.0010	24%
2.2.b.4	0.207	0.0892	0.0089 ± 0.0004	22%
5.1.b.5	0.201	0.0864	0.0086 ± 0.0014	22%
R4	0.046	0.0073	0.0007 ± 0.0016	2%
C. blanco	0.291	0.0131	0.0132 ± 0.0022	33%
C. negativo	0.000	0.000	0.0000	--

$Y_{pg/s}$ : Rendimiento entre producto (glucosa) y sustrato (paja de trigo).

Los valores de gramo de glucosa por mililitro ( $g_{glucosa} mL^{-1}$ ) fueron graficados en la figura 6 y representan con un punto azul las medias de glucosa ( $g_{glucosa} mL^{-1}$ ) y su desviación estándar. Los aislados bacterianos que presentaron una alta producción de celulasas son los que tuvieron las mayores medias y presentaron los intervalos más pronunciados: 5.b.3, 5.1.b.1, B.1.M.7, P.3.1.bac1, 5.b.4, 7.b.2, Q4, Q5, B.5.M.6, 1.3.b.5 y S1. Solo el aislado

P.3.1bac1 presentó el intervalo más pronunciado (0.0193). Los aislados B.2.M.7 y B.5.M.8 que pertenecen al grupo de los poco efectivos en la producción de celulasas, resultaron con medias sin diferencia significativa comparadas contra el valor de la media más alta (5.b.3). Se realizó una comparación múltiple de medias con el método de Dunnett tomando como control el aislado 5.b.3, los resultados de este análisis se muestran en la figura 9. El aislado B.2.M.9, que no produjo celulasas (S/P), resultó liberar cantidades de glucosa similares a los aislados que ya se mencionaron.



**Fig. 6. Generación de glucosa por aislados bacterianos a partir de paja de trigo. Los puntos azules representan la media de cada aislado (n=4) y la línea vertical representan la desviación estándar.**

### 8.6.1 Análisis de varianza (ANOVA)

El análisis, con una hipótesis nula donde todas las medias son iguales, arrojó que las medias eran diferentes entre sí, con un valor-p de 0.00.

### 8.6.2 Comparación múltiple de medias contra un control (Dunnett)

La prueba de Dunnett compara de manera individual cada media de los resultados contra una media control establecida. Con un nivel de significancia de  $\alpha=0.05$ , y tomando como control al c. blanco, la prueba arroja que solo un aislado bacteriano (5.b.3) presentó diferencia significativa contra el control blanco. En la figura 7 se muestra como el aislado 5.b.3, está desplazado hacia la derecha fuera del nivel del control (línea verde punteada), siendo el que más glucosa produce.

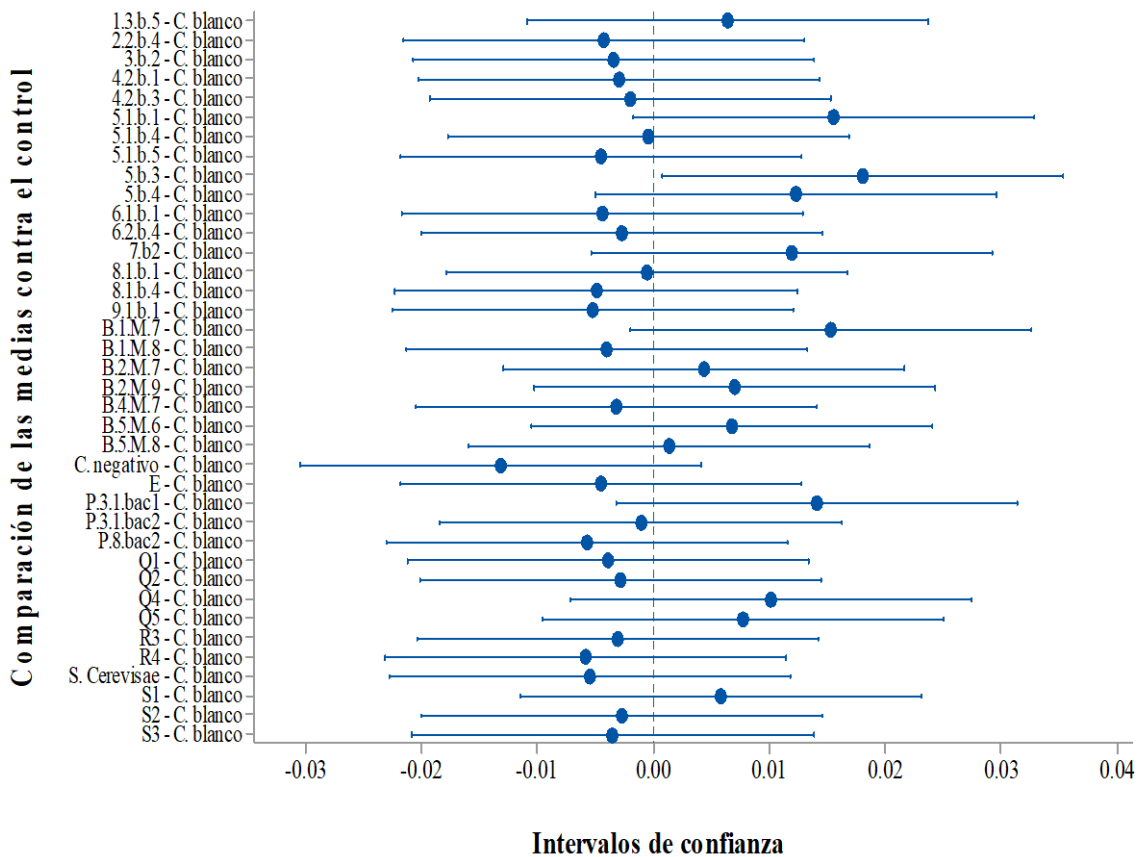
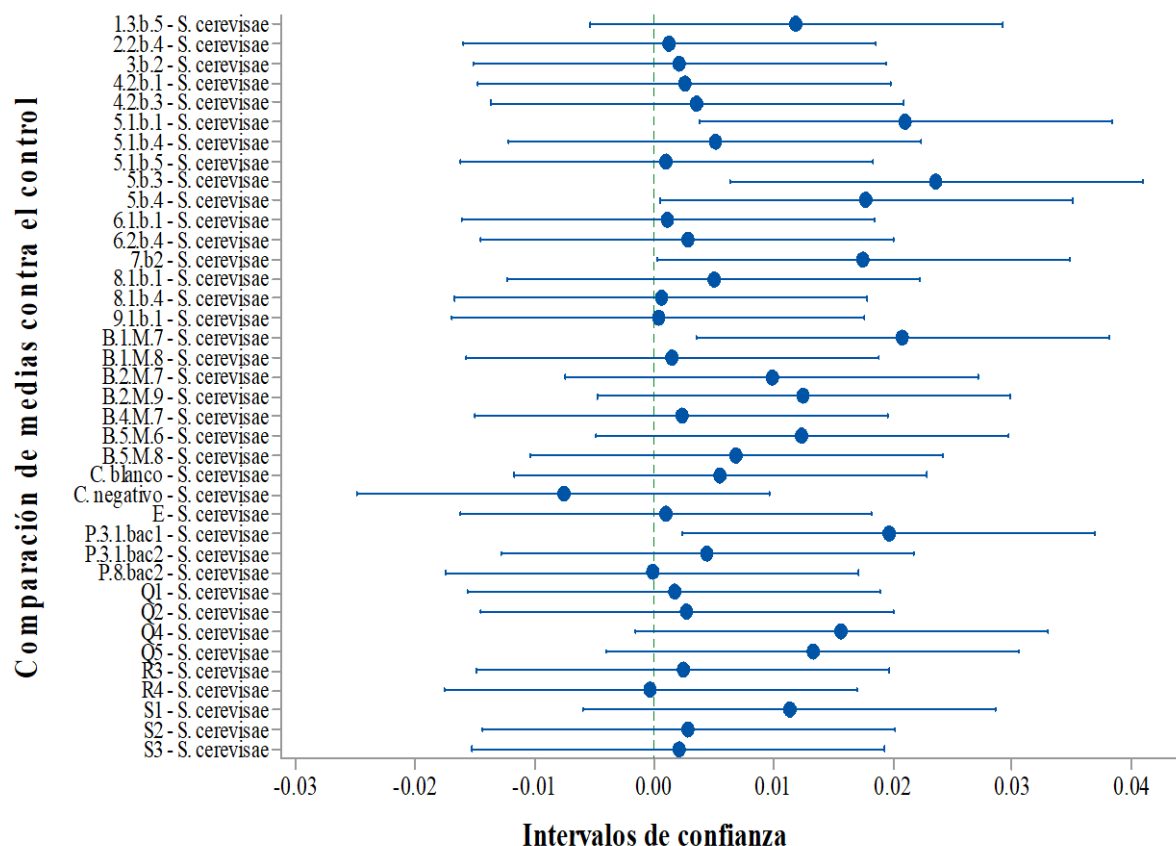


