

---

---

**INSTITUTO TECNOLÓGICO DE ORIZABA**  
**DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN**

“OPTIMIZACIÓN DE LA HIDRÓLISIS ÁCIDA Y MEJORAMIENTO DEL  
PROCESO FERMENTATIVO DEL BAGAZO DE SORGO DULCE  
EMPLEANDO LEVADURA *Pichia stipitis* PARA LA OBTENCIÓN DE  
BIOETANOL”

TRABAJO PROFESIONAL (OPCIÓN I)  
TÉSIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:  
MAESTRO EN CIENCIAS EN INGENIERÍA QUÍMICA

PRESENTA:  
I.Q. IRIS PAOLA VIVEROS REYES

DIRECTORES DE TESIS:  
DRA. LETICIA LÓPEZ ZAMORA  
DRA. MARÍA GUADALUPE AGUILAR USCANGA

# *Dedicatorias*

*A ti, mi Dios, por el regalo más grande, la vida. Por permitirme estar donde me encuentro hoy. Por ser nuestro creador, amparo y fortaleza.*

*A mí preciosa madre por apoyarme incondicionalmente, por ser mi fortaleza en los momentos de desesperación y porque sin su ejemplo no podría ser quien soy.*

*Al amor de mi vida Alberto, que siempre ha creído en mí y me ha impulsado en cada paso que doy. Por todo este tiempo que hemos estado juntos, el cual ha sido maravilloso. No solo te dedico estas páginas escritas si no mi vida entera.*

*A mis asesoras de tesis la Dra. María Guadalupe Aguilar Uscanga quien me recibió gratamente en su laboratorio. A la Dra Guadalupe Luna Solano y la Dra Yolanda Sonia Pliego Bravo que se tomaron un pequeño espacio en revisar este trabajo, por sus consejos para mejorar. Y en especial a la Dra. Leticia López Zamora por haberme dado la oportunidad de formar parte de su equipo de investigación, guiarme durante el desarrollo de la misma y transmitirme sus conocimientos.*

*Por supuesto al maestro Germán, amigo, compañero y consejero, por su entrega, paciencia y gran disponibilidad para apoyarme en este proyecto. Y no podían faltar mis queridos amigos (Cesar, Rubí, Yusani, Ricardo, Edith, Dany, Alma, Alex, Elío, Juve, Shely, Citlalli, Lalo, Roberto y Kevin) con los cuales compartí momentos muy agradables y también de mucho trabajo.*

*A CONACYT por el apoyo económico brindado para la realización de este proyecto. Así también a personas que conocí a lo largo de este camino y que me orientaron mucho (Francisco, Inés y Betsi). Y por último y no menos importante a mi pequeño Bruno, mi compañero fiel y leal que ha traído a mi vida una gran felicidad.*

## RECONOCIMIENTOS

Las presentaciones en congresos y publicación obtenida de esta tesis se enlistan a continuación.

### PRESENTACIONES EN CONGRESOS

- 2013 Expositor Optimización del tratamiento ácido de bagazo de sorgo dulce empleando un diseño de experimentos. Coloquio de Investigación Multidisciplinaria (CIM). Evento Internacional 24 y 25 de Octubre. Instituto Tecnológico de Orizaba, México.
- 2014 Expositor Maximization of glucose production using hydrogen peroxide as an alkaline pretreatment of sweet sorghum bagasse. 9° Encuentro Nacional de Biotecnología del IPN. Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada Tlaxcala. México.

### PUBLICACIÓN

P. Viveros Reyes, L. López Zamora, G. Partida Sedas, M. G. Aguilar Uscanga. 1<sup>st</sup> Biotechnology World Symposium. "Maximization of glucose production using hydrogen peroxide as an alkaline pretreatment of sweet sorghum bagasse". Journal of Chemical, Biological and Physical Sciences E- ISSN: 2249 –1929, Vol. 4 No 3 (ii) Special Issue; 13 Oct.-16 Oct.2014.Tlaxcala. Mexico.

## RESUMEN

### Optimización de la hidrólisis ácida y mejoramiento del proceso fermentativo del bagazo de sorgo dulce empleando levadura *Pichia stipitis* para la obtención de bioetanol

**Elaborada por:** I.Q. Iris Paola Viveros Reyes  
**Dirigida por:** Dra. Leticia López Zamora  
Dra. María Guadalupe Aguilar Uscanga

El futuro agotamiento de los combustibles fósiles aunado a la ascendente demanda energética, determinan la actual tendencia en la búsqueda de materiales viables para la obtención de biocombustibles como vía alternativa energética. El bioetanol, puede ser obtenido a partir de diversas materias primas ricas en azúcares, almidones y celulosa, siendo durante su producción, el pretratamiento la etapa limitante, ya que representa el mayor costo del proceso, por lo cual debe ser estudiado para lograr una tecnología eficiente y económica. En una etapa posterior al pretratamiento se obtiene una solución de azúcares fermentables, la cual contiene principalmente glucosa, así como pentosas resultantes de la hidrólisis inicial de la hemicelulosa. Estos azúcares son convertidos a etanol mediante el uso de ciertos microorganismos especializados, que pueden utilizar uno o varios azúcares presentes en el material pretratado o hidrolizado. El bagazo de sorgo dulce, representa un material viable por sus mínimos requerimientos y alta resistividad, por lo que es propuesto en el presente trabajo como fuente generadora de azúcares fermentables (proveniente de la zona de Cotaxtla, Ver.). Primeramente para solubilizar la fracción de hemicelulosa de la biomasa y hacer la celulosa más accesible a las enzimas, se llevó a cabo el pretratamiento con una solución de ácido sulfúrico diluido ( $H_2SO_4$ ), mediante un diseño experimental Box-Behnken, teniendo como variables independientes: concentración de  $H_2SO_4$  (1, 1.5 y 2 % v/v), tiempo de pretratamiento (20, 30 y 40 min) y relación líquido-sólido (RLS) de 4, 5 y 6 mL/g y como variable de respuesta la concentración de xilosa (g/L). Posteriormente para llevar a cabo la deslignificación, se aplicó el tratamiento alcalino con peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), teniendo como variables independientes: la concentración de  $H_2O_2$  (3.5, 4.5 y 5.5 % v/v), tiempo de pretratamiento (15, 25 y 35 h) y RLS (10, 17 y 24 mL/g) y como variable de respuesta la concentración de glucosa (g/L). Finalmente la cinética de fermentación se llevó a cabo utilizando la levadura *Pichia stipitis*, proponiéndose un diseño Box-Behnken con las variables: concentración de urea (1, 1.5 y 4 g/L), sulfato de magnesio heptahidratado ( $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ): 0.4, 1.2 y 2 g/L y fosfato de potasio monobásico ( $KH_2PO_4$ ): 3, 4.5 y 6 g/L, y como variables de respuesta: rendimiento y productividad de etanol (cuantificadas mediante cromatografía líquida de alta resolución). Los resultados mostraron durante la etapa de hidrólisis ácida rendimientos de aproximadamente 68 % de azúcares provenientes de la hemicelulosa (principalmente xilosa), al utilizarse una concentración de  $H_2SO_4 = 1.5$  %, tiempo = 40 min y RLS de 4:1, obteniendo una conversión de 39.58 g/L; resultado cercano al valor óptimo de conversión de xilosa de 38.92 g/L obtenido mediante la sustitución de las variables: RLS = 4:1, tiempo = 36 min y concentración de  $H_2SO_4 = 1.4$  % (de acuerdo a las gráficas de contornos), en el modelo obtenido mediante regresión cuadrática. Para la etapa del tratamiento alcalino se obtuvo un máximo de conversión de 47.47 g/L de glucosa mediante las variables obtenidas de los gráficos de contornos: RLS = 18.11:1, tiempo = 27.04 h y concentración de  $H_2O_2 = 4.65$  %, en el modelo cuadrático obtenido y comprobado mediante el análisis canónico. Finalmente durante el proceso fermentativo se obtuvo un rendimiento de etanol de 0.43 g/g, (dentro de los rangos reportados por La Grage *et al.*, 2010), resultado comprobado mediante la localización del punto estacionario con los valores: Urea = 4.05 g/L;  $MgSO_4 \cdot 7H_2O = 1.34$  g/L y  $KH_2PO_4 = 2.70$  g/L.

