

Evaluación de pretratamientos ácido-térmico y sacarificación enzimática para la obtención de azúcares fermentables a partir de jugo y bagazo de hojas de *Agave salmiana*

Alonso Guadalupe Hernández-Mendoza ¹, Sergio Martínez-Hernández ^{1,*}, Héctor Arturo Ruiz-Leza ², Angel Isauro Ortiz-Ceballos ¹, Alejandro Antonio Castro-Luna ¹ y Magdiel Láinez-González ³

¹ Instituto de Biotecnología y Ecología Aplicada (INBIOTECA); Xalapa, Veracruz, México; alonso_energy@hotmail.com

² Universidad Autónoma de Coahuila (UAdeC); Saltillo, Coahuila, México; hector_ruiz_leza@uadec.edu.mx

³ Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco A.C. (CIATEJ); Guadalajara, Jalisco; México; magdiel.86@gmail.com

* Autor de correspondencia: sermartinez@uv.mx; Tel.: (+52 228 170 5198)

Recibido: 23 de abril de 2021 Aceptado: 7 de mayo de 2021

Resumen: En este estudio se presentan los resultados de pretratamientos ácido-térmico y sacarificación enzimática para la producción de azúcares fermentables a partir de jugo y bagazo de hojas de *Agave salmiana*. En el pretratamiento ácido-térmico fue usado H₂SO₄ mientras que en la sacarificación enzimática se usó la enzima comercial Cellic Ctec2 (Novozyme). En los resultados se encontró que las mejores condiciones del pretratamiento ácido-térmico (H₂SO₄ % (v/v) a 100 °C por 30 min) para el jugo generaron una concentración de 43.65 ± 1.36 g/L de azúcares reductores. En el bagazo, las mejores condiciones (H₂SO₄ % (p/v) a 120 °C por 60 min) produjeron una concentración de 37.35 ± 1.65 g/L de azúcares reductores en los hidrolizados. En la sacarificación enzimática a 15 FPU/g sustrato y carga de sólidos de 10% (p/v), se obtuvo una concentración de 87.37 ± 1.27 g/L de azúcares reductores después de 72 h. Los resultados obtenidos demuestran el potencial del uso integral de bagazo y jugos de las hojas de *Agave salmiana* como materia prima para la producción de azúcares fermentables.

Palabras clave: hojas-*Agave salmiana*; pretratamientos ácido-térmico; sacarificación enzimática; fermentables; azúcares reductores

Evaluation of acid-thermal pretreatments and enzymatic saccharification to obtain fermentable sugars from the juice and bagasse of *Agave salmiana* leaves

Abstract: This study presents the results of acid-thermal pretreatments and enzymatic saccharification for the production of fermentable sugars from the juice and bagasse of *Agave salmiana* leaves. In the acid-thermal pretreatment, H₂SO₄ was used while in the enzymatic saccharification the commercial enzyme Cellic Ctec2 (Novozyme) was used. In the results it was found that the best conditions of the acid-thermal pretreatment (H₂SO₄ % (v/v) at 100 °C for 30 min) for the juice generated a concentration of 43.65 ± 1.36 g/L of reducing sugars. In bagasse, the best conditions (H₂SO₄ % (p/v) at 120 °C for 60 min) produced a concentration of 37.35 ± 1.65 g/L of reducing sugars in the hydrolysates. In the enzymatic saccharification at 15 FPU/g substrate and solids load of 10 % (p/v), a concentration of 87.37 ± 1.27 g/L of reducing sugars was obtained after 72 h. The results obtained demonstrate the potential of the integral use of bagasse and juices from the leaves of *Agave salmiana* as raw material to produce fermentable sugars.

Keywords: *Agave salmiana*-leaf; acid-thermal pretreatments; enzymatic saccharification; fermentable; reducing sugars

Introducción

La búsqueda de alternativas energéticas diferentes a las obtenidas de la explotación del petróleo ha llevado a la investigación de energía amigables con el ambiente (Yan *et al.*, 2020). Entre las opciones, se encuentran el uso de los biocombustibles provenientes de biomasa lignocelulósica (Lee *et al.*, 2017) obtenida de distintos productos, destacando los residuos agroindustriales los cuales están compuestos fundamentalmente por celulosa, hemicelulosa, lignina, extractivos (mezcla de diferentes compuestos orgánicos) y algunos componentes inorgánicos (Sudiyani *et al.*, 2013). La biomasa lignocelulósica es considerada un recurso abundante e ideal para la producción azúcares fermentables y su conversión a biocombustibles (Visioli *et al.*, 2014). Para tal efecto, la aplicación de pretratamientos es indispensable. El pretratamiento **ácido-térmico** (H₂SO₄) diluido es uno de los métodos más eficaces ya que hidroliza predominantemente la hemicelulosa y polímeros de carbohidratos (Díaz-Blanco *et al.*, 2018). Posteriormente se requiere la sacarificación enzimática del material pretratado, donde se lleva a cabo la acción sinérgica de diversas enzimas tales como endoglucanasas (EG), β-glucosidasas (BG), celobiohidrolasas (CBH) para transformar los polímeros en azúcares simples (Li *et al.*, 2019). Las plantas de *Agave* son un potencial de materia prima lignocelulósica para la obtención de azúcares fermentables y productos de alto valor (Viniestra-gonzález, 2021). Los *Agaves* han recibido especial atención debido a su alta eficiencia en el uso del agua y su resistencia a la sequía, lo que les permite crecer en