Fig. 7. Comparación de medias contra el grupo control. El 0.00 (línea verde vertical punteada) marca el valor del control usado (c. blanco).

Existe una diferencia del 57.82% entre el aislado 5.b.3 y en control blanco, el aislado 5.1.b.1 que presenta la segunda media más alta (0.0287; tabla 18, figura 6) tiene una

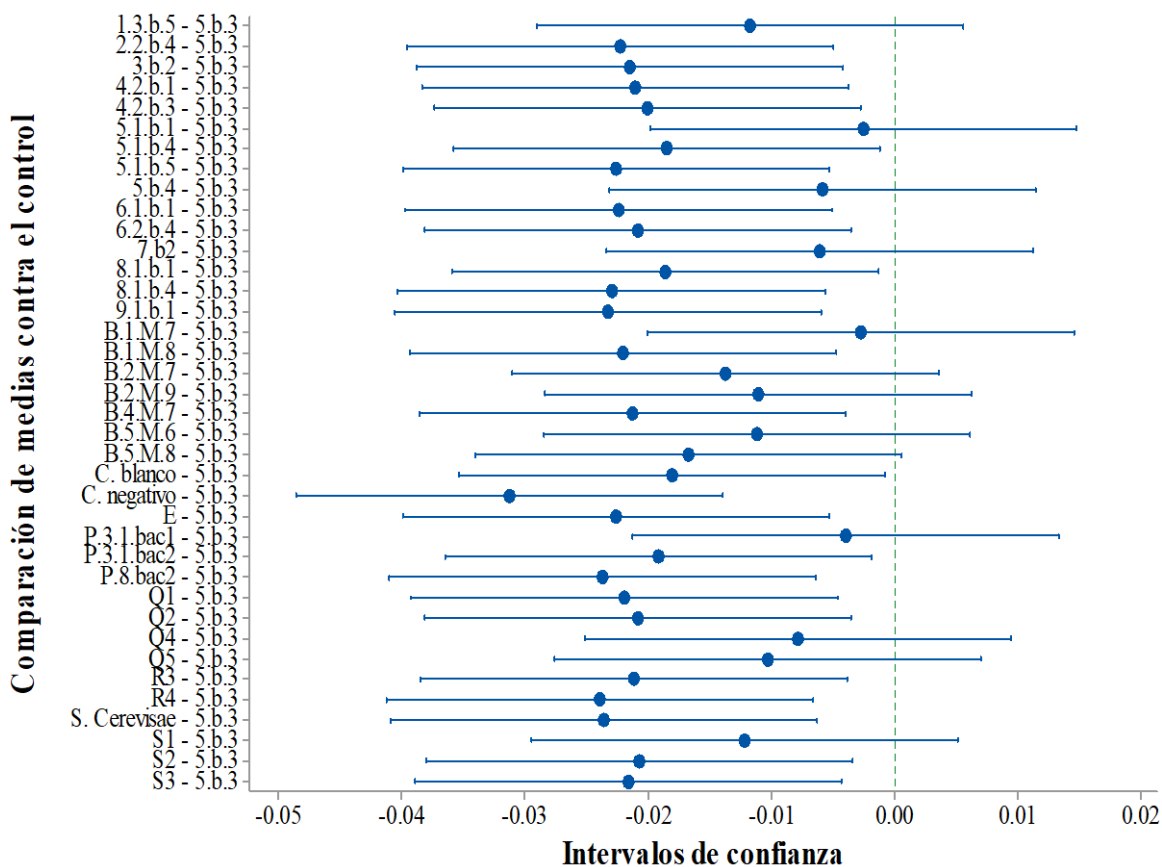
diferencia del 54.00% y no presenta diferencia significativa a pesar de superar con un poco más de la mitad la cantidad de glucosa presente en el control blanco.



**Fig. 8. Comparación de medias contra el grupo control. El 0.00 (línea verde vertical punteada) marca el valor del nivel del control usado (*S. cerevisiae*).**

En la figura 8, se aplicó el método de Dunnett, pero esta vez, el grupo control fue la levadura *S. cerevisiae*. En este caso, la cantidad de glucosa tendió a reducirse, debido a que este microorganismo se alimenta de hexosas, es por eso que el T<sub>th</sub> usado como control blanco tiene una mayor cantidad de glucosa presente que el tratado con la levadura. El 83.33% de los aislados bacterianos no presentó una diferencia significativa contra la *S. cerevisiae*, al contrario, presentaron un comportamiento similar al solo alimentarse de los azúcares disponibles tras la esterilización de los T<sub>th</sub>.

Solo los aislados 5.b.3, 5.1.b.1, B.1.M.7, P.3.1.bac1, 5.b.4 y 7.b.2 presentaron diferencia significativa contra la *S. cerevisiae* (los aislados se encuentran desplazados a la derecha, y sus intervalos de confianza no se intersectan con el nivel del control; ver figura 8), estos aislados (como ya se mencionó) fueron los que tuvieron la mayor producción de celulasas, además de mostrar la capacidad de deslignificar e hidrolizar la paja de trigo.



**Fig. 9. Comparación de medias contra el grupo control. El 0.00 (línea verde vertical punteada) marca el valor del nivel del control usado (5.b.3).**

En la figura 9, se realizó comparación de Dunnett con otro grupo control, esta vez, se seleccionó el aislado 5.b.3 para identificar cuales aislados bacterianos presentaban diferencia significativa. En esta comparación, el 36.11% de los aislados bacterianos no presentaron dicha diferencia debido a que intersectan el nivel de control (línea verde vertical punteada, figura 9), esto quiere decir que no presentan diferencia significativa con el control

establecido. Las intersecciones están representadas por los aislados 5.1.b.1, B.1.M.7, P.3.1.bac1, 5.b.4, 7.b.2, Q4, Q5, B.2.M.9, B.5.M.6, 1.3.b.5, S1, B.2.M.7 y B.5.M.8; mismos que en la gráfica de intervalos (figura 6) poseen la mayor producción de glucosa ( $\text{g mL}^{-1}$ ) por encima del control. A pesar de que ciertos aislados poseen diferencia significativa con los controles establecidos (fig. 7 y 8), donde se busca aquellos con el mejor desempeño, en la gráfica de la figura 9 se destacan aquellos que tuvieron un desempeño similar al aislado 5.b.3.

