



**UNIVERSIDAD MICHOACANA
DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO**



**División de Estudios de Posgrado
Facultad de Ingeniería Química**

***Obtención de 2,3-butanodiol a partir del hidrolizado
enzimático de bagazo de Agave cupreata usando la
cepa silvestre Klebsiella oxytoca UM2-17***

Tesis presentada por:

Lizbeth Pasaye Anaya

A la División de Estudios de Posgrado de la Facultad de Ingeniería
Química para obtener el grado de:

Doctora en Ciencias en Ingeniería Química

Asesor:

Dr. Agustín Jaime Castro Montoya

Co-asesor:

Dr. Jesús Campos García

Morelia, Michoacán, Enero de 2020.

“La ciencia no sabe de países, porque el conocimiento le pertenece a la humanidad y es la antorcha que ilumina al mundo. La ciencia es el alma de la prosperidad de las naciones y la fuente de todo progreso”.

Louis Pasteur

*Adquiere sabiduría, adquiere inteligencia;
no te olvides ni te apartes de las razones de mi boca;
No la dejes, y ella te guardará;
Amala, y te conservará.
Sabiduría ante todo; adquiere sabiduría;
Y sobre todas tus posesiones adquiere inteligencia.
Engrandécela, y ella te engrandecerá;
Ella te honrará, cuando tú la hayas abrazado.
Adorno de gracia dará a tu cabeza;
Corona de hermosura te entregará.*

Proverbios 4:5-9

RESUMEN

Obtención de 2,3-butanodiol a partir del hidrolizado enzimático de bagazo de *Agave cupreata* usando la cepa silvestre *Klebsiella oxytoca* UM2-17

Por: Lizbeth Pasaye Anaya

Noviembre de 2019.

Doctora en Ciencias en Ingeniería Química

Dirigida por: Dr. Agustín Jaime Castro Montoya y Dr. Jesús Campos García

El 2,3-butanodiol es un compuesto químico con una alta demanda en el mercado actual, esto se debe a que tiene una amplia gama de aplicaciones industriales, tales como los combustibles y diferentes precursores químicos. El 2,3-butanodiol se obtiene convencionalmente por síntesis química, sin embargo, en los últimos años se ha generado un creciente interés en producirlo biotecnológicamente a partir de sustratos renovables, esto debido a las ventajas ambientales y económicas que el proceso trae consigo. El presente trabajo describe el aislamiento de una cepa nativa de bagazo de agave capaz de producir 2,3-butanodiol a partir de la fermentación del hidrolizado enzimático de dicho residuo. La cepa silvestre, identificada como *Klebsiella oxytoca* UM2-17, produjo 2,3-butanodiol de manera eficiente en medio mineral, tanto con glucosa o xilosa pura, como con la mezcla de ambos azúcares. Cuando se utilizaron 100 g L⁻¹ de glucosa como fuente de carbono se obtuvieron 29.36 g L⁻¹ de 2,3-butanodiol y un rendimiento de 0.29 g g⁻¹, mientras que cuando se empleó una mezcla de 50 g L⁻¹ de glucosa y 50 g L⁻¹ de xilosa se alcanzaron 25.9 g L⁻¹ del diol y un rendimiento de 0.26 g g⁻¹. Por otro lado, se obtuvo un hidrolizado enzimático del bagazo de *Agave cupreata* que contenía una mezcla de glucosa, xilosa y arabinosa, equivalente a 25.8 g L⁻¹ de azúcar, lo que correspondió a una conversión del 52.5% del material. La fermentación batch de este hidrolizado con la cepa *K. oxytoca* UM2-17 mostró el consumo total de la glucosa y la xilosa, con una producción máxima de 2,3-butanodiol de 10.3 g L⁻¹ y 0.28 g L⁻¹ de etanol, correspondiente a un rendimiento de 0.40 g g⁻¹. Estos resultados indicaron que el bagazo de *A. cupreata* es un sustrato adecuado para producir 2,3-butanodiol utilizando la cepa silvestre *K. oxytoca* UM2-17, y

hasta donde se sabe, no existen reportes que evalúen la producción de 2,3-butanodiol con *K. oxytoca* utilizando bagazo de agave.

Palabras clave: biocombustibles, mezcal, residuo, lignocelulosa, fermentación.

ABSTRACT

Obtaining 2,3-butanediol from the enzymatic hydrolysate of *Agave cupreata* bagasse using the wild strain *Klebsiella oxytoca* UM2-17

By: Lizbeth Pasaye Anaya

November of 2019

PhD in Chemical Engineering

Directed by: PhD. Agustín Castro Montoya & PhD. Jesús Campos García

The 2,3-butanediol is a chemical component with wide industrial applications, such as biofuels and chemical precursors. It is usually obtained through chemical synthesis, but in recent years there has been a growing interest on its biological production from renewable substrates due to its environmental and economic benefits. The present work describes the isolation of an agave bagasse native strain capable of producing 2,3-butanediol from the fermentation of the enzymatic hydrolysate of *Agave cupreata* bagasse. The wild strain, identified as *Klebsiella oxytoca* UM2-17, produced 2,3-butanediol efficiently in mineral medium with glucose, xylose and a mixture of both sugars. They were obtained 29.36 g L⁻¹ of 2,3-butanediol and a yield of 0.29 g g⁻¹ in medium with 100 g L⁻¹ of glucose, while a mixture of 50 g L⁻¹ of glucose and 50 g L⁻¹ of xylose reached 25.9 g L⁻¹ of 2,3-butanediol and a yield of 0.26 g g⁻¹. On the other hand, the hydrolysate obtained had a mixture of glucose, xylose and arabinose equivalent to 25.8 g L⁻¹ of sugar, corresponding to a 52.5% of material conversion. The batch fermentation of the hydrolysate with *K. oxytoca* UM2-17 showed glucose and xylose total depletion with a production of 10.3 g L⁻¹ of 2,3-butanediol and 0.28 g L⁻¹ of ethanol, corresponding to a yield of 0.40 g g⁻¹. These results demonstrated that *A. cupreata* bagasse is a sustainable raw material to produce 2,3-butanediol using the wild strain *Klebsiella oxytoca* UM2-17. To the authors' knowledge no work has been reported evaluating 2,3-butanediol production by *K. oxytoca* using agave bagasse.

DEDICADA A:

Aída Lara Valdespino (†), mi abuelita materna, mi gran amor y mi segunda madre. No hay palabras exactas que expresen todo el amor que siento por ti, ni la inmensa gratitud en mi corazón por el infinito amor, la paciencia y las enseñanzas que me diste. Agradezco a Dios por la bendición de ser tu nieta, una extensión de ti. Gracias por darle vida a mi maravillosa madre, porque gracias a ello soy miembro de la hermosa familia que forjaste; nos enseñaste el valor de la unión familiar y a amarnos incondicionalmente, no cualquiera tiene ese privilegio ni experimenta cada día la dicha que ello trae consigo.

Gracias por estar siempre a mi lado mostrándome el amor de Dios, enseñándome a ser temerosa de Él, y a sentir empatía y respeto por cada ser del planeta. Fuiste el vivo ejemplo de la humildad y la nobleza de corazón, pero al mismo tiempo me enseñaste a no dejarme pisotear por nadie.

Agradezco a Dios por todo el tiempo que me permitió tenerte a mi lado, tu presencia en mi vida fue sin duda uno de los mayores regalos que me otorgó nuestro Creador. Atesoro en mi corazón cada momento vivido contigo de manera consciente, y sé que incluso aquellos momentos compartidos inconscientemente vibran en cada célula de mi cuerpo.

Nuestra conexión es atemporal. Aprendí tantas cosas de ti que me es imposible plasmarlo todo, pero cada día me topo de frente con alguna de tus enseñanzas, sonrío y te agradezco por tanto que me diste. **TE AMÉ, TE AMO Y TE AMARÉ por el resto de mi vida, y aunque ya no estés físicamente conmigo VIVES DENTRO DE MI ALMA!**

AGRADECIMIENTOS

- ❖ A Dios, por la vida, por darme la capacidad y la fortaleza necesaria para superar cada obstáculo que se me ha presentado a lo largo de mi vida. Por cruzarme con personas maravillosas que me inspiran a crecer como individuo. Por brindarme la oportunidad de seguir acumulando éxitos y experiencias como profesionista, por permitirme alcanzar un peldaño académico más. ¡Gracias por estar siempre a mi lado!
- ❖ A mi madre, Lizbeth Anaya Lara, por su infinito amor, porque gracias a ella soy lo que soy. Gracias por enseñarme a luchar por mis sueños e ideales, por encauzar mi camino desde pequeña con ese gran amor y dedicación que te caracteriza, por sembrar en mí bases éticas y morales sólidas, por brindarme tu tiempo y apoyo a cada momento, por confiar en mí a pesar de mis imperfecciones. Porque gracias a ti entendí que no existen derrotas, sólo aprendizajes; por siempre tener las palabras de aliento perfectas cuando me siento perdida. Gracias por enseñarme a apreciar y valorar lo bueno en mi vida, y por sensibilizarme ante la grandeza, la belleza y la perfección de la obra de Dios. Es un honor ser tu hija, eres una mujer maravillosa, admirable y la mejor madre que me pudo dar la vida. ¡Te amo y te amaré eternamente!
- ❖ A mi hermana, Aída Pasaye Anaya, por ser mi mejor amiga y mi confidente. Gracias por caminar a mi lado sin importar las circunstancias, dándole fuerza y felicidad a mi andar. Mi amor por tí siempre será infinito e inquebrantable. ¡Te amo!
- ❖ A mis tíos, Olimpo Anaya Lara, Marco Antonio Anaya Lara, Edgar Anaya Lara, Homero Anaya Lara y Raúl Anaya Lara. Gracias por estar siempre pendientes de mí, brindándome su amor, su apoyo y sus valiosos consejos, gracias por creer en mí. Soy muy afortunada, tengo cinco padres en lugar de uno. ¡Los amo!

- ❖ A mi maravilloso esposo, Sergio González Hernández, porque a pesar de las dificultades siempre ha sabido sostenerme, demostrándome su amor y compromiso incondicional a cada paso. Gracias por soñar conmigo y trabajar a mi lado para construir una hermosa realidad. ¡Te amo!
- ❖ A mis hermanas de luz, Darinka, Dalia, Carla y Jazmín, porque con ustedes no hay imposibles, porque la hermosa vibración de cada una bendice y enriquece mi propia vibración. Gracias por ser mis curanderas del alma.
- ❖ A mis amigos, Christian, Pepe, Domingo, Sandra y Sandrita, porque siempre me tienden la mano sin esperar nada a cambio, gracias por su valioso tiempo y los increíbles momentos vividos.
- ❖ A Victor Manuel Calderón Vieyra, por ofrecerme su apoyo a lo largo de estos años, pues a veces la familia no sólo es aquella por la que corre la misma sangre.
- ❖ Al Dr. Jesús Campos García, a la Técnico Alma L. Díaz Pérez y a la Dra. Ana Alejandra Vargas Tha por su paciencia, entusiasmo e inigualable apoyo durante este trayecto académico. Así mismo, agradezco al Dr. Agustín J. Castro Montoya, la Dra. Ma. del Carmen Chávez Parga y el Dr. José Ma. Ponce Ortega, por ayudarme a mejorar la calidad de mi investigación a través de su amplia experiencia y conocimiento.
- ❖ A la UMSNH por acogerme y contribuir nuevamente a mi formación profesional, y al ITM por brindarme apoyo cuando lo requerí aún después de tantos años.
- ❖ Al CONACYT por confiar en mí y proporcionarme los medios económicos para realizar esta investigación. Gracias por creer en el poder infinito de la Ciencia.

ÍNDICE

	Pág.
I. INTRODUCCIÓN	1
II. MARCO TEÓRICO	3
2.1 Generalidades del 2,3-butanodiol	3
2.2 Producción de 2,3-butanodiol	4
2.2.1 Obtención por método sintético	4
2.2.2 Obtención por método biológico	5
2.3 Obtención de 2,3-butanodiol a partir de residuos lignocelulósicos	6
2.3.1 Residuos lignocelulósicos	6
2.3.1.1 Celulosa	7
2.3.1.2 Hemicelulosa	7
2.3.1.3 Lignina	7
2.3.2 Proceso de obtención de 2,3-butanodiol a partir de residuos lignocelulósicos	9
2.3.2.1 Pretratamiento	9
2.3.2.2 Sacarificación o hidrólisis enzimática	10
2.3.2.3 Fermentación	10
2.3.3 Microorganismos empleados para la obtención de 2,3-butanodiol usando residuos lignocelulósicos como materia prima	11
2.3.3.1 <i>Klebsiella oxytoca</i>	12
2.4 Obtención de 2,3-butanodiol a partir de bagazo de <i>Agave cupreata</i>	13
2.4.1 El <i>Agave</i> y la producción de mezcal	13

2.4.2 Bagazo de <i>Agave cupreata</i>	14
III. ANTECEDENTES	16
HIPÓTESIS	30
OBJETIVOS	30
IV. METODOLOGÍA	31
4.1 Materia prima	31
4.2 Obtención de cepas nativas del bagazo de agave	31
4.2.1 Medios de cultivo empleados	31
4.2.2 Aislamiento y purificación de cepas	32
4.2.3 Mantenimiento de microorganismos	32
4.3 Selección de la cepa productora de 2,3-butanodiol	32
4.3.1 Prueba de Voges-Proskauer	32
4.3.2 Fermentación en medio complejo	33
4.3.2.1 Cuantificación de metabolitos	34
4.3.3 Selección e identificación molecular de la cepa productora de 2,3-butanodiol	35
4.4 Fermentación en medio sintético con la cepa <i>Klebsiella oxytoca</i> UM2-17	35
4.4.1 Fermentación en medio mineral	35
4.4.2 Crecimiento y producción de 2,3-butanodiol en medio mineral	37
4.5 Fermentación en hidrolizado de bagazo de agave con la cepa <i>Klebsiella oxytoca</i> UM2-17	38
4.5.1 Obtención de hidrolizado de bagazo de agave	38
4.5.1.1 Pretratamiento	38
4.5.1.2 Hidrólisis enzimática o sacarificación	39

4.5.2 Fermentación en hidrolizado de bagazo de agave	40
V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	42
5.1 Aislamiento y purificación de microorganismos	42
5.2 Identificación de cepas productoras de 2,3-butanodiol	42
5.3 Selección de la cepa productora de 2,3-butanodiol usando medio complejo	43
5.4 Producción de 2,3-butanodiol por <i>Klebsiella oxytoca</i> UM2-17 en medio mineral	47
5.5 Cinética de crecimiento y producción de 2,3-butanodiol de <i>Klebsiella oxytoca</i> UM2-17 en medio mineral con glucosa/xilosa	50
5.6 Composición química del bagazo de <i>Agave cupreata</i> y sus hidrolizados	55
5.7 Producción de 2,3-butanodiol de <i>Klebsiella oxytoca</i> UM2-17 usando hidrolizado de bagazo de <i>Agave cupreata</i>	57
VI. CONCLUSIÓN	61
VII. PERSPECTIVAS A FUTURO	62
VIII. REFERENCIAS	63

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 4.1 Composición del medio mínimo mineral M9	36
Tabla 4.2 Formulaciones probadas como medio de fermentación	36
Tabla 4.3 Composición de los medios minerales utilizados	38
Tabla 5.1 Resultados de la prueba de Voges-Proskauer	43
Tabla 5.2 Producción de metabolitos de las cepas aisladas en medio YPD	44
Tabla 5.3 Producción de 2,3-butanodiol por <i>Klebsiella oxytoca</i> UM2-17 en medio mineral	50
Tabla 5.4 Crecimiento y producción de 2,3-butanodiol en medio mineral M1 con glucosa/xilosa por <i>Klebsiella oxytoca</i> UM2-17	54
Tabla 5.5 Parámetros cinéticos de la producción de 2,3-butanodiol en la fermentación batch de <i>Klebsiella oxytoca</i> UM2-17 utilizando medio mineral M1 con glucosa/xilosa	54
Tabla 5.6 Producción de 2,3-butanodiol de <i>Klebsiella oxytoca</i> UM2-17 en fermentaciones batch de medio mineral e hidrolizado de bagazo de <i>Agave cupreata</i>	60

INDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 2.1 Estereoisómeros del 2,3-butanodiol	3
Figura 2.2 Reacción de la síntesis química del 2,3-butanodiol	4
Figura 2.3 Ruta metabólica de la producción de 2,3-butanodiol a partir del piruvato	6
Figura 2.4 Estructura de la celulosa	7
Figura 2.5 Estructura de la hemicelulosa	7
Figura 2.6 Posible estructura de la lignina	8
Figura 2.7 Estructura de la biomasa lignocelulósica	8
Figura 2.8 Etapas del proceso de obtención de 2,3-butanodiol a partir de residuos lignocelulósicos	11
Figura 2.9 Cultivos de <i>Klebsiella oxytoca</i> obtenidos en la presente investigación	12
Figura 2.10 Proceso de elaboración del mezcal	14
Figura 2.11 Tiradero clandestino de bagazo de agave	14
Figura 2.12 <i>A. cupreata</i> (Etúcuaro, Mich.)	15
Figura 2.13 <i>A. cupreata</i> : a) hojas, b) quiole, c) semillas, d) flor	15
Figura 2.14 Bagazo de <i>A. cupreata</i>	15
Figura 4.1 Prueba de Voges-Proskauer	33
Figura 4.2 Inoculación de cepas	33
Figura 4.3 Fermentación en medio sintético y muestras tomadas	34
Figura 4.4 Preparación de las muestras	34
Figura 4.5 Patrones	34
Figura 4.6 Sistema HPLC utilizado ..	35
Figura 4.7 Fermentación en medio mineral	37

Figura 4.8 Adaptación en medio mineral	38
Figura 4.9 Medios A, B, C y D al final de la fermentación	38
Figura 4.10 Preparación y molienda del bagazo	39
Figura 4.11a Bagazo antes y después de la hidrólisis ácida	39
Figura 4.11b Hidrolizados ácidos	39
Figura 4.11c Sólido residual	39
Figura 4.12 Sacarificación	40
Figura 4.13 Separación del hidrolizado	40
Figura 4.14a Hidrolizado enzimático obtenido	40
Figura 4.14b Sólido residual	40
Figura 4.15 Adaptación al medio mineral	41
Figura 4.16 Fermentación en hidrolizado de bagazo de agave	41
Figura 5.1 Algunos de los microorganismos aislados del bagazo de agave	42
Figura 5.2 Comparación de la producción de 2,3-butanodiol por las cepas 2-17, 3-7 y 3-19	45
Figura 5.3 Metabolismo de la cepa 2-17	46
Figura 5.4 Metabolismo de la cepa 3-7	46
Figura 5.5 Metabolismo de la cepa 3-19	46
Figura 5.6 Crecimiento y producción de 2,3-butanodiol de <i>Klebsiella oxytoca</i> UM2-17 en medio mineral M1	48
Figura 5.7 Crecimiento y producción de 2,3-butanodiol de <i>Klebsiella oxytoca</i> UM2-17 en medio mineral M2	49
Figura 5.8 Crecimiento y producción de 2,3-butanodiol de <i>Klebsiella oxytoca</i> UM2-17 en medio mineral M3	49
Figura 5.9 Crecimiento y producción de 2,3-butanodiol de <i>Klebsiella oxytoca</i> UM2-17 en medio M1 con 100 g L ⁻¹ de glucosa	52
Figura 5.10 Crecimiento y producción de 2,3-butanodiol de <i>Klebsiella oxytoca</i> UM2-17 en medio M1 con 100 g L ⁻¹ de xilosa	52
Figura 5.11 Crecimiento y producción de 2,3-butanodiol de <i>Klebsiella oxytoca</i>	

UM2-17 en medio M1 con 50 g L ⁻¹ de glucosa y 50 g L ⁻¹ de xilosa	53
Figura 5.12 Crecimiento y producción de 2,3-butanodiol de <i>Klebsiella oxytoca</i> UM2-17 en medio M1 con 150 g L ⁻¹ de glucosa y 15 g L ⁻¹ de xilosa	53
Figura 5.13 Balance de masa de la producción de 2,3-butanodiol a partir de bagazo de <i>Agave cupreata</i>	56
Figura 5.14 Producción de 2,3-butanodiol de <i>Klebsiella oxytoca</i> UM2-17 en la fermentación batch del hidrolizado de bagazo de <i>Agave cupreata</i>	60

I. INTRODUCCIÓN

El petróleo ha sido la principal fuente de energía a nivel mundial desde los inicios de la era industrial, sin embargo, el uso desenfrenado de los recursos energéticos en las últimas décadas ha conducido al agotamiento progresivo de las reservas fósiles. La problemática ambiental y socioeconómica asociada al uso y las constantes fluctuaciones en el precio del petróleo, obligan a buscar fuentes de energía alternativas que satisfagan las necesidades de la vida moderna con un mínimo impacto ambiental.¹

² Por ello, en los últimos años la atención se ha centrado en el desarrollo de tecnologías que permitan el aprovechamiento de la biomasa, la única materia prima renovable conocida hasta el momento, para obtener productos químicos de alto valor agregado. En este sentido, los residuos lignocelulósicos poseen un gran potencial, pues no tienen valor económico en el contexto donde se generan, pero por su composición química pueden ser utilizados como materia prima en la síntesis de diversos productos de interés industrial.^{2, 3}

El bagazo de agave es un residuo lignocelulósico procedente de la elaboración de mezcal y tequila en México a partir de diferentes especies de *Agave*, anualmente se producen miles de toneladas que conllevan a problemas de disposición, pero puede utilizarse como insumo para producir compuestos como el 2,3-butanodiol. Este alcohol es un compuesto químico básico (*bulk chemical*) empleado en la producción de plásticos, suavizantes, insecticidas, fármacos, cosméticos, perfumes, tintas, explosivos y combustibles, por lo que presenta una alta demanda en el mercado global. La síntesis biológica del 2,3-butanodiol a partir de bagazo de agave representa una opción sostenible para reducir la dependencia de los materiales fósiles. Sin embargo, las investigaciones sobre la revalorización biotecnológica del bagazo de agave se han enfocado en la obtención de biocombustibles, edulcorantes y ácidos orgánicos, pero nunca de 2,3-butanodiol; además, se ha usado principalmente bagazo de la especie *Agave tequilana*, dejando de lado a otras especies de igual importancia como el *Agave cupreata*, una especie endémica de Michoacán y Guerrero ampliamente utilizada para producir mezcal.⁴⁻⁹

En general, la investigación sobre la producción del 2,3-butanodiol a partir de residuos lignocelulósicos es escasa, y hasta donde se tiene conocimiento, no existen reportes que evalúen la formación del diol empleando bagazo de *Agave cupreata* como materia prima. Por tanto, el objetivo de este trabajo fue obtener 2,3-butanodiol a partir de la fermentación del hidrolizado enzimático de bagazo de *Agave cupreata* usando una cepa aislada de bagazo de agave pútrido.

II. MARCO TEÓRICO

2.1 Generalidades del 2,3-butanodiol

El 2,3-butanodiol (2,3-BD) es un diol de fórmula molecular $C_4H_{10}O_2$. Este alcohol también conocido como 2,3-butilenglicol, dimetilenglicol o dimetiletilenglicol, es un líquido denso, inodoro, incoloro, de sabor dulce, con un peso molecular de 90.12 g mol^{-1} , un punto de ebullición de 177°C y un punto de fusión de 19°C .¹⁰⁻¹²

El consumo del 2,3-BD en el mercado actual es alto, esto se debe a que es precursor de compuestos químicos importantes como la metiletilcetona, usada en el ámbito de los combustibles, resinas, pinturas, adhesivos y tintas; el 1,3-butadieno, empleado en la producción de caucho sintético, poliéster y poliuretanos; y varias poliamidas, utilizadas para fabricar cosméticos, perfumes y fármacos. Este diol también tiene aplicación en la producción de plásticos, solventes, fumigantes y agentes suavizantes; se usa como agente anticongelante y como combustible de aviación; y sus precursores, la acetoína y el diacetilo, son aditivos alimentarios.^{6, 8, 11-14} La demanda global del 2,3-BD al 2011 se estimó en 32 millones de t, lo que equivale a 43 billones de dólares en ventas, con un incremento anual de producción entre el 4-7%.^{10, 12, 15, 16}

El 2,3-BD es uno de los isómeros del butanodiol y puede existir en tres formas isoméricas: *D*-(-)-, *L*-(+)- y *meso*- (Fig. 2.1). El isómero formado depende del microorganismo que lo generó, pero usualmente se produce una mezcla de dos estereoisómeros.^{8, 11, 12, 17, 18}

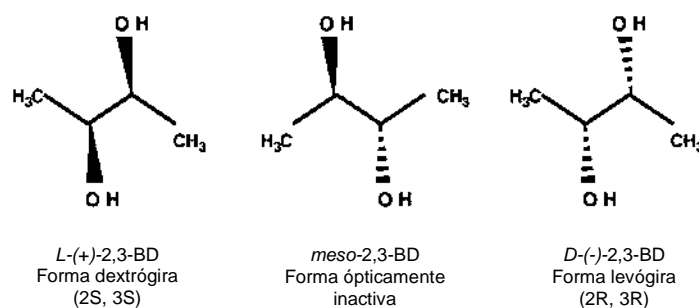


Figura 2.1 Estereoisómeros del 2,3-butanodiol.
(Celinska y Grajek, 2009)

El 2,3-BD es menos tóxico para los microorganismos que otros alcoholes como el etanol y el butanol, por lo que es posible obtener mayores rendimientos.¹⁹⁻²²

La función biológica del 2,3-BD no ha sido completamente definida, pero se ha relacionado con tres posibles cometidos: 1) servir como fuente de carbono cuando el sustrato se agota o su concentración es muy baja, 2) prevenir la acidificación intracelular, y 3) regular la proporción de NADH/NAD⁺ en la célula.^{8, 11, 23}

2.2 Producción de 2,3-butanodiol

La producción microbiana del 2,3-BD se remonta al siglo pasado. Se investigó por primera vez en 1906, llevándose a escala industrial en 1933 y fue ampliamente utilizado durante la Segunda Guerra Mundial para producir 1,3-butadieno y fabricar caucho sintético, pues el natural era escaso en ese momento. El proceso fue abandonado debido a la introducción de las tecnologías petroquímicas, pero en la década de los 70's se retomó el interés en su obtención por medios biológicos, debido a la disminución de los recursos fósiles y el continuo incremento en el precio del petróleo.^{2, 11, 13, 24}

2.2.1 Obtención por método sintético

La síntesis química del 2,3-BD se lleva a cabo a partir del 2,3-metil-oxaciclopropano, el cual se obtiene por cloración y posterior ciclación de la fracción de los hidrocarburos C₄, previa separación del butadieno y el isobuteno. Posteriormente, el 2,3-metil-oxaciclopropano se somete a una hidrólisis ácida, a una temperatura entre 160-220°C y una presión de 50 bar (Fig. 2.2).²

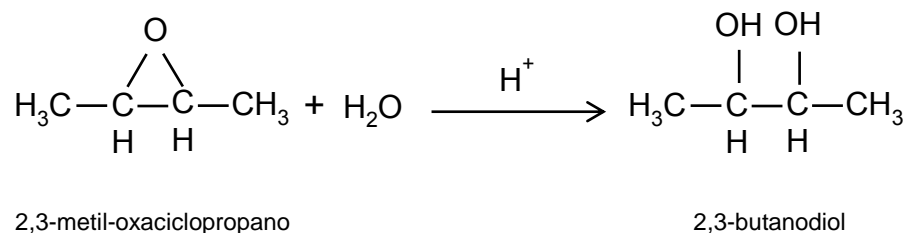


Figura 2.2 Reacción de la síntesis química del 2,3-butanodiol.
(Ripoll, 2017)

2.2.2 Obtención por método biológico

Comparada con la síntesis química, la producción biotecnológica del 2,3-BD es un proceso más sencillo y económico, especialmente cuando se usan materias primas renovables, pues el precio del sustrato se encuentra entre los costos más significativos de un bioproceso.^{2, 23}

El 2,3-BD se obtiene biológicamente a través de la fermentación butanodiólica. La ruta parte del piruvato generado durante la glucólisis o la ruta de la pentosa fosfato, e inicia cuando dicha molécula sufre una descarboxilación y es transformada en α -acetolactato por acción de la enzima α -acetolactato sintasa (α -ALS), luego el α -acetolactato puede seguir dos vías: 1) bajo condiciones de oxígeno limitado o anaeróbicas, la molécula es convertida en acetoína mediante la enzima α -acetolactato descarboxilasa (α -ALD); o 2) bajo condiciones aeróbicas es descarboxilado espontáneamente y forma diacetilo, el cual es transformado en acetoína por acción de la enzima diacetilo reductasa (DAR, también conocida como acetoína deshidrogenasa). En cualquier caso, la acetoína formada da lugar al 2,3-BD en una reacción catalizada por la enzima acetoína reductasa (AR, también conocida como butanodiol deshidrogenasa) (Fig. 2.3).^{8, 11, 12, 17, 25-27} El rendimiento teórico de la conversión de glucosa a 2,3-BD es 0.5 g g^{-1} y la reacción global del proceso es la siguiente:



Además del 2,3-BD, es posible obtener subproductos como etanol, acetato, formato, lactato y succinato; pero depende del microorganismo utilizado y las condiciones operativas del proceso fermentativo.^{11, 13, 23}

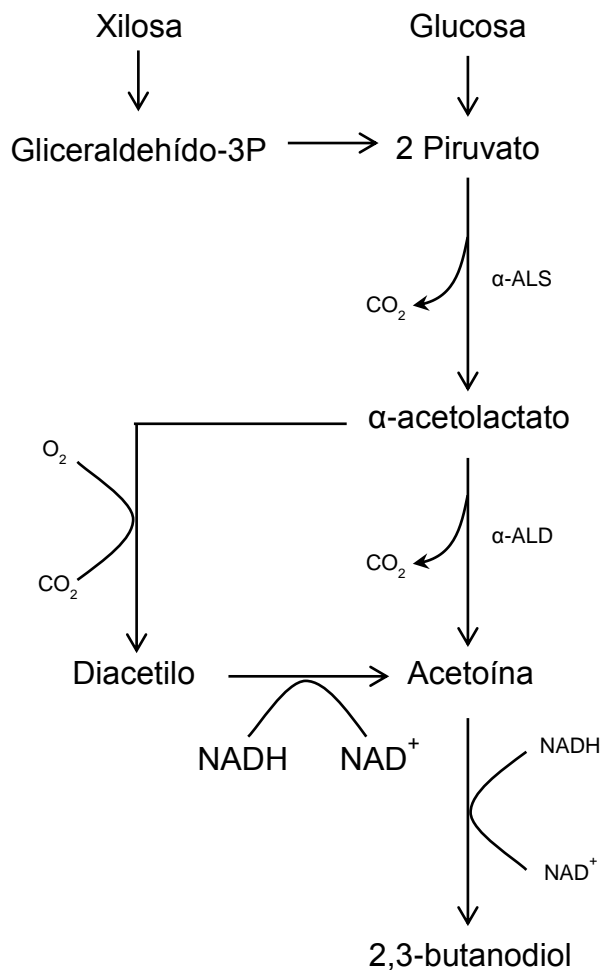


Figura 2.3 Ruta metabólica de la producción de 2,3-butanodiol a partir de piruvato.
(Elaboración propia)

2.3 Obtención de 2,3-butanodiol a partir de residuos lignocelulósicos

2.3.1 Residuos lignocelulósicos

Los residuos lignocelulósicos (RLC) son los desechos generados en las actividades agroindustriales. La lignocelulosa es el componente principal de la pared celular vegetal, por ende es el material renovable más barato y abundante del mundo; anualmente se generan 200,000 millones de t de RLC,^{26, 28-31} provenientes en gran parte de actividades agroindustriales. Los RLC están constituidos por tres fracciones principales: celulosa (40-60%), hemicelulosa (20-40%) y lignina (10-25%) (Fig. 2.7); cuya proporción varía dependiendo de la especie y edad de la planta.^{1, 28, 32-35}

2.3.1.1 Celulosa

Es un polímero de D-Glucosa unido por enlaces β -1,4 glucosídicos que forma una estructura cristalina resistente a la hidrólisis, con algunas regiones amorfas susceptibles a la degradación enzimática (Figuras 2.4 y 2.7).^{29, 32, 33, 36-38}

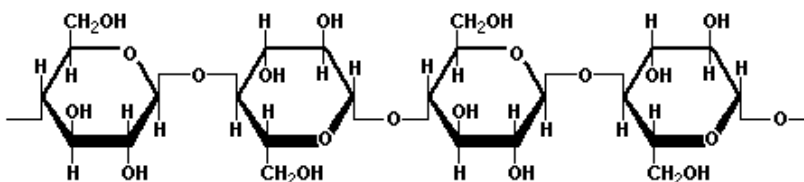


Figura 2.4 Estructura de la celulosa.
(Zamora, 2019)

2.3.1.2 Hemicelulosa

Es un polímero complejo de heteropolisacáridos que generalmente contiene 15% de hexosas (D-glucosa, D-manosa y D-galactosa) y 85% de pentosas (D-xilosa 75% y L-arabinosa 10%), además de ácidos metilglucurónico, galacturónico y glucurónico (Fig. 2.5). La hemicelulosa es más fácil de hidrolizar que la celulosa, su función es enlazar la celulosa y la lignina (Fig. 2.7).^{1, 32, 35, 37, 38}

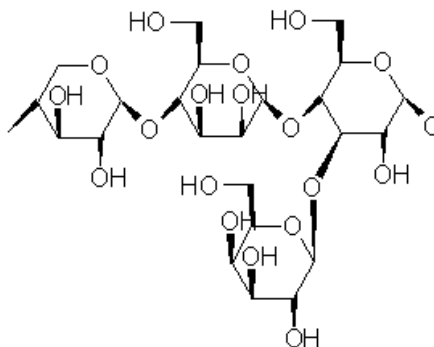


Figura 2.5 Estructura de una hemicelulosa.
(Wikipedia, 2019)

2.3.1.3 Lignina

Es un heteropolímero amorfo ramificado de naturaleza fenólica, compuesto a base de alcohol cumarílico, alcohol coniferílico y alcohol sinapílico (Fig. 2.6). La lignina brinda soporte estructural, impermeabilidad y protección a la celulosa y la hemicelulosa.

