



**INSTITUTO POTOSINO DE INVESTIGACIÓN
CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA, A.C.**

POSGRADO EN CIENCIAS AMBIENTALES

**Producción de etanol a partir de residuos
lignocelulósicos: optimización de la hidrólisis
enzimática y efecto de la aplicación de vacío en la
fermentación**

Tesis que presenta

Mónica Ibarra De Lira

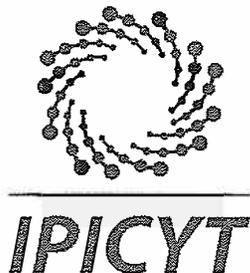
Para obtener el grado de

Maestra en Ciencias Ambientales

Director de la Tesis:

Dr. Francisco Javier Cervantes Carrillo

San Luis Potosí, S.L.P., Enero de 2018



Constancia de aprobación de la tesis

La tesis *“Producción de etanol a partir de residuos lignocelulósicos: optimización de la hidrólisis enzimática y efecto de la aplicación de vacío en la fermentación”* presentada para obtener el Grado de Maestra en Ciencias Ambientales fue elaborada por **Mónica Ibarra De Lira** y aprobada el quince de enero del dos mil dieciocho por los suscritos, designados por el Colegio de Profesores de la División de Ciencias Ambientales del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.



Dr. Francisco Javier Cervantes Carrillo
Director de la tesis



Dr. Felipe Alatraste Mondragón
Miembro del Comité Tutorial



Dra. Lorena Amaya Delgado
Miembro del Comité Tutorial



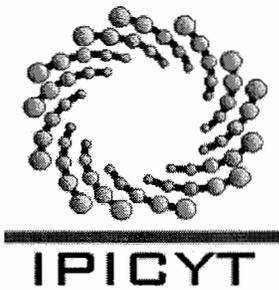
Créditos Institucionales

Esta tesis fue elaborada en los Laboratorios de la División de Ciencias Ambientales del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., bajo la dirección del Dr. Francisco Javier Cervantes Carrillo.

Durante la realización del trabajo el autor recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT-590453) y del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A. C.

Este trabajo de investigación fue financiado por el Clúster Bioturbosina a través del proyecto 248090 del Fondo de Sustentabilidad Energética, fomentado por la Secretaría de Energía y CONACYT.

La determinación de inhibidores (furfurales y fenoles) se realizó en el Laboratorio Nacional de Biotecnología Agrícola, Médica y Ambiental (LAMBAMA) y el análisis de difracción de rayos X se llevó a cabo en el Laboratorio de Investigaciones de Nanociencias y Nanotecnología (LINAN).



Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Acta de Examen de Grado

El Secretario Académico del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., certifica que en el Acta 052 del Libro Primero de Actas de Exámenes de Grado del Programa de Maestría en Ciencias Ambientales está asentado lo siguiente:

En la ciudad de San Luis Potosí a los 15 días del mes de enero del año 2018, se reunió a las 16:00 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

Dr. Felipe Alatraste Mondragón

Presidente

IPICYT

Dr. Francisco Javier Cervantes Carrillo

Secretario

IPICYT

a fin de efectuar el examen, que para obtener el Grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS AMBIENTALES

sustentó la C.

Mónica Ibarra De Lira

sobre la Tesis intitulada:

Producción de etanol a partir de residuos lignocelulósicos: optimización de la hidrólisis enzimática y efecto de la aplicación de vacío en la fermentación

que se desarrolló bajo la dirección de

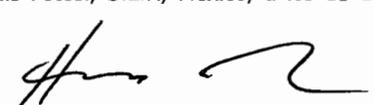
Dr. Francisco Javier Cervantes Carrillo

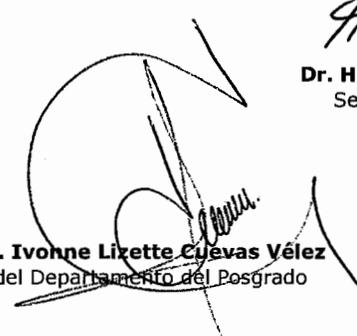
El Jurado, después de deliberar, determinó

APROBARLA

Dándose por terminado el acto a las 18:00 horas, procediendo a la firma del Acta los integrantes del Jurado. Dando fe el Secretario Académico del Instituto.

A petición de la interesada y para los fines que a la misma convengan, se extiende el presente documento en la ciudad de San Luis Potosí, S.L.P., México, a los 15 días del mes de enero de 2018.


Dr. Horacio Flores Zúñiga
Secretario Académico


Mtra. Ivonne Lizette Cuevas Vélez
Jefa del Departamento del Posgrado



*A mis padres, por ser yo el motivo de su más grande
preocupación y por no poder regresar el tiempo para estar a su
lado.*

*A toda mi familia por todo el amor, paciencia y comprensión
que me brindan incondicionalmente.*

Agradecimientos

A Dios por permitirme finalizar esta etapa de mi vida y guiar con su luz mis pasos.

A mis padres, por amarme y apoyarme para realizar todos mis sueños. Por instruirme con el ejemplo para luchar día a día. No tengo palabras para agradecer la dedicación y esmero puestos en mí para ser lo que ahora soy. Son el motor que mueve mi vida.

A Omar Aviña, gracias por estar a mi lado en todo momento, por enseñarme a observar el horizonte y compararlo con la pequeñez de los problemas y así poder asimilar que la vida está llena de altos y bajos, pero lo importante es dar lo mejor que tenemos. Gracias por todo el amor y comprensión que siempre me brindas.

A mis hermanos y cuñados, por todo el cariño y apoyo, por darme uno de los regalos más lindos: mis sobrinos, que me contagian con su alegría, bondad y energía.

Gracias a Lucita, por abrirme las puertas de su corazón sin ninguna condición. Por ser uno de los pilares más importantes de mi vida.

Al Dr. Cervantes, por brindarme la oportunidad de formar parte de este proyecto, que me permitió crecer no sólo en el aspecto profesional, sino también personal. Por confiar en mí y mostrarme que la paciencia es clave fundamental para alcanzar los objetivos que la vida te plantea. Gracias por todo.

Al Dr. Alatraste y a la Dra. Amaya, por su disponibilidad para atender mis dudas y por enriquecer este trabajo con sus comentarios y consejos.

A Lupita, por adoptar este proyecto como suyo y ayudarme a convertir los días en minutos, por acompañarme en cada madrugada y en cada velada. A Cynthia, por escuchar cada uno de mis relatos sin juzgarme, así como por hacer la distancia más corta. A las dos, gracias por su amistad.

A los técnicos académicos de la División de Ciencias Ambientales: M. en C. Alejandra Colunga, M. en C. Juan Pablo Rodas, M. en C. Guillermo Vidriales y Mario Delgado por el apoyo técnico brindado en los laboratorios de la DCA.

A I.Q. Ma. Del Carmen Rocha y a I.Q. Guadalupe Ortega, por su apoyo en la determinación de inhibidores en el Laboratorio Nacional de Biotecnología Agrícola, Médica y Ambiental (LANBAMA), así como a M. en C. Alicia Becerra, por su disposición para llevar a cabo las mediciones de crecimiento celular. Así mismo quiero agradecer a Laura Edith Sánchez Galindo y Edith Rodríguez Delgadillo por el apoyo administrativo brindado.

A Irma, Dendera y Cruz, por regalarme de su tiempo y compartir sus conocimientos sobre optimización.

A mis compañeros de generación por compartir vivencias, tanto alegres como estresantes, especialmente al entrañable club de los Niños.

A Cervantes Team, por hacer amena mi estancia en el laboratorio.

A Iván, Violeta, Saúl, Edgar y Francisco, por toda su hospitalidad y amabilidad.

Contenido

Constancia de aprobación de la tesis	ii
Créditos institucionales	iii
Acta de examen	iv
Dedicatorias	v
Agradecimientos	vi
Lista de tablas	xi
Lista de figuras	xii
Abreviaturas	xiv
Resumen	xvi
Abstract	xvii
Capítulo 1 Introducción, antecedentes, justificación, hipótesis, objetivos	1
1.1. Introducción	1
1.2. Antecedentes	5
1.2.1. El etanol en la fabricación de la bioturbosina	5
1.2.1.1. Bioturbosina (Jet A Jet A-1)	5
1.2.1.2. Etanol	9
1.2.2. Biomasa	10
1.2.2.1. Composición del material lignocelulósico	11
1.2.3. Proceso de Producción de Bioetanol	15
1.2.3.1. Pretratamiento	15
1.2.3.2. Hidrólisis Enzimática	18
1.2.3.3. Fermentación	20
1.2.4. Tipos de Biomosas	21
1.2.4.1. Podas de Jatropha	21
1.2.4.2. Paja de Trigo	23
1.2.5. Limitaciones de la hidrólisis enzimática	24
1.2.5.1. Diseño Plackett Burman	25
1.2.5.2. Diseño Central Compuesto	26
1.2.6. Extracción de etanol por vacío en un Reactor Continuo de Tanque Agitado CSTR	27
1.3. Justificación	29
1.4. Hipótesis	29
1.5. Objetivos	30
1.5.1. Generales	30
1.5.2. Particulares	30

1.6. Diagrama Experimental	30
Capítulo 2 Pretratamiento ácido y Selección de podas de Jatropha	33
2.1. Resumen	33
2.2. Materiales y métodos	33
2.2.1. Biomosas	33
2.2.2. Caracterización	33
2.2.3. Selección	35
2.2.3.1. Hidrólisis Ácida	35
2.2.3.2. Hidrólisis enzimática	35
2.2.4. Determinaciones analíticas y cálculos	36
2.2.5. Análisis estadístico	36
2.3. Resultados y discusión	36
2.3.1. Caracterización	36
2.3.2. Hidrólisis ácida	40
2.3.3. Hidrólisis enzimática	42
2.3.4. Selección de la biomasa	44
2.4. Conclusiones	44
Capítulo 3 Optimización de la hidrólisis enzimática	46
3.1. Resumen	46
3.2. Materiales y métodos	46
3.2.1. Pretratamiento: Hidrólisis ácida	46
3.2.2. Optimización de le hidrólisis enzimática	46
3.2.2.1. Exploración mediante el diseño Plackett Burman	47
3.2.2.2. Diseño Central Compuesto	47
3.2.2.3. Cinética de producción de azúcares	48
3.2.3. Comprobación de las condiciones óptimas	48
3.2.4. Fermentación en botella	48
3.2.5. Determinaciones analíticas y cálculos	49
3.2.6. Análisis Estadístico	50
3.3. Resultados y discusión	50
3.3.1. Optimización	50
3.3.2. Fermentación en botellas	59
3.4. Conclusiones	64
Capítulo 4 Evaluación del proceso de fermentación alcohólica en un cstr acoplado a extracción de vacío	65
4.1. Resumen	65
4.2. Materiales y métodos	65
4.2.1. Activación de la levadura	65
4.2.2. Preparación de los hidrolizados	65

4.2.3. Reactor sin vacío	66
4.2.4. Reactor con vacío	66
4.2.5. Determinaciones analíticas y cálculos	67
4.2.6. Análisis Estadístico	67
4.3 Resultados y discusión	68
4.4. Conclusiones	72
Capítulo 5 Conclusiones generales y perspectivas	73
5.1 Conclusiones generales	73
5.2. Perspectivas	74
Referencias	75
Anexos	94

Lista de tablas

Tabla 1 Clasificación de los procesos de producción de bioturbosina (tomada y modificada de (Wang & Tao 2016)).	3
Tabla 2 Especificaciones de Combustible Jet A-1 (Adaptada de: (Wang & Tao 2016; Pemex 2011)).	6
Tabla 3 Clasificación de Biocombustibles en función del tipo de biomasa.	11
Tabla 4 Biomasa lignocelulósicas y sus respectivos porcentajes de fibras.	12
Tabla 5 Pautas generales para diseñar un experimento tomado de: (Montgomery 2014).	25
Tabla 6 Índice de cristalinidad (IC) de biomasa cruda. Avicel PH101: Estándar.	39
Tabla 7 Caracterización de los hidrolizados ácidos.	40
Tabla 8 Inhibidores formados durante la hidrólisis ácida.	41
Tabla 9 Porcentaje de fibras después de aplicar la hidrólisis ácida.	42
Tabla 10 Factores experimentales del PB e intervalos de prueba evaluados para las dos biomosas.	47
Tabla 11 Diseño experimental obtenido del PB para la paja de trigo y podas de Jatropha, donde t: tiempo, AR: Azúcares Reductores.	51
Tabla 12 Set de experimentos del DCC para la optimización de la paja de trigo.	52
Tabla 13 Experimentos para la optimización de podas de Jatropha generados del DCC.	54
Tabla 14 Valores óptimos para los factores obtenidos del DCC y de la cinética de tiempo, así como los valores tomados del PB. AR y %LR son valores predichos por el DCC.	56
Tabla 15 Comparación entre valores obtenidos de AR y %LR (Experimental & Predicho). AR: azúcares reductores, %LR: porcentaje de líquido recuperado.	57
Tabla 16 Caracterización de los hidrolizados y sólido enzimático bajo condiciones óptimas. Inhibidores formados (HMF: 5-(hidroximetil)furfural) y porcentaje de fibras.	58
Tabla 17 Caracterización de los hidrolizados alimentados al reactor. AR: azúcares reductores, HMF:5-(hidroximetil)furfural	66
Tabla 18 Rendimiento de etanol para las diversas biomosas.	71
Tabla 19 Comparación entre el etanol esperado y el etanol producido.	71

Lista de figuras

Figura 1 Ciclo de vida de los combustibles a) Fósiles (ciclo de cuna a tumba), b) Biocombustibles (Ciclo de Cuna-Cuna) (Atag 2009).	2
Figura 2 Procesos de producción de Bioturbosina agrupados en la categoría de Alcohol, Aceite, azúcar y Gas. ATJ: alcohol to jet; HEFA: hydroprocessed esters and fatty acids; HDCJ: hydrotreated depolymerized cellulosic jet; APR: aqueous phase reforming; DSH: direct sugar to hydrocarbons; FT: Fischer–Tropsch.	7
Figura 3 Estructura de la celulosa (Rincón Martínez & Silva Lora 2014).	13
Figura 4 Monosacáridos que componen la Hemicelulosa (Rincón Martínez & Silva Lora 2014).	14
Figura 5 Modelo estructural de la lignina de madera aserrada (tomada de (Rincón Martínez & Silva Lora 2014)).	14
Figura 6 Reacciones que ocurren durante la hidrólisis de materiales lignocelulósicos (Palmqvist & Hahn-Hägerdal 2000b).	20
Figura 7 Estados de la República Mexicana donde se siembra trigo grano. Valores numéricos en el mapa representan el % del valor de producción por entidad. (mapa tomado de Atlas Agroalimentario (SIAP 2017).	23
Figura 8 Diseño Experimental	31
Figura 9 Distribución de tamaño de partícula después del proceso de trituración	37
Figura 10 Porcentaje de fibras de biomasa cruda.	38
Figura 11 Cinética de producción de azúcares reductores durante la hidrólisis enzimática para las 3 biomásas lignocelulósicas.	43
Figura 12 Diagrama de Pareto del PB, a) Paja de trigo y b) Podas de Jatropha. A: Enzima; B: Sustrato; C: pH; D:Tiempo; E: Temperatura.	52
Figura 13. Superficie de respuesta para paja de trigo, considerando pH constante	53
Figura 14 Superficie de respuesta para las podas de Jatropha	55
Figura 15 Optimización del tiempo de hidrólisis enzimática. $P(>F)=8.93e-5$ para la paja de trigo y $P(>F)=0.013$	55
Figura 16 Consumo de azúcares reductores durante la fermentación de paja de trigo. PA: hidrolizados ácido de paja de trigo; PE: hidrolizado enzimático de paja de trigo; PM: Mezcla hidrolizados ácido/enzimático relación=0.671.	59
Figura 17 Producción de etanol a partir de hidrolizados de paja de trigo. PA: ácido ($P(>F)=0.00233$); PE: enzimático ($P(>F)=0.000102$); PM ácido/enzimático=0.671 ($P(>F)=0.000161$).	60
Figura 18 Crecimiento celular de <i>K. marxianus</i> SLP1, durante la fermentación de hidrolizados de paja. PA: hidrolizados ácido de paja de trigo; PE: hidrolizado enzimático de paja de trigo; PM: Mezcla hidrolizados ácido/enzimático relación=0.671.	61
Figura 19 Consumo de azúcares reductores durante la fermentación de hidrolizados de podas de Jatropha. JA: hidrolizados ácido; JE: hidrolizado enzimático; JM: Mezcla hidrolizados ácido y enzimático relación=0.504.	62
Figura 20 Producción de etanol a partir de hidrolizados de podas de Jatropha. JA: ácido ($P(>F)=1.38e-05$); JE: enzimático ($P(>F)=9.11e-05$); JM ácido/enzimático=0.504 ($P(>F)=8.51e-08$).	63

Figura 21 Crecimiento celular de <i>K. marxianus</i> SLP1, durante la fermentación de hidrolizados de podas de <i>Jatropha</i> . JA: hidrolizados ácido; JE: hidrolizado enzimático; JM: Mezcla hidrolizados ácido y enzimático relación=0.504.	63
Figura 22 Configuración reactor con vacío. a) CSTR, b) Columna de condensación. c) Controlador de vacío d) Bomba de vacío.	67
Figura 23 Cinética de consumo de azúcares reductores en el reactor CSTR, con y sin aplicación de ciclos de vacío.	68
Figura 24 Producción de etanol en el reactor CSTR con y sin ciclos de vacío. La curva de aplicación de vacío incluye la cantidad de etanol presente en la columna de condensación.	69
Figura 25 Crecimiento celular de <i>K. marxianus</i> SLP1 en el reactor CSTR con y sin ciclos de vacío, para las dos biomazas	70

Abreviaturas

%LR	Porcentaje de líquido recuperado
ANOVA	Análisis de varianza
APR	Reformado en fase acuosa
AR	Azúcares reductores
ASA	Aeropuertos y Servicios Auxiliares
ASTM	Sociedad Americana de Pruebas y Materiales
ATJ	Alcohol a combustible
CIAD	Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo
CIATEJ	Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco
cSt	Centistokes
CSTR	Reactor Continuo de tanque agitado
DCC	Diseño Central Compuesto
DOE	Departamento de Energía de los Estados Unidos
DSH	Azúcar directo a hidrocarburos
EJ	Exajoule
FT	Fischer–Tropsch.
g	Gramos
GEI	Gases de efecto invernadero
GTJ	Gas a combustible
h	Horas
HDCJ	Hidrotratamiento de despolimerización celulósica
HEFA	Hidroprocesado de ésteres y ácidos grasos
IC	Índice de cristalinidad
IPCC	Panel Intergubernamental de Cambio Climático
ITSON	Instituto Tecnológico de Sonora
JA	Hidrolizado ácido de podas de Jatropha
JE	Hidrolizado enzimático de podas de Jatropha
JM	Mezcla de hidrolizados ácido y enzimático de podas de Jatropha
KPa	Kilopascal

MJ	Megajoule
L	Litros
mg	Miligramos
mL	Mililitros
OTJ	Aceite a combustible
PA	Hidrolizado ácido de paja de trigo
PB	Plackett-Burman
PE	Hidrolizado enzimático de paja de trigo
Pemex	Petróleos Mexicanos
PJ	Podas de Jatropha
PM	Mezcla de hidrolizados ácido y enzimático de paja de trigo
ppm	Partes por millón
pS	Picosiemens
PT	Paja de trigo
rpm	Revoluciones por minuto
SIAP	Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera
STJ	Azúcar a combustible
Temp.	Temperatura
XRD	Difractometro de Rayos-X

Resumen

Producción de etanol a partir de residuos lignocelulósicos: optimización de la hidrólisis enzimática y efecto de la aplicación de vacío en la fermentación

Palabras clave. Plackett Burman, Diseño central compuesto, podas de Jatropha, paja de trigo, extracción In-situ, corteza.

La paja de trigo (PT) y las podas de Jatropha (PJ) son residuos lignocelulósicos con alto potencial para ser utilizados en la obtención de etanol en México. Sin embargo, para aprovechar al máximo estos dos residuos, es necesario mejorar el proceso de producción de etanol. Por tal motivo, en este trabajo se realizó una optimización de las condiciones de hidrólisis enzimática de las dos biomásas (después de ser sometidas a una hidrólisis ácida) evaluando el efecto que tienen la concentración de sustrato, la concentración de enzima (Celluclast 1.5L®), el pH, el tiempo de reacción y la temperatura sobre la producción máxima de azúcares reductores y el porcentaje de líquido recuperado (%LR). Se utilizó de manera secuencial un diseño Plackett-Burman (PB), un Diseño Central Compuesto (DCC) y finalmente una cinética (optimización del tiempo). Los valores óptimos para la PT fueron: 50.34 g/L de sustrato, un pH de 4.98, 43.24°C y 24 h (1.5 mg/mL de enzima del PB); mientras que para las PJ se encontraron las siguientes condiciones óptimas: 50.44 g/L de sustrato, 5.13 de pH y 24 h (tomando 0.52 mg/mL de enzima y 40°C del PB). Al término de la optimización se alcanzaron 21.94 g/L de azúcares reductores en el caso de la PT (con 73 %LR) y 7.49 g/L para las PJ (con 55 %LR), lo que representa un 81.3 y 99.5%, respectivamente, del valor de azúcar predicho por el DCC. Así mismo, también se evaluó el efecto que tiene la aplicación de vacío (eliminación in-situ de etanol) sobre el proceso de fermentación de hidrolizados de PT y PJ en un reactor CSTR (por sus siglas en inglés continuous stirred-tank reactor), donde se observó un cambio positivo para los hidrolizados de PT, aumentando la productividad de etanol de 0.26 a 0.64 g/L*h, mientras que para las PJ no se observaron diferencias significativas.

Adicionalmente, se estudió el impacto de las PJ sin la corteza en la producción de azúcares reductores, observando que no se tienen diferencias significativas, por lo que se decidió utilizar las PJ con corteza, lo cual evita la pérdida adicional de tiempo y costos ocasionados por el proceso de descortezado.

Abstract

Ethanol production from lignocellulosic waste: optimization of enzymatic hydrolysis and effect of vacuum on fermentation.

Key words. Plackett Burman, central composite design, *Jatropha* prunings, wheat straw, in-situ extraction, bark.

Wheat straw (WS) and *Jatropha* prunings (JP) are lignocellulosic wastes with high potential to be used in the production of ethanol in Mexico. However, in order to make the most of both residues, it is necessary to improve the ethanol production process. For this reason, the aim of this thesis was to optimize the enzymatic hydrolysis conditions of the two biomasses (after being subjected to an acid hydrolysis) by evaluating the effect of the substrate concentration, enzyme concentration (Celluclast 1.5L®), pH, reaction time and temperature, on the maximum production of sugars and the recovered liquid percentage (% RL). A Plackett-Burman design (PB), a Central Composite Design (CCD) and finally a kinetic (time optimization) were sequentially used. The optimal values for the WS were: 50.34 g/L of substrate, a pH of 4.98, 43.24 ° C and 24 h (taking 1.5 mg/mL of enzyme of PB); while for the JP the following optimal conditions were found: 50.44 g/L of substrate, 5.13 of pH and 24 h (taking 0.52 mg/mL of enzyme and 40 ° C of PB). At the end of the optimization, 21 g/L of reducing sugars were reached in the case of WS (with 73% RL) and 7.5 g/L for JP (with 55% RL), representing 81.3 and 99.5%, respectively, of the sugar value predicted by the CCD. Likewise, the effect of the application of vacuum (in-situ removal of ethanol) on the fermentation process of WS and JP hydrolysates in a CSTR reactor was evaluated. There was, a positive change observed for WS hydrolysates increasing the ethanol productivity of 0.26 to 0.64 g/L*h, however, no significant differences were observed for JP. Additionally, the impact of using JP without bark in the production of reducing sugars was studied. As there were no significant differences, we recommend the use of JP with bark, thus saving additional time and costs produced by manual bark removal process.

Capítulo 1 .

1.1. Introducción

Uno de los problemas actuales más importantes es el calentamiento global, esto debido a que las actividades antropogénicas, a partir de la revolución industrial, han provocado que la cantidad de gases de efecto invernadero (GEI) se incremente más allá de la concentración natural necesaria para mantener la tierra a una temperatura promedio de 15°C (Isaza Delgado & Campos Romero 2007). Este aumento se debe principalmente al CO₂ liberado de los combustibles fósiles, el cual, para el 2050, se prevé que contribuya con más de 2/3 partes de las emisiones de GEI (Reilly 2015). El calentamiento global resulta ser cada vez más alarmante, tal como lo expuso el Panel Intergubernamental de Cambio Climático (IPCC), en diciembre de 2015, donde dio a conocer que un aumento en la temperatura más allá de 2°C traerá graves consecuencias al planeta, tales como derretimiento de los polos, aumento en el nivel del mar, migración de especies, desaparición de los arrecifes de coral, provocando así mismo: ciclones, tormentas, huracanes, todos éstos con mayor intensidad y frecuencia, poniendo en riesgo la vida en la tierra (Jackson et al. 2015; Reilly 2015; COP 21 2015; Global Carbon Project 2016).

Con el fin de reducir el impacto del calentamiento global, Aeropuertos y Servicios Auxiliares (ASA) llevaron a cabo la iniciativa “Plan de vuelo” con el propósito de agrupar diferentes sectores para ayudar a disminuir la concentración de GEI procedentes de la industria de la aviación, la cual, de acuerdo a Global Carbon, representa un 3% de las emisiones de CO₂ a nivel mundial y continua en aumento (Global Carbon Project 2016). La reducción de CO₂ es mediante la modificación del ciclo de vida del combustible, ya que en el caso de la bioturbosina se realiza un ciclo en el cual el cultivo de las especies, que se utilizan como materia prima, permite capturar el CO₂ generado durante el uso y procesado de dicho combustible. Por ejemplo, un análisis realizado para camelina muestra una reducción del 84% de las emisiones en su ciclo de vida (Figura 1b ciclo de cuna a cuna); mientras que el proceso de producción de los combustibles fósiles

únicamente libera CO₂, sin capturar nada de estas emisiones (Figura 1a, Ciclo de cuna a tumba). Esta iniciativa permitió la formación de un Clúster (integrantes del clúster anexo A) cuyo objetivo es la obtención de Bioturbosina, buscando así posicionar a México como líder a nivel mundial en la producción de este biocombustible (Aeropuertos y Servicios Auxiliares 2015; Atag 2009; Global Carbon Project 2016).

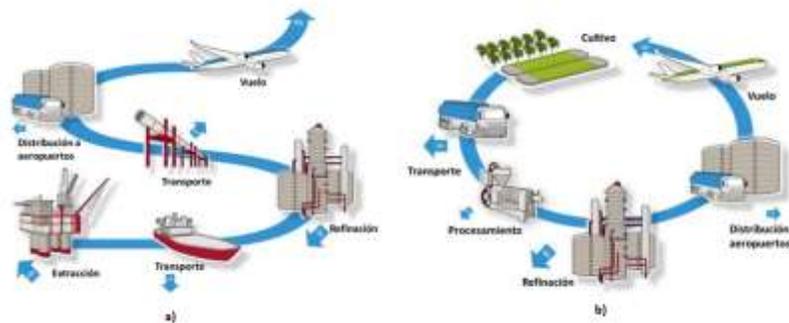


Figura 1 Ciclo de vida de los combustibles a) Fósiles (ciclo de cuna a tumba), b) Biocombustibles (Ciclo de Cuna-Cuna) (Atag 2009).

A lo largo de la modificación del ciclo de vida del biocombustible, es necesario mejorar la eficiencia del proceso de producción del mismo, esto con el fin de hacerlo competitivo respecto a los combustibles convencionales (Masran et al. 2016).

Los procesos de producción de bioturbosina, se pueden clasificar en cuatro categorías dependiendo de la materia prima que se utiliza: alcohol, aceite, gas y azúcar (Tabla 1), siendo el más utilizado y estudiado el que procede de aceites; sin embargo, resulta importante indagar en otros procesos, tal como el que procede de alcoholes (Wang & Tao 2016).