### 8.7 Fermentación alcohólica

Los aislados que generaron la mayor producción de glucosa se presentan en la tabla 19, donde se aprecia la cantidad de glucosa presente después de la fermentación, el control negativo (C. negativo) debido a que no fue inoculado con levadura presenta el mismo valor antes y después de la fermentación.

**Tabla 19. Glucosa presente en los  $T_{th}$  después de la fermentación. Los datos son valores promedios ( $n=4$ )  $\pm$  la desviación estándar;  $\sigma$**

Aislado	g glucosa $\text{mL}^{-1}$
5.1.b.1	$0.0112 \pm 0.0021$
5.b.3	$0.0097 \pm 0.0028$
P.3.1bac1	$0.0091 \pm 0.0028$
B.1.M.7	$0.0086 \pm 0.0008$
Q4	$0.0118 \pm 0.0025$
7.b.2	$0.0098 \pm 0.0045$
C. positivo	$0.0062 \pm 0.0030$
C. negativo	$0.0132 \pm 0.0022$

En la tabla 20 se muestra el consumo de glucosa por la *S. cerevisiae*. La glucosa inicial se obtuvo después de pretratamiento biológico con los aislados bacterianos y la glucosa final es la que se obtuvo después de la fermentación con la levadura. La diferencia obtenida está en el consumo de glucosa; ver tabla 20. Donde los tratamientos con el aislado 5.b.3 es donde ocurrió 69% de consumo de glucosa, siendo el de mayor consumo a diferencia del tratamiento

con el aislado Q4, quien presentó un menor consumo (49%) incluso por debajo del control positivo (C. positivo). Los resultados del control negativo (C. negativo) no cambiaron ya que no fueron inoculados con levadura.

**Tabla 20: Glucosa consumida por *S. cerevisiae*.**

Aislado	Glucosa inicial (g mL <sup>-1</sup> )	Glucosa final (g mL <sup>-1</sup> )	*Consumo de glucosa (g mL <sup>-1</sup> )	Relación de consumo
5.1.b.1	0.0287	0.0112	0.0175	61%
5.b.3	0.0312	0.0097	0.0215	69%
P.3.1bac1	0.0273	0.0091	0.0182	67%
B.1.M.7	0.0284	0.0086	0.0198	70%
Q4	0.0233	0.0118	0.0115	49%
7.b.2	0.0251	0.0098	0.0153	61%
C. positivo	0.0132	0.0062	0.0070	53%
C. negativo	0.0132	0.0132	0.0000	--

\*El consumo de glucosa refiere a la cantidad de glucosa metabolizada por la levadura *S. cerevisiae*.

El porcentaje teórico de conversión de glucosa a etanol es de 52.26%, con base en los resultados del consumo de glucosa, se puede inferir que el producto consumido sufrió una transformación debido al metabolismo de *S. cerevisiae* (tabla 21), donde, el mayor rendimiento (expresado como  $Y_{pb/s}$ ) en la producción de bioetanol a partir de 0.02 g de paja en un  $T_{th}$  pertenece al aislado 5.b.3 con 14% de conversión de paja de trigo a bioalcohol.

**Tabla 21. Bioetanol teórico obtenido con base la glucosa consumida por la levadura.**

Aislado	Consumo de glucosa (mg)	Bioetanol teórico (mg)	Bioetanol teórico (mL)	$Y_{pb/s}$
5.1.b.1	43.75	22.86	0.0290	11%
5.b.3	53.68	28.05	0.0356	14%
P.3.1bac1	45.49	23.77	0.0301	12%
B.1.M.7	49.41	25.82	0.0327	13%
Q4	28.82	15.06	0.0191	8%
7.b.2	38.18	19.95	0.0253	10%
C. positivo	17.57	9.18	0.0116	5%
C. negativo	0.0000	0.000	--	--

$Y_{pb/s}$ : Rendimiento entre producto (bioetanol) y sustrato (paja de trigo).

En la tabla 21, el consumo de glucosa se convirtió a miligramos a partir de los 2.5 mL extraídos de los T<sub>th</sub> tratados. A pesar de que el tratamiento con el aislado Q4 haya tenido una relación de consumo más bajo de glucosa por parte de la levadura (ver tabla 20), tuvo un mayor rendimiento con respecto a producción de bioetanol. Al contrario del tratamiento con el aislado 5.b.3, que tuvo una relación de consumo alto (tabla 20) junto con el rendimiento más alto después de la fermentación, seguido y a la par, le sigue el tratamiento con el aislado B.1.M.7, teniendo la relación de consumo más alta y el segundo rendimiento más alto (tabla 20 y 21 consecutivamente).

### 8.8 Determinación de fibra cruda

La paja de trigo tuvo un porcentaje promedio de fibra cruda de 21.67 % ± 0.0007, cercanos a los resultados de Vadivel et al., 2017 con 16.91 % ± 2.72, donde trabajaron con la misma especie de *Triticum aestivum*, sin embargo, el método ácido y alcalino empleado difirió durante la digestión acida que se realizó en este trabajo, pudiendo ser una variante en los resultados obtenidos.

### 8.9 Determinación de cenizas

La paja de trigo tuvo un porcentaje promedio de cenizas de 10.44 % ± 0.0005. Los resultados de metodología empleada para determinar cenizas se muestran en la tabla 22.

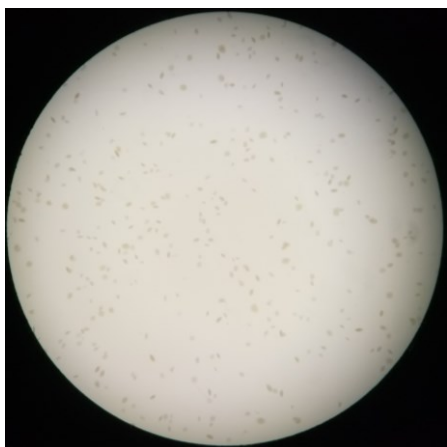
**Tabla 22. Resultados del análisis de cenizas en la paja de trigo**

Crisol con cenizas (g)		
32.7485	34.3008	34.0359
Crisol sin cenizas (g)		
32.4342	33.9867	33.7243
Cenizas		
10.47%	10.47%	10.38%

El valor está por debajo de los resultados de Montero et al., 2016 con 17.04 % de cenizas, y mayores a los de García et al., 2014 con 4.57 % y McKendry, 2002 con 7.10 %. Los resultados de McKendry, 2002 son los más cercanos a los obtenidos en esta investigación, pudiendo diferir debido a las muestras de paja de trigo presentes en Oviedo, España empleadas en su investigación.

#### 8.10 Prueba para detectar microorganismos aerobios facultativos

Los aislados bacterianos sometidos a la prueba presentaron crecimiento en un periodo de menos de 24 horas, un comportamiento similar con respecto a su crecimiento en presencia de oxígeno. El propósito de esta prueba fue comprobar que estos aislados pudieran crecer en ausencia de oxígeno y su capacidad de producir enzimas capaces de destruir subproductos como el anión súper oxido ( $O_2^-$ ), radical hidroxilo ( $OH^-$ ) y/o peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), grupos funcionales presentes en las cadenas de lignina. En la fig. 10, se puede observar el crecimiento de colonias del aislado 5.b.3.