## ABSTRACT

### Acid hydrolysis optimization and sweet sorghum bagasse fermentative process improvement by using *Pichia stipitis* yeast for bioethanol production

**By:** I.Q. Iris Paola Viveros Reyes  
**Advsior:** Dra. Leticia López Zamora  
Dra. María Guadalupe Aguilar Uscanga

The future depletion of fossil fuels coupled with rising energetic demand, determine the current trend in the search of viable materials which can be used in the production of biofuels as an alternative energy way. Bioethanol can be produced from various raw materials rich in sugars, starches and cellulose, being during production, pretreatment and enzymatic hydrolysis, the limiting steps, as they represent the most expensive part of the process, therefore both must be studied to achieve an efficient and economical technology. In a later stage to pretreatment, a fermentable sugars solution is obtained, which mainly contains glucose, as well as pentoses generated during the initial hemicellulose. These sugars are converted to ethanol by certain specialized microorganisms usage, which may use one or more sugars contained in the hydrolysate or pretreated material. Sweet sorghum bagasse represents a viable material because of its minimum requirements and high resistivity, so it is proposed in this paper as a source of fermentable sugars (from the area of Cotaxtla, Ver.). First to solubilize the hemicellulose fraction of biomass and make the cellulose accessible to enzymes, a pretreatment with diluted sulfuric acid ( $H_2SO_4$ ) was carried out using a Box-Behnken experimental design, taking as independent variables: concentration of  $H_2SO_4$  (1, 1.5 and 2 % v/v), pretreatment time (20, 30 and 40 min) and liquid-solid ratio (LSR) 4, 5 and 6 mL/g and as a response variable xylose concentration (g/L). Then for delignification stage, an alkali treatment with hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) was applied, by using the independent variables:  $H_2O_2$  concentration (3.5, 4.5 and 5.5 % v/v), pretreatment time (15, 25 and 35 h) and LSR (10, 17 and 24 mL/g) and as a response variable glucose concentration (g/L). Finally fermentation kinetics was carried out using *Pichia stipites* yeast proposing a Box-Behnken design with the following variables: urea concentration (1, 1.5 and 4 g/L), magnesium heptahydrate sulphate ( $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ): 0.4, 1.2 and 2 g/L, potassium phosphate monobasic ( $KH_2PO_4$ ): 3, 4.5 and 6 g/L, and as response variables: yield and productivity of ethanol, which were quantified by high performance liquid chromatography (HPLC). The results showed during the acid hydrolysis stage, yields around of 68 % of sugars from hemicellulose (mainly xylose), with an  $H_2SO_4$  concentration = 1.5 %, time = 40 min and LSR of 4:1, obtaining a conversion of 39.58 g/L; close to the optimum xylose conversion value of 39.92 g/L, obtained by substituting the variables: LSR = 4:1, time = 36 min and  $H_2SO_4$  concentration = 1.4 % (according to the contour graphs), into the model obtained by quadratic regression. For alkali treatment stage a 47.47 g/L optimum of glucose conversion was obtained by the contour plots, using the variables: LSR = 18.11:1, time = 27.04 h and  $H_2O_2$  concentration of 4.65 %, into the quadratic model obtained and verified by canonical analysis. Finally during fermentation process an ethanol yield of 0.43 g/g was obtained (within the ranges reported by The Grage, *et al.*, 2010), a result confirmed by canonical analysis by substituting the values: Urea = 4.05 g/L;  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  = 1.34 g/L and  $KH_2PO_4$  = 2.70 g/L.

## ÍNDICE

Resumen		
Abstract		
	<b>Pág.</b>	
Lista de Figuras	iv	
Lista de Tablas	vii	
Nomenclatura	ix	
Introducción	1	
<b>CAPÍTULO I. FUNDAMENTOS TEÓRICOS</b>		
1.1	Materiales lignocelulósicos	4
1.1.1	Celulosa	5
1.1.2	Hemicelulosa	6
1.1.3	Lignina	7
1.2	Sorgo	8
1.2.1	Constituyentes del sorgo	9
1.2.2	Sorgo dulce	11
1.2.3	Producción de etanol	12
1.2.4	Áreas potenciales para el cultivo de sorgo dulce	13
1.2.5	Rendimiento potencial del cultivo de sorgo dulce	14
1.3	Pretratamiento del material lignocelulósico	14
1.3.1	Tipos de pretratamiento	15
1.3.1.1	Pretratamiento físico	16
1.3.1.2	Pretratamiento químico	16
1.3.1.3	Pretratamiento biológico	20
1.3.1.4	Pretratamiento fisicoquímico	21
1.3.2	Factores clave para un pretratamiento efectivo	22
1.4	Hidrólisis de la celulosa	23
1.4.1	Hidrólisis ácida	24
1.4.1.1	Xilosa	26

1.4.2	Hidrólisis alcalina	27
1.4.3	Hidrólisis enzimática	27
1.4.3.1	Glucosa	28
1.4.3.2	Enzimas que contribuyen la hidrólisis de la celulosa a glucosa	29
1.4.3.3	Surfactantes no-iónicos (Tween 80) como maximizador en la producción de glucosa	30
1.5	Fermentación de azúcares a etanol	31
1.5.1	Conversión de xilosa a etanol	32
1.5.2	<i>Pichia stipitis</i>	35
1.5.3	Factores que influyen en la fermentación alcohólica	35

## **CAPÍTULO II. MATERIALES Y MÉTODOS**

2.1	Obtención del bagazo de sorgo dulce	41
2.2	Caracterización del bagazo de sorgo dulce	42
2.3	Hidrólisis ácida del bagazo de sorgo dulce	43
2.3.1	Condiciones de la hidrólisis ácida	43
2.3.2	Cuantificación de los azúcares (Xilosa)	45
2.3.2.1	Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)	46
2.3.3	Análisis estadístico y optimización de la variable de respuesta	47
2.4	Deslignificación del bagazo de sorgo dulce prehidrolizado	47
2.4.1	Condiciones del pretratamiento oxidativo del bagazo de sorgo dulce	48
2.4.2	Cuantificación de la glucosa	50
2.5	Cinética de fermentación con hidrolizado ácido	50
2.5.1	Condiciones de la fermentación (precultivo y preinóculo)	50
2.5.2	Evaluación de la composición del medio de cultivo con hidrolizado ácido y la adición de nutrientes para la fermentación alcohólica	52

### **CAPÍTULO III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

3.1	Caracterización del bagazo de sorgo dulce	55
3.2	Hidrólisis ácida del bagazo de sorgo dulce	57
3.2.1	Análisis de regresión en función de la concentración de $H_2SO_4$ , tiempo y RLS	59
3.2.2	Optimización de la respuesta y establecimiento de las mejores condiciones de producción de xilosa a partir del bagazo de sorgo dulce	61
3.2.3	Fibra remanente del bagazo de sorgo dulce prehidrolizado	65
3.3	Deslignificación del bagazo de sorgo dulce prehidrolizado	66
3.3.1	Análisis de regresión en función de la concentración de $H_2O_2$ , tiempo y RLS	68
3.3.2	Optimización de la respuesta y establecimiento de las mejores condiciones de producción de glucosa a partir del bagazo de sorgo dulce	70
3.3.3	Fibra remanente del bagazo de sorgo dulce deslignificado	73
3.4	Cinética de fermentación del hidrolizado ácido de bagazo de sorgo dulce con <i>Pichia stipitis</i>	74
3.4.1	Evaluación de la composición del medio de cultivo con hidrolizado ácido y la adición de nutrientes para la fermentación alcohólica	76
3.4.2	Análisis de regresión en función de la concentración de los nutrientes esenciales (g/L)	77
	Conclusiones y Recomendaciones	84
	Referencias Bibliográficas	89
	Anexos	99

## LISTA DE FIGURAS

Figura	Pág.
1.1 Estructura de la lignocelulosa (Harris, 2012)	5
1.2 Estructura de la celulosa (Harris, 2012)	5
1.3 Estructura de la hemicelulosa (Harris, 2012)	6
1.4 Estructura de la lignina (Harris, 2012)	7
1.5 Sorgo (Montes, 2012)	8
1.6 Composición química promedio de tallos de sorgo dulce (Modificado de Prasad <i>et al.</i> , 2007)	9
1.7 Contenido comparativo de celulosa, hemicelulosa, lignina y ceniza como porcentaje de fibra presente en materiales lignocelulósicos de desechos agrícolas (Modificado de Prasad <i>et al.</i> , 2007)	10
1.8 Jugo de sorgo (Naranjo-Díaz, 2011)	10
1.9 Bagazo de sorgo (Naranjo-Díaz, 2011)	10
1.10 Biomasa de sorgo dulce observada en Tamaulipas durante el ciclo P-V 2009-2009 (Montes <i>et al.</i> , 2010)	12
1.11 Regiones potenciales de la República Mexicana para la producción de sorgo dulce (Ochoa <i>et al.</i> , 2011)	13
1.12 Fibrilla de celulosa, rodeadas de hemicelulosa y lignina (Harris, 2012)	14
1.13 Esquema del efecto del pretratamiento sobre el material lignocelulósico (Harris, 2012)	16
1.14 Estructura química del Xilitol (Harrison, 2007)	26
1.15 Estructura química de la Glucosa (Harrison, 2007)	28
1.16 Acción de las celulasas sobre el sustrato celulósico (Harris, 2012)	29
2.1 Metodología global hacia la obtención azúcares totales para la producción de etanol del bagazo de sorgo dulce empleando la levadura <i>Picha stipitis</i>	41