tierras áridas o semiáridas no aptas para otros cultivos, hay más de 200 especies del género *Agave*, de las cuales la mayoría son nativos de México (Castañeda-Nava *et al.*, 2019). La especie de *Agave salmiana* representa cultivos bioenergéticos altamente eficientes, tiene características fisiológicas tipo CAM, además, no compite con los principales cultivos alimentarios, se estima una productividad de 42 t/ha-año de biomasa de *A. salmiana* (Viniestra-gonzález, 2021). Durante la producción industrial de bebidas fermentadas de *A. salmiana*, las hojas se descaran, las cuales representan aproximadamente el 50 % del peso de la planta provocando un problema ambiental (Godínez-Hernández *et al.*, 2015). Estas hojas contienen una alta cantidad de carbohidratos y una baja cantidad de lignina (aproximadamente 9-13% en peso) proporcionando una baja recalcitrancia. También las hojas, generan un jugo fermentable cuyo principal carbohidrato es el fructano, un polímero de unidades de glucosa y varios tipos de fructosa (González-Llanes *et al.*, 2018). Las investigaciones para la obtención de azúcares fermentables empleando las hojas de *A. salmiana* han mostrado resultados relevantes. Sin embargo, el uso integral del bagazo y jugos de estas estructuras de la planta son escasas en la literatura. Por tanto, el objetivo de esta investigación fue determinar el efecto del pretratamiento ácido-térmico y sacarificación enzimática para la obtención de azúcares fermentables del bagazo y jugo de las hojas de *A. salmiana*.

Materiales y Métodos

Materia prima

Se utilizaron hojas de *A. salmiana* de una edad aproximada entre 9 y 10 años, obtenidas de plantaciones de la localidad de Tenextepec, Perote en el Valle de Perote, en la altiplanicie del Estado de Veracruz (19°29.616' N, 97°15.991' W, 2,521 m.s.n.m). Se registraron sus pesos frescos en el momento de la cosecha (García Núñez *et al.*, 2020). Las hojas se cortaron en tamaños de 5 x 5 cm, se molieron en un molino de cuchillas y se pusieron en un exprimidor para separar el jugo del bagazo (Rijal *et al.*, 2016). Ambas fracciones se secaron por separado para calcular el contenido de humedad (Corbin *et al.*, 2015). El bagazo molido se tamizó para obtener partículas de tamaño entre 0.250 y 0.600 mm y se guardó en bolsas plásticas hasta su uso. El jugo se centrifugó a 10,000 rpm por 30 min (Eppendorf AG, 22331 Hamburg, Germany), se filtró usando papel Whatman 40 para eliminar fibras del bagazo y se almacenó a -4 °C hasta su uso (González-Llanes *et al.*, 2018).

Pretratamientos ácido-térmicos

Los jugos se sometieron a tres diferentes concentraciones de H₂SO₄ (0.1, 0.5 y 1 % (v/v)), dos tiempos de residencia (15-30 min) y dos temperaturas (100-120 °C, usando una autoclave). Los ensayos se realizaron por triplicado en matraces Erlenmeyer de 250 ml, con un volumen de trabajo de 100 ml. El producto se filtró empleando membranas de 0.45 µm para eliminar las partículas suspendidas y se determinaron las concentraciones de azúcares reductores y totales mediante los métodos de Miller, (1959) y Nielsen, (2003) respectivamente. El bagazo también se sometió a pretratamientos ácidos-térmicos a una concentración de H₂SO₄ de 1 % (p/v), tiempo de residencia de 60 min y temperatura de 120 °C (usando una autoclave) (Láinez *et al.*, 2018). Los ensayos se realizaron por triplicado en matraces Erlenmeyer de 125 ml, a una relación sólido/ líquido de 1:10 (p/v) con un volumen de trabajo de 50 ml. El producto se centrifugó a 6,000 rpm (Eppendorf AG, 22331 Hamburg, Germany) durante 20 minutos a 20 °C. Posteriormente la parte sólida se lavó con agua destilada manejando un valor de pH entre 6.5 y 7. Se determinó la concentración de azúcares reductores en los hidrolizados usando el método DNS (Miller, 1959).

Sacarificación enzimática

El bagazo pretratado se sometió a una sacarificación enzimática utilizando una carga enzimática de 15 FPU/g sustrato, carga de sólidos de 10 % (p/v). Se utilizó la enzima comercial Cellic Ctec2 (Novozyme), con actividad enzimática de 151 FPU/ml (Láinez *et al.*, 2019). Los experimentos de sacarificación enzimática se realizaron por triplicado en matraces Erlenmeyer 125 ml, volumen de trabajo de 50 ml conteniendo buffer citrato (50 mM, pH de 4.8), incubación a 50 °C, y 150 rpm durante 72 h. Se tomaron muestras periódicamente y se determinó la concentración de azúcares reductores por el método DNS (Miller, 1959). Los rendimientos de la sacarificación enzimática se obtuvieron de acuerdo con Xu *et al.*, (2019).