**Fig. 10. Crecimiento de colonias en ausencia de oxígeno después de 18 horas. Aislado 5.b.3**

## 9. Discusión de resultados

Al comenzar las pruebas de esta investigación tras reactivar los microorganismos, se tuvo que buscar aquellos capaces de producir celulasas, debido a que es el compuesto principal en la paja de trigo. Los aislados con más alto desempeño y prometedores para obtener mejores rendimientos al tratar la paja de trigo fueron: 5.1.b.1, B.5.M.6, B.1.M.7, 5.b.4, 5.b.3, 4.2.b.3, Q4, Q5, P.3.1bac1, S1, 1.3.b.5, 7.b.2, ya que tuvieron la mayor decoloración tras reaccionar con el yodo Lugol en las pruebas con CMC. También hubo aquellos que no presentaron decoloración como los aislados 9.1.b.1y B.2.M.9.

Para detectar la presencia de azúcares reductores y entender el comportamiento que podrían tener los aislados al intentar procesar la paja de trigo, se empleó el licor de Fehling (sección 8.5) después de tratar la paja de trigo. Aunque todos los tratamientos con los aislados bacterianos resultaron positivos, no significó que hubiera un metabolismo de la paja de trigo, ya que durante la esterilización se desprenden azúcares reductores, pues el control negativo empleado resultó con precipitados de cobre. Ante esta situación, se empleó el método DNS cuantificando la glucosa (sección 8.6).

Con base en los resultados obtenidos en la prueba DNS, el análisis estadístico de Dunnett arrojó como tratamiento sobresaliente en producción de glucosa a partir de la paja de trigo como pretratamiento fue el del aislado 5.b.3 con una media de producción de glucosa de  $0.0313 \text{ g mL}^{-1}$  y fue el único tratamiento que tuvo diferencia significativa contra el control blanco ( $0.0132 \text{ g mL}^{-1}$ ) superándolo en más del 50%. El control blanco, siendo un  $T_{th}$  sin inocular, solamente fue esterilizado y, por consiguiente, al haber pasado por un tratamiento térmico, liberó azúcares reductores (sección 8.5). Este control fue empleado como estándar a superar, ya que pasa por un tratamiento fisicoquímico e indirectamente crea una

comparación contra un tratamiento biológico. El aislado 5.b.3 además de producir celulasas, podría tener la capacidad de producir enzimas deslignificadoras pudiendo penetrar hacia el interior de las cadenas internas y así hidrolizar la celulosa y hemicelulosa (fig. 3) de la paja de trigo.

La tabla 23 representa un resumen de las figuras 7, 8 y 9. Se presentan 3 columnas particulares, donde en el primer renglón (C. blanco, *S. cerevisiae* y 5.b.3) muestra los controles estadísticos empleados durante el análisis de Dunnett, y continuando hacia abajo, muestra los aislados que tuvieron diferencia significativa. Las columnas de la derecha muestran los valores de efectividad, producción media de glucosa.

**Tabla 23. Resumen de las pruebas de Dunnett**

	<b>C. blanco (Fig. 7)</b>	<b><i>S. cerevisiae</i> (Fig. 8)</b>	<b>5.b.3 (Fig. 9)</b>	<b>Efectividad*</b>	<b>Glucosa (g mL<sup>-1</sup>)</b>
Aislados	5.b.3	5.b.3	N/A	+++	0.0313 ± 0.0113
		5.1.b.1	5.1.b.1	+++	0.0287 ± 0.0114
		B.1.M.7	B.1.M.7	+++	0.0284 ± 0.0097
		P.3.1.bac1	P.3.1.bac1	+++	0.0273 ± 0.0193
		5.b.4	5.b.4	+++	0.0254 ± 0.0117
		7.b.2	7.b.2	+++	0.0251 ± 0.0119
			Q4	+++	0.0233 ± 0.0092
			Q5	+++	0.0209 ± 0.0121
			B.2.M.9	S/P	0.0201 ± 0.0169
			B.5.M.6	+++	0.0200 ± 0.0093
			1.3.b.5	+++	0.0195 ± 0.0012
			S1	+++	0.0190 ± 0.0102
			B.2.M.7	+	0.0175 ± 0.0159
			B.5.M.8	+	0.0145 ± 0.0132

\*Efectividad establecida cualitativamente en las pruebas con CMC (sección 8.4, tabla 15).

N/A: No aplica comparar 5.b.3 con ella misma.

Se esperaba que los tratamientos de los aislados que fueron valorados medianamente efectivos (sección 8.5) tuvieran un mejor rendimiento produciendo glucosa, sin embargo, tuvieron resultados por debajo del control blanco.

Hubo 13 aislados que no presentaron diferencia significativa en la producción de glucosa usando como control de medias al aislado 5.b.3; tercera columna tabla 23. No indica que sus rendimientos superen al control blanco, pero indican una capacidad hidrolítica similar entre aislados. Sin embargo, al comparar los aislados con un microorganismo (*S. cerevisiae*) que no tiene la capacidad de deslignificar e hidrolizar los componentes de la paja de trigo como control estadístico (segunda columna, tabla 23), resultó que seis aislados presentaron ser superiores estadísticamente a la levadura, y cabe mencionar que son del grupo de los más efectivos en producir celulasas. La primera columna muestra al único aislado que superó al control blanco.

En el tratamiento con el aislado B.2.M.9 se produjo una cantidad significativa de  $0.0201 \text{ g mL}^{-1}$  de glucosa, siendo que en la prueba de producción de celulasas (sección 8.4) fue evaluado negativamente debido a que no produjo celulasas durante la prueba. Pero cabe recordar que estos microorganismos pertenecen al grupo de los extremófilos y también es aerobio facultativo. Debido a la presencia de grupos hidroxilo en la lignocelulosa y los subproductos derivados de ella: furfural, 5-hidroximetil-2-furaldehído (HMF), hidroxibenzaldehído y ácido acético y el estar en un medio que se “vuelve anóxico” en el  $T_{th}$ , es probable la generación de enzimas como superóxido dismutasa y catalasas (Madigan et al., 2015), esto para eliminar los radicales presentes en el medio de los  $T_{th}$  durante el pretratamiento. Esto infiere que el aislado B.2.M.9, al ser aerobio facultativo, produjo alguna de estas enzimas para hacer menos tóxico el medio en donde se encuentra y de esta manera deslignificar e hidrolizar la paja de trigo. Incluso, los aislados 5.b.3, 5.1.b.1, B.1.M.7, P.3.1.bac1, 5.b.4 y 7.b.2 al ser aerobios facultativos, también los hace candidatos a producir estas enzimas y más capaces que B.2.M.9.