El proceso de Alcohol a combustible (ATJ, por sus siglas en inglés, Alcohol-to-jet) consta de cuatro pasos para convertir alcoholes: deshidratación del alcohol, oligomerización, destilación e hidrogenación (BYOGY Renewables 2011). Existen diversos alcoholes utilizados en el proceso ATJ, entre los que se encuentra el etanol (Wang & Tao 2016).

Tabla 1 Clasificación de los procesos de producción de bioturbosina (tomada y modificada de (Wang & Tao 2016)).

Categoría	Pruebas en vuelos	Materias primas
Aceite a combustible (OTJ)	Aerolíneas comerciales	
	Virgin Atlantic, Air New Zealanda, Continental airlines, KLM, JAL, TAM airlines, Jet blue airways, Boeing, Interjet, Air france, Honeywell, Finnair, Air México, Thomson airways,	Coco y babasu; Jatropha; alga y Jatropha; camelina, Jatropha y alga; camelina; aceite de cocina, Jatropha y halófito; carinata; Jatropha, camelina y grasas animales; algas y aceite
Alcohol a combustible (ATJ)	Aeronaves militares	
	U.S Navy, U.S. Air Force, Netherland Air, NASA, Dutch Military, EADs.	Camelina; camelina y aceite de cocina; aceite de cocina; algas; pollo y sebo de res.
Gas a combustible (GTJ)	Aerolíneas comerciales	
	Continental airlines	Algas
Azúcar a combustible (STJ)	Aeronaves militares	
	U.S. Air Force	Alcohol derivado de Celulosa ; Azúcar derivada de biomasa
Gas a combustible (GTJ)	Aerolíneas comerciales	
	Virgin Atlantic, British airways	Gas de desecho industrial, desecho de fábrica.
Azúcar a combustible (STJ)	Aeronaves militares	
	U.S. Air Force	Gas natural
Azúcar a combustible (STJ)	Aerolíneas comerciales	
	Azul airlines	Caña de azúcar

El etanol es también conocido como alcohol etílico y se puede obtener a partir de biomasa (Zabed et al. 2016; Atag 2009). A nivel industrial se obtiene principalmente de maíz y de caña de azúcar, en EUA y Brasil, respectivamente (Sarkar et al. 2012). Sin embargo, es necesario hacer uso de otras biomásas que no compitan con la seguridad alimentaria, tales como las podas de Jatropha y la paja de trigo, las cuales son consideradas como residuos. Debido a la naturaleza lignocelulósica tres pasos son fundamentales para la conversión de ambas biomásas a etanol: pretratamiento, hidrólisis enzimática y fermentación (Zabed et al. 2016).

Se requieren pretratamientos físicos y químicos, para la reducción de tamaño de las biomásas (con el objeto de aumentar el área superficial accesible) y para destruir la matriz lignocelulósica, respectivamente (Rincón Martínez & Silva Lora 2014). Además, las podas de *Jatropha* pueden requerir un pretratamiento adicional, debido a la presencia de lignina en la corteza de éstas (Valdes & Pacheco 1998), por tanto un proceso de descortezado permite reducir la lignina aumentando la accesibilidad y obteniendo así una mayor hidrólisis de la holocelulosa (Zabed et al. 2016).

El proceso de hidrólisis enzimática consiste en la conversión de celulosa en azúcares fermentables (Gupta & Verma 2015) y su eficiencia se ve afectada por diversos factores, tales como enzima, sustrato, pH, temperatura y tiempo (Rincón Martínez & Silva Lora 2014). Existen varios modelos estadísticos pueden ser utilizados para encontrar las condiciones óptimas de los factores que favorezcan la hidrólisis enzimática, dentro de los que se encuentra el modelo Plackett Burman y el Diseño Central Compuesto, que pueden ser utilizados de manera secuencial, ya que el primero permite encontrar aquellas factores que son significativos en el proceso de hidrólisis enzimática usando pocos experimentos y el segundo, al ser un experimento más robusto, permite obtener los valores óptimos de dichas factores de manera más precisa (Montgomery 2014).

La fermentación etílica es el paso mediante el cual los azúcares obtenidos de la hidrólisis son convertidos a etanol (Rincón Martínez & Silva Lora 2014). Diversas limitaciones se presentan en este proceso, entre las que se encuentra inhibición por producto, la cual puede evitarse mediante el uso de técnicas de extracción *in-situ* como la aplicación de vacío (Cysewski & Wilke 1977).

1.2. Antecedentes

1.2.1. El etanol en la fabricación de la bioturbosina

1.2.1.1. Bioturbosina (Jet A Jet A-1)

Jet A y Jet A-1 son combustibles tipo keroseno utilizados por la industria de Aviación y se diferencian uno del otro principalmente por su punto de congelación ($\geq -40^{\circ}\text{C}$ y $\geq 47^{\circ}\text{C}$, respectivamente) (Exxon Mobil Aviation 2005). Éstos pueden ser producidos a partir de materia prima procedente de biomasa, por tal motivo se les considera biocombustibles de aviación, los cuales debe cumplir con especificaciones muy estrictas de calidad de acuerdo con la Sociedad Americana de Pruebas y Materiales (ASTM por sus siglas en inglés) en comparación con los biocombustibles utilizados para vía terrestre. Este combustible forma parte de los biocombustibles de segunda generación; es decir, aquellos que se elaboran a partir de mejores procesos tecnológicos y materias primas biológicas no destinadas a la alimentación y cultivables en terrenos no agrícolas o marginales, inclusive en zonas desérticas, utilizando aguas salobres. Además de que se trata de un recurso renovable y sustentable que puede reemplazar al combustible de aviación tradicional (Aeropuertos y Servicios Auxiliares 2015; US Energy Information Administration 2013).

Especificaciones de la bioturbosina

Las especificaciones y requerimientos de la bioturbosina están en función del tipo de uso a futuro, dentro de las que destacan el punto de congelación y la viscosidad máxima permitida (Department of Defense 2013). Es importante evaluar estas especificaciones, ya que de éstas depende el funcionamiento adecuado del avión. Por ejemplo: se requiere un alto punto de inflamación debido al considerable riesgo de combustión (Exxon Mobil Aviation 2005); Además, el combustible de la aviación necesita buenas propiedades de flujo en frío, como un punto de congelación más bajo, para asegurar que el combustible puede fluir a gran altura (Wang & Tao 2016).

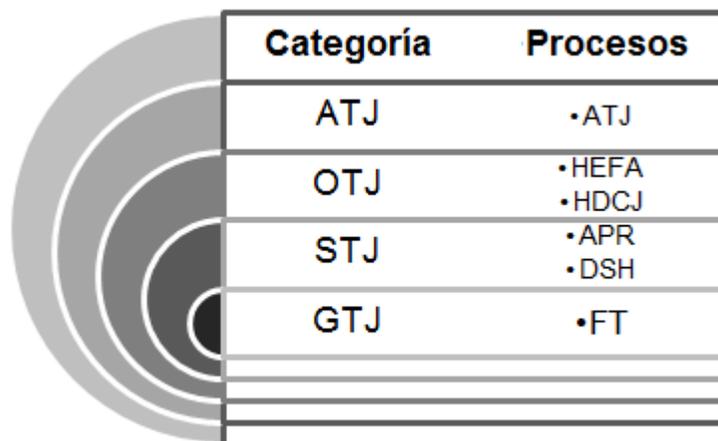
En la Tabla 2 se enlistan algunas de las especificaciones más importantes para la bioturbosina obtenidas de la certificación estándar D7566 de la ASTM, así como para la turbosina recopiladas del estándar D1655 ASTM y de la hoja de seguridad de Petróleos Mexicanos (Pemex).

Tabla 2 Especificaciones de Combustible Jet A-1 (Adaptada de: (Wang & Tao 2016; Pemex 2011)).

Jet A-1			
Parámetro	ASTM D1655-04a	ASTM D7566	PEMEX
Composición			
Acidez total (mg KOH/g)	0.1, máx.	0.1, máx.	-
Aromáticos (% vol.)	25, máx.	25, máx.	25, máx.
Sulfuros totales (% peso)	0.3, máx.	0.3, máx.	-
Volatilidad			
Temperatura de destilación			
10% recuperación (°C)	205, máx.	205, máx.	205, máx.
50% recuperación (°C)	-	15, min	-
90% recuperación (°C)	-	40, min	-
Punto final de ebullición (°C)	300, máx.	300, máx.	-
Punto de inflamabilidad (°C)	38, min	38, min	38, min
Densidad a 15°C (kg/m³)	775-840	775-840	
Fluidez			
Punto de congelamiento (°C), máx.	-47	-47	-47
Viscosidad a -20°C (cSt)	8, máx.	8, máx.	8
Combustión			
Calor neto de comb (MJ/kg)	42.8, min	42.8, min	-
Naftalenos (% vol.)	3, máx.	3, máx.	-
Conductividad			
conductividad (pS/m)	50-450	-	5-450

Producción de bioturbosina

Existen diferentes caminos para la producción de bioturbosina, los cuales se clasifican en función de la materia prima que se usa en cada uno: Aceite a combustible, Azúcar a combustible, Alcohol a combustible y gas de síntesis a combustible (Figura 2).

El diagrama muestra un gráfico de ondas concéntricas a la izquierda de una tabla. La tabla tiene dos columnas: 'Categoría' y 'Procesos'.

Categoría	Procesos
ATJ	•ATJ
OTJ	•HEFA •HDCJ
STJ	•APR •DSH
GTJ	•FT

Figura 2 Procesos de producción de Bioturbosina agrupados en la categoría de Alcohol, Aceite, azúcar y Gas. ATJ: alcohol to jet; HEFA: hydroprocessed esters and fatty acids; HDCJ: hydrotreated depolymerized cellulosic jet; APR: aqueous phase reforming; DSH: direct sugar to hydrocarbons; FT: Fischer–Tropsch.

A continuación se describe cada una de las cuatro categorías:

Gas (GTJ, por sus siglas en inglés, gas to jet): Consiste en la conversión de biogás, gas natural y singas (gas de síntesis) a biocombustible de aviación (Wang & Tao 2016). La producción de syngas involucra una pirólisis y gasificación. La pirólisis es el proceso de descomposición térmica de la biomasa en ausencia de aire, que da como resultado la formación de bioaceite y metano con otros productos secundarios. La gasificación implica el tratamiento de productos de pirólisis con aire o vapor para producir gas de síntesis, que es una mezcla de hidrógeno y monóxido de carbono (Gutiérrez-Antonio et al. 2017; Kandaramath et al. 2015). El proceso de obtención del combustible se conoce como Fischer-Tropsch, el cual es una vía certificada por ASTM (Gutiérrez-Antonio et al. 2017).

Aceite (OTJ, por sus siglas en inglés, oil to jet): Es un método de hidroprocesamiento que implica el tratamiento de grasas y aceites (aceites vegetales y bioaceites, tales como aceite de *Jatropha*) a través de hidrodeshidrogenación, hidroisomerización e hidrocrackeo para producir combustible de aviones. De esta manera, se generan hidrocarburos de cadenas que están en el rango de C8 y C16, que corresponden al combustible de aviación. El hidroprocesamiento da como resultado la formación de combustibles parafínicos limpios con alta estabilidad térmica, sin compuestos aromáticos ni sulfurados (Kandaramath et al. 2015; Gutiérrez-Antonio et al. 2017).

Azúcar (STJ, por sus siglas en inglés, sugar to jet): Consiste en la conversión biológica y catalítica de azúcares a hidrocarburos, mediante un proceso que no involucra la intermediación de un alcohol. Según los informes de la Oficina de Tecnologías de Eficiencia Energética y Energías Renovables del Departamento de energía de los Estados Unidos (DOE, por sus siglas en inglés, U.S. Department of Energy), el combustible STJ se puede procesar a través de dos vías: mejora catalítica y fermentación de azúcares (Wang & Tao 2016; Kandaramath et al. 2015).

Alcohol (ATJ, por sus siglas en inglés, alcohol-to-jet): También conocido como oligomerización de alcohol. Éste consiste en convertir alcoholes, tales como metanol, etanol, butanol y alcoholes grasos de cadena larga a combustible. El proceso incluye principalmente 4 pasos: deshidratación del alcohol, oligomerización, destilación e hidrogenación. Una desventaja sería que se requieren alcoholes de alta pureza (BYOGY Renewables 2011; Wang & Tao 2016; Kandaramath et al. 2015). Se puede usar una amplia gama de materias primas potenciales para el proceso, que incluye almidón, celulosa, azúcar y desechos. El método es muy económico ya que las materias primas no son muy costosas y el proceso no necesita grandes cantidades de energía. El azúcar y el almidón se pueden convertir en alcohol por fermentación directa, pero en el caso de la biomasa debe pretratarse para obtener azúcar, que luego se fermenta

directamente en alcohol, para después convertirse en biocombustible de avión (Kandaramath et al. 2015).

Muchas de las tecnologías de conversión de combustible bioturbosina, ya sea en investigación y desarrollo, demostración, o etapas comerciales, están descritos en la literatura, siendo la más estudiada y utilizada la vía que procede de aceites (Wang & Tao 2016), por lo que resulta tentador investigar otras rutas, como la que utiliza alcoholes.

1.2.1.2. Etanol

El etanol, conocido también como alcohol etílico, es un compuesto con fórmula química C_2H_5OH , perteneciente a la familia de los alcoholes. El etanol puede ser producido por fermentación de biomasa que contiene azúcar y almidón, siendo en este caso un producto natural (CropEngies AG 2006).

El etanol ha tomado gran importancia, esto debido a que en las últimas décadas, las regulaciones requieren el uso de mezclas etanol-gasolina o únicamente etanol como combustible en automóviles. Estas regulaciones surgen debido al agotamiento de las fuentes de energía no renovables, así como por su impacto sobre el medio ambiente y el preocupante calentamiento global y más recientemente, la volatilidad de los precios del petróleo, han provocado un aumento de la investigación sobre producción de este combustible alternativo (Mielenz 2001; Ioelovich 2015; Baeyens et al. 2015; Agarwal 2007). Sin embargo, el etanol no puede usarse directamente como combustible para aviación debido a su alta volatilidad, bajo punto de inflamación y baja densidad de energía (Kandaramath et al. 2015), por lo cual se necesita la transformación de éste a combustibles propios para aviones mediante la vía ATJ (Wang & Tao 2016).

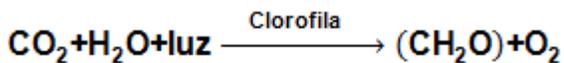
El etanol es producido principalmente en EUA y Brasil a partir de maíz y caña de azúcar, respectivamente (Gupta & Verma 2015; Manochio et al. 2017). Biomásas lignocelulósicas son también utilizadas alrededor del mundo para la producción de etanol, siendo las más utilizadas la paja de arroz y de trigo (Gupta & Verma 2015).

1.2.2. Biomasa

El término biomasa engloba la materia vegetal generada a través de fotosíntesis y sus derivados. La cantidad de biomasa que una planta produce depende principalmente de la energía solar que recibe y del total que pueda almacenar como hidratos de carbono (Rincón Martínez & Silva Lora 2014).

A través de la fotosíntesis los hidratos de carbono son producidos, a partir del dióxido de Carbono (CO₂), agua y clorofila, y están contenidos en los tejidos de las plantas, teniendo una proporción de energía solar atrapada en sus enlaces químicos (Rincón Martínez & Silva Lora 2014). Estos hidratos de carbono están constituidos de carbono, hidrógeno y oxígeno, ejemplos de ellos son la glucosa, el almidón y la celulosa (Olmo & Nave n.d.). La Ecuación 1 muestra el proceso simplificado de la producción de hidratos de carbono en la plantas a partir de la fotosíntesis (Rincón Martínez & Silva Lora 2014).

Ecuación 1



El uso de biomasa juega un papel importante en la producción de energía, por ejemplo, en EUA se tiene un aumento en la producción de energía a base de biomasa de un 57% de 2000 a 2015 (U.S. Energy Information Administration 2016). A nivel mundial se espera que de 2014 a 2050 se tenga un aumento en la producción de energía de 50 EJ a 1500 EJ, lo cual representa un aumento significativo (Rincón Martínez & Silva Lora 2014). Este aumento surge debido a los combustibles a base de biomasa, tales como el etanol, los cuales son una alternativa viable y prometedora, ya que está incluida en el ciclo del carbón, lo que implica una reducción en el dióxido de carbón (Karagözz et al. 2012). La Tabla 3 presenta, en forma general, una clasificación de los biocombustibles en función al tipo de biomasa utilizada.

Los biocombustibles de primera generación presentan ciertas complicaciones, ya que surge el debate entre que la materia prima se use para generar alimento o

combustible (Wyman 2008; Singh & Trivedi 2013; Hahn-Hägerdal et al. 2006; Rincón Martínez & Silva Lora 2014).

Tabla 3 Clasificación de Biocombustibles en función del tipo de biomasa.

Clasificación biocombustible	Materia Prima	Ejemplos de biomasa	Referencias
Primera generación	Cultivos alimenticios	Caña de azúcar, maíz	(Louime & Uckelmann 2008; Rincón Martínez & Silva Lora 2014)
Segunda generación	Residuos lignocelulósicos, cultivos energéticos, subproductos de procesamiento.	Paja de trigo, Pasto Varilla, cáscaras de arroz	(Montane et al. 1998)
Tercera generación	Organismos microscópicos	Micro algas	(Rincón Martínez & Silva Lora 2014; Hossain et al. 2015)

Dentro de la biomasa englobada en los biocombustibles de segunda generación, tenemos a los materiales lignocelulósicos, como los residuos agrícolas (rastrero de maíz, paja de trigo, paja de arroz, bagazo de caña de azúcar), residuos forestales, de jardín, cultivos energéticos (pasto de varilla, *Miscanthus*), los cuales han sido ampliamente utilizados para el proceso de producción de etanol (Díaz Velilla 2015; Hahn-Hägerdal et al. 2006; Singh & Trivedi 2013; Diaz et al. 2013; Rincón Martínez & Silva Lora 2014; Montane et al. 1998). Este grupo, al ser residuos, desechos y cultivos energéticos, no compiten con la producción de alimentos (Diaz et al. 2013; Rincón Martínez & Silva Lora 2014) y representan la reserva más abundante de carbohidratos de todo el mundo (Saha et al. 2013).

1.2.2.1. Composición del material lignocelulósico.

Los materiales lignocelulósicos están compuestos principalmente de celulosa, hemicelulosa y lignina, así como extractivos y sales en menor cantidad (Preeti et al. 2012). La celulosa y hemicelulosa, que juntas son consideradas como

holocelulosa, después de un proceso de hidrólisis liberan azúcares que pueden ser fermentables para la producción de etanol (Lee et al. 2008; Takeshi 2012).

La composición de la lignocelulosa depende de la especie de la planta, edad y condiciones de crecimiento (Rincón Martínez & Silva Lora 2014). En la Tabla 4 se presentan algunas de las principales fuentes de lignocelulosa y su composición química en términos de celulosa (compuesto de mayor proporción en todas las plantas), hemicelulosa y lignina.

Tabla 4 Biomasa lignocelulósicas y sus respectivos porcentajes de fibras.

<i>Biomasa</i>	<i>Celulosa</i> (%)	<i>Hemicelulosa</i> (%)	<i>Lignina</i> (%)	<i>Referencia</i>
Podas de <i>Jatropha curcas</i>	30.5	13.2	26.1	(Kumar et al. 2014)
Paja de trigo	34.4-38.3	24.7-30.5	9.6-18.4	(Ćilerdžić et al. 2016; Saha et al. 2015)
Paja de Arroz	35	22	12	(Srilekha Yadav et al. 2011)
Aserrín de roble	59.1	19.5	15.6	(Ćilerdžić et al. 2016)
Paja de Avena	35	28.2	4.1	(Gómez-Tovar et al. 2012)

A continuación se describe cada uno de las fibras presentes en el material lignocelulósico.

Celulosa

La celulosa es un homopolímero compuesto exclusivamente de moléculas de D-glucosa (Figura 3) que se unen mediante enlaces β -1,4-O-glucosídico que se estructuran en largas cadenas lineales (microfibrillas) unidas por puentes de hidrógeno y fuerzas de Van der Waals intramoleculares, formando una estructura cristalina resistente a la hidrólisis y regiones amorfas susceptibles a la degradación enzimática. Al hidrolizarse totalmente se obtiene glucosa. El total de unidades de glucosa en una molécula de celulosa varía de varios cientos a más de

10,000 con un peso molecular promedio de 100,000. Constituye aproximadamente el 15-30% de la masa seca de la pared celular primaria y hasta el 40% de la pared celular secundaria en las células vegetales (Rincón Martínez & Silva Lora 2014; Zabed et al. 2016).

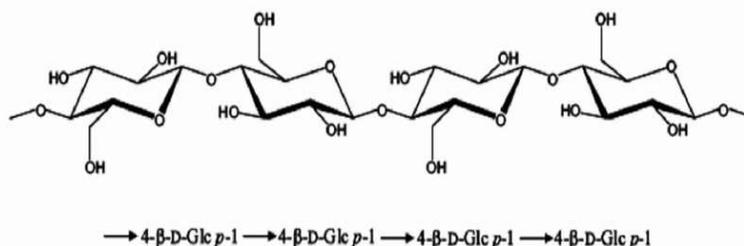


Figura 3 Estructura de la celulosa (Rincón Martínez & Silva Lora 2014).

Hemicelulosa

Es un heteropolímero que consiste en cadenas cortas, lineales y altamente ramificadas de varios monómeros. Los principales monómeros presentes en la hemicelulosa incluyen hexosas (β -D-glucosa, α -D-galactosa y β -D-manosa), pentosas (β -D-xilosa y α -L-arabinosa). Es posible encontrar en la molécula de hemicelulosa algunos ácidos de azúcares (ácidos urónicos) como el ácido α -D-glucurónico, α -D-galacturónico y α -D-4-O-metilgalacturónico, así como otros azúcares (la α -L-ramnosa y la α -L-fructosa) que se presentan en una pequeña cantidad cuando los grupos hidroxilo de los azúcares están parcialmente sustituidos con grupos acetilo. Su cadena principal está compuesta principalmente por xilano a través de enlaces β -1,4 que incluyen D-xilosa (alrededor del 90%) y L-arabinosa (aproximadamente 10%). A diferencia de la celulosa, cuya estructura es la misma en los diferentes tipos de madera y otros materiales lignocelulósicos, en las hemicelulosa existe una considerable variación entre las diferentes especies. Las hemicelulosas comúnmente conocidas son xilanos y glucomananos. Los xilanos son hemicelulosas en maderas duras, residuos forestales, residuos agrícolas y desechos municipales e industriales, mientras que la madera blanda es generalmente rica en glucomananos (Rincón Martínez & Silva Lora 2014; Zabed et al. 2016). La Figura 4 muestra una representación esquemática de algunos de los componentes de la hemicelulosa.

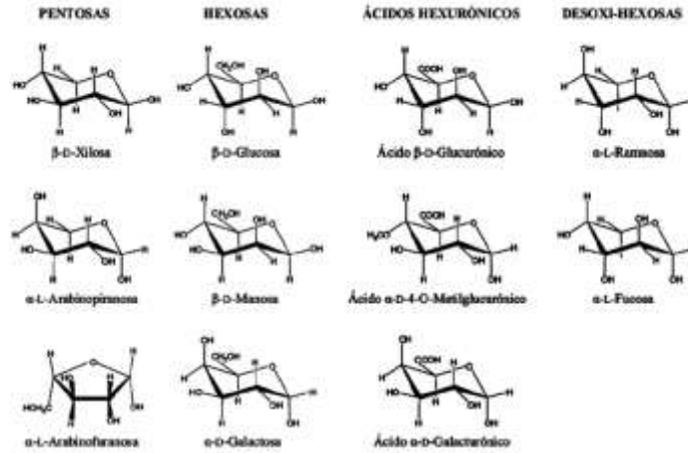


Figura 4 Monosacáridos que componen la Hemicelulosa (Rincón Martínez & Silva Lora 2014).

Lignina

La lignina es un polímero aromático altamente ramificado con una gran variedad de grupos funcionales que proporcionan centros activos para interacciones químicas y biológicas (Figura 5).

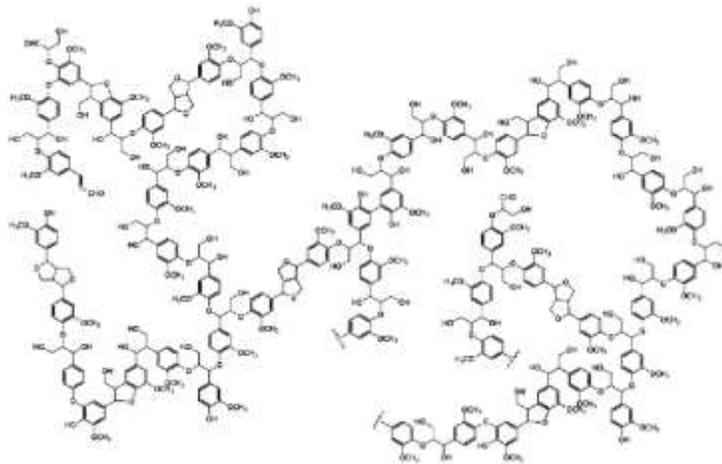


Figura 5 Modelo estructural de la lignina de madera aserrada (tomada de (Rincón Martínez & Silva Lora 2014)).

Los principales grupos funcionales en la lignina incluyen los hidróxidos fenólicos, hidróxidos alifáticos, metoxilos, carboxilos y sulfonatos (Zabed et al. 2016; Rincón Martínez & Silva Lora 2014), formando unidades estructurales que no suelen repetirse (Figura 5). Debido a esa complejidad es difícil su aislamiento, análisis y

caracterización estructural. La lignina se encuentra depositada en la pared de las células tornándolas rígidas e impermeables. La lignina protege los polisacáridos de la pared celular de la degradación microbiana, ofreciendo resistencia a la descomposición.

Los niveles de celulosa, hemicelulosa, la cristalinidad de la celulosa, el área de superficie accesible, la protección de la lignina y la composición del material determinan el rendimiento de la producción de biocombustibles (Zabed et al. 2016; Rincón Martínez & Silva Lora 2014).

1.2.3. Proceso de Producción de etanol

El uso de biomasa lignocelulósica para la producción de etanol requiere un serie de pasos, siendo las tres operaciones principales: el pretratamiento, la hidrólisis y la fermentación (Sarkar et al. 2012).

1.2.3.1. Pretratamiento

El objetivo del pretratamiento es abrir las fibras del material lignocelulósico y aumentar el área superficial de las fibras de celulosa, remover la hemicelulosa y lignina lo que permite desenrollar a la celulosa (Geddes et al. 2010; Díaz Velilla 2015; Sun & Cheng 2002). El complejo lignocelulósico se compone de una matriz de celulosa y lignina obligado por las cadenas de hemicelulosa. Entonces el pretratamiento, permite la descomposición de la matriz lignocelulósica, para reducir el grado de cristalinidad de la celulosa y aumentar la parte de la celulosa amorfa. Esta forma de la celulosa es la forma más adecuada para el ataque enzimático (Rincón Martínez & Silva Lora 2014; Sánchez & Cardona 2008). El pretratamiento es un proceso indispensable en la separación de las fibras, permitiendo la accesibilidad a la celulosa en el proceso de hidrólisis enzimática (Rincón Martínez & Silva Lora 2014; Tong et al. 2012; Lee 1997; Lee et al. 1994; Mosier et al. 2005).

Para que un proceso de pretratamiento sea eficaz, debe cumplir con los siguientes requisitos: (i) formación de azúcares directamente o posteriormente por hidrólisis,

(ii) evitar la pérdida y / o degradación de los azúcares formados, (iii) limitar la formación de los productos inhibitorios, (iv) reducir la demanda de energía y (v) reducir al mínimo los costos (Saxena et al. 2009; Lu & Mosier 2008; Menon & Rao 2012; Tong et al. 2012).

Tipos de Pretratamiento

Existen tres diferentes tipos de pretratamientos.