Métodos analíticos

La determinación de los extractivos fue de acuerdo con Thurbide & Hughes (2000) y reportado como porcentaje. El contenido de cenizas y componentes lignocelulósicos se caracterizó de acuerdo con Láinez *et al.*, (2018). El pH del jugo se determinó usando un pH-metro (HI2211, Hanna instruments, USA). El contenido de sólidos solubles totales (SST) de los jugos se determinó de acuerdo con Corbin *et al.*, (2015). El contenido de glucosa, fructosa y sacarosa en el jugo crudo se cuantificó mediante HPLC (Sandoval-Nuñez *et al.*, 2018). La cuantificación de azúcares reductores se realizó por el método de Miller (Miller, 1959) utilizando un espectrofotómetro UV-vis (1280, Shimadzu, Japón) a una longitud de onda de 540 nm. Una curva estándar de glucosa (2 mg/ml) se usó como referencia. El contenido azúcares totales se calculó mediante el método de fenol-ácido sulfúrico (Nielsen, 2003) utilizando un espectrofotómetro UV-vis (1280, Shimadzu, Japón) a una longitud de onda de 490 nm. Una curva estándar de sacarosa (0.1 mg/ml) se usó como referencia.

Análisis estadístico

El pretratamiento ácido-térmico de los jugos se analizó con un diseño factorial con tres factores, concentración de ácido, tiempo de residencia y temperatura (con tres niveles para la concentración de ácido y los otros dos factores con dos niveles cada uno). La variable de respuesta fue la concentración de azúcares reductores. Los datos fueron analizados con un análisis de varianza (ANOVA) multifactorial y pruebas de rangos múltiples utilizando el software Statgraphics Centurion XVII (Statpoint Technologies Inc., Warrenton, USA).

Resultados y Discusión

Procesamiento físico de las hojas de *Agave salmiana*

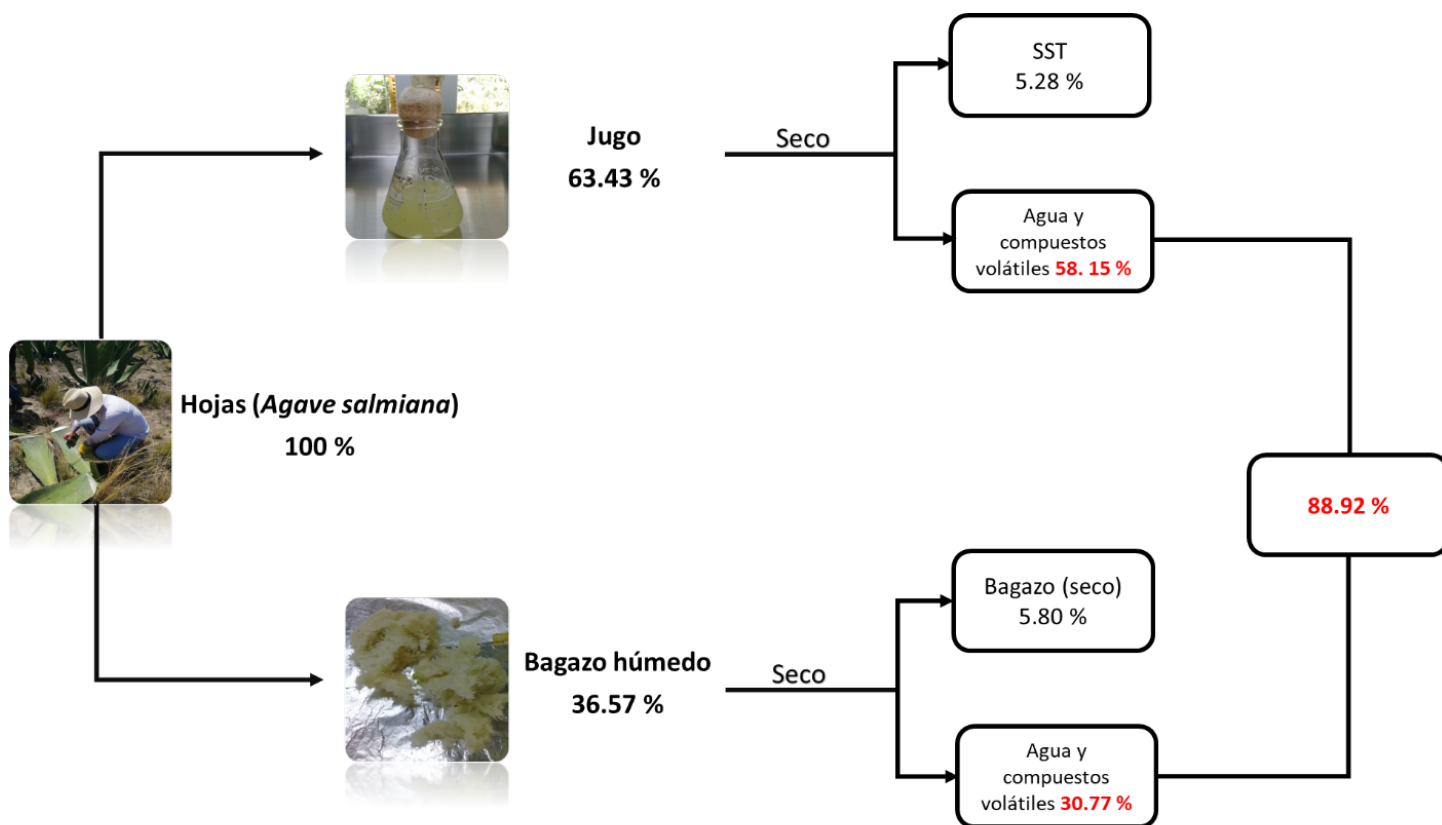


Figura 1. Procesamiento del *Agave salmiana* y contenido de humedad, los datos se presentan como porcentaje de masa inicial fresca (húmeda) (% p/p). Los valores mostrados en letra color rojo se utilizan para el cálculo del contenido de humedad total (Corbin *et al.*, 2015).