Es altamente resistente a la degradación química y biológica y su estructura aún no ha sido definida (Fig. 2.7).^{29, 32, 35, 37}

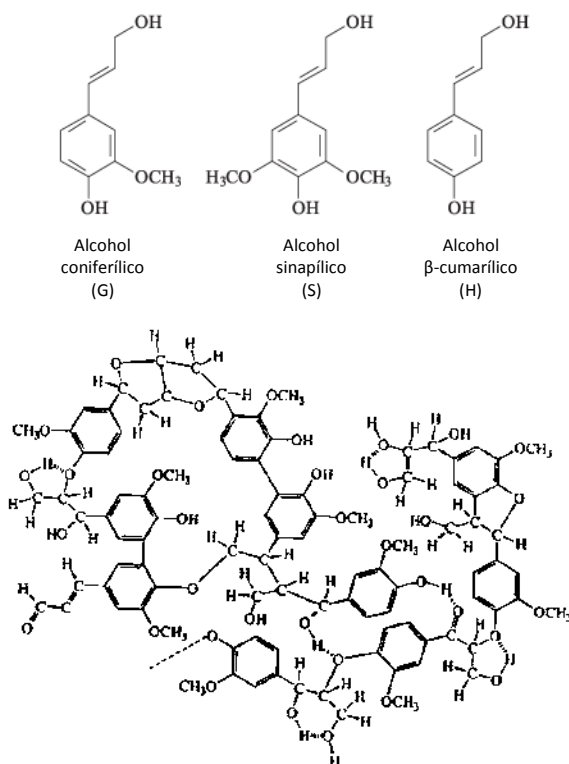


Figura 2.6 Posible estructura de la lignina.
(Abreu, 2013; Wikipedia, 2019)

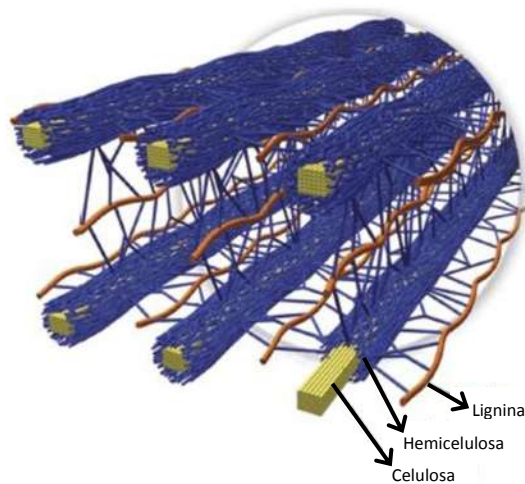


Figura 2.7 Estructura de la biomasa lignocelulósica.
(Abreu, 2013)

2.3.2 Proceso de obtención de 2,3-butanodiol a partir de residuos lignocelulósicos

Los RLC pueden ser utilizados como materia prima para la producción de 2,3-BD. Esto implica la transformación microbiana de los azúcares contenidos en los RLC, en un proceso complejo que consta de tres etapas principales: pretratamiento, sacarificación o hidrólisis enzimática y fermentación (Fig. 2.8).^{8, 39}

2.3.2.1 Pretratamiento

El pretratamiento tiene como finalidad disminuir la cristalinidad de la celulosa, aumentar el área superficial, separar la hemicelulosa de la celulosa y eliminar la lignina, para facilitar la accesibilidad de las enzimas en la siguiente etapa del proceso.^{3, 28, 31, 36, 40} Sin embargo, está limitado por la recalcitrancia de los RLC, la formación de compuestos inhibidores del crecimiento microbiano (derivados del furano, ácidos débiles y compuestos fenólicos), la degradación parcial o total de los azúcares y el uso extensivo de químicos, agua y energía. No obstante, estos procedimientos incrementan el rendimiento de la siguiente etapa entre 20-90%.^{8, 28, 31, 32, 36, 40}

El pretratamiento puede ser mecánico, físico, químico, físico-químico y/o biológico. Los métodos mecánicos incluyen el astillado, trituración y molienda; los físicos irradiación, termohidrólisis y pirólisis; los químicos hidrólisis ácida, extracción alcalina, organosolv (proceso con solventes orgánicos), ozonólisis, uso de peróxidos y líquidos iónicos; los físico-químicos explosión de vapor, explosión supercrítica de CO₂, explosión de fibra de amonio (AFEX) y oxidación con aire húmedo; y los biológicos utilizan microorganismos, como los hongos de la podredumbre blanca, marrón o blanda.^{28, 33, 41, 42}

La hidrólisis ácida es uno de los métodos más utilizados. Su principal inconveniente es la degradación de la glucosa a 5-hidroximetil-furfural, el cual a su vez forma ácido levulinico y ácido formico, así como la degradación de las pentosas a furfural. El proceso ocurre cuando una molécula de agua se disocia y el H⁺ liberado se une al oxígeno del extremo de una de las moléculas de azúcar, mientras que el OH⁻ se une al carbono libre del otro residuo de azúcar, liberando así los monosacáridos.⁴³

2.3.2.2 Sacarificación o hidrólisis enzimática

La sacarificación es un proceso altamente específico que requiere poca energía debido a que se realiza bajo condiciones ambientales normales, no es corrosivo, no genera inhibidores ni residuos y se obtienen mejores rendimientos. Involucra tres grupos de enzimas distintas de origen fúngico o bacteriano, que actúan de manera sinérgica: celulasas, hemicelulasas y ligninasas.^{3, 28, 31, 37, 40} Las celulasas engloban un conjunto de enzimas que hidrolizan la celulosa cristalina en pequeños oligosacáridos y posteriormente en glucosa, son tres: las β -1-4-endoglucanasas (EGs) que cortan las regiones amorfas de la celulosa dejando extremos libres, las β -1-4-exoglucanasas o celobiohidrolasas (CBHs) que actúan sobre los extremos reductor y no reductor de las cadenas de celulosa liberando glucosa o celobiosa, y las β -glucosidasas (BG) que hidrolizan la celobiosa para liberar dos moléculas de glucosa. Por otro lado, las hemicelulasas hidrolizan la hemicelulosa en azúcares monoméricos, las más importantes son las xilanasas, las xilosidasas y las glucuronidasas. Por último, las ligninasas degradan y mineralizan la lignina, las principales son las manganeso peroxidadas y las ligninoperoxidasas, que catalizan reacciones oxidativas dependientes del peróxido de hidrógeno, y las lacasas que oxidan los compuestos fenólicos y reducen el oxígeno molecular a agua.^{28, 29, 31, 36} Sus principales limitantes son el costo de las enzimas y su accesibilidad a las cadenas poliméricas. Por ello, la elección del sustrato y el método de pretratamiento, o incluso la adición de otras sustancias (tensoactivos, proteínas no catalíticas, proteínas funcionales, etc.) adquieren vital importancia.²⁸ Generalmente el sustrato requiere una detoxificación previa que elimine los compuestos inhibidores formados en la etapa previa.^{40, 44, 45}

2.3.2.3 Fermentación

En esta etapa los monosacáridos son transformados en 2,3-butanodiol por acción de un microorganismo. La parte medular de la fermentación (FM) es el microorganismo que se utiliza, pues su elección no se limita a que pueda llevar a cabo la reacción deseada, sino también a que pueda efectuarla en un menor tiempo con el mayor rendimiento posible. El proceso puede ser por lotes (*batch*), discontinuo

alimentado (*fed-batch*) o continuo; dependiendo de las propiedades cinéticas del microorganismo, el medio de FM y los recursos económicos con que se cuenten.^{22, 32}

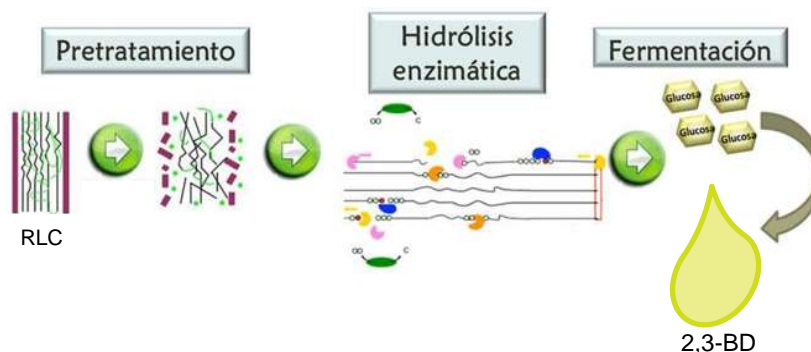


Figura 2.8 Etapas del proceso de obtención de 2,3-butanodiol a partir de residuos lignocelulósicos. (Oliva y Dufour, 2014)

2.3.3 Microorganismos empleados para la obtención de 2,3-butanodiol usando residuos lignocelulósicos como materia prima

El microorganismo empleado para llevar a cabo la FM 2,3-butilenglicólica es parte medular del proceso. Por ello, la gama de microorganismos estudiados para producir este diol es extensa, aunque las cepas bacterianas son las más utilizadas. Entre ellas se encuentran: *Aeromonas hydrophila*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus polymyxa*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Corynebacterium glutamicum*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella terrigena*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactococcus lactis*, *Leuconostoc lactis*, *Oenococcus oeni*, *Pediococcus pentosaceus*, *Serratia marcescens*, *Streptococcus faecalis* y *Escherichia coli*.^{11, 46-60}

Sin embargo, aunque varias especies microbianas son capaces de acumular 2,3-BD, sólo algunos pueden hacerlo de manera significativa. En este sentido, los microorganismos que destacan son bacterias pertenecientes a los géneros *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Bacillus* y *Serratia*; de ellos, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca* y *Paenibacillus polymyxa* (también conocida como *Bacillus polymyxa*) son considerados como los productores de 2,3-BD por excelencia, aunque las especies de *Klebsiella*

producen al menos el doble de producto que *P. polymyxa*. De hecho, con *K. oxytoca* se han reportado concentraciones finales de 2,3-BD cercanas a 100 g L⁻¹ (FM *fed-batch*) y rendimientos superiores al 90% del máximo teórico.^{8, 11, 25, 61, 62}

2.3.3.1 *Klebsiella oxytoca*

El género *Klebsiella* produce 2,3-BD con altos rendimientos a partir de una amplia gama de sustratos y bajo un amplio rango de condiciones operativas. De manera específica, *Klebsiella oxytoca* es una bacteria Gram-negativa con forma de bacilo, de 0.3–1 µm de diámetro y 0.6–6 µm de longitud, no mótil, a menudo rodeada por una cápsula de polisacárido hidrofílico espesa responsable del aspecto de sus colonias, diazotrófica, anaerobia facultativa, capaz de metabolizar tanto pentosas como hexosas; lo cual es particularmente útil cuando se trabaja con hidrolizados derivados de RLC, pues éstos generalmente contienen pentosas.^{6, 11, 13, 56, 63} Produce una mezcla de L(+)- y meso-2,3-BD, siendo capaz de acumular hasta 130 g L⁻¹ del diol sin sufrir inhibición, y es la única especie del género que produce un compuesto amarillo soluble en todas las cápsulas que muestran cierto crecimiento. Sus colonias son lactosa positivas, pulvinadas, de 3-4 mm de diámetro después de una incubación de 18-24 h a 30°C o 37°C, de aspecto brillante y mucoso (ocasionalmente pegajoso, dependiendo de la cepa y la composición del medio de cultivo) con tendencia a confluir.⁶⁴ En medios líquidos se forma un anillo viscoso en la superficie que aparece a las 24 h aproximadamente, y un depósito mucoso en el fondo del contenedor (Fig. 2.9).^{11, 64-66}



Figura 2.9 Cultivos de *K. oxytoca* obtenidos en la presente investigación.

A partir de 1984 y hasta el 2017, se publicaron 50 trabajos sobre la obtención de 2,3-BD usando a *K. oxytoca* como organismo fermentador; sin embargo, el número de publicaciones se reduce cuando el sustrato es un RLC.² Se ha utilizado esta cepa para

fermentar melazas⁶⁷, hidrolizados de mazorcas de maíz^{10, 68}, hidrolizados de cáscaras de *Jatropha*⁶⁹, hidrolizados de madera²¹, hidrolizados de tallos de sorgo⁶⁶, hidrolizados de pasto varilla¹⁵, suero y agua residual de yuca⁴¹, e hidrolizados de *Golenkinia*¹⁸.

2.4 Obtención de 2,3-butanodiol a partir de bagazo de *Agave cupreata*

2.4.1 El *Agave* y la producción de mezcal

El *Agave* es una planta de la familia Agavaceae, posee hojas largas y fibrosas de forma lanceolada de color verde azulada. La parte utilizada es la cabeza o piña, la cual actúa como tallo y base de las hojas. El género cuenta con más de 200 especies (75% de ellas localizadas en México) y es oriundo de las regiones áridas y tropicales comprendidas desde el sur de los Estados Unidos hasta el norte de Sudamérica. Se utiliza para la elaboración de bebidas alcohólicas como el mezcal, el tequila, el pulque y el bacanora.^{71, 72}

Específicamente, el mezcal es una bebida alcohólica tradicional mexicana, producida en muchas áreas rurales de México, que se obtiene a partir de la FM alcohólica de los azúcares obtenidos de las piñas del *Agave*. El proceso de elaboración comprende cinco etapas: 1) corte, que consiste en fraccionar la piña en dos o más pedazos, 2) cocción, que tiene por objeto hidrolizar los polímeros contenidos en las piñas, e implica colocarlas en un horno “de tierra” con piedras calentadas con leña durante tres a cuatro días, 3) molienda, que consiste en cortar las piñas en trozos pequeños y triturarlos en un molino para extraer el jugo azucarado, 4) fermentación, donde los azúcares son transformados en alcohol por acción microbiana, en un tiempo aproximado de seis a diez días y 5) destilación, que es la purificación del alcohol en equipos denominados alambiques (Fig. 2.10).^{71, 73} De acuerdo con el Consejo Regulador del Mezcal (CRM)⁷⁴, en el 2018 se envasaron 5,914,200 L de esta bebida, de los cuales 2,491,909 L fueron para el mercado Nacional y 3,422,291 L para el mercado de exportación.



Figura 2.10 Proceso de elaboración del mezcal. De izquierda a derecha: corte, cocción, molienda, fermentación y destilación. (*Elaboración propia*)

El residuo lignocelulósico derivado de la elaboración de mezcal es lo que se conoce como bagazo de agave y contiene aproximadamente 43% de celulosa, 19% de hemicelulosa y 15% de lignina en peso seco (p/p). Este residuo no tiene utilidad dentro del proceso, pero se generan miles de toneladas anuales. Según Gurrola (2016)⁷⁵, en 2012 se produjeron 29,375 t de bagazo de agave en México; lo que constituye un fuerte problema de disposición para los productores y conlleva a distintas problemáticas ambientales (Fig. 2.11).^{71, 72, 76, 77}



Figura 2.11 Tiradero clandestino de bagazo de agave. (*Crespo, 2011*)

2.4.2 Bagazo de *Agave cupreata*

El *A. cupreata*, también conocido como gordito, papalote o mariposa, es una especie dispuesta en forma de roseta que puede alcanzar hasta 0.8 m de altura y 1 m de anchura, con hojas verde brillante ampliamente lanceoladas, espinas grandes y curvas de color cobre, inflorescencia de hasta seis metros, con flores amarillas en forma de embudo y que se reproduce por semilla. Este *Agave* es una de las especies silvestres más utilizadas en México para producir mezcal, es endémica de la cuenca del Río Balsas y sólo se encuentra en los estados de Michoacán y Guerrero, siendo este último uno de los estados con mayor producción de mezcal en México (1.7 millones de L/año), alcanzando el 1.8% de la producción en el 2018.^{5, 9, 71, 73, 74, 78}



Figura 2.12 *A. cupreata*
(Etúcuaro, Mich.)
(NaturaLista, 2019)



Figura 2.13 *A. cupreata*: a) hojas, b) quiote, c) semillas, d) flor.
(Elaboración propia)

El bagazo de *Agave cupreata* (BAC), al ser un RLC, puede ser aprovechado como materia prima para la obtención de diversos productos de interés industrial, entre ellos el 2,3-BD. El inconveniente es que la mayoría de las investigaciones se han centrado en el uso de bagazo de *A. tequilana* para producir etanol,^{7, 79-82} metano,^{83, 84} xilitol,⁷⁹ ácido succínico y ácido láctico,⁸⁵ dejando de lado el bagazo de otras especies igualmente importantes, como el *A. cupreata*.⁷⁴ Hasta el momento, los estudios sobre esta especie se enfocan únicamente en su distribución y diversidad genética en México o en la caracterización de los microorganismos involucrados en la producción de mezcal a partir de ella.^{5, 9, 71, 73}



Figura 2.14 Bagazo de *A. Cupreata*.
(Tomada de esta investigación)

III. ANTECEDENTES

A continuación se describen las investigaciones realizadas sobre la producción de 2,3-BD utilizando cepas de *Klebsiella* sp. o *K. oxytoca*, en medios sintéticos, hidrolizados de RLC y algunos residuos de origen no celulósico.

Fond *et al.* (1985) investigaron el efecto inhibitorio del butiletilenglicol y el ácido acético sobre el crecimiento y la producción de 2,3-BD de *K. oxytoca*. Para determinar ambos parámetros, realizaron fermentaciones *batch* sin control de pH en un medio sintético con 40 g L⁻¹ iniciales de xilosa, así mismo monitorearon el consumo de oxígeno controlando el pH a 5.5. Se reportó que *K. oxytoca* fue capaz de acumular hasta 130 g L⁻¹ de 2,3-BD sin sufrir inhibición, mientras que 0.45 g L⁻¹ de ácido acético inhibieron su crecimiento por completo.

Champluvier *et al.* (1989) analizaron el potencial de una cepa de *K. oxytoca* para sintetizar 2,3-BD utilizando lactosa, glucosa y galactosa como fuentes de carbono. Se realizaron fermentaciones *batch* en un medio sintético con lactosa o una mezcla de glucosa/galactosa, bajo diferentes condiciones de aireación y pH. La concentración inicial de azúcar en cada medio fue de 50 g L⁻¹, los valores de pH probados fueron 6.5, 6.0 y 5.0, y los valores fijados para el coeficiente de transferencia de oxígeno fueron 12 h⁻¹, 45 h⁻¹ y 91 h⁻¹. Los resultados indicaron que en el medio con lactosa no se detectó 2,3-BD, mientras que en el medio con glucosa/galactosa fue el principal metabolito, alcanzando una concentración de 18.8 g L⁻¹ a pH 6. Además, se observó que al aumentar la aireación, la biomasa se incrementó a expensas de la concentración de 2,3-BD, por lo que para lograr la producción del diol era necesario alcanzar una condición de oxígeno limitante.

Qureshi y Cheryan (1989) estudiaron el efecto del ácido láctico sobre el crecimiento y la producción de 2,3-BD de *K. oxytoca*. Llevaron a cabo fermentaciones *batch* en un medio con 80-100 g L⁻¹ de glucosa. Los datos obtenidos experimentalmente mostraron que, aunque las tasas de crecimiento fueron bajas, la concentración de 2,3-

BD se incrementó de 28 g L⁻¹ a 46 g L⁻¹ cuando se adicionaron 3 g L⁻¹ de lactato, con un rendimiento de 0.47 g g⁻¹ y una productividad de 0.64 g L⁻¹ h⁻¹; aunque el enriquecimiento del medio también incrementó la producción de etanol y ácido acético. Debido a lo anterior, se realizó otra FM *batch* en un medio con una concentración inicial de 219 g L⁻¹ de glucosa, adicionando el lactato cuando el crecimiento celular había cesado. Los autores indicaron que la concentración de 2,3-BD se incrementó a 81 g L⁻¹, con un rendimiento de 0.52 g g⁻¹ y una productividad de 0.65 g L⁻¹ h⁻¹, señalando que si bien el rendimiento obtenido fue superior al teórico máximo esperado para la glucosa, esto se debía a que la cepa utilizó el lactato como fuente de carbono y energía.

Afschar *et al.* (1991) evaluaron la producción de 2,3-BD a partir de la fermentación de melazas con una cepa de *K. oxytoca*. Para ello, realizaron fermentaciones en modo *batch*, *fed-batch* y continuo con reciclaje de células, controlando la aireación y agitación de los cultivos. Se indicó que a partir de 280 g L⁻¹ de melazas se obtuvieron 118 g L⁻¹ de 2,3-BD, con un rendimiento de 0.42 g g⁻¹ y una productividad de 2.40 g L⁻¹ h⁻¹; concluyendo que la FM por lotes aunada a una alta concentración inicial de sustrato permite obtener una alta concentración de 2,3-BD.

Eiteman y Miller (1995) examinaron el efecto del ácido succínico en la producción de 2,3-BD por *K. oxytoca*. Se utilizaron fermentadores tipo *batch* con un medio sintético que contenía 30 g L⁻¹ de xilosa, controlando el pH, la agitación y la aireación del proceso. La concentración inicial de ácido succínico en el medio se varió de 0 a 30 g L⁻¹. De acuerdo con los datos obtenidos, el incremento de ácido succínico en el medio promovió una mayor acumulación de 2,3-BD, obteniéndose una concentración máxima de 12.1 g L⁻¹ del diol con 30 g L⁻¹ iniciales de ácido, aunque el rendimiento (0.18 g g⁻¹) y la productividad (0.44 g L⁻¹ h⁻¹) fueron las más bajas de todas las fermentaciones. Los autores concluyeron que el ácido succínico no inhibe el crecimiento de la cepa por debajo de los 10 g L⁻¹ y que éste es utilizado como fuente de carbono cuando la xilosa se ha agotado, aumentando la concentración final de 2,3-BD.

Sivakumar *et al.* (1995) estudiaron el efecto de la urea sobre la producción de 2,3-BD por *K. oxytoca*. Se ejecutaron fermentaciones *batch* en un medio artificial con 50 g L⁻¹ de glucosa, con cultivos previamente adaptados y sin adaptar a la urea como fuente de nitrógeno, ajustando el pH a 6.8 y la agitación a 160 rpm. En la FM *batch* con adaptación preliminar del cultivo se obtuvo una concentración de 2,3-BD, una velocidad de crecimiento y un rendimiento de 17.25 g L⁻¹, 0.66 h⁻¹ y 0.35 g g⁻¹, respectivamente; en tanto que los cultivos no adaptados mostraron valores de 5 g L⁻¹ (aproximadamente), 0.29 h⁻¹ y 0.26 g g⁻¹ para los tres parámetros. Además, cuando se utilizó urea como fuente de carbono y nitrógeno no se observó crecimiento, probablemente debido a una inhibición por la alta concentración de urea en el medio.

Cao *et al.* (1997) obtuvieron 2,3-BD fermentando el hidrolizado de mazorcas de maíz con una cepa de *K. oxytoca*. El material se pretrató con una solución de amoníaco al 10% para remover la lignina, después se sometió a una hidrólisis con ácido clorhídrico al 1% (p/v) para separar las hemicelulosas, y el sólido remanente rico en celulosa (aproximadamente 90%) se sacarificó para emplearse como sustrato en un proceso de sacarificación y fermentación simultánea. Los autores reportaron que el pretratamiento fue efectivo, permitiendo utilizar una dosis baja de enzima y alcanzar 25 g L⁻¹ de 2,3-BD, con una productividad de 0.36 g L⁻¹ h⁻¹ a partir de 80 g L⁻¹ de celulosa; además, señalaron que el hidrolizado hemicelulósico y la lignina residual, dada su composición final, eran potencialmente utilizables para sintetizar otros productos de importancia industrial.

Wu *et al.* (2008) valoraron la capacidad de una cepa de *Klebsiella* sp. aislada de lodos activados para producir hidrógeno, 2,3-BD y etanol a partir de sacarosa. Se llevaron a cabo fermentaciones *batch* en un medio sintético con concentraciones iniciales de 8.9 g L⁻¹, 17.8 g L⁻¹ y 26.7 g L⁻¹ de sacarosa, con un pH inicial de 7.3, 6.4 y 5.5 (no controlado) y de 7.5, 6.25 y 5.5 (controlado con NaOH 3 N). El estudio mostró que el principal metabolito soluble generado por la cepa fue el 2,3-BD (42-58%), seguido del etanol (29-42%) y pequeñas cantidades de ácido láctico (10-11%) y ácido acético (3-5%); mientras que los productos gaseosos formados fueron principalmente

CO₂ (64-75%) e hidrógeno (25-36%). Así mismo, las mayores productividades para el hidrógeno, 2,3-BD y etanol fueron 0.59 g L⁻¹ h⁻¹, 1.22 g L⁻¹ h⁻¹ y 1.29 g L⁻¹ h⁻¹, respectivamente, utilizando 26.7 g L⁻¹ de sacarosa y un pH inicial de 7.3 (no controlado).

Ji *et al.* (2008) manipularon genéticamente una cepa de *K. oxytoca* para mejorar la producción de 2,3-BD. Construyeron 12 mutantes con la intención de reducir la formación de subproductos. Se llevaron a cabo fermentaciones *batch* en un medio artificial que contenía 100 g L⁻¹ de glucosa y se determinó la actividad de las enzimas involucradas en la formación de ácido láctico y ácido acético. Al final, se obtuvo una mutante capaz de producir 7.8% más de 2,3-BD, 88% menos ácido láctico y 92% menos ácido acético que la cepa silvestre.

Ji *et al.* (2009) investigaron la producción de 2,3-BD en un medio sintético con glucosa como fuente de carbono usando una cepa de *K. oxytoca* modificada genéticamente. Realizaron una FM *batch* en un medio con 200 g L⁻¹ de glucosa iniciales, controlando el suministro de oxígeno a través de la velocidad de agitación. Los autores concluyeron que la mejor estrategia consistía en llevar a cabo la FM en dos etapas con una velocidad de agitación distinta, en la primera etapa la velocidad debía ser mayor para generar una densidad celular alta, y en la segunda la velocidad debía disminuirse para favorecer la producción de 2,3-BD; de manera que cuando la biomasa permanecía constante, la acumulación del diol ocurría. La máxima concentración de 2,3-BD obtenida fue de 95.5 g L⁻¹, con un rendimiento de 0.49 g g⁻¹ y una productividad de 1.71 g L⁻¹ h⁻¹.

Cheng *et al.* (2010) utilizaron hidrolizado ácido de mazorca de maíz para producir 2,3-BD con una cepa de *K. oxytoca*. Los autores realizaron una FM *batch* y una *fed-batch*, controlando la adición de ácido acético y el pH del medio. La composición inicial del hidrolizado fue de 20 g L⁻¹ de glucosa, 120 g L⁻¹ de xilosa, 13 g L⁻¹ de arabinosa, 0.8 g L⁻¹ de celobiosa, 1.2 g L⁻¹ de galactosa y 0.7 g L⁻¹ de manosa. Se reportó que el ácido acético en el hidrolizado inhibió el crecimiento de la cepa pero favoreció el rendimiento del 2,3-BD, aunque la inhibición podía ser mitigada ajustando el pH del medio. En la FM

batch con pH optimizado se alcanzó una concentración de 2,3-BD de 25.7 g L⁻¹, un rendimiento de 0.49 g g⁻¹ y una productividad de 0.54 g L⁻¹ h⁻¹; mientras que en la FM *fed-batch* se obtuvo una concentración máxima de 2,3-BD de 35.7 g L⁻¹, un rendimiento de 0.5 g g⁻¹ y una productividad de 0.59 g L⁻¹ h⁻¹.

Ji *et al.* (2010) manipularon genéticamente una cepa de *K. oxytoca* para mejorar la producción de 2,3-BD. Construyeron mutantes deficientes en la formación de etanol y acetoína, y realizaron fermentaciones en un medio definido con 200 g L⁻¹ de glucosa para modo *batch* y 1000 g L⁻¹ totales para modo *fed-batch*; ajustando la agitación, aireación y pH a 200 rpm, 1 vvm y 6.5, respectivamente. Se reportó que las modificaciones metabólicas de la mutante lograron incrementar la producción de 2,3-BD y disminuir las concentraciones de los subproductos, obteniéndose 90.8 g L⁻¹ y 87.7 g L⁻¹ de 2,3-BD, rendimientos de 0.48 g g⁻¹ y 0.45 g g⁻¹ y productividades de 1.51 g L⁻¹ h⁻¹ y 1.46 g L⁻¹ h⁻¹ con la mutante y la cepa silvestre en modo *batch*, respectivamente; mientras que la FM *fed-batch* con la mutante arrojó una concentración de 130 g L⁻¹ de 2,3-BD, un rendimiento de 0.48 g g⁻¹ y una productividad de 1.63 g L⁻¹ h⁻¹.

Nie *et al.* (2011) propusieron una estrategia *fed-batch* con un método de alimentación controlado, basado en el pH del medio, para incrementar la producción de 2,3-BD en un medio artificial usando una cepa de *K. oxytoca* modificada genéticamente. La estrategia consistió en alimentar una mezcla de glucosa e hidróxido de sodio al medio de FM, para mantener el pH en un nivel adecuado, tanto para el crecimiento celular como para la formación de 2,3-BD. Primeramente, se realizó una FM *batch* en un medio con 220 g L⁻¹ de glucosa iniciales, manteniendo el pH en 6 con NaOH 3M; enseguida se efectuó una FM *fed-batch* alimentada con glucosa (*fed-batch1*) y finalmente una FM *fed-batch* alimentada con la mezcla de azúcar-base de acuerdo a las necesidades del medio (*fed-batch2*). Las fermentaciones en modo alimentado se iniciaron con 80 g L⁻¹ de glucosa y el pH se estableció entre 5.97-6.03. Los resultados mostraron que la producción de 2,3-BD fue eficiente, pues se lograron concentraciones de 86.2 g L⁻¹, 98.5 g L⁻¹ y 127.9 g L⁻¹, con rendimientos de 0.39 g g⁻¹, 0.43 g g⁻¹ y 0.48 g g⁻¹, y productividades de 1.06 g L⁻¹ h⁻¹, 1.37 g L⁻¹ h⁻¹ y 1.78 g L⁻¹ h⁻¹ para las fermentaciones en *batch*, *fed-batch1* y *fed-batch2*, respectivamente.

Ji *et al.* (2011) emplearon técnicas de ingeniería genética para eliminar la represión catabólica por glucosa en *K. oxytoca*, de manera que fuera capaz de metabolizar glucosa y xilosa simultáneamente para producir 2,3-BD. El crecimiento celular y el consumo de sustrato se analizó mediante fermentaciones por lotes en un medio sintético con mezclas de glucosa (G) y xilosa (X) como sigue: 40 g L⁻¹ de G + 20 g L⁻¹ de X, 30 g L⁻¹ de G + 30 g L⁻¹ de X, y 20 g L⁻¹ de G + 40 g L⁻¹ de X; a 200 rpm y 1 vvm. La producción de 2,3-BD se valoró con una FM *batch* en medio sintético con la mezcla de glucosa y xilosa en proporción 2:1 (p/p). Los datos obtenidos reflejaron que la represión catabólica se eliminó exitosamente, pues a diferencia de la cepa original, la mutante consumió glucosa y xilosa de forma simultánea, obteniendo una concentración máxima de 2,3-BD de 23.9 g L⁻¹ y un rendimiento de 0.44 g g⁻¹.