2.2	Bagazo de sorgo dulce molido	42
2.3	Equipo para determinación de lignocelulósicos	42
2.4	Representación del diseño Box-Behnken para tres factores (Domínguez, 2012)	45
3.1	Gráfica de residuos de probabilidad del modelo 1(11)	60
3.2	Gráfica de contornos del contenido de Xilosa en la prehidrólisis ácida del efecto de: (a) Concentración ácido (% v/v) vs RLS (mL:g), (b) Concentración de ácido (% v/v) vs Tiempo (min) y (c) Tiempo (min) vs RLS (mL:g)	62
3.3	Gráfica de superficie de respuesta del contenido de Xilosa en la prehidrólisis ácida del efecto de: (a) Concentración ácido (% v/v) vs RLS (mL:g), (b) Concentración de ácido (% v/v) vs Tiempo (min) y (c) Tiempo (min) vs RLS (mL:g)	63
3.4	Contenido de fibra del bagazo de sorgo dulce prehidrolizado	65
3.5	Gráfica de residuos de probabilidad del modelo 1(11)	69
3.6	Gráfica de superficie de respuesta del contenido de Glucosa en la hidrólisis alcalina del efecto de: (a) Concentración de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (% v/v) vs Tiempo (h), (b) RLS (mL:g) vs Tiempo (h) y (c) Concentración de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (% v/v) vs RLS (mL:g)	71
3.7	Gráfica de contornos del contenido de Glucosa en la hidrólisis alcalina del efecto de: (a) Concentración de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (% v/v) vs Tiempo (h), (b) RLS (mL:g) vs Tiempo (h) y (c) Concentración de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (% v/v) vs RLS (mL:g)	72
3.8	Contenido de fibra del bagazo de sorgo dulce deslignificado	73
3.9	Consumo de azúcares y producción de Etanol en función del tiempo de fermentación con sustrato de hidrolizado ácido por: (a) <i>Pichia stipitis</i> NRRL, (b) <i>Pichia stipitis</i> JS-ITV S42	75
3.10	Gráfica de residuos de probabilidad del modelo 2(11)	78
3.11	Gráfica de contornos del rendimiento de etanol (g/g) del efecto de: (a) Concentración de Urea (g/L) vs MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O (g/L), (b) Urea (g/L) vs KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (g/L) y (c) Concentración de	79

	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O (g/L) vs KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (g/L)	
3.12	Gráfica de superficie de respuesta del rendimiento de etanol (g/g) del efecto de: (a) Concentración de Urea (g/L) vs MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O (g/L), (b) Urea (g/L) vs KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (g/L) y (c) Concentración de MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O (g/L) vs KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (g/L)	80
3.13	Gráfica de contornos del mejor rendimiento de etanol (g/g) en el efecto: Concentración de Urea (g/L) vs KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (g/L)	81
3.14	Gráfica de superficie de respuesta del mejor rendimiento de etanol (g/g) en el efecto: Concentración de Urea (g/L) vs KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (g/L)	81

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla</b>	<b>Pág.</b>
1.1 Clasificación de los tipos de sorgo	8
1.2 Pretratamientos químicos para la biomasa lignocelulósica	17
1.3 Pretratamientos fisicoquímicos para la biomasa lignocelulósica	21
1.4 Propiedades de microorganismos candidatos a la producción industrial de etanol a partir de lignocelulosa	33
2.1 Parámetros para la caracterización del bagazo de sorgo dulce	43
2.2 Diseño Box-Behnken para llevar acabo el pretratamiento ácido del bagazo de sorgo dulce con valores codificados y naturales	44
2.3 Diseño Box-Behnken para llevar acabo el pretratamiento alcalino del bagazo de sorgo dulce con valores codificados y naturales	49
2.4 Componentes para el medio de activación y preparación en la fermentación del bagazo de sorgo dulce	50
2.5 Diseño Box-Behnken para llevar acabo la fermentación alcohólica con hidrolizado ácido de bagazo de sorgo dulce adicionando nutrientes esenciales en valores codificados y naturales	53
3.1 Concentrado de datos de bagazo de sorgo dulce para las pruebas de hidrólisis	56
3.2 Comparación del contenido de fibra de bagazo de sorgo dulce crudo	57
3.3 Resultados obtenidos a partir del primer diseño experimental para la obtención de Xilosa considerando la concentración de $H_2SO_4$ , tiempo y RLS	58
3.4 ANOVA del diseño experimental Box-Behnken para el bagazo pre-hidrolizado de sorgo dulce	61
3.5 Resultados obtenidos a partir del segundo diseño experimental	67

	para la obtención de Glucosa considerando la concentración de $H_2O_2$ , tiempo y RLS	
3.6	ANOVA del diseño experimental Box-Behnken para el bagazo de sorgo dulce deslignificado	69
3.7	Comparación de la producción de etanol por <i>Pichia stipitis</i> en hidrolizado ácido	74
3.8	Resultados del diseño Box-Behnken para llevar acabo la fermentación alcohólica con hidrolizado acido de bagazo de sorgo dulce adicionando nutrientes esenciales	76
3.9	Resultados del proceso fermentativo para su mejoramiento con y sin la adición de nutrientes esenciales	82

## NOMENCLATURA

### Símbolo

FPU/g	Unidades de papel filtro por gramo
°C	Grados Celsius
KJ/Kg	Kilo Joule por Kilogramo
ton	Toneladas
ha <sup>-1</sup>	Hectáreas
ton ha <sup>-1</sup>	Toneladas por hectárea
L	Litros
L ha <sup>-1</sup>	Litros por hectárea
g	Gramos
g/L	Gramos por litro
p/v	Peso-volumen
RLS	Relación Líquido-Sólido
p/p	Peso-peso
Kcal/g	Kilocalorías por gramo
g L <sup>-1</sup>	Gramos por litro
h	Horas
m/v	Masa-volumen
v/v	Volumen- volumen
mL	Mililitro
M	Molar
mL/g	Mililitro por gramo
g/g	Gramo por gramo
g/Lh	Gramo por litro por hora
Y <sub>X/S</sub>	Rendimiento biomasa/sustrato
Y <sub>P/S</sub>	Rendimiento producto/sustrato
Q <sub>p</sub>	Productividad
mM	Milimolar
min	Minutos
mL/min	Mililitros por minuto
rpm	Revoluciones por minuto
Kg/cm <sup>2</sup>	Kilogramo por centímetro cuadrado
μL	Microlitro
μm	Micrómetro

## INTRODUCCIÓN

La demanda de etanol para su utilización como combustible ha aumentado en los últimos años. Según el Informe del Estado Global de los Renovables (REN21, 2010), la producción de bioetanol en el mundo para el 2009 sustituyó cerca del 4 % de la producción mundial de gasolinas. La incertidumbre relacionada con la disponibilidad de fuentes de petróleo a largo plazo, la fluctuación en los precios del mismo así como los problemas de contaminación, ha inclinado la balanza hacia el uso de etanol como aditivo de la gasolina.

Los materiales lignocelulósicos se perfilan como una fuente alternativa que no presenta el problema de los materiales amiláceos y están disponibles en grandes cantidades. Su composición es básicamente lignina, celulosa y hemicelulosa (Mateos, 2006). La celulosa y hemicelulosa se pueden degradar en azúcares fermentables mediante el uso de enzimas y la aplicación de un pretratamiento previo para exponer las fibras de celulosa a la acción de las enzimas.

De todos los materiales lignocelulósicos, el sorgo dulce presenta características ventajosas, ya que posee una amplia adaptabilidad, rápido crecimiento, alta acumulación de azúcar; además de presentar cierta tolerancia a la sequía, inundaciones, salinidad del suelo y toxicidad por acidez (Reddy *et al.*, 2007). El sorgo dulce es una interesante planta cosechada anualmente, la cual puede ser cultivada en zonas extensas de climas tropicales y templados con el potencial para producir más etanol por hectárea que el maíz (Xiaorong *et al.*, 2010). Además, tiene un alto rendimiento de biomasa verde y diferentes partes de esta planta, como el bagazo, puede ser hidrolizado a azúcar fermentable antes de seguir su bioconversión a etanol. Al igual que en toda la biomasa lignocelulósica, los principales componentes del bagazo de sorgo dulce son celulosa, hemicelulosa y lignina (Balint *et al.*, 2009; Xiaorong *et al.*, 2010).

La lignina y la hemicelulosa actúan como una barrera de protección de la celulosa. Para hidrolizar la celulosa y posteriormente realizar la fermentación de los azúcares, es necesario pretratar el material lignocelulósico, en este caso el sorgo dulce, para modificar su estructura, eliminando la lignina y hemicelulosa para que la celulosa quede expuesta para la etapa de hidrólisis. El pretratamiento con peróxido de hidrógeno (agente oxidante), aumenta la susceptibilidad a la hidrólisis enzimática al eliminar cerca del 50 % de la lignina y la mayoría de la hemicelulosa, las cuales son solubilizadas liberando la glucosa durante la sacarificación (Azzam, 1989). La hidrólisis de la parte de hemicelulosa se puede llevar a cabo con ácido diluido, ácido concentrado o enzimáticamente, mientras que la celulosa se puede realizar bajo condiciones suaves con alto rendimiento de la glucosa (Taherzadeh y Karimi, 2007). El sorgo dulce puede ser transformado biológicamente en alcohol etílico de primera y segunda generación, etanol celulósico, producción de energía propia (Lemus y Parrish, 2009) o como aditivo.

La fermentación de azúcares por microorganismos constituye en método más común para producir combustibles como etanol a partir de granos y residuos vegetales. Involucra la necesidad de contar con microorganismos que presenten mayores rendimientos y velocidades de conversión, que permitan consolidar etapas del proceso (Jolly *et al.*, 2006). En una etapa posterior, del pretratamiento se obtiene una solución de azúcares fermentables que contiene principalmente glucosa, así como de pentosas resultantes de la hidrólisis inicial de la hemicelulosa. Estos azúcares son posteriormente convertidos en etanol mediante microorganismos que pueden utilizar uno o varios azúcares presentes en el material lignocelulósico pretratado e hidrolizado.

En base a lo anterior, el objetivo de este trabajo es optimizar la concentración de xilosa y mejorar el proceso fermentativo, usando esta azúcar resultante de la hidrólisis ácida del bagazo de sorgo dulce, empleando la levadura *Pichia stipitis* para la obtención de bioetanol.