Físicos

Los pretratamientos físicos corresponden a la reducción de tamaño de las partículas de la biomasa, incrementando así el área superficial para el ataque enzimático y reducir la cristalinidad de la celulosa (Rincón Martínez & Silva Lora 2014; Kumar et al. 2008; Sun & Cheng 2002). Este es el primer paso para la producción de etanol a partir de residuos, e involucra procesos como la molienda, astillado, trituración o calentamiento (Rincón Martínez & Silva Lora 2014; Sun & Cheng 2002). Estos métodos mejoran la eficiencia de los siguientes procesos (Buaban et al. 2010; Sun & Cheng 2002).

Químicos

Los pretratamientos químicos utilizan ácidos, bases o agentes oxidantes para la separación de los compuestos de la biomasa (Rincón Martínez & Silva Lora 2014).

La técnica de pretratamiento alcalino es un proceso de deslignificación, en el cual una buena cantidad de hemicelulosa es solubilizada. El mecanismo de hidrólisis alcalina es la saponificación de enlaces éster intramoleculares entre la lignina y la hemicelulosa (Chang et al. 1997; Lee 1997). Por lo tanto, comúnmente para superar la barrera de la lignina, la lignocelulosa es inicialmente pretratada con el método alcalino (Lee 1997). Una eficiente deslignificación deberá remover un máximo de lignina y un mínimo de azúcares (no más que 5%) (Taherzadeh & Karimi 2007). Dentro de los compuestos utilizados para el pretratamiento alcalino tenemos al CaO y NaOH (Rincón Martínez & Silva Lora 2014).

Diversos tipos de ácidos, concentrados o diluidos, pueden ser utilizados, por ejemplo sulfuroso, sulfúrico, clorhídrico, fluorhídrico, fosfórico, nítrico y fórmico (Rincón Martínez & Silva Lora 2014; Lenihan et al. 2010). Los ácidos sulfúrico y clorhídrico son los más comunes para catalizar la hidrólisis de biomasa lignocelulósica (Lenihan et al. 2010). El paso principal del pretratamiento con ácido es la hidrólisis de la hemicelulosa, es decir, el ácido cataliza el rompimiento de las grandes cadenas de hemicelulosa, para formar oligómeros de cadenas cortas y luego monómeros de azúcar (Wyman 1999; Wyman 1996; Wyman et al. 2005).

El proceso de ácido diluido es la tecnología más antigua para convertir biomasa celulósica a etanol, que ha resultado efectivo para diferentes materiales y que tiene alto potencial para la aplicación industrial (Wyman 1999; Wyman 1996; Wyman et al. 2005; Mosier et al. 2005; Rocha et al. 2011). Esto se debe principalmente a que este método permite altas recuperaciones (80-90%) de azúcares de hemicelulosa, y por lo tanto, una alta conversión de celulosa después en la hidrólisis enzimática (Yang & Wyman 2008). Se considera hidrólisis ácida diluida cuando se trabaja a concentraciones en un rango entre 2-5% y un rango de temperatura de 120-160 °C (Rincón Martínez & Silva Lora 2014). En este tipo de hidrólisis la fracción de hemicelulosa es despolimerizada a más baja temperatura que la fracción de celulosa. Por lo tanto, después de aplicar hidrólisis con ácido diluido será necesaria una hidrólisis enzimática (Palmqvist & Hahn-Hägerdal 2000a).

El proceso de hidrólisis utilizando ácido concentrado es realizado en condiciones de baja temperatura con concentraciones de ácido superiores a 30%. La operación de este método requiere un proceso de secado previo del sustrato hasta la obtención de humedad debajo de 10% para evitar la dilución del ácido durante la hidrólisis. Esta hidrólisis exige la recuperación del ácido altamente corrosivo y la neutralización posterior del material hidrolizado (Rincón Martínez & Silva Lora 2014).

Otro pretratamiento químico es mediante el uso de un agente oxidante, el cual se conoce como deslignificación oxidativa, usando H_2O_2 , junto con enzimas peroxidasa que permiten la degradación de la lignina (Azzam 1989).

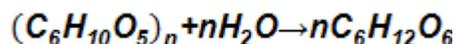
Biológicos

Este tipo de pretratamientos introducen la acción de microorganismos para la descomposición de la biomasa (Rincón Martínez & Silva Lora 2014). Entre los microorganismos utilizados, para la degradación del complejo lignocelulósico y liberar celulosa, están los hongos de putrefacción café, blanca y suave (Sarkar et al. 2012). El hongo de putrefacción blanca resulta ser el más efectivo para la degradación de lignina (Prasad et al. 2007).

1.2.3.2. Hidrólisis Enzimática

En esta etapa la biomasa celulósica es convertida a azúcares reductores fermentables (Rincón Martínez & Silva Lora 2014; Taherzadeh et al. 1997; McMillan 1994). Esta etapa es el paso más crítico de la producción de etanol, y se lleva a cabo principalmente por enzimas degradadoras de celulosa, que se produce naturalmente en microorganismos celololíticos, dentro de los que se encuentran: *p.Clostridium*, *Cellulomonas*, *Thermonospora*, *Bacillus*, *Bacteriodes*, *Ruminococcus*, *Erwinia*, *Acetovibrio*, *Microbispora*, *Streptomyces* y otros hongos como *Trichoderma*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Phanerochaete*, *Humicola*, *Schizophillum sp.* Estas enzimas tienen la capacidad de convertir la celulosa en glucosa o monómero de galactosa (Sarkar et al. 2012; Gupta & Verma 2015). La Ecuación 2 muestra el proceso de hidrólisis para la glucosa.

Ecuación 2



La hidrólisis enzimática del material celulósico involucra la acción sinérgica de por lo menos tres enzimas diferentes llamadas de modo genérico celulasas: (1) endoglucanasa (EG, endo-1,4-D-glucanohidrolasa, o EC 3.2.1.4) es la encargada de atacar las regiones de baja cristalinidad de la fibra de celulosa, creando extremos de cadena libres; (2) exoglucanasa o celobiohidrolasa (CBH, 1,4-β-D-

glucano celobiohidrolasa, o EC 3.2.1.91) que degrada la molécula aún más extrayendo unidades de celobiosa de los extremos libres de cadena; (3) β -glucosidasa (EC 3.2.1.21) que hidroliza celobiosa para producir glucosa (Rincón Martínez & Silva Lora 2014; Coughlan & Ljungdahl 1988).

Entre los principales factores que afectan la hidrólisis enzimática se tiene:

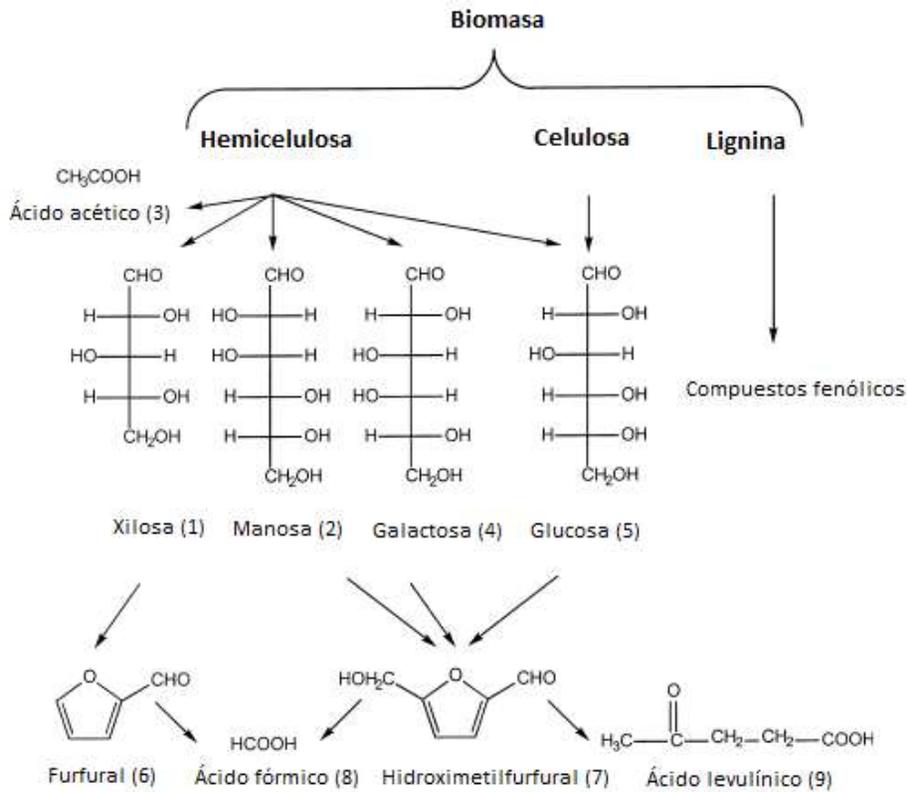
- Concentración y calidad del sustrato.
- Pre-tratamientos aplicados.
- Actividad de la celulasa (que también depende de su origen).
- Temperatura, pH, agitación, tiempo, etc.

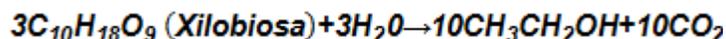
El 90% de las enzimas son producidas hoy en día por recombinación (modificación genética) buscando la maximización de la pureza de los productos y la disminución de los costos de producción (Rincón Martínez & Silva Lora 2014).

Inhibidores formados

Los procesos de hidrólisis que están involucrados en el tratamiento de los compuestos lignocelulósicos conducen a la formación y liberación de una gama de compuestos (Rincón Martínez & Silva Lora 2014; Taherzadeh et al. 1997; Palmqvist & Hahn-Hägerdal 2000b). En la Figura 6 es posible observar las principales vías de formación de estos compuestos, siendo algunos de ellos considerados inhibitorios para los microorganismos que llevan a cabo la fermentación (Palmqvist & Hahn-Hägerdal 2000b).

Es importante tratar con estos inhibidores cuando se encuentran en una concentración que pudiera afectar el proceso de fermentación. Yadav (2011) encontró que cuando el hidrolizado ácido se trata con óxido de calcio y carbón activado provoca una reducción de 88.4% de furanos y 84.6% de fenólicos totales (Srilekha Yadav et al. 2011).





En estas ecuaciones es posible observar que teóricamente se obtienen 2 moles de etanol por mol de glucosa, 1.66 moles de etanol por mol de xilosa, 4 por mol de celobiosa y 3.33 por mol de xilobiosa, rendimiento obtenido sin considerar la formación de biomasa. Sin embargo, no todas las levaduras son capaces de convertir todos los componentes de las ecuaciones 3-6 en etanol (Rittmann & McCarty 1996; Rincón Martínez & Silva Lora 2014; Tran et al. 2013).

Este proceso se puede realizar, en lote o de manera continua, esto dependerá de la propiedades cinéticas de los microorganismos, del tipo de hidrolizado lignocelulósico y costes de producción (Rincón Martínez & Silva Lora 2014).

1.2.4. Tipos de biomasa

Varios residuos están disponibles como materias primas lignocelulósicas de bajo costo para la conversión a biocombustibles. Dentro de estos residuos se encuentra las podas de *Jatropha* y la paja de trigo, las cuales tienen potencial para ser utilizadas en la producción de etanol de segunda generación.

1.2.4.1. Podas de *Jatropha*

La *Jatropha* es un arbusto nativo de México y Centro América, especialmente en zonas tropicales, pertenece a la familia Euphorbiaceae y cuenta con 175 especies. La planta de *Jatropha* es un cultivo importante debido a su alto contenido de aceite, un crecimiento rápido, fácil propagación, tolerancia a la sequía, capacidad de crecer y recuperar diferentes tipos de terreno, necesidad de menos riego e insumos agrícolas, resistencia a plagas, períodos de gestación cortos y rasgos adecuados para facilitar la cosecha (Nunes et al. 2014; Kumar et al. 2014; Heller 1996; Edrisi et al. 2015; Brittain 2010).

La planta *Jatropha* tiene muchos usos, principalmente el aceite de *Jatropha* es una excelente fuente de energía renovable para producir biodiesel y combustible para aviones (Wang & Tao 2016; Topare et al. 2011). El aceite es también usado como

lubricante, así como en la fabricación de suaves y durables jabones (Rivera Lorca & Vera 1997; Pratt et al. 2002). Durante el acondicionamiento para la extracción del aceite de *Jatropha* se generan una cáscara residual que representa de un 35 a 40% del peso (en seco) de la fruta recién cosechada (Singh et al. 2008). Se han propuesto diversos usos para esta cáscara, por ejemplo en aplicaciones energéticas debido a su alto poder calorífico que va de 16 a 17 MJ/kg (Kratzein & Müller 2009).

Existen otras fracciones de la planta que quedan sin uso después de usar las semillas de la *Jatropha* y que pueden tener un valor agregado, tales como las podas. Esta parte de la planta puede ser utilizada como combustible, ya sea como leña (tal como los usan en zonas rurales) (Moniruzzaman et al. 2016) o para la obtención de azúcares fermentables para la producción de etanol (Kumar et al. 2014). Kumar (2014) reportó el uso de podas de *Jatropha* en la India, para producir dichos azúcares. En ese artículo mencionan que es necesario realizar la poda una vez al año para un mejor crecimiento de la planta, generando de 4-6 kg de tallo secundario al momento de realizar la poda en una planta de dos años de edad. Teniendo en cuenta las hectáreas cultivadas de *Jatropha* en la India y el número de plantas por hectárea, da como resultado 4×10^6 toneladas de podas por año en ese país (Kumar et al. 2014; Planning Commission 2003; Axelsson et al. 2012). Los tallos secundarios obtenidos de las podas están cubiertos por corteza, la cual está compuesta principalmente de lignina (Valdes & Pacheco 1998), que sin lugar a dudas actúa como una barrera para la degradación de la holocelulosa, disminuyendo así, la obtención de azúcares (Arantes & Saddler 2010).

En México, según datos del Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP), en 2016, se tenía una superficie sembrada de *Jatropha* de 1,428.14 ha, principalmente en los estados de Puebla, Veracruz y Chiapas (SIAP. 2016), dándonos como resultado 14.28×10^3 ton de podas, lo cual es una cantidad considerable y que continúa en aumento a causa de programas incentivos para el cultivo de materias primas para la producción de biocombustibles en México.

1.2.4.2. Paja de Trigo

La paja de trigo es un residuo formado de la producción de trigo (Guerra-Rodríguez et al. 2012). La cantidad de paja generada depende trigo producido, el cual resulta ser elevado, ya que es el grano más cultivado en el mundo (FAO 2012). En 2016, el área sembrada de trigo en México ascendió a 729,121.23 ha, generando aproximadamente 3,862 miles de toneladas de trigo grano (SIAP. 2016). Este cultivo está presente en más de 20 estados de la república, siendo el principal productor Sonora, el cual es líder en volumen y valor de grano, aportando un 43% de la producción nacional (SIAP 2017), tal como se observa en la Figura 7. El rendimiento promedio de la paja de trigo varía 1.3 a 1.4 kg por kg de trigo (Montane et al. 1998), lo cual nos da una cantidad promedio de 5,214 miles de toneladas de paja de trigo en México en el año 2016.



Figura 7 Estados de la República Mexicana donde se siembra trigo grano. Valores numéricos en el mapa representan el % del valor de producción por entidad. (mapa tomado de Atlas Agroalimentario (SIAP 2017)).

Después de las actividades de aprovechamiento, el 85% de paja de trigo generada en algunas zonas de México está siendo quemada in situ causando graves

problemas de contaminación (Quintero Núñez & Moncada Aguilar 2008), por tanto, resulta necesario evaluar otros usos potenciales para este residuo. Dentro de estos usos destaca la producción de biocombustibles (Saha et al. 2015; Saini et al. 2016; Guerra-Rodríguez et al. 2012; Saha et al. 2005) debido al alto contenido de celulosa y hemicelulosa, el cual varía entre 34.4-57.09% y 16.81-30.5% respectivamente. Estos valores depende del tipo de trigo del que proceda la paja, de la región, así como de las condiciones de cultivo (Montero et al. 2016; Saha et al. 2015; Čilerdžić et al. 2016). En función a la cantidad generada de trigo y a las cualidades en cuanto a celulosa y hemicelulosa, resulta atractivo usar la paja de trigo para producir etanol.

1.2.5. Limitaciones de la hidrólisis enzimática

La producción de etanol ha sido practicada por siglos, a partir de diversos tipos de biomásas, siendo los materiales lignocelulósicos (Rocha et al. 2011; García et al. 2014; Caspeta et al. 2014) los más estudiados actualmente debido a que no compiten con la seguridad alimentaria (Díaz et al. 2013; Rincón Martínez & Silva Lora 2014). Sin embargo, la clave para hacer más competitivo este biocombustible respecto a los combustibles fósiles, está en el pretratamiento y en la hidrólisis enzimática, los cuales permiten transformar los polímeros de carbohidratos en monómeros de azúcares que puedan ser utilizados por las levaduras para llevar a cabo la fermentación (Tahezadeh et al. 1997; McMillan 1994; Sun & Cheng 2002; Nguyen & Saddler 1991). La hidrólisis enzimática se lleva a cabo en función de diversos factores (enzima, cantidad de sustrato, temperatura, pH y tiempo de contacto), los cuales tienden a cambiar en función al tipo de biomasa y de enzima, por ejemplo los tallos de alcachofa de Jerusalén requiere una temperatura de 50°C (Li et al. 2016), mientras que la paja de avena se hidroliza a una temperatura menor de 45°C (Gómez-Tovar et al. 2012).

Para poder encontrar las condiciones que favorezcan la hidrólisis enzimática, cuando se trabaja con sustratos como las podas de *Jatropha* y la paja de trigo, es necesario hacer uso de un diseño estadístico de experimentos, el cual permite plantear experimentos para evaluar el efecto que tienen los factores sobre la

variable de respuesta (azúcares reductores, por ejemplo), de forma tal que se recaben datos adecuados para que sean analizados por métodos estadísticos y poder así tener conclusiones válidas y objetivas (Montgomery 2014). Para llevar a cabo estos diseños es necesario seguir una serie de pasos, tal como se ilustra en la Tabla 5:

Tabla 5 Pautas generales para diseñar un experimento tomado de: (Montgomery 2014).

-
- 1 Identificación del problema.
 - 2 Selección de factores, niveles y rangos.
 - 3 Selección de la variable de respuesta.
 - 4 Determinación del diseño experimental a realizar.
 - 5 Realización del experimento.
 - 6 Análisis estadístico.
 - 7 Conclusiones y recomendaciones.
-

Los pasos 1-3 se determinan en función al conocimiento previo del problema a tratar. Los pasos 5-7 se basan en la selección de diseño experimental, por tanto nos enfocaremos en explicar de manera más amplia el paso 4 (Montgomery 2014).

La selección del diseño experimental a utilizar es una labor fácil si los pasos previos fueron desarrollados de manera eficiente. Diversos tipos de diseños experimentales pueden ser utilizados, dentro de los que se encuentran el diseño Plackett Burman y el diseño Central Compuesto.

1.2.5.1. Plackett Burman (PB)

Es un diseño experimental fraccionado de dos niveles 2K, es decir utiliza únicamente dos niveles de prueba, los cuales pueden ser cualitativos y cuantitativos; son de gran utilidad en etapas iniciales del trabajo de experimental, cuando se están utilizando muchos factores, ya que permite realizar menos

corridas de experimentos. Por tal motivo, estos diseños son muy utilizados para propósitos de exploración (Camara et al. 2016; Montgomery 2014).

Este tipo de diseño de experimentos permite seleccionar los factores con la más alta significancia, ignorando las interacciones entre variables (PLACKETT & BURMAN 1946) y presenta algunas ventajas (Camara et al. 2016):

- El diseño mínimo permite estudiar hasta 11 factores con 12 experimentos.
- Permite estudiar muchos factores al mismo tiempo.
- Usado en casos particulares donde el ensayo es demasiado costoso.

El diseño PB ha sido empleado para obtener altas concentraciones de metabolitos valiosos en algas marinas, donde se examinaron 7 factores (El-sheekh et al. 2016). Su uso también ha sido aplicado en el campo de la medicina, en la preparación de nano partículas de glibenclamida para mejorar la disolución de las mismas, analizando 5 factores (Shah et al. 2013).

1.2.5.2. Diseño Central compuesto (DCC)

Una vez encontrados los factores significativos del PB, el siguiente paso consiste en la aplicación de un segundo diseño, cuyo objetivo es la realización de experimentos de manera más robusta que permitan obtener una estimación más precisa de las condiciones óptimas del proceso a evaluar. A esta pauta para la optimización se le conoce como metodología de superficie de respuesta, la cual comúnmente se apoya en un diseño central compuesto (Montgomery 2014).

El DCC es utilizado para construir modelos de superficie de respuesta de segundo orden, utilizando al menos 3 niveles para cada factor lo cual permite obtener la curvatura (STATGRAPHICS 2006). Los diseños centrales compuestos son diseños de tratamientos con $2k$ combinaciones adicionales llamadas puntos axiales y n_c puntos centrales (María & Jiménez 2015).

Experimentos de diversas áreas han empleado el DCC, por ejemplo para la optimización de las condiciones de operación para la generación de electricidad en

una celda de combustible microbiana (Alshehria et al. 2016); para la optimización de los parámetros de procesamiento para la producción de nano partículas de lípidos sólidos cargadas con extracto de *Ficus religiosa* L (Priyanka et al. 2017) o para maximizar la producción de enzimas lignocelulósicas en fermentación en medio sólido (Peña-Maravilla et al. 2017).

1.2.6. Extracción de etanol por Vacío en un reactor Continuo de tanque agitado (CSTR)

A lo largo del proceso de fermentación alcohólica se presentan diversos problemas que disminuyen la eficiencia del proceso, dentro de los que se encuentra la alta concentración de etanol, la cual afecta la actividad de la levadura de fermentación, presentándose inhibición por producto (Roychouldhury et al. 1980; Apar & Özbek 2004; Wyman et al. 1992; Vane 2005; Wei et al. 2014; He et al. 2012). Esta inhibición se detecta cuando la concentración de etanol en el caldo de fermentación alcanza un 15% en volumen (Cysewski & Wilke 1977) lo que provoca una declinación de la velocidad de crecimiento específica, mermando el rendimiento de etanol y la eficiencia de fermentación (Wang et al. 1999; Cysewski & Wilke 1977; Honorato da Silva et al. 1999).

La inhibición por producto se disminuye al remover el etanol en de la fase líquida del reactor tan pronto como se ha formado (Finn & Ramalingam 1977; Cysewski & Wilke 1977; Bai et al. 2008; Nguyen et al. 2009; Cardona 2007). Un avance significativo en el desarrollo de técnicas de eliminación in situ de alcoholes se ha hecho durante las últimas décadas. Estas técnicas incluyen sistemas con y sin membranas, tales como pervaporación (Groot et al. 1984; Qureshi & Blaschek 2000; Bengston et al. 1991; Friedl et al. 1991; Groot & Luyben 1987; Orozco-gonzález et al. 2016), ósmosis inversa (Garcia et al. 1986), adsorción (Ennis et al. 1987; Nielson et al. 1988; Groot & Luyben 1986; Abdehagh et al. 2013), extracción líquido-líquido (Evans & Wang 1988; Eckert & Schugerl 1987), arrastre por gas (Taylor et al. 1997; Taylor et al. 2010) y extracción por vacío (Nguyen et al. 2009; Shihadeh et al. 2014; Mariano et al. 2012). Todas estas técnicas tienen ventajas y desventajas (Mariano et al. 2011). Por ejemplo, la técnica de pervaporación (un

proceso basado en la membranas) resulta ser muy competitiva debido a su simplicidad, alta selectividad y ausencia de aditivos adicionales (por ejemplo, agentes de arrastre) (Apar & Özbek 2004; Wyman et al. 1992; Vane 2005; Wei et al. 2014; He et al. 2012; Calibo et al. 1987; Matsumura & Markl 1986); sin embargo, las membranas representan costos elevados, por lo que resulta ser poco interesante. Un caso similar ocurre con la extracción líquido-líquido, ya que está restringida por el manejo de solventes, que hacen su operación difícil (Slapack et al. 1987).

La extracción por vacío es una de las tecnologías de eliminación de etanol in situ, que puede frenar la acumulación de etanol y por lo tanto evitar la inhibición (Finn & Ramalingam 1977; Cysewski & Wilke 1977). Esta técnica fue inicialmente utilizada por Cysewski y Wilke, y hasta la fecha ha sido ampliamente utilizada (Lee et al. 1981; Ghose et al. 1984; Nguyen et al. 2009; Nguyen et al. 2011; Huang et al. 2015; Sharif Rohani et al. 2015). Se basa en mantener al reactor en condiciones de vacío, lo que permite eliminar el etanol durante la fermentación. El vacío provoca que la temperatura de ebullición de la mezcla etanol-agua decrezca (78.3-100°C a presión atmosférica) y pueda pasar a fase vapor a la temperatura de fermentación para ser recuperado por condensación (Shihadeh et al. 2013; Mariano et al. 2011; Ghose et al. 1984; Le et al. 1981; Ishida & Shimizu 1996).

La producción de combustibles de segunda generación puede ser afectada por factores como tipo de reactor (Paulova et al. 2015). Diversos reactores han sido utilizados para la producción de etanol, tales como reactores de lecho (Park et al. 1991) y el CSTR (Continuous Stirred Tank Reactor), siendo este último el más utilizado para la conversión de diversos sustratos como desechos de comida (Huang et al. 2015), maíz con alto contenido de sólidos (Shihadeh et al. 2014), paja de arroz pretratada (Ghose et al. 1984) y glucosa (Lee et al. 1981; Nguyen et al. 2009; Nguyen et al. 2011). Por tanto, la evaluación del comportamiento de la técnica de extracción por vacío durante la fermentación de hidrolizados de paja de trigo y podas de *Jatropha* puede ser aplicada en un CSTR, usando *Kluyveromyces marxianus* SLP1 como levadura.

1.3. Justificación

Diversos tipos de materias primas han sido utilizados para la elaboración de biocombustibles a nivel global. No obstante resulta importante indagar en otro tipo de biomásas que puedan ser aplicables para la producción de etanol en el caso específico de México; por ejemplo, las podas de *Jatropha* y la paja de trigo, ya que ambos residuos al ser de naturaleza lignocelulósica son buenos candidatos para dicho fin.

Las podas de *Jatropha* son, principalmente, tallos secundarios cubiertos con corteza. La corteza contiene en mayor cantidad lignina, la cual actúa como una barrera para la degradación de la holocelulosa, por lo tanto es importante estudiar la influencia que tiene la corteza sobre la producción de azúcares, y cuyo estudio no ha sido realizado.

Varios factores, tales como sustrato, enzima, pH, temperatura y tiempo de reacción, determinan la eficiencia de la hidrólisis enzimática, por lo que la optimización de dichos factores puede ser realizada en sustratos de paja de trigo y podas de *Jatropha*.

La técnica de extracción por vacío ha sido estudiada en las últimas décadas para soluciones modelo (compuestos de glucosa) y sustratos de primera generación; sin embargo, no se ha reportado la aplicación de esta técnica en hidrolizados de materiales lignocelulósicos en los cuales se pudiera evitar la inhibición por producto, por tanto en este trabajo se pretende evaluar su efecto.

1.4. Hipótesis

Se tendrán una mayor producción de azúcares para las podas de *Jatropha* sin corteza que para las podas con corteza, ya que al eliminar la corteza se disminuye la barrera para la degradación de la holocelulosa.

El uso de diseños estadísticos de experimentos en la optimización de la hidrólisis enzimática permitirá obtener altos rendimientos en la producción de azúcares reductores.

La aplicación de vacío en un reactor CSTR, durante el proceso de fermentación alcohólica de los hidrolizados (de podas de Jatropha y de paja de trigo), ayudará a aumentar la productividad de etanol, ya que se evitará la inhibición por producto.

1.5. Objetivos

1.5.1. General

Evaluar y comparar la producción de etanol, a partir de hidrolizados de paja de trigo y podas de Jatropha, asistida por extracción por vacío.

1.5.2. Particulares

Identificar y seleccionar el residuo (podas de Jatropha con o sin corteza) que genera una mayor producción de azúcares reductores.