Jiang *et al.* (2012) fermentaron hidrolizados de cáscaras de *Jatropha* y un medio sintético con glucosa mediante una cepa de *K. oxytoca* para producir 2,3-BD. Se obtuvieron un total de tres hidrolizados: el primero de ellos provino de la hidrólisis ácida directa de las cáscaras de *Jatropha*, y los otros dos se obtuvieron por la hidrólisis ácida en dos etapas subsecuentes de las cáscaras de *Jatropha* en polvo. A continuación se realizaron pruebas fermentativas en modo *batch* con los tres hidrolizados y el medio artificial. La concentración inicial de azúcares en los hidrolizados se ajustó a 100 g L⁻¹, mientras que el medio sintético contenía 80 g L⁻¹. Los resultados indicaron que con el primer hidrolizado se obtuvo una concentración de 4.11 g L⁻¹ de 2,3-BD, un rendimiento de 0.055 g g⁻¹ y una productividad de 0.069 g L⁻¹ h⁻¹; con el segundo hidrolizado se alcanzaron 25.03 g L⁻¹ de 2,3-BD, un rendimiento de 0.36 g g⁻¹ y una productividad de 0.42 g L⁻¹ h⁻¹; con el tercer hidrolizado se logró una concentración de 31.57 g L⁻¹ de 2,3-BD, un rendimiento de 0.41 g g⁻¹ y una productividad de 0.53 g L⁻¹ h⁻¹; y con el medio sintético se obtuvieron 35.62 g L⁻¹ de 2,3-BD, un rendimiento de 0.45 g g⁻¹ y una productividad de 0.59 g L⁻¹ h⁻¹.

Cho *et al.* (2012) examinaron la producción de 2,3-BD en un medio complejo con glucosa como fuente de carbono usando una cepa de *K. oxytoca* y una de *K. pneumoniae*, a través de fermentaciones *batch* y *fed-batch*. La concentración inicial de

azúcar en el medio se varió entre 18-135 g L⁻¹. Las cepas fueron analizadas morfológicamente mediante microscopía electrónica de barrido, indicando que *K. pneumoniae* produjo una mayor cantidad de polisacárido capsular, lo que incrementa su patogenicidad y dificultad para separarla del medio de FM. En modo *batch*, las concentraciones máximas de 2,3-BD obtenidas por *K. oxytoca* y *K. pneumoniae* fueron 10.9 g L⁻¹ y 17.6 g L⁻¹, con rendimientos de 0.24 g g⁻¹ y 0.27 g g⁻¹ y productividades de 1.80 g L⁻¹ h⁻¹ y 1.76 g L⁻¹ h⁻¹; mientras que en modo *fed-batch* se generaron 34.1 g L⁻¹ y 50.9 g L⁻¹ de 2,3-BD, con rendimientos de 0.45 g g⁻¹ y 0.5 g g⁻¹ y productividades de 0.68 g L⁻¹ h⁻¹ y 1.04 g L⁻¹ h⁻¹ con *K. oxytoca* y *K. pneumoniae*, respectivamente.

Jung *et al.* (2013) evaluaron la acumulación de 2,3-BD una cepa de *K. pneumoniae* y dos cepas de *K. oxytoca* manipuladas mediante ingeniería genética para remover sus factores de virulencia. Para construir las mutantes se empleó la técnica de recombinación homóloga, la cual permitió eliminar el gen *wabG* involucrado en la síntesis de los liposacáridos capsulares; además, se examinaron tanto su morfología como sus propiedades de adhesión en células epiteliales humanas. Así mismo, se determinó la producción de 2,3-BD con las especies mutantes a través de una FM por lotes en medio mínimo con 70 g L⁻¹ de glucosa. Los resultados mostraron que las mutantes no presentaron LPS de núcleo externo ni formaron polisacárido capsular, siendo posible apreciar células bien delimitadas; sin embargo, esto ocasionó que su capacidad de asociación con las células epiteliales se incrementara. La morfología colonial también cambió, pues la cepa silvestre forma colonias de borde liso y las mutantes mostraron colonias de borde rugoso e irregular. Por otro lado, aunque las cepas modificadas crecieron de manera normal, la mutación afectó la producción de 2,3-BD, disminuyendo de 31.27 g L⁻¹ a 22.44 g L⁻¹ en comparación con la cepa silvestre.

Huang *et al.* (2013) evaluaron la formación de 2,3-BD con dos cepas de *Klebsiella* sp. (posiblemente *K. Pneumoniae* y *K. Oxytoca*) y una cepa de *Serratia marcescens* en medios con azúcares puros (glucosa, xilosa y arabinosa) e hidrolizados de paja de arroz (hidrolizado de celulosa e hidrolizado de hemicelulosa). En los medios sintéticos se utilizaron concentraciones entre 40-50 g L⁻¹ de azúcar. Los resultados de

las distintas fermentaciones *batch* se expresaron en términos de rendimiento y productividad. En el medio con glucosa, para las tres cepas, el rendimiento varió entre 0.38-0.41 g g⁻¹ y la productividad entre 0.76-0.78 g L⁻¹ h⁻¹, en el medio con xilosa el rendimiento se situó entre 0.37-0.39 g g⁻¹ y la productividad entre 0.52-0.82 g L⁻¹ h⁻¹, en el medio con arabinosa el rendimiento estuvo entre 0.37-0.38 g g⁻¹ y la productividad entre 0.73-0.87 g L⁻¹ h⁻¹, y finalmente con los hidrolizados el rendimiento varió entre 0.32-0.41 g g⁻¹ y la productividad entre 0.23-0.59 g L⁻¹ h⁻¹.

Kim *et al.* (2013) aislaron una cepa de *K. oxytoca* y la manipularon genéticamente para inhibir la producción de ácido láctico que la bacteria generaba a la par del 2,3-BD. La cepa mutante fue utilizada para fermentar un medio sintético bajo configuraciones *batch* y *fed-batch*, en la primera se empleó un medio con 90 g L⁻¹ de glucosa y en la segunda se alimentó intermitentemente una mezcla de 700 g L⁻¹ de glucosa y 20 g L⁻¹ de MgSO₄·7H₂O. Los datos experimentales mostraron que en la FM *batch* la cepa silvestre produjo 19.42 g L⁻¹ de 2,3-BD y 26.35 g L⁻¹ de ácido láctico, con un rendimiento de 0.21 g g⁻¹ y una productividad de 0.86 g L⁻¹ h⁻¹, en contraste con la cepa mutante que generó 29.93 g L⁻¹ de 2,3-BD y 1.88 g L⁻¹ de ácido láctico, con un rendimiento de 0.33 g g⁻¹ y una productividad de 0.98 g L⁻¹ h⁻¹. Así mismo, la cepa mutante acumuló 115 g L⁻¹ de 2,3-BD, niveles sumamente basales de ácido láctico, un rendimiento de 0.41 g g⁻¹ y una productividad de 2.27 g L⁻¹ h⁻¹ cuando se empleó para fermentar el medio artificial en modo *fed-batch*.

Cho *et al.* (2013) aislaron una cepa de *K. oxytoca* capaz de producir selectivamente 2,3-BD o acetoína como producto metabólico principal, dependiendo de la temperatura del cultivo. La investigación se desarrolló a través de fermentaciones *batch* en un medio definido con 40 g L⁻¹ de glucosa, analizando el nivel de expresión de la acetoína reductasa (AR) y la transcripción del gen que codifica dicha enzima (*budC*). El estudio reveló que la formación de 2,3-BD o acetoína como metabolito principal de la FM era determinada por el nivel de expresión de la AR y el nivel de transcripción del gen *budC*. La expresión de la AR a 37°C fue 12.8 veces menor que a 30°C, de manera que cuando la temperatura era menor la expresión era mayor, ocasionando que la cepa

acumulara 2,3-BD principalmente, y viceversa. Los rendimientos obtenidos para el 2,3-BD y la acetoína estuvieron entre 0.32-0.34 g g⁻¹ y 0.32-0.38 g g⁻¹, respectivamente.

Park *et al.* (2013) realizaron una simulación para maximizar la producción de 2,3-BD y minimizar la formación de subproductos de *K. oxytoca*, comparándola con los datos obtenidos experimentalmente. Se basaron en la construcción de dos cepas, una con el gen *ldhA* inactivo (*K. oxytoca* A) y otra con los genes *ldhA* y *pflB* inactivos (*K. oxytoca* AB). El gen *ldhA* codifica la enzima lactato deshidrogenasa, involucrada en la formación de ácido láctico, y el gen *pflB* codifica la enzima piruvato formato liasa, que convierte el piruvato en acetil-CoA (precursor del etanol) y ácido fórmico. Las mutantes se emplearon para fermentar un medio sintético que contenía 90 g L⁻¹ de glucosa en modo *batch*, y entre 10-60 g L⁻¹ en modo *fed-batch*. Los cultivos mantuvieron una aireación de 1 vvm y un pH de 6.5. La comparación de los resultados experimentales con las predicciones por computadora indicaron que *K. oxytoca* AB produjo una mayor concentración y rendimiento de 2,3-BD en comparación con *K. oxytoca* A y la cepa silvestre; aunque la inactivación simultánea de ambos genes ocasionó que la productividad disminuyera. Las concentraciones de 2,3-BD, los rendimientos y las productividades obtenidas fueron 40.9 g L⁻¹, 29.9 g L⁻¹ y 17.3 g L⁻¹; 0.44 g g⁻¹, 0.32 g g⁻¹ y 0.18 g g⁻¹; y 0.51 g L⁻¹ h⁻¹, 1.07 g L⁻¹ h⁻¹ y 0.58 g L⁻¹ h⁻¹ para *K. oxytoca* AB, *K. oxytoca* A y la cepa silvestre, respectivamente. Respecto a la formación de subproductos, *K. oxytoca* AB disminuyó considerablemente la formación de etanol y ácido fórmico (<1 g L⁻¹) en comparación con *K. oxytoca* A. Por último, para mejorar la productividad obtenida, se analizó la velocidad de agitación empleando *K. oxytoca* AB. En la FM *batch* la mayor productividad (2.7 g L⁻¹ h⁻¹) se registró a 450 rpm, mientras que en la FM *fed-batch* se encontró que cambiar de 450 a 350 rpm cuando la concentración de acetoína se aproximaba a 10 g L⁻¹ permitió alcanzar 113 g L⁻¹ de 2,3-BD, con un rendimiento de 0.45 g g⁻¹ y una productividad de 2.1 g L⁻¹ h⁻¹.

Park *et al.* (2013) investigaron el efecto del pH sobre la producción de 2,3-BD y otros ácidos orgánicos por *K. oxytoca* en un medio artificial. Se analizaron los metabolitos intracelulares y extracelulares (glucosa, succinato, lactato, formato, acetato,

etanol, *meso*-2,3-BD y (*R,R*)-2,3-BD) de la cepa en cultivos por lotes y continuos, utilizando los datos experimentales para estimar el flujo metabólico mediante modelos computacionales. Los cultivos continuos se realizaron a partir de los cultivos *batch* probando diferentes valores de pH (5.5, 7.0) y distintas tasas de transferencia de oxígeno (0.1 h^{-1} , 0.2 h^{-1} , 0.3 h^{-1}). Se observó que a pH 5.5 las concentraciones de los ácidos orgánicos y el etanol disminuyeron, mientras que la concentración y el flujo metabólico del 2,3-BD se incrementó; en cambio, a pH 7.0 sucedió lo opuesto. Las distribuciones del flujo metabólico variaron muy poco respecto al cambio en la transferencia de oxígeno, pero las concentraciones de los metabolitos intracelulares, en general, se incrementaron al aumentar la tasa de dilución de oxígeno, especialmente a pH 7.0. En conclusión, el valor del pH determinó el grado de actividad de las distintas enzimas involucradas en la producción de 2,3-BD, determinando la formación y concentración de metabolitos específicos.

Wong *et al.* (2014) estimaron los efectos del pH y diferentes estrategias de FM sobre la producción de 2,3-BD utilizando una cepa silvestre de *K. oxytoca*. Llevaron a cabo fermentaciones en modo *batch*, *fed-batch* y continuo en un medio artificial de glucosa con una concentración inicial de 146 g L^{-1} . El rango de pH investigado fue de 4.5-9.0, encontrando que el valor óptimo para el proceso era de 6. Los autores tenían la teoría de que la producción de 2,3-BD en modo *fed-batch* estaba asociada al crecimiento, pero aunque intentaron estimular este parámetro a través de la solución alimentada, esto no afectó significativamente la concentración de 2,3-BD obtenida; sin embargo, en el caso de la FM por lotes la formación del diol sí estuvo asociada al crecimiento celular. Al final, se alcanzaron concentraciones de 2,3-BD de 57.17 g L^{-1} , 110 g L^{-1} y 33.81 g L^{-1} , rendimientos de 0.82 g g^{-1} , 0.94 g g^{-1} y 0.66 g g^{-1} y productividades de $1.59 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$, $0.88 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ y $2.81 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ para las fermentaciones *batch*, *fed-batch* y continua, respectivamente.

Jeong *et al.* (2015) determinaron la influencia de la hemoglobina bacteriana de *Vitreoscilla* sp. (VHb) y la adición de ácido acético sobre la producción de 2,3-BD en *K. oxytoca*. Se realizaron fermentaciones *batch* en un medio sintético con 40 g L^{-1} de

glucosa, una agitación de 100 o 200 rpm y un flujo de aire de 1 vvm; y fermentaciones *fed-batch* con 100 g L⁻¹ de glucosa iniciales (mantenida posteriormente en 60 g L⁻¹), una agitación de 200 rpm y un flujo de aire de 1 vvm. Los resultados indicaron que la VHB indujo un aumento del 10% en el crecimiento de *K. oxytoca*, mientras que el ácido acético mejoró la producción de 2,3-BD. Específicamente, en la FM *fed-batch* se logró un incremento en la producción de 2,3-BD de 34.9 g L⁻¹ a 49.4 g L⁻¹ en 40 h.

Park *et al.* (2015) utilizaron la ingeniería metabólica para desarrollar una cepa de *K. oxytoca* superproductora de (*R,R*)-2,3-BD. La mutante fue usada para fermentar un medio artificial de glucosa en modo *batch* y *fed-batch*, controlando el flujo de aire a 1 vvm y el pH en 6.5. En la FM por lotes el medio de cultivo contenía 90 g L⁻¹ de glucosa y en la FM por lotes alimentada la concentración de azúcar se mantuvo entre 10-60 g L⁻¹. Los resultados señalaron que la mutante producía 2,3-BD con más del 90% de (*R,R*)-2,3-BD, aunque los valores obtenidos de 88 g L⁻¹ de 2,3-BD, con un rendimiento de 0.32 g g⁻¹ y una productividad de 1.6 g L⁻¹ h⁻¹ fueron notablemente menores que los registrados para la cepa silvestre: 113 g L⁻¹ de 2,3-BD, rendimiento de 0.45 g g⁻¹ y productividad de 2.1 g L⁻¹ h⁻¹; además, la cantidad de acetoína acumulada en el medio fue mayor cuando se empleó la mutante (15.5 g L⁻¹ vs. 4.7 g L⁻¹). Lo anterior sugirió que la expresión del gen introducido en *K. oxytoca* no era lo suficientemente alta, por lo que se realizó una mutación adicional que permitió alcanzar 106.7 g L⁻¹ de (*R,R*)-2,3-BD [9.3 g L⁻¹ de *meso*-2,3-BD], con un rendimiento de 0.40 g g⁻¹ y una productividad de 3.1 g L⁻¹ h⁻¹ a través de una FM *fed-batch*; así como reducir la acumulación de acetoína de 15.5 g L⁻¹ a 8.9 g L⁻¹.

Cho *et al.* (2015) evaluaron la producción de 2,3-BD a partir de glicerol crudo con una cepa de *K. oxytoca* manipulada genéticamente para incrementar la producción de 2,3-BD y reducir la formación de 1,3-propanodiol y ácido láctico. Se eliminaron de la bacteria los genes *pduC* y *ldhA*, encargados de codificar las enzimas glicerol deshidratasa y lactato deshidrogenasa, respectivamente. Las cepas se emplearon en fermentaciones *batch* y *fed-batch* en un medio definido con glicerol puro (GP) o glicerol crudo (GC) como fuente de carbono, a pH 6, 1 vvm y 400 rpm. Los cultivos *batch* contenían 90 g L⁻¹ de sustrato inicial y los *fed-batch* entre 90-100 g L⁻¹. Se observó que

el desempeño de la cepa parental en la FM por lotes fue prácticamente el mismo sin importar la fuente de carbono, registrando valores de 8.4 g L⁻¹ y 8.9 g L⁻¹ de 2,3-BD, 0.25 y 0.24 g g⁻¹, 0.17 y 0.19 g L⁻¹ h⁻¹, 0.3 y 4.2 g L⁻¹ de ácido láctico para el GP y GC, respectivamente; aunque no se detectó 1,3-propanodiol en ningún caso. Sin embargo, en la FM *fed-batch* el glicerol crudo fue más efectivo que el glicerol puro, observándose una producción de 73.8 g L⁻¹ de 2,3-BD, 3.7 g L⁻¹ de 1,3-propanodiol y 9.9 g L⁻¹ de ácido láctico con GC, y 59.4 g L⁻¹ de 2,3-BD, 8.9 g L⁻¹ de 1,3-propanodiol y 18.6 g L⁻¹ de ácido láctico con el GP. Por otro lado, la doble mutante mostró mejores resultados que la cepa parental en fermentaciones *fed-batch*: con GP se obtuvieron 59.4 vs. 115 g L⁻¹ de 2,3-BD, 0.31 vs. 0.39 g g⁻¹, 0.52 vs. 1.01 g L⁻¹ h⁻¹, 18.6 vs. 0.7 g L⁻¹ de ácido láctico y 8.9 vs. 6.9 g L⁻¹ de 1,3-propanodiol para la cepa parental y la mutante, respectivamente; mientras que en GC se alcanzaron 78.3 vs. 131.5 g L⁻¹ de 2,3-BD, 0.42 vs. 0.44 g g⁻¹, 0.68 vs. 0.84 g L⁻¹ h⁻¹, 9.8 vs. 0.8 g L⁻¹ de ácido láctico y 3.7 vs. 0.0 g L⁻¹ de 1,3-propanodiol para la cepa parental y la mutante, respectivamente.

Kim *et al.* (2016) analizaron la FM butanodiólica a través de fermentaciones *batch* y *fed-batch* en medio sintético con una cepa de *K. oxytoca* modificada genéticamente. El medio de cultivo contenía glucosa como fuente de carbono, en modo *batch* la concentración se varió de 0-180 g L⁻¹ y en modo *fed-batch* se mantuvo entre 20-30 g L⁻¹. Los datos obtenidos experimentalmente se emplearon para simular los efectos del sustrato y los subproductos de la FM en el comportamiento de la cepa y la producción de 2,3-BD. Los autores reportaron que la producción de diol está más ligada a la velocidad de crecimiento que a la cantidad de biomasa en el cultivo, y que la tolerancia de *K. oxytoca* ante a los subproductos estudiados fue como sigue: 2,3-BD > ácido succínico > etanol > acetoína > ácido acético > ácido fórmico. Las concentraciones máximas obtenidas de 2,3-BD fueron 55 g L⁻¹ en modo *batch* y 87.5 g L⁻¹ en modo *fed-batch*.

Xin *et al.* (2016) compararon el desempeño de una cepa silvestre de *Klebsiella* sp. con su mutante para generar 2,3-BD a partir de la FM de sacarosa. Primeramente se optimizaron las condiciones del proceso fermentativo por lotes mediante la

metodología de superficie de respuesta (MSR) y después se realizó una FM *fed-batch* optimizada. En la FM *batch* se utilizaron entre 50-300 g L⁻¹ de sacarosa y en la *fed-batch* la concentración de azúcar se mantuvo en 100 g L⁻¹. La mutante se obtuvo por mutagénesis aleatoria en presencia de 0,5% (v/v) de etil metil sulfonato. Los resultados de la MSR y la FM *batch* señalaron que podían obtenerse 42.6 g L⁻¹ de 2,3-BD a partir de 100 g L⁻¹ de sacarosa. Finalmente, se obtuvieron 91.2 g L⁻¹ y 119.4 g L⁻¹ de 2,3-BD en las fermentaciones *fed-batch* con la cepa silvestre y la mutante, respectivamente.

Guragain y Vadlani (2017) llevaron a cabo un estudio sobre la producción de 2,3-BD en medio sintético e hidrolizados de sorgo, pasto varilla y madera usando a *K. oxytoca* como organismo fermentador. Primero realizaron fermentaciones *batch* en el medio sintético y los hidrolizados de biomasa, enseguida fermentaciones *fed-batch* en el medio artificial y el hidrolizado de madera, y finalmente fermentaciones *fed-batch* optimizadas en medio sintético. Los resultados de las fermentaciones *batch* indicaron que para una producción eficiente de 2,3-BD, las concentraciones óptimas de azúcar debían ser 70 g L⁻¹ en medios con azúcar puro (glucosa o xilosa) y 90 g L⁻¹ en medios con azúcar mixto (glucosa y xilosa); por lo tanto, los hidrolizados de sorgo y pasto varilla se ajustaron a 2.5% y 9% de azúcares totales, mientras que el hidrolizado de madera se ajustó a 9% de azúcares totales. En los medios sintéticos se obtuvieron rendimientos de 0.43 g g⁻¹, 0.36 g g⁻¹ y 0.35 g g⁻¹ y productividades de 1.03 g L⁻¹ h⁻¹, 0.64 g L⁻¹ h⁻¹ y 0.50 g L⁻¹ h⁻¹ para los medios con glucosa, xilosa y azúcar mixto, respectivamente. También se reportó que las fermentaciones con hidrolizados de biomasa que contenían 2.5% de azúcares totales y el hidrolizado de madera con 9% de azúcares, fueron igual de eficientes que los medios con azúcar puro; sin embargo, en el hidrolizado de sorgo con 9% de azúcares la xilosa no fue utilizada, posiblemente debido a la presencia de ácido acético resultado de la falta de detoxificación (sólo el hidrolizado de madera se detoxificó). Por otro lado, las fermentaciones *fed-batch* con hidrolizado de madera (9%) mostraron que la xilosa se acumulaba en el medio cuando la glucosa inicial no se consumía por completo, y si se esperaba a que se agotara y luego se alimentaba nuevamente el medio, ninguno de los dos azúcares era consumido. Por último, las fermentaciones *fed-batch* en medio optimizado con glucosa permitieron alcanzar 79.4 g

L⁻¹ de 2,3-BD, con un rendimiento de 0.47 g g⁻¹ y una productividad de 0.79 g L⁻¹ h⁻¹. Los autores concluyeron que las fermentaciones en medios con 7-9% de glucosa permiten alcanzar una máxima producción de 2,3-BD y que las fermentaciones en modo *fed-batch* no son estrategias apropiadas para fermentar medios con azúcar mixto, ya sean sintéticos o procedentes de RLC.

Park *et al.* (2017) investigaron la producción de 2,3-BD a partir de hidrolizado ácido de *Golenkinia* sp. empleando una cepa de *K. oxytoca* manipulada genéticamente para metabolizar glucosa y galactosa simultáneamente. Para ello, llevaron a cabo una FM *batch* en un medio sintético con una concentración inicial de 2.16 g L⁻¹ de glucosa y 2 g L⁻¹ de galactosa extraídos directamente de las algas. Los resultados revelaron que la cepa modificada produjo 2.76 g L⁻¹ de 2,3-BD con una productividad de 0.30 g L⁻¹ h⁻¹, en contraste con la cepa silvestre que generó 1.38 g L⁻¹ de 2,3-BD con una productividad de 0.11 g L⁻¹ h⁻¹.

Por último, cabe mencionar el trabajo de Lee *et al.* (2019), quienes desarrollaron una prueba enzimática para detectar 2,3-BD basada en la cuantificación de la reducción del NADP⁺, a través de la enzima 2,3-BD deshidrogenasa extraída de *Clostridium ljungdahlii* (CL-Bdh). Para ello, realizaron ensayos enzimáticos en una placa microtituladora con 96 pocillos, agregando en cada espacio solución buffer, 25 µg mL⁻¹ de la enzima CL-Bdh y medio de cultivo (2,3-BD diluido serialmente); enseguida se efectuó la activación a 45°C por 20 min y se midió la absorbancia de cada pocillo por espectrofotometría a 340 nm. Los mismos medios fueron analizados por HPLC empleando una columna Aminex HPX-87H bajo las siguientes condiciones operativas: H₂SO₄ 5 mM, 0.2 mL min⁻¹, 60°C y 80 min. Los autores reportaron que la prueba enzimática fue 15 veces más sensible al 2,3-BD que el HPLC, pudiendo detectar hasta 0.01 mM del diol. Finalmente, para corroborar la eficacia de la prueba, se analizó el medio de cultivo procedente de 23 aislados microbianos; con el ensayo enzimático se identificaron 14 cepas productoras de 2,3-BD y con el HPLC sólo ocho, aunque éstas coincidieron con las encontradas mediante la prueba. Los autores concluyeron que el método propuesto es rápido y efectivo para identificar cepas productoras de 2,3-BD, sobre todo cuando se requiere analizar una gran cantidad de muestras.

HIPÓTESIS

Es posible obtener 2,3-butanodiol a partir de la fermentación del hidrolizado enzimático de bagazo de *Agave cupreata* utilizando una cepa aislada de bagazo de agave pútrido.

OBJETIVOS

Objetivo general

Evaluar el crecimiento y la producción de 2,3-butanodiol de una cepa aislada de bagazo de agave pútrido a través de fermentaciones *batch* de medios de cultivo sintéticos e hidrolizado enzimático de bagazo de *Agave cupreata*.

Objetivos particulares

1. Obtener microorganismos nativos del bagazo de agave pútrido capaces de producir 2,3-butanodiol y seleccionar la mejor cepa productora.
2. Identificar la cepa seleccionada mediante técnicas moleculares.
3. Evaluar el desempeño de la cepa seleccionada al fermentar medio sintético.
4. Obtener el hidrolizado enzimático del bagazo de *Agave cupreata* y evaluar el desempeño de la cepa seleccionada al fermentar dicho hidrolizado.
5. Comparar la producción de 2,3-butanodiol en medio sintético y en el hidrolizado enzimático del bagazo de *Agave cupreata*.

IV. METODOLOGÍA

4.1 Materia prima

Las cepas se aislaron de bagazo pútrido de piñas cocidas de *Agave tequilana* Weber variedad Azul, obtenido de la procesadora Ex Hacienda Zacapendo, S.P.R. de R.L., ubicada en la carretera Indaparapeo – Álvaro Obregón Km 4.2 del municipio de Indaparapeo, Michoacán, México.

Los hidrolizados se obtuvieron utilizando bagazo de piñas cocidas de *Agave cupreata*, el cual fue proporcionado por la destiladora La Flor del Mezcal, localizada en el municipio de Etúcuaro, Michoacán, México. La caracterización del material se realizó de acuerdo a los procedimientos estándar del Laboratorio Nacional de Energía Renovable (NREL) designados como NREL/TP-510-42618 (Determinación de carbohidratos estructurales y lignina en biomasa), LAP NREL/TP-510-42621 (Determinación de azúcares, subproductos y productos de degradación en muestras de proceso de fracción líquida) y LAP NREL/TP-510-42622 (Determinación de cenizas en biomasa).

4.2 Obtención de cepas nativas del bagazo de agave

4.2.1 Medios de cultivo empleados

El aislamiento y purificación de los microorganismos se realizó en medio YPD (dextrosa-peptona-extracto de levadura), cuya composición fue la siguiente: 20 g L⁻¹ de peptona de caseína, 10 g L⁻¹ de extracto de levadura, 20 g L⁻¹ de agar bacteriológico y glucosa al 2%. Los componentes y la solución de glucosa se esterilizaban por separado a 121°C durante 15 min y posteriormente se mezclaban bajo condiciones estériles.

La reactivación de microorganismos se llevó a cabo en YPD líquido (YPD_L) y caldo Luria Bertani (LB), éste último compuesto por: 10 g L⁻¹ de peptona de caseína, 5 g L⁻¹ de extracto de levadura y 5 g L⁻¹ de NaCl.

Las fermentaciones en medio sintético se realizaron utilizando el medio mineral M9, compuesto por 120 g L⁻¹ de K₂HPO₄, 60 g L⁻¹ de KH₂PO₄, 10 g L⁻¹ de NaCl, 20 g L⁻¹

de NH_4Cl , 2 mL L^{-1} de MgSO_4 1 M , 0.1 mL L^{-1} de CaCl_2 1 M y $5 \text{ }\mu\text{L}$ 100 mL^{-1} de una solución de trazas que contenía 5 g L^{-1} de EDTA, 0.83 g L^{-1} de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 84 mg L^{-1} de ZnCl_2 , 13 mg L^{-1} de $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 10 mg L^{-1} de $\text{CoCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 10 mg L^{-1} de H_3BO_3 y 1.6 mg L^{-1} de $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$.⁸⁶

4.2.2 Aislamiento y purificación de cepas

El aislamiento de los microorganismos consistió en tomar muestras directas del bagazo de agave sin pretratar, sembrarlas por estría en placas de YPD e incubarlas a 30°C por 72 h.

La purificación de las cepas se realizó a través de resiembras sucesivas en placas de YPD, incubando a 30°C por 72 h.^{87, 88} Para determinar el tipo de microorganismo aislado y la pureza del cultivo se realizaron tinciones Gram.

Además, el Laboratorio de Biotecnología Microbiana del Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (LBM/IIQB-UMSNH) donó 20 cepas aisladas del mismo tipo de agave, dando un total de 35 cepas.

4.2.3 Mantenimiento de microorganismos

Las cepas se mantuvieron viables por congelación a -70°C en glicerol al 20% (v/v) en un ultracongelador vertical Revco.

4.3 Selección de la cepa productora de 2,3-butanodiol

4.3.1 Prueba de Voges-Proskauer

Las cepas aisladas se sometieron a la prueba bioquímica de Voges-Proskauer (VP) con el objeto de identificar a aquellas capaces de fermentar la glucosa por la vía butanodiólica.

Las cepas se crecieron en medio YPD_L durante 18 h, se pasaron a tubos con medio MR-VP y se incubaron a 37°C por 24 h. Transcurrido el tiempo, a cada tubo se le agregaron seis gotas de una solución de α -naftol y dos gotas de KOH (en ese orden),

se agitó suavemente y se dejó en reposo por 15 min a temperatura ambiente. La formación de un anillo rojo en la superficie del tubo indicó una prueba positiva, lo contrario una prueba negativa (Fig. 4.1). Se utilizó además un blanco negativo y un blanco positivo con la cepa *Bacillus subtilis*.

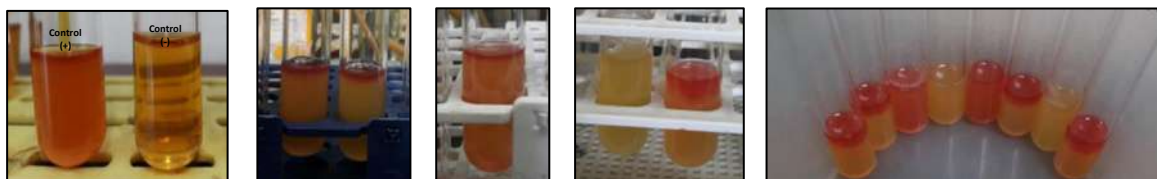


Fig. 4.1 Prueba de Voges-Proskauer.

4.3.2 Fermentación en medio complejo

Las cepas positivas a VP fueron evaluadas respecto a su capacidad para producir 2,3-butanodiol y otros metabolitos de interés a través de fermentaciones en tubos de ensaye con 10 mL de YPD_L. La inoculación se realizó a partir de cultivos líquidos del mismo medio previamente crecidos por 18 h y el tamaño del inóculo fue de 1 mL (Fig. 4.2). Las corridas se llevaron a cabo en un rotor de tubos a 30°C y 50 rpm durante 96 h, tomando alícuotas de 1 mL cada 24 h. Las muestras se centrifugaron a 13,200 rpm durante 12 min, los sobrenadantes se filtraron utilizando membranas milipore de 0.22 micras y se conservaron a 4°C para su posterior análisis (Fig. 4.3). El experimento se realizó por duplicado.

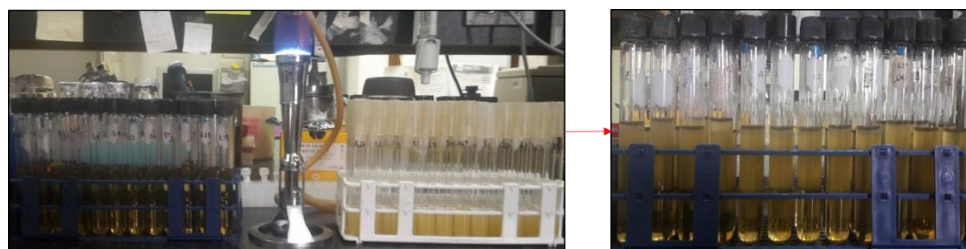


Figura 4.2 Inoculación de cepas.