**CAPÍTULO I**  
**FUNDAMENTOS TEÓRICOS**

## CAPÍTULO I. FUNDAMENTOS TEÓRICOS

### 1.1 Materiales lignocelulósicos

Actualmente existe una tendencia hacia la búsqueda de materias primas que sean fuentes renovables de energía y con potencial biotecnológico para la producción de metabolitos como el etanol, xilitol, ácido acético, ácido láctico y muchos otros productos de interés tanto comercial como farmacéutico. Debido a su alta composición de fibra, los materiales lignocelulósicos son idóneos para la generación de etanol a partir de la fracción celulósica, contribuyendo a la reducción de la dependencia energética sobre el crudo. La biomasa lignocelulósica comprende una gran variedad de desechos forestales, de la agricultura y agroindustriales, los cuales son abundantes, renovables y representan fuentes de energía baratas. Tales desechos incluyen una gran variedad de materias, como el aserrín, bagazo de caña de azúcar, diversos pastos, hojas, cascaras de cereales como arroz, maíz, trigo, olote y sorgo (Parveen *et al.*, 2009).

Los residuos lignocelulósicos son acumulados cada año en grandes cantidades, pudiendo llegar a causar problemas ambientales. Sin embargo, debido a su composición química basada en azúcares y otros compuestos de interés, pueden ser utilizados para la producción de un gran número de productos con valor adquirido, tales como etanol y otros compuestos de interés. La lignocelulosa es el componente principal de las paredes celulares vegetales, consiste principalmente en celulosa, hemicelulosa y lignina junto con pequeñas cantidades de pectina, proteínas, clorofila, grasas y cenizas. Básicamente la celulosa forma un esqueleto que está rodeado por la hemicelulosa y la lignina (Mussatto y Teixeira, 2010).

El porcentaje que representa cada uno de estos constituyentes depende del tipo de planta. La celulosa, la hemicelulosa y la lignina forman estructuras llamadas

microfibrillas, organizadas en microfibras que regulan la estabilidad de la pared celular de las plantas (Figura 1.1).

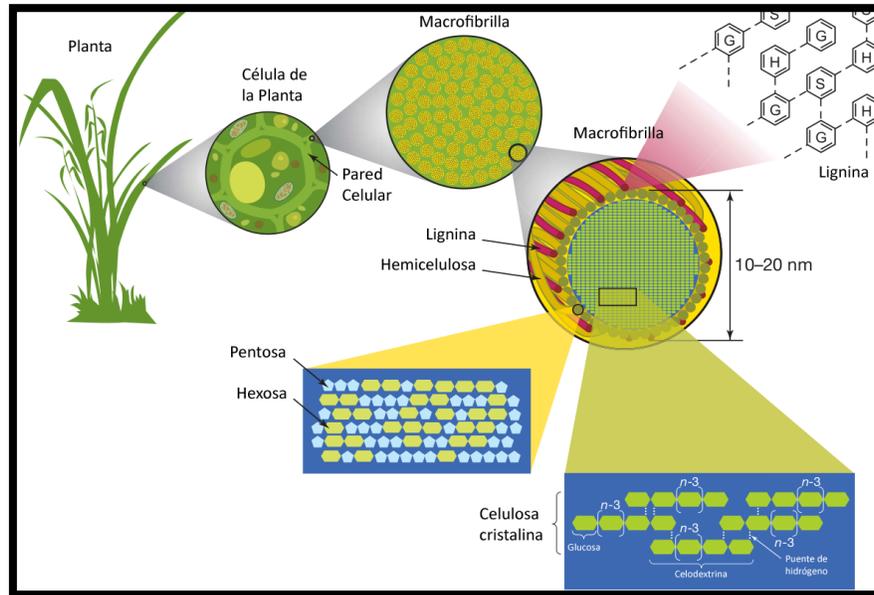


Figura 1.1 Estructura de la lignocelulosa (Harris, 2012)

### 1.1.1 Celulosa

La celulosa (Figura 1.2) es un polisacárido formado por subunidades de D-glucosa, unidas por enlaces  $\beta$ -1,4-glucosídicos. La unión de las moléculas mediante puentes de hidrógeno en la celulosa forma una estructura lineal ordenada que representa entre un 50 - 90 % de la celulosa total, la otra parte tiene un arreglo desordenado o amorfo (Foyle *et al.*, 2007). La celulosa conforma de un 30 a 60 % de la planta (Balat, 2010).

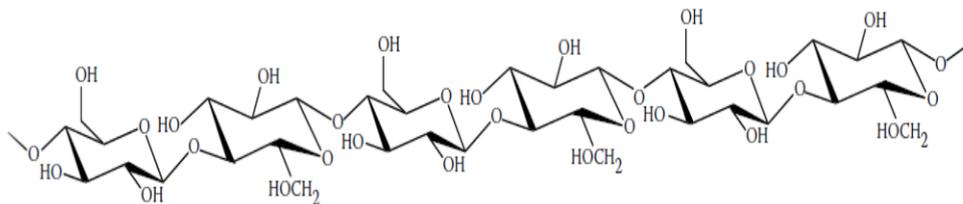


Figura 1.2 Estructura de la celulosa (Harris, 2012)

La celobiosa es la unidad repetitiva que constituye las cadenas de celulosa. Esta última es más susceptible a la degradación enzimática en su forma amorfa (Parveen *et al.*, 2009).

La celulosa es el material renovable más abundante, tiene un grado de polimerización de 500 a 15000 unidades. La mayoría de la celulosa es cristalina, siendo insoluble y resistente al ataque de enzimas y al ataque microbiano.

### 1.1.2 Hemicelulosa

La hemicelulosa (Figura 1.3) es un polímero heterogéneo que representa en general el 15 - 35 % de la biomasa de la planta. Consiste en cadenas cortas y ramificadas de azúcares. Contiene azúcares de cinco carbonos, generalmente xilosa y arabinosa, azúcares de seis carbonos como galactosa, glucosa y manosa, así como ácidos úronicos (Gírio *et al.*, 2010).

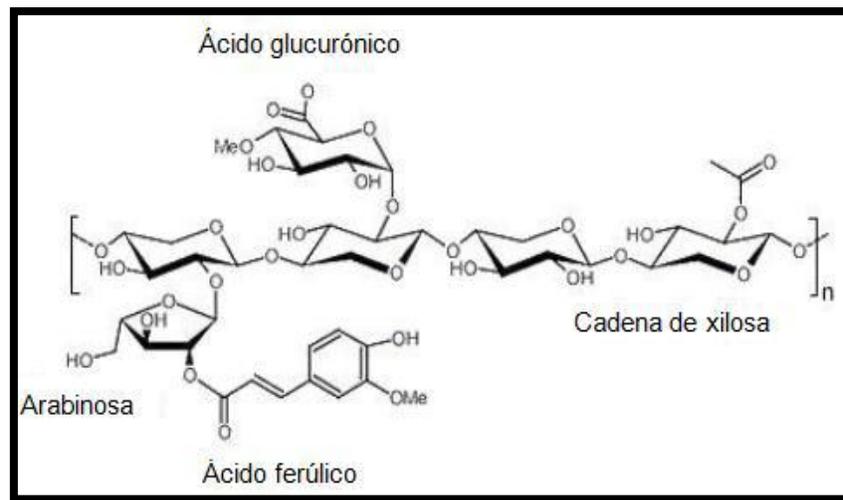


Figura 1.3 Estructura de la hemicelulosa (Harris, 2012)

La hemicelulosa sirve como conexión entre la lignina y las fibras de celulosa. Debido a su naturaleza ramificada, es amorfa y relativamente fácil de hidrolizar a sus azúcares constitutivos.

### 1.1.3 Lignina

La lignina (Figura 1.4) tiene una estructura amorfa que consiste en unidades diferentes de fenilpropano. La función principal de la lignina es dar soporte estructural a la planta, impermeabilidad, resistencia contra ataques microbianos y al estrés oxidativo. Es insoluble en agua y ópticamente inactiva, lo que la hace difícil de degradar (Hendricks y Zeeman, 2009). No contiene azúcares, pero encierra a la celulosa y hemicelulosa que sí los contienen e impide que sean alcanzadas para ser hidrolizadas.

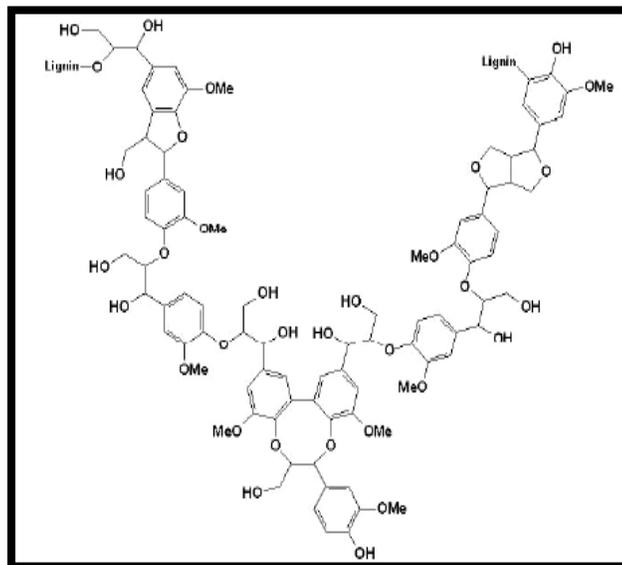


Figura 1.4 Estructura de la lignina (Harris, 2012)

Los monómeros que forman la lignina se denominan alcoholes cinamílicos, diferenciados entre sí por las diferentes sustituciones que presenta el anillo aromático. Estos alcoholes son el p-cumarílico, el alcohol coniferílico y el alcohol sinapílico. La lignina puede ser utilizada para la generación de energía térmica, su valor energético depende de la fuente de biomasa y varía entre 20,934 y 27,912 KJ/Kg. También, puede ser procesada dependiendo de la calidad de la misma, en productos de alto valor económico como plastificantes, polímeros conductores de electricidad o resinas fenólicas (Lozanoff *et al.*, 2007).