La biomasa se separó en jugo y bagazo, la distribución de masa (% p/p) se muestra en la Figura 1. Se observó un contenido de alrededor de 63 % (p/p) de jugos de *A. salmiana* que se puede extraer con la molienda de las hojas. La fracción restante fue considerada bagazo húmedo (36.57%). Respecto a los jugos, la distribución en masa (% p/p) fue diferente a reportes de varios autores (González-Llanes *et al.*, 2018; Corbin *et al.*, 2016; Michel-Cuello *et al.*, 2012), esto podría ser atribuido a la especie de *Agave* y la edad de la planta. La fracción de masa de bagazo seco fue de 5.85 % (p/p). Este valor fue menor a lo reportado por Yang *et al.*, (2015) y Corbin *et al.*, (2015) con 7 y 10 % (p/p), respectivamente utilizando biomasa de *A. tequilana*. Por otra parte, el contenido total de humedad fue superior a 88 %, estos valores son similares a los reportados por Yang *et al.*, (2015) y Corbin *et al.*, (2015), utilizando biomasa de hojas de *A. tequilana* y menor al estudio de Gonzales *et al.*, (2018) utilizando *A. salmiana*. Por otro lado, en las hojas de *A. salmiana* se obtuvo una cantidad de biomasa fresca de 96 kg/planta (García Núñez *et al.*, 2020). Estos resultados confirman que *A. salmiana* es una materia prima sustancial para el bioprocesamiento de producción de azúcares fermentables (Yan *et al.*, 2020).

Análisis composicional

a) Composición lignocelulósica del bagazo de hojas *Agave salmiana*

El bagazo de *A. salmiana* cruda presentó la siguiente composición (% Base seca) celulosa 31.53 ± 0.88 %, hemicelulosa 15.16 ± 0.25 %, lignina 17.28 ± 1.36 %, extractivos 1.22 ± 0.67 % y cenizas 8.17 ± 0.09 %, como se muestra en la Tabla 1. Los porcentajes de celulosa encontrados en este trabajo fueron superiores a los reportados por Láinez *et al.*, (2018), Chávez-Romero *et al.*, (2018) y Pinos-Rodríguez *et al.*, (2008) con valores que oscilaron entre 18 y 27 %, y menores a lo reportado por Naranjo *et al.*, (2016) y Medina-Morales *et al.*, (2011) quienes reportaron valores mayores que 35 %. Los valores de hemicelulosa en este trabajo fueron superiores a los reportados por Láinez *et al.*, (2018) y Chávez-Romero *et al.*, (2018). El contenido de lignina fue superior a los reportados por Naranjo *et al.*, (2016) y Chávez-Romero *et al.*, (2018), e inferior a lo reportado por Láinez *et al.*, (2018).

Tabla 1. Componentes lignocelulósicos de bagazo *Agave salmiana* en base seca reportados en la literatura y en este estudio.

Celulosa	Hemicelulosa	Lignina	Extractivos	Cenizas	Referencias
31.53 ± 0.88	15.16 ± 0.25	17.28 ± 1.36	1.22 ± 0.67	8.17 ± 0.09	En este estudio
48.94 ± 5.27	----	8.48 ± 1.78	----	2.32 ± 0.92	Naranjo <i>et al.</i> , (2016)
20.67 ± 0.48	3.74 ± 0.19	23.37 ± 0.42	4.01 ± 0.18	11.21 ± 0.21	Láinez <i>et al.</i> , (2018)
35.26	----	----	----	----	Medina-Morales <i>et al.</i> , (2011)
18.94 ± 0.07	0.95 ± 0.09	2.26 ± 0.02	0.73 ± 0.03	5.12 ± 0.07	Chávez-Romero <i>et al.</i> , (2018)
27.2	----	----	----	8.6	Pinos-Rodríguez <i>et al.</i> , (2008)

b) Composición del jugo de hojas de *Agave salmiana*

Tabla 2. pH y composición de jugos (g/L) de Agaves reportados en la literatura y en este estudio.

Agave	pH	Glucosa	Fructosa	Sacarosa	Azúcares reductores	Azúcares totales	Referencias
<i>salmiana</i>	4.5 ± 0.005	8.76 ± 0.85	20.82 ± 0.49	0.43 ± 0.07	28 ± 0.07	44.87 ± 2.21	En este estudio
<i>salmiana</i>	-----	10.84 ± 1.22	5.79 ± 1.12	5.33 ± 0.88	-----	-----	Michel-Cuello <i>et al.</i> , (2008)
<i>salmiana</i>	-----	-----	-----	-----	26.1	86.4	(González-Llanes <i>et al.</i> , 2018)
<i>tequilana</i>	4.6 -5	25.6 ± 4.9	12.7 ± 2.7	6.0 ± 4.5	-----	-----	Corbin <i>et al.</i> , (2016)
<i>tequilana</i>	4.74 ± 0.002	18.1 ± 0.1	16.8 ± 0.3	-----	-----	-----	Yang <i>et al.</i> , (2015)
<i>tequilana</i>	-----	18.3 ± 0.1	15.2 ± 0.1	-----	-----	-----	Rijal <i>et al.</i> , (2016)
<i>henequén</i>	4.5	-----	-----	-----	40.2 ± 0.64	-----	Villegas-Silva <i>et al.</i> , (2014)