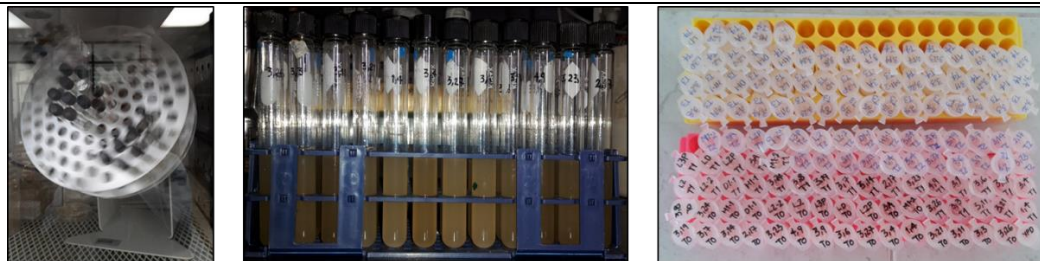


Figura 4.3 Fermentación en medio sintético y muestras tomadas.

4.3.2.1 Cuantificación de metabolitos

Las muestras obtenidas durante la fermentación se descongelaron a temperatura ambiente, se volvieron a centrifugar a 13,200 rpm por 12 min y el sobrenadante se filtró en viales con membranas milipore de 0.22 micras (Fig. 4.4). Posteriormente, se analizaron por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) empleando un cromatógrafo Ultimate 3000 Thermo Scientific acoplado a detectores de índice de refracción (DIR) y ultravioleta (UV). Se utilizó una columna Metacarb 87C de Agilent, la cual se mantuvo a 60°C con H_2SO_4 5 mN como fase móvil, a razón de 0.6 mL min^{-1} . El volumen de inyección de la muestra fue de $20 \mu\text{L}$ y el tiempo de operación de 30 min. Los patrones empleados fueron glucosa (G), ácido butírico (AB), ácido acético (AA), acetona (AC), butanol (BT), etanol (ET), isopropanol (ISO), glicerol (GLI) y 2,3-butanodiol (2,3-BD) (Figuras 4.5 y 4.6). Los compuestos se identificaron por comparación de los tiempos de retención con los patrones y cuantificados mediante el método de regresión lineal.



Figura 4.4 Preparación de las muestras.

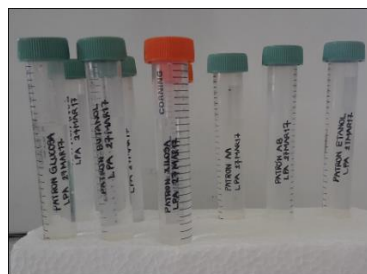


Figura 4.5 Patrones.



Figura 4.6 Sistema HPLC utilizado.

4.3.3 Selección e identificación molecular de la cepa productora de 2,3-butanodiol

La cepa seleccionada fue aquella que mostró la mayor producción de 2,3-butanodiol en la fermentación en medio complejo, aunque también se analizó la formación de otros metabolitos. Ésta se identificó por secuenciación de un fragmento de 1500 pb del ARNr 16S. El análisis de la secuencia de nucleótidos usando el algoritmo Blast (nt) mostró un 97% de identidad con cepas pertenecientes a especies de *Klebsiella oxytoca* del banco de genes del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI por sus siglas en inglés) indicando una alta probabilidad de que la cepa corresponda a este linaje, catalogándola como *Klebsiella oxytoca* UM2-17.

4.4 Fermentación en medio sintético con la cepa *Klebsiella oxytoca* UM2-17

4.4.1 Fermentación en medio mineral

El medio más adecuado para realizar las fermentaciones butanodiólicas con la cepa *K. oxytoca* UM2-17 se determinó probando tres formulaciones distintas (Tabla 4.2), usando como medio base el medio mínimo mineral M9 (Tabla 4.1). Cada formulación se probó con tres concentraciones de glucosa distintas: 50, 100 y 150 g L⁻¹. Antes de experimentar con las tres formulaciones se realizaron pruebas fermentativas exclusivamente en medio base, para determinar si había crecimiento y establecer el momento en que debía tomarse el inóculo de fermentación.

Tabla 4.1 Composición del medio mínimo mineral M9.

Compuesto	g L ⁻¹
K ₂ HPO ₄	120
KH ₂ PO ₄	60
NaCl	10
NH ₄ Cl	20
pH = 7.4	
Complemento	
MgSO ₄ 1M	2 mL L ⁻¹
CaCl ₂ 1M	0.1 mL L ⁻¹
Trazas	5 µL 100 mL ⁻¹

Tabla 4.2 Formulaciones probadas como medio de fermentación.

Componente	M1	M2	M3
Medio mínimo mineral M9	x	x	x
Extracto de levadura (1%)		x	x
Peptona de caseína (1%)			x

M1 = medio 1, M2 = medio 2, M3 = medio 3

La cepa *K. oxytoca* UM2-17 se creció en YPD_L durante 18 h (precultivo), ésta requería un periodo de adaptación al medio mineral, por lo que primero se inoculó 1 mL del precultivo en tubos de ensaye con 10 mL de M1, M2 o M3 y se incubaron en un rotor de tubos a 30°C y 50 rpm durante 24 h. Posteriormente, se tomaron muestras de 1 mL de cada tubo para analizar el crecimiento celular por espectrofotometría a una D.O._{600nm} y ajustar el inóculo de fermentación a 0.05DO. El inóculo se agregó a tubos con medio mineral nuevo y se incubaron en el rotor de tubos a 30°C y 50 rpm durante 120 h, tomando muestras de 1 mL cada 24 h para determinar el crecimiento celular (D.O._{600 nm}). Enseguida las muestras se centrifugaron a 13,200 rpm por 12 min, los sobrenadantes se filtraron con membranas milipore de 0.22 micras y se conservaron a 4°C para su análisis posterior por HPLC, siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 4.3.2.1, usando G, AA, ET, GLI y 2,3-BD como patrones. El experimento se

realizó por duplicado y se manejaron dos controles para cada medio con concentración de azúcar distinta, designados como CA y CB (Fig. 4.7).

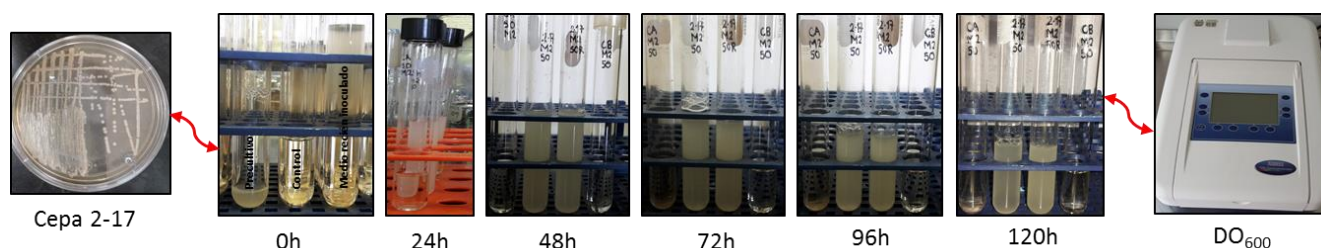


Figura 4.7 Fermentación en medio mineral.

4.4.2 Crecimiento y producción de 2,3-butanodiol en medio mineral

El monitoreo de la cinética de crecimiento y producción de 2,3-butanodiol de la cepa *K. oxytoca* UM2-17 permitió determinar sus parámetros cinéticos de crecimiento y su comportamiento cuando se utilizó glucosa, xilosa o una mezcla de ambos azúcares como fuente de carbono en el medio mineral.

La cinética se realizó en matraces Erlenmeyer de 125 mL que contenían 50 mL de medio mínimo mineral M9 formulado como se indica en la Tabla 4.3. La cepa fue previamente adaptada al medio mineral durante 24 h, de la misma manera que en la fermentación anterior (Fig. 4.8). Los matraces se incubaron en un agitador orbital PolyScience a 30°C y 100 rpm durante 120 h, tomando muestras de 1 mL a las 0, 4, 8, 12, 16, 20, 24, 30, 36, 48, 72, 96 y 120 h para determinar el crecimiento celular ($D.O._{600nm}$); aunque se muestrearon algunos puntos intermedios cuando se consideró pertinente. Enseguida las alícuotas se centrifugaron a 13,200 rpm por 12 min, los sobrenadantes se filtraron con membranas milipore de 0.22 micras y se conservaron a 4°C para su análisis posterior por HPLC, siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 4.3.2.1, utilizando G, X, AA, ET, GLI y 2,3- BD como patrones. El experimento se llevó a cabo por duplicado, empleando un control negativo en cada conjunto experimental.

Tabla 4.3 Composición de los medios minerales utilizados.

Medio	Fuente de carbono	Concentración (g L ⁻¹)	
		Xilosa	Glucosa
A	Glucosa	--	100
B	Xilosa	100	--
C	Xilosa/Glucosa	50	50
D	Xilosa/Glucosa	15	150

**Figura 4.8** Adaptación en medio mineral.**Figura 4.9** Medios A, B, C y D (izquierda a derecha) al final de la fermentación.

4.5 Fermentación en hidrolizado de bagazo de agave con la cepa *Klebsiella oxytoca* UM2-17

4.5.1 Obtención del hidrolizado de bagazo de agave

4.5.1.1 Pretratamiento

Primeramente realizó un pretatamiento mecánico, el cual consistió en lavar el bagazo de *A. cupreata*, pasarlo por un extrusor de tornillo sin fin, dejarlo secar a temperatura ambiente y molerlo en un molino de cuchillas hasta alcanzar una longitud de fibra aproximada de 1 cm (Fig. 4.10).

A continuación, el bagazo de agave se sometió a un pretratamiento químico mediante una hidrólisis ácida en una autoclave con H₂SO₄ al 5% durante 1 h a 121°C y 15 Lb, en una relación sólido-líquido de 1:10. La fracción líquida se separó del sólido residual mediante filtración al vacío. El hidrolizado ácido obtenido se descartó, mientras que el residuo sólido se lavó con agua común para eliminar cualquier rastro de ácido y

se colocó en la mufla a 50°C durante 24 h para utilizarlo como sustrato en la siguiente fase experimental (Fig. 4.11).



Fig. 4.10 Preparación y molienda del bagazo.



Figura 4.11 a) Bagazo antes (izquierda) y después (derecha) de la hidrólisis ácida, b) Hidrolizados ácidos, c) Sólido residual.

Finalmente, se caracterizaron tanto el bagazo de agave residual como el hidrolizado ácido obtenido. Para el bagazo se utilizaron los procedimientos estándar del NREL mencionados en el apartado 4.1. Para el hidrolizado se utilizó el mismo sistema de HPLC empleado en la cuantificación de metabolitos, pero el tiempo de operación fue de 60 min y los patrones usados fueron G, X, AA, arabinosa (AR), Manosa (M), hidroximetilfurfural (HMF) y furfural (F).

4.5.1.2 Hidrólisis enzimática o sacarificación

El sólido residual de la hidrólisis ácida se sacarificó con una mezcla de buffer de citratos 0.05 M y las enzimas Cellic[®] CTec3 y Cellic[®] HTec3, en un agitador orbital a 150 rpm y 50°C durante 48 h, empleando una relación sólido-líquido de 1:10.^{72, 89} La fracción líquida se separó del sólido residual por decantación y enseguida se centrifugó

a 4000 rpm por 20 min. El hidrolizado enzimático obtenido se conservó a 4°C para su uso posterior en las pruebas fermentativas, mientras que el residuo sólido se colocó en la mufla a 50°C durante 24 h (Figs. 4.12-4.14).



Figura 4.12 Sacarificación.



Figura 4.13 Separación del hidrolizado.

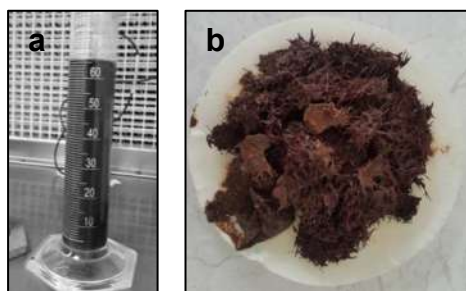


Figura 4.14 a) Hidrolizado enzimático obtenido, b) Sólido

Por último, se caracterizó el hidrolizado enzimático obtenido, de la misma manera que se procedió con el hidrolizado ácido.

4.5.2 Fermentación en hidrolizado de bagazo de agave

El hidrolizado enzimático de bagazo de agave se probó como medio de fermentación para producir 2,3-butanodiol. Se utilizaron matraces Erlenmeyer de 125 mL que contenían 50 mL del hidrolizado previamente ajustado a pH 7.0, esterilizado a 121°C por 15 min y suplementado con una tercera parte de las sales del medio mínimo mineral M9. Primeramente se creció un cultivo de *K. oxytoca* UM2-17 en YPD_L durante 18 h, luego se adaptó a medio mineral con 100 g L⁻¹ de glucosa por 24 h, después se tomó el inóculo de fermentación ajustado a 0.05DO para iniciar la fermentación, incubando los matraces en un agitador orbital a 30°C y 100 rpm durante 148 h. Se tomaron alícuotas a las 0, 4, 8, 12, 16, 20, 24, 30, 36, 48, 72, 96, 120 y 148 h para determinar el crecimiento celular (D.O._{600nm}). A continuación, las muestras se

centrifugaron a 13,200 rpm por 12 min, se filtraron los sobrenadantes con membranas milipore de 0.22 micras y se guardaron a 4°C para su análisis posterior mediante HPLC, siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 4.3.2.1, empleando G, X, AA, ET, GLI y 2,3-BD como patrones. El experimento se realizó por triplicado y se agregó un control negativo (Figuras 4.15 y 4.16).



Figura 4.15 Adaptación en medio mineral.



Figura 4.16 Fermentación en hidrolizado de bagazo de agave.

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Aislamiento y purificación de microorganismos

La gama de microorganismos aislados del bagazo de agave fue amplia, sin embargo, con base en criterios morfológicos y observaciones microscópicas, se eligieron aquellas cepas que presentaron rasgos bacterianos, descartando hongos filamentosos y actinomicetos (Fig. 5.1). Al final, se seleccionaron un total de 35 cepas.

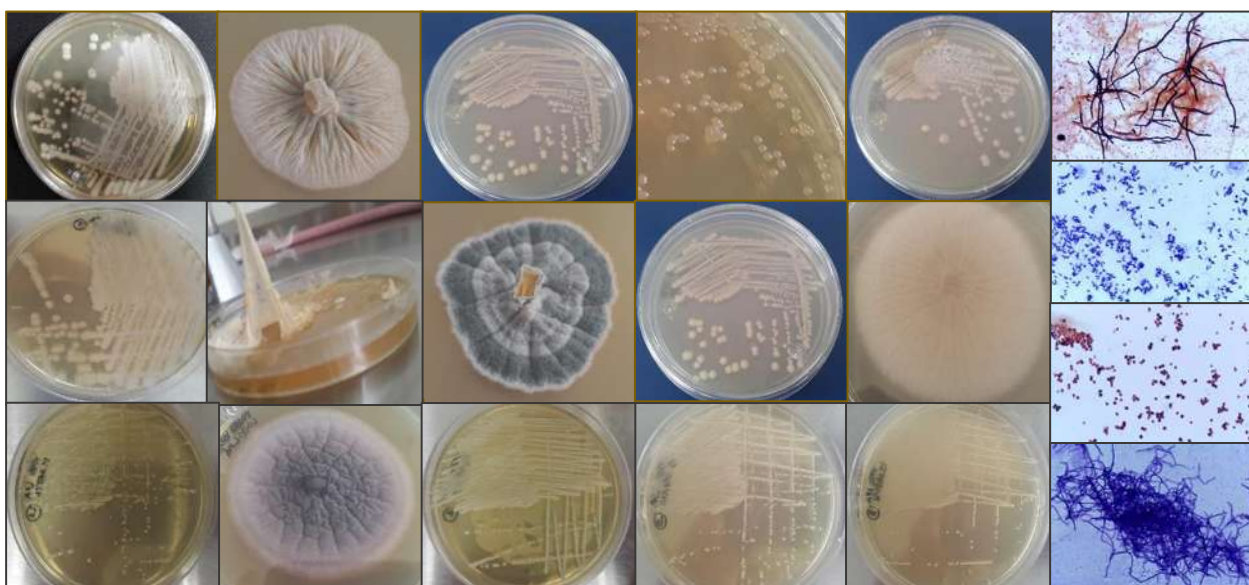


Figura 5.1 Algunos de los microorganismos aislados del bagazo de agave.

5.2. Identificación de cepas productoras de 2,3-butanodiol

De las 35 cepas seleccionadas, 31 se sometieron a la prueba bioquímica de Voges-Proskauer (VP), las cepas restantes se descartaron por dificultades en su crecimiento. Un total de 26 cepas mostraron una reacción positiva a la prueba (Tabla 5.1).

Tabla 5.1 Resultados de la prueba de Voges-Proskauer.

Cepa	Origen	VP	Cepa	Origen	VP
UM3-26	LBM/IIQB-UMSNH	+	UM3-8	LBM/IIQB-UMSNH	+
UM3-3	LBM/IIQB-UMSNH	+	UM3-24	LBM/IIQB-UMSNH	+
UM3-11	LBM/IIQB-UMSNH	+	UMH1-1	BATP	+
UM3-21	LBM/IIQB-UMSNH	+	UMD1-1	BATP	+
UM1-4	LBM/IIQB-UMSNH	+	UML2-2	BATP	+
UM3-4	LBM/IIQB-UMSNH	+	UML2	BATP	+
UM3-27	LBM/IIQB-UMSNH	+	UML3P	BATP	+
UM3-6	LBM/IIQB-UMSNH	+	UMLD	BATP	+
UM3-9	LBM/IIQB-UMSNH	+	UML3-2	BATP	-
UM4-9	LBM/IIQB-UMSNH	+	UML2P	BATP	+
UM3-23	LBM/IIQB-UMSNH	+	UM3A	BATP	+
UM2-17	LBM/IIQB-UMSNH	+	UM3B	BATP	-
UM3-14	LBM/IIQB-UMSNH	+	UM3C	BATP	-
UM3-7	LBM/IIQB-UMSNH	+	UML2-1	BATP	-
UM3-19	LBM/IIQB-UMSNH	+	UMM1-2	BATP	+
UM1-1	LBM/IIQB-UMSNH	-			

LBM/IIQB-UMSNH = Laboratorio de Biotecnología Microbiana del Instituto de Investigaciones Químico-biológicas de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, BATP = bagazo de *Agave tequilana* pútrido.

5.3 Selección de la cepa productora de 2,3-butanodiol usando medio complejo

Las 26 cepas VP positivas se utilizaron para fermentar YPD_L. En las muestras analizadas por HPLC se detectaron glicerol (GLI), ácido acético (AA), etanol (ET) y sobre todo 2,3-BD. La concentración de los compuestos identificados se determinó a partir de los datos obtenidos por regresión lineal de las curvas patrón.

De acuerdo con los datos experimentales obtenidos, las cepas UM3A, UML2, UML2-2 y UMM1-2 no generaron 2,3-BD, por lo que fueron descartadas. De las 22 cepas restantes, la UM3-3 y la UM3-9 formaron GLI, ET y 2,3-BD; mientras que las otras cepas también acumularon AA. La Tabla 5.2 muestra las concentraciones de 2,3-

BD obtenidas por cada una de las 22 cepas, donde se aprecia que las cepas UM2-17, UM3-7 y UM3-19 alcanzaron una mayor producción del diol. La Figura 5.2 pone de manifiesto que las cepas UM3-7 y UM3-19 no alcanzan la máxima producción de 2,3-BD a las 96 h, mientras que la cepa UM2-17 alcanza su punto máximo a las 24 h. Las tres cepas consumieron la fuente de carbono a la par que produjeron 2,3-BD, ET, GLI y AA. De manera individual, la cepa UM2-17 generó la máxima concentración de los metabolitos dentro de las primeras 24 h, alcanzando valores de 4.5 g L⁻¹ de 2,3-BD, 1.53 g L⁻¹ de ET, 0.73 g L⁻¹ de GLI y 0.71 g L⁻¹ de AA, consumiendo la glucosa completamente en 48 h (Fig. 5.3). En los casos de las cepas UM3-7 y UM3-19 la glucosa se metabolizó en 24 h, observándose crestas y valles de amplitud variable en la producción de los cuatro metabolitos hasta el final de la FM, lo que sugiere el posible consumo de GLI, ET y AA para mantener la producción de 2,3-BD (Figuras 5.4 y 5.5).

Acorde a lo anterior, se seleccionó la cepa UM2-17 para continuar el proyecto, pues fue quien mostró la mayor producción de 2,3-BD en un periodo de tiempo corto, además de formar otros metabolitos de interés. Como se describió en el apartado 4.3.3, la cepa UM2-17 fue identificada por secuenciación del ARNr 16S como *Klebsiella oxytoca*.

Tabla 5.2 Producción de metabolitos de las cepas aisladas en medio YPD_L.

Cepa	Tiempo* (h)	2,3-BD (g L ⁻¹)	GLI (g L ⁻¹)	ET (g L ⁻¹)	AA (g L ⁻¹)
UM2-17	24	4.50±0.13	0.73±0.01	1.53±0.08	0.71±0.01
UM3-7	96	4.35±0.78	0.79±0.01	1.88±0.21	0.24±0.04
UM3-19	96	3.76±0.69	0.83±0.01	1.74±0.12	1.02±0.10
UM3-14	24	3.25±0.20	0.89±0.23	1.26±0.03	0.65±0.02
UM3-4	48	3.24±0.13	0.00	1.02±0.14	0.00
UM4-9	48	3.19±0.56	0.31±0.15	1.60±0.10	0.20±0.14
UM3-11	96	3.16±0.12	0.56±0.14	1.64±0.13	0.11±0.15
UM3-23	48	3.16±0.13	0.38±0.10	1.60±0.10	0.17±0.14
UM3-24	48	3.04±0.57	0.21±0.14	1.33±0.16	0.15±0.08

UM3-8	24	3.00±0.22	1.54±0.35	1.01±0.026	0.00
UM3-3	48	2.99±0.10	2.04±0.11	1.04±0.02	ND
UM1-4	24	2.77±0.15	1.71±0.13	1.07±0.12	0.00
UM3-26	24	2.69±0.17	0.99±0.01	1.23±0.08	0.64±0.00
UM3-21	24	2.67±0.10	1.80±0.13	1.09±0.03	0.85±0.06
UM3-27	24	2.66±0.30	1.71±0.08	1.14±0.05	0.00
UM3-6	24	2.60±0.10	1.57±0.05	1.04±0.01	0.00
UM3-9	24	2.59±0.20	1.57±0.08	1.21±0.09	ND
UMH1-1	24	2.52±0.52	1.17±0.05	1.11±0.11	0.79±0.01
UMD1-1	24	2.51±0.31	1.63±0.12	1.23±0.06	0.83±0.01
UMLD	24	2.21±0.47	1.40±0.10	1.08±0.10	0.85±0.04
UML3P	24	2.14±0.03	1.45±0.10	1.07±0.14	0.88±0.10
UML2P	72	0.56±0.37	0.59±0.10	0.00	0.25±0.11

* Tiempo al cual se identificó la mayor producción de 2,3-BD, ND = no detectado.

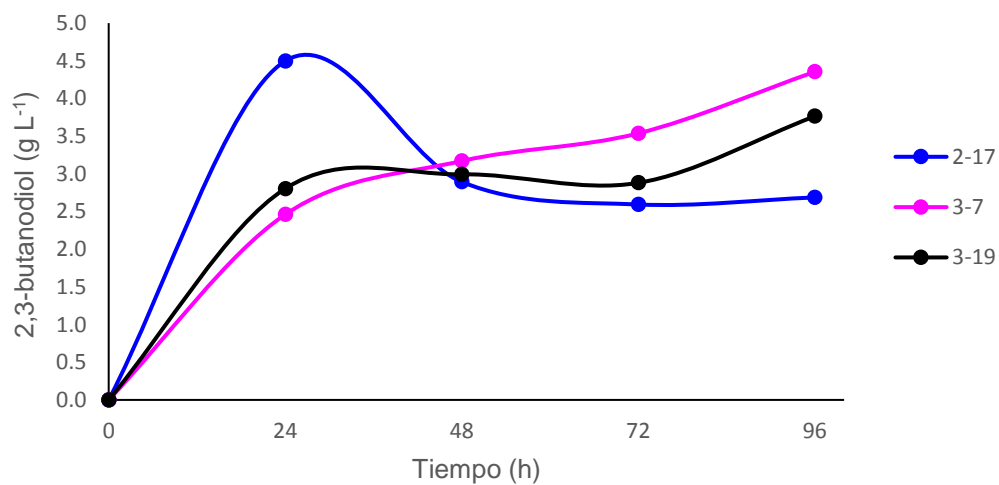


Figura 5.2 Comparación de la producción de 2,3-butanodiol por las cepas 2-17, 3-7 y 3-19.

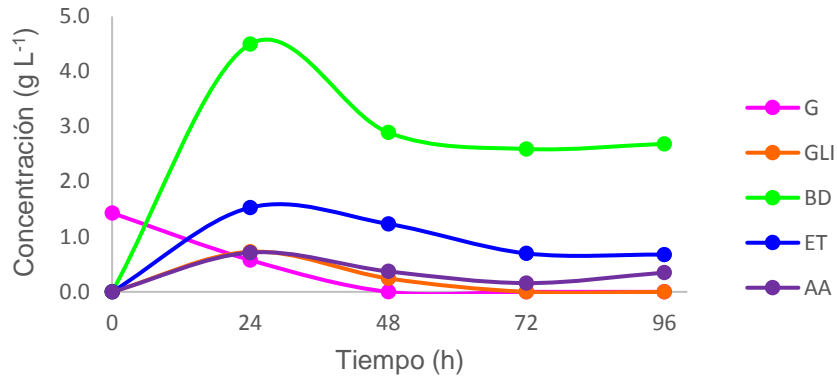


Figura 5.3 Metabolismo de la cepa 2-17.

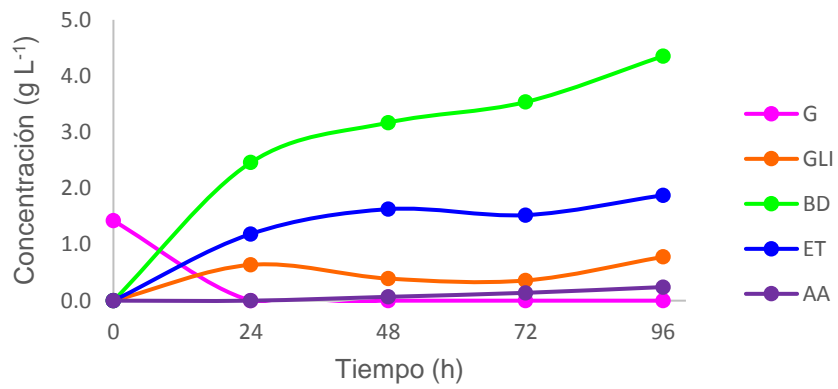


Figura 5.4 Metabolismo de la cepa 3-7.

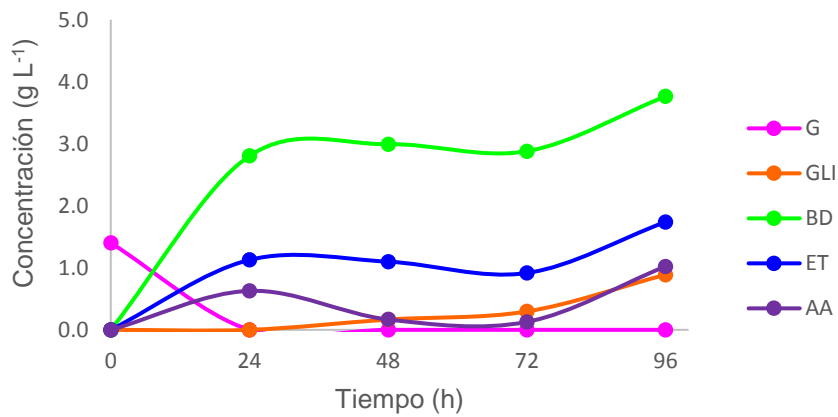


Figura 5.5 Metabolismo de la cepa 3-19.

5.4 Producción de 2,3-butanodiol por *Klebsiella oxytoca* UM2-17 en medio mineral

De acuerdo con Celinska y Grajek (2009)¹¹ el rendimiento del 2,3-BD depende de la concentración de azúcar en el medio de FM. Normalmente en un medio definido se utilizan entre 20-100 g L⁻¹ de glucosa o xilosa, pero acorde a los autores la concentración de azúcar adecuada es de 100 g L⁻¹, pues exceder los 150 g L⁻¹ produce inhibición celular, probablemente debido a la acumulación de subproductos como el etanol o el acetato. Sin embargo, los resultados de la FM en los medios M1, M2 y M3 indicaron que *K. oxytoca* UM2-17 no sólo fue capaz de crecer en medio mineral y producir 2,3-BD, independientemente de la concentración de glucosa utilizada, sino que metabolizó concentraciones altas de glucosa (150 g L⁻¹) sin sufrir inhibición, generando incluso una concentración mayor del diol (Tabla 5.3). Esto coincidió con lo reportado por Guragain y Vadlani (2017)¹⁵, quienes al aumentar la concentración inicial de glucosa en el medio de 3% a 9% incrementaron la producción de 2,3-BD de 11 a 40 g L⁻¹. Específicamente en el medio M1, a medida que se aumentó la concentración de azúcar la producción de 2,3-BD fue mayor, acumulando aproximadamente 15 g L⁻¹ del diol con 150 g L⁻¹ de glucosa, aunque al parecer la formación del diol no dependió de la biomasa presente, mostrando un mejor crecimiento en concentraciones bajas de glucosa (Fig. 5.6). En el medio M2 se observó lo contrario, concentraciones de azúcar altas condujeron a una menor producción de 2,3-BD, aparentemente dependiente de la densidad celular, la cual fue notablemente mayor que en el M1; sin embargo, aunque la biomasa en los medios con 100 g L⁻¹ y 150 g L⁻¹ de glucosa fue similar, la producción de 2,3-BD en el primer medio fue casi el doble que en el segundo (Fig. 5.7 y Tabla 5.3). Por último, en el medio M3 no se observó un patrón específico en la producción de 2,3-BD, pero se apreció un comportamiento similar al del medio M2, pues la mayor producción del diol se registró en el medio con la densidad celular más alta (Fig. 5.8 y Tabla 5.3). No obstante, mientras más se enriqueció el medio con peptona de caseína y/o extracto de levadura, la biomasa se incrementó pero la producción de 2,3-BD disminuyó (Tabla 5.3). Lo anterior sugirió que *K. oxytoca* UM2-17 redirigió su metabolismo hacia la formación de biomasa, lo que contrastó con las observaciones respecto a que los suplementos exógenos como el extracto de levadura y las peptonas mejoran la producción de 2,3-BD y mantienen la velocidad de formación del alcohol.⁵¹

86, 90-94 Lo anterior resultó favorable, pues se decidió continuar el trabajo con el medio mineral sin enriquecimiento, es decir el medio M1, lo que evitaría interferencias en el comportamiento de la cepa y reduciría los costos experimentales.^{66, 93}

Por último, a diferencia de la FM en YPD, las concentraciones más altas de 2,3-BD se obtuvieron al final de las fermentaciones (120 h) con un consumo parcial de glucosa. En los cultivos se detectó ET y en algunos casos GLI, pero nunca AA; sin embargo, las concentraciones de estos metabolitos fueron bajas en comparación con el 2,3-BD (Figs. 5.6-5.8 y Tabla 5.3).

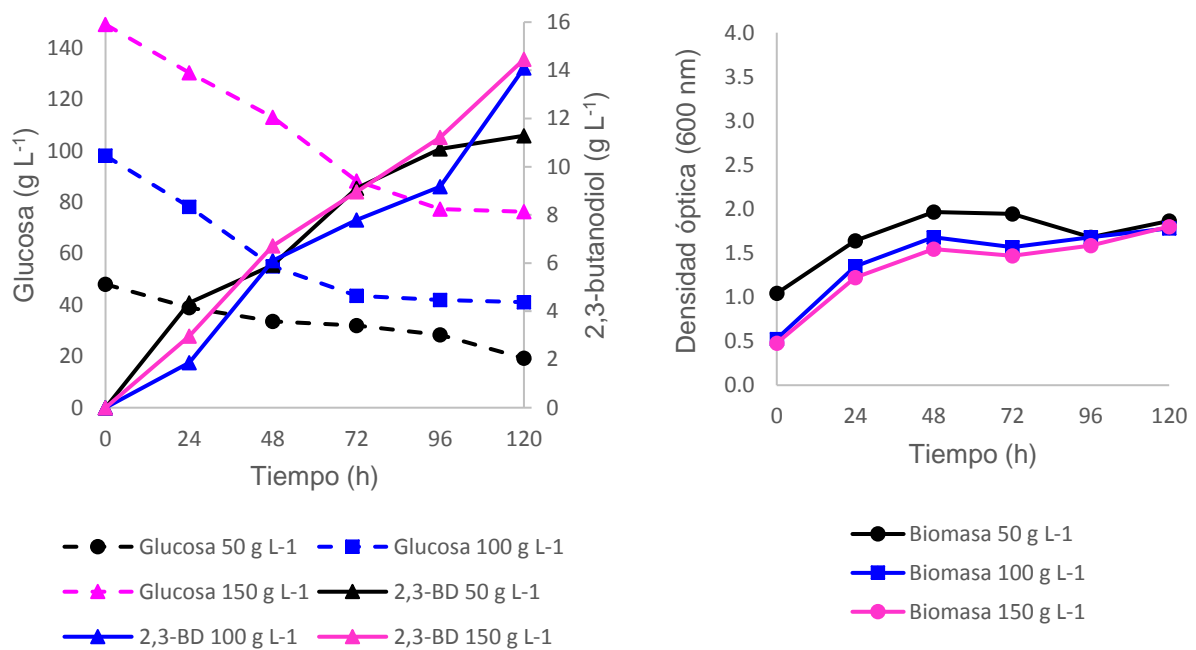


Figura 5.6 Crecimiento y producción de 2,3-butanodiol de *Klebsiella oxytoca* UM2-17 en medio mineral M1.