## 1.2 Sorgo

Es uno de los principales granos que se producen en nuestro país (Figura 1.5), llegando a formar parte de la cadena de producción que permite suministrar al mercado de alimentos, proteína de origen animal. Presenta características ventajosas, ya que posee una amplia adaptabilidad, rápido crecimiento, además tiene un alto rendimiento de biomasa verde y diferentes partes de esta planta como el bagazo, puede ser hidrolizado a azúcar fermentable antes de seguir su bioconversión a etanol (Xiaorong *et al.*, 2010; Chuck-Hernández *et al.*, 2011).



Figura 1.5 Sorgo (Montes, 2012)

En nuestro país se cultivan tres variedades de sorgo orientados principalmente por el uso que se le da (Tabla 1.1).

Tabla 1.1 Clasificación de los tipos de sorgo

TIPO	CARACTERÍSTICAS
<b>Grano</b>	Son aquellas variedades no sacarinas y de las cuales se busca explotar principalmente el grano, el cual se ha constituido como la principal materia prima en la industria de alimentos balanceados.
<b>Escobero</b>	Es aquella variedad que tiene una mayor precocidad y resistencia, y cuya espiga es utilizada para la elaboración de las escobas.
<b>Forrajero</b>	Son aquellas variedades sacarinas (sorgo dulce), las cuales están consideradas como uno de los forrajes más nutritivos, sobre todo cuando están verdes.

Fuente: Olvera *et al.*, 2009

A pesar de que nuestro país cuenta con dos importantes zonas productoras de sorgo (Tamaulipas y el Bajío) y en ambos ciclos del año agrícola, problemas de infraestructura así como de comercialización, provocan que se hayan importado en algunos años elevados volúmenes de sorgo proveniente de otros países.

### 1.2.1 Constituyentes del sorgo

En el caso de los carbohidratos estructurales, el sorgo está compuesto principalmente por celulosa y hemicelulosa, los cuales a su vez pueden ser hidrolizados y usados como sustrato para la producción de etanol (Sipos *et al.*, 2011). La composición química varía dependiendo de diversos factores, entre los que destacan el tipo y variedad de sorgo así como la madurez del cultivo y las condiciones climatológicas. En la Figura 1.6 se muestra la composición promedio de los tallos de sorgo dulce. La hemicelulosa, celulosa y lignina representan el 12 % del peso total del tallo. De acuerdo a Woods (2000), puede decirse que en promedio un 15 % del peso del tallo corresponde a la porción fibrosa en un rango que va desde el 12 hasta el 17 %.

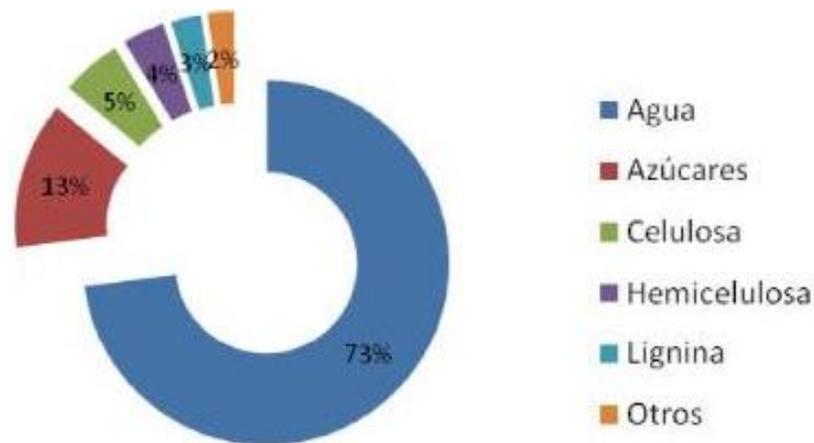


Figura 1.6 Composición química promedio de tallos de sorgo dulce  
(Modificado de Prasad *et al.*, 2007)

Si se analiza el bagazo de sorgo dulce, o el residuo que se obtiene después de extraer el jugo azucarado, se tiene que los rangos de hemicelulosa, celulosa y lignina

van de 15 - 25 %, 35 - 50 % y 20 - 30 %, respectivamente (Montes, 2012). En la Figura 1.7 se muestra la composición química del bagazo y rastrojo de sorgo dulce, comparado con los residuos de caña de azúcar, rastrojo de maíz, trigo y arroz.

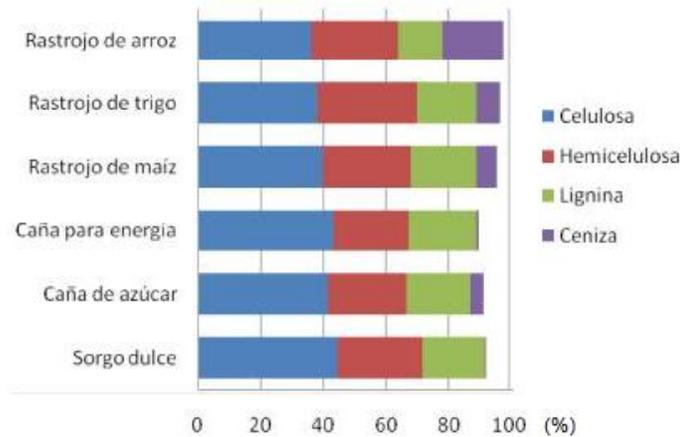


Figura 1.7 Contenido comparativo de celulosa, hemicelulosa, lignina y ceniza como porcentaje de fibra presente en materiales lignocelulósicos de desechos agrícolas (Modificado de Prasad *et al.*, 2007)

Del sorgo aparte del jugo que se fermenta (Figura 1.8) para obtener etanol, el bagazo y la hoja (Figura 1.9) se pueden hidrolizar para convertir la celulosa y la hemicelulosa en azúcares por medio de las hidrólisis: ácida, alcalina o enzimática con buenos rendimientos (Almodares y Hadi, 2009).



Figura 1.8 Jugo de sorgo



Figura 1.9 Bagazo de sorgo

(Fuente: Naranjo-Díaz, 2011)

### 1.2.2 Sorgo dulce

El sorgo dulce (*Sorghum bicolor* L. Moench) es una planta tolerante a la sequía, altas temperaturas, inundaciones, salinidad del suelo y toxicidad por acidez. Pertenece a la familia de las gramíneas, junto con el arroz, el maíz, el trigo, la caña de azúcar y la yerba guinea. Además, posee amplia adaptabilidad, rápido crecimiento y alta acumulación de azúcar. El sorgo dulce además de su rápido crecimiento, alta eficiencia en el uso del agua, bajos requerimientos de fertilizante y amplia adaptación (Prasad *et al.*, 2007), presenta ventajas en relación a otros cultivos que son usados comúnmente para la obtención de biocombustibles.

Es la principal materia prima alternativa que puede suplementar el uso de la caña de azúcar en la producción de etanol. El sorgo dulce es un cultivo que no compite con los granos, ya que puede sembrarse en áreas no aptas para otros cultivos y ofrece en algunos casos grano y forraje, siendo el tallo el principal órgano que se aprovecha, el cual presenta un alto contenido de azúcar (Almodares y Hadi, 2009).

Con el sorgo dulce se puede hacer azúcar refinada, techos (Rajvanshi *et al.*, 1993), papel y miel. Uno de los principales usos del sorgo dulce ha sido su amplia utilización en la producción de alimentos balanceados (Undersander *et al.*, 1990). El sorgo dulce puede ser transformado biológicamente en alcohol etílico de primera y segunda generación, etanol celulósico para producir energía propia Lemus y Parrish, (2009) o como aditivo.

El tallo del sorgo dulce concentra grandes cantidades de azúcar estas cantidades pueden ser similares o más altos que los de la caña de azúcar (*Saccharum spp.*), aunque el mecanismo de acumulación del azúcar es diferente (Tarpley y Vietor, 2007); la caña de azúcar requiere de 12 a 16 meses de clima tropical para madurar, mientras que el sorgo requiere de 3 a 5 meses. Debido a su rápido crecimiento, a su alto valor de producción de energía y su amplia adaptabilidad, el sorgo dulce resulta una excelente fuente de biomasa para

producir etanol a partir del jugo del tallo (Smith y Buxton, 1993) o del bagazo o residuo post extracción de los azúcares, ya que este puede también ser utilizado como energía para el proceso de fabricación de etanol (Woods, 2000).

En Tamaulipas, el sorgo dulce, el tallo representa la mayor proporción de biomasa (Figura 1.10), teniendo en promedio el 79 % del peso total de la planta, mientras que las hojas representan el 11.5 % y la panoja el 9.5 % (Montes *et al.*, 2010).