El jugo crudo presentó la siguiente composición (g/L): glucosa 8.76 ± 0.85 , fructosa 20.82 ± 0.49 , sacarosa 0.43 ± 0.07 , azúcares reductores 28 ± 0.07 , azúcares totales 45.87 ± 2.21 y pH de 4.5 ± 0.005 (Tabla 2). Se observa que la diferencia

de azúcares reductores y totales es mayor al 16 %, esta desigualdad podría deberse al contenido de fructanos presentes en el jugo (González-Llanes *et al.*, 2018). Por otro lado, el contenido de fructosa es mayor a lo reportado por Michel-Cuello *et al.*, (2008) y Corbin *et al.*, (2016) utilizando biomasa de *A. salmiana* y *tequilana* respectivamente. El contenido de glucosa fue menor con respecto a otros trabajos citados en la literatura (Tabla 2). La cantidad de sacarosa fue menor a lo reportado por González-Llanes *et al.*, (2018) y Michel-Cuello *et al.*, (2008). Por otra parte, los azúcares reductores fueron mayores a lo reportado por González-Llanes *et al.*, (2018) y menor a lo reportado por Villegas-Silva *et al.*, (2014) utilizando biomasa de *A. salmiana* y *A. henequén* respectivamente. El contenido de azúcares totales fue menor a lo reportado por González-Llanes *et al.*, (2018). Respecto al pH, la acidez del jugo de *Agave* es una característica de las plantas que utilizan el metabolismo ácido crasuláceo (Corbin *et al.*, 2016).

Pretratamiento del jugo de *Agave salmiana*

La Tabla 3 presenta los resultados obtenidos cuando el jugo de *A. salmiana* fue sometida a pretratamientos ácido-térmicos. La concentración de azúcares reductores osciló entre 30.39 ± 1.21 y 43.65 ± 1.36 g/L, lo cual puede ser atribuido a la hidrólisis de oligosacáridos (Michel-Cuello *et al.*, 2012). En los resultados, se observa que el incremento en la concentración de los azúcares reductores fue proporcional al aumento de concentración de H_2SO_4 , a 100 °C por 30 min (Tabla 3). Los niveles de concentración de H_2SO_4 mostraron diferencias significativas ($p < 0.0244$).

Tabla 3. Condiciones de pretratamiento ácido-térmico para los jugos de *A. Salmiana* y concentración de azúcares reductores producidos

Tratamiento	Concentración H_2SO_4	Tiempo	Temperatura	Azúcares reductores
	% v/v			min
1	0.1	30	100	31.28 ± 0.49
2	0.1	15	100	30.39 ± 1.21
3	0.1	15	120	32.16 ± 0.98
4	1	15	100	41.82 ± 0.89
5	0.5	30	100	39.79 ± 2.11
6	1	30	120	37.85 ± 0.59
7	0.5	30	120	39.78 ± 0.39
8	1	15	120	42.18 ± 1.15
9	1	30	100	43.65 ± 1.36
10	0.5	15	120	41.57 ± 0.80
11	0.5	15	100	40.68 ± 0.89
12	0.1	30	120	33.15 ± 0.71

Medias y 95.0% de Fisher LSD

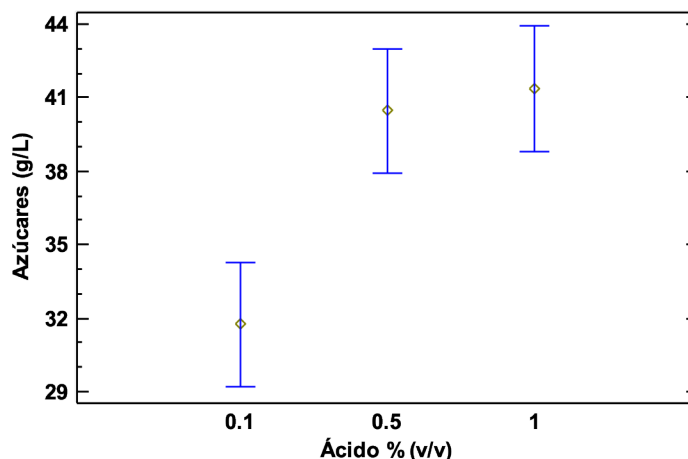


Figura 2. Gráfico de medianas con intervalos del 95% de confianza.

En la Figura 2, se muestra el gráfico de medianas con intervalos de confianza de 95 %, donde se aprecia que los tratamientos con una concentración de H_2SO_4 1 % (v/v) mostraron los valores más altos de azúcares reductores. Los resultados obtenidos se pueden comparar con otros reportados en la literatura. Corbin *et al.*, (2016), realizaron un pretratamiento ácido (TFA 0.2 M a 80 °C por 60 min) al jugo de *A. tequilana* obteniendo un aumento 30 a 41 g/L de azúcares reductores. En otro estudio, Rijal *et al.*, (2016), realizaron un pretratamiento ácido (H_2SO_4 1 % (v/v) a 121 °C por 60 min) al jugo de *A. tequilana* obteniendo un aumento 33.5 a 39.6 g/L de azúcares reductores. Este resultado muestra la eficacia del pretratamiento ácido-térmico en jugo de *A. salmiana* para el incremento de azúcares fermentables.