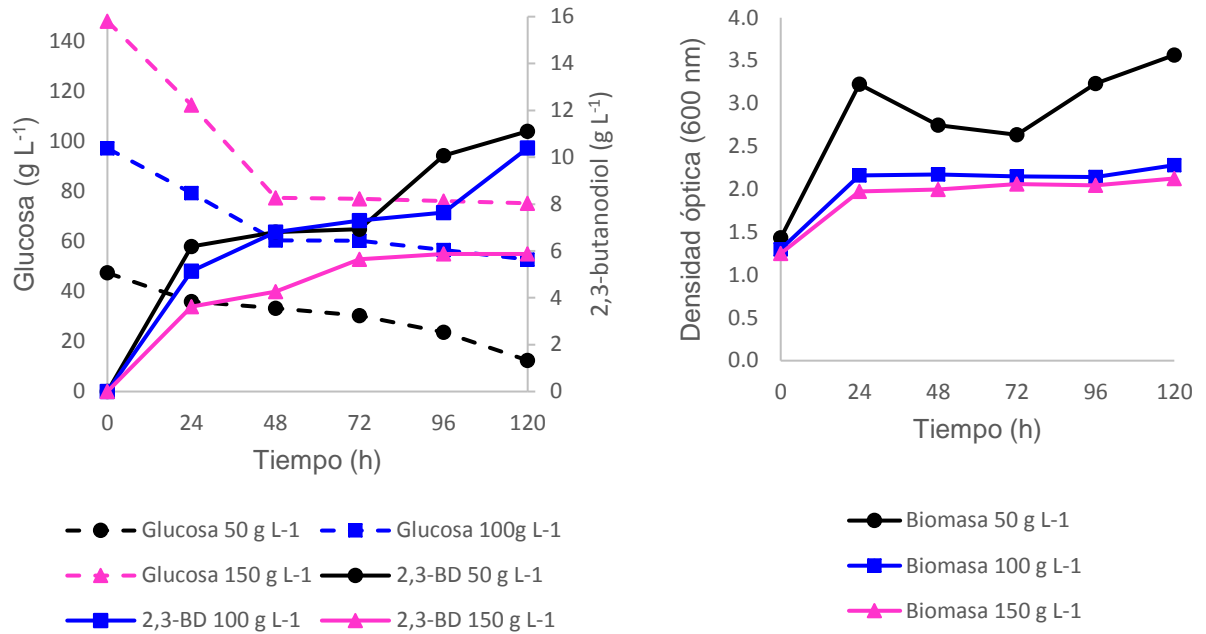


Figura 5.7 Crecimiento y producción de 2,3-butanodiol de *Klebsiella oxytoca* UM2-17 en medio mineral

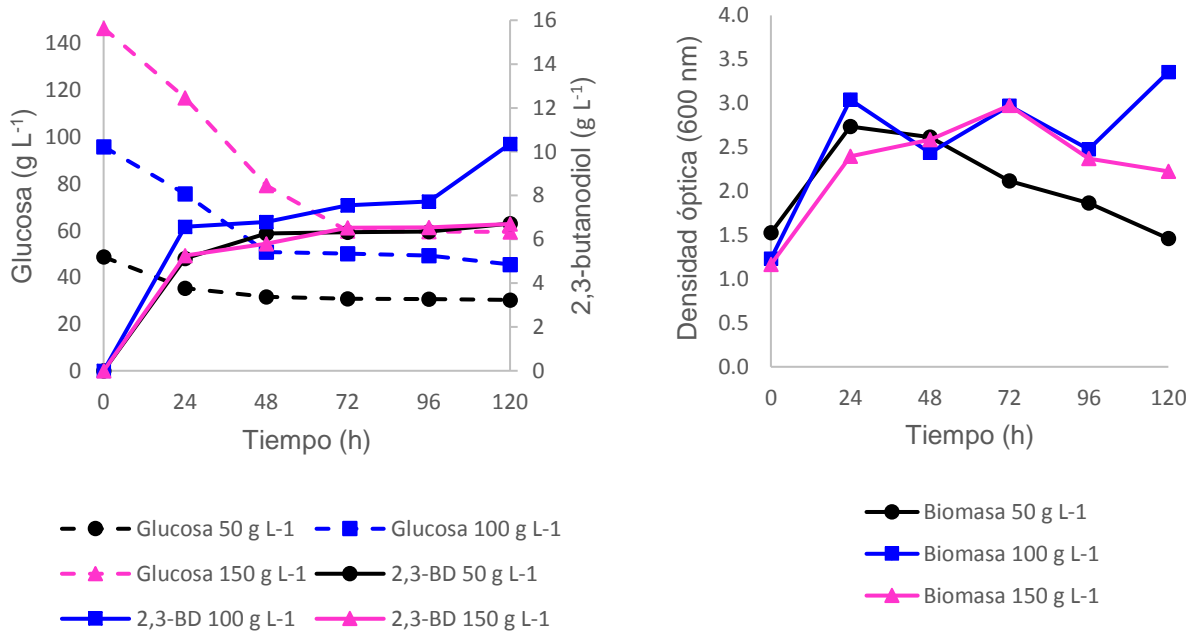


Figura 5.8 Crecimiento y producción de 2,3-butanodiol de *Klebsiella oxytoca* UM2-17 en medio mineral M3.

Tabla 5.3 Producción de 2,3-butanodiol por *Klebsiella oxytoca* UM2-17 en medio mineral.

Glucosa (g L ⁻¹)	2,3-BD (g L ⁻¹)	CS (g L ⁻¹)	Biomasa (DO)	GLI (g L ⁻¹)	ET (g L ⁻¹)
M1					
50	11.29±0.15	28.79±0.01	1.87±0.19	0.68±0.04	1.27±0.001
100	14.09±0.12	56.97±0.57	1.78±0.48	0.63±0.02	0.32±0.002
150	14.45±0.12	72.86±0.63	1.80±0.16	ND	0.90±0.005
M2					
50	11.11±0.10	35.03±0.08	3.57±0.26	0.49±0.02	0.95±0.05
100	10.39±0.16	44.46±0.019	2.28±0.50	ND	0.80±0.03
150	5.87±0.025	72.86±0.014	2.13±0.06	ND	0.42±0.06
M3					
50	6.72±0.02	18.39±0.02	1.46±0.39	0.89±0.02	1.22±0.04
100	10.36±0.01	50.36±0.01	3.36±0.24	0.50±0.01	0.90±0.01
150	6.70±0.15	87.14±0.01	2.23±0.16	ND	0.23±0.01

CS = consumo de sustrato, DO = densidad óptica a 600 nm, ND = no detectado

5.5 Cinética de crecimiento y producción de 2,3-butanodiol de *Klebsiella oxytoca* UM2-17 en medio mineral con glucosa/xilosa

Los datos de crecimiento y producción de 2,3-BD de *K. oxytoca* UM2-17, obtenidos durante el monitoreo de la FM en medio sintético con glucosa/xilosa, se concentran en las Tablas 5.4 y 5.5. Los resultados mostraron que *K. oxytoca* UM2-17 fue capaz de metabolizar glucosa, xilosa y la mezcla de ambos azúcares para producir 2,3-BD (Figs. 5.9-5.12). La producción del metabolito dependió del consumo de sustrato, obteniéndose la mayor concentración de 2,3-BD (29.4 g L⁻¹) en el medio G100 (Fig. 5.9 y Tabla 5.4), sin embargo, la glucosa es una de las principales fuentes de carbono microbiano, por lo que no es de extrañarse que *K. oxytoca* UM2-17 haya generado una mayor concentración de 2,3-BD en el medio con glucosa pura; mientras

que en el medio X100, el sustrato fue principalmente dirigido hacia la formación de biomasa (Fig. 5.10). Ahora bien, cuando la glucosa se mezcló con xilosa, *K. oxytoca* UM2-17 metabolizó ambos azúcares eficientemente, pero en forma secuencial debido a la represión catabólica ejercida por la glucosa; no obstante, el consumo de ambos azúcares confirmó que la cepa podía ser utilizada para fermentar hidrolizados procedentes de biomasa lignocelulósica. En concordancia con esto, la síntesis de 2,3-BD se favoreció cuando la xilosa se mezcló en una baja concentración (15 g L^{-1}) con glucosa, obteniéndose una concentración del metabolito y una productividad cercana a la del medio con glucosa pura (Tablas 5.4 y 5.5); además, la velocidad de crecimiento (μ) se incrementó sin modificar significativamente la biomasa, lo que permitió que la cepa aprovechara mejor el sustrato y el $Y_{p/s}$ aumentara. En contraste, cuando la concentración de xilosa se incrementó con respecto a la glucosa, el metabolismo de la pentosa pareció activarse, pues al comparar los medios G50-X50 y G150-X15 se observó que el consumo de glucosa, la concentración de 2,3-BD y la productividad fueron similares, pero el consumo de xilosa fue notablemente mayor y más rápido en el primer medio, lo que acrecentó tanto la μ como la densidad celular, pero disminuyó el rendimiento y la velocidad de producción del 2,3-BD (Tablas 5.4 y 5.5). Lo anterior concuerda con las observaciones de Ma *et al.* (2018)⁵⁶, quienes reportaron que la represión catabólica por glucosa en mezclas sintéticas de glucosa/xilosa puede eliminarse al reducir la concentración de glucosa respecto a la de xilosa. Estos resultados sugirieron que *K. oxytoca* UM2-17 no aprovechó el sustrato adecuadamente para la formación de 2,3-BD, probablemente debido a que lo utilizó para generar otros productos (exopolisacáridos) como algunos autores sugieren.^{66, 95} Pese a ello, mientras existió sustrato disponible en el medio la producción de 2,3-BD continuó hasta el final de la FM.

Por otra parte, se observó que aún cuando la producción de 2,3-BD fue notable durante la fase exponencial, la mayor concentración del metabolito se alcanzó durante la fase estacionaria, a excepción del medio X100 donde la concentración de 2,3-BD disminuyó hacia el final de la FM. En este medio también se apreció la fase de latencia, pero esto se debió a que la adaptación de la cepa se llevó a cabo en medio mineral con glucosa como fuente de carbono. No obstante, el comportamiento de *K. oxytoca* UM2-

17 fue semejante en los cuatro medios probados (Figs. 5.9-5.12) y los rendimientos obtenidos fueron similares a los reportados por otros autores ^{6, 15, 24, 66, 96}; aunque los resultados siempre estarán relacionados con la capacidad genética de la cepa utilizada y las variaciones que se puedan presentar en el medio a lo largo de la FM.

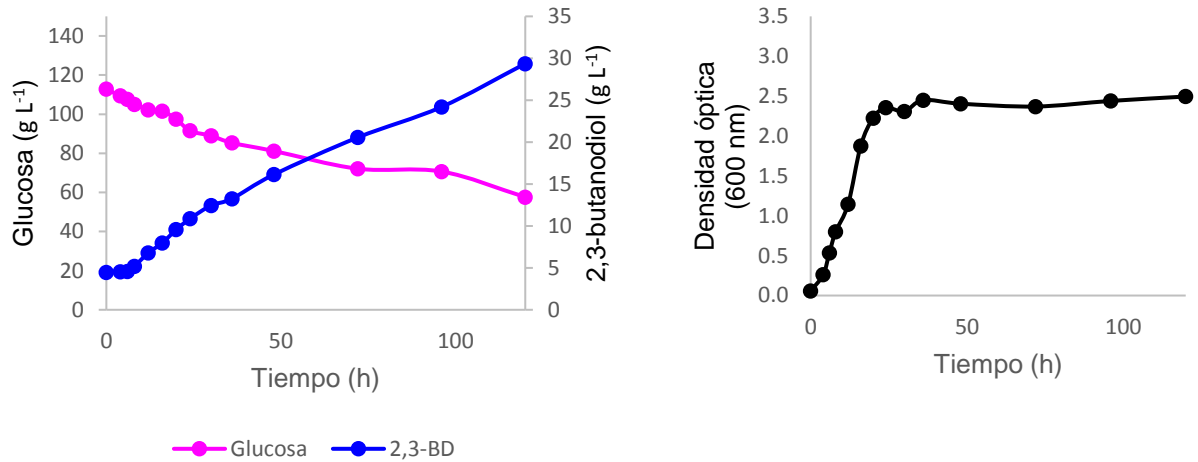


Figura 5.9 Crecimiento y producción de 2,3-butanodiol de *Klebsiella oxytoca* UM2-17 en medio M1 con 100 g L⁻¹ de glucosa.

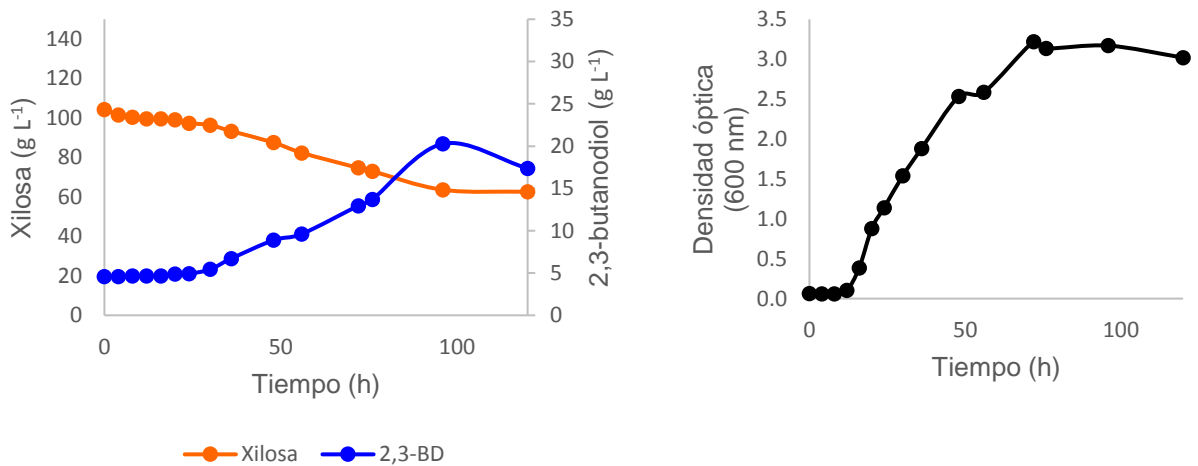


Figura 5.10 Crecimiento y producción de 2,3-butanodiol de *Klebsiella oxytoca* UM2-17 en medio M1 con 100 g L⁻¹ de xilosa.

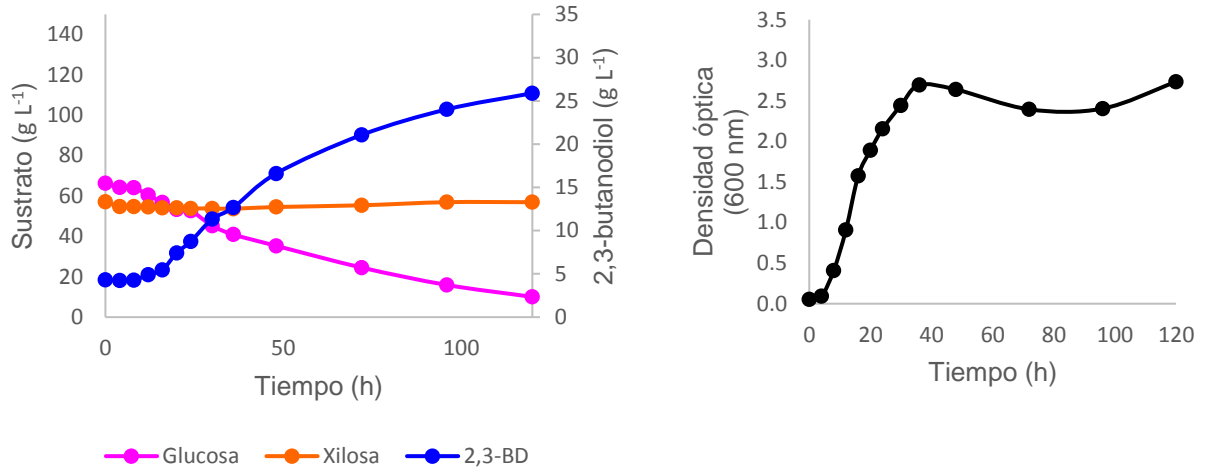


Figura 5.11 Crecimiento y producción de 2,3-butanodiol de *Klebsiella oxytoca* UM2-17 en medio M1 con 50 g L⁻¹ de glucosa y 50 g L⁻¹ de xilosa.

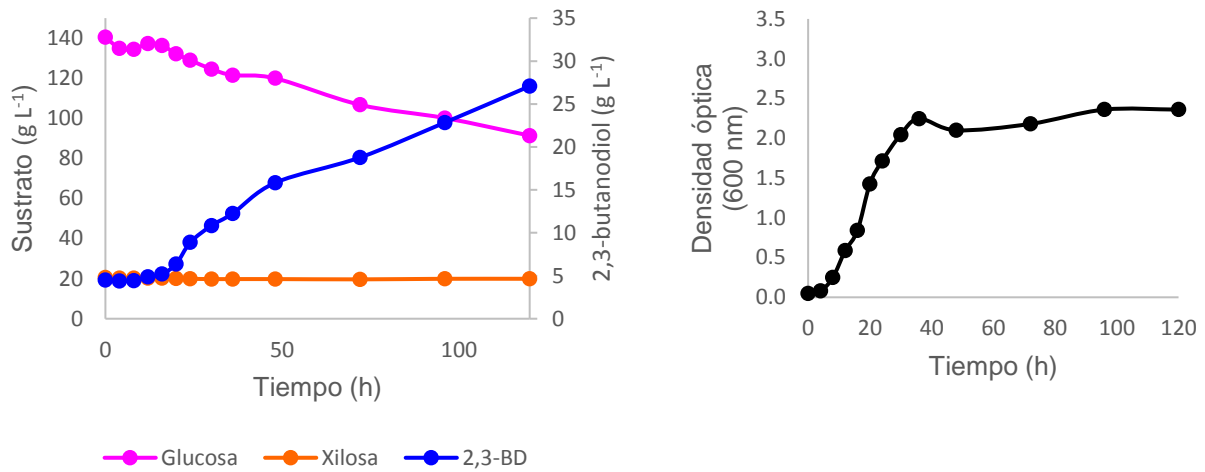


Figura 5.12 Crecimiento y producción de 2,3-butanodiol de *Klebsiella oxytoca* UM2-17 en medio M1 con 150 g L⁻¹ de glucosa y 15 g L⁻¹ de xilosa.

Tabla 5.4 Crecimiento y producción de 2,3-butanodiol en medio mineral M1 con glucosa/xilosa por *Klebsiella oxytoca* UM2-17.

Medio	Xilosa (g L ⁻¹)	Glucosa (g L ⁻¹)	2,3-BD (g L ⁻¹)	CS (g L ⁻¹)	Biomasa (DO)
G100	-	100	29.36±0.35	67.25±0.14	2.50±0.19
X100	100	-	17.37±0.24	45.35±0.01	3.02±0.29
G50-X50	50	50	25.89±0.07	56.33±0.05 (G) 2.67±0.28 (X)	2.74±0.14
G150-X15	15	150	27.07±0.21	58.34±0.28 (G) 0.14±0.16 (X)	2.36±0.18

G = glucosa, X = xilosa, CS = consumo de sustrato, DO = densidad óptica a 600 nm

Tabla 5.5 Parámetros cinéticos de la producción de 2,3-butanodiol en la fermentación batch de *Klebsiella oxytoca* UM2-17 utilizando medio mineral M1 con glucosa/xilosa.

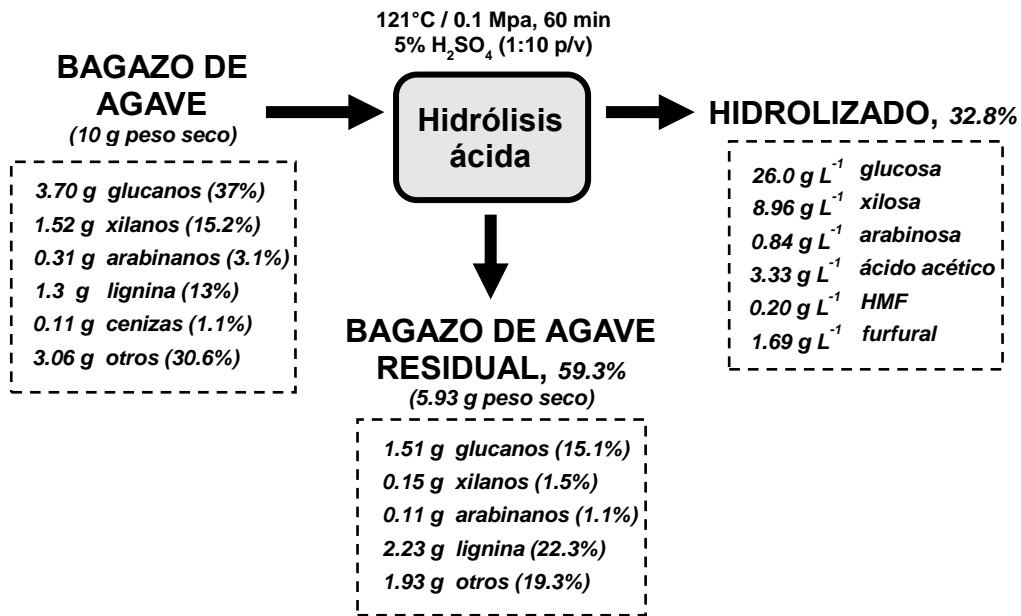
Medio	Xilosa (g L ⁻¹)	Glucosa (g L ⁻¹)	μ (h ⁻¹)	$Y_{x/s}$ (%)	$Y_{p/s}$ (%)	q_s (gS gB ⁻¹ h ⁻¹)	q_p (gP gB ⁻¹ h ⁻¹)	Q (g h ⁻¹ L ⁻¹)
G100	-	100	0.15±0.01	16.23±0.06	45.09±0.09	0.92±0.09	0.09±0.01	0.24±0.01
X100	100	-	0.23±0.01	15.60±0.04	30.65±0.79	1.47±0.15	0.04±0.01	0.14±0.01
G50-X50	50	50	0.22±0.01	16.03±0.28	38.29±0.04	1.37±0.01	0.07±0.01	0.22±0.01
G150-X15	15	150	0.18±0.01	16.47±0.03	45.95±0.55	1.09±0.30	0.08±0.01	0.23±0.01

G = glucosa, X = xilosa, B = biomasa

5.6 Composición química del bagazo de *Agave cupreata* y sus hidrolizados

La caracterización química del bagazo de *A. cupreata* (BAC) antes de la hidrólisis ácida indicó que contenía 37% de glucanos, 15.2% de xilanos, 3.1% de arabinanos y 13% de lignina, con una humedad de 6.42%; lo cual fue consistente con los datos reportados por otros autores.^{97, 98} Guragain y Vadlani (2017)¹⁵, quienes compararon la producción de 2,3-BD entre medio sintético e hidrolizados de sorgo, pasto varilla y madera, reportaron que la mejor estrategia para obtener 2,3-BD a partir de hidrolizados de biomasa era realizar las hidrólisis ácida y enzimática de manera separada. Esta dirección se siguió en el presente trabajo (Fig. 5.13) y el análisis del BAC posterior al tratamiento ácido mostró 15.1% de glucanos, 1.5% de xilanos, 1.1% de arabinanos y 22.3% de lignina; mientras que el hidrolizado ácido presentó una composición de 26 g L⁻¹ de glucanos, 8.96 g L⁻¹ de xilanos y 0.84 g L⁻¹ de arabinanos. Lo anterior indicó que el 59% de los carbohidratos permaneció en el BAC, aunque gran parte de la glucosa quedó retenida en la fase líquida, sugiriendo que las condiciones del pretratamiento no fueron adecuadas para los propósitos del trabajo, pues el bajo contenido de azúcares remanentes en el BAC ocasionó que se obtuviera un hidrolizado enzimático con una concentración de azúcares totales menor a la esperada, equivalente a 25.8 g L⁻¹, de los cuales 19.36 g L⁻¹ correspondieron a glucanos, 6.28 g L⁻¹ a xilanos y 0.15 g L⁻¹ a arabinanos (Fig. 5.13). No obstante, estos resultados señalaron que la proporción de glucosa:xilosa en el hidrolizado fue de 3:1, lo que indicó que el bagazo residual de la hidrólisis ácida contenía más glucosa que otros RLC, pues normalmente en la literatura se reporta una relación 2:1.^{11, 15} Sin embargo, aunque el pretratamiento ácido fue un procedimiento eficiente para hidrolizar el BAC, existe la posibilidad de que utilizando ácido más diluido, como algunos autores sugieren para el bagazo de *A. tequilana*, se obtenga un hidrolizado enzimático con un mayor contenido de azúcares.^{4, 15, 84, 99} Esto sería especialmente importante si se considera que algunos autores afirman que la concentración final de 2,3-BD es directamente proporcional a la concentración de glucosa empleada al inicio de la FM, de manera que una concentración inicial de azúcar alta supone obtener una concentración de 2,3-BD alta, y viceversa.^{15, 23, 54, 56, 69}

ETAPA 1



ETAPA 2

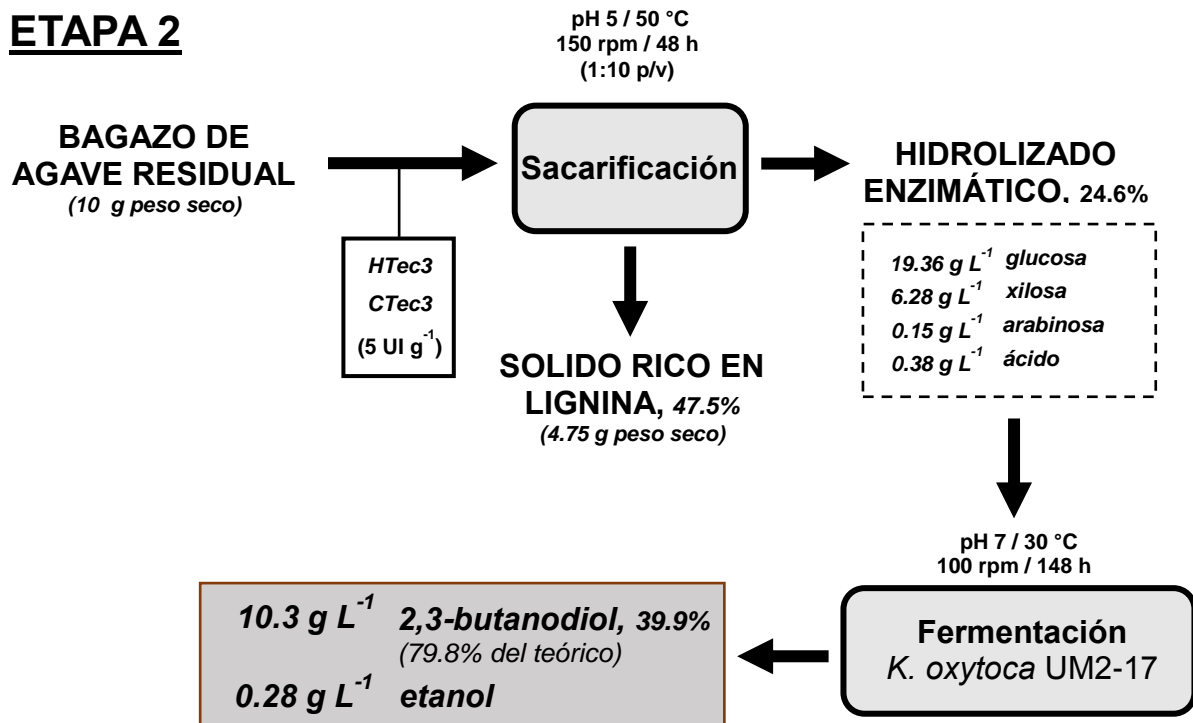


Figura 5.13 Balance de masa de la producción de 2,3-butanodiol a partir de bagazo de *Agave cupreata*.

5.7 Producción de 2,3-butanodiol con *Klebsiella oxytoca* UM2-17 usando hidrolizado de bagazo de *Agave cupreata*

El comportamiento de *K. oxytoca* UM2-17 durante la FM del hidrolizado enzimático del bagazo de *A. cupreata* (HBA) fue similar al observado en el medio complejo, pues produjo la máxima concentración de 2,3-BD (10.3 g L^{-1}) en las primeras 24 h de FM, habiendo consumido por completo la glucosa (Fig. 5.14). Esto contrastó con las observaciones en medio mineral, donde la producción de 2,3-BD se incrementó hasta el final de la FM (120 h). Así mismo, se apreció represión catabólica por glucosa, lo que ocasionó que la cepa consumiera la xilosa después de las 24 h, cuando ésta detuvo su crecimiento y entró en fase estacionaria, agotándola a las 72 h de FM. Sin embargo, entre las 24-72 h se advirtió un crecimiento diaúxico acompañado de un decremento en la concentración de 2,3-BD, siendo posible que *K. oxytoca* UM2-17 convirtiera el diol en acetoína, dada la reversibilidad de la reacción $\text{acetoína} \rightleftharpoons 2,3\text{-BD}$.⁶

¹¹ Este comportamiento ha sido previamente descrito en *P. putida* y *S. cerevisiae*.^{11, 100}

¹⁰¹ A pesar de ello, los resultados sugieren que *K. oxytoca* UM2-17 aprovechó la riqueza nutricional del HBA para solventar la falta de glucosa y xilosa, pues la producción de 2,3-BD se reactivó después de las 72 h de FM, acumulando la misma concentración (10.04 g L^{-1}) a las 120 h, indicando que la cepa metabolizó eficientemente otras fuentes de carbono presentes en el hidrolizado, como los arabinanos o incluso compuestos no detectados (Fig. 5.12).^{6, 11, 54, 95, 102, 103} Además, cabe resaltar que aunque la tasa de producción más alta de 2,3-BD se obtuvo cuando *K. oxytoca* UM2-17 se encontraba en fase exponencial, la mayor concentración del metabolito se registró en fase estacionaria, en correlación con el agotamiento de la glucosa y la xilosa (Fig. 5.14 y Tabla 5.6). Esto concuerda con lo descrito por Celinska y Grajek (2009)¹¹, quienes explicaron que durante la FM butanodiólica todos los compuestos involucrados normalmente se sintetizan al final de la fase exponencial y en la fase estacionaria, bajo condiciones de oxígeno limitante.

En cuanto a la composición del HBA, ésta favoreció considerablemente el crecimiento de *K. oxytoca* UM2-17, pues la biomasa se triplicó en comparación con las fermentaciones en medio mineral; no obstante, la densidad celular pareció no afectar directamente la producción de 2,3-BD (Tabla 5.6). De acuerdo con Kim *et al.* (2016)¹⁰³,

la síntesis de 2,3-BD está más ligada al crecimiento de *K. oxytoca* que a la biomasa formada, corroborando que en los procesos microbianos una mayor biomasa no necesariamente implica una mayor formación del producto.^{6, 11, 90, 104, 105}

Por otra parte, el rendimiento del diol fue de 0.4 g g⁻¹, lo que correspondió al 80% del valor teórico (considerando que el HBA contenía 25.8 g L⁻¹ de azúcares fermentables) y resultó similar al del medio mineral G150-X15, aunque la productividad fue notablemente más baja (Tabla 5.6). Ahora bien, si la cepa produjo 27.1 g L⁻¹ de 2,3-BD en el medio mineral G150-X15 y 10.3 g L⁻¹ en el HBA con solo el 13% de glucosa y el 4% de xilosa, es muy probable que al mejorar las condiciones de pretratamiento del BAC se obtenga una concentración mayor de 2,3-BD, incluso superior a la observada en el medio sintético; pues la literatura muestra que concentraciones de sustrato menores a 70 g L⁻¹ al inicio de la FM conlleva a concentraciones finales de 2,3-BD relativamente bajas^{18, 21, 51, 56, 61}, lo que se corroboró con los experimentos en medio mineral, donde se alcanzaron concentraciones mayores del metabolito cuando el contenido de azúcares en el medio fue mayor (Tabla 5.4).