Saha et al., 2016 empleó hongos basidiomicetos y rastrojo de maíz como sustrato, su mejor resultado fue el *Cyathus stercoreus* NRRL-6573 con una producción de glucosa de 304 mg g<sup>-1</sup> de rastrojo de maíz tratado (con un rendimiento del 64 %). Esto después de 30 días de pretratamiento biológico (con hongos), además de una hidrólisis enzimática (coctel de enzimas comerciales), comparado con los resultados de esta investigación, se obtuvo un rendimiento de producción de glucosa del 78% en 7 días con el aislado 5.b.3. Los estudios de Potumarthi et al., 2013; similar a la metodología de Saha et al., 2016, usaron otro hongo basidiomiceto; *Phanerochete chrysosporium* NCIM 1106 y cáscara de arroz (la composición química de los diferentes rastrojos: trigo, arroz, maíz son similares y se muestran en la tabla 24) obtuvieron una cantidad 895.9 mg mL<sup>-1</sup> de azúcares reductores por cada 2 g de cáscara de arroz (resultados obtenidos con el método DNS) después de 18 días de tratamiento, con un rendimiento del 44.75%. Otros resultados usaron la biodeslignificación y sacarificación simultánea de paja de arroz con el hongo *Trichoderma viride* sp. inmovilizado en perlas de alginato de calcio y un coctel enzimático de celulasas, produciendo 8.52 g L<sup>-1</sup> de glucosa a partir de 4 g de paja de arroz después de 10 días (Karimi et al., 2017), con un rendimiento del 81% de conversión a glucosa, superando al del aislado 5.b.3, sin embargo, en los resultados de Karimi et al. 2017 se usaron dos procesos semi simultáneos, sin mencionar los 3 días extra del proceso de hidrolisis con enzimas comerciales, en cambio el tratamiento con el aislado 5.b.3 fue corrido, con los microorganismos libres por el medio y un menor periodo. Incluso los resultados del tratamiento químico ácido fosfórico más peróxido de hidrógeno usado en la investigación de Qiu et al., 2017, obtuvieron una producción de glucosa de 299 mg g<sup>-1</sup> de paja de trigo después de 3 días a partir de 10 gramos; con un 29.9% de conversión, un bajo rendimiento pero en menor tiempo.

**Tabla 24. Composición química de diferentes materiales lignocelulósicos.**

Desechos	Celulosa %	Hemicelulosa %	Lignina %
<b>Trigo</b>	35-45 <sup>1,2</sup> , 37-41 <sup>3</sup> , 33-38 <sup>4</sup>	20-30 <sup>1,2</sup> , 27-32 <sup>3</sup> , 26-32 <sup>4</sup>	8-15 <sup>1,2</sup> , 13-15 <sup>3</sup> , 17-19 <sup>4</sup>
<b>Arroz</b>	32-47 <sup>1</sup> , 28-36 <sup>4</sup>	19-27 <sup>1</sup> , 23-28 <sup>4</sup>	5-24 <sup>1</sup> , 12-14 <sup>4</sup>
<b>Maíz</b>	42.6 <sup>1</sup> , 39-47 <sup>3</sup> , 38-40 <sup>4</sup> , 36.3 <sup>5</sup>	21.3 <sup>1</sup> , 26-31 <sup>3</sup> , 24-26 <sup>4</sup> , 31.4 <sup>5</sup>	8.2 <sup>1</sup> , 3-5 <sup>3</sup> , 7-19 <sup>4</sup> , 17.2 <sup>5</sup>

1: (Sarkar et al., 2012), 2: (Qiu et al., 2017), 3: (Balat, 2011), 4: (Zabed et al., 2017), 5: (Saha et al., 2016).

Los tratamientos con los aislados que superaron al control blanco pueden presentar una ventaja produciendo enzimas específicas similares a las que producen algunos hongos con capacidad deslignificadora, presentan rápida respuesta adaptándose a un medio con nutrientes difíciles de convertir en energía y al tener una baja disponibilidad de glucosa los obliga a buscar nuevas fuentes de energía, como mencionaron Potumarthi et al., 2013, el *P. chrysosporium* consumió los azúcares disponibles después del día 20 y disminuyó la producción de celulasas y xilanasas.

La manera en que algunos aislados bacterianos se adaptan a un medio con bajas fuentes de energía se evidencia cuando se somete la *S. cerevisiae* contra un T<sub>th</sub> esterilizado y sin tratamiento biológico, siendo el control positivo en la prueba de fermentación. Los sobrenadantes extraídos después del pretratamiento biológico (sección 7.8) tuvieron diferentes comportamientos a la hora de metabolizar los azúcares disponibles. El mejor resultado fue el del tratamiento de los aislados 5.b.3, donde hubo el mayor consumo de azúcares (0.0215 g mL<sup>-1</sup>) y por metabolismo de la levadura podría haber entre 20.0 a 35.6 µL de bioetanol, con un rendimiento teórico del 14%.

Los procesos de fermentación con sobrenadantes de los tratamientos biológicos presentan una diferencia de consumo por cada aislado. Se esperaría que al haber inoculado la misma cantidad de levadura por cada replica, los valores del consumo de glucosa fueran iguales, sin embargo, se presentaron valores con medias diferentes (ver tabla 21). El mayor rendimiento lo ofrece el tratamiento del aislado 5.b.3 (14%), y el menor rendimiento de producción de bioetanol fue del 8% con el tratamiento del aislado Q4. La menor producción de bioetanol que se puede obtener, es la que ofrece un rendimiento del 5% a partir de un  $T_{th}$  sin tratamiento biológico; tabla 21. Como ya se mencionó, los tratamientos de materiales lignocelulósicos pueden desprender subproductos tóxicos (Bhatia et al., 2017); y con base en los resultados de los microorganismos aerobios facultativos, hubo un cambio en el medio donde la levadura fue inoculada, permitiendo su desarrollo. En la tabla 20 se aprecia la relación de consumo de glucosa por la levadura, donde, en el tratamiento con el aislado B.1.M.7 hubo una mejor adaptación con un consumo de 0.0198 g mL de glucosa con una relación del 70% y seguido, con una relación de consumo del 69% el tratamiento del aislado 5.b.3. Aunque parecidos, el tratamiento con el aislado 5.b.3 es superior al tener el rendimiento del 78% en la producción de glucosa y el tratamiento con el aislado B.1.M.7, tuvo un rendimiento del 71%.

## 10. Conclusiones

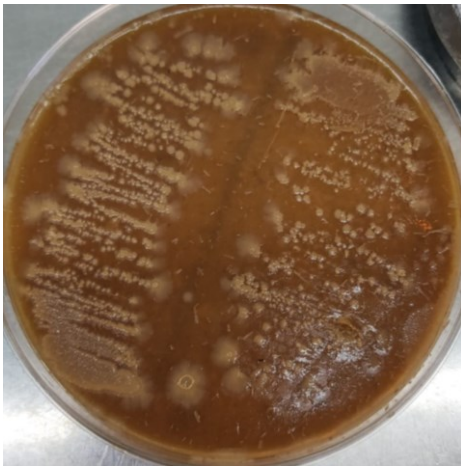
El uso de sistemas biológicos para transformar residuos se está convirtiendo en una carrera a llevar ante los tiempos que enfrentamos. El tratamiento con el aislado 5.b.3 fue el que obtuvo los mejores resultados transformando la paja de trigo en glucosa, con un rendimiento del 78 %, además dejando favorable las condiciones del sobrenadante que se empleó para la fermentación obteniendo un rendimiento teórico del 14%. Además de producción de enzimas lignocelulósicas, demostró ser aerobio facultativo, pudiendo aprovechar esta característica para futuras investigaciones. También la tolerancia a altas temperaturas y su resistencia a altas concentraciones de salinidad, hacen del aislado 5.b.3 adaptable a diversas condiciones de estrés.

Las condiciones para llevar a cabo el pretratamiento biológico fueron de 40 °C, similar a la temperatura que se emplea con enzimas lignocelulósicas comerciales (45°C) durante los procesos de hidrólisis que registraron algunos trabajos citados en esta investigación. Para futuras investigaciones, el aumentar la temperatura durante el pretratamiento biológico podría mejorar significativamente la producción de azúcares fermentables, ya que a mayor temperatura favorecería la catálisis enzimática sin dañar al microorganismo principal y pudiendo evitar el crecimiento de otros microorganismos (baja contaminación microbiana) que quieran aprovecharse de los azúcares simples que se vayan liberando.