Pretratamiento del bagazo de *Agave salmiana*

El bagazo de *A. salmiana* fue sometida a pretratamiento ácido-térmico, en los hidrolizados se obtuvo una concentración de azúcares reductores de 37.35 ± 1.65 g/L. Se sabe que la eficacia del pretratamiento ácido-térmico elimina una gran parte de la hemicelulosa y se recupera como azúcar simple (Díaz-Blanco *et al.*, 2018). Los resultados obtenidos en el presente estudio se pueden comparar con otros reportados en la literatura. Láinez *et al.*, (2018), reportaron una concentración de 25 g/L de azúcares reductores en biomasa de bagazo de *A. salmiana* utilizando H_2SO_4 al 1 % (v/v). Por otro lado, Díaz-Blanco *et al.*, (2018), obtuvieron una concentración de 16 g/L de azúcares reductores aplicando H_2SO_4 al 1 % (p/v) en bagazo de *A. lechuguilla*. En otro estudio, Saucedo-Luna *et al.*, (2010), reportaron una concentración de 20 g/L de azúcares reductores en biomasa de bagazo de *A. tequilana* utilizando H_2SO_4 al 1 % (p/v). Estos resultados confirman que el pretratamiento ácido-térmico producen hidrolizados con alto contenido de azúcares fermentables.

Sacarificación enzimática

La fracción sólida producida del pretratamiento ácido-térmico fue sometida a sacarificación enzimática obteniendo una concentración de azúcares reductores de 87.37 ± 1.27 g/L después de 72 h de experimentación (Figura 3). Las concentraciones de azúcares reductores fueron de 48.74 ± 2.13 g/L a las 12 h, aumentando a 87.37 ± 1.27 g/L al final del experimento. Los resultados obtenidos se pueden comparar con otros en la literatura. Láinez *et al.*, (2019), trabajaron un pretratamiento secuencial ácido-alcalino y sacarificación enzimática en bagazo de *A. salmiana* obteniendo una concentración de 50 g/L de azúcares reductores. Por otro lado, Ríos-González *et al.*, (2021), evaluaron el efecto del pretratamiento secuencial ácido-microondas y sacarificación enzimática en bagazo de *A. lechuguilla* obteniendo una concentración de 47.7 g/L de azúcares reductores. Saucedo-Luna *et al.*, (2011), estudiaron el efecto del pretratamiento ácido (H_2SO_4 1 – 3 % (p/v)) y la sacarificación enzimática utilizando enzimas celulasa y β -glucosidasa sobre el bagazo de *A. tequilana* obteniendo una concentración de 41 g/L de azúcares reductores.

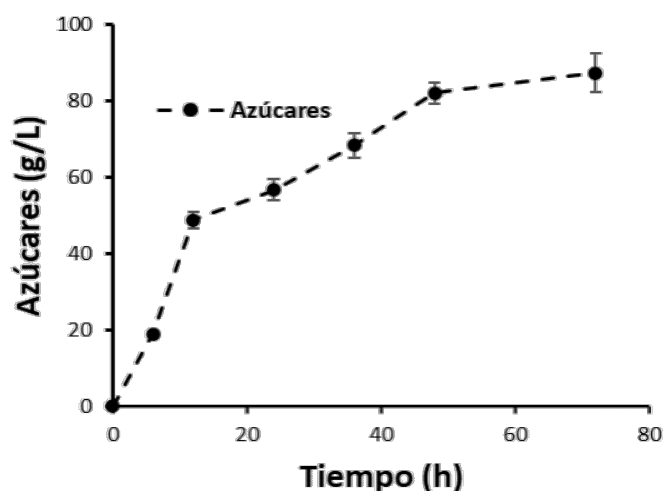


Figura 3. Cinética de sacarificación enzimática del agave pretratado (H_2SO_4 1 % (p/v) a 120 °C por 60 min) con una carga de sólidos del 10 % y una carga de enzima de 15 FPU/g sustrato.

Conclusiones

Los resultados de este trabajo mostraron la potencial liberación de azúcares simples a partir de uso integral del bagazo y jugo de hojas de *A. salmiana* mediante la aplicación secuencial de pretratamiento ácido-térmico y enzimáticos. Los pretratamientos ácido-térmico permitieron obtener hasta 82 g/L de azúcares reductores en jugo e hidrolizados. Además, la sacarificación enzimática del material pretratado produjo una concentración de hasta 87 g/L de azúcares reductores. Este reporte ofrece resultados útiles para futuras investigaciones, también, para hacer un aprovechamiento integral de la biomasa de *A. salmiana*. Finalmente, se debe realizar futuros estudios fermentativos para evaluar el rendimiento de producción de biocombustibles.