Las investigaciones sobre la producción de 2,3-BD a partir de materiales lignocelulósicos es limitada, sin embargo es bien sabido que cuando se utiliza biomasa como materia prima, la concentración, el rendimiento y la productividad del 2,3-BD son generalmente menores en comparación con los valores que se obtienen en medio sintético.^{10, 56, 68} Los mejores resultados se han obtenido empleando estrategias de FM diferentes al cultivo batch, con azúcares puros en concentraciones iniciales entre 70-200 g L⁻¹^{8, 15, 67, 96, 106, 107} No obstante, aunque en este trabajo no se manipuló ninguna variable operativa, algunos autores reportaron concentraciones de 2,3-BD similares a las obtenidas con el HBA: Grover *et al.* (1990)⁵¹ utilizaron una cepa de *K. pneumoniae* para llevar a cabo una FM batch de hidrolizado de madera, obteniendo 13.3 g L⁻¹ de 2,3-BD; Cho *et al.* (2012)⁶¹ utilizaron una cepa de *K. oxytoca* para realizar una FM batch en medio sintético con glucosa, logrando 10.9 g L⁻¹ de 2,3-BD; Joo *et al.* (2016)²¹ fermentaron cultivos batch con una cepa de *E. aerogenes* sobre hidrolizados de álamo amarillo, larix y cáscara de arroz, reportando 14.3 g L⁻¹, 12.4 g L⁻¹ and 10.2 g L⁻¹ de 2,3-BD, respectivamente; y Saratale *et al.* (2016)¹⁰⁸ realizaron una FM batch con residuos de arroz usando una cepa de *K. pneumoniae*, alcanzando 11.4 g L⁻¹ de 2,3-BD. En

estos trabajos se observaron rendimientos más bajos y productividades más altas que las obtenidas con el HBA. De la misma manera, el rendimiento del hidrolizado (0.4 g g^{-1}) fue superior a los registrados en medio mineral, lo que se atribuyó a la mayor biomasa y la baja formación de subproductos, como el etanol (Fig. 5.13 y Tabla 5.5).^{10, 11, 15} Además, el rendimiento del HBA fue comparable con la investigación de Huang *et al.* (2013)⁵⁴, quienes lograron rendimientos de 0.32 g g^{-1} y 0.41 g g^{-1} al fermentar hidrolizado de paja de arroz con especies de *Klebsiella*; mientras que Ji *et al.* (2010)¹⁰⁶ y Guragain y Vadlani (2017)¹⁵ reportaron valores similares utilizando glucosa como sustrato. Acorde a lo anterior, se estimó que *K. oxytoca* UM2-17 dirigió prácticamente todo el azúcar presente en el HBA hacia la formación de 2,3-BD. En contraste, la productividad del HBA fue baja ($0.06 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$) y sólo comparable con el trabajo de Jiang *et al.* (2012)⁶⁹, quienes señalaron una productividad de $0.069 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ al fermentar hidrolizado ácido de cáscaras de *Jatropha* con una cepa de *K. oxytoca*. Lo anterior pudo estar relacionado con la baja concentración inicial de azúcares en el HBA^{54, 56, 69}, de manera que cuando *K. oxytoca* UM2-17 alcanzó la fase estacionaria sin glucosa o xilosa en el medio, comenzó a metabolizar otros compuestos presentes en el HBA pero a menor velocidad, ocasionando que la producción de 2,3-BD fuera más lenta, y por ende la productividad disminuyera considerablemente. Aparte, la represión catabólica por glucosa y el largo tiempo de FM fueron factores que también pudieron haber influido en la baja productividad.^{15, 56, 103, 105}

Ciertamente es posible mejorar la concentración final, el rendimiento y la productividad del 2,3-BD a través de la manipulación de los factores clave del proceso, sin embargo, la literatura muestra que es complicado alcanzar valores altos para los tres parámetros de forma simultánea.^{56, 105}

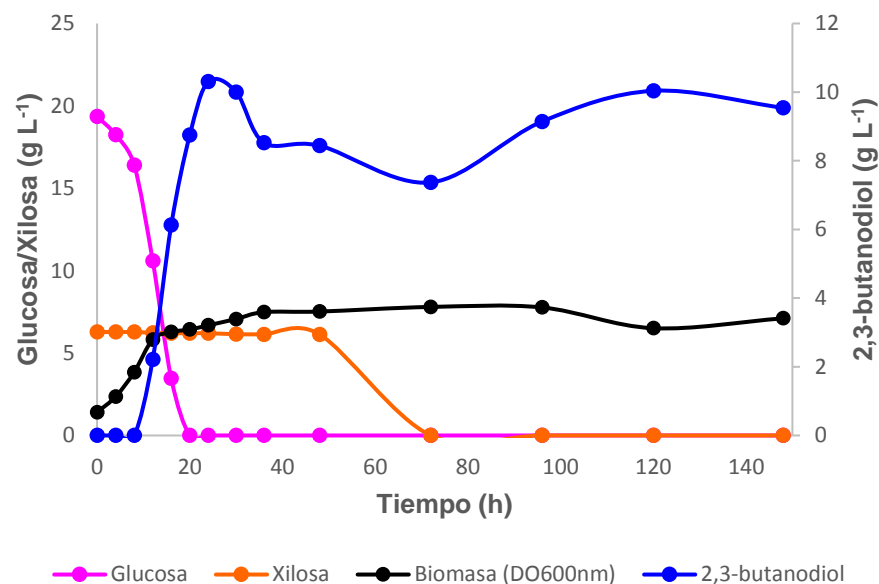


Figura 5.14 Producción de 2,3-butanodiol de *Klebsiella oxytoca* UM2-17 en la fermentación batch del hidrolizado de bagazo de *Agave cupreata*.

Tabla 5.6 Producción de 2,3-butanodiol de *Klebsiella oxytoca* UM2-17 en fermentaciones batch de medio mineral e hidrolizado de bagazo de *Agave cupreata*.

Medio	Xilosa inicial (g L ⁻¹)	Glucosa inicial (g L ⁻¹)	Xilosa consumida (g L ⁻¹)	Glucosa consumida (g L ⁻¹)	2,3-BD (g L ⁻¹)	Biomasa (DO)	Tiempo (h)	Y _{p/s} (g g ⁻¹)	Q (g L ⁻¹ h ⁻¹)
HBA	6.28	19.36	6.28±0.01	19.36±0.01	10.30±0.14	6.75±0.33	24	0.40±0.46	0.06±0.001
G150-X15	15	150	0.14±0.16	58.34±0.28	27.07±0.21	2.36±0.18	120	0.46±0.55	0.23±0.001

HBA = hidrolizado de bagazo de *A. cupreata*, G = glucosa, X = xilosa, DO = densidad óptica a 600 nm

VI. CONCLUSIÓN

La cepa silvestre *K. oxytoca* UM2-17 fue capaz de metabolizar tanto hexosas como pentosas, lo cual resultó particularmente útil al momento de fermentar el HBA, pues a pesar de la represión catabólica por glucosa, la cepa consumió por completo la xilosa y la glucosa presentes en el hidrolizado. Así mismo, la cepa mostró tolerancia a altas concentraciones de azúcar sin sufrir inhibición, produciendo más 2,3-BD en los medios con mayor contenido de sustrato. Además, la producción del diol no dependió de la biomasa formada en el medio de FM. Sin embargo, cuando la producción de 2,3-BD alcanza su valor máximo, si la FM continua y el sustrato preferente ha sido completamente metabolizado o está por terminarse, *K. oxytoca* UM2-17 utiliza el 2,3-BD producido como fuente de carbono, aunque si detecta otro sustrato asimilable en el medio, ésta lo consumirá y el 2,3-BD seguirá acumulándose; empero, esto no garantiza conseguir una concentración superior a la obtenida con anterioridad. Por ende, no se recomienda prolongar la FM más tiempo del que *K. oxytoca* UM2-17 requiera para alcanzar la producción máxima del diol a partir de los sustratos de interés.

No obstante, se requiere más investigación sobre el bagazo de agave como materia prima para producir 2,3-BD, y aún más sobre el BAC, pues la mayoría de los trabajos se centran en el uso de otras especies de *Agave* para obtener productos como el etanol, el metano o el xilitol, pero no el 2,3-BD, lo que dificulta la comparación de resultados. Sin embargo, el presente estudio demostró que el BAC es un RLC con un gran potencial para generar 2,3-BD utilizando la cepa silvestre *K. oxytoca* UM2-17.

VII. PERSPECTIVAS A FUTURO

- Caracterizar el HBA más detalladamente, para explicar con mayor precisión el comportamiento de *K. oxytoca* UM2-17.
- Optimizar las variables operativas del pretratamiento y la FM del HBA con la cepa *K. oxytoca* UM2-17, para mejorar la producción de 2,3-BD.
- Evaluar las posibles configuraciones del proceso fermentativo del HBA (*batch*, *fed-batch*, continuo, etc.) con *K. oxytoca* UM2-17, que bajo las condiciones operativas óptimas permitan incrementar la producción de 2,3-BD.
- Determinar la proporción adecuada de xilosa en la mezcla glucosa/xilosa, que favorezca la activación del metabolismo de la pentosa en *K. oxytoca* UM2-17, para producir 2,3-BD.

VIII. REFERENCIAS

1. Carreón, R. O. E.; Sabido, R. L. A.; Centeno, L. S.; Leal, R. L. J.; Martínez, J. A.; Fernández, S. M. T. 2009. Etanol Carburante. Revista de la Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería A. C. 13: 79-102.
2. Ripoll, M. V. 2017. Producción de 2,3-butanodiol a partir de glicerina (residuo de biodiesel). Tesis de Doctorado. Madrid, España.
3. López, G. E. 2013. Procesamiento de biomasa lignocelulósica para la obtención de bioetanol. Experiencia Recepcional. Universidad Veracruzana. <http://cdigital.uv.mx/bitstream/123456789/35127/1/lopezgarciaemmanuel.pdf>.
4. Abreu, S. J. S. 2013. Aprovechamiento de bagazo de *Agave tequilana* Weber para la producción de bio-hidrógeno. Tesis de Maestría. Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A. C. San Luis Potosí, S.L.P., México.
5. Aguirre-Dugua, X.; Eguiarte, L. E. 2013. Genetic diversity, conservation, and sustainable use of wild *Agave cupreata* and *Agave potatorum* extracted for mezcal production in Mexico. Journal of Arid Environments. 90: 36-44.
6. Białkowska, A. M. 2016. Strategies for efficient and economical 2,3-butanediol production: new trends in this field. World J Microbiol Biotechnol. 32: 200.
7. Caspeta, L.; Caro-Bermúdez, M. A.; Ponce-Noyola, T.; Martínez, A. 2014. Enzymatic hydrolysis at high-solids loadings for the conversion of agave bagasse to fuel ethanol. Applied Energy. 113:277-286.
8. Ji, X.; Huang, H; Ouyang, P. 2011. Microbial 2,3-butanediol production: A state-of-the-art-review. Biotechnology Advances. 29: 351-364.

-
9. Martin, M. P.; Peters, Ch. M.; Palmer, M. I.; Illsley, C. 2011. Effect of habitat and grazing on the regeneration of wild *Agave cupreata* in Guerrero, México. *Forest Ecology and Management*. 262: 1443-1451.
 10. Cao, N.; Xia, Y.; Gong, C. S.; Tsao, G. T. 1997. Production of 2,3-Butanediol from Pretreated Corn Cob by *Klebsiella oxytoca* in the Presence of Fungal Cellulase. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 63:129-139.
 11. Celinska, E.; Grajek, W. 2009. Biotechnological production of 2,3-butanediol- Current state and prospects. *Biotechnology Advances*. 27: 715–725.
 12. Duan, H.; Yamada, Y. Sato, S. 2017. Vapor-phase hydrogenation of acetoin and diacetyl into 2,3-butanediol over supported metal catalysts. *Catalysis Communications*. 90: 53-56.
 13. Koutinas, A. A.; Yepez, B.; Kopsahelis, N.; Freire, D. M. G.; Machado de Castro, A.; Papanikolaou, S.; Kookos, I. A. 2016. Techno-economic evaluation of a complete bioprocess for 2,3- butanediol production from renewable resources. *Bioresource Technology*. 204: 55-64.
 14. Syu, M. J. 2001. Biological production of 2,3-butanediol. *Applied Microbiology and biotechnology*. 55: 10-18.
 15. Guragain, Y. N.; Vadlani, P. V. 2017. 2,3-Butanediol production using *Klebsiella oxytoca* ATCC8724: evaluation of biomass derived sugars and fed-batch fermentation process. *Process Biochemistry*. 58: 25-34.
 16. Köpke, M.; Mihalcea, C.; Liew, F.; Tizard, J. H.; Ali, M. S.; Conolly, J. J.; Al-Sinawi, B.; Simpson, S. D. 2011. 2,3-butanediol production by acetogenic bacteria, an alternative route to chemical synthesis, using industrial waste gas. *Applied and Environmental Microbiology*. 77: 5467–5475.
-

-
17. Parés, F. R.; Juárez, G. A. 2012. Biochemistry of microorganisms: formic acid. Revertè Editorial. 9: 116-119, 127-129. ISBN: 978-84-291-9187-5.
18. Park, J. H.; Choi, M. A.; Kim, Y. J.; Kim, Y. Ch.; Chang, Y. K.; Jeong, K. J. 2017. Engineering of *Klebsiella oxytoca* for production of 2,3-butanediol via simultaneous utilization of sugars from a *Golenkinia* sp. hydrolysates. Bioresource Technology. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2017.05.111>.
19. Champluvier, B.; Decallonne, J.; Rouxhet, P. G. 1989. Influence of sugar source (lactose, glucose, galactose) on 2,3-butanediol production by *Klebsiella oxytoca* NRRL-B199. Archives of Microbiology. 152: 411-414.
20. Gurrola, A. D. L. 2016. Aprovechamiento integral del bagazo de agave mezcalero cocido para su uso en la agricultura y ganadería. Tesis de Maestría. Instituto Politécnico Nacional, unidad Durango. Durango, Durango, México.
21. Joo, J.; Lee, S. J.; Yoo, H. Y.; Kim, Y.; Jang, M.; Lee, J.; Han, S. O.; kim, S. W.; Park, Ch. 2016. Improved fermentation of lignocellulosic hydrolysates to 2,3-butanediol through investigations of effects of inhibitory compounds by *Enterobacter aerogenes*. Chemical Engineering Journal. 306: 916-924.
22. López Álvarez, J. A. 2007. Selección y manipulación genética de una levadura tolerante y sobreproductora de etanol. Tesis de Maestría. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.
23. Kallbach, M.; Horn, S.; Kuenz, A.; Prübe, U. 2017. Screening of novel bacteria for the 2,3-butanediol production. Applied Microbiology and Biotechnology. 101:1025–1033.
24. Ji, X. J.; Nie, Z. K.; Huang, H.; Ren, L. J.; Peng, Ch.; Ouyang, P. K. 2011. Elimination of carbon catabolite repression in *Klebsiella oxytoca* for efficient 2,3-
-

-
- butanediol production from glucose–xylose mixture. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 89: 1119-1125.
25. Fedit. 2008. Tendencias en el uso de la biotecnología en el sector químico. [http://marinponzasociados.com/PDFINDUSTRIA/Tendencias en el Uso de Biotecnologia.pdf](http://marinponzasociados.com/PDFINDUSTRIA/Tendencias%20en%20el%20Uso%20de%20Biotecnologia.pdf). España.
26. Lee, S. J.; Lee, J. H.; Yang, X.; Kim, S. B.; Lee, J. H.; Yoo, H. Y.; Park, Ch.; Kim, S. W. 2015. Phenolic compounds: Strong inhibitors derived from lignocellulosic hydrolysate for 2,3-butanediol production by *Enterobacter aerogenes*. *Biotechnology Journal*. 10: 1920–1928.
27. MacFaddin, J. F. 2003. Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica: reaction of Voges-Proskauer. Third edition. Panamericana Editorial. 29: 190-198. ISBN: 950061572X, 9789500615723.
28. Amruta, M.; Pandey, R. A. 2014. Lignocellulosic biobutanol production: Gridlocks and potential remedies. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 37: 21–35.
29. Cuervo, L.; Folch, J. L.; Quiroz, L. E. 2009. Lignocelulosa Como Fuente de Azúcares Para la Producción de Etanol. *Revista de la Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería A. C.* 13:11- 25.
30. Han, S. H.; Cho, D. H.; Kim, Y. H.; Shin, S. J. 2013. Biobutanol production from 2-year-old willow biomass by acid hydrolysis and acetone-butanol-ethanol fermentation. *Energy*. 61: 13-17.
31. Rangel, O. S. X. 2012. Estudio del efecto de enzimas ligninolíticas y celulolíticas obtenidas del hongo *Pleurotus ostreatus* sobre una gramínea forrajera tropical. Universidad Nacional de Colombia. <http://www.bdigital.unal.edu.co/8853/1/sandraximenarangelortega.2012.pdf>.
-

-
32. Balat, M. 2011. Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: A review. *Energy Conversion and Management*. 52: 858-875.
33. Bellido-Díez, C. 2013. Obtención de bioetanol 2G a partir de hidrolizados de paja de trigo. Fermentación conjunta de los penta y hexa carbohidratos con *Pichia stipitis*. Tesis Doctoral. Universidad de Valladolid.
34. Rangel, J, A.; Gutiérrez, H. A.; Wadnívar, L. M. 2011. Bioetanol a partir de residuos lignocelulósicos. <http://www.slideshare.net/jaimeantoniorangel/presentacion-bioetanol-a-partir-de-residuos-lignocelulsicos>.
35. Saval, S. 2012. Aprovechamiento de Residuos Agroindustriales: Pasado, Presente y Futuro. *Revista de la Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería A. C.* 16: 14-46.
36. Castro Martínez, C.; Valverde, M. E.; Paredes López, O. 2009. Biocombustibles: biomasa lignocelulósica y procesos de producción. *Ideas CONCYTEG*. 54: 1246-1270.
37. Conesa, C.; Seguí, L.; Fito, P. 2013. Sacarificación de residuos industriales de Piña con mezclas de enzimas comerciales. <http://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/28121/TESIS%20DE%20MASTER%20CLAUDCL.pdf?sequence=1>.
38. Zamora, A. 2019. Carbohidratos o Glúcidos - Estructura Química. <http://www.scientificpsychic.com/fitness/carbohidratos2.html>.
-

-
39. Cheng, C.; Pei-Yi, C.; Bor-Yann, C.; Wen-Jhy, L.; Chiu-Yue, L.; Jo-Shu, C. 2012. Biobutanol production from agricultural waste by an acclimated mixed bacterial microflora. *Applied Energy*. 100: 3-9.
40. Oliva, A.; Dufour, J. 2014. El papel de la ingeniería genética en el proceso de producción de bioetanol de segunda generación. <http://www.madrimasd.org/blogs/energiasalternativas/2014/03/28/132291>.
41. Conde-Mejía, C.; Jiménez-Gutiérrez, A.; El-Halwagi, M. 2012. A comparison of pretreatment methods for bioethanol production from lignocellulosic materials. *Process Safety and Environmental Protection*. 90: 189-202.
42. Lozanoff, J.; Heinichen, S.; Marchi, G.; Risso, E. 2007. Bioenergía: revisión de tecnologías emergentes. Observatorio de políticas públicas de Argentina. www.cag.igm.gov.ar.
43. Farías-Sánchez, J.C. 2014. Evaluación y optimización de pretratamientos para obtención de bioetanol a partir de aserrín de pino. Tesis de Maestría. Universidad Michoacana de San Nicolas de Hidalgo (UMSNH). Morelia, Michoacán, México.
44. Ballesteros M. 2007. Biocombustibles segunda generación. <http://www.energiasrenovables.ciemat.es/suplementos/2generacion/2gentext.htm>
45. Malagón, P. 2012. Biocombustibles. <http://biocombustibles2012.blogspot.mx/p/marco-teorico.html>.
46. Adlakha, N.; Yazdani, S. S. 2015. Efficient production of (R,R)- 2,3- butanediol from cellulosic hydrolysate using *Paenibacillus polymyxa* ICGEB2008. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 42:21–28.
-

-
47. Bialkowska, A. M.; Gromek, E.; Krysiak, J.; Sikora, B.; Kalinowska, H.; Jedrzejczak-Krzepkowska, M.; Kubik, C.; Lang, S.; Schütt, F.; Turkiewicz, M. 2015. Application of enzymatic apple pomace hydrolysate to production of 2,3-butanediol by alkaliphilic *Bacillus licheniformis* NCIMB. *Journal of industrial Microbiology and Biotechnology*. 42:1609–1621.
48. Dai, J. Y.; Zhao, P.; Cheng, X. L.; Xiu, Z. L. 2015. Enhanced Production of 2,3-Butanediol from Sugarcane Molasses. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 175:3014–3024.
49. Erian, A. M.; Gibisch, M.; Pflügl, S. 2018. Engineered *E. coli* W enables efficient 2,3-butanediol production from glucose and sugar beet molasses using defined minimal medium as economic basis. *Microbial cell factories*. 17:190.
50. Gao, Y.; Huang, H.; Chen, S.; Qi, G. 2018. Production of optically pure 2,3-butanediol from *Miscanthus floridulus* hydrolysate using engineered *Bacillus licheniformis* strain. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 34:66.
51. Grover, B. P.; Garg, S. K.; Verma, J. 1990. Production of 2,3-butanediol from wood hydrolysate by *Klebsiella pneumoniae*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 6: 328-332.
52. Hazzena, S. H.; Pandey, A.; Binod, P. 2016. Evaluation of oil palm frond hydrolysate as a novel substrate for 2,3-butanediol production using a novel isolate *Enterobacter cloacae* SG1. *Renewable Energy*. 98: 216-220.
53. Hong, E.; Kim, D.; Kim, J.; Kim, J.; Yoon, S.; Rhie, S.; Ha, S.; Ryu, Y. 2015. Optimization of alkaline pretreatment on corn stover for enhanced production of 1,3-propanediol y 2,3-butanediol by *Klebsiella pneumoniae* AJ4. *Biomass and Bioenergy*. 77: 177-185.
-

-
54. Huang, Ch. F.; Jiang, Y. F.; Guo, G. L.; Hwang, W. S. 2013. Method of 2,3-butanediol production from glycerol and acid-pretreated rice straw hydrolysate by newly isolated strains: pre-evaluation as an integrated biorefinery process. *Bioresource Technology*. 135: 446-453.
55. Kang, Y. I.; Park, J. M.; Hong, W. K.; Kim, Y. S.; Jung, Y. R.; Kim, S. B.; Heo, S. Y.; Lee, S. M.; Kang, J. Y.; Oh, B. R.; Kim, D. H.; Seo, J. W.; Kim, C. H. 2015. Enhanced production of 2,3-butanediol by a genetically engineered *Bacillus* sp. BRC1 using a hydrolysate of empty palm fruit bunches. *Bioprocess and Biosystems Engineering*. 38:299–305.
56. Ma, K.; He, M.; You, H.; Pan, L.; Wang, Z.; Wang, Y.; Hu, G.; Cui, Y.; Maeda, T. 2018. Improvement of (R,R)-2,3-butanediol production from corn stover hydrolysate by cell recycling continuous fermentation. *Chemical Engineering Journal*. 332: 361-369.
57. Sun, L. H.; Wang, X. D.; Dai, J. Y.; Xiu, Z. L. 2009. Microbial Production of 2,3-butanediol from Jerusalem artichoke tubers by *Klebsiella pneumoniae*. *Applied Microbiology and biotechnology*. 82:847–852.
58. Wang, A.; Wang, Y.; Jiang, T.; Li, L.; Ma. C.; Xu, P. 2010. Production of 2,3-butanediol from corncob molasses, a waste by-product in xylitol production. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 87: 965–970.
59. Yu, E. K. C.; Levitin, N.; Saddler, J.N. 1982. Production of 2,3-butanediol by *Klebsiella pneumoniae* grown on acid hydrolyzed wood hemicellulose. *Biotechnology Letters*. 4: 741-746.
60. Yu, E. K. C.; Deschatelets, L.; Saddler, J. N. 1984. The Bioconversion of Wood Hydrolyzates to Butanol and Butanediol. *Biotechnology Letters*. 6: 327-332.
-

-
61. Cho, J. H.; Rathnasingh, Ch.; Song, H.; Chung, B. W.; Lee, H. J.; Seung, D. 2012. Fermentation and evaluation of *Klebsiella pneumoniae* and *K. oxytoca* on the production of 2,3-butanediol. *Bioprocess and Biosystems Engineering*. 35: 1081–1088.
62. Wong, Ch. L.; Yen, H. W.; Lin, Ch. L.; Chang, J. S. 2014. Effects of pH and fermentation strategies on 2,3-butanediol production with an isolated *Klebsiella* sp. Zmd30 strain. *Bioresource Technology*. 152: 169–176.
63. Chen, J.; Zidwick, M. J.; Rogers, P. 2013. Organic acid and solvent production: butanol, acetone, and isopropanol; 1,3- and 1,2-propanediol production; and 2,3-butanediol production. *The prokaryotes - Applied Bacteriology and Biotechnology*. DOI 10.1007/978-3-642-31331-8_386.
64. Brisse, S.; Grimont, F.; Grimont, P. A. D. 2006. The Genus *Klebsiella*. *Prokaryotes*. 6:159–196.
65. Fond, O.; Jansen, N. D.; Tsao, G. T. 1985. A model of acetic acid and 2,3-butanediol inhibition of the growth and metabolism of *Klebsiella oxytoca*. *Biotechnology Letters*. 7: 727-732.
66. Guragain, Y. N.; Chitta, D.; Karanjikar, M.; Vadlani, P. V. 2017. Appropriate lignocellulosic biomass processing strategies for efficient 2,3-butanediol production from biomass-derived sugars using *Bacillus licheniformis* DSM 8785. *Food and Bioproducts Processing*. 104: 147–158.
67. Afschar, A. S.; Bellgardt, K. H.; Vaz-Rosell, C. E.; Czok, A.; Schaller, K. 1991. The production of 2,3-butanediol by fermentation of high test molasses. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 34: 582-585.
-

-
68. Cheng, K. K.; Liu, Q.; Zhang, J. A.; Li, J. P.; Xu, J. M.; Wang, G. H. 2010. Improved 2,3-butanediol production from corn cob acid hydrolysate by fed-batch fermentation using *Klebsiella oxytoca*. *Process Biochemistry*. 45: 613-616.
69. Jiang, L. Q.; Fang, Z.; Guo, F.; Yang, L. B. 2012. Production of 2,3-butanediol from acid hydrolysates of *Jatropha* hulls with *Klebsiella oxytoca*. *Bioresource Technology*. 107: 405-410.
70. De Andrade, C. J.; De Andrade, L. M.; Bution, M. L.; Dolder, M. A. H.; Cavalcante, B. F. F.; Pastore, G. M. 2016. Optimizing alternative substrate for simultaneous production of surfactin and 2,3-butanediol by *Bacillus subtilis* LB5a. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 6: 209-218.
71. Damián, R. R. M. 2012. Aislamiento, caracterización molecular y bioquímica del consorcio microbiano asociado a la fermentación alcohólica para la producción de mezcal en Michoacán. Tesis de maestría. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia, Michoacán, México.
72. Velázquez-Valadez, U.; Farías-Sánchez, J. C.; Vargas-Santillán, A.; Castro-Montoya, A. J. 2016. *Tequilana weber* agave bagasse enzymatic hydrolysis for the production of fermentable sugars: oxidative-alkaline pretreatment and kinetic modeling. *Bioenergy Research*. DOI 10.1007/s12155-016-9757-8.
73. Salas, T. J.; Hernández, S. L. Y. 2015. Mezcal *cupreata*, fuente de admiración. *Revista Ciencia – Academia Mexicana de Ciencias*. 66: 42-47.
74. Consejo Regulador del Mezcal (CRM). 2018. www.crm.org.mx.
75. Gurrola, A. D. L. 2016. Aprovechamiento integral del bagazo de agave mezcalero cocido para su uso en la agricultura y ganadería. Tesis de Maestría. Instituto Politécnico Nacional, unidad Durango. Durango, Durango, México.
-

-
76. Bautista-Justo, M.; García-Oropeza, L.; Barboza-Corona, J. E.; Parra-Negrete, L. A. 2001. El *Agave Tequilana* weber y la producción de tequila. Instituto de Ciencias Agrícolas, Universidad de Guanajuato. Acta Universitaria. 11: 26-34. Guanajuato, México.
77. López, O. K. M.; Mojica, A. R. Ma.; González, P. D.; Pérez-Pimienta, J. A. 2015. Obtención de sacarificados viables para la fermentación empleando bagazo de agave pretratado con líquidos iónicos. Memorias del XVI Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. Guadalajara, Jalisco, México.
78. Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco (CIATEJ). 2014. Manual para la estandarización de los procesos de producción del mezcal guerrerense, A. C. ISBN: 978-607-95885-9-5.
79. Arrizon, J.; Mateos, J. C.; Sandoval, G.; Aguilar, B.; Solis, J.; Aguilar, M. G. 2010. Bioethanol and xylitol production from different lignocellulosic hydrolysates by sequential fermentation. Journal of Food Process Engineering. 35: 437–454.
80. Flores, J.; Gschaedler, A.; Amaya-Delgado, L.; Herrera-López, E. J.; Arellano, M.; Arrizon, J. 2013. Simultaneous saccharification and fermentation of *Agave tequilana* fructans by *Kluyveromyces marxianus* yeasts for bioethanol and tequila production. Bioresource Technology. 146: 267-273.
81. Pérez-Pimienta, J. A.; Vargas-Tha, A.; López-Ortega, K. M.; Medina-López, Y. N.; Mendoza-Pérez, J. A.; Avila, S.; Singh, S.; Simmons, B. A.; Loaces, I.; Martínez, A. 2017. Sequential enzymatic saccharification and fermentation of ionic liquid and organosolv pretreated agave bagasse for ethanol production. Bioresource Technology. 225: 191-198.
82. Ríos-González, L. J.; Morales-Martínez, T. K.; Rodríguez-Flores, M. F.; Rodríguez-De la Garza, J. A.; Castillo-Quiroz, D.; Castro-Montoya, A. J.;
-

-
- Martínez, A. 2017. Autohydrolysis pretreatment assessment in ethanol production from agave bagasse. *Bioresource Technology*. 242: 184-190.
83. Arreola-Vargas, J.; Ojeda-Castillo, V.; Snell-Castro, R.; Corona-González, R. I.; Alatríste-Mondragón, F.; Méndez-Acosta, H. O. 2015. Methane production from acid hydrolysates of *Agave tequilana* bagasse: evaluation of hydrolysis conditions and methane yield. *Bioresource Technology*. 181: 191-199.
84. Arreola-Vargas, J.; Flores-Larios, A.; González-Álvarez, V.; Corona-González, R. I.; Méndez-Acosta, H. O. 2016. Single and twostage anaerobic digestion for hydrogen and methane production from acid and enzymatic hydrolysates of *Agave tequilana* bagasse. *International Journal of Hydrogen Energy*. 41: 897-904.
85. Pérez-Pimienta, J. A.; Flores-Gómez, C. A.; Ruiz, H. A.; Sathitsuksanoh, N.; Balan, V.; Sousa, L. da C.; Dale, B. E.; Sing, S.; Simmons, B. A. 2016. Evaluation of agave bagasse recalcitrance using AFEXTM, autohydrolysis, and ionic liquid pretreatments. *Bioresource Technology*. 211: 216–223.
86. Akanni, G. B.; Du Preez, J. C.; Steyn, L.; Kilian, S. G. 2014. Protein enrichment of an *Opuntia ficus-indica* cladode hydrolysate by cultivation of *Candida utilis* and *Kluyveromyces marxianus*. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. DOI 10.1002/jsfa.6985.
87. Juárez, J. M.; Pérez, S. R.; Rodríguez, P. L. P.; López, J. G. 2004. Manual para el laboratorio de técnicas microbiológicas. Instituto Politecnico Nacional http://www.who.int/csr/resources/publications/biosafety/CDS_CSR_LYO_2004_11SP.pdf.
88. UGR-pomif. 2015. Técnicas de cultivo, aislamiento, obtención de cultivos puros. <http://www.pomif.com/pages/practicas/bacteriologia/aislamiento>.
-