Con un escalamiento adecuado del pretratamiento, se podrían aprovechar aproximadamente 268,360 toneladas de paja de trigo anuales en Mexicali y el transformarlas en azúcares fermentables, se podrían producir 209,320.8 toneladas de glucosa y al fermentarse, teóricamente, se podrían producir 29,304.9 toneladas de bioetanol que serían igual a 37,141.8 metros cúbicos (m<sup>3</sup>) anuales. Este proceso podría involucrar otros desechos

agrícolas como sustrato, siendo rastrojo de maíz, paja de cebada, paja de sudan, etc. ya que presentan una composición orgánica similar a la paja de trigo y son cosechas típicas de la región y se podría disminuir las quemadas agrícolas.

Una vez terminada la experimentación, los aislados bacterianos fueron resembrados en medio R2A y guardados en congelador con glicerol al 30%. Además, se realizó un medio a base de pt y agar (las cantidades se mencionan en el Anexo 1), y se vertieron en cajas Petri de plástico de 90 x10 mm. Se dejaron incubando los aislados bacterianos de la tabla 21 identificados como aerobios facultativos, a 50 °C, presentando un crecimiento en un periodo de 18 a 30 h y posteriormente guardados a 4 °C. Este procedimiento final confirma que estos aislados son capaces de usar la pt como sustrato y presentar actividad biológica. En la fig. 11 se aprecia el crecimiento de los aislados sobre medio de paja de trigo.



**Fig. 11. Presencia de colonias sobre medio paja de trigo.**

## 11. Referencias

1. Aditiya, H. B., Mahlia, T.M.I., Chong, W. T., Nur, H. y Sebayang, A. H. (2016). Second generation bioethanol production: A critical review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 66, 631–653. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2016.07.015>
2. ATSDR. (2016). Resúmenes de Salud Pública: Dibenzo-p-dioxinas policloradas (Chlorinated Dibenzo-p-Dioxins [CDDs]). Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades. [https://www.atsdr.cdc.gov/es/phs/es\\_phs104.html](https://www.atsdr.cdc.gov/es/phs/es_phs104.html)
3. Balat, M. (2011). Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: A review. *Energy Conversion and Management*, 52(2), 858–875. <https://doi.org/10.1016/j.enconman.2010.08.013>
4. Bhatia, S. K., Kim, S.-H., Yoon, J.-J. y Yang, Y.-H. (2017). Current status and strategies for second generation biofuel production using microbial systems. *Energy Conversion and Management*, 148, 1142–1156. <https://doi.org/10.1016/j.enconman.2017.06.073>
5. Binod, P., Gnansounou, E., Sindhu, R. y Pandey, A. (2019). Enzymes for second generation biofuels: Recent developments and future perspectives. *Bioresource Technology Reports*, 5, 317–325. <https://doi.org/10.1016/j.biteb.2018.06.005>
6. CCA (2014). La quema de residuos agrícolas: fuente de dioxinas. *Atmospheric Chemistry and Physics Discussions*(6), 6. <http://www3.cec.org/islandora/es/item/11405-la-quema-de-residuos-agr-colas-es-una-fuente-de-dioxinas-es.pdf> (Hoja de datos).

7. Chen, G.-Q. y Jiang, X.-R. (2018). Next generation industrial biotechnology based on extremophilic bacteria. *Current Opinion in Biotechnology*, 50, 94–100. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2017.11.016>
8. Coronado, M. A., Montero Alpírez, G., García González, C., Pérez Sánchez, A. y Pérez Pelayo, L. J. (2012). Emisiones de las quemas de residuos agrícolas en el Valle de Mexicali, 1987-2010. *Revista internacional de contaminación ambiental*. [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0188-49992012000500016](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0188-49992012000500016)
9. Cuervo, L., Folch-Mallol, J. L. y Quiroz Castañeda, R. E. (2009). Lignocelulosa Como Fuente de Azúcares Para la Producción de Etanol., 13, Artículo 3, 11–25. <https://www.researchgate.net/publication/266610846>
10. Darwesh, O. M., El-Maraghy, S. H., Abdel-Rahman, H. M. y Zaghloul, R. A. (2020). Improvement of paper wastes conversion to bioethanol using novel cellulose degrading fungal isolate. *Fuel*, 262, 116518. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2019.116518>
11. Delegación SAGARPA Baja California. (2018a). Reportan los Centros de Acopio la recepción de 191,686 toneladas de trigo: SAGARPA. SAGARPA. <https://www.gob.mx/sagarpa/bajacalifornia/articulos/reportan-los-centros-de-acopio-la-recepcion-de-191-686-toneladas-de-trigo-sagarpa?idiom=es>
12. Delegación SAGARPA Baja California. (2018b). Siguen avanzando las siembras del otoño-invierno en el Valle de Mexicali: Guillermo Aldrete. SAGARPA. <https://www.gob.mx/sagarpa/bajacalifornia/articulos/siguen-avanzando-las-siembras-del-otono-invierno-en-el-valle-de-mexicali-guillermo-aldrete?idiom=es>

13. DEMİRBAŞ, A. (2005). Bioethanol from Cellulosic Materials: A Renewable Motor Fuel from Biomass. *Energy Sources*, 27(4), 327–337.  
<https://doi.org/10.1080/00908310390266643>
14. Di Donato, P., Finore, I., Poli, A., Nicolaus, B. y Lama, L. (2019). The production of second generation bioethanol: The biotechnology potential of thermophilic bacteria. *Journal of Cleaner Production*, 233, 1410–1417.  
<https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2019.06.152>
15. Diario Oficial de la Federación (1978a). DETERMINACIÓN DE CENIZAS EN ALIMENTOS. (NMX, F-066-S-1978). México.  
<https://www.colpos.mx/bancodenormas/nmexicanas/NMX-F-066-S-1978.PDF>
16. Diario Oficial de la Federación (1978b). DETERMINACIÓN DE REDUCTORES DIRECTOS Y TOTALES EN ALIMENTOS. (NMX, F-312-1978). Mexico.  
<https://www.colpos.mx/bancodenormas/nmexicanas/NMX-F-312-1978.PDF>
17. Diario Oficial de la Federación (1979, 27 de marzo). DETERMINACIÓN DE FIBRA CRUDA EN ALIMENTOS. (NMX, F-090-S-1978).  
[http://www.dof.gob.mx/nota\\_detalle.php?codigo=4799842&fecha=27/03/1979](http://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=4799842&fecha=27/03/1979)
18. Flores Rendón, A. C. (2015). Producción de biosurfactantes por microorganismos provenientes de suelos áridos (cim.209607) [Tesis de licenciatura]. Universidad Autónoma de Baja California, Mexicali, Baja California, México.
19. García, R., Pizarro, C., Lavín, A. G. y Bueno, J. L. (2014). Spanish biofuels heating value estimation. Part II: Proximate analysis data. *Fuel*, 117(5), 1139–1147.  
<https://doi.org/10.1016/j.fuel.2013.08.049>