Bibliografía

- Castañeda-Nava, J. J., Rodríguez-Domínguez, J. M., Camacho-Ruiz, R. M., Gallardo-Valdez, J., Villegas-García, E., & Gutiérrez-Mora, A. (2019). Morphological comparison among populations of *Agave salmiana* Otto ex Salm-Dyck (Asparagaceae), a species used for mezcal production in Mexico. *Flora: Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants*, 255(October 2018), 18–23. <https://doi.org/10.1016/j.flora.2019.03.019>
- Chávez-Romero, F.-M., Yee-Madeira, H. T., García-Zebadúa, J. C.1, González-Montoya, M., Mora-Escobedo, R., & *. (2018). Disintegration treatments of *Agave Salmiana* waste : Lignocellulose characterization by physicochemical, thermogravimetric and spectroscopic studies. *Tratamientos de desintegración de desechos de Agave Salmiana : Caracterización de la lignocelulosa por est. REVISTA BIOCENCIA*, 5(1), 1–18.
- Corbin, K. R., Betts, N. S., van Holst, N., Jiranek, V., Chambers, D., Byrt, C. S., Fincher, G. B., & Burton, R. A. (2016). Low-Input Fermentations of *Agave tequilana* Leaf Juice Generate High Returns on Ethanol Yields. *Bioenergy Research*, 9(4), 1142–1154. <https://doi.org/10.1007/s12155-016-9755-x>
- Corbin, K. R., Byrt, C. S., Bauer, S., Debolt, S., Chambers, D., Holtum, J. A. M., Karem, G., Henderson, M., Lahnstein, J., Beahan, C. T., Bacic, A., Fincher, G. B., Betts, N. S., & Burton, R. A. (2015). Prospecting for energy-rich renewable raw materials: *Agave* leaf case study. *PLoS ONE*, 10(8), 1–23. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0135382>
- Díaz-Blanco, D. I., de La Cruz, J. R., López-Linares, J. C., Morales-Martínez, T. K., Ruiz, E., Rios-González, L. J., Romero, I., & Castro, E. (2018). Optimization of dilute acid pretreatment of *Agave lechuguilla* and ethanol production by co-fermentation with *Escherichia coli* MM160. *Industrial Crops and Products*, 114(February), 154–163. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.01.074>
- García Núñez, R. M. G. N. M., Galán Reséndiz, M., Cuevas Sánchez, J. A., & Álvarez Hernández, R. (2020). Identificación y caracterización morfológica de agaves en sistemas agroforestales con metepantle en tierras campesinas. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 11(4), 917–929. <https://doi.org/10.29312/remexca.v11i4.2468>
- Godínez-Hernández, C. I., Aguirre-Rivera, J. R., Juárez-Flores, B. I., Ortiz-Pérez, M. D., & Becerra-Jiménez, J. (2015). Extraction and characterization of *Agave salmiana* Otto ex Salm-Dyck fructans. *Revista Chapingo, Serie Ciencias Forestales y Del Ambiente*, 22(1), 59–72. <https://doi.org/10.5154/r.rchscfa.2015.02.007>
- González-Llanes, M. D., Hernández-Calderón, O. M., Rios-Irribé, E. Y., Alarid-García, C., Castro Montoya, A. J., & Escamilla-Silva, E. M. (2018). Fermentable sugars production by enzymatic processing of *agave* leaf juice. *Canadian Journal of Chemical Engineering*, 96(3), 639–650. <https://doi.org/10.1002/cjce.22959>
- Láinez, M., Ruiz, H. A., Arellano-Plaza, M., & Martínez-Hernández, S. (2019). Bioethanol production from enzymatic hydrolysates of *Agave salmiana* leaves comparing *S. cerevisiae* and *K. marxianus*. *Renewable Energy*, 138, 1127–1133. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2019.02.058>
- Láinez, M., Ruiz, H. A., Castro-Luna, A. A., & Martínez-Hernández, S. (2018). Release of simple sugars from lignocellulosic biomass of *Agave salmiana* leaves subject to sequential pretreatment and enzymatic saccharification. *Biomass and Bioenergy*, 118(September), 133–140. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2018.08.012>
- Lee, M., Cho, S., & Kim, J. (2017). A comprehensive model for design and analysis of bioethanol production and supply strategies from lignocellulosic biomass. *Renewable Energy*, 112, 247–259. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2017.05.040>
- Li, J., Zhang, M., & Wang, D. (2019). High-solids hydrolysis of corn stover to achieve high sugar yield and concentration through high xylan recovery from magnesium oxide-ethanol pretreatment. *Bioresource Technology*, 280(January), 352–359. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.02.058>
- Medina-Morales, M. A., Contreras-Esquivel, J. C., De la Garza-Toledo, H., Rodríguez, R., & Aguilar, C. N. (2011). Enzymatic bioconversion of *agave* leaves fiberhydrolysis using plackett-burman design. *American Journal of Agricultural and Biological Science*, 6(4), 480–485. <https://doi.org/10.3844/ajabssp.2011.480.485>
- Michel-Cuello, C., Juárez-Flores, B. I., Aguirre-Rivera, J. R., & Pinos-Rodríguez, J. M. (2008). Quantitative characterization of nonstructural carbohydrates of mezcal *agave* (*Agave salmiana* Otto ex Salm-Dick). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(14), 5753–5757. <https://doi.org/10.1021/jf800158p>
- Michel-Cuello, C., Ortiz-Cerda, I., Moreno-Vilet, L., Grajales-Lagunes, A., Moscota-Santillán, M., Bonnin, J., González-Chávez, M. M., & Ruiz-Cabrera, M. (2012). Study of enzymatic hydrolysis of fructans from *Agave salmiana* characterization and kinetic assessment. *The Scientific World Journal*, 2012. <https://doi.org/10.1100/2012/863432>
- Miller, G. L. (1959). Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Analytical Chemistry*, 31(3), 426–428. <https://doi.org/10.1021/ac60147a030>
- Naranjo, C. D. D., Alamilla-beltrán, L., Gutiérrez-lopez, G. F., Terres-rojas, E., & Solorza-, J. (2016). Aislamiento y caracterización de celulosas obtenidas de fibras de *Agave salmiana* aplicando dos métodos de extracción ácido-alcali * Isolation and characterization of cellulose obtained from *Agave salmiana* fibers using two acid-alkali extraction methods Re. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 7(1), 31–43.