-
89. Morales-Zamora, M.; Espino-Leal, I.; Mesa-Garriga, L.; Acosta-Martínez, D.; González-Suárez, E.; Castro-Galiano, E. 2012. Evaluación de residuales de la hidrólisis ácida del bagazo como productos de alto valor añadido. *AFINIDAD LXVIII*. 556: 453-458.
90. Asenjo, J. A.; Merchuk, J. C. 1994. *Bioreactor System Design: design, formulation, and optimization of media*. CRC Press Editor. IV: 89-129. ISBN: 0824790022, 9780824790028.
91. Castañón-Rodríguez, J. F.; Domínguez-González, J. M.; Ortíz-Muñiz, B.; Torrestiana-Sánchez, B.; Ramírez de León, J. A.; Aguilar-Uscanga, M. G. 2015. Continuous multistep versus fed-batch production of ethanol and xylitol in a simulated medium of sugarcane bagasse hydrolyzates. *Engineering in Life Sciences*. 15: 96-107.
92. Jantama, K.; Polyiam, P.; Khunnonkwao, P. 2015. Efficient reduction of the formation of by-products and improvement of production yield of 2,3-butanediol by a combined deletion of alcohol dehydrogenase, acetate kinase-phosphotransacetylase, and lactate dehydrogenase genes in metabolically engineered *Klebsiella oxytoca* in mineral salts medium. *Metabolic Engineering*. 30:16-26.
93. Ji, X. J.; Huang, H.; Du, J.; Zhu, J. G.; Ren, L. J.; Li, S.; Nie, Z. K. 2009. Development of an industrial medium for economical 2,3-butanediol production through co-fermentation of glucose and xylose by *Klebsiella oxytoca*. *Bioresource Technology*. 100: 5214-5218.
94. Wang, X. X.; Hu, H. Y.; Liu, D. H.; Song, Y. Q. 2016. The implementation of high fermentative 2,3-butanediol production from xylose by simultaneous additions of yeast extract, Na₂EDTA, and acetic acid. *New Biotechnology*. 33: 16-22.
-


-
95. Agudelo, C.; Ortega, R.; Hoyos, J. L. 2010. Determination of kinetic parameters of two lactic inoculums: *Lactobacillus plantarum* A6 and Lactic acid bacteria of yogurt. Universidad del Cauca. 8: 8-16.
96. Nie, Z. K.; Ji, X. J.; Huang, H.; Du, J.; Li, Z. Y.; Qu, L.; Zhang, Q.; Ouyang, P. K. 2011. An effective and simplified fed-batch strategy for improved 2,3-butanediol production by *Klebsiella oxytoca*. Applied Biochemistry and Biotechnology. 163: 946-953.
97. Crespo, G. M. R. 2011. Proceso de compostaje de bagazo de agave tequilero a gran escala y uso de la composta para el cultivo de *Agave tequilana* en contenedor. Tesis Doctoral. Universidad de Guadalajara. Zapopan, Jalisco, México.
98. García, S. M. D.; Serrano, H. 2014. El Agave como planta medicinal. TecnoAgro: avances tecnológicos y agrícolas (on line). No. 92.
99. Méndez, R. T. 2015. Tesis de Maestría. Evaluación del potencial productivo del *Agave tequilana* como materia prima en la producción de etanol combustible. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia, Michoacán, México.
100. González, E.; Fernández, M. R.; Larroy, C.; Sola, L.; Pericas, M. A.; Pares, X. 2000. Characterization of (2R,3R)-2,3-butanediol de hydrogenase as the *Sacharomyces cerevisiae* YAL60W gene product. Disruption and induction of the gene. Journal of Biological Chemistry. 275: 35876-35885.
101. Huang, M.; Oppermann F. B.; Steinbüchel, A. 1994. Molecular characterization of the *Pseudomonas putida* 2,3-butanediol metabolic pathway. Microbiology Letters. 124: 141-150.
-

-
102. Dos Santos, E. A. J. 2007. Estudio del comportamiento cinético de microorganismos de interés en seguridad alimentaria con modelos matemáticos. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Barcelona. Barcelona, España.
103. Kim, D. K.; Park, J. M.; Song, H.; Chang, Y. K. 2016. Kinetic modeling of substrate and product inhibition for 2,3-butanediol production by *Klebsiella oxytoca*. *Biochemical Engineering Journal*. 114: 94-100.
104. Alexander, M. 1977. Introduction to soil microbiology: microbial ecology, the carbon cycle. Second edition. AGT Editorial. I: 11-46, II: 127-240. México. ISBN: 968-462-002-0.
105. Ji, X. J.; Huang, H.; Du, J.; Zhu, J. G.; Ren, L. J.; Hu, N.; Li, S. 2009. Enhanced 2,3-butanediol production by *Klebsiella oxytoca* using a two stage agitation speed control strategy. *Bioresource Technology*. 100: 3410–3414.
106. Ji, X. J.; Huang, H.; Zhu, J.; Ren, L. J.; Nie, Z. K.; Du, J. 2010. Engineering *Klebsiella oxytoca* for efficient 2,3-butanediol production through insertional inactivation of acetaldehyde dehydrogenase gene. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 85: 1751-1758.
107. Qureshi, N.; Cheryan, M. 1989. Effect of lactic acid on growth and butanediol production by *Klebsiella oxytoca*. 4: 453-456.
108. Saratale, G. D.; Jung, M. Y.; Oh, M. K. 2016. Reutilization of green liquor chemicals for pretreatment of whole rice waste biomass and its application to 2,3-butanediol production. *Bioresource Technology*. 205: 90-96.
109. Eiteman, M. A.; Miller, J. H. 1995. Effect of succinic acid on 2,3-butanediol by *Klebsiella oxytoca*. *Biotechnology Letters*. 17: 1057-1062.
-

-
110. Sivakumar, A.; Swaminathan, T.; Baradarajan, A. 1995. Effect of urea on the production of 2, 3-butanediol by *K. oxytoca*. *Bioprocess Engineering*. 13: 49-50.
111. Wu, K. J.; Saratale, G. D.; Lo, Y. Ch.; Chen, W. M.; Tseng, Z. J.; Chang, M. Ch.; Tsai, B. Ch.; Su, A.; Chang, J. S. 2008. Simultaneous production of 2,3-butanediol, ethanol and hydrogen with a *Klebsiella* sp. strain isolated from sewage sludge. *Bioresource Technology*. 99: 7966–7970.
112. Ji, X. J.; Huang, H.; Lo, S.; Du, J.; Lian, M. 2008. Enhanced 2,3-butanediol production by altering the mixed acid fermentation pathway in *Klebsiella oxytoca*. *Biotechnology Letters*. 30: 731–734.
113. Jung, S. G.; Jang, J. H.; Kim, A. Y.; Lim, M. Ch.; Kim, B.; Lee, J.; Kim, Y. R. 2013. Removal of pathogenic factors from 2,3-butanediol-producing *Klebsiella* species by inactivating virulence-related *wabG* gene. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 97: 1997–2007.
114. Kim, D. K.; Rathnasingh, Ch.; Song, H.; Lee, H. J.; Seung, D.; Chang, Y. K. 2013. Metabolic engineering of a novel *Klebsiella oxytoca* strain for enhanced 2,3-butanediol production. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 116: 186-192.
115. Cho, S.; Kim, K. D.; Ahn, J. H.; Lee, J.; Kim, S. W.; Um, Y. 2013. Selective production of 2,3-butanediol and acetoin by a newly isolated bacterium *Klebsiella oxytoca* M1. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 170: 1922–1933.
116. Park, J. M.; Song, H.; Lee, H. J.; Seung, D. 2013. In silico aided metabolic engineering of *Klebsiella oxytoca* and fermentation optimization for enhanced 2,3-butanediol production. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 40: 1057–1066.
-

-
117. Park, Ch.; Lu, M.; Yun, S.; Park, K.; Lee, J. 2013. Effect of pH on the metabolic flux of *Klebsiella oxytoca* producing 2,3-butanediol in continuous cultures at different dilution rates. *Bioprocess and Biosystems Engineering*. 36: 845–855.
118. Jeong, J. W.; Park, K. M.; Chung, M.; Won, J. I. 2015. Influence of *Vitroscilla* hemoglobin gene expression on 2,3-butanediol production in *Klebsiella oxytoca*. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*. 20: 10-17.
119. Park, J. M.; Rathnasingh, Ch.; Song, H. 2015. Enhanced production of (R,R)-2,3-butanediol by metabolically engineered *Klebsiella oxytoca*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 42: 1419–1425.
120. Cho, S.; Kim, T.; Woo, H. M.; Kim, Y.; Lee, J.; Um, Y. 2015. High production of 2,3-butanediol from biodiesel – derived crude glycerol by metabolically engineered *Klebsiella oxytoca* M1. *Biotechnology for Biofuels*. 8: 146.
121. Xin, F.; Basu, A.; Weng, M. Ch.; Yang, K. L.; He, J. 2016. Production of 2,3-butanediol from sucrose by a *Klebsiella* species. *Bioenergy Research*. 9: 15–22.
122. Lee, G. B.; Kim, Y. J.; Lim, J. K.; Kim, T. W.; Kang, S. G.; Lee, J. H.; Lee, H. S. 2019. A rapid and sensitive enzymatic assay for 2,3- butanediol. *3 Biotech*. 9: 170.
123. NaturaLista. 2019. Maguey Papalote (*Agave cupreata*). www.naturalista.mx.
-

Production of 2,3-butanediol by fermentation of enzymatic hydrolysed bagasse from agave mezcal-waste using the native *Klebsiella oxytoca* UM2-17 strain

Lizbeth Pasaye-Anaya,^a Alejandra Vargas-Tah,^a Christian Martínez-Cámara,^{a,b} Agustín J Castro-Montoya^{a*} and Jesús Campos-García^{c*} 



Abstract

BACKGROUND: 2,3-butanediol is a chemical component with wide industrial applications, such as biofuels and chemical precursors. Reducing 2,3-butanediol production costs is a high priority and recent focus has been on its biological synthesis from raw renewable materials rather than through conventional chemical procedures. In this study, a 2,3-butanediol native bacterial producer was selected for the fermentation of *Agave cupreata* bagasse waste by enzymatic hydrolysis to obtain 2,3-butanediol.

RESULTS: The native *Klebsiella oxytoca* UM2-17 strain was selected to efficiently produce 2,3-butanediol on synthetic mineral media. Using glucose (100 g L⁻¹) and glucose:xylose (50 g L⁻¹:50 g L⁻¹) as sugar sources obtained titres of 29.36 g L⁻¹ and 25.9 g L⁻¹ of 2,3-butanediol, corresponding to yields of 0.29 g g⁻¹ and 0.26 g g⁻¹, respectively. Agave bagasse solid waste after acid pre-treatment was utilized to obtain enzymatic hydrolysates, obtaining liquors with glucose/xylose/arabinose at 25.8 g L⁻¹ with efficiency of ~52.5% sugar conversion from residual solid pre-hydrolysed bagasse. The production of 2,3-butanediol through batch fermentation of the enzymatic-hydrolysate by the UM2-17 strain showed total depletion of glucose and xylose, achieving a maximal production of 10.3 g L⁻¹ of 2,3-butanediol plus 0.28 g L⁻¹ ethanol, corresponding to 2,3-butanediol yield of 0.40 g g⁻¹.

CONCLUSION: The results indicate that *A. cupreata* bagasse waste from mezcal beverage elaboration is a sustainable bioresource for production of 2,3-butanediol by fermentation of enzymatic bagasse-hydrolysate using the *K. oxytoca* UM2-17 strain.

© 2019 Society of Chemical Industry

Supporting information may be found in the online version of this article.

Keywords: agave bagasse; biofuels; 2,3-butanediol; fermentation; enzyme-hydrolysate; *K. oxytoca*

INTRODUCTION

2,3-butanediol is a highly priced glycol, widely utilized in the production of important chemical compounds, such as methyl-ethyl ketone used in fuels, resins, paints, softening agents, adhesives and inks. The 1,3-butadiene co-synthesized is utilized to produce synthetic rubber, polyester, polyurethanes and several polyamides employed to manufacture cosmetics and drugs. Also, their acetoin and diacetyl precursors are useful as food additives.¹⁻⁷

Until 2011, the production of 2,3-butanediol was valued at approximately US\$43 billion in sales, with a yearly increase in production of 4–7%.^{1,4,6,8} This alcohol is usually obtained by chemical synthesis, but it can be produced biologically using bacteria by the butanediol biosynthesis pathway [Fig. 1(a)]. The 2,3-butanediol biosynthesis pathway from pyruvate comprises α -acetolactate biosynthesis by α -acetolactate synthase (BudB), acetoin biosynthesis by α -acetolactate decarboxylase (BudA) and 2,3-butanediol biosynthesis by acetoin reductase (BudC). This

route utilizes the pyruvate generated during glycolysis to render acetoin and 2,3-butanediol as accumulated products.^{2,6,9-11}

* Correspondence to: AJ Castro-Montoya, Posgrado de Ingeniería Química, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Francisco J. Múgica S/N, Ciudad Universitaria, 58030, Morelia, Michoacán, Mexico. E-mail: ajcastro@umich.mx; or J Campos-García, Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Edif. U-3, Ciudad Universitaria, 58030, Morelia, Michoacán, Mexico. E-mail: jcgarcia@umich.mx

a Posgrado de Ingeniería Química, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia, Michoacán, Mexico

b Departamento de Ingeniería Química y Bioquímica, Instituto Tecnológico de Morelia, Morelia, Michoacán, Mexico

c Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia, Michoacán, Mexico

The 2,3-butanediol is less toxic to microorganisms than other alcohols such as ethanol and butanol, making it possible to obtain higher yields.^{3,12,13}

Biotechnological production of 2,3-butanediol dates back to last century but is being reexamined due to its environmental benefits. The main advantage of producing this chemical by biological synthesis is to reduce the use of fossil materials, especially when using renewable substrates.^{4–7,12,14} In this sense, agave bagasse can be used as raw material for 2,3-butanediol synthesis, as it is an abundant lignocellulosic residue derived from production of the Mexican alcoholic beverages known as Mezcal and Tequila.

Mezcal is produced by alcoholic fermentation of saccharified agave pines of the *Agavaceae* family plants.¹⁵ However, agave bagasse from the *Agave tequilana* specie has been proposed as a raw material to produce ethanol,^{16–22} methane,^{23,24} xylitol,¹⁷ hydrogen,²⁵ succinic acid and lactic acid.²⁰ The use of agave species such as *Agave arrovirens*, *Agave angustifolia*, *Agave salmiana* and *Agave americana* also have been described for obtaining ethanol.²⁶ *Agave cupreata* species is one of the most representative wild species utilized to produce craft Mezcal in México. This plant species is endemic in the Balsas River Basin, located in Michoacán and Guerrero states, where the major production of mezcal in México (1.7×10^6 L yr⁻¹) takes place.¹¹ Thus, *A. cupreata* is a potential alternative raw material for chemical manufacture.

Some microorganisms of the *Klebsiella* genus produce high yields of 2,3-butanediol, using a broad range of substrates, and under wide process conditions. Specifically, *K. oxytoca* is a facultative anaerobic microorganism that can metabolize pentoses and hexoses, which is particularly useful because hydrolysates obtained from lignocellulosic biomass generally are rich in pentoses.^{2,4,5,7,12} *Klebsiella oxytoca* has been used to produce 2,3-butanediol from molasses,^{11,27} corn cob hydrolysates,^{28,29} *Jatropha* hulls hydrolysates,³⁰ wood hydrolysates,³¹ sorghum stalk hydrolysates,^{13,32} switchgrass hydrolysates,³² whey and cassava wastewater,³³ and simultaneously utilizing glucose and galactose obtained from the green algae *Golenkinia* sp. hydrolysates.³⁴ This microorganism produces a mixture of L(+) and meso-2,3-butanediol from glucose substrate by fed-batch fermentation and this biofuel can be accumulated up to 130 g L⁻¹ without causing inhibition of fermentation.² *Klebsiella oxytoca* also has been ascribed with a theoretical maximum yield of 0.50 g g⁻¹ 2,3-butanediol from monosaccharides such as glucose or xylose.³⁵

Therefore, the aim of this work was to obtain 2,3-butanediol by fermentation with a native *K. oxytoca* strain isolated from putrid agave bagasse, utilizing as substrate enzymatic hydrolysates of *A. cupreata* bagasse waste, a lignocellulosic residue generated by the Mexican Mezcal industry.

MATERIALS AND METHODS

Raw material and characterization of agave bagasse hydrolysates (ABHs)

Raw material was obtained from cooked agave bagasse pines acquired from the Ex-Hacienda Zacapendo Company, located in Indaparapeo, Michoacán, México. Hydrolysates were obtained using *A. cupreata* bagasse as feedstock, brought from La Flor del Mezcal distillery located in Etúcuaro, Michoacán, México. The bagasse was fully washed with distilled water at 80 °C until free-sugar elimination (at least three times) was achieved, and dried at room temperature. Characterization of the agave bagasse was carried out according to the Standard Analytical Procedures of the National Renewable Energy Laboratory (NREL), named as

NREL/TP-510-42 618 (Determination of structural carbohydrates and lignin in biomass), LAP NREL/TP-510-42 621 (Determination of sugars, byproducts, and degradation products in liquid fraction process samples) and LAP NREL/TP-510-42 622 (Determination of ash in biomass).

Washed agave bagasse was passed through an endless screw extruder and ground with a blade mill until it reached an approximate length of 1 cm. Next, bagasse was put through an acid hydrolysis pretreatment with 5% H₂SO₄ for 1 h at 121 °C (solid:liquid ratio 1:10). The residual bagasse solids were used to carry out an enzymatic hydrolysis after washing with distilled water at 80 °C for at least three times and suspended (solid:liquid ratio 1:10) with a mixture of 0.05 mol L⁻¹ citrate buffer adding 5 IU g⁻¹ of enzyme mixture Cellic® CTec3 and Cellic® HTec3 (Novozymes, Edo. Mex., México) by residual bagasse at pH = 5.0, followed by incubation at 50 °C for 48 h and 150 rpm agitation. A pH adjustment was done before using hydrolysates in fermentation assays.

Bacterial strains, media and growth conditions

Isolation of 2,3-butanediol producing strains was done directly from agave bagasse in the process of decomposition, and streaking onto agar plates of yeast peptone dextrose (YPD) medium contained 10 g L⁻¹ yeast extract, 20 g L⁻¹ casein peptone, 20 g L⁻¹ glucose and 20 g L⁻¹ bacteriological agar (if needed). Single colonies were inoculated onto fresh plates; through sequential cultivation, axenic bacteria cultures were obtained. In addition, the Microbial Biotechnology Laboratory of the Institute of Chemical-Biological Investigations of the Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo donated 20 bacterial strains also isolated from agave bagasse waste, giving a total of 35 isolates. All cultures were grown at 30 °C for 24 h.

Base mineral medium M9 is composed of 120 g L⁻¹ K₂HPO₄, 60 g L⁻¹ KH₂PO₄, 10 g L⁻¹ NaCl, 20 g L⁻¹ NH₄Cl, 2 mL L⁻¹ MgSO₄ 1 mol L⁻¹, 0.1 mL L⁻¹ CaCl₂ 1 mol L⁻¹ and 5 μL 100 mL⁻¹ of mineral micronutrients solution (pH = 7.4). The mineral micronutrients were composed of 5 g L⁻¹ EDTA, 0.83 g L⁻¹ FeCl₃·6H₂O, 84 mg L⁻¹ ZnCl₂, 13 mg L⁻¹ CuCl₂·2H₂O, 10 mg L⁻¹ CoCl₂·2H₂O, 10 mg L⁻¹ H₃BO₃ and 1.6 mg L⁻¹ MnCl₂·4H₂O.³⁶

Agave bagasse hydrolysis and analytics

Acid hydrolysis pre-treatment was carried out in an autoclave (FE-397 Felisa) at 121 °C, 0.1 MPa for 1 h, whereas enzymatic hydrolysis was performed in an orbital shaker (PolyScience) at 50 °C, pH = 5.0 and 150 rpm for 48 h. The characterization of hydrolysates and metabolites concentration were determined using a high-performance liquid chromatography (HPLC) system (Ultimate 3000 Thermo Scientific) equipped with both refractive index and UV detectors. HPLC column (Metacarb 87C, BioRad) was employed and maintained at 60 °C with mobile phase 5 mmol L⁻¹ H₂SO₄ at a flow rate of 0.6 mL min⁻¹. The injection volume of the samples was 20 μL. The operating time was 60 min for material characterization and 30 min for metabolites quantitation.

Screening of 2,3-butanediol-producing bacterial strains

Bacterial strains were tested for 2,3-butanediol production using the Voges–Proskauer (VP) biochemical test and fermentation trials.⁹ VP-positive strains underwent fermentation in tubes containing 10 mL of YPD liquid medium. Bacterial cultures were incubated in a tube rotator at 30 °C and 50 rpm for 96 h, sampling each 24 h (1 mL).

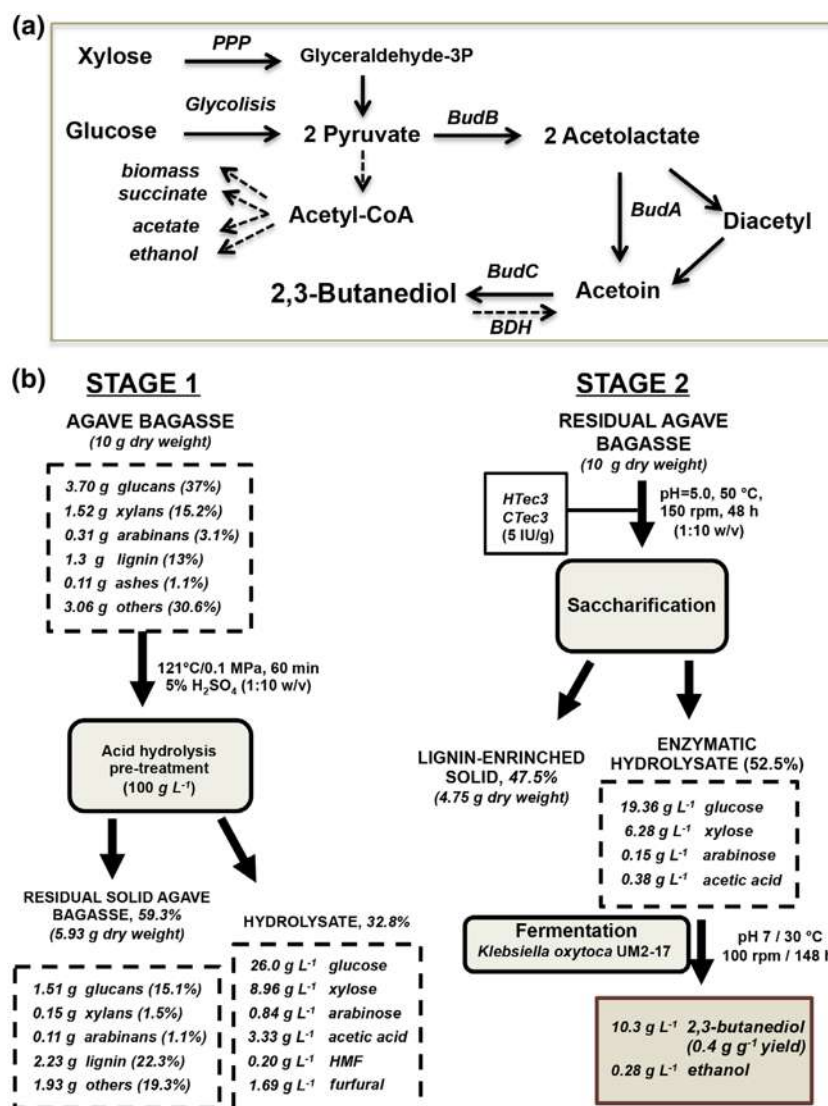


Figure 1. (a) Biosynthetic pathway of 2,3-butanediol in bacteria of the *Klebsiella* genus. BudA, acetolactate decarboxylase; BudB, acetolactate synthase; BudC, 2,3-butanediol dehydrogenase (BDH). (b) Process diagram for the production of 2,3-butanediol from agave bagasse residues.

Elapsed time samples were analysed by HPLC using glucose, acetic acid, butyric acid, acetone, ethanol, butanol, 2,3-butanediol, glycerol and isopropanol as standards (all from Sigma-Aldrich). Calibration curves with each compound were utilized for quantification. The selected strain was chosen based on the higher production of 2,3-butanediol.

Molecular identification of selected bacterial strain

The selected bacterial strain was identified by sequencing a 1500-bp fragment of 16S rRNA.^{16,22} Nucleotide sequence analysis using the Blast(nt) algorithm showed 97% of identity with strains that belong to *K. oxytoca* species from the gene bank of the NCBI, indicating a high probability that the strain corresponds to this lineage, cataloguing the isolated as *K. oxytoca* UM2-17 (Fig. S1, Supplemental Material).

Fermentation assays in mineral media

The selected strain of *K. oxytoca* UM2-17 was tested in three mineral medium formulations: base M9 medium (M1), base M9 medium enriched with 1% yeast extract (M2) and base M9 medium

enriched with 1% yeast extract and 1% casein peptone (M3). Each formulation was probed with three different glucose concentrations: 50, 100 and 150 g L⁻¹. Pre-cultured 2,3-butanediol producing strain was grown for 18 h in YPD liquid medium, and 1 mL of the culture was inoculated in tubes with 10 mL of M1, M2 or M3 media. The fermentation inoculum was adjusted to 0.05 at OD_{600nm}. Tubes were incubated in a tube rotator for 24 h at 30 °C and 50 rpm without aeration. After that, cell growth was determined by OD_{600nm}, and 1 mL samples were taken every 24 h to determine cell growth and thereafter stored at -20 °C and analysed to quantify glucose, xylose, ethanol, acetic acid, glycerol and 2,3-butanediol by HPLC as above. All experiments were run in triplicate.

Growth monitoring and substrate consumption using synthetic medium

Growth monitoring and 2,3-butanediol production kinetics were performed to determine the *K. oxytoca* UM2-17 kinetic growth parameters and behaviour when glucose, xylose or a mix of both sugars were utilized as carbon source on the mineral medium. Kinetics were performed in 125-mL flasks with 50 mL of mineral

medium M1 as follows: (i) M1 medium with 100 g L⁻¹ glucose as carbon source; (ii) M1 medium with 100 g L⁻¹ xylose; (iii) M1 medium with 50 g L⁻¹ glucose and 50 g L⁻¹ xylose; and (iv) M1 medium with 150 g L⁻¹ glucose and 15 g L⁻¹ xylose. *Klebsiella oxytoca* UM2-17 strain previously was adapted to the mineral medium for 24 h. Flasks were incubated in an orbital shaker at 30 °C and 100 rpm for 120 h, sampling 1 mL of the fermentation medium to establish cell growth. Aliquots were taken at 120 h, and samples were analysed through growth at OD_{600 nm}. The amount of glucose, xylose, glycerol, acetic acid, ethanol and 2,3-butanediol were determined by HPLC as above. Trials were carried out in triplicate.

Fermentation of ABH by the *K. oxytoca* UM2-17

In order to determine production of 2,3-butanediol from enzymatically hydrolysed agave bagasse, a fermentation trial was performed in 125-mL flasks containing 50 mL of hydrolysate as the fermentation medium. Hydrolysate was adjusted to pH 7.0, sterilized at 121 °C for 15 min and supplemented with a third part of M9 mineral salts. A culture of the *K. oxytoca* UM2-17 strain was grown in a mineral medium with glucose for a 24 h adaptation period. Then, the inoculum was taken to start fermentation, incubating at 30 °C for 148 h at 100 rpm. Samples were taken during 148 h for determination of growth by OD_{600 nm}, and sugar consumption and metabolite production were analysed by HPLC. The experiment was run in triplicate.

RESULTS

Composition of *A. cupreata* bagasse and its hydrolysate

The bagasse waste from the elaboration of the mezcal beverage of the *A. cupreata* species was analysed to determine its composition using the NREL procedure, showing to be a mixed substrate consisting of 37% glucans, 15.2% xylans, 3.1% arabinans, 13% lignin, 1.1% ash, 30.6% other compounds and 6.42% moisture content; these amounts are consistent with a previous report.³⁷

In order to evaluate the potential to use of the agave bagasse waste as a lignocellulosic biomass for biofuel generation, it was submitted to acid hydrolysis as pre-treatment of the bagasse [Stage 1; Fig. 1(b)], with subsequent enzymatic hydrolysis of solid residue [Stage 2; Fig. 1(b)]. The acid hydrolysis pre-treatment conditions were followed on the basis of a previous study carried out in the present authors' work group^{16,22}; 5% H₂SO₄ (1:10 w/v dilution), 121 °C/0.103 MPa for 1 h [Fig. 1(b)]. On one side, liquid phase of the hydrolysate showed a composition of 26 g L⁻¹ glucose, 8.96 g L⁻¹ xylose, 0.84 g L⁻¹ arabinose, 3.33 g L⁻¹ acetic acid, 0.2 g L⁻¹ hydroxymethyl furfural (HMF) and 1.69 g L⁻¹ furfural from 100 g L⁻¹ of agave bagasse. The solid phase of the ABH from acid pre-treatment was composed of glucans (15.1%), xylans (1.5%), arabinans (1.1%), lignin (22.3%) and other solids (19.3%) [Fig. 1(b)]. Mass balance indicates that around 59% of the carbohydrates remained on the

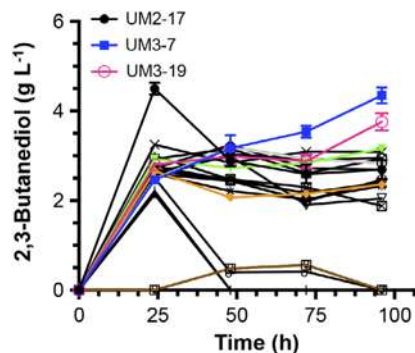


Figure 2. Comparison of 2,3-butanediol production by native bacterial isolates. The plot indicates only the selected strains used for further analyses (UM2-17, UM3-7 and UM3-19); remaining bacterial strains are not indicated. Results are means of triplicate experiments. SE values are indicated as bars.

residual solid phase of the hydrolysate from acid pre-treatment step. Therefore, this lignocellulosic solid material was used posteriorly for enzymatic treatment as mentioned.

The solid phase of the hydrolysate from the acid pre-treatment (washed with distilled water until free-sugar elimination and neutralization) was submitted to enzymatic hydrolysis using HTec3 and CTec3 enzymes (5 IU g⁻¹ at 1:10 w/v solid:liquid ratio, 50 °C, pH = 5.0 for 48 h). The resultant hydrolysate showed a composition of 19.36 g L⁻¹ glucose, 6.28 g L⁻¹ xylose, 0.15 g L⁻¹ arabinose and 0.38 g L⁻¹ acetic acid. Non-HMF and furfural were detected [Stage 2, Fig. 1(b)]. Additionally, the residual solid material remaining from enzymatic hydrolysis was composed of 4.75 g lignin-rich biomass. Under this procedure fermentable sugars were obtained at a concentration of 25.8 g L⁻¹. The glucose and xylose are the major fermentable sugars derived from lignocellulosic biomass, in ≈2:1 ratio, respectively, as described¹³; in the present study a 3:1 ratio of glucose:xylose was obtained, indicating that the residual solid from acid pre-treatment of agave bagasse had a higher glucose content than other lignocellulosic wastes as described above. Thus, enzymatic hydrolysate subsequently was used for a fermentation test with the *K. oxytoca* UM2-17 strain, as outlined below.

Selection of 2,3-butanediol producers strains using synthetic medium

A total of 31 strains were submitted to VP test, resulting in 26 isolates that were VP-positive. These strains were used to carry out assays of fermentation in a complex medium (YPD) with glucose as carbon source. Compound analysis in the samples indicated that 22 strains accumulated 2,3-butanediol on the culture medium (Fig. 2). The strains catalogued here as UM2-17, UM3-7 and UM3-19 reached the highest 2,3-butanediol titres between 3.76 and 4.5 g L⁻¹, relative to ~1.8 g L⁻¹ of ethanol, ~0.8 g L⁻¹ of glycerol and ~0.7 g L⁻¹ of acetic acid, in YPD with 20 g L⁻¹ of

Table 1. Metabolites production by native bacterial isolates on YPD medium

Strain	Fermentation time (h)	2,3-butanediol (g L ⁻¹)	Ethanol (g L ⁻¹)	Glycerol (g L ⁻¹)	Acetic acid (g L ⁻¹)
UM2-17	24	4.50 ± 0.13	1.53 ± 0.08	0.73 ± 0.01	0.71 ± 0.01
UM3-7	96	4.35 ± 0.78	1.88 ± 0.21	0.79 ± 0.01	0.24 ± 0.04
UM3-19	96	3.76 ± 0.69	1.74 ± 0.12	0.83 ± 0.01	1.02 ± 0.10

YPD medium contains 20 g L⁻¹ glucose. Data correspond to averages of triplicate assay and standard deviation is shown.

glucose (Table 1). Figure 2 demonstrates that the UM2-17 strain reached maximum production in short time periods, whereas strains UM3-7 and UM3-19 had not reached their maximum production at the end of the fermentation time. These strains also generated ethanol, glycerol and acetic acid according to the substrate consumption, but produced a smaller proportion of 2,3-butanediol than UM2-17 strain (Table 1). According to these results, the UM2-17 bacterial isolate was selected as 2,3-butanediol producer strain; and as described above it was identified by 16S rRNA gene sequencing and nucleotide sequence alignments as *K. oxytoca* (Fig. S1).