Encontrar las condiciones que favorecen la hidrólisis enzimática de la paja de trigo y de las podas de Jatropha (seleccionado), mediante el uso del diseño Plackett Burman y del Diseño Central Compuesto.

Analizar el impacto que tiene la aplicación de vacío sobre la productividad de etanol, en el proceso de fermentación alcohólica en un reactor CSTR.

1.6. Diagrama experimental

La estrategia para la realización de este proyecto, se llevó a cabo tal como se ilustra en la Figura 8, donde se observan tres etapas principales.

La primer etapa corresponde al capítulo 2 de esta tesis y consistió en caracterizar las biomásas lignocelulósicas (paja de trigo y podas de Jatropha con y sin corteza) mediante análisis de fibras, índice de cristalinidad, distribución de tamaño y cenizas. Así mismo, se estudió el pretratamiento ácido efectuado sobre las biomásas. En esta etapa se seleccionó un tipo de podas en función al impacto que tiene el eliminar la corteza de las mismas, mediante un análisis de la cantidad de azúcares liberados durante la hidrólisis. Las podas seleccionadas, junto con la paja de trigo, se utilizaron en las siguientes etapas.

En la segunda etapa se realizó una optimización de la hidrólisis enzimática aplicando inicialmente un diseño experimental Plackett Burman, seguido de un Diseño Central Compuesto y finalmente una cinética de producción. Adicionalmente, en esta etapa se probaron los hidrolizados obtenidos bajo condiciones óptimas en un proceso de la fermentación alcohólica (en botella) usando la levadura *Kluyveromyces marxianus* SLP1. Esta etapa se encuentra detallada en el capítulo 3.

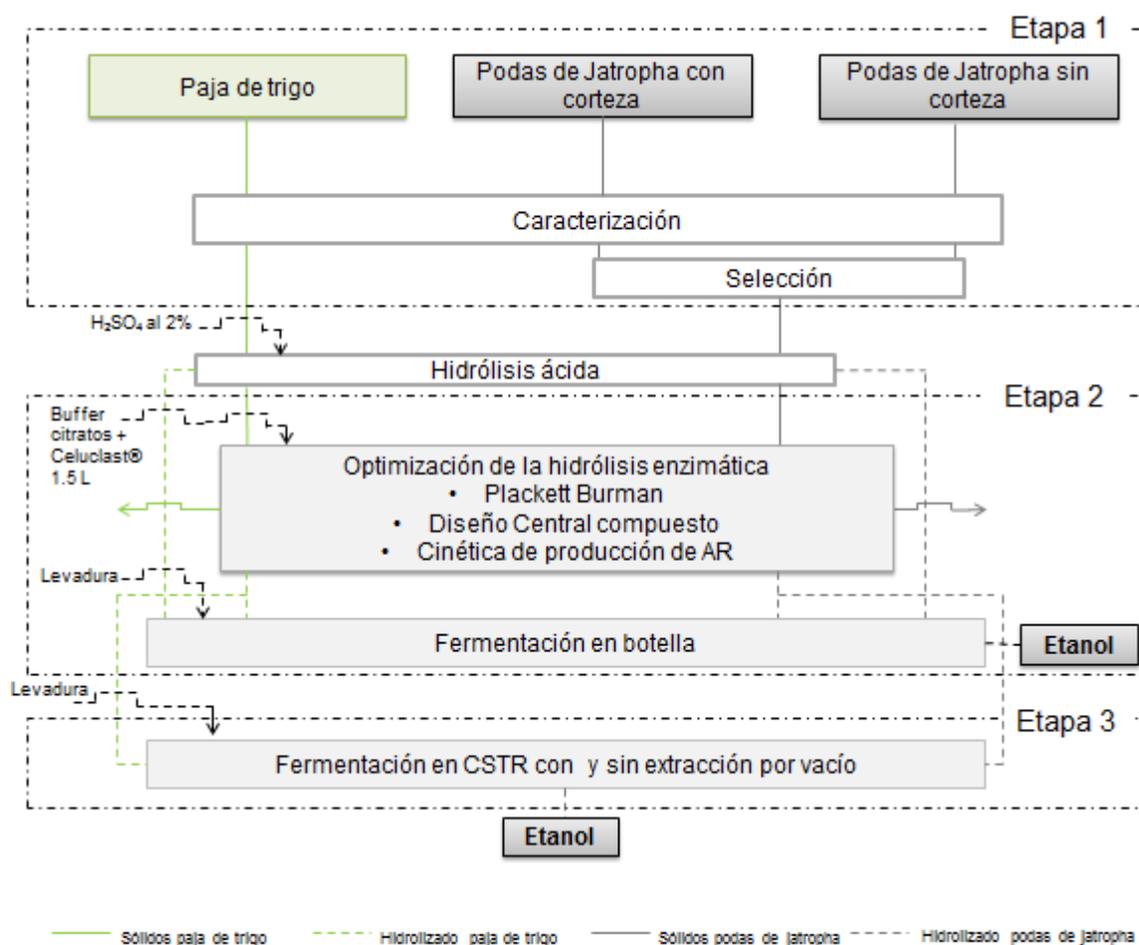


Figura 8 Diseño Experimental

Por último, se determinó el efecto que tiene la presión de vacío sobre el proceso de fermentación, por tal motivo se sometió a los hidrolizados a una fermentación en un reactor CSTR (Capítulo 4).

Cabe señalar que cada una de las etapas se probó para las biomásas de manera separada.

Capítulo 2 Pretratamiento ácido y Selección de podas de Jatropha

2.1. Resumen

Las actividades contempladas en este capítulo permitieron conocer las características principales de las biomásas, con el objetivo de entender el pretratamiento ácido, principalmente. Como se mencionó anteriormente, se utilizaron como biomásas, la paja de trigo y las podas de Jatropha con y sin corteza.

Finalmente, se comparó la cantidad de azúcares liberados por las podas de Jatropha con y sin corteza, con el objetivo de seleccionar aquella de estas biomásas que diera un mayor rendimiento para ser utilizada en los próximos capítulos.

2.2. Materiales y métodos

2.2.1. Biomásas.

La paja de trigo se obtuvo como residuo del trigo cultivado en el Valle de Yaqui por el Instituto Tecnológico de Sonora (ITSON).

Las podas de Jatropha (Especie *J. curcas*) fueron obtenidas de un campo experimental del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD) ubicado en Culiacán Sinaloa, recolectando tallos secundarios principalmente. Parte de la Jatropha se sometió a un proceso de descortezado manual (Podas de Jatropha sin corteza) y otra parte se dejó tal como se recibió (Podas de Jatropha).

Las tres biomásas se trituraron en una ensiladora-trituradora marca Azteca, a través de una malla de 3/8".

2.2.2. Caracterización

Análisis del tamaño de partícula

Se colocaron 40-50 g de paja de trigo y 90-100 g de podas de Jatropha con y sin corteza (de manera separada) en un sistema de tamizado que consiste en 6 mallas (No. 6, No. 8, No. 12, No. 18, No. 35 y No. 60) ordenadas de apertura

mayor a menor. El tiempo de agitación fue de 5 minutos para cada muestra, realizando la prueba de manera manual y por duplicado. Al término de la agitación se procedió a pesar la cantidad de biomasa retenida en cada malla (Gee & Or 2002; Yan & Barbosa-Canovas 1997).

Análisis de Fibras

Se llevó a cabo según lo establecido en el protocolo de ANKOM technology, el cual está basado en el método Van Soest (Keys et al. 1969). Para tales determinaciones, se colocaron 500±50 mg de cada una de las biomásas en bolsas filtro previamente etiquetadas con un marcador resistente a solventes. Las bolsas con la muestra dentro fueron selladas mediante un sellador de calor y sometidas a diversas soluciones (Anexo B) para determinar de manera secuencial la fibra detergente Neutral (hemicelulosa, lignina, celulosa), fibra detergente ácida (Celulosa y lignina) y lignina detergente ácida. Después de cada determinación se procedió a enjuagar las bolsas hasta dejar un pH neutro. Las pruebas se realizaron por triplicado para la paja de trigo y por quintuplicado para las podas de *Jatropha* (Keys et al. 1969).

Índice de Cristalinidad (IC)

Las muestras fueron analizadas en el Difractómetro de Rayos-X (XRD) SmartLab RIGAKU con radiación monocromática Cu K α ($\lambda=1.541 \text{ \AA}$), voltaje de 40 keV y corriente de 44 mA. Se examinó cada una de las muestras en un intervalo de 5-70 ° en 2θ , calculando el IC a partir de la Ecuación 7 (Phillips 2008).

Ecuación 7

$$IC = \frac{Cr}{Cr+Ca} \times 100$$

Donde: Cr corresponde al área total de la fracción cristalina, mientras que Ca es el área total de la fracción amorfa.

Se utilizó un estándar de celulosa microcristalina (Avicel PH-101) para encontrar los picos cristalinos, los cuales están reportados en la literatura a valores de 15°, 16.5°, 22.8° y 34.6°.

Cenizas

El porcentaje de cenizas presentes en los materiales lignocelulósicos se obtuvo en función a Standard Methods ((APHA) 1998). De 2.5 ± 0.05 g de muestra fueron puestos en crisoles (peso constante y previamente etiquetados). Los crisoles con muestra se colocaron a 550°C por 4 horas en una mufla Cole-parmer (CBFL516), con el objetivo de obtener el contenido de cenizas, según la Ecuación 8:

Ecuación 8

$$\% \text{ Cenizas (sólidos fijos)} = \frac{(M-C)*100}{X}$$

Donde: M=Peso del crisol con muestra después de la calcinación, C= Peso del crisol y X= peso de la muestra.

2.2.3. Selección de biomosas.

2.2.3.1. Hidrólisis Ácida

Cada biomasa, previamente triturada, fue sometida a un proceso de hidrólisis ácida, utilizando ácido sulfúrico. Para tal determinación se empleó el protocolo utilizado por el Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco (CIATEJ), usando una relación 1:8 sólido:líquido, de biomasa respecto a ácido sulfúrico al 2%. Esta mezcla se colocó en la autoclave a 121°C por 15 min. Al término, se analizó la fracción sólida determinando la cantidad de fibras y la parte líquida mediante azúcares reductores e inhibidores.

2.2.3.2. Hidrólisis Enzimática

La fibra sólida obtenida de la hidrólisis ácida fue usada para llevar a cabo la hidrólisis enzimática. Se usó una relación 1:10 de sólido lavado:líquido, empleando buffer de acetatos con una concentración de 50 mM y pH de 5.5. Finalmente se agregó 3.5% g proteína de enzima Celluclast® 1.5 L respecto a mL de buffer. Los experimentos se realizaron por duplicado para cada biomasa, colocados en la incubadora orbital (INO 650V-7) a 50°C con una agitación de 220 rpm, tomando muestras intermedias.

2.2.4. Determinaciones analíticas y cálculos

Para las determinaciones gravimétricas de análisis de fibras se utilizó una balanza Ohaus Discovery. La cantidad de azúcares reductores (AR) liberados del pretratamiento ácido y de la hidrólisis enzimática, fueron determinados por el método del ácido 3,5-dinitrosalicílico (Miller 1959). El rendimiento de azúcares se calculó como los gramos de azúcares entre los gramos de biomasa cruda. El rendimiento teórico de azúcares se calculó en base a la cantidad de hemicelulosa y celulosa multiplicada por 1.111 (Saini et al. 2016). La eficiencia de sacarificación fue determinada dividiendo el rendimiento obtenido experimentalmente entre el rendimiento teórico y expresándolo en porcentaje.

La determinación de inhibidores, tales como furanos (5-hidroximetilfurfural y furfural), así como aldehídos fenólicos (vainillina y siringaldehído) se llevó a cabo en HPLC (1200 series, Agilent Technologies) utilizando una columna Synergi 4u Hydro-RP 80 A (4.6 x 250 mm), empleando como fase móvil agua/acetonitrilo (92/8%) a un flujo de 0.8 mL/min , pH de muestra 4.4 (Arreola-Vargas et al. 2013).

La cantidad de biomasa usada en cada tratamiento y en los cálculos fue en base a peso seco. La determinación de sólidos totales se realizó en un termobalanza Ohaus MB45-2A0 colocando de 3 a 5 g de muestra.

La determinación de proteína de la enzima Celluclast® 1.5 L se llevó a cabo según el método de Bradford (Bradford 1976).

2.2.5. Análisis estadístico

Se realizó una prueba de ANOVA (Análisis de varianza) para determinar si existen diferencias entre la eficiencia de sacarificación al final de la hidrólisis ácida y enzimática para las podas de *Jatropha* (con y sin corteza), así como una prueba de Duncan para encontrar cual era el mejor.

2.3. Resultados y discusión

2.3.1. Caracterización

Tamaño de partícula

Como se mencionó en la sección de metodología, se usó el método de tamizado para determinar la distribución de tamaño que se obtiene después del proceso de trituración. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 9, donde se observa una distribución similar a una campana para la paja de trigo, lo que nos indica que se tiene mayor cantidad de partículas de tamaño intermedio. Para las podas de *Jatropha* (con y sin corteza) se tiene una distribución decreciente, por lo tanto, se tienen principalmente partículas mayores a 1.68 mm.

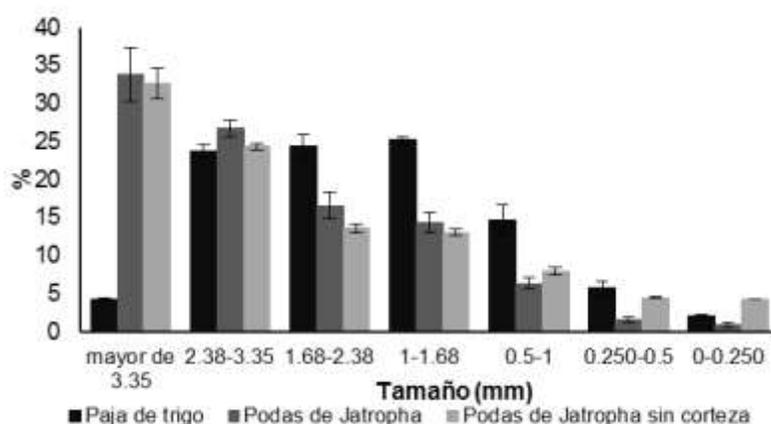


Figura 9 Distribución de tamaño de partícula después del proceso de trituración

La técnica de tamizado presenta ciertas desventajas, ya que el paso de una partícula por el tamiz depende de la orientación de ésta y del tiempo de agitación (Gee & Or 2002). Esta desventaja debería ser más notoria en el caso de la paja de trigo, ya que se trata de material en forma de tubos; sin embargo, no se ve una desviación alta entre los resultados obtenidos. A pesar de esta limitante, este método permite darnos una aproximación del tamaño de partícula que se usó en los experimentos realizados en esta tesis, además de que se trata de un técnica simple, transportable, económica y ampliamente utilizada (The International Volcanic Health Hazard Network 2017).

Análisis de fibras

Los resultados de la caracterización de fibras arrojan que la paja de trigo tiene el mayor contenido de holocelulosa (celulosa + hemicelulosa) de $62.47\pm 0.56\%$, seguida de las podas de *Jatropha* sin corteza con un valor de $60.53\pm 0.68\%$ y finalmente tenemos las podas de *Jatropha* con corteza ($52.98\pm 0.63\%$). En la Figura 10 se pueden observar los porcentajes de fibras que presenta cada una de las biomásas.

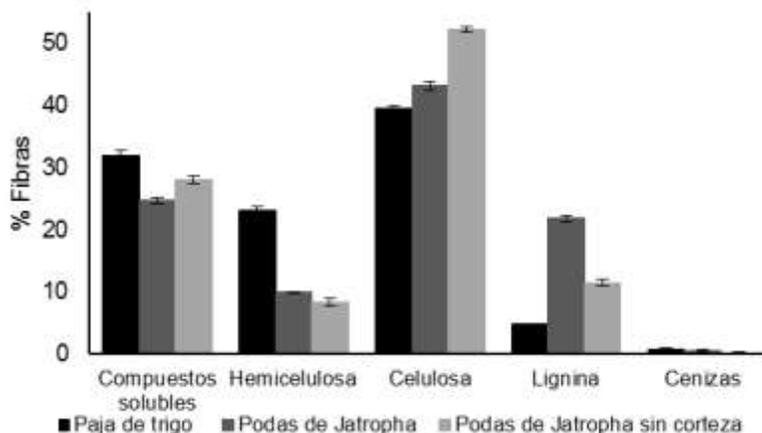


Figura 10 Porcentaje de fibras de biomasa cruda.

La cantidad de holocelulosa es un parámetro importante, ya que es proporcional a la cantidad de azúcares liberados después de aplicar la hidrólisis (Srilekha Yadav et al. 2011). El contenido de holocelulosa obtenido, para el caso de las podas de *Jatropha* sin corteza ($60.53\pm 0.68\%$), resulta ser superior a lo presentado para podas de *Jatropha* con corteza en la India, con un valor de 56.7% (Kumar et al. 2014), mientras que el valor de holocelulosa de las podas de *Jatropha* con corteza ($52.98\pm 0.63\%$) es inferior a lo reportado por estos autores. Respecto a lo obtenido en la paja de trigo, el valor de holocelulosa ($62.47\pm 0.56\%$) es inferior a lo reportado por otro autor para el mismo tipo de biomasa, donde se encontró un valor de 68.8% (Ćilerdžić et al. 2016); sin embargo, la cantidad obtenida en este trabajo no varía considerablemente según lo realizado por Saha et al. (2015), el cual obtuvo 59.1% para paja de trigo. Los resultados obtenidos y sus variaciones respecto a otros están en función del tipo de biomasa, edad de la planta, así como condiciones de crecimiento (Rincón Martínez & Silva Lora 2014), razón por la cual

no se obtienen los mismo resultados para las podas de *Jatropha* cultivada en México y la cultivada en la India, por ejemplo.

Comparando el valor de holocelulosa con lo reportado para otro tipo de residuos lignocelulósicos, por ejemplo bagazo de agave con 70% (Arreola-vargas et al. 2015), aserrín de madera de roble con 78.6% (Ćilerdžić et al. 2016), tenemos valores por debajo de estos; sin embargo, las podas de *Jatropha* constituyen un residuo lignocelulósico interesante, sobre todo para obtener la mayor cantidad de energía a partir de las plantas de esta especie, de cuya semilla se extrae aceite para producir biocombustibles.

Otro aspecto importante a destacar respecto a los resultados obtenidos en el análisis de fibras es la cantidad de lignina de: $21.82 \pm 0.5\%$ para las podas de *Jatropha* con corteza, $11.44 \pm 0.54\%$ para las podas sin corteza y siendo el valor más bajo para la paja de trigo $4.82 \pm 0.1\%$. Se puede observar que el porcentaje de lignina es más alto para las podas de *Jatropha* con corteza que para las podas sin corteza, lo que nos indica que la corteza contiene una alta cantidad de lignina, tal como se había mencionado en el capítulo 1. El contenido de lignina es importante, ya que es más difícil obtener azúcares cuanto más lignina se tenga, debido a que actúa como una barrera para la liberación de los monómeros de la celulosa y de la hemicelulosa durante el proceso de hidrólisis (Marques 2009).

Índice de cristalinidad

El índice de cristalinidad (IC) es muy similar para las dos podas de *Jatropha*, con una variación menor al 1%, mientras que para la paja de trigo se obtuvo un IC de 49.08%. En la Tabla 6 se muestran los resultados obtenidos a partir del XRD.

Tabla 6 Índice de cristalinidad (IC) de biomasa cruda. Avicel PH101: Estándar.

Material	IC (%)
Avicel PH101	58.92
Paja de trigo	49.08
Podas de <i>Jatropha</i>	58.09
Podas de <i>Jatropha</i> sin corteza	58.41

El IC es un parámetro muy importante, que nos permiten conocer más acerca de las biomásas y su comportamiento para la producción de azúcares. El IC, determina qué tan cristalino es el material, lo cual está relacionada con la accesibilidad para la degradación de la celulosa (Browning 1967), es decir un material muy cristalino no es accesible, mientras que un material amorfo es más accesible al tratamiento enzimático. Por tanto, se espera que sea más fácil acceder a la celulosa presente en la paja de trigo, debido a que presenta un menor IC.

2.3.2. Hidrólisis ácida

El hidrolizado ácido obtenido de cada biomasa fue caracterizado, tal como se observa en la Tabla 7.

Tabla 7 Caracterización de los hidrolizados ácidos.

ID	Azúcares Reductores (g/L)	Rendimiento (g AR/g biomasa)	Rendimiento Teórico (g AR/g biomasa)	Eficiencia de sacarificación (%)
Paja de trigo	54.72±0.9	0.44±0.002	0.69	63.44±0.25
Podas de Jatropha	35.18±0.96	0.28±0.008	0.59	47.70±1.44
Podas de Jatropha sin corteza	41.98±0.19	0.34±0.002	0.67	50.12±0.23

La cantidad obtenida de azúcares reductores a partir de las podas de Jatropha sin corteza resulta ser superior a lo obtenido para las podas con corteza, alcanzando una eficiencia de sacarificación de 50.12±0.23 y 47.70±1.44 %, respectivamente. Esta variación es ocasionada por la presencia de lignina, la cual se encuentra en mayor concentración en las podas con corteza, por lo tanto existe una mayor barrera para lograr la liberación de azúcares (Arantes & Saddler 2010). Comparando la eficiencia de ambas podas, respecto a otros autores, se tiene que el resultado de este proyecto es casi 5 veces mayor a lo obtenido por Kumar de

11.53%, variación que pudo haber sido ocasionada por la diferencia entre la cantidad de ácido, carga de sólido, la temperatura y el tiempo de contacto (Kumar et al. 2014).

Respecto a la paja de trigo, se obtuvo una eficiencia de sacarificación mayor a lo reportado por Saha de 44.02% (Saha et al. 2005) esto debido a la variación de las condiciones (2:1 H₂SO₄, 3 h y 25°C vs 121°C y 15 min).

Otro aspecto importante que se puede observar, es referente a que se obtuvo una mayor eficiencia en la hidrólisis de la paja de trigo que de ambas podas de *Jatropha*. Este comportamiento se debe a que se tiene el menor contenido de lignina en la paja de trigo, por lo tanto existe menos protección para degradar a la hemicelulosa y parte de la celulosa (Marques 2009). Otros aspectos que favorecen el proceso de hidrólisis ácida de la paja de trigo son su alto contenido de holocelulosa y un tamaño de partícula más pequeño respecto a lo obtenido para las podas de *Jatropha* (Figura 9).

El rendimiento de azúcares para las podas de *Jatropha* y la paja de trigo es inferior al rendimiento teórico. No obstante, aún existe celulosa remanente en la paja de trigo y en las podas de *Jatropha*, la cual se sacarificará por medio de las enzimas, liberando una cantidad de azúcares adicional.

En cuanto a los inhibidores formados de la hidrólisis ácida, se determinó la presencia de 4 inhibidores principales (Tabla 8).

Tabla 8 Inhibidores formados durante la hidrólisis ácida.

Compuesto	ppm			
	Paja de trigo	Podas de <i>Jatropha</i>	Podas de <i>Jatropha</i> sin corteza	Concentración inhibitoria <i>K. marxianus</i> SLP1 (Oliva 2003)
HMF^{††}	269.19±25.52	45.26±2.2	57.24 ±4.39	3000
Furfural	11.43±13.66	16.71±2.77	19.34±0.61	2000
Vanilina	N/D	1.09±1.89	8.14±0.64	1000
Siringaldehído	31.24±5.89	2.34±4.05	N/D ^{§§}	1500

^{††} HMF: 5-(hidroximetil)furfural

^{§§} N/D: No detectado

Se observa que la cantidad de inhibidores formados es mayor en el hidrolizado de paja de trigo que para las podas de *Jatropha*; sin embargo, es inferior a la concentración inhibitoria reportada por Oliva (2003) para *K. marxianus* (Oliva 2003), lo que sugiere que no se tendrán problemas relacionados con estos compuestos en el proceso de fermentación.

El análisis de fibras realizado después de la hidrólisis ácida (Tabla 9) indica que la cantidad de hemicelulosa para las tres biomásas es prácticamente cero, esto debido a que en la hidrólisis ácida, se ataca principalmente la fracción de hemicelulosa (Yang & Wyman 2008). Estos resultados remarcan la eficiencia del pretratamiento ácido, lo cual ayudará a tener un buen rendimiento en la hidrólisis enzimática, ya que la hemicelulosa no limitará el ataque de la enzima.

Tabla 9 Porcentaje de fibras después de aplicar la hidrólisis ácida.

	Compuestos solubles	Hemicelulosa	Celulosa	Lignina	Cenizas
	%	%	%	%	%
Paja de trigo	17.8±0.18	1.14±0.05	63.16±0.43	16.93±0.52	0.97±0.14
Podas de Jatropha	10.40±0.33	0.77±0.17	51.80±0.49	36.46±0.33	0.56±0.12
Podas de Jatropha sin corteza	6.32±0.01	0±0.06	37.18±5.05	57±4.97	0.57±0.04

2.3.3. Hidrólisis enzimática

La cantidad de proteína obtenida por el método de Bradford para Celluclast® 1.5 L fue de 32.45 mg de proteína/mL de enzima, un valor inferior a lo reportado por López-Gutiérrez (2015) de 39.23mg/mL y por Gómez-Tovar (2008) de 40.7 mg/mL; sin embargo, la enzima utilizada para estos ensayos proviene de un lote diferente al usado por ellos.

Esta cantidad de proteína fue utilizada en los experimentos de hidrólisis enzimática de biomasa después de ser sometida a un proceso de hidrólisis ácida.

En la Figura 11 se observa el comportamiento de los azúcares reductores liberados a través del tiempo para la hidrólisis enzimática, alcanzando 7.46 g/L para la paja de trigo y cantidades menores y similares entre sí para los hidrolizados de las podas de Jatropha con corteza y sin corteza (2.3 y 1.8 g/L, respectivamente). Las concentraciones anteriores, corresponden a rendimientos 0.034 g AR/g biomasa inicial para la paja de trigo, 0.012 y 0.010 g AR/g biomasa inicial para las podas de Jatropha. Estos rendimientos, junto con el obtenido de la hidrólisis ácida nos da como resultado una eficiencia total de sacarificación de 68.42 ± 0.29 , 49.77 ± 1.62 y 51.54 ± 0.55 % para la paja de trigo, podas de Jatropha con corteza y podas de Jatropha sin corteza.

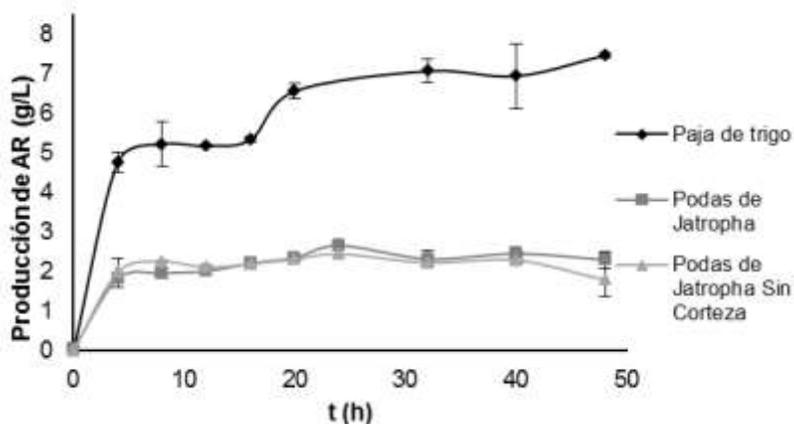


Figura 11 Cinética de producción de azúcares reductores durante la hidrólisis enzimática para las 3 biomásas lignocelulósicas.