Figura 1.10 Biomasa de sorgo dulce observada en Tamaulipas durante el ciclo P - V 2009 - 2009 (Montes *et al.*, 2010)

### 1.2.3 Producción de etanol

Hasta los años 30, el etanol de grado industrial fue producido a nivel mundial vía la fermentación de la melaza. Hoy en día, el alto costo del azúcar de caña ha hecho que estas fuentes de producción pierdan terreno contra otras tecnologías. En relación a esto, los tallos del sorgo dulce contienen azúcares fermentables en el jugo, equivalentes a 3,500 - 5,500 L ha<sup>-1</sup> de etanol, el cual es el doble comparado con el obtenido del grano de maíz (Baker y Zahniser, 2006).

Según Prasad *et al.*, (2007) en una producción de 50 ton ha<sup>-1</sup> de tallo, el 73 % (36.5 ton) corresponden a agua, 6.49 ton son de azúcar, 2.66 ton de celulosa,

1.87 ton de hemicelulosa, 1.35 ton de lignina y 1.15 ton corresponden a otros compuestos. Lo anterior, al añadirse 5 ton de agua para la fermentación producen jugo (39.67 ton ha<sup>-1</sup>) y bagazo 15.33 ton ha<sup>-1</sup>). El jugo se compone de agua (33.24 ton), azúcar (5.65 ton) y otros compuestos (0.78 ton), mientras que el bagazo se compone de agua (8.26 ton), azúcar (0.83 ton), celulosa (2.61 ton), hemicelulosa (1.83 ton), lignina (1.31 ton) y otros compuestos (0.49 ton). Del jugo se obtienen alrededor de 3,451 L de etanol anhidro y del bagazo 2,422 L, dando un total de 5,873 L ha<sup>-1</sup>, lo cual es muy factible de obtener en Tamaulipas de acuerdo a los resultados de evaluaciones realizadas, donde se superan las 50 ton ha<sup>-1</sup> de tallo de sorgo dulce.

#### 1.2.4 Áreas potenciales para el cultivo de sorgo dulce

En la República Mexicana (Figura 1.11) existen para el cultivo de sorgo dulce 2,180,435 ha con potencial alto y otra superficie similar con potencial intermedio.

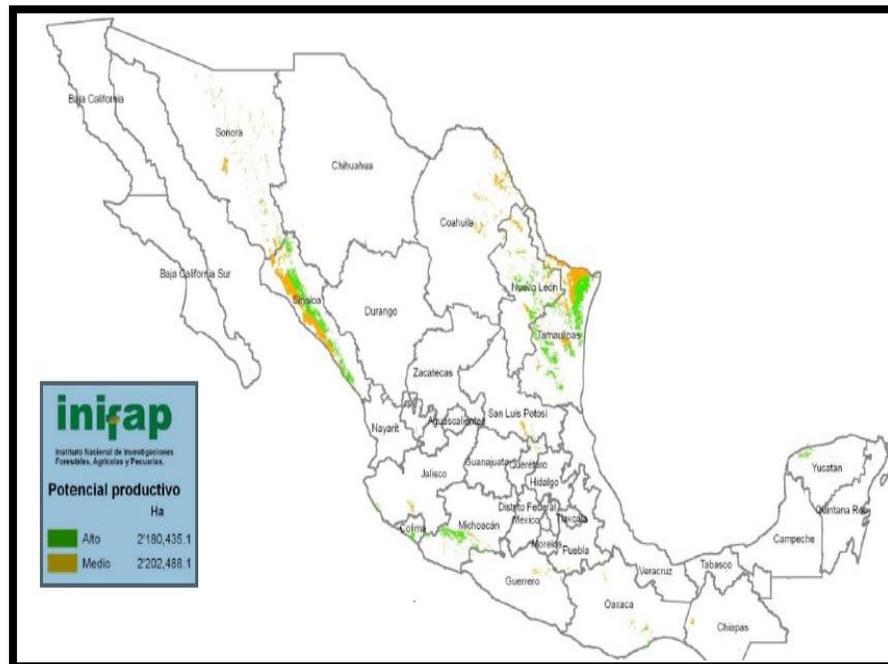


Figura 1.11 Regiones potenciales de la República Mexicana para la producción de sorgo dulce (Ochoa *et al.*, 2011)

### 1.2.5 Rendimiento potencial del cultivo de sorgo dulce

El sorgo dulce es un cultivo alternativo que puede sustituir al uso de la caña de azúcar en la producción de etanol ya que puede producir hasta 5,600 L ha<sup>-1</sup> a partir de 70 ton ha<sup>-1</sup> de materia verde.

El rendimiento del sorgo dulce de cada región es directamente proporcional a la fertilidad de los suelos y otros factores, entre los que se encuentran: potencial genético, condiciones climáticas y nivel tecnológico de producción. El sorgo dulce, tiene alta eficiencia en el uso del agua, se produce con bajos requerimientos de fertilizantes y tiene amplia adaptación en ambientes del trópico (Prasad *et al.*, 2007).

### 1.3 Pretratamiento del material lignocelulósico

La lignina y le hemicelulosa actúan como una barrera de protección de la celulosa (Figura 1.12). Para hidrolizar la celulosa y posteriormente, realizar la fermentación de los azúcares, es necesario pretratar el material lignocelulósico, en este caso el sorgo dulce, para modificar su estructura, eliminando la lignina y hemicelulosa para que la celulosa quede expuesta para la etapa de hidrólisis (Mussatto y Teixeira, 2010).

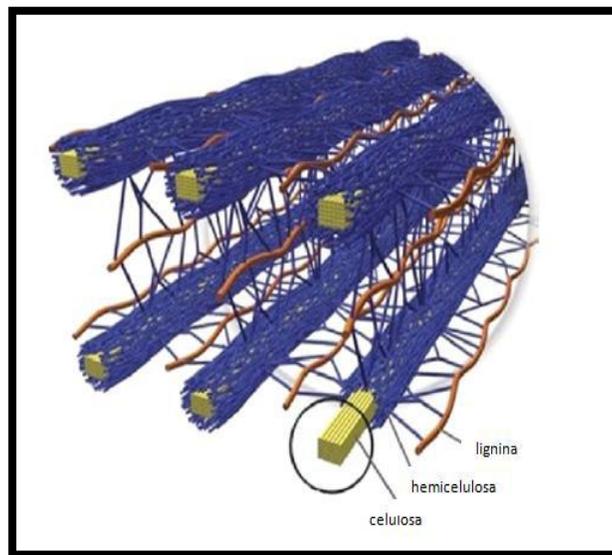


Figura 1.12 Fibrilla de celulosa, rodeadas de hemicelulosa y lignina (Harris, 2012)

El objetivo del proceso de pretratamiento es romper la estructura de la lignina y la estructura cristalina de la celulosa, de tal forma que los ácidos o enzimas tengan acceso a la celulosa y la hidrolicen (Nathan *et al.*, 2005).

Alvira *et al.*, (2009) indican que para la etapa de pretratamiento se deben tomar en cuenta varios factores como los siguientes:

- Los azúcares no deben ser degradados durante el proceso
- Generación mínima de compuestos tóxicos
- Es preferible que no se requiera una disminución del tamaño de la partícula debido a que conlleva altos costos por consumo de energía
- Que la operación se pueda realizar en reactores de costo moderado y tamaño razonable
- No producir residuos sólidos
- Obtener altas concentraciones de azúcares

### 1.3.1 Tipos de pretratamiento

El pretratamiento que se realiza a la biomasa puede ser físico, químico o microbiológico, también, puede ser una combinación de ellos, los cuáles se enfocan en eliminar la lignina y hemicelulosa para mejorar el acceso a la celulosa.

Dado que lo que se busca es obtener los azúcares contenidos en el material lignocelulósico, en particular, la glucosa por ser más abundante, es necesario llegar a la celulosa (Harris, 2012). Sin embargo, la envoltura molecular compuesta por lignina y hemicelulosa, junto con la cristalinidad de la celulosa, dificultan enormemente la descomposición en glucosa (hidrólisis), por lo que es necesario un tratamiento previo que permita romper parcial o totalmente esta estructura y dejar expuesta la celulosa (Figura 1.13).

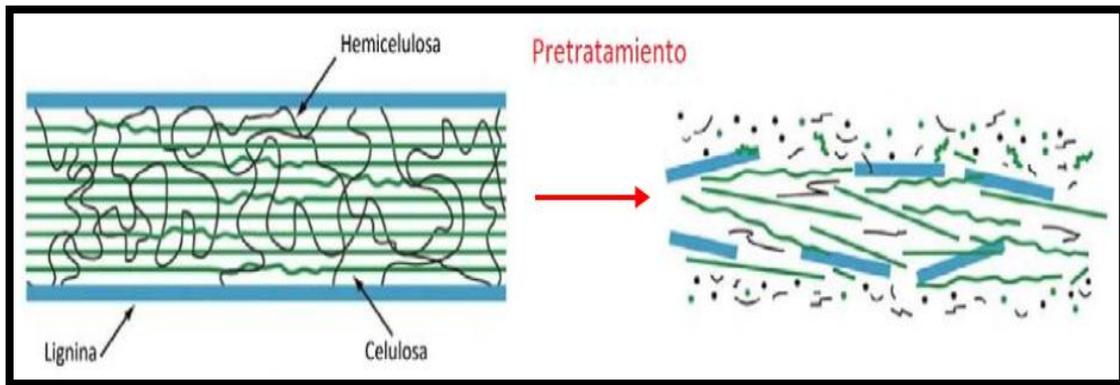


Figura 1.13 Esquema del efecto del pretratamiento sobre el material lignocelulósico  
(Harris, 2012)

### 1.3.1.1 Pretratamiento físico

Se realiza para disminuir el tamaño de partícula de la biomasa mediante un proceso de trituración y extrusión. El objetivo de la trituración es reducir el tamaño de la partícula y la cristalinidad del material para incrementar la superficie específica y reducir el grado de polimerización. El material se pica, tritura o muele dependiendo del tamaño final de la partícula (Alvira *et al.*, 2009). Con respecto al material sin pretratar, se incrementa el rendimiento total de la hidrólisis de la lignocelulosa en 5 - 25 % dependiendo del tipo de biomasa y del tamaño de partícula. También, reduce el tiempo de digestión en 23 - 59 % (Hendricks y Zeeman, 2009).