Production of 2,3-butanediol in mineral medium by the native isolated *K. oxytoca* UM2-17 strain

Results indicate that *K. oxytoca* UM2-17 is able to grow in mineral media regardless of the glucose concentration, in correlation with 2,3-butanediol accumulation. For the three media tested, substrate consumption was dependent on the sugar concentration in the medium. In the M1 medium, it was observed that at higher sugar concentrations (150 g L^{-1}), the 2,3-butanediol production was $\approx 15 \text{ g L}^{-1}$. An apparent improvement was observed in its growth rate at lowest glucose concentration (Fig. 3). In the M2 medium, the opposite behaviour was observed; higher concentrations of sugar led to a lower production of 2,3-butanediol and a small difference in the cellular density (Fig. 4). Nonetheless, the biomass in the media with 100 g L^{-1} and 150 g L^{-1} of glucose was similar, but the production of 2,3-butanediol at 100 g L^{-1} was almost double that at 150 g L^{-1} (Fig. 4 and Table 2). With regards to the M3 medium, no specific trend was showed in the production of 2,3-butanediol (Fig. 5). However, similar behaviour to that in M2 medium was observed; a higher 2,3-butanediol production was found at 50 g L^{-1} glucose, but biomasses were not different in the media regardless of the amount of glucose (Fig. 5 and Table 2).

However, there was no significant difference between 2,3-butanediol production in supplemented and nonsupplemented media. In addition, other metabolites such as glycerol and ethanol were detected in the fermented media, but in all cases their amount obtained were lower or null with respect to 2,3-butanediol (Table 2).

Klebsiella oxytoca UM2-17 growth and 2,3-butanediol production kinetics using synthetic media with glucose/xylose

Bacterial growth and 2,3-butanediol production data obtained from the fermentation process in synthetic media with glucose and xylose are summarized in Tables 3 and 4. *Klebsiella oxytoca* UM2-17 had the ability to metabolize glucose and xylose individually and as a mixed substrate. The production of 2,3-butanediol was dependent on substrate consumption, with glucose (100 g L^{-1}) as fermentable sugar giving the highest titres of production of $\sim 29.4 \text{ g L}^{-1}$ of 2,3-butanediol (Table 3). In media with xylose, the sugar source was directed mainly to biomass generation, but when mixed at low concentration (15 g L^{-1}) with glucose, it increased the growth rate (μ) without significant effect on biomass, as the substrate constant $Y_{p/s}$ was slightly higher. By contrast, when xylose concentration was high, substrate consumption was faster, so both the μ constant and cell density were increased, but the 2,3-butanediol yield was slower (Tables 3 and 4). The production constant q_p ($\text{gP/gX}^*\text{h}$), which indicates productivity (grams of product converted by grams of substrate by time units), showed that glucose is the best substrate ($0.09 \text{ g g}^{-1} \text{ h}^{-1}$)

Table 2. Production of 2,3-butanediol by *K. oxytoca* UM2-17 on synthetic mineral media

Glucose (g L^{-1})	M1			M2			M3			
	BD (g L^{-1})	SC (g L^{-1})	Biomass (OD)	GLY (g L^{-1})	ET (g L^{-1})	BD (g L^{-1})	SC (g L^{-1})	Biomass (OD)	GLY (g L^{-1})	ET (g L^{-1})
50	11.29 ± 0.15	28.79 ± 0.01	1.87 ± 0.19	0.68 ± 0.04	1.27 ± 0.001	11.11 ± 0.10	35.03 ± 0.08	3.57 ± 0.26	0.49 ± 0.02	0.95 ± 0.05
100	14.09 ± 0.12	56.97 ± 0.57	1.78 ± 0.48	0.63 ± 0.02	0.32 ± 0.002	10.39 ± 0.16	44.46 ± 0.019	2.28 ± 0.50	ND	0.80 ± 0.03
150	14.45 ± 0.12	72.86 ± 0.63	1.80 ± 0.16	ND	0.90 ± 0.005	5.87 ± 0.025	72.86 ± 0.014	2.13 ± 0.06	ND	0.42 ± 0.06

BD, 2,3-butanediol; SC, sugar consumed; OD, optical density at 600 nm; GLY, glycerol; ET, ethanol, ND, not detected. Data correspond to averages of triplicate assay and standard deviation is shown.

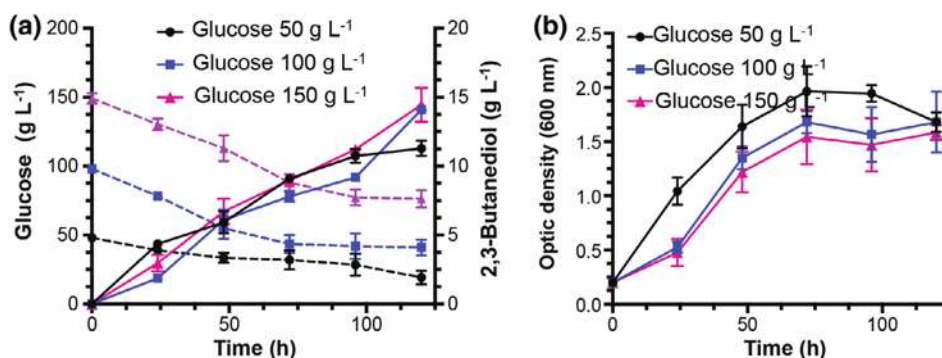


Figure 3. Production of 2,3-butanediol and growth on M1 mineral synthetic medium by *K. oxytoca* UM2-17. Results are means of triplicate experiments. SE values are indicated as bars.

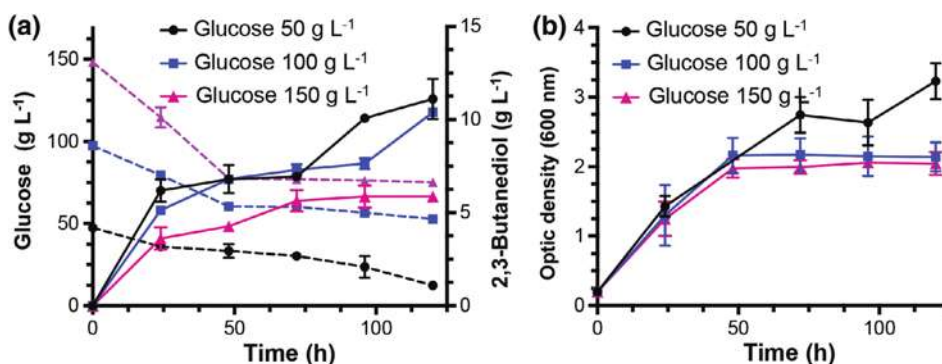


Figure 4. Production of 2,3-butanediol and growth on M2 mineral synthetic medium by *K. oxytoca* UM2-17. Results are means of triplicate experiments. SE values are indicated as bars.

and xylose the worst ($0.04 \text{ g g}^{-1} \text{ h}^{-1}$); but the mixed substrate of 50 g L^{-1} glucose with 50 g L^{-1} xylose gave intermediate values ($0.07 \text{ g g}^{-1} \text{ h}^{-1}$). It also was observed that although the production of 2,3-butanediol was remarkable in the exponential phase, the highest concentration of the product was reached during the stationary phase, except for the xylose (X100) medium. In that medium, the 2,3-butanediol concentration decreased at the end of fermentation. Nonetheless, the production and growth kinetics of the *K. oxytoca* UM2-17 strain were similar in all of the media tested. These results indicate that the UM2-17 strain was capable of fermenting glucose, xylose or their mixture to produce 2,3-butanediol.

Production of 2,3-butanediol by *K. oxytoca* UM2-17 using enzymatic ABH

The fermentation behaviour of *K. oxytoca* UM2-17 on the ABH revealed a similar performance to that shown in the synthetic complex medium; the maximum concentration of 2,3-butanediol was reached at 24 h of fermentation, glucose having been consumed completely (Fig. 6). This contrasted with observations in the mineral medium mixtures, where 2,3-butanediol production increased until the end of fermentation (120 h). Carbon catabolic repression as a cell energy control mechanism initiated by glucose consumption than others sugars. In our assay, glucose was totally consumed in the first 24 h of fermentation; leading to show that xylose was consumed after 24 h, and depleted at 72 h of fermentation (Fig. 6). When *K. oxytoca* UM2-17 growth was finished and the stationary phase exhibited, *K. oxytoca* started to metabolize xylose until it was completely consumed. However, between 24 h and 72 h of fermentation, a decrease in the 2,3-butanediol amounts was observed. After glucose/xylose consumption, *K. oxytoca* UM2-17 probably

began to convert other carbon sources, such as arabinans, which could be reflected in the fact that the production of 2,3-butanediol began to increase again (Fig. 6). The highest rate of 2,3-butanediol production was obtained when *K. oxytoca* UM2-17 was in its exponential phase (Table 5), but the highest 2,3-butanediol concentration (10.3 g L^{-1}) was registered in the stationary phase, correlating with glucose and xylose exhaustion (Fig. 6).

Cell growth otherwise was higher in ABH hydrolysate fermentation than in synthetic media, but yield was similar to that in the G150-X15 synthetic medium (Table 5). ABH composition favoured the growth of *K. oxytoca* UM2-17, and biomass was tripled. The 2,3-butanediol yield was 0.4 g g^{-1} , corresponding to 80% of the theoretical value [considering that the ABH contains 25.8 g L^{-1} of fermentable sugars (glucose, xylose, and arabinose)]. Although a higher biomass was formed, it did not seem to have a direct effect on 2,3-butanediol production (Table 5).

DISCUSSION

According to Guragain and Vadlani (2017),³² who compared 2,3-butanediol production between synthetic media and hydrolysates of sorghum, switch grass and wood, the best way to produce 2,3-butanediol using biomass hydrolysate is to perform acid and enzymatic hydrolysis separately. Even though this strategy was followed in the present study, chemical characterization of agave bagasse and its hydrolysate indicated that the acid pretreatment of the bagasse was suitable to obtain an optimal solid residue for enzymatic hydrolysis. Evidence for this was produced by the analysis of the enzymatic hydrolysate, which rendered a ratio of glucose:xylose of 3:1, indicating that the agave bagasse waste has better glucose content than other lignocellulosic

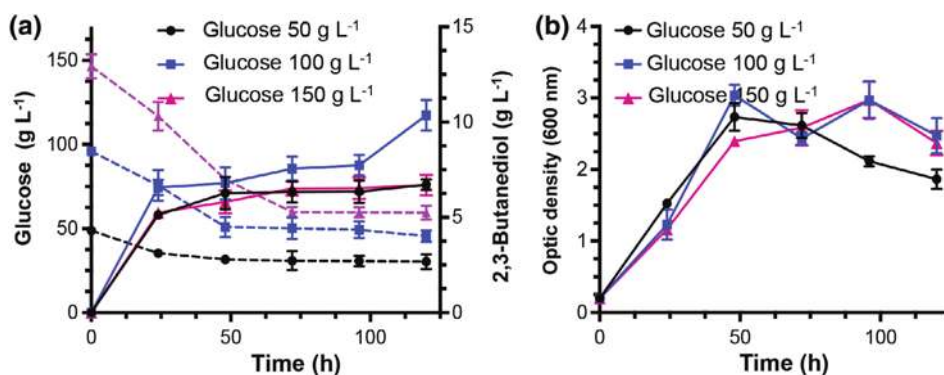


Figure 5. Production of 2,3-butanediol and growth on M3 mineral synthetic medium by *K. oxytoca* UM2-17. Results are means of triplicate experiments. SE values are indicated as bars.

Table 3. Production of 2,3-butanediol by *K. oxytoca* UM2-17 in batch fermentations using synthetic mineral medium with glucose/xylose

Medium	Xylose (g L ⁻¹)	Glucose (g L ⁻¹)	2,3-butanediol (g L ⁻¹)	Sugar consumed (g L ⁻¹)	Biomass (OD)
G100	-	100	29.36 ± 0.35	67.25 ± 0.14	2.50 ± 0.19
X100	100	-	17.37 ± 0.24	45.35 ± 0.01	3.02 ± 0.29
G50-X50	50	50	25.89 ± 0.07	56.33 ± 0.05 (G) 2.67 ± 0.28 (X)	2.74 ± 0.14
G150-X15	15	150	27.07 ± 0.21	58.34 ± 0.28 (G) 0.14 ± 0.16 (X)	2.36 ± 0.18

G, glucose; X, xylose; O.D., optic density at 600 nm. Data correspond to averages of triplicate assay and standard deviation is shown.

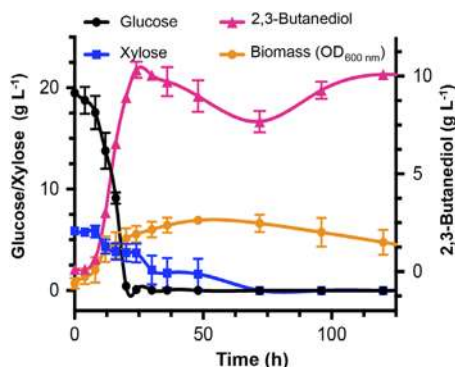


Figure 6. Production of 2,3-butanediol using the *K. oxytoca* UM2-17 isolate in batch fermentation of ABH obtained by enzymatic treatment. Results are means of triplicate experiments. SE values are indicated as bars.

wastes.¹³ Thus, results confirm that diluted acid treatment is an efficient procedure to hydrolyse agave bagasse as some authors have suggested previously.^{16,23,25,32}

Regarding the synthetic medium, enrichment with yeast extract and casein peptone stimulated the growth of *K. oxytoca* UM2-17, but not the production of 2,3-butanediol. On the more enriched medium, less 2,3-butanediol was produced. This finding suggests that *K. oxytoca* UM2-17 redirected its metabolism towards biomass generation. These results contrast with those of Asenjo and Merchuk (1994),³⁸ where yeast extract and peptone supplementation maintained alcohol production rate and improved 2,3-butanediol production.^{39–42}

The 2,3-butanediol yield is dependent on the sugar concentration used in the fermentation medium²; the suitable sugar concentration range to produce 2,3-butanediol with maximal yield was defined as 20–100 g L⁻¹ of glucose or xylose, because exceeding 150 g L⁻¹ causes cellular inhibition, probably due to accumulation of subproducts such as ethanol and acetate [Fig. 1(a)]. However,

the *K. oxytoca* UM2-17 strain was able to metabolize high sugar concentrations (150 g L⁻¹) without suffering inhibition of the fermentation step, producing 2,3-butanediol in media with higher substrate content. That fact was coincident with the low concentration of acetic acid (0.38 g L⁻¹) in the fermentation medium [Fig. 1(b)]. Moreover, glucose being the main sugar source available in lignocellulosic hydrolysates, it was not surprising that the *K. oxytoca* UM2-17 strain generated a higher 2,3-butanediol amount in the synthetic medium with glucose.

When glucose was mixed with xylose, *K. oxytoca* UM2-17 efficiently metabolized both sugars, confirming that this bacterial isolate is suitable for fermenting hydrolysates proceeding from lignocellulosic raw materials. In agreement with this idea, 2,3-butanediol synthesis was favoured when xylose was used at low concentration, obtaining a metabolite concentration close to that of the medium with only glucose. When xylose proportion was increased in the medium with respect to glucose, the glucose consumption and 2,3-butanediol yield were similar in the G50-X50 and G150-X15 media, but xylose consumption was markedly higher in the former. Furthermore, the yields obtained in synthetic media were similar to those reported by other authors.^{4,32,43,44} In the present study it can be noted that the native *K. oxytoca* UM2-17 strain showed a phenomenon well-known in carbon source preference (catabolic repression), that glucose is energetically preferred to xylose, but once that glucose was depleted, fermentation of xylose was exhibited, without requiring genetic modifications of the regulatory mechanisms involved as described to occur in other bacteria.⁴³

In ABH, *K. oxytoca* UM2-17 showed maximum 2,3-butanediol production at 24 h, exploiting the nutritional richness of ABH to solve glucose depletion and to continue synthesizing 2,3-butanediol. In the diauxic behaviour of 2,3-butanediol synthesis observed in the fermentation of ABH (Fig. 6), the depletion of glucose occurred in the first 24 h of fermentation, decrease in the amount of 2,3-butanediol in the medium was observed;

Table 4. Kinetic parameters of 2,3-butanediol production in batch fermentation by *K. oxytoca* UM2-17 using synthetic mineral medium with glucose/xylose

Medium	Xylose (g L ⁻¹)	Glucose (g L ⁻¹)	μ (h ⁻¹)	$Y_{x/s}$ (%)	$Y_{p/s}$ (%)	q_s (gS/gX*h)	q_p (gP/gX*h)	Q (g h ⁻¹ L ⁻¹)
G100	-	100	0.15 ± 0.01	16.23 ± 0.06	45.09 ± 0.09	0.92 ± 0.09	0.09 ± 0.01	0.24 ± 0.01
X100	100	-	0.23 ± 0.01	15.60 ± 0.04	30.65 ± 0.79	1.47 ± 0.15	0.04 ± 0.01	0.14 ± 0.01
G50-X50	50	50	0.22 ± 0.01	16.03 ± 0.28	38.29 ± 0.04	1.37 ± 0.01	0.07 ± 0.01	0.22 ± 0.01
G150-X15	15	150	0.18 ± 0.01	16.47 ± 0.03	45.95 ± 0.55	1.09 ± 0.30	0.08 ± 0.01	0.23 ± 0.01

G, Glucose; X, xylose. Data correspond to averages of triplicate assay and standard deviation is shown.

Table 5. Production of 2,3-butanediol by *K. oxytoca* UM2-17 in batch fermentations using synthetic mineral medium and agave bagasse hydrolysate

Medium	Initial xylose (g L ⁻¹)	Initial glucose (g L ⁻¹)	Xylose consumed (g L ⁻¹)	Glucose consumed (g L ⁻¹)	2,3-butanediol (g L ⁻¹)	Biomass (OD)	Time (h)	$Y_{p/s}$ (g g ⁻¹)	Q (g L ⁻¹ h ⁻¹)
ABH	6.28	19.36	6.28 ± 0.01	19.36 ± 0.01	10.30 ± 0.14	6.75 ± 0.33	24	0.40 ± 0.46	0.06 ± 0.001
G150-X15	15	150	0.14 ± 0.16	58.34 ± 0.28	27.07 ± 0.21	2.36 ± 0.18	120	0.46 ± 0.55	0.23 ± 0.001

ABH, agave bagasse hydrolysate enzymes-obtained; G, glucose; X, xylose, OD, optic density at 600 nm. Data correspond to averages of triplicate assay and standard deviation is shown.

this fact could be due to the conversion of this alcohol to other compounds such as acetoin, sustained by the reversible reaction of the butanediol dehydrogenase (acetoin \rightleftharpoons 2,3-butanediol). This can explain why *K. oxytoca* UM2-17 consumes 2,3-butanediol, the oxidation to acetoin by the butanediol dehydrogenase has been described in *Pseudomonas putida* and *S. cerevisiae*.^{2,45,46} However, other compounds could be produced as organic acids or ethanol [Fig. 1(a)].

Although research focused on 2,3-butanediol production from lignocellulosic materials is limited, it is well known that when using biomass as feedstock, the concentration, yield and productivity of 2,3-butanediol are usually lower when compared to synthetic media.^{7,11,28,29} Various authors obtained similar 2,3-butanediol concentrations to those in this work using ABH.⁴⁷ Batch wood hydrolysate fermentation obtained 13.3 g L⁻¹ of 2,3-butanediol using a *K. pneumoniae* strain³⁹; batch fermentation using *K. oxytoca* in mineral medium with glucose achieved 10.9 g L⁻¹ of 2,3-butanediol³¹; batch fermentations using *Enterobacter aerogenes* on yellow poplar, larix and rice hull hydrolysates reported 14.3 g L⁻¹, 12.4 g L⁻¹ and 10.2 g L⁻¹, respectively⁴⁸; and with rice waste biomass fermentation using *K. pneumoniae* obtained 11.4 g L⁻¹ of 2,3-butanediol.⁴⁹

Therefore, the present study demonstrates that *A. cupreata* bagasse is a lignocellulosic residue which after acid pre-treatment offers great potential for 2,3-butanediol production, and it is feasible to use its hydrolysates with high yield for fermentation processes using the wild *K. oxytoca* UM2-17 strain as biocatalyzer.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was funded by the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) of México (grant number 256119) and Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo/C.I.C.2.14 grant. Thanks to Alma L. Díaz-Pérez for help as technician. LP-A received a scholarship from CONACYT.

Supporting Information

Supporting information may be found in the online version of this article.

REFERENCES

- Syu J, Biological production of 2, 3-butanediol. *Appl Microbiol Biotechnol* **55**:10–18 (2001).
- Celinska E and Grajek W, Biotechnological production of 2, 3-butanediol current state and prospects. *Biotechnol Adv* **27**:715–725 (2009).
- Ji X-j, Huang H and Ouyang PK, Microbial 2, 3-butanediol production: a state of the art review. *Biotechnol Adv* **29**:351–364 (2011).
- Białkowska AM, Strategies for efficient and economical 2, 3-butanediol production: new trends in this field. *World J Microbiol Biotechnol* **32**:200 (2016).
- Koutinas AA, Yopez B, Kopsahelis N, Freire DMG, Machado A, Castro D et al., Techno-economic evaluation of a complete bioprocess for 2, 3-butanediol production from renewable resources. *Bioresour Technol* **204**:55–64 (2016).
- Duan H, Yamada Y and Sato S, Vapor-phase hydrogenation of acetoin and diacetyl into 2,3-butanediol over supported metal catalysts. *Catal. Commun.* **99**:53–56 (2017).
- Ma K, He M, You H, Pan L, Wang Z, Wang Y et al., Improvement of (R, R)-2, 3-butanediol production from corn stover hydrolysate by cell recycling continuous fermentation. *Chem Eng J* **332**:361–369 (2018).
- Köpke M, Mihalcea C, Liew F, Tizard JH, Ali MS, Conolly JJ et al., 2, 3-Butanediol production by acetogenic bacteria, an alternative route to chemical synthesis, using industrial waste gas. *Appl Environ Microbiol* **77**:5467–5475 (2011).
- MacFaddin JF, *Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica*. Editorial Medica Panamericana, Argentina, pp. 190–198 (2003).
- Pares R and Juárez A, *Bioquímica de los microorganismos*. Editorial Reverté, Barcelona, España, pp. 116–119, 127–129 (2012).
- Campos-García J, Vargas A, Fariás-Rosales L, Miranda AL, Meza-Carmen V and Díaz-Pérez AL, Improving the organoleptic properties of a craft mezcal beverage by increasing fatty acid ethyl ester contents through ATF1 expression in an engineered *Kluyveromyces marxianus* UMPe-1 yeast. *J Agric Food Chem* **66**:4469–4480 (2018).
- Chen J, Zidwick MJ and Rogers P, Organic acid and solvent production: butanol, acetone, and isopropanol; 1,3- and 1,2-propanediol production; and 2,3-butanediol production, in *The Prokaryotes: Applied Bacteriology and Biotechnology*, ed. by, ed. by Rosenberg E, EF DL, Stackebrand E, Lory S and Thompson F. Springer, Berlin (2013).
- Guragain YN, Chitta D, Karanjikar M and Vadlani PV, Appropriate lignocellulosic biomass processing strategies for efficient 2, 3-butanediol production from biomass-derived sugars using *Bacillus licheniformis* DSM 8785. *Food Bioprod Process* **104**:147–158 (2017).

- 14 Kant SB, Kim SH, Yoon JJ and Yang YH, Current status and strategies for second generation biofuel production using microbial systems. *Energ Conver Manage* **148**:1142–1156 (2017).
- 15 Escalante MMP, Aspectos químicos y moleculares del proceso de producción de mezcal. (2007). Available: <http://hdl.handle.net/11627/3078> [8 October 2018].
- 16 Saucedo-Luna J, Castro-Montoya AJ, Martínez-Pacheco MM, Sosa-Aguirre CR and Campos-García J, Efficient chemical and enzymatic saccharification of the lignocellulosic residue from *Agave tequilana* bagasse to produce ethanol by *Pichia caribbica*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol* **38**:725–732 (2011).
- 17 Arrizon J, Mateos JC, Sandoval G, Aguilar B, Solís J and Aguilar MG, Bioethanol and xylitol production from different lignocellulosic hydrolysates by sequential fermentation. *J Food Process Eng* **35**:437–454 (2010).
- 18 Flores JA, Gschaedler A, Amaya-Delgado L, Herrera-López EJ, Arellano M and Arrizon J, Simultaneous saccharification and fermentation of *Agave tequilana* fructans by *Kluyveromyces marxianus* yeasts for bioethanol and tequila production. *Bioresour Technol* **146**:267–273 (2013).
- 19 Caspeta L, Caro-bermúdez MA, Ponce-Noyola T and Martínez A, Enzymatic hydrolysis at high-solids loadings for the conversion of agave bagasse to fuel ethanol. *Appl Energy* **113**:277–286 (2014).
- 20 Perez-Pimienta JA, Lopez-Ortega MG and Sacher A, Recent developments in Agave performance as a drought-tolerant biofuel feedstock: agronomics, characterization, and biorefining. *Biofuels Bioprod Biorefin* **11**:732–748 (2017).
- 21 Rios-González LJ, Morales-Martínez TK, Rodríguez-Flores MF, Rodríguez-de JA, Castillo-Quiroz D, Castro-Montoya AJ *et al.*, Autohydrolysis pretreatment assessment in ethanol production from agave bagasse. *Bioresour Technol* **242**:184–190 (2017).
- 22 Saucedo-Luna J, Castro-Montoya AJ, Rico JL and Campos-García J, Optimization of acid hydrolysis of bagasse from *Agave tequilana* Weber. *Rev Mex Ing Quim* **9**:91–97 (2010).
- 23 Arreola-Vargas J, Ojeda-Castillo V, Snell-Castro R, Corona-González RI, Alariste-Mondragón F and Méndez-Acosta HO, Methane production from acid hydrolysates of *Agave tequilana* bagasse: evaluation of hydrolysis conditions and methane yield. *Bioresour Technol* **181**:191–199 (2015).
- 24 Arreola-Vargas J, Flores-Larios A, HO M and Corona-Gonzalez RI, Single and two-stage anaerobic digestion for hydrogen and methane production from acid and enzymatic hydrolysates of *Agave tequilana* bagasse. *Int J Hydrogen Energy* **41**:897–904 (2016).
- 25 Abreu SJS, Aprovechamiento de bagazo de *Agave tequilana* Weber para la producción de bio-hidrógeno (2013). Available: <http://hdl.handle.net/11627/86>. [8 October 2018].
- 26 Pérez-Pimienta JA, Vargas-Tah A, López-Ortega KM, Medina-López YN, Mendoza-Pérez JA, Avila S *et al.*, Sequential enzymatic saccharification and fermentation of ionic liquid and organosolv pretreated agave bagasse for ethanol production. *Bioresour Technol* **225**:191–198 (2017).
- 27 Afschar AS, Bellgardt KH, Vaz Rossell CE, Czok A and Schaller K, The production of 2,3-butanediol by fermentation of high test molasses. *Appl Microbiol Biotechnol* **34**:582–585 (1991).
- 28 Cao N, Xia Y, Gong CS and Tsao GT, Production of 2, 3-butanediol from pretreated corn cob by *Klebsiella oxytoca* in the presence of fungal cellulase. *Appl Biochem Biotechnol* **63**:129–139 (1997).
- 29 Cheng KK, Liu Q, Zhang JA, Li JP, Xu JM and Wang GH, Improved 2, 3-butanediol production from corncob acid hydrolysate by fed-batch fermentation using *Klebsiella oxytoca*. *Process Biochem* **45**:613–616 (2010).
- 30 Jiang LQ, Fang Z, Guo F and Yang LB, Production of 2, 3-butanediol from acid hydrolysates of *Jatropha* hulls with *Klebsiella oxytoca*. *Bioresour Technol* **107**:405–410 (2012).
- 31 Joo J, Jun S, Young H, Kim Y, Jang M, Lee J *et al.*, Improved fermentation of lignocellulosic hydrolysates to 2, 3-butanediol through investigation of effects of inhibitory compounds by *Enterobacter aerogenes*. *Chem Eng J* **306**:916–924 (2016).
- 32 Guragain YN and Vadlani PV, 2, 3-Butanediol production using *Klebsiella oxytoca* ATCC 8724: evaluation of biomass derived sugars and fed-batch fermentation process. *Process Biochem* **58**:25–34 (2017).
- 33 De Andrade CJ, De Andrade LM, Bution ML, Dolder MAH, Cavalcante BFF and Pastore GM, Optimizing alternative substrate for simultaneous production of surfactin and 2, 3-butanediol by *Bacillus subtilis* LB5a. *Biocatal Agric Biotechnol* **6**:209–218 (2016).
- 34 Park JH, Choi MA, Kim YJ, Kim YC, Chang YK and Jeong KJ, Engineering of *Klebsiella oxytoca* for production of 2, 3-butanediol via simultaneous utilization of sugars from a *Golenkinia* sp. hydrolysate. *Bioresour Technol* **245**:1386–1392 (2017).
- 35 Jansen NB, Flickinger MC and Tsao GT, Production of 2,3-butanediol from D-xylose by *Klebsiella oxytoca* ATCC 8724. *Biotechnol Bioeng* **26**:362–369 (1984).
- 36 Akanni GB, Preez JC, Steyn L and Kilian SG, Protein enrichment of an *Opuntia ficus-indica* cladode hydrolysate by cultivation of *Candida utilis* and *Kluyveromyces marxianus*. *J Sci Food Agric* **95**:1094–1102 (2015).
- 37 García SMD and Serrano H, El agave como planta medicinal. *TechoAgro*. 92 (2014). Available: <https://tecnoagro.com.mx/no.-92/el-agave-como-planta-medicinal> [8 November 2018].
- 38 Asenjo JA and Merchuk JC, Design, formulation, and optimization of media, in *Bioreactor System Design*, ed. by, ed. by Asenjo JA and Merchuk JC. Marcel Dekker, Inc, New York, NY, pp. 89–129 (1994).
- 39 Grover BP, Garg SK and Verma J, Production of 2, 3-butanediol from wood hydrolysate by *Klebsiella pneumoniae*. *World J Microbiol Biotechnol* **6**:328–332 (1990).
- 40 Ji XJ, Huang H, Du J, Zhu JG, Ren LJ, Hu N *et al.*, Enhanced 2, 3-butanediol production by *Klebsiella oxytoca* using a two-stage agitation speed control strategy. *Bioresour Technol* **100**:3410–3414 (2009).
- 41 Castañón-Rodríguez JF, Domínguez-González JM, Ortiz-Muñiz B, Torrestiana-Sánchez B, Ramírez de León JA and Aguilar-Uscanga MG, Continuous multistep versus fed-batch production of ethanol and xylitol in a simulated medium of sugarcane bagasse hydrolysates. *Eng Life Sci* **15**:96–107 (2015).
- 42 Wang XX, Hu HY, Liu DH and Song YQ, The implementation of high fermentative 2, 3-butanediol production from xylose by simultaneous additions of yeast extract, Na₂EDTA, and acetic acid. *New Biotechnol* **33**:16–22 (2016).
- 43 Xj J, Nie ZK, Huang H and Ren LJ, Elimination of carbon catabolite repression in *Klebsiella oxytoca* for efficient 2, 3-butanediol production from glucose – xylose mixtures. *Appl Microbiol Biotechnol* **89**:1119–1125 (2011).
- 44 Nie ZK, Ji XJ, Huang H and Du J, An effective and simplified fed-batch strategy for improved 2, 3-butanediol production by *Klebsiella oxytoca*. *Appl Biochem Biotechnol* **163**:946–953 (2011).
- 45 Gonzalez E, Fernandez MR, Larroy C, Sola L, Pericas MA, Pares X *et al.*, Characterization of a (2R,3R)-2,3-butanediol dehydrogenase as the *Saccharomyces cerevisiae* YAL060W gene product. Disruption and induction of the gene. *J Biol Chem* **275**:35876–35885 (2000).
- 46 Huang M, Oppermann FB and Steinbüchel A, Molecular characterization of the *Pseudomonas putida* 2,3-butanediol catabolic pathway. *FEMS Microbiol Lett* **124**:141–150 (1994).
- 47 Cho JH, Rathasingh C, Song H, Chung BW, Lee HJ and Seung D, Fermentation and evaluation of *Klebsiella pneumoniae* and *K. oxytoca* on the production of 2,3-butanediol. *Bioprocess Biosyst Eng* **35**:1081–1088 (2012).
- 48 Saratale GD, Jung MY and Oh MK, Reutilization of green liquor chemicals for pretreatment of whole rice waste biomass and its application to 2,3-butanediol production. *Bioresour Technol* **205**:90–96 (2016).
- 49 Kim DK, Myoung J, Song H and Keun Y, Kinetic modeling of substrate and product inhibition for 2, 3-butanediol production by *Klebsiella oxytoca*. *Biochem Eng J* **114**:94–100 (2016).