- Nielsen, S. S. (2003). *Phenol-Sulfuric Acid Method for Total Carbohydrates*. 39–44. https://doi.org/10.1007/978-1-4757-5250-2_6
- Pinos-Rodríguez, J. M., Zamudio, M., & González, S. S. (2008). The effect of plant age on the chemical composition of fresh and ensiled Agave salmiana leaves. *South African Journal of Animal Sciences*, 38(1), 43–50. <https://doi.org/10.4314/sajas.v38i1.4108>
- Rijal, D., Vancov, T., McIntosh, S., Ashwath, N., & Stanley, G. A. (2016). Process options for conversion of Agave tequilana leaves into bioethanol. *Industrial Crops and Products*, 84, 263–272. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.02.011>
- Ríos-González, L. J., Medina-Morales, M. A., Rodríguez-De la Garza, J. A., Romero-Galarza, A., Medina, D. D., & Morales-Martínez, T. K. (2021). Comparison of dilute acid pretreatment of agave assisted by microwave versus ultrasound to enhance enzymatic hydrolysis. *Bioresource Technology*, 319(July 2020), 124099. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.124099>
- Sandoval-Nuñez, D., Arellano-Plaza, M., Gschaedler, A., Arrizon, J., & Amaya-Delgado, L. (2018). A comparative study of lignocellulosic ethanol productivities by *Kluyveromyces marxianus* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Clean Technologies and Environmental Policy*, 20(7), 1491–1499. <https://doi.org/10.1007/s10098-017-1470-6>
- Saucedo-Luna, J., Castro-Montoya, A. J., Rico, J. L., & Campos-García, J. (2010). Optimización de hidrólisis ácida de bagaso de Agave tequilana Weber. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 9(1), 91–97.
- Saucedo-Luna, Jaime, Castro-Montoya, A. J., Martínez-Pacheco, M. M., Sosa-Aguirre, C. R., & Campos-García, J. (2011). Efficient chemical and enzymatic saccharification of the lignocellulosic residue from Agave tequilana bagasse to produce ethanol by *Pichia caribbica*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 38(6), 725–732. <https://doi.org/10.1007/s10295-010-0853-z>
- Sudiyani, Y., Styarini, D., Triwahyuni, E., Sudiyarmanto, Sembiring, K. C., Aristiawan, Y., Abimanyu, H., & Han, M. H. (2013). Utilization of biomass waste empty fruit bunch fiber of palm oil for bioethanol production using pilot - Scale unit. *Energy Procedia*, 32, 31–38. <https://doi.org/10.1016/j.egypro.2013.05.005>
- Villegas-Silva, P. A., Toledano-Thompson, T., Canto-Canché, B. B., Larqué-Saavedra, A., & Barahona-Pérez, L. F. (2014). Hydrolysis of Agave fourcroydes Lemaire (henequen) leaf juice and fermentation with *Kluyveromyces marxianus* for ethanol production. *BMC Biotechnology*, 14(130). <https://doi.org/10.1186/1472-6750-14-14>
- Viniegua-gonzález, G. (2021). *Agave bioindustries : history and future of a strategic bioresource*. 1(1), 12–24.
- Visioli, L. J., Stringhini, F. M., Salbego, P. R. S., Chielle, D. P., Ribeiro, G. V., Gasparotto, J. M., Aita, B. C., Klaic, R., Moscon, J. M., & Mazutti, M. A. (2014). Use of Agroindustrial Residues for Bioethanol Production. *Bioenergy Research: Advances and Applications*, 49–56. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-59561-4.00003-6>
- Xu, C., Zhang, J., Zhang, Y., Guo, Y., Xu, H., Xu, J., & Wang, Z. (2019). Enhancement of high-solids enzymatic hydrolysis efficiency of alkali pretreated sugarcane bagasse at low cellulase dosage by fed-batch strategy based on optimized accessory enzymes and additives. *Bioresource Technology*, 292(August), 121993. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.121993>
- Yan, X., Corbin, K. R., Burton, R. A., & Tan, D. K. Y. (2020). Agave: A promising feedstock for biofuels in the water-energy-food-environment (WEFE) nexus. *Journal of Cleaner Production*, 261, 121283. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2020.121283>
- Yang, L., Lu, M., Carl, S., Mayer, J. A., Cushman, J. C., Tian, E., & Lin, H. (2015). Biomass characterization of Agave and Opuntia as potential biofuel feedstocks. *Biomass and Bioenergy*, 76, 43–53. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2015.03.004>