En función a la cantidad de celulosa presente en los materiales crudos (Figura 10) era de esperarse una mayor liberación de azúcares para las podas de Jatropha; sin embargo, esto ocurre de manera contraria, ya que se tiene un menor índice de cristalinidad para la paja de trigo (49.08%) respecto a las podas con y sin corteza (58% aproximadamente), lo que nos indica que existe mayor cantidad de celulosa amorfa que de celulosa cristalina, por tanto se liberan más azúcares para la paja de trigo, debido a que la celulosa amorfa exhibe menos resistencia a la

degradación (Browning 1967). Otro factor importante es el tamaño de partícula, presentando tamaños más grandes en las podas de *Jatropha* (Figura 9), lo cual hace que los tratamientos de hidrólisis sean más efectivos para la paja de trigo (Gupta & Verma 2015). Finalmente, se tiene que la cantidad de lignina de cada material al inicio de la hidrólisis enzimática (Tabla 9) influye en la cantidad de azúcares liberados, ya que para el caso de la paja de trigo el porcentaje de lignina fue de $16.93 \pm 0.52\%$, inferior a lo obtenido para las podas de *Jatropha*, por lo que la lignina actuó como barrera para la degradación de celulosa en ambas Podas de *Jatropha*.

La cantidad de azúcares liberados para los tres casos es muy pequeña comparada con lo obtenido en la hidrólisis ácida (menor al 14%), lo que sugiere que se necesita realizar un proceso de optimización que permita aumentar esta producción de azúcares, lo cual se describirá en el siguiente capítulo.

2.3.4. Selección de podas de *Jatropha*

Se aplicó un ANOVA (Anexo C) para llevar a cabo la selección del tipo de podas de *Jatropha* que se usaría en los siguientes experimentos (capítulos 3 y 4). El resultado indicó que no existen diferencias significativas entre la eficiencia de sacarificación obtenida de la hidrólisis ácida para las podas con y sin corteza, ya que el valor de P es mayor a 0.05 ($P(>F)=0.143$). Estos resultados concuerdan con el análisis realizado con las eficiencias de la hidrólisis enzimática con un valor de P mayor de 0.05 ($P(>F)=0.283$). Por otro lado se tiene que la obtención de podas de *Jatropha* sin corteza involucra trabajo de descortezado, que representa inversión de tiempo y recursos. Debido a lo anterior y considerando el análisis estadístico, se decidió usar las podas con corteza para el resto del trabajo.

2.4. Conclusiones

La caracterización de las biomásas crudas nos permite conocer la cantidad de holocelulosa, la cual nos indica la máxima cantidad de azúcares que se pueden liberar por medio del pretratamiento ácido y de la hidrólisis enzimática. Por otro

lado, se obtuvieron algunas características (IC, % lignina, distribución de tamaño) que nos permitieron interpretar los resultados obtenidos.

Los resultados de hidrólisis ácida muestran que la hemicelulosa (y parte de la celulosa) fue convertida a azúcares reductores, siendo mayor la conversión en la paja de trigo debido a que presenta menor cantidad de lignina en la biomasa cruda, tamaño de partícula pequeño y altos porcentajes de celulosa y hemicelulosa. Así mismo, se observa que no se liberan altas concentraciones de furanos y fenólicos que pudieran inhibir el proceso de fermentación.

Respecto a la hidrólisis enzimática se observa la misma tendencia que en la hidrólisis ácida, con una mayor liberación de azúcares para la paja de trigo que para las podas de *Jatropha*. Así mismo se puede concluir que es necesaria una optimización de la sacarificación enzimática, debido a las bajas concentraciones obtenidas respecto a la hidrólisis ácida (menores al 14%).

Finalmente se selecciona las podas de *Jatropha* con corteza, con el objetivo de ahorrar tiempo y recursos al evitar el proceso de remoción de corteza, así como basándonos en el análisis estadístico.

Capítulo 3 Optimización de la hidrólisis enzimática.

3.1. Resumen

Para poder aprovechar al máximo la paja de trigo y las podas de *Jatropha* (con corteza capítulo 1), es necesario mejorar el proceso de hidrólisis enzimática que se refleja en una mayor producción de etanol. Por tal motivo en este capítulo, se presentan los resultados obtenidos para la optimización de la hidrólisis enzimática. En primera instancia, un set de experimentos fue obtenido del diseño experimental Plackett Burman, que nos permiten tener una aproximación inicial para la optimización. Aquellos factores que resultaron significativos en el Plackett Burman fueron optimizados en un Diseño Central Compuesto, ya que se trata de un diseño experimental más robusto. Ambos diseño experimentales se realizaron en el programa Design Expert® 7.0.0. Adicionalmente, se optimizó el tiempo de hidrólisis enzimática, mediante una cinética de producción de azúcares reductores. Finalmente, se evaluaron los hidrolizados ácidos y enzimáticos, así como una mezcla de ambos en un proceso de fermentación en botellas usando *Kluyveromyces marxianus* SLP1.

3.2. Materiales y métodos

3.2.1. Pretratamiento: Hidrólisis ácida

Cada biomasa, previamente triturada, fue sometida a un proceso de hidrólisis ácida, utilizando ácido sulfúrico. Para tal determinación se utilizó el protocolo del CIATEJ, en la cual se emplea una relación 1:8 sólido:líquido, de biomasa en seco respecto a ácido sulfúrico al 2%. Esta mezcla se colocó en un autoclave a 121°C por 15 min. Al término de la hidrólisis ácida, se separó la fracción sólida, la cual fue secada y lavada, para después ser sometida al proceso de optimización.

3.2.2. Optimización de la hidrólisis enzimática

Se realizó la optimización de las condiciones de hidrólisis enzimática de las dos biomásas (después de ser sometidas a una hidrólisis ácida) evaluando el efecto que tienen la concentración de sustrato, la concentración de enzima, el pH, el tiempo de reacción y la temperatura sobre la producción máxima de azúcares reductores (AR) y el porcentaje de líquido recuperado (%LR). Inicialmente se utilizó el diseño Plackett-Burman (PB), donde se evaluaron estos 5 factores. Seguido de este diseño, se procedió a utilizar un Diseño Central Compuesto (DCC) con aquellos factores que resultaron significativos en el diseño PB.

Se utilizó como enzima Celluclast 1.5 L® con 32.45 mg proteína/mL enzima (capítulo 2) y como solución amortiguadora buffer de citratos de 50 mM (Gómez-Tovar et al. 2012). Los experimentos se llevaron a cabo en una incubadora orbital (INO 650V-7) a 120 rpm.

3.2.2.1. Exploración mediante el diseño Plackett Burman

Como primera etapa para la optimización, se llevó a cabo una exploración usando el diseño experimental Plackett Burman (PB), utilizando el software Design Expert® 7.0.0. Los experimentos se realizaron con valores mínimos y máximos para los 5 factores (Tabla 10), en función a estas variables el software generó las combinaciones necesarias a realizar experimentalmente. Cada ensayo se realizó con sus respectivos controles de enzima y sustrato.

Tabla 10 Factores experimentales del PB e intervalos de prueba evaluados para las dos biomásas.

Factor	Valor inferior	Valor Superior	Unidades
Enzima [‡]	0.5	1.5	mg/mL
Sustrato [¥]	20	80	g/L
pH	4	6	
Tiempo	12	48	h
Temperatura	40	60	°C

[‡] Concentración de enzima (mg de proteína)

[¥] Concentración de sustrato

3.2.2.2. Diseño Central Compuesto (DCC).

Los factores significativos en el PB fueron optimizados en el Diseño Central Compuesto (DCC), tomando un punto central para cada factor con 5 y 3 réplicas, para la paja de trigo y las podas de *Jatropha*, respectivamente. Así mismo, se mantuvo constante el valor sugerido por el PB para aquellos factores que no tuvieron efecto significativo. EL set de experimentos fue generado en el software Design Expert 7.0.0.

3.2.2.3. Cinética de producción de azúcares

Se llevó a cabo el proceso de hidrólisis enzimática utilizando las condiciones obtenidas del DCC, así como las sugeridas del PB. Se tomaron mediciones intermedias para la determinación de AR, hasta alcanzar un estado estable en el consumo de azúcares.

3.2.3. Comprobación de la condiciones óptimas

Teniendo las condiciones (y tomado los valores sugeridos por el PB) se procedió a comprobar el valor de azúcares reductores y líquido recuperado predicho por el modelo del DCC. Adicional a esto, se determinaron inhibidores formados en el hidrolizado, así como el porcentaje de fibras del residuo sólido generado.

3.2.4. Fermentación en botellas

La fermentación alcohólica en este experimento, se llevó a cabo con la levadura *Kluyveromyces marxianus* SLP1, utilizando los azúcares obtenidos en el hidrolizado ácido, enzimático (valores óptimos) y una mezcla de ambos como fuente de carbono.

La activación de la levadura se realizó en medio YPD (20 g/L de glucosa, 20 g/L de peptona y 10 g/L de extracto de levadura) pH 4.5, 30°C y 225 rpm.

Las condiciones de fermentación fueron 30°C, pH 4.5, agitación 100 rpm y 1 g/L de $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$. Se agregó 10% v/v de inóculo (1×10^6 cel/mL). El ensayo se llevó a cabo durante 48 h, con mediciones intermedias de azúcares reductores, producción de etanol y conteo de células. Se utilizaron botellas serológicas de 120

mL, a un volumen de trabajo de 60 mL. A cada botella se le intercambio la atmósfera con nitrógeno durante 6 min.

3.2.5. Determinaciones analíticas y cálculos

El etanol producido se analizó en un cromatógrafo de gases Agilent technologies 6890N FID, usando una columna Agilent J&W DB-624 UI (60 m*0.32 mm*1.8 μ m). La productividad de etanol (velocidad de producción del etanol) se calculó como el etanol producido (g/L) dividido entre el tiempo exponencial de fermentación (g/L*h). El rendimiento de etanol fue definido como gramos totales de etanol producido entre gramos de biomasa utilizada (antes de la hidrólisis ácida) (g/g) (Huang et al. 2015). La productividad en función al rendimiento fue calculada como el rendimiento dividido entre el tiempo seleccionado de fermentación (g/g*h).

Por otra parte, el rendimiento teórico de azúcares se calculó como la cantidad de hemicelulosa y celulosa presente en las biomásas crudas multiplicada por 1.111 (Saini et al. 2016). El rendimiento real de azúcares fue determinado, como los gramos de azúcares reductores por gramo de biomasa inicial utilizada y la productividad como la cantidad de azúcares reductores producida dividida entre el tiempo exponencial de hidrólisis enzimática. La eficiencia de sacarificación fue determinada dividiendo el rendimiento obtenido experimentalmente (ácido más enzimático) entre el rendimiento teórico y expresándolo en porciento.

La determinación de masa celular se realizó usando una cámara de Neubauer en un microscopio Leica DM 1000.

El análisis de fibras se llevó a cabo según lo establecido en el protocolo de ANKOM technology, el cual está basado en el método Van Soest (Keys et al. 1969). La cantidad de azúcares reductores liberada de la hidrólisis enzimática, fue determinada por el método del ácido 3,5-dinitrosalicílico (Miller 1959).

La determinación de inhibidores, tales como furanos (5-hidroximetilfurfural y furfural) y aldehídos fenólicos (vainillina y siringaldehído) se llevó a cabo en un HPLC (1200 series, Agilent Technologies) utilizando una columna Synergi 4u

Hydro-RP 80 A (4.6 x 250 mm), empleando como fase móvil agua/acetonitrilo (92/8%) a un flujo de 0.8 mL/min , pH de muestra 4.4 (Arreola-Vargas et al. 2013).

3.2.6. Análisis estadístico

El análisis estadístico se llevó a cabo con ayuda del software Rstudio®. Para la optimización del tiempo de sacarificación se realizó una prueba de ANOVA para determinar si existen diferencias entre los azúcares obtenidos a diferentes tiempos para cada biomasa y una prueba de Duncan para encontrar cual es el mejor resultado dentro de esos tiempos.

En la parte de fermentación, se utilizó la prueba ANOVA para determinar las diferencias entre el etanol producido junto con una prueba Duncan para la selección del tiempo en el cual se alcanza el máximo, así como para la selección del hidrolizado en función al rendimiento.

3.3. Resultados y discusión

3.3.1. Optimización

Plackett Burman (PB)

El diseño PB propuso la realización de 12 experimentos, tal como se observa en la Tabla 11 Después de la realización de los experimentos propuestos, el valor de AR obtenido se analizó en el software.

Los resultados del análisis del diseño PB, se examinaron mediante un diagrama de Pareto, en el cual se observa qué factores son significativos en la producción de azúcares reductores, considerando significativos aquellos que superan el valor límite de Bonferroni, ya que la hipótesis nula es rechazada, por lo que se necesita una optimización. Si se muestra en color naranja indica que el efecto es positivo, si se presenta de color azul el efecto es negativo. En la Figura 12 podemos observar que el sustrato (B) es significativo para ambas biomasas, presentándose de color naranja, por lo que se debe optimizar en el DCC a valores cercanos a 80 g/L. En el

caso de la paja de trigo la temperatura (E) es otro factor que supera el valor de Bonferroni, considerando en el DCC valores cercanos a 40°C.

Tabla 11 Diseño experimental obtenido del PB para la paja de trigo y podas de Jatropha, donde t: tiempo, AR: Azúcares Reductores.

ID	Enzima (mg/mL)	Sustrato (g/L)	pH	t (h)	Temp. (°C)	AR (g/L)	
						Paja de trigo	Podas de Jatropha
1	1.5	20	6	48	40	9.02	2.6
2	1.5	80	4	48	60	15.04	2.64
3	0.5	80	6	12	60	10.45	2.6
4	1.5	80	4	12	40	20.36	5.91
5	1.5	20	4	12	60	3.87	1.34
6	1.5	20	6	48	60	4.02	0.81
7	0.5	20	4	12	40	6.9	0.97
8	0.5	80	6	48	40	23.44	7.27
9	1.5	80	6	12	40	18.3	7.05
10	0.5	80	4	48	60	10.34	7.22
11	0.5	20	6	12	60	3.26	0.62
12	0.5	20	4	48	40	9.47	2.27

El pH para ambas biomásas, resultó no tener efecto significativo en la hidrólisis enzimática; sin embargo, el PB mostraba un valor cercano a 6, siendo elevado en comparación a lo usado por otros autores donde el valor oscila entre 4.5 y 5 (Gómez-Tovar et al. 2012; Saha et al. 2005; Saha et al. 2015; Saha et al. 2013; Lu et al. 2009), por lo que se decidió optimizar el pH en el DCC. El valor generado para aquellas variables que no resultaron significativas, se mantuvo constante para la optimización del DCC.

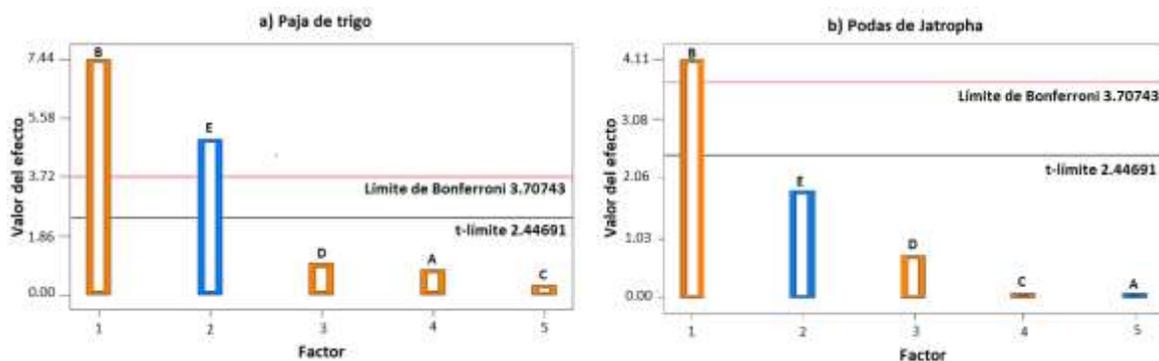


Figura 12 Diagrama de Pareto del PB, a) Paja de trigo y b) Podas de Jatropha. A: Enzima; B: Sustrato; C: pH; D:Tiempo; E: Temperatura.

Diseño Central Compuesto (DCC)

La cantidad de sustrato, la temperatura y el pH se analizaron con el DCC, para encontrar las condiciones óptimas para la paja de trigo.

Tabla 12 Set de experimentos del DCC para la optimización de la paja de trigo.

ID	Sustrato (g/L)	Temp. (°C)	pH	AR (g/L)	Líqu. Recuperado (%)
DP_1	60	36.59	5.25	21.26	66.67
DP_2	80	40	6	29.14	63.33
DP_3	60	45	3.99	29.40	76
DP_4	40	50	4.5	9.04	73.33
DP_5	40	40	6	16.6	81.33
DP_6	80	50	6	10.53	64
DP_7	80	50	4.5	15.65	67.33
DP_8	60	53.41	5.25	15.14	63.33
DP_9	60	45	5.25	27.23	75.33
DP_10	40	40	4.5	19.11	80
DP_11	60	45	5.25	27.54	73.33
DP_12	60	45	6.51	18.50	74.67
DP_13	93.64	45	5.25	38.56	66.67
DP_14	60	45	5.25	27.76	80
DP_15	40	50	6	5.37	75.33
DP_16	80	40	4.5	35.69	68
DP_17	26.36	45	5.25	13.41	90.67
DP_18	60	45	5.25	27.23	79.33
DP_19	60	45	5.25	27.79	74.67

Se obtuvieron un total de 19 experimentos, con 6 puntos axiales y 3 valores centrales, tomando como variables de respuesta la cantidad máxima de azúcares reductores y el porcentaje máximo de líquido recuperado después de la hidrólisis enzimática. Se consideró como variable dependiente la cantidad de líquido recuperado, debido a que este último parámetro determina la cantidad de real de gramos de azúcar que se obtiene al final de la hidrólisis enzimática. En la Tabla 12 se muestran el set de experimentos con la combinación de factores para la paja de trigo, así como las variables de respuesta obtenidas después de la realización de los experimentos de hidrólisis.

El programa generó una superficie de respuesta (Figura 13), donde se puede observar el cambio de condiciones óptimas para cada variable de respuesta. Se generaron condiciones que favorecen el máximo para los azúcares reductores sin considerar el líquido recuperado (Anexo D), las cuales pueden ser utilizadas a nivel industrial, cuando se cuenta con sistemas eficientes de separación líquido-sólido, y por tanto el líquido recuperado no es una limitante. Sin embargo, a escala laboratorio ambas variables de respuesta son importantes, debido a lo cual se procedió a generar en el software un modelo capaz de predecir de manera conjunta ambas variables (Tabla 14), obteniendo así los siguientes valores óptimos: 50.34 g sustrato/L, 43.24 °C y 4.98 de pH.

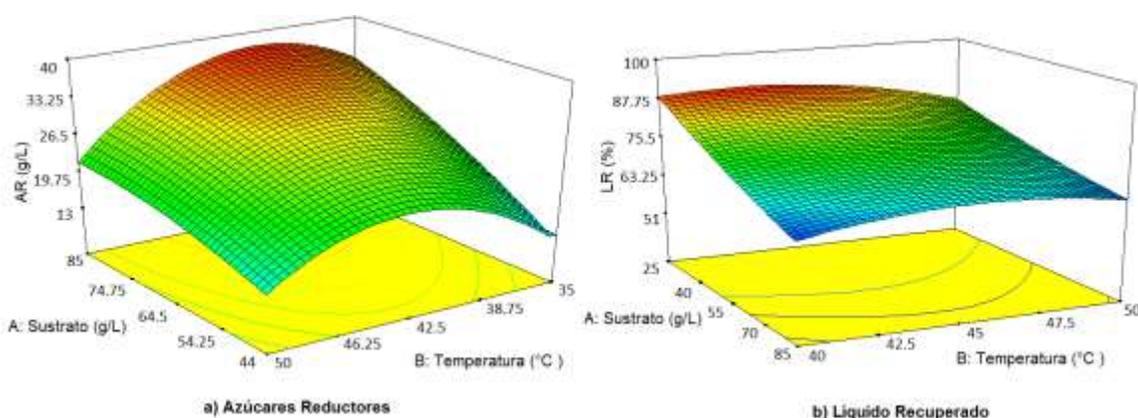


Figura 13. Superficie de respuesta para paja de trigo, considerando pH constante

Por otro lado, para las podas de *Jatropha*, sólo se optimizó en el DCC la cantidad de sustrato y el pH, obteniendo un total de 11 experimentos, con 4 puntos axiales y 2 valores centrales. En la Tabla 13 se muestran las combinaciones propuestas por el DCC, así como los resultados de los experimentos para azúcares reductores y líquido recuperado.

Tabla 13 Experimentos para la optimización de podas de *Jatropha* generados del DCC.

ID	Sustrato (g/L)	pH	AR (g/L)	Líqu. Recuperado (%)
DJ_1	31.72	5.25	5.19	76
DJ_2	88.28	5.25	8.74	42
DJ_3	80	4.5	9.38	48.67
DJ_4	60	6.31	5.41	57.33
DJ_5	40	4.5	5.48	68
DJ_6	60	5.25	7.54	60
DJ_7	80	6	3.85	48
DJ_8	60	5.25	8.14	58.67
DJ_9	60	5.25	8.76	59.33
DJ_10	60	4.19	6.28	62
DJ_11	40	6	5.20	68.67

Los resultados del DCC muestran la superficie de respuesta (Figura 14) para la concentración de AR y para el %LR, donde se observa que la cantidad de sustrato afecta de forma opuesta al máximo de cada variable de respuesta. El software generó un modelo para obtener el máximo de ambas variables con los siguientes valores óptimos: 50.44 g/L de sustrato y 5.13 de pH. Estos valores pueden ser utilizados para escala laboratorio, ya que nos permiten conocer los gramos reales a los que se puede aspirar, debido a que no toda la cantidad de líquido puede ser recuperada de manera manual. Dichos valores óptimos fueron utilizados en este trabajo. Los valores óptimos para la realización a nivel industrial se muestran en el Anexo D.

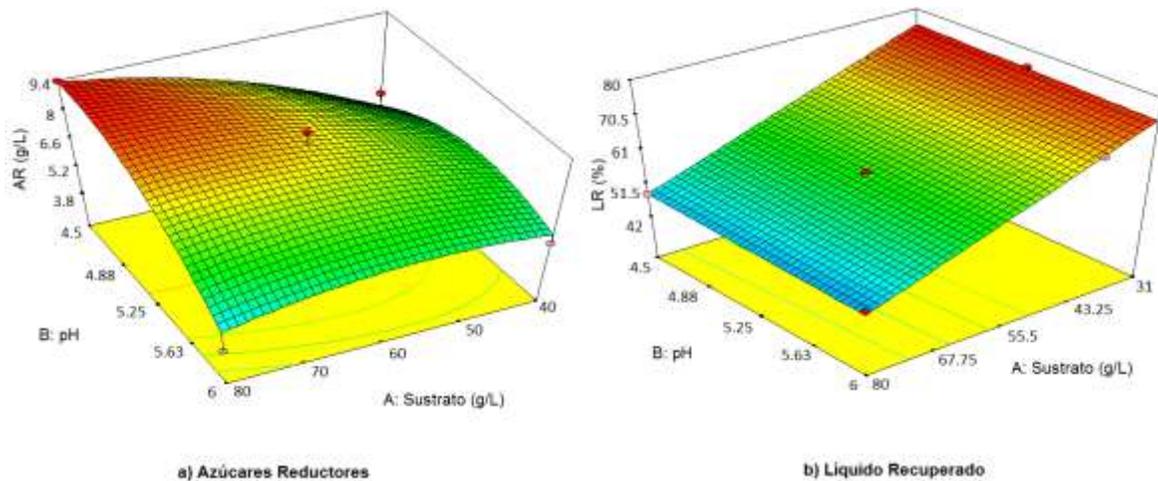


Figura 14 Superficie de respuesta para las podas de Jatropha

Finalmente, se optimizó nuevamente el tiempo a través de una cinética de azúcares reductores utilizando las condiciones propuestas por DCC y PB para los otros factores, con el objetivo de ver si existe una disminución en el tiempo de hidrólisis, lo cual resultaría satisfactorio para el ahorro de costos en el proceso de producción.

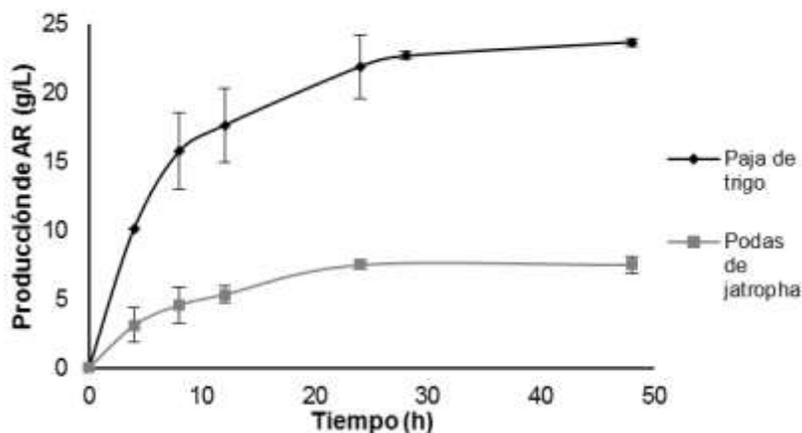


Figura 15 Optimización del tiempo de hidrólisis enzimática. $P(>F)=8.93e-5$ para la paja de trigo y $P(>F)=0.013$

Al pie de la Figura 15 se tienen los valores de P del análisis estadístico de ANOVA para las dos biomásas, donde se observan valores inferiores a 0.05, lo que significa que sí existen diferencias significativas entre los tiempos. La prueba Duncan (Anexo C) nos indica que el mejor tiempo para la paja de trigo son las 48

horas, pero no existe diferencia significativa entre 28 y 24 h, por lo que se decidió seleccionar 24 h. Por otro lado, la prueba Duncan indica que el tiempo donde se observa mayor obtención de azúcares para las podas de *Jatropha* es de 48 h; sin embargo, no existe diferencia significativa a las 24 h.

En la Tabla 14 se muestran los valores que favorecen la máxima producción de azúcares reductores y el máximo porcentaje de líquido recuperado, obtenidos del del DCC y de la cinética de hidrólisis enzimática, así como los valores tomados del diseño PB.

Tabla 14 Valores óptimos para los factores obtenidos del DCC y de la cinética de tiempo, así como los valores tomados del PB. AR y %LR son valores predichos por el DCC.

	Paja de trigo	Podas de <i>Jatropha</i>	Unidades
Enzima	1.5	0.52	mg/mL
tiempo	24	24	h
Sustrato	50.34	50.44	g/L
Temperatura	43.24	40	°C
pH	4.98	5.13	
AR (predicho)	25.83	7.54	g/L
LR (predicho)	79.87	64.36	%

Comprobación de las condiciones óptimas.

En la Tabla 15 se observan los valores experimentales obtenidos de AR y %LR para ambas biomásas usando las condiciones óptimas del DCC y los valores tomados del PB (Tabla 14), donde se tiene mayor diferencia entre el valor experimental y el predicho para la paja de trigo. Esto se debe a la naturaleza de la biomasa y al volumen utilizado para la comprobación, ya que la paja tiende a hincharse y al ser un volumen grande limita la agitación, y por tanto el contacto entre enzima y sustrato. Por otra parte, los resultados para las podas de *Jatropha* muestran una mayor similitud entre el valor experimental y el predicho por el modelo, ya que en este caso la agitación no es una limitante.

Tabla 15 Comparación entre valores obtenidos de AR y %LR (Experimental & Predicho). AR: azúcares reductores, %LR: porcentaje de líquido recuperado.

	Paja de trigo			Podas de Jatropha		
	Experimental	Predicho	% similitud	Experimental	Predicho	% similitud
AR (g/L)	21.94±0.27	25.83	84.94	7.49±0.29	7.54	99.34
LR (%)	94.76±0.03	79.87	118.64	82.61±0.14	64.36	128.36

La cantidad de azúcares reductores generada en el proceso de hidrólisis enzimática para la paja de trigo es de 21.94 g/L, lo cual es una cantidad un poco mayor a lo obtenido por Gómez-Tovar (2012), el cual reportó 18.8 g/L usando como materia prima paja de avena cruda. La cantidad obtenida es muy similar debido a que ambos materiales presentan porcentaje de celulosa inicial parecido, así como la cantidad de celulosa presente en el material que entra al proceso de hidrólisis enzimática (22.4 g (Gómez-Tovar et al. 2012) y 23.24 g en este trabajo (balance de masa anexo E)). Por otro lado, la cantidad de azúcares reductores es inferior a lo reportado por Saini (2016), donde se tiene una liberación de azúcares de 54.8 g/L después de 96 h utilizando una mezcla de enzimas en bruto, las cuales trabajan de manera sinérgica favoreciendo el proceso de hidrólisis.