Los requerimientos energéticos son altos dependiendo del tamaño final de la partícula y de las características de la biomasa, por lo que su aplicación depende del costo económico que represente.

### 1.3.1.2 Pretratamiento químico

Hay diferentes métodos de pretratamiento químico, los que se utilizan comúnmente son el pretratamiento alcalino y ácido (Tabla 1.2).

Tabla 1.2 Pretratamientos químicos para la biomasa lignocelulósica

MÉTODO	PRINCIPIO
<b>Ácidos (diluidos):</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Sulfúrico</li> <li>• Hidroclórico</li> <li>• Nítrico</li> <li>• Fosfórico</li> </ul>	Solubilización de hemicelulosa
<b>Álcalis:</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Hidróxido de sodio</li> <li>• Hidróxido de sodio + peróxido</li> <li>• Hidróxido de calcio</li> </ul>	Deslignificación + remoción de hemicelulosa
<b>Solventes:</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Metanol</li> <li>• Etanol</li> <li>• Acetona</li> </ul>	Deslignificación

Fuente: Mousdale, 2008

Los pretratamientos químicos han recibido mayor atención porque los pretratamientos físicos son relativamente ineficientes y los pretratamientos combinados raramente han mejorado la digestibilidad cuando son comparados con tratamientos simples. El pretratamiento permite que los rendimientos en la hidrólisis de celulosa aumenten con respecto a los rendimientos teóricos con valores mayores al 90 % (Rabelo *et al.*, 2008).

En el pretratamiento con ácido, el objetivo es solubilizar la hemicelulosa para que la celulosa esté más accesible para la etapa de hidrólisis. Se realiza tanto con ácidos concentrados como con ácidos diluidos. Aunque son un agente fuerte para la hidrólisis de la celulosa, los ácidos concentrados son tóxicos, corrosivos, peligrosos y se requieren reactores de materiales resistentes a la corrosión, por lo que el costo del pretratamiento es elevado (Lenihan *et al.*, 2010).

Los pretratamientos que utilizan ácido diluido resultan en la hidrólisis de una cantidad significativa de la fracción hemicelulósica de la biomasa, obteniendo altos rendimientos de azúcares solubles provenientes de la hemicelulosa, principalmente xilosa. El proceso caliente, que es una variación del pretratamiento con ácido diluido involucra el lavado y la separación de los sólidos pretratados, lo que evita la precipitación de la lignina, así como de los xilanos que se han solubilizado bajo las condiciones de pretratamiento. La remoción completa de la hemicelulosa del residuo agroindustrial durante el pretratamiento es un requisito necesario para la eficiente hidrólisis enzimática de la fracción celulósica. La remoción de la hemicelulosa incrementa la porosidad del sustrato lignocelulósico, aumentando la accesibilidad a la celulosa (Harris, 2012).

El ácido diluido es un pretratamiento viable para todos los tipos de sustratos lignocelulósicos como el rastrojo de maíz, trigo, cebada, bagazo de caña, cascarilla de arroz, sorgo entre otros, para obtener altos rendimientos de xilosa en el hidrolizado; el ácido diluido es más favorable para aplicaciones a nivel industrial, se realiza a altas temperaturas durante un periodo corto de tiempo o a bajas temperaturas con tiempos de retención mayores (Alvira *et al.*, 2009). La lignina también se solubiliza en este proceso.

Para este proceso se emplea ácido sulfúrico, clorhídrico o nítrico en cantidades diluidas, siendo el ácido sulfúrico el más utilizado, dada sus ventajas de cortos tiempos de reacción y bajo costo (Saucedo-Luna *et al.*, 2010). El ácido sulfúrico diluido (0.5 - 1.5 %) a temperaturas superiores a los 160 °C alcanza altos rendimientos de xilosa (75 - 90 %) y son las condiciones más adecuadas para aplicaciones industriales. El tratamiento con concentraciones de ácido sulfúrico de 1 a 2 % y a temperaturas menores de 220 °C por pocos minutos reduce el grado de polimerización de la celulosa, mientras que el grado de cristalinidad no decrece (Parveen *et al.*, 2009).

Dentro de los pretratamientos químicos se han utilizado diferentes sustancias y condiciones, pero uno de los pretratamientos más novedosos en estudio es con disolución de celulosa a baja temperatura, no volatilidad, estabilidad química con ácido fosfórico. Entre las ventajas más sobresalientes de este método se encuentra su bajo costo comparado con los que usan líquidos iónicos, tolerancia a la presencia de agua, capacidad de reciclamiento. El ácido fosfórico puede hinchar o disolver la celulosa, dependiendo de su concentración y el tipo de biomasa. Geoffrey *et al.*, (2008) han reportado el uso del pretratamiento con ácido fosfórico del cáñamo industrial usando diferentes condiciones de reacción, cambiando la fuente lignocelulósica de producción, es decir, bagazo de caña de azúcar.

El pretratamiento alcalino se realiza a bajas temperaturas y presiones comparadas con otras tecnologías para pretratamiento. Es posible llevar a cabo el proceso a condiciones ambientales, sin embargo este proceso puede dilatar horas e inclusive días (Nathan *et al.*, 2005). Comparado con el pretratamiento ácido, el proceso alcalino causa menos degradación de azúcares y la sal cáustica se puede recuperar o regenerar (Parveen *et al.*, 2009). Además, la estructura de la celulosa después del pretratamiento es más densa y termodinámicamente más estable que la celulosa natural (Hendricks y Zeeman, 2009).

El hidróxido de sodio diluido, provoca un hinchamiento en la biomasa, aumentando la superficie interior, mientras que el grado de polimerización disminuye; separándose la lignina de los carbohidratos y alterándose la estructura de la lignina. Parveen *et al.*, (2009), realizaron estudios con bagazo de caña, pretratado con hidróxido de sodio al 2 % (m/v) por 90 min a 121 °C, mejorando el proceso de deslignificación en un 7 %.

El pretratamiento con peróxido de hidrógeno (agente oxidante) aumenta la susceptibilidad a la hidrólisis enzimática al eliminar cerca del 50 % de la lignina y la mayoría de la hemicelulosa, las cuales son solubilizadas liberando la glucosa durante la sacarificación (Azzam, 1989). En el presente trabajo se utilizará peróxido de hidrógeno en concentraciones bajas para llevar a cabo el pretratamiento del sorgo

dulce, debido a que se han reportado buenos rendimientos de glucosa (40.2 g/L) posterior a la hidrólisis enzimática: 4.7 % p/v de  $H_2O_2$ , RLS de 17.1:1 y tiempo de 26.7 h (Nochebuena, 2012).

### ***Peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ )***

El peróxido de hidrógeno es usado como pretratamiento de residuos agroindustriales a temperaturas operacionales mayores a los 100 °C en soluciones alcalinas, los aniones de hidroperóxido reaccionan con la lignina presente en la pulpa actuando como nucleófilo y como oxidante, a estas temperaturas, ciertos agentes quelantes son formados para disminuir la velocidad de descomposición. En la industria del papel, se emplea principalmente para propósitos de deslignificación (para mejorar el brillo de la pulpa del papel conforme reacciona con el grupo carbonilo de la estructura de la lignina que le confiere ese color café oscuro). El pretratamiento con peróxido de hidrogeno alcalino en residuos lignocelulósicos, como el bagazo de sorgo dulce, aumenta enormemente la susceptibilidad para la hidrólisis enzimática y consecuentemente la producción de etanol (Azzam, 1989).

La descomposición del peróxido de hidrógeno en condiciones alcalinas es rápida y como consecuencia se generan radicales más reactivos, como los grupos hidroxilo ( $OH^-$ ) y los aniones superóxidos ( $O_2^-$ ), los cuales son los responsables de la degradación de la lignina. De acuerdo a Nigam y Pandey (2009), el proceso de oxidación se vuelve inestable a altas temperaturas, particularmente en el caso de la presencia de ciertos metales de transición como el manganeso (Mn), hierro (Fe) y cobre (Cu), requiriendo la adición de quelantes para reducir la velocidad de descomposición.