20. Garriga, M., Almaraz, M. y Marchiaro, A. (2017). Determination of reducing sugars in extracts of *Undaria pinnatifida* (harvey) algae by UV-visible spectrophotometry (DNS method). *Actas De Ingeniería*, 3, 173–179.  
<http://fundacioniai.org/actas/Actas3/Actas3.19.pdf>
21. Gobierno del Estado de Baja California. Principales sectores, productos y servicios: Agricultura. Gobierno del Estado de Baja California.  
[http://www.bajacalifornia.gob.mx/portal/nuestro\\_estado/municipios/mexicali/sector\\_prod.jsp](http://www.bajacalifornia.gob.mx/portal/nuestro_estado/municipios/mexicali/sector_prod.jsp)
22. Gonzalo, G. de, Colpa, D. I., Habib, M. H. M. y Fraaije, M. W. (2016). Bacterial enzymes involved in lignin degradation. *Journal of Biotechnology*, 236, 110–119.  
<https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2016.08.011>
23. Gupta, A. y Verma, J. P. (2015). Sustainable bio-ethanol production from agro-residues: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 41, 550–567.  
<https://doi.org/10.1016/j.rser.2014.08.032>
24. Hernández, S. Z. (2017). Insuficiencia de la regulación de los compuestos orgánicos volátiles en México. SEMARNAT.  
[http://www.pincc.unam.mx/7mocongreso/7O\\_CONGRESO/CCA/MIERCOLES\\_CCA/MIERCOLES\\_CCA\\_PDF/MESA\\_3/3\\_SERGIO\\_HERNANDEZ.pdf](http://www.pincc.unam.mx/7mocongreso/7O_CONGRESO/CCA/MIERCOLES_CCA/MIERCOLES_CCA_PDF/MESA_3/3_SERGIO_HERNANDEZ.pdf)
25. Hosseini, E., Dahadha, S., Bazyar Lakeh, A. A., Azizi, A. y Elbeshbishy, E. (2019). Enzymatic pretreatment of lignocellulosic biomass for enhanced biomethane production-A review. *Journal of Environmental Management*, 233, 774–784.  
<https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2018.09.106>

26. Jönsson, L. J. y Martín, C. (2016). Pretreatment of lignocellulose: Formation of inhibitory by-products and strategies for minimizing their effects. *Bioresource Technology*, 199, 103–112. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.10.009>
27. Karimi, M., Esfandiar, R. y Biria, D. (2017). Simultaneous delignification and saccharification of rice straw as a lignocellulosic biomass by immobilized *Trichoderma viride* sp. to enhance enzymatic sugar production. *Renewable Energy*, 104, 88–95. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2016.12.012>
28. Kasana, R. C., Salwan, R., Dhar, H., Dutt, S. y Gulati, A. (2008). A rapid and easy method for the detection of microbial cellulases on agar plates using gram's iodine. *Current Microbiology*, 57(5), 503–507. <https://doi.org/10.1007/s00284-008-9276-8>
29. Kim, S. y Dale, B. E. (2004). Global potential bioethanol production from wasted crops and crop residues. *Biomass and Bioenergy*, 26(4), 361–375. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2003.08.002>
30. Koppmann, R., Czapiewski, K. von y Reid, J. S. (2005). A review of biomass burning emissions, part I: gaseous emissions of carbon monoxide, methane, volatile organic compounds, and nitrogen containing compounds. *Atmospheric Chemistry and Physics Discussions*, 5(5), 10455–10516. <https://doi.org/10.5194/acpd-5-10455-2005>
31. Krasznai, D. J., Champagne Hartley, R., Roy, H. M., Champagne, P. y Cunningham, M. F. (2018). Compositional analysis of lignocellulosic biomass: Conventional methodologies and future outlook. *Critical Reviews in Biotechnology*, 38(2), 199–217. <https://doi.org/10.1080/07388551.2017.1331336>

32. Kumar, A. y Chandra, R. (2020). Ligninolytic enzymes and its mechanisms for degradation of lignocellulosic waste in environment. *Heliyon*, 6(2), e03170. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e03170>
33. Lemieux, P. M., Lutes, C. C. y Santoianni, D. A. (2004). Emissions of organic air toxics from open burning: a comprehensive review. *Progress in Energy and Combustion Science*, 30(1), 1–32. <https://doi.org/10.1016/j.pecs.2003.08.001>
34. López Arreguin, A. A. (2015). Bacterias extremófilas y su potencial en la producción de auxinas y metabolitos con actividad tensoactiva (cim.211671) [Tesis de licenciatura]. Universidad Autónoma de Baja California, Mexicali, Baja California, México.
35. Madigan, M. T., Martinko, J. M., Bender, K. S., Buckley, D. H. y Stahl, D. A. (2015). *Brock biology of microorganisms* (Global edition). Pearson.
36. Manisha y Yadav, S. K. (2017). Technological advances and applications of hydrolytic enzymes for valorization of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*, 245(Pt B), 1727–1739. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.05.066>
37. Mansouri, A., Rihani, R., Laoufi, A. N. y Özkan, M. (2016). Production of bioethanol from a mixture of agricultural feedstocks: Biofuels characterization. *Fuel*, 185, 612–621. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2016.08.008>
38. McKendry, P. (2002). Energy production from biomass (part 1): overview of biomass. *Bioresource Technology*, 83(1), 37–46. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(01\)00118-3](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(01)00118-3)

39. 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. <https://doi.org/10.1016/j.pecs.2012.02.002>
40. Mohd Azhar, S. H., Abdulla, R., Jambo, S. A., Marbawi, H., Gansau, J. A., Mohd Faik, A. A. y Rodrigues, K. F. (2017). Yeasts in sustainable bioethanol production: A review. *Biochemistry and Biophysics Reports*, 10, 52–61. <https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2017.03.003>
41. Montero, G., Coronado, M. A., Torres, R., Jaramillo, B. E., García, C., Stoytcheva, M., Vázquez, A. M., León, J. A., Lambert, A. A. y Valenzuela, E. (2016). Higher heating value determination of wheat straw from Baja California, Mexico. *Energy*, 109, 612–619. <https://doi.org/10.1016/j.energy.2016.05.011>
42. OEIDRUS. (2010). Estudio sobre la utilización de la paja de trigo. SAGARPA. <http://www.nacionmulticultural.unam.mx/empresasindigenas/docs/1868.pdf>
43. OEIDRUS. (2015). Avance Agropecuario Semanal #39. SEDAGRO. [http://www.oeidrus-bc.gob.mx/oeidrus\\_bca/pdf/boletin\\_semanal/2015/octubre/Avance%20Agropecuari%20Semanal%20No%2039.pdf](http://www.oeidrus-bc.gob.mx/oeidrus_bca/pdf/boletin_semanal/2015/octubre/Avance%20Agropecuari%20Semanal%20No%2039.pdf)
44. OEIDRUS. (2016). Avance Agropecuario Semanal #41. SEDAGRO. [http://www.oeidrus-bc.gob.mx/oeidrus\\_bca/pdf/boletin\\_semanal/2016/octubre/Avance%20Agropecuari%20Semanal%20No%2041.pdf](http://www.oeidrus-bc.gob.mx/oeidrus_bca/pdf/boletin_semanal/2016/octubre/Avance%20Agropecuari%20Semanal%20No%2041.pdf)
45. OEIDRUS. (2017). Avance Agropecuario Semanal #41. SEDAGRO. [http://www.oeidrus-bc.gob.mx/oeidrus\\_bca/pdf/boletin\\_semanal/2017/octubre/Avance%20Agropecuari%20Semanal%20No%2041.pdf](http://www.oeidrus-bc.gob.mx/oeidrus_bca/pdf/boletin_semanal/2017/octubre/Avance%20Agropecuari%20Semanal%20No%2041.pdf)