El hidrolizado enzimático de las podas de Jatropha presenta una concentración de azúcares reductores de 7.49 g/L, cantidad similar a lo reportado por López-Gutiérrez (2015), donde se obtuvieron 6.932 g AR/L a partir de Bagazo de Agave tequilana Weber var azul (López Gutiérrez 2015). Comparado con la concentración de azúcares reductores obtenidos por Kumar (2014) para un pretratamiento similar al usado en este trabajo, obtenemos una cantidad superior a lo encontrado por ellos de 4.32 g/L.

A partir de la cantidad de azúcar fue posible obtener una productividad de 0.81 y 0.28 g/L*h, para la paja de trigo y las podas de Jatropha. El cálculo del rendimiento nos indica que se alcanzan 0.20 g/g para la paja de trigo, que junto con el rendimiento de la hidrólisis ácida (0.44) permite alcanzar un rendimiento de obtención de azúcares de 0.64 g AR/g biomasa inicial, lo cual representa una eficiencia de sacarificación de 92.75%. Para las podas de Jatropha, se tiene un rendimiento en la hidrólisis enzimática de 0.08 y 0.28 en la hidrólisis ácida,

obteniendo un rendimiento total de 0.36 g AR/g biomasa inicial, lo que corresponde a una eficiencia de 61%. La eficiencia de sacarificación es inferior en el caso de la *Jatropha*, debido al porcentaje de lignina presente en este material inicial (gráfico 2), el cual al ser alto (21.82 % podas de *Jatropha* & 4.82 % paja de trigo) actúan como una barrera que evita la hidrólisis de hemicelulosa y celulosa; así como por el IC más elevado (58.09%) que el de la paja de trigo (49.08%) y por la distribución de tamaño, ya que en las podas de *Jatropha* se tiene tamaños más grandes, lo cual limita la sacarificación.

Por último, en la Tabla 16 se muestran los datos obtenidos de la caracterización de los hidrolizados enzimáticos y del sólido generado para las dos biomásas. Oliva en 2003 menciona que se necesitan concentraciones superiores a 1000 ppm de cada inhibidor (tabla 5) para observar una inhibición en el proceso fermentativo de *Kluyveromyces marxianus* (Oliva 2003). En la Tabla 16 se tienen concentraciones de cada inhibidor inferiores a 1000 ppm, lo cual sugiere que no se tendrán problemas en el proceso de fermentación causado por los inhibidores.

Tabla 16 Caracterización de los hidrolizados y sólido enzimático bajo condiciones óptimas. Inhibidores formados (HMF: 5-(hidroximetil)furfural) y porcentaje de fibras.

	Paja de trigo	Podas de <i>Jatropha</i>
Inhibidores (ppm)		
HMF	7.12±9.17	0.07±0.09
Furfural	0.26±0.37	N/D
Vanilina	N/D	N/D
Siringaldehído	9.78±13.83	N/D***
Fibras (%)		
Hemicelulosa (%)	1.26±0.1	1.35±0.08
Celulosa (%)	41.50±1.32	44.37±0.88
Lignina (%)	22.25±0.08	36.10±1.19

*** N/D: No detectado

El porcentaje de fibras de la Tabla 16, nos indica una clara disminución en el porcentaje de celulosa de un 63.16 y 51.80% para la paja de trigo y las podas de *Jatropha* (antes de la hidrólisis enzimática, Tabla 9) a 41.5 y 44.37% después de

aplicar hidrólisis enzimática, causado por la conversión de esta a azúcares monoméricos durante el ataque de las enzimas.

Los balances de masa antes, después de la hidrólisis enzimática y al término de la hidrólisis ácida se presentan en el anexo E.

3.3.2. Fermentación en botellas

Paja de trigo

Los resultados de fermentación en botellas para la paja de trigo se muestran en las figuras 16-18, donde se observa el comportamiento en el consumo de azúcares, producción de etanol y crecimiento celular a través del tiempo. Se evaluaron 3 hidrolizados, ácido (PA), enzimático (PE) y la mezcla ácido-enzimática (PM).

El mayor consumo de azúcares se llevó a cabo en las primeras 24 horas (Figura 16), consumiéndose 20.8 g/L para PE, 18.6 g/L para PM y 9 g/L para PA.

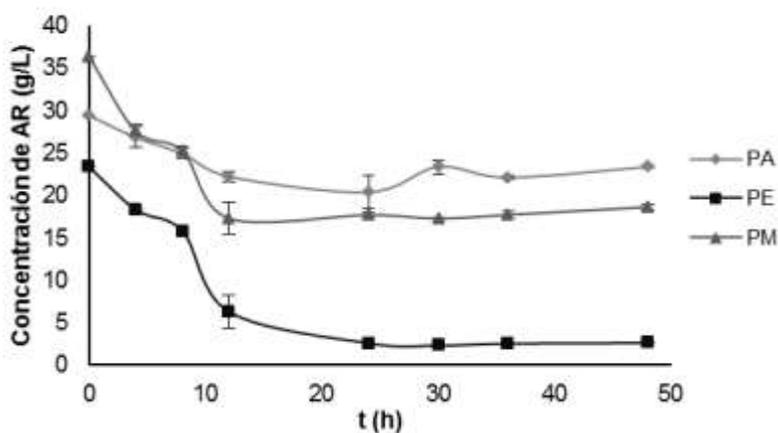


Figura 16 Consumo de azúcares reductores durante la fermentación de paja de trigo. PA: hidrolizados ácido de paja de trigo; PE: hidrolizado enzimático de paja de trigo; PM: Mezcla hidrolizados ácido/enzimático relación=0.671.

El consumo de azúcares es casi completo para el hidrolizado enzimático, esto debido a que se tiene presencia principalmente de glucosa, causada por la conversión de celulosa. Para el caso del hidrolizado ácido y la mezcla, no se

alcanza un consumo completo, ya que en la hidrólisis ácida se liberan principalmente pentosas y la levadura *K. marxianus* SLP1 prefiere consumir hexosas; por otro lado, pudiera haber la presencia de ciertos compuestos liberados por el uso del ácido (diferentes a los determinados en Tabla 16) que inhiban a la levadura.

El comportamiento de la producción de etanol a través del tiempo es muy similar con lo observado en el consumo de azúcares (Figura 16). Se tiene una mayor producción de etanol para PE (7.65 g/L), seguida de PM (4.35 g/L) y finalmente PA (2.36 g/L). Al pie de la Figura 17 se observan los valores de P de la prueba ANOVA, donde se tiene que si existe diferencia significativa entre el etanol producido a través del tiempo para cada hidrolizado, ya que el valor de P es menor a 0.05 ($P(>F)=0.000161$ (PM); 0.0000102 (PE) y 0.00233 (PA)); por otro lado, los resultados de la Prueba Duncan para los 3 hidrolizados concuerdan con lo analizado en la Figura 16, que es estadísticamente posible detener la cinética a las 24 h.

El cálculo de productividad en la fase exponencial muestra un valor de: $0.47 \text{ g/L}\cdot\text{h}$ para PE, $0.40 \text{ g/L}\cdot\text{h}$ para PM y $0.20 \text{ g/L}\cdot\text{h}$ para PA.

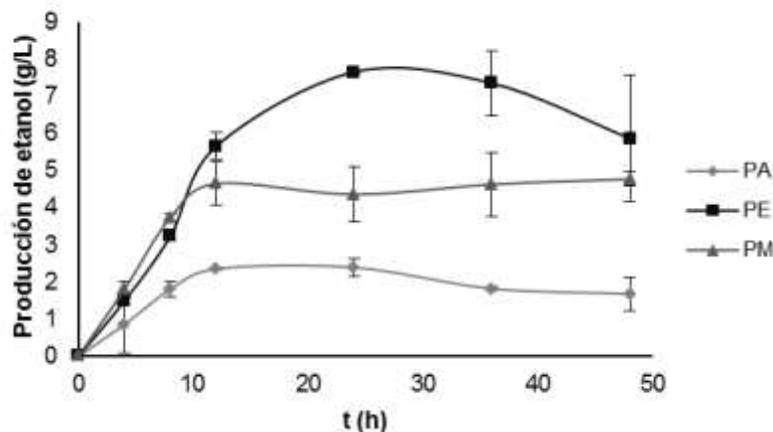


Figura 17 Producción de etanol a partir de hidrolizados de paja de trigo. PA: ácido ($P(>F)=0.00233$); PE: enzimático ($P(>F)=0.0000102$); PM ácido/enzimático= 0.671 ($P(>F)=0.000161$).

El crecimiento celular es más notorio en las primeras 12 h de la fermentación, marcando una tendencia casi constante en las siguientes horas. En la Figura 18 se observa un mayor crecimiento en el hidrolizado enzimático, seguido de la mezcla y finalmente el ácido, debido al bajo consumo de azúcares reductores.

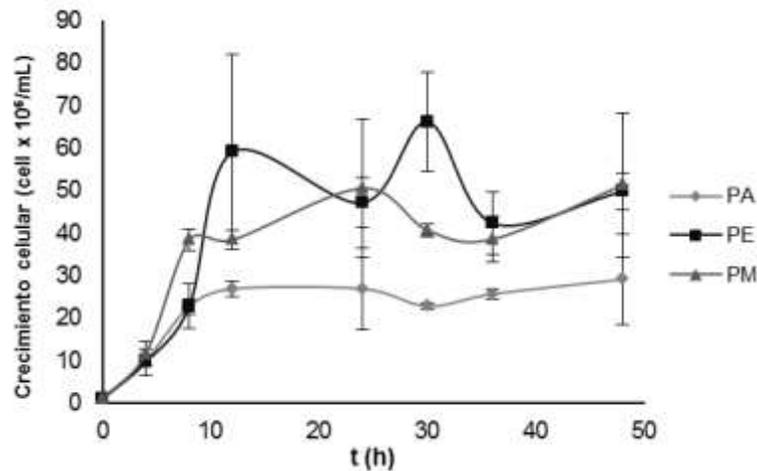


Figura 18 Crecimiento celular de *K. marxianus* SLP1, durante la fermentación de hidrolizados de paja. PA: hidrolizados ácido de paja de trigo; PE: hidrolizado enzimático de paja de trigo; PM: Mezcla hidrolizados ácido/enzimático relación=0.671.

Estos resultados sugieren que sería mejor usar los hidrolizados de manera separada. Sin embargo, al hacer el análisis de la cantidad de gramos de etanol que se generan a las 24 h, al sumar los procedentes del hidrolizado ácido más los que se generan del enzimático, se tiene un rendimiento de etanol de 0.08 g/g, mientras que de utilizar la mezcla se obtienen un rendimiento de 0.06 g/g. La prueba ANOVA indica que no existe diferencia significativa entre el rendimiento obtenido separado y en mezcla ($P(>F) = 0.157$).

Los rendimientos obtenidos resultan ser inferiores a lo obtenido por Saha (2015) donde alcanzan 0.29 g/g en 83 h para la paja de trigo (Saha 2015). Sin embargo, en cuestiones de productividad en cuanto a rendimiento, se obtienen valores similares, ya que Saha alcanza una productividad de 0.003 g/g*h, y en nuestro caso usando la mezcla 0.0025 g/g*h.

Podas de *Jatropha*

El comportamiento del proceso de fermentación de los hidrolizados de podas de *Jatropha* a través del tiempo se observa en las figuras 19, 20 y 21. Los hidrolizados evaluados fueron: ácido (JA), enzimático (JE) y la mezcla ácido-enzimática (JM).

La cantidad de azúcares consumidos (Figura 19) en las primeras 12 horas es muy similar para los tres casos, siendo mayor para JM (8.18 g/L), seguida de JE (7.03 g/L) y finalmente JA (6.27 g/L).

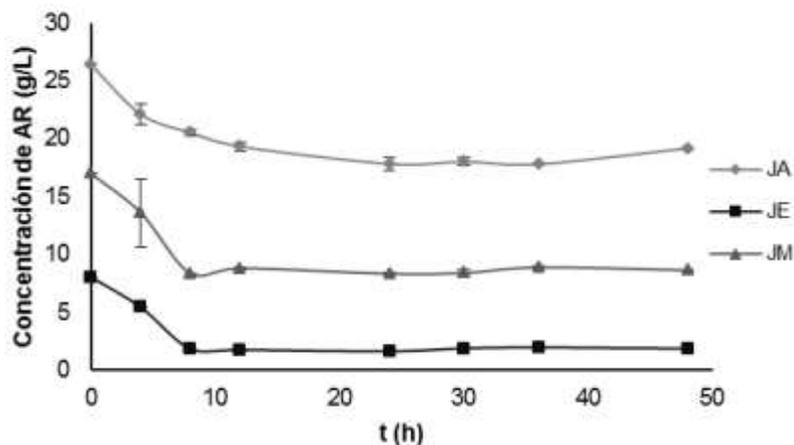


Figura 19 Consumo de azúcares reductores durante la fermentación de hidrolizados de podas de *Jatropha*. JA: hidrolizados ácido; JE: hidrolizado enzimático; JM: Mezcla hidrolizados ácido y enzimático relación=0.504.

En el caso de producción de etanol, se alcanza la más alta cantidad en las primeras 12 h, generando una cantidad similar en los tres casos de entre 2.25-2.5 g/L a las 12 h (Figura 20). Estos resultados de tiempo corresponden con el análisis estadístico, para la determinación del tiempo de fermentación, en el cual los valores de P de la prueba ANOVA (pie Figura 20) son inferiores a 0.05, por tanto las medias de la producción de etanol en los diferentes tiempos son diferentes. La prueba Duncan para los tres hidrolizados concuerda con lo observado en las figuras 19 y 20, estableciendo como tiempo 12 h, alcanzando una productividad de 0.21 g/L*h para JM y JA y un valor de 0.19 g/L*h para JE.

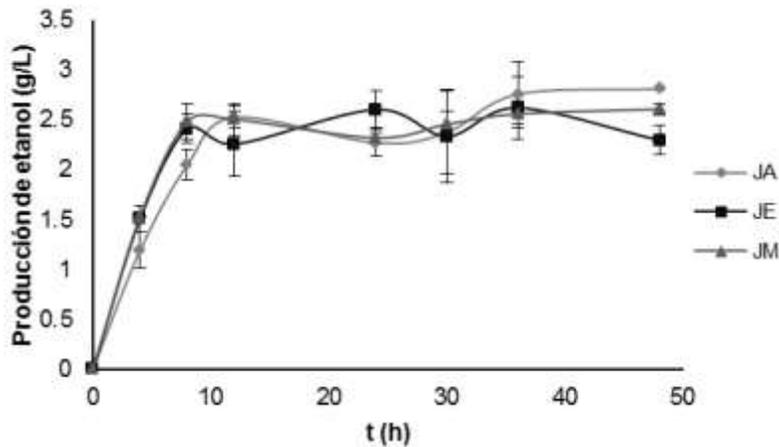


Figura 20 Producción de etanol a partir de hidrolizados de podas de Jatropha. JA: ácido ($P(>F)=1.38e-05$); JE: enzimático ($P(>F)=9.11e-05$); JM ácido/enzimático=0.504 ($P(>F)=8.51e-08$).

En cuanto al crecimiento celular (Figura 21), se observa un mayor crecimiento en JE. Sin embargo, analizando la producción de etanol se esperaba un comportamiento similar, es decir, se esperaba un crecimiento celular similar para los 3 casos.

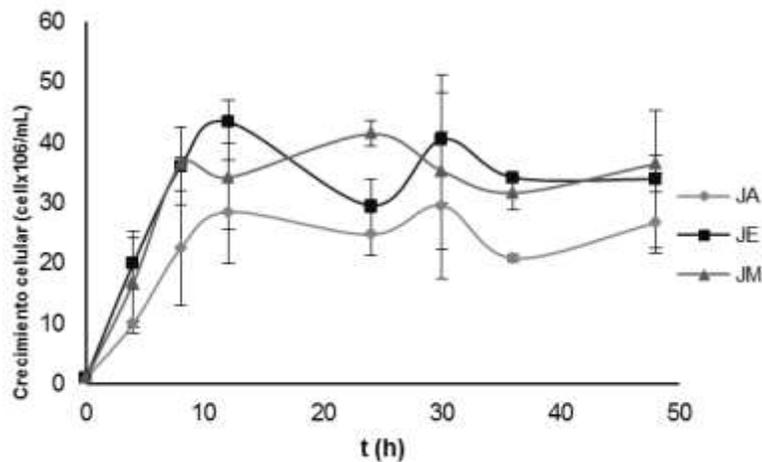


Figura 21 Crecimiento celular de *K. marxianus* SLP1, durante la fermentación de hidrolizados de podas de Jatropha. JA: hidrolizados ácido; JE: hidrolizado enzimático; JM: Mezcla hidrolizados ácido y enzimático relación=0.504.

Al analizar estos resultados, podemos deducir que es mejor trabajar los hidrolizados de manera conjunta, y se corroboran estos resultados con el rendimiento respecto a la biomasa inicial, siendo de 0.037 para JM y 0.035 para

JA más JE, por tanto se sugiere trabajar con la mezcla de hidrolizados, ahorrando 12 h de tiempo.

3.4. Conclusiones

El uso de diseño estadísticos experimentales permitió la optimización de las condiciones de hidrólisis enzimática, lo que ayuda a tener un mejor aprovechamiento de ambas biomásas.

Estos resultados muestran que las condiciones óptimas para sacarificar PT y PJ son diferentes, lo que resalta la importancia de recurrir a una optimización de la sacarificación de cada biomasa para lograr los máximos rendimientos de azúcares.

El análisis del proceso fermentativo sugiere el poder realizar los experimentos en un tiempo de 12 h para las podas de *Jatropha* y de 24 horas para la paja de trigo. Finalmente, se tiene que es posible usar la mezcla de hidrolizados, para ahorrar tiempo en el proceso de fermentación.

Capítulo 4 Evaluación del proceso de fermentación alcohólica en un CSTR acoplado a extracción de vacío.

4.1. Resumen

El uso de reactores para la producción de etanol es importante si se quiere escalar el proceso a nivel piloto e industrial. Debido a lo anterior, en este capítulo se estudió un proceso de fermentación alcohólica usando como levadura *Kluyveromyces marxianus* SLP1, en un reactor CSTR. Adicional a esto se acopló un sistema de vacío al reactor con el objetivo de evaluar el impacto que tiene el vacío en el proceso. La alimentación del reactor consistió en una mezcla de hidrolizados ácido y enzimático para las dos biomásas (capítulo 3).

4.2. Materiales y métodos

4.2.1. Activación Levaduras

La activación de la levadura se realizó en medio YPD (20 g/L de glucosa, 20 g/L de peptona y 10 g/L de extracto de levadura) pH 4.5, 30°C y 225 rpm.

4.2.2. Preparación de hidrolizados

Los reactores fueron alimentados con una mezcla de hidrolizado ácido y enzimático, para ambas biomásas, usando una relación Acido/enzimático (volumen) de 0.504 y 0.671 para las podas de *Jatropha* y paja de trigo, respectivamente.

El hidrolizado ácido fue preparado de acuerdo al capítulo 2. Al término de la hidrólisis ácida, la fracción sólida fue lavada y secada para pasar a la hidrólisis enzimática. La hidrólisis enzimática se realizó bajo condiciones óptimas (capítulo 3). La caracterización de las mezclas de hidrolizados se enlista en la Tabla 17, después de ajustar el pH a 4.5.

Tabla 17 Caracterización de los hidrolizados alimentados al reactor. AR: azúcares reductores, HMF:5-(hidroximetil)furfural

	Mezcla podas de Jatropha	Mezcla paja de trigo
AR (g/L)	18.67±0.14	40.31±1.44
HMF (ppm)	6.5±1.05	45.29±7.97
Furfural (ppm)	1.19±1.53	4.51±0.62
Vanilina (ppm)	N/D	N/D ^{***}
Siringaldehído (ppm)	6.47±9.14	9.32±13.18

*** N/D: no detectado

4.2.3. Reactor sin vacío

Un CSTR de vidrio con un volumen de 2 litros y una chaqueta de calentamiento FAM2000 marca Eseve® fue utilizado. El reactor estaba conectado a una unidad PLC Prendo® para su control, con sensores de temperatura, pH y oxígeno disuelto. Se mantuvo a una temperatura de 30°C, un pH de 4.5 y una agitación de 100 rpm, utilizando un volumen de trabajo de 1.5 L, inoculando un 10% de levaduras con una concentración celular de 1×10^6 cel/mL. El reactor se operó en cultivo en lote durante 24 h. Se tomaron muestras intermedias para determinar azúcares reductores, etanol y concentración celular.

4.2.4. Reactor con vacío

Se utilizó el mismo reactor usado en el apartado 4.2.3, sólo que la salida del reactor estaba conectada a un sistema de vacío, compuesto por una columna de condensación Eseve®, un controlador de vacío Heb® (VC-400) y una bomba de vacío Diphragm Heb® (GM-0.20) (Figura 22). La columna de condensación fue enfriada con anticongelante comercial concentrado al 70% marca Roshfrans®, usando un chiller.

Se aplicó vacío en forma de ciclos, trabajando a vacío el sistema 15 min y 15 min a presión atmosférica. El vacío generado fue de 32 kPa para la paja de trigo y de 23 kPa para las podas de Jatropha. El proceso de fermentación se detuvo después de 24 h tomando muestras intermedias, para determinar azúcares reductores, etanol y concentración celular. Adicionalmente se determinó la concentración de etanol en el líquido recuperado en la columna de condensación.

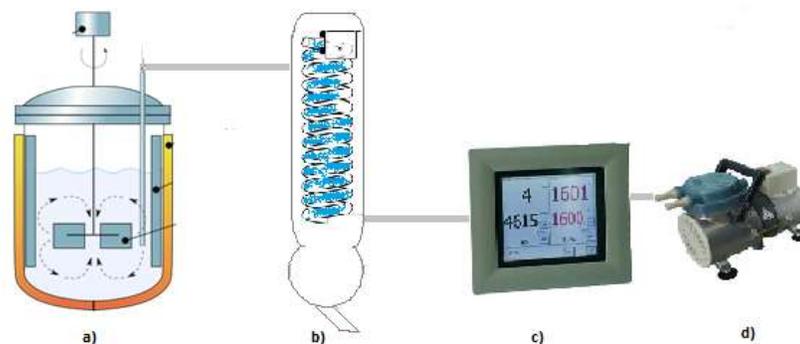


Figura 22 Configuración reactor con vacío. a) CSTR, b) Columna de condensación. c) Controlador de vacío d) Bomba de vacío.

4.2.5. Determinaciones analíticas y cálculos

El etanol producido se analizó en un cromatógrafo de gases Agilent technologies 6890N FID, usando una columna Agilent J&W DB-624 UI (60 m*0.32 mm*1.8 μ m). La productividad de etanol (velocidad de producción del etanol) se calculó como el etanol producido dividido entre el tiempo de fermentación en la fase exponencial (g/L*h). El rendimiento de etanol será definido como gramos totales de etanol producido (en el reactor y en la columna de condensación) entre gramos de biomasa utilizada (antes de la hidrólisis ácida) (g/g) (Huang et al. 2015). La determinación de masa celular se realizó usando una cámara de Neubauer en un microscopio Motic® BA300.

La cantidad de azúcares reductores consumidos durante la fermentación fue determinada por el método del ácido 3,5-dinitrosalicílico (Miller 1959).

4.2.6. Análisis Estadístico

Se realizó una prueba de ANOVA para determinar si existen diferencias entre la productividad de etanol obtenida para cada biomasa con y sin vacío, así como una prueba de Duncan para encontrar cual es el mejor resultado, usando el software RStudio® 3.2.0.

4.3. Resultados y discusión

El proceso de fermentación en el reactor (Figura 23) presentó un patrón diferente al observado en el proceso de fermentación en botellas (Figura 16 y Figura 19), ya que en el caso de reactor, las levaduras presentaron una fase de latencia (aproximadamente 8 h) antes de que comenzaran a consumir los azúcares presentes. Este periodo de latencia no se observa en la fermentación en botellas, debido a que la activación y el proceso de fermentación se llevan a cabo en botellas agitadas a través de la incubadora, mientras que la agitación del reactor es mediante aspas. Sin embargo, después del proceso de adaptación, las levaduras consumen rápidamente los azúcares dentro del reactor. La cantidad de azúcares consumidos fue de 17.66 y 17.35 g AR/L para los hidrolizados de paja con y sin vacío, respectivamente. Para la fermentación de hidrolizados de podas de *Jatropha* se consumen 8.17 y 7.48 g AR/L con y sin vacío.

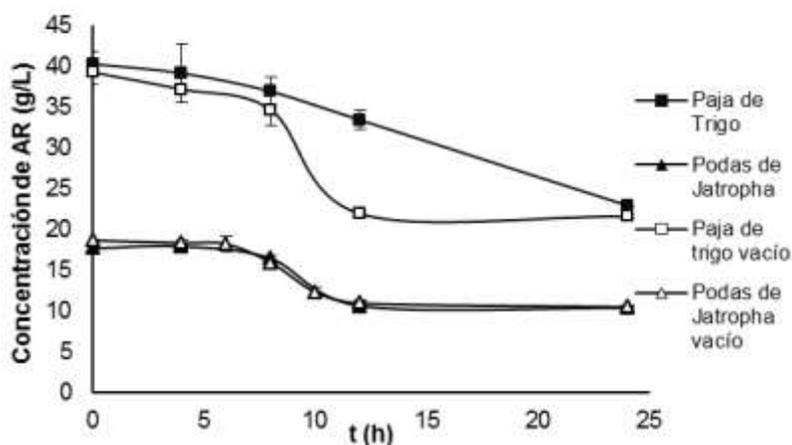


Figura 23 Cinética de consumo de azúcares reductores en el reactor CSTR, con y sin aplicación de ciclos de vacío.

El etanol producido (Figura 24) presenta una variación cuando se aplican los ciclos de vacío, comparado con la fermentación desarrollada a presión atmosférica. Esta variación se aprecia en los hidrolizados de paja de trigo, donde se tiene un aumento en la producción de etanol del 17.82% cuando se usa vacío.

Se alcanzó una productividad de 0.64 y 0.26 g/L*h para la paja de trigo con y sin vacío, respectivamente. La prueba ANOVA para la productividad ($P(>F)=0.00744$) muestra que sí existen diferencias significativas, siendo el mejor tratamiento las pruebas con vacío (Duncan). Para el caso de las podas de Jatropha, se alcanza una productividad de 0.36 y 0.26 g/L*h, con y sin vacío, respectivamente; sin embargo, no se aprecia un cambio considerable a causa de la aplicación de vacío, y se corrobora con el análisis estadístico ($P(>F)= 0.107$). El efecto del vacío se observa en la paja de trigo, esto tal vez se debe a que para este caso se tiene una mayor cantidad de etanol y por tanto más proximidad a la inhibición por producto, si la cantidad de etanol fuera mayor, el efecto de vacío sería más pronunciado.

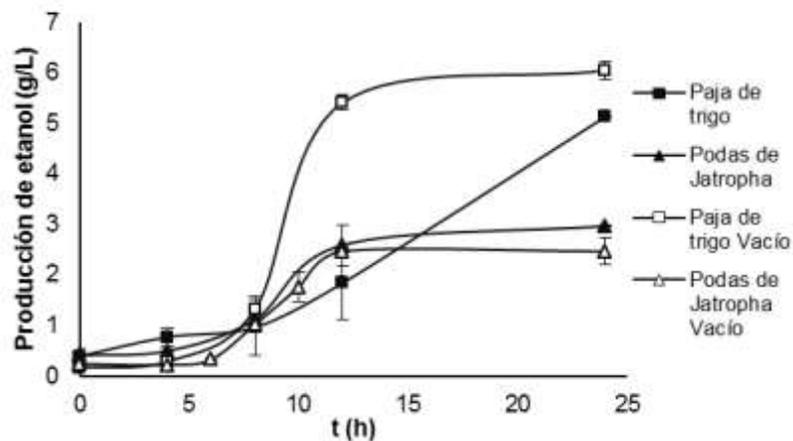


Figura 24 Producción de etanol en el reactor CSTR con y sin ciclos de vacío. La curva de aplicación de vacío incluye la cantidad de etanol presente en la columna de condensación.

El crecimiento de las células bajo presión de vacío presentó un comportamiento similar y en ambos casos aumentó el crecimiento cuando se aplicó el vacío (Figura 25).

Para el caso de la aplicación de vacío se observa claramente la fase estacionaria que aparece después de las 12 h, así como la fase de crecimiento de las 6 h a las 12 h, mientras que la fase lag no se ve muy marcada.

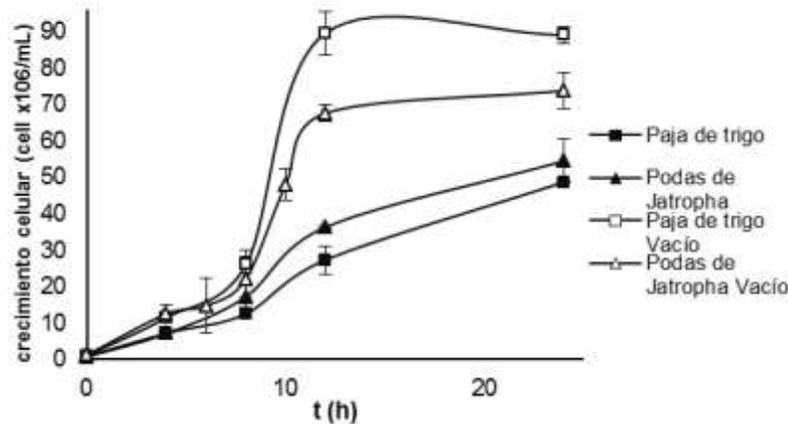


Figura 25 Crecimiento celular de *K. marxianus* SLP1 en el reactor CSTR con y sin ciclos de vacío, para las dos biomazas

El vacío, al ser una técnica de extracción, permite remover el etanol del caldo de fermentación, obteniendo un etanol más puro con una concentración mayor. Adicionalmente, se tiene que la técnica de extracción por vacío, permite la separación de los compuestos responsables de la coloración y el etanol, ya que la mezcla etanol-agua de la columna de fermentación se presentaba incolora. Esto pudiera deberse a la diferencia entre puntos de evaporación, siendo más elevado para los compuestos que proporcionan color.

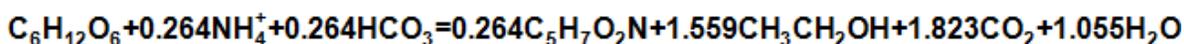
El rendimiento obtenido en litros del etanol por tonelada de biomasa puede apreciarse en la Tabla 18, donde se alcanzan 110.7 L/ton para el hidrolizado de paja de trigo sometido a vacío. Esta cantidad corresponde a lo obtenido de etanol cuando se usa remolacha como materia prima (Manochio et al. 2017). Para la podas de Jatropha se alcanzan rendimientos muy por debajo de los obtenidos para cuando se utiliza caña de azúcar, por tanto es importante analizar las causas que originan una baja producción de etanol a pesar de tener una alta cantidad de holocelulosa. La razón principal podría ser elevado porcentaje de lignina que presenta de manera cruda, cercano al 21%, por otro lado el elevado índice de cristalinidad que impide la conversión de celulosa durante la hidrólisis enzimática.

Tabla 18 Rendimiento de etanol para las diversas biomazas.

Materia prima	L/ton	Referencia
Paja de trigo	93.96	Este trabajo
Paja de trigo con vacío	110.70	
Podas de Jatropha	49.22	
Podas de Jatropha con vacío	40.90	
Remolacha Azucarera	100-110	Tomado de (Manochio et al. 2017)
Caña de azúcar	70-90	
Maíz	360-460	

En función a la cantidad de azúcares consumidos es posible determinar la cantidad de etanol que pudiera generarse mediante estequiometría. Es posible obtener 1.559 moles de etanol por cada mol de glucosa, tal como se observa en la Ecuación 9.

Ecuación 9



Considerando que la mayoría de los azúcares reductores consumidos se derivan del hidrolizado enzimático, teniendo glucosa como producto principal, se puede calcular el etanol esperado (Tabla 19).

Tabla 19 Comparación entre el etanol esperado y el etanol producido.

	Azúcar Consumida (g/L)	Etanol esperado (g/L)	Etanol producido (g/L)
Paja de trigo	17.35	6.92	5.13
Podas de Jatropha	7.48	2.98	2.97
Paja de trigo con vacío	17.66	7.04	6.04
Podas de Jatropha con vacío	8.17	3.26	2.47

El etanol producido durante la fermentación en el reactor, para los 4 casos, es inferior al valor esperado; sin embargo, la variación no es muy importante. Para el caso de la paja de trigo, el vacío permite acercarse más al valor esperado, alcanzado un 86%. La variación puede ser causada por la levadura *K. marxianus* SLP1, ya que puede producir alcoholes superiores, tales como isobutanol, 1-

propanol y alcohol isoamílico (Arellano-plaza & Gschaedler 2013), por lo que parte de los azúcares consumidos pudieron usarse para producir esos alcoholes, sin embargo, no se realizó la determinación de éstos. Las podas de *Jatropha* presentan una mayor aproximación cuando no se trabaja con vacío, ya que casi se alcanza un 100% respecto del valor esperado. Para el caso de las podas de *Jatropha* se observa que a pesar de que se producen cantidades similares de etanol, no se alcanza la misma eficiencia de producción (99.66 y 75.77% sin vacío y con vacío, respectivamente); esto se debe a que se tiene una mayor producción de células cuando se aplica vacío (Figura 25), por lo que parte de los azúcares consumidos fue usado para dicho fin.

4.4. Conclusiones

La aplicación de vacío tiene un efecto positivo en los hidrolizados de paja de trigo debido a que aumenta la concentración de etanol, por lo cual la extracción in-situ ayuda a evitar una posible inhibición por producto. La fermentación del hidrolizado de podas de *Jatropha* no tuvo un efecto significativo cuando se aplicó vacío.

Se observa una fase de adaptación por parte de la levadura para consumir los azúcares, debido a la diferencia entre las condiciones de agitación en la activación y en el reactor.

El rendimiento en función a la biomasa usada inicialmente para cada biomasa es de 110.70 L/ton para la paja de trigo con vacío, muy cercano al valor reportado para la remolacha azucarera. El rendimiento para las podas de *Jatropha* con vacío fue de 40.9 L/ton.

La cantidad de etanol producido fue muy cercano al valor esperado en función a los azúcares consumidos, la variación se debe tal vez a la formación de alcoholes superiores, los cuales no fueron determinados.

Capítulo 5 Conclusiones generales y perspectivas

5.1 Conclusiones generales

Cuatro contribuciones importantes pueden ser resaltadas de esta tesis y que sin lugar a dudas serán de gran utilidad para posteriores desarrollos de este tema.

La primera contribución, es referente a la caracterización de ambos materiales lignocelulósicos, donde se observa que el contenido de holocelulosa para la paja de trigo es de 62.47 ± 0.56 %. Mientras que las podas de *Jatropha* presentaron una cantidad de 60.53 ± 0.68 % y 52.98 ± 0.63 %, sin corteza y con corteza, respectivamente. Por otro lado, se presenta un IC de ~58% para ambas podas de *Jatropha* y 48.08% para la paja de trigo, lo que nos indica que es más difícil degradar la celulosa presente en las podas de *Jatropha*, ya que es más cristalina.

El segundo aspecto a resaltar, es el estudio del impacto que tiene la corteza de las podas de *Jatropha* en la liberación de azúcares. Se obtuvo una mayor producción de azúcares reductores durante la hidrólisis ácida cuando no se tenía presencia de corteza; sin embargo, el análisis estadístico en función a la eficiencia de sacarificación indica que no existen diferencias significativas al utilizar las podas sin corteza ($P(>F) = 0.143$). Esto concuerda con el análisis realizado para la eficiencia de sacarificación de la hidrólisis enzimática ($P(>F) = 0.283$) en los experimentos con y sin corteza. Por tanto se optó por utilizar las podas con corteza, evitando así, costos adicionales por el proceso de descortezado.

La optimización del proceso de hidrólisis enzimática, permitió encontrar las condiciones que incrementan la producción de azúcares. Los resultados indican que las condiciones que favorecen la hidrólisis enzimática para la paja de trigo son: 50.34 g/L de sustrato, 24 h, 43.24 °C y un valor de pH de 4.98; mientras que para las podas de *Jatropha* se obtuvieron los siguientes valores: 50.44 g/L de sustrato, 24 h y 5.13 de pH. Bajo las condiciones mencionadas anteriormente se alcanzaron 21.94 (84.94% del valor predicho) y 7.49 (99.34% de los predicho) g/L de AR, para la paja de trigo y las podas de *Jatropha*, respectivamente.

Finalmente, se evaluó el efecto que tiene aplicar presión de vacío durante la fermentación etílica, encontrándose un efecto positivo cuando se utilizan hidrolizados de paja de trigo, aumentando la producción de etanol un 17.82%; Sin embargo, no se tiene un aumento significativo en las podas de *Jatropha*. El efecto es más marcado en la paja de trigo, debido a que se tiene una producción de etanol más elevada, acercándose más a la concentración inhibitoria, por lo que retirar el etanol del caldo de fermentación favorece la producción.

5.2 Perspectivas

Diversas actividades pueden realizarse con el objetivo de enriquecer las investigaciones realizadas, dentro de los que destacan:

- 1 Una pretratamiento adicional pudiera ser necesario para las podas de *Jatropha*, con el objetivo de aumentar el rendimiento en la producción de azúcares reductores durante la hidrólisis enzimática.
- 2 La caracterización del condensado obtenido en la columna, con el objetivo de saber ver que compuestos, además del etanol y el agua, son arrastrados.
- 3 Es importante la realización de una optimización de la etapa de fermentación, que permita incrementar el porcentaje de etanol y poder así ver más marcado el impacto de la aplicación de vacío. Dentro de las actividades a realizar están: evaluar diversas levaduras que puedan consumir en su totalidad los azúcares presentes, mezclar el hidrolizado con algún otro producto para tener una mayor cantidad de AR y por tanto una elevada concentración de etanol. Así mismo, buscar las condiciones de temperatura, pH y agitación que favorezcan el proceso.
- 4 Finalmente, encontrar las condiciones óptimas para el uso de la extracción por vacío para cada uno de los hidrolizado, es decir la presión necesaria y el tiempo de aplicación.

Referencias

- (APHA), A.P.H.A., 1998. *Total, fixed and volatile solids in solid and semisolid samples*. 20a ed.,
- Abdehagh, N., Tezel, F.H. & Thibault, J., 2013. No Title. *Adsorption*, 19, p.1263.
- Aeropuertos y Servicios Auxiliares, 2015. BIOturbosina ::: Biocombustibles de aviación. Available at: http://plandevuelo.asa.gob.mx/es_mx/BIOturbosina/Biocombustibles_de_aviacion [Accessed February 29, 2016].
- Agarwal, A.K., 2007. Biofuels (alcohols and biodiesel) applications as fuels for internal combustion engines. *Progress in Energy and Combustion Science*, 33(3), pp.233–271.
- Alshehria, A.N.Z., Ghanem, K.M. & Al-garni, S.M., 2016. Application of a five level central composite design to optimize operating conditions for electricity generation in a microbial fuel cell. *Integrative Medicine Research*, 10(6), pp.797–804. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jtusci.2015.01.004>.
- Apar, D.K. & Özbek, B., 2004. □ -Amylase inactivation during corn starch hydrolysis process. *Process Biochemistry*, 39, pp.1877–1892.
- Arantes, V. & Saddler, J., 2010. Access to cellulose limits the efficiency of enzymatic hydrolysis: the role of amorphogenesis. *Biotechnology*. Available at: <https://biotechnologyforbiofuels.biomedcentral.com/articles/10.1186/1754-6834-3-4> [Accessed May 10, 2017].
- Arellano-plaza, J.A.M. & Gschaedler, A., 2013. Performance evaluation of *Pichia kluyveri*, *Kluyveromyces marxianus* and *Saccharomyces cerevisiae* in industrial tequila fermentation.
- Arreola-vargas, J. et al., 2015. Bioresource Technology Methane production from acid hydrolysates of Agave tequilana bagasse : Evaluation of hydrolysis conditions and methane yield. *BIORESOURCE TECHNOLOGY*, 181, pp.191–

199. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2015.01.036>.

Arreola-Vargas, J. et al., 2013. Hydrogen production from acid and enzymatic oat straw hydrolysates in an anaerobic sequencing batch reactor: Performance and microbial population analysis. *International Journal of Hydrogen Energy*, 38(32), pp.13884–13894.

Atag, 2009. Beginner's Guide to Aviation Biofuels. *Enviro*, (May), p.24. Available at: WWW.enviro.aero.

Axelsson, L. et al., 2012. Jatropha cultivation in southern India: assessing farmers' experiences. *Biofuel, Bioproducts & Biorefining*, 6(3), p.246.

Azzam, A.M., 1989. Pretreatment of cane bagasse with alkaline hydrogen peroxide for enzymatic hydrolysis of cellulose and ethanol fermentation. *Environmental Science and Health*, 24(4), pp.421–433.

Baeyens, J. et al., 2015. Challenges and opportunities in improving the production of bio-ethanol. *Progress in Energy and Combustion Science*, 47, pp.60–88. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pecs.2014.10.003>.

Bai, F.W., Anderson, W.A. & Moo-young, M., 2008. Ethanol fermentation technologies from sugar and starch feedstocks. *Biotechnology Advances*, 26, pp.89–105.

Bengston, G. et al., 1991. Recovery of ABE fermentation products by integrated pervaporation. *Conference on prevaporation Process*, p.508.

Bradford, M.M., 1976. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. , 254, pp.248–254.

Brittaine, R., 2010. *Jatropha: A Smallholder Bioenergy Crop The Potential for Pro-Poor Development* FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS,

- Browning, B.L., 1967. Crystallinity and accessibility. In *Methods of Wood Chemistry*. U.S.A.: Wiley, pp. 499–518.
- Buaban, B. et al., 2010. Bioethanol production from ball milled bagasse using an on-site produced fungal enzyme cocktail and xylose-fermenting *Pichia stipitis*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 110(1), pp.18–25. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiosc.2009.12.003>.
- BYOGY Renewables, 2011. Alcohol To Jet (ATJ) emerging through ASTM. *ICAO aviation and sustainable alternative fuels workshop*.
- Calibo, R.L. et al., 1987. Ethanol stripping by pervaporation using porous PTFE membrane. *Fermentation Tehcnology*, 65, pp.665–674.
- Camara, M.S. et al., 2016. *DISEÑO EXPERIMENTAL Y OPTIMIZACIÓN DE SISTEMAS*,
- Cardona, C.A., 2007. Fuel ethanol production : Process design trends and integration opportunities. , 98, pp.2415–2457.
- Caspeta, L. et al., 2014. Enzymatic hydrolysis at high-solids loadings for the conversion of agave bagasse to fuel ethanol. *Applied Energy*, 113, pp.277–286. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0306261913006028> [Accessed March 10, 2016].
- Chang, V.S., Burr, B. & Holtzapple, M.T., 1997. Lime pretreatment of switchgrass. *Applied biochemistry and biotechnology*, 63–65(4), pp.3–19. Available at: <http://link.springer.com/article/10.1007/BF02920408>.
- Ćilerdžić, J., Stajić, M. & Vukojević, J., 2016. Degradation of wheat straw and oak sawdust by *Ganoderma applanatum*. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 114, pp.39–44. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0964830516301834>.
- COP 21, 2015. COP 21 Paris France Sustainable Innovation Forum 2015 working

with UNEP. Available at: <http://www.cop21paris.org/>.

Coughlan, M.P. & Ljungdahl, L.G., 1988. Comparative biochemistry of fungal and bacterial cellulolytic enzyme system. *Biochemistry and Genetics of Cellulose Degradation*.

CropEngies AG, 2006. Bioethanol & CropEnergies AG. Available at: <http://www.cropenergies.com/en/Bioethanol/> [Accessed September 5, 2016].

Cysewski, G.R. & Wilke, R., 1977. Rapid ethanol fermentation using vacuum and cell recycle. *Biotechnology and Bioenergy*, 19, pp.1125–1143.

Department of Defense, U.S. of A., 2013. DETAIL SPECIFICATION TURBINE FUEL , AVIATION , KEROSENE TYPE , JP-8 (NATO F-34), NATO F-35 , and JP-8 + 100 (NATO F-37) . , (December), pp.1–25.

Diaz, A. et al., 2013. Pretreatment of rice hulls with alkaline peroxide to enhance enzyme hydrolysis for ethanol production. *Chemical Engineering Transactions*, 32, pp.949–954.

Díaz Velilla, J.P., 2015. *Sistemas de Energía Renovables Primera.*, Madrid, España: Paraninfo SA. Available at: https://books.google.com.mx/books?id=sKR9CAAAQBAJ&pg=PA177&dq=material+lignocelulósico&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwjdx3l_LnOAhUUUWMKHYSZCKwQ6AEILzAF#v=onepage&q=material+lignocelulósico&f=false.

Eckert, G. & Schugerl, K., 1987. No Title. *Appl. Microbiol Biotechnol*, 27, p.221.

Edrisi, S.A. et al., 2015. *Jatropha curcas* L.: A crucified plant waiting for resurgence. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 41, pp.855–862. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.rser.2014.08.082>.

El-sheekh, M.M. et al., 2016. Application of Plackett – Burman design for the high production of some valuable metabolites in marine alga *Nannochloropsis oculata*. *The Egyptian Journal of Aquatic Research*, 42(1), pp.57–64. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejar.2015.10.001>.

- Ennis, B.M., Qureshi, N. & Maddox, I.S., 1987. Inline toxic product removal during solvent production by continuous fermentation using immobilized *Clostridium acetobutylicum*. *Enzyme and microbial Technology*, 9, p.672.
- Evans, P.J. & Wang, H.W., 1988. Enhancement of butanol fermentation by *Clostridium acetobutylicum* in the presence of decanol-oleyl alcohol mixed extractants. *Appl Environ Microbiol*, 54, p.1662.
- Exxon Mobil Aviation, 2005. World Jet Fuel Specifications. , pp.1–47.
- FAO, 2012. *Breakout session P1.1 National Food Security – The Wheat Initiative – an International Research Initiative for Wheat Improvement*, Available at: [http://www.fao.org/docs/eims/upload/306175/Briefing Paper \(3\)-Wheat Initiative - Hélène Lucas.pdf](http://www.fao.org/docs/eims/upload/306175/Briefing Paper (3)-Wheat Initiative - Hélène Lucas.pdf).
- Finn, R.K. & Ramalingam, A., 1977. No Title. *Biotechnology and Bioenergy*, 19, p.583.
- Friedl, A., Qureshi, N. & Maddox, I.S., 1991. No Title. *Biotechnology and Bioenergy*, 20, p.528.
- García, A. et al., 2014. Dilute sulphuric acid pretreatment and enzymatic hydrolysis of *Jatropha curcas* fruit shells for ethanol production. *Industrial Crops and Products*, 53, pp.148–153. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.12.029>.
- Garcia, A., Iannotti, E.L. & Fischer, J.L., 1986. Butanol fermentation liquor production and separation by reverse osmosis. *Biotechnology and Bioenergy*, 28, p.785.
- Geddes, C.C. et al., 2010. Optimizing the saccharification of sugar cane bagasse using dilute phosphoric acid followed by fungal cellulases. *Bioresource Technology*, 101(6), pp.1851–1857. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2009.09.070>.
- Gee, G.W. & Or, D., 2002. 2.4 Particle-Size Analysis. In *Methods of soil analysis*.

- Part, 4 Physical Methods*. Soil Science Society of America, pp. 255–293.
- Ghose, T.K., Roychoudhury, P.K. & Ghosh, P., 1984. Simultaneous Saccharification and Fermentation. *Biotechnology*, XXVI, pp.377–381.
- Global Carbon Project, 2016. Outreach | Global Carbon Atlas. Available at: <http://www.globalcarbonatlas.org/?q=en/outreach> [Accessed February 27, 2016].
- Gómez-Tovar, F. et al., 2012. Chemical and enzymatic sequential pretreatment of oat straw for methane production. *Bioresource Technology*, 116, pp.372–378. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2012.03.109>.
- Groot, W. & Luyben, K., 1987. No Title. *Biotechnol Lett*, 9, p.867.
- Groot, W. & Luyben, K., 1986. No Title. *Appl Microbial Biotechnol*, 25, p.29.
- Groot, W.J., Van den Oever, C.E. & Kossen, N.W.F., 1984. Pervaporation for simultaneous product recovery in the butanol/isopropanol batch fermentation. *Biotechnol Lett*, 6, p.709.
- Guerra-Rodríguez, E. et al., 2012. Acid hydrolysis of wheat straw: A kinetic study. *Biomass and Bioenergy*, 36, pp.346–355. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852415014157>.
- Gupta, A. & Verma, J.P., 2015. Sustainable bio-ethanol production from agro-residues: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 41, pp.550–567. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.rser.2014.08.032>.
- Gutiérrez-Antonio, C. et al., 2017. A review on the production processes of renewable jet fuel. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 79(October 2016), pp.709–729. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.rser.2017.05.108>.
- Hahn-Hägerdal, B. et al., 2006. Bio-ethanol - the fuel of tomorrow from the residues of today. *Trends in Biotechnology*, 24(12), pp.549–556.
- He, Y. et al., 2012. Recent advances in membrane technologies for bioengineering

- and bioenergy production. *Biotechnology Advances*, 30, pp.817–858.
- Heller, J., 1996. *Physic nut Jatropha Curcas*,
- Honorato da Silva, F.L., Rodrigues, M.I. & Maugeri, F., 1999. Dynamic modelling , simulation and optimization of an extractive continuous alcoholic fermentation process Fla. *J Chem Technol Biotech*, 74, pp.176–182.
- Hossain, M.N. Bin, Basu, J.K. & Mamun, M., 2015. The Production of Ethanol from Micro-Algae Spirulina. *Procedia Engineering*, 105(Icte 2014), pp.733–738.
- Huang, H. et al., 2015. Ethanol Production from Food Waste at High Solids Content with Vacuum Recovery Technology. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(10), pp.2760–2766. Available at: <http://dx.doi.org/10.1021/jf5054029>.
- loelovich, M., 2015. Recent findings and the energetic potential of plant biomass as a renewable source of biofuels - A review. *BioResources*, 10(1), pp.1879–1914. Available at: http://ojs.cnr.ncsu.edu/index.php/BioRes/article/view/BioRes_10_1_Loelovich_Review_Plant_Biomass_Renewable_Source_Biofuels.
- Isaza Delgado, J.F. & Campos Romero, D., 2007. *Cambio Climático: Glaciaciones y calentamiento global* Primera., Bogotá, Colombia. Available at: <https://books.google.com.mx/books?id=pfQ2lhHM3D0C&printsec=frontcover&dq=Isaza+Delgado&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwjV86Sg1u7OAhULzWMKHR S5AEoQ6AEIGzAA#v=onepage&q=Isaza Delgado&f=false>.
- Ishida, K. & Shimizu, K., 1996. Novel repeated batch operation for flash fermentation system: experimental data and mathematical modelling. *J Chem Technol Biotech*, 66, p.34.
- Jackson, R.B. et al., 2015. Two or three degrees CO2 emissions and global temperature impacts. *The Bridge*, 45(2), pp.16–21. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0169721810020058>.

- Kandaramath, T., Yaakob, Z. & Binitha, N.N., 2015. Aviation biofuel from renewable resources : Routes , opportunities and challenges. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 42, pp.1234–1244. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.rser.2014.10.095>.
- Karagözz, P. et al., 2012. Alkaline peroxide pretreatment of rapeseed straw for enhancing bioethanol production by Same Vessel Saccharification and Co-Fermentation. *Bioresource Technology*, 104, pp.349–357.
- Keys, J.E., Van Soest, P.J. & Young, E.P., 1969. Comparative Study of the Digestibility of Forage Cellulose and Hemicellulose in Ruminants and Nonruminants. *Journal of Animal Science*, 29(1), p.11. Available at: <https://www.animalsciencepublications.org/publications/jas/abstracts/29/1/JAN0290010011> [Accessed May 11, 2017].
- Kratzein, M. & Müller, J., 2009. Energy from seed shells of *Jatropha Curcas*. *Landtech*, 64, p.391.
- Kumar, R. et al., 2014. Investigating *Jatropha* prunings as a feedstock for producing fermentable sugars and chemical treatment for process optimization. *Journal of Renewable and Sustainable Energy*, 6(3), p.33118. Available at: <http://scitation.aip.org/content/aip/journal/jrse/6/3/10.1063/1.4880215>.
- Kumar, R., Singh, S. & Singh, O. V., 2008. Bioconversion of lignocellulosic biomass: Biochemical and molecular perspectives. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 35(5), pp.377–391. Available at: <http://link.springer.com/article/10.1007/s10295-008-0327-8>.
- Le, J.H. et al., 1981. Vacuum fermentation for ethanol-production using strains of *Zymomonasmobilis*. *Biotechnol Lett*, 3, p.177.
- Lee, D. et al., 1994. Evaluation of the enzymatic susceptibility of cellulosic substrates using specific hydrolysis rates and enzyme adsorption. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 45–46(1), pp.407–415. Available at:

<http://link.springer.com/article/10.1007/BF02941815>.

- Lee, J., 1997. Biological conversion of lignocellulosic biomass to ethanol. *Journal of Biotechnology*, 56(1), pp.1–24. Available at:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9246788>.
- Lee, J. et al., 2008. Recent developments of key technologies on cellulosic ethanol production. *Journal of Scientific and Industrial Research*, 67(November), pp.865–873. Available at:
[http://nopr.niscair.res.in/bitstream/123456789/2430/1/JSIR 67\(11\) 865-873.pdf](http://nopr.niscair.res.in/bitstream/123456789/2430/1/JSIR_67(11)_865-873.pdf).
- Lee, J.H. et al., 1981. Vacuum fermentation for ethanol production using strains of *Zymomonas mobilis*. *Biotechnology Letters*, 3(4), pp.177–182.
- Lenihan, P. et al., 2010. Dilute Acid Hydrolysis of Lignocellulosic Biomass. *Chemical Engineering Journal*, 156(2), pp.395–403.
- Li, K. et al., 2016. Optimization of pretreatment , enzymatic hydrolysis and fermentation for more efficient ethanol production by Jerusalem artichoke stalk. *Bioresource Technology*, 221, pp.188–194. Available at:
<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2016.09.021>.
- Louime, C. & Uckelmann, H., 2008. Cellulosic ethanol: Securing the planet future energy needs. *International Journal of Molecular Sciences*, 9(5), pp.838–841. Available at: <http://www.mdpi.com/1422-0067/9/5/838>.
- Lu, X., Zhang, Y. & Angelidaki, I., 2009. Optimization of H₂SO₄-catalyzed hydrothermal pretreatment of rapeseed straw for bioconversion to ethanol : Focusing on pretreatment at high solids content. *Bioresource Technology*, 100(12), pp.3048–3053. Available at:
<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2009.01.008>.
- Lu, Y.L. & Mosier, N., 2008. Current technologies for fuel ethanol production from lignocellulosic plant biomass. *Genetic improvement of bioenergy crops*, (3),

pp.161–182. Available at: http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-0-387-70805-8_6.