- bc.gob.mx/oeidrus\_bca/pdf/boletin\_semanal/2017/octubre/Avance%20Agropecuari  
o%20Semanal%20No%2041.pdf
46. OEIDRUS. (2018). Avance Agropecuario Semanal #35. SEDAGRO.  
[http://www.oeidrus-  
bc.gob.mx/oeidrus\\_bca/pdf/boletin\\_semanal/2018/agosto/Avance%20Agropecuario  
%20Semanal%20No%2035%20\(29%20de%20Agosto%20de%202018\).pdf](http://www.oeidrus-bc.gob.mx/oeidrus_bca/pdf/boletin_semanal/2018/agosto/Avance%20Agropecuario%20Semanal%20No%2035%20(29%20de%20Agosto%20de%202018).pdf)
47. Paudel, S. R., Banjara, S. P., Choi, O. K., Park, K. Y., Kim, Y. M. y Lee, J. W. (2017).  
Pretreatment of agricultural biomass for anaerobic digestion: Current state and  
challenges. *Bioresource Technology*, 245(Pt A), 1194–1205.  
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.08.182>
48. Pérez-Morales, G., Morales Gómez, P. y Haza Duaso, A. I. (2016). Hidrocarburos  
aromáticos policíclicos (HAPs) (I): Toxicidad, exposición de la población y alimentos  
implicados. *Revista Complutense De Ciencias Veterinarias*, 10(1).  
[https://doi.org/10.5209/rev\\_RCCV.2016.v10.n1.51869](https://doi.org/10.5209/rev_RCCV.2016.v10.n1.51869)
49. Potumarthi, R., Baadhe, R. R., Nayak, P. y Jetty, A. (2013). Simultaneous  
pretreatment and saccharification of rice husk by *Phanerochete chrysosporium* for  
improved production of reducing sugars. *Bioresource Technology*, 128, 113–117.  
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.10.030>
50. Qiu, J., Tian, D., Shen, F., Hu, J., Zeng, Y., Yang, G., Zhang, Y., Deng, S. y Zhang,  
J. (2018). Bioethanol production from wheat straw by phosphoric acid plus hydrogen  
peroxide (PHP) pretreatment via simultaneous saccharification and fermentation  
(SSF) at high solid loadings. *Bioresource Technology*, 268, 355–362.  
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.08.009>

51. Qiu, J., Wang, Q., Shen, F., Yang, G., Zhang, Y., Deng, S., Zhang, J., Zeng, Y. y Song, C. (2017). Optimizing Phosphoric Acid plus Hydrogen Peroxide (PHP) Pretreatment on Wheat Straw by Response Surface Method for Enzymatic Saccharification. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 181(3), 1123–1139. <https://doi.org/10.1007/s12010-016-2273-7>
52. Quintero, M. y Moncada, A. (2008). Contaminación y control de las quemas agrícolas en Imperial, California, y Mexicali, Baja California, 20, Artículo 43, 3–24.
53. Reséndiz, B. A. (2018). Bacterias de un ambiente extremo, fijadoras de Nitrógeno y solubilizadoras de fosfato de calcio, Tolerantes a elementos potencialmente tóxicos y Radiación u.v (cim.231830) [Tesis de licenciatura]. Universidad Autónoma de Baja California, Mexicali, Baja California, México.
54. RFA. (2019). Renewable Fuels Association. <https://ethanolrfa.org/statistics/annual-ethanol-production/>
55. Saha, B. C., Qureshi, N., Kennedy, G. J. y Cotta, M. A. (2016). Biological pretreatment of corn stover with white-rot fungus for improved enzymatic hydrolysis. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 109, 29–35. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2015.12.020>
56. Saldaña, R. (2016). Bacterias asociadas a plantas de la laguna la salada, baja california y posibles aplicaciones en la industria (cim.214341) [Tesis de licenciatura]. Universidad Autónoma de Baja California, Mexicali, Baja California, México.
57. Salvachúa, D., Prieto, A., López-Abelairas, M., Lu-Chau, T., Martínez, A. T. y Martínez, M. J. (2011). Fungal pretreatment: An alternative in second-generation

- ethanol from wheat straw. *Bioresource Technology*, 102(16), 7500–7506.  
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.05.027>
58. Sánchez, J. (2014). Pemex lanzará licitación para incorporar etanol a gasolinas.  
<https://archivo.eluniversal.com.mx/finanzas-cartera/2014/pemex-etanol-combustible-1036562.html>
59. Sarkar, N., Ghosh, S. K., Bannerjee, S. y Aikat, K. (2012). Bioethanol production from agricultural wastes: An overview. *Renewable Energy*, 37(1), 19–27.  
<https://doi.org/10.1016/j.renene.2011.06.045>
60. Sethi, S., Datta, A., Gupta, B. L. y Gupta, S. (2013). Optimization of cellulase production from bacteria isolated from soil. *ISRN Biotechnology*, 2013, 985685.  
<https://doi.org/10.5402/2013/985685>
61. Talebnia, F., Karakashev, D. y Angelidaki, I. (2010). Production of bioethanol from wheat straw: An overview on pretreatment, hydrolysis and fermentation. *Bioresource Technology*, 101(13), 4744–4753. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.11.080>
62. Vadivel, V., Moncalvo, A., Dordoni, R. y Spigno, G. (2017). Effects of an acid/alkaline treatment on the release of antioxidants and cellulose from different agro-food wastes. *Waste Management (New York, N.Y.)*, 64, 305–314.  
<https://doi.org/10.1016/j.wasman.2017.03.010>
63. Valdez-Vazquez, I., Acevedo-Benítez, J. A. y Hernández-Santiago, C. (2010). Distribution and potential of bioenergy resources from agricultural activities in Mexico. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 14(7), 2147–2153.  
<https://doi.org/10.1016/j.rser.2010.03.034>

64. Valenzuela Aviles, J. A. (2017). Sustancias bioactivas (biosurfactantes y sideróforos) producidos por microorganismos de suelo árido (cim.220208) [Tesis de licenciatura]. Universidad Autónoma de Baja California, Mexicali, Baja California, México.
65. Wang, L., Littlewood, J. y Murphy, R. J. (2013). Environmental sustainability of bioethanol production from wheat straw in the UK. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 28, 715–725. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2013.08.031>
66. Zabed, H., Sahu, J. N., Suely, A., Boyce, A. N. y Faruq, G. (2017). Bioethanol production from renewable sources: Current perspectives and technological progress. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 71, 475–501. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2016.12.076>
67. Zhang, B., Sun, H., Li, J., Wan, Y., Li, Y. y Zhang, Y. (2016). High-titer-ethanol production from cellulosic hydrolysate by an engineered strain of *Saccharomyces cerevisiae* during an in situ removal process reducing the inhibition of ethanol on xylose metabolism. *Process Biochemistry*, 51(8), 967–972. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2016.04.019>
68. Zheng, Y., Zhao, J., Xu, F. y Li, Y. (2014). Pretreatment of lignocellulosic biomass for enhanced biogas production. *Progress in Energy and Combustion Science*, 42, 35–53. <https://doi.org/10.1016/j.pecs.2014.01.001>
69. Zinnai, A., Venturi, F., Sanmartin, C., Quartacci, M. F. y Andrich, G. (2013). Kinetics of D-glucose and D-fructose conversion during the alcoholic fermentation promoted by *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 115(1), 43–49. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2012.08.008>

## **ANEXOS**

### **Medio agar base paja de trigo para 300 mL.**

- 12 g de paja de trigo molida y tamizada a 1 mm.**
- 4.5 g de Agar bacteriológico (MCD LAB)**
- 300 mL de agua purificada.**