- Manochio, C. et al., 2017. Ethanol from biomass : A comparative overview. , 80(February), pp.743–755.
- María, L. & Jiménez, G., 2015. Superficies de Respuesta mediante un Diseño Central Compuesto. , pp.31–36.
- Mariano, A. et al., 2012. No Title. *J Chem Technol Biotech*, 87, p.334.
- Mariano, A.P., Qureshi, N. & Ezeji, T.C., 2011. Bioproduction of butanol in bioreactors: New insights from simultaneous in situ butanol recovery to eliminate product toxicity. *Biotechnology and Bioenergy*, 108, p.1757.
- Marques, F., 2009. El objetivo es el bagazo. *PESQUISA FAPESP*, pp.32–36.
- Masran, R. et al., 2016. Harnessing the potential of ligninolytic enzymes for lignocellulosic biomass pretreatment. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(12), pp.5231–5246. Available at: <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-016-7545-1>.
- Matsumura, M. & Markl, H., 1986. Elimination of ethanol inhibition by perstraction. *Biotechnology and Bioenergy*, 28, p.534—541.
- McMillan, J.D., 1994. *Pretreatment of Lignocellulosic Biomass* M. E. Himmel, J. O. Baker, & R. . Overend, eds., American Chemical Society.
- Menon, V. & Rao, M., 2012. Trends in bioconversion of lignocellulose: Biofuels, platform chemicals & biorefinery concept. *Progress in Energy and Combustion Science*, 38(4), pp.522–550. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pecs.2012.02.002>.
- Mielenz, J.R., 2001. Ethanol production from biomass: technology and commercialization status. *Current opinion in microbiology*, 4(3), pp.324–329. Available at:

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1369527400002113>.

Miller, G., 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, 31, pp.426–428.

Moniruzzaman, M., Yaakob, Z. & Khatun, R., 2016. Biotechnology for Jatropha improvement : A worthy exploration. , 54, pp.1262–1277.

Montane, D. et al., 1998. Application of steam explosion to the fractionation and rapid vapor-phase alkaline pulping of wheat straw. *Biomass and Bioenergy*, 14(3), pp.261–276.

Montero, G. et al., 2016. Higher heating value determination of wheat straw from Baja California, Mexico. *Energy*, 109, pp.612–619.

Montgomery, D.C., 2014. *Diseño y análisis de experimentos* 2nd ed., Universidad estatal de Arizona: Limusa Wiley.

Mosier, N. et al., 2005. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*, 96(6), pp.673–686.
Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15588770>.

Nguyen, Q.A. & Saddler, J.N., 1991. An integrated model for the technical and economic evaluation of an enzymatic biomass conversion process. *Bioresource Technology*, 35(3), pp.275–282.

Nguyen, V.D. et al., 2009. Effect of Vacuum on Ethanol Fermentation. *J. Applied Sciences*, 9(17), pp.3020–3026.

Nguyen, V.D. et al., 2011. Vacuum fermentation integrated with separation process for ethanol production. *Biochemical Engineering Journal*, 55(3), pp.208–214.
Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bej.2011.05.001>.

Nielson, L. et al., 1988. Adsorbents for extractive bioconversion applied to the acetone butanol fermentation. *Appl Microbial Biotechnol*, 28, pp.335–33.

Nunes, M.D. et al., 2014. Jatropha seed cake supplementation for improved fungal

- growth and later use as animal feed Mateus. *African Journal of Agricultural Research*, 8(38), pp.3457–3462. Available at:
<http://www.academicjournals.org/journal/AJAR/article-abstract/375F3A640396>.
- Oliva, J., 2003. *Efectos de los productos de degradacion originados en la explosión por vapor de biomasa de chopo sobre Kluyveromyces marxianus*. Universidad Complutense de MADrid. Available at:
<http://biblioteca.ucm.es/tesis/bio/ucm-t26833.pdf>.
- Olmo, M. & Nave, R., HyperPhysics. *hidratos de carbono*. Available at:
<http://hyperphysics.phy-astr.gsu.edu/hbasees/organic/carb.html>.
- Orozco-gonzález, N., Bustamante, F. & Acosta-cardenas, A., 2016. Experimental assessment of the integration of in situ removal of ethanol by pervaporation with a simultaneous saccharification – fermentation process. *SCI*, (52).
- Palmqvist, E. & Hahn-Hägerdal, B., 2000a. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. I: Inhibition and detoxification. *Bioresource Technology*, 74(1), pp.17–24.
- Palmqvist, E. & Hahn-Hägerdal, B., 2000b. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: Inhibitors and mechanisms of inhibition. *Bioresource Technology*, 74(1), pp.25–33.
- Park, C., Okos, M.R. & Wankat, P.C., 1991. Acetone-Butanol-Ethanol (ABE) Fermentation and Simultaneous Separation in a Trickle Bed Reactor? , pp.185–194.
- Paulova, L. et al., 2015. Lignocellulosic ethanol : Technology design and its impact on process efficiency. *Biotechnology Advances*, 33(6), pp.1091–1107. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2014.12.002>.
- Pemex, F., 2011. Hoja de Datos de Seguridad. , pp.1–12. Available at:
<http://www.pemex.com/comercializacion/productos/HDS/refinados/HDSS-201Turboquinas.pdf>.

- Peña-Maravilla, M. et al., 2017. CELLULASES AND XYLANASES PRODUCTION BY *Penicillium citrinum* CGETCR USING COFFEE PULP IN SOLID STATE FERMENTATION. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 16(3), pp.757–769. Available at: <http://rmiq.org/ojs/index.php/rmiq/article/view/116/40>.
- Phillips, R.N.I.Æ.D.D.Æ.D.A.S., 2008. The hydrolysis and recrystallisation of lyocell and comparative cellulosic fibres in solutions of mineral acid. , pp.241–254.
- PLACKETT, R.L. & BURMAN, J.P., 1946. THE DESIGN OF OPTIMUM MULTIFACTORIAL EXPERIMENTS. *Biometrika*, 33(4), pp.305–325.
- Planning Commission, G.O.I., 2003. Report of the committee on development of biofuel. , p.214. Available at: http://planningcommission.gov.in/reports/genrep/cmtt_bio.pdf.
- Prasad, S., Singh, A. & Joshi, H.C., 2007. Ethanol as an alternative fuel from agricultural, industrial and urban residues. *Resources, Conservation and Recycling*, 50(1), pp.1–39. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0921344906001285>.
- Pratt, J.H. et al., 2002. Malawi Agroforestry Extension Project Marketing & Enterprise Program Main Report. \, (47), pp.1–139.
- Preeti, V.E. et al., 2012. An evaluation of chemical pretreatment methods for improving enzymatic saccharification of chili postharvest residue. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 167(6), pp.1489–1500.
- Priyanka, K., Sahu, P.L. & Singh, S., 2017. Optimization of processing parameters for the development of *Ficus religiosa* L. extract loaded solid lipid nanoparticles using central composite design and evaluation of antidiabetic efficacy. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jddst.2017.08.006>.
- Quintero Núñez, M. & Moncada Aguilar, A., 2008. Contaminación y control de las quemadas agrícolas en Imperial , California , y Mexicali , Baja California. *Región*

Y Sociedad, 20(43). Available at:

<http://www.scielo.org.mx/pdf/regsoc/v20n43/v20n43a1.pdf>.

Qureshi, N. & Blaschek, H.P., 2000. Butanol production using *Clostridium beijerinckii* BA101 hyper-butanol producing mutant strain and recovery by pervaporation. *Appl Microbial Biotechnol*, 17, pp.175–184.

Reilly, J.M., 2015. Impacts on Resources and Climate of Projected Economic and Population Growth Patterns. *The Bridge*, 45(2), pp.6–15.

Rincón Martínez, J.M. & Silva Lora, E., 2014. *Bioenergía: Fuentes, conversión y sustentabilidad - Google Libros* Primera., Bogota, Colombia. Available at: [https://books.google.com.mx/books?id=YpnxCAAQBAJ&pg=PA141&dq=composicion+del+material+lignocelulósico&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwizqYSK3bLOAhVD42MKHWONCskQ6AEIITAB#v=onepage&q=composicion del material lignocelulósico&f=false](https://books.google.com.mx/books?id=YpnxCAAQBAJ&pg=PA141&dq=composicion+del+material+lignocelulósico&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwizqYSK3bLOAhVD42MKHWONCskQ6AEIITAB#v=onepage&q=composicion%20del%20material%20lignocelulósico&f=false).

Rittmann, B.E. & McCarty, P.L., 1996. *Environmental Biotechnology: Principles and Applications*,

Rivera Lorca, J. & Vera, J.K., 1997. Chemical composition of three different varieties of *J. curcas* from Mexico. Biofuels and industrial products from *Jatropha curcas*. *Graz*, pp.47–55.

Rocha, G.J. de M. et al., 2011. Dilute mixed-acid pretreatment of sugarcane bagasse for ethanol production. *Biomass and Bioenergy*, 35(1), pp.663–670. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biombioe.2010.10.018>.

Roychoudhury, P.K., Tyagi, R.. & Ghose, T.K., 1980. *Proceedings of the Bioconversion Symposium*,

Saha, B.C. et al., 2005. Dilute acid pretreatment, enzymatic saccharification and fermentation of wheat straw to ethanol. *Process Biochemistry*, 40(12), pp.3693–3700.

Saha, B.C. et al., 2013. Hydrothermal pretreatment and enzymatic saccharification

- of corn stover for efficient ethanol production. *Industrial Crops and Products*, 44, pp.367–372. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.11.025>.
- Saha, B.C. et al., 2015. Pilot scale conversion of wheat straw to ethanol via simultaneous saccharification and fermentation. *Bioresource Technology*, 175, pp.17–22. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2014.10.060>.
- Saini, J.K. et al., 2016. Improvement of wheat straw hydrolysis by cellulolytic blends of two *Penicillium* spp. *Renewable Energy*, 98, pp.43–50. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.renene.2016.01.025>.
- Sánchez, Ó.J. & Cardona, C.A., 2008. Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks. *Bioresource Technology*, 99(13), pp.5270–5295. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852407009376>.
- Sarkar, N. et al., 2012. Bioethanol production from agricultural wastes: An overview. *Renewable Energy*, 37(1), pp.19–27. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.renene.2011.06.045>.
- Saxena, R.C., Adhikari, D.K. & Goyal, H.B., 2009. Biomass-based energy fuel through biochemical routes: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 13(1), pp.167–178. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1364032107001256>.
- Shah, S.R. et al., 2013. Application of Plackett – Burman screening design for preparing glibenclamide nanoparticles for dissolution enhancement. *Powder Technology*, 235, pp.405–411. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.powtec.2012.10.055>.
- Sharif Rohani, A., Mehrani, P. & Thibault, J., 2015. Comparison of in-situ recovery methods of gas stripping, pervaporation, and vacuum separation by multi-objective optimization for producing biobutanol via fermentation process. *Canadian Journal of Chemical Engineering*, 93(6), pp.986–997.

- Shihadeh, J.K. et al., 2013. Design of a vacuum flashing system for high-solids fermentation of corn. *Trans ASABE*, 56, pp.1441–1447.
- Shihadeh, J.K. et al., 2014. Vacuum stripping of ethanol during high solids fermentation of corn. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 173(2), pp.486–500.
- SIAP, 2017. *Atlas Agroalimentario 2017*, México D.F.
- SIAP., 2016. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. Available at: <http://www.gob.mx/siap/>.
- Singh, D.P. & Trivedi, R.K., 2013. Acid and alkaline pretreatment of lignocellulosic biomass to produce ethanol as biofuel. *International Journal of ChemTech Research*, 5(2), pp.727–734.
- Singh, R.N.Ã. et al., 2008. SPRERI experience on holistic approach to utilize all parts of *Jatropha curcas* fruit for energy. , 33, pp.1868–1873.
- Slapack, G.E., Russell, I. & Stewart, G.G., 1987. *Thermophilic microbes in ethanol production*, United States: CRC Press Inc. Boca Raton, FL.
- Srilekha Yadav, K. et al., 2011. Bioethanol fermentation of concentrated rice straw hydrolysate using co-culture of *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia stipitis*. *Bioresource Technology*, 102(11), pp.6473–6478. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2011.03.019>.
- STATGRAPHICS, 2006. *Diseño de experimentos- Diseño de Superficie de Respuesta*,
- Sun, Y. & Cheng, J., 2002. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production : a review q. *Bioresource and technology*, 83(1), pp.1–11. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12058826>.
- Taherzadeh, M.J., Eklund, R. & Gustafsson, L., 1997. Characterization and fermentation of dilute-acid hydrolysates from wood. *Industrial & Engineering*

Chemistry, 36, pp.4659–4665.

Taherzadeh, M.J. & Karimi, K., 2007. Acid-based hydrolysis processes for ethanol from lignocellulosic materials: a review. *Bioresources*, 2(3), pp.472–499.

Takeshi, Y. ed., 2012. Green Energy and Technology. In Kyoto Japan: Springer, pp. 1–467.

Taylor, F. et al., 2010. Bioresource Technology Continuous high-solids corn liquefaction and fermentation with stripping of ethanol q. *Bioresource Technology*, 101(12), pp.4403–4408. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2010.01.092>.

Taylor, F. et al., 1997. Effects of ethanol concentration and stripping temperature on continuous fermentation rate. , pp.311–316.

The International Volcanic Health Hazard Network, 2017. Guia Para El Analisis De la Distribucion. Available at: http://www.ivhhn.org/index.php?option=com_content&view=article&id=108 [Accessed May 6, 2017].

Tong, Z., Pullammanappallil, P. & A.A., T., 2012. How ethanol is made from cellulosic biomass constituents of cellulosic biomass. *Agriculture and Biological Engineering*.

Topare, N.S. et al., 2011. Biodiesel Production from Jatropha Curcas. *Int J Chem Sci*, 6, p.1607.

Tran, D.T., I, Y.P. & Lin, C.W., 2013. Developing co-culture system of dominant cellulolytic *Bacillus* sp. THLA0409 and dominant ethanolic *Klebsiella oxytoca* THLC0409 for enhancing ethanol production from lignocellulosic materials. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 44(5), pp.762–769. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jtice.2013.01.028>.

U.S. Energy Information Administration, 2016. *Monthly Energy Review*, Washington DC.

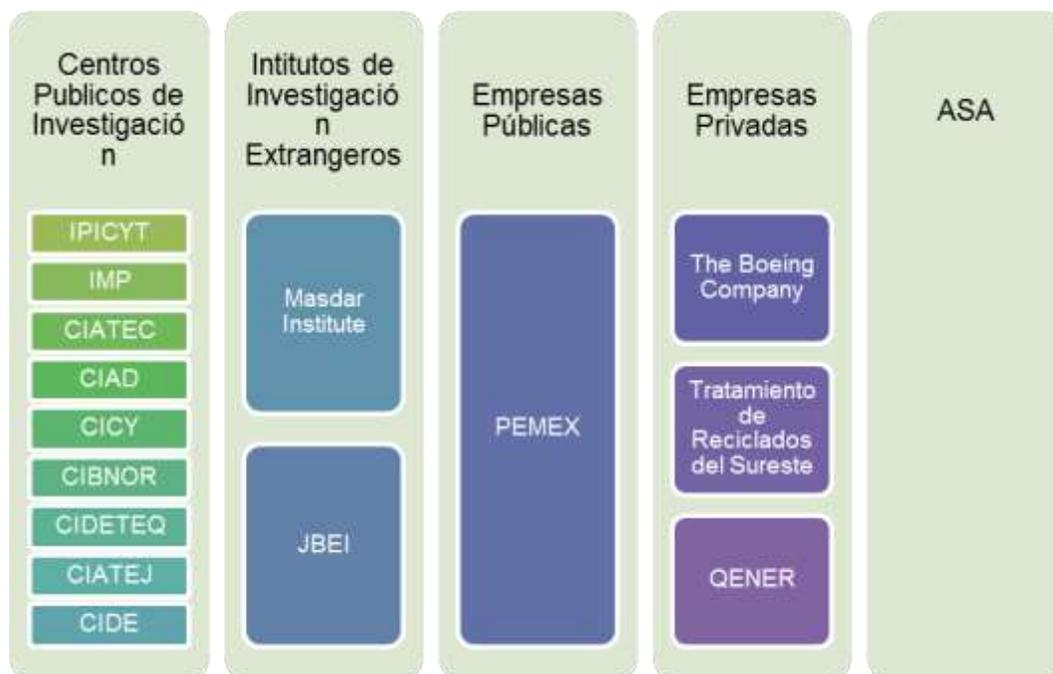
- US Energy Information Administration, 2013. What fuel are made of crude oil?
- Valdes, S. & Pacheco, M., 1998. *Bosque* 19th ed. F. de C. de la U. A. de C. Forestales, ed., Chile.
- Vane, L.M., 2005. A Review of Pervaporation for Product Recovery From Biomass Fermentation Process A review of pervaporation for product recovery from biomass fermentation processes †. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 80, pp.603–629.
- Wang, S. et al., 1999. Optimization of Fermentation Temperature and Mash Specific Gravity for Fuel Alcohol Production. *Cereal Chem*, 76, pp.82–86.
- Wang, W.-C. & Tao, L., 2016. Bio-jet fuel conversion technologies. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 53, pp.801–822.
- Wei, P. et al., 2014. A review of membrane technology for bioethanol production. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 30, pp.388–400. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.rser.2013.10.017>.
- Wyman, C., 1996. *Handbook on Bioethanol: Production and Utilization*, Washington DC.
- Wyman, C.E., 1999. BIOMASS ETHANOL: Technical Progress, Opportunities, and Commercial Challenges. *Annual Review of Energy and the Environment*, 24(1), pp.189–226. Available at: <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.energy.24.1.189>.
- Wyman, C.E., 2008. Cellulosic Ethanol: A Unique Sustainable Liquid Transportation Fuel. *MRS Bulletin*, 33(4), pp.381–383.
- Wyman, C.E. et al., 2005. Comparative sugar recovery data from laboratory scale application of leading pretreatment technologies to corn stover. *Bioresource Technology*, 96(18 SPEC. ISS.), pp.2026–2032. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16112491>.

- Wyman, C.E., Spindler, Diane, D. & Grohmann, K., 1992. SIMULTANEOUS AND FERMENTATION OF SEVERAL LIGNOCELLULOSIC FEEDSTOCKS TO FUEL ETHANOL. *Biomass and Bioenergy*, 3(5), pp.301–307.
- Yan, H. & Barbosa-Canovas, G.V., 1997. Size characterization of selected food powders particle size distribution functions. *Food Science and Technology International*, 3, pp.361–369.
- Yang, B. & Wyman, C. e., 2008. Perspective: Jatropha cultivation in southern India: Assessing farmers' experiences. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 2, pp.26–40.
- Zabed, H. et al., 2016. Fuel ethanol production from lignocellulosic biomass: An overview on feedstocks and technological approaches. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 66, pp.751–774. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1364032116304695>.

Anexos

Anexo A. Integrantes del clúster de bioturbosina

El clúster está conformado por: 10 centros públicos de investigación, 2 institutos de investigación extranjeros, 1 empresa pública y 3 empresas privadas (figura 2), los cuales estarán trabajando de manera sinérgica.



Estructura del clúster

Anexo B. Soluciones para determinación de fibras.

a) Fibra Detergente Neutra (FDN)

Solución detergente Neutra (DN): Colocar 30 g de dodecilsulfato sódico (SDS), 18.61 g de EDTA sal disódica dihidratada, 6.81 g de borato de sodio, 4.56 g de fosfato de sodio dibásico anhidro y 10 mL de trietilenglicol en 1 L de agua destilada. Agitar y calentar.

Colocar 24 bolsas filtro en el recipiente del analizador de fibras ANKOM y agregar 2 L de solución DN, 4 mL de α -amilasa y 20 g de sulfito de sodio. Calentar y agitar por 75 min.

Retirar la solución y agregar 2 L de agua destilada y 4 mL α -amilasa, agitar y calentar por 5 min. Repetir 2 veces más, una con α -amilasa y la otra sólo con agua destilada.

b) Fibra Detergente ácida (FDA)

Solución detergente ácida (DA): Agregar 20 g de bromuro de cetiltrimetilamonio CTAB a 1 L de H₂SO₄ 1N.

Después del tratamiento FDN, colocar las 24 bolsas filtro en el recipiente del analizador de fibras ANKOM y agregar 2 L de solución DA, agitar y calentar por 60 min.

Retirar la solución DA y agregar 2 L de agua destilada, agitar y calentar por 5 min. Repetir 2 veces más.

c) Lignina detergente ácida (LDA)

Después del tratamiento FDA, colocar las bolsas en un vaso de precipitados de 500 mL, y agregar de 250-300 mL de H₂SO₄ al 72%. Colocar dentro del vaso de precipitados un matraz de aforo de 250 mL y usarlo para apretar y liberar las bolsas dentro del ácido. Repetir 30 veces cada 30 min durante 3 h. Posteriormente, retirar el ácido y enjuagar las bolsas con agua destilada hasta pH neutro.

Al término de cada tratamiento (FDN, FDA y LDA), después de realizar los respectivos enjuagues, sumergir las bolsas en acetona, para retirar el agua de las bolsas. Secar en acetona en la campana y colocar las bolsas en la estufa a 105 °C.

La determinación de fibras termina con la calcinación de las bolsas después del tratamiento LDA, a 525°C por 3 h.

Anexo C. Resultados de los análisis estadísticos

- **ANOVA selección de biomasa tratamiento ácido en función de eficiencia**

> summary(model)

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
biomasa	1	5.861	5.861	5.529	0.143
Residuals	2	2.120	1.060		

> comp<-duncan.test(model, "biomasa", alpha = 0.05)

> comp

\$groups

	trt	means	M
1	sincorteza	50.12060	a
2	corteza	47.69966	a

- ANOVA selección de biomasa tratamiento enzimático

> summary(model)

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
biomasa	1	3.120	3.120	2.121	0.283
Residuals	2	2.942	1.471		

- ANOVA y Duncan optimización tiempo para “Paja de trigo”

>summary(model)

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
tiempo	6	850.6	141.77	32.66	8.93e-05 ***
Residuals	7	30.4	4.34		

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

> comp<-duncan.test(model, "tiempo", alpha = 0.05)

> comp

\$groups

	trt	means	M
1	cuarentayoch	23.215	a
2	veintiocho	22.715	ab
3	veinticuatro	21.945	ab
4	doce	17.675	bc
5	ocho	15.780	c
6	cuatro	10.170	d
7	cero	0.000	e

- Prueba ANOVA y Duncan optimización tiempo para “Podas de Jatropha”

> summary(model)

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
tiempo	5	81.28	16.26	18.91	0.0013 **
Residuals	6	5.16	0.86		

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

> comp<-duncan.test(model, "tiempo", alpha = 0.05)

> comp
\$groups

	trt	means	M
1	cuarentayocho	7.490	a
2	veinticuatro	7.490	a
3	doce	5.345	ab
4	ocho	4.580	b
5	cuatro	3.100	b
6	cero	0.000	c

- ANOVA etanol en botella paja de trigo (PM)

> summary(model)

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
tiempo	6	40.04	6.674	27.33	0.000161 ***
Residuals	7	1.71	0.244		

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

> comp<-duncan.test(model, "tiempo", alpha = 0.05)

> comp
\$groups

	trt	means	M
1	cuarentayocho	4.762644	a
2	doce	4.642448	a
3	treintayseis	4.623025	a
4	veinticuatro	4.353354	a
5	ocho	3.725287	a
6	cuatro	1.802490	b
7	cero	0.000000	c

- ANOVA etanol en botella paja de trigo (PE)

> summary(model)

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
tiempo	6	104.24	17.374	31.39	0.000102 ***
Residuals	7	3.87	0.554		

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

> comp<-duncan.test(model, "tiempo", alpha = 0.05)

> comp
\$groups

	trt	means	M
1	veinticuatro	7.647509	a
2	treintayseis	7.345301	ab

3	cuarentayocho	5.862737	ab
4	doce	5.651042	b
5	ocho	3.230642	c
6	cuatro	1.485575	cd
7	cero	0.000000	d

- ANOVA etanol en botella paja de trigo (PA)

>summary(model)

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
tiempo	6	8.764	1.4606	11.82	0.00233 **
Residuals	7	0.865	0.1236		

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

> comp<-duncan.test(model, "tiempo", alpha = 0.05)

> comp

\$groups

	trt	means	M
1	veinticuatro	2.3856335	a
2	doce	2.3514543	a
3	treintayseis	1.8176085	a
4	ocho	1.8013049	a
5	cuarentayocho	1.6766837	ab
6	cuatro	0.8513748	b
7	cero	0.0000000	c

- ANOVA etanol en botella podas de Jatropha (JM)

> summary(model)

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
tiempo	7	11.360	1.6229	145.5	8.51e-08 ***
Residuals	8	0.089	0.0112		

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

> comp<-duncan.test(model, "tiempo", alpha = 0.05)

> comp

\$groups

	trt	means	M
1	cuarentayocho	2.608806	a
2	treintayseis	2.560447	ab
3	doce	2.505914	ab
4	ocho	2.486696	ab
5	treinta	2.457650	ab
6	veinticuatro	2.321334	b
7	cuatro	1.533170	c
8	cero	0.000000	d

- ANOVA etanol en botella podas de Jatropha (JE)

> summary(model)

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
tiempo	7	10.858	1.5512	24.02	9.11e-05 ***
Residuals	8	0.517	0.0646		

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

> comp<-duncan.test(model, "tiempo", alpha = 0.05)

> comp

\$groups

	trt	means	M
1	treintayseis	2.621078	a
2	veinticuatro	2.604651	a
3	ocho	2.410754	a
4	treinta	2.338029	a
5	cuarentayocho	2.297321	a
6	doce	2.257787	a
7	cuatro	1.509868	b
8	cero	0.000000	c

- ANOVA etanol en botella podas de Jatropha (JA)

> summary(model)

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
tiempo	7	12.758	1.8226	39.54	1.38e-05 ***
Residuals	8	0.369	0.0461		

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

> comp<-duncan.test(model, "tiempo", alpha = 0.05)

> comp

\$groups

	trt	means	M
1	cuarentayocho	2.813219	a
2	treintayseis	2.758407	ab
3	doce	2.525560	abc
4	treinta	2.376969	abc
5	veinticuatro	2.270554	bc
6	ocho	2.050345	c
7	cuatro	1.194649	d
8	cero	0.000000	e

- ANOVA rendimiento etanol fermentación en botellas paja de trigo

> summary(model)

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Hidrolizado	1	0.0002917	2.917e-04	4.925	0.157
Residuals	2	0.0001184	5.921e-05		

- **ANOVA y Duncan para aplicación de vacío Paja de trigo (PRODUCTIVIDAD)**

> summary(model)

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
operacion	1	0.14141	0.14141	132.8	0.00744 **
Residuals	2	0.00213	0.00106		

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

> comp<-duncan.test(model, "operacion", alpha = 0.05)

> comp

\$groups

	trt	means	M
1	convacio	0.63955	a
2	sinvacio	0.26350	b

- **ANOVA y Duncan para aplicación de vacío Podas de Jatropha (PRODUCTIVIDAD)**

> summary(model)

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
operacion	1	0.009101	0.009101	4.541	0.167
Residuals	2	0.004008	0.002004		

Anexo D. Resultados del DCC para usarse a escala Industrial (considerando como única variable de respuesta AR)

- **Paja de trigo**

Variable	Valor	Unidades
Sustrato	90.83	g/L
pH	4.94	
Temperatura	39.22	°C
AR (predicho)	38.57	g/L

- **Podas de Jatropha**

Variable	Valor	Unidades
Sustrato	88.28	g/L
pH	4.73	
AR (predicho)	9.375	g/L

Anexo E. Balance de Masa

- **Paja de trigo**

	Iniciales	Después de hidrólisis ácida	Al término de hidrólisis enzimática
Compuesto	g		
Compuestos solubles	25.52	6.55	9.13
Hemicelulosa	18.45	0.42	0.34
Celulosa	31.52	23.24	11.28
Lignina	3.86	6.23	6.05
Cenizas	0.64	0.36	0.38

- **Podas de Jatropha**

	Iniciales	Después de hidrólisis ácida	Al término de hidrólisis enzimática
Compuesto	g		
Compuestos solubles	22.17	4.98	7.32
Hemicelulosa	8.92	0.37	0.56
Celulosa	38.76	24.78	18.34
Lignina	19.64	17.44	14.92
Cenizas	0.50	0.27	0.20