#### **1.3.1.3 Pretratamiento biológico**

En este tipo de pretratamientos, los microorganismos que atacan la madera degradando la lignina naturalmente son puestos en el sustrato para eliminar este componente, este pretratamiento tiene varias ventajas:

- ❖ Bajo consumo energético
- ❖ No se genera productos de desecho tóxicos para el ambiente
- ❖ Condiciones peligrosas químicas se evitan

#### 1.3.1.4 Pretratamiento fisicoquímico

La desventaja de este pretratamiento es la necesidad de tiempos largos para tratar la materia y obtener la degradación de los polisacáridos (y la reducción de los azúcares fermentables). Todas las características mencionadas, están asociadas con ahorros económicos. Debido a esto, los pretratamientos biológicos permanecen a escala laboratorio. Una elección cuidadosa del organismo (usualmente un hongo que pudre madera) o una mezcla de organismos adecuados puede, sin embargo, asegurar una remoción grande de lignina (Mousdale, 2008).

En la Tabla 1.3 se presentan los diferentes pretratamientos fisicoquímicos de la biomasa lignocelulósica.

Tabla 1.3 Pretratamientos fisicoquímicos para la biomasa lignocelulósica

MÉTODO	PRINCIPIO
<b>Ácidos:</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Vaporización con impregnación de ácido sulfúrico</li> <li>• Explosión de vapor con impregnación de ácido sulfúrico</li> <li>• Explosión de vapor con dióxido de azufre</li> <li>• Explosión de vapor con dióxido de carbono</li> </ul>	Solubilización de hemicelulosa
<b>Álcalis:</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Explosión de vapor con hidróxido de sodio</li> </ul>	Deslignificación + remoción de hemicelulosa

Fuente: Mousdale, 2008

### 1.3.2 Factores clave para un pretratamiento efectivo

Existen varios aspectos importantes a considerar para un proceso de pretratamiento efectivo y a bajo costo, a continuación se mencionan los más importantes:

- ✓ Alta digestibilidad del sólido pretratado. La celulosa derivada del pretratamiento debería ser altamente digerible con rendimientos cercanos al 90 %, también el tiempo de hidrólisis enzimática no debe sobrepasar los 3 días ni cargas enzimáticas de 10 FPU/g de celulosa.
- ✓ Mínima cantidad de compuestos tóxicos.

El hidrolizado líquido derivado del pretratamiento debe ser fermentable y producido a un bajo costo. Las condiciones severas durante el pretratamiento degradan parcialmente la hemicelulosa, generando compuestos tóxicos productos de la descomposición de azúcares que podrían afectar las etapas subsecuentes de fermentación. Los productos de degradación de los residuos agroindustriales tienen la siguiente clasificación: ácidos carboxílicos, derivados del furano y compuestos fenólicos. Los principales derivados del furano son el furfural y el 5-hidroximetilfurfural, los cuales provienen de la degradación de pentosas y hexosas respectivamente. En su mayoría, los ácidos débiles son principalmente el acético, fórmico y el levulínico y para el caso de los compuestos fenólicos, se incluyen a los alcoholes, aldehídos y cetonas (Sun y Cheng, 2002; Alvira *et al.*, 2009).

- ✓ **Reducción del tamaño de partícula innecesaria.** La molienda o el triturado del residuo agroindustrial para reducir su tamaño de partícula previamente al pretratamiento, demanda grandes cantidades de energía, además de encarecer el proceso.

- ✓ **Recuperación de la lignina.** Los productos de oxidación de la lignina como los alcoholes aromáticos, deben ser recuperados y convertidos a productos de valor comercial.
- ✓ **Bajos requerimientos de energía.** La demanda de calor y energía para el pretratamiento debe ser baja o compatible con el proceso térmicamente integrado (Alvira *et al.*, 2009).

#### 1.4 Hidrólisis de la celulosa

La etapa de hidrólisis de materiales lignocelulósicos puede realizarse tratando el material con ácido diluido, ácido concentrado o mediante el uso de enzimas. El grado de hidrólisis alcanzado en cada residuo lignocelulósico depende del contenido de lignina de este. La celulosa de los residuos con contenidos en lignina inferior al 10 % respecto a materia seca inicial, se hidroliza bien (más del 80 %); es el caso de los tallos del sorgo dulce. Los materiales cuyo contenido en lignina es más elevado, tienen rendimientos de hidrólisis más bajos. La degradación de hexosas a hidroximetilfurfural (HMF) no ha superado, en ningún caso, el 8 % (Breijo y Yúfera 1989).

Las condiciones de la hidrólisis en cada etapa deben ser estudiadas dependiendo del material a utilizar, ya que la complejidad estructural y composición depende del tipo de residuo o desechos que se esté utilizando (Chandler *et al.*, 2012). Respecto al tratamiento de los materiales lignocelulósicos, la hidrólisis ácida ha sido la tecnología más utilizada para la obtención de azúcares fermentables, que posteriormente son convertidos a etanol (Sarrouh *et al.*, 2005).

En los residuos lignocelulósicos se realiza una prehidrólisis ácida y una hidrolisis enzimática, en la prehidrólisis ácida se obtiene xilosa, con la cual se puede generar productos de valor comercial como el xilitol, que hace atractivo el fraccionamiento y aprovechamiento de los componentes lignocelulósicos. En la hidrolisis enzimática se

obtiene glucosa. Ambos productos obtenidos (xilosa y glucosa), pueden ser fermentados y orientados a la obtención de bioetanol.

#### 1.4.1 Hidrólisis ácida

Con ácido concentrado o diluido es posible romper el polímero de celulosa y hemicelulosa de la biomasa para obtener las moléculas de azúcares que pueden ser fermentadas a etanol. La ventaja de la hidrólisis ácida, es que el ácido puede penetrar la lignina sin tratamiento previo, la tasa de hidrólisis ácida es más rápida que la hidrólisis enzimática. Sin embargo, presenta la desventaja de que la glucosa se degrada rápidamente bajo condiciones ácidas. Se emplea ácido sulfúrico y ácido clorhídrico en concentraciones de 1 - 10 % a una temperatura de 100 - 150 °C. Pero en estas condiciones relativamente moderadas, es menos eficaz la formación de hexosas debido a que los monosacáridos se descomponen en compuestos menos deseables durante la hidrólisis, como el furfural (producto de la deshidratación de pentosas) y el hidroximetilfurfural (producto de la deshidratación de hexosas que son sustancias inhibitorias) (Lenihan *et al.*, 2010).

Roberto *et al.*, (2003) en estudios previos, comentan que la concentración del ácido es el factor más influyente en el rendimiento obtenido de los azúcares, mientras que la temperatura lo es en la degradación de éstos. Así mismo, el tiempo de mantenimiento de la hidrólisis en el autoclave está muy relacionado con la temperatura de reacción, de esta manera al convertirse la mayor cantidad de hemicelulosa y celulosa a glucosa, xilosa y a otros compuestos sigue la degradación de estas azúcares en compuestos tóxicos como hidroximetilfurfural (HMF), furfural y ácido acético, reduciéndose de manera significativa los azúcares recuperables en el hidrolizado. Este hecho explica el comportamiento de los azúcares reductores durante el desarrollo de la hidrólisis a temperatura constante de 121 °C.

Acudiendo al estudio de la cinética de hidrólisis de la hemicelulosa del *Switchgrass* (Canettieri *et al.*, 2007; Morinelly *et al.*, 2009), se sabe que a concentraciones bajas de ácido sulfúrico (0.25 - 0.75 % p/p) y temperatura de 150 °C, se produce del 33 al

60 % de oligosacáridos de xilosa y que la degradación de xilosa a furfural no supera el 15 %, con respecto al contenido inicial. La máxima producción de carbohidratos glucosa y xilosa en el hidrolizado no se puede lograr simultáneamente, porque la máxima producción de glucosa se presenta a temperaturas mayores que la de xilosa. Para este estudio la máxima producción de glucosa se presenta en las reacciones realizadas a 150 °C, mientras que la máxima producción de xilosa se presenta en los pretratamientos realizados a 130 °C. Este resultado es similar en la investigación reportada por Dien *et al.*, (2006) y Marzioletti *et al.* (2008).

Alvira *et al.*, (2009) aclaran que el pretratamiento con ácido diluido parece ser un método favorable para aplicación industrial y ha sido estudiado en el tratamiento de una gran variedad de residuos lignocelulósicos. Rangel-León *et al.*, (2009) maximizaron la cantidad de xilosa liberada, evitando la degradación térmica de pentosas y hexosas, así como la formación de ácido acético que inhiben la subsecuente fermentación de xilosa a xilitol.

Herazo *et al.*, (2010) concluyen en sus resultados obtenidos para la hidrólisis ácida de cascarilla de arroz, que la interacción entre la concentración de ácido sulfúrico y el tiempo tiene un efecto altamente significativo ( $Pr < 0.05$ ) en la producción de azúcares reductores., donde al aumentar el tiempo de hidrólisis se produce un incremento en la concentración de azúcares reductores cuando se utilizan concentraciones de  $H_2SO_4$  del 1 % y 2 %, siendo este último el que causa el mayor aumento. Por el contrario, la concentración del  $H_2SO_4$  del 3 % causa una disminución en la concentración de azúcares reductores al incrementar el tiempo. Para la selección del hidrolizado no solo se tuvieron en cuenta los tratamientos con mayor concentración de azúcares reductores, sino también las diferencias significativas entre los tratamientos y los costos inherentes al utilizar un ácido de mayor concentración o un tiempo de reacción mayor. Estos resultados son comparables a los reportados por Roberto *et al.*, (2003) en la obtención de hidrolizados de paja de arroz, donde la más alta concentración de xilosa ( $25 \text{ g L}^{-1}$ ) y glucosa ( $6 \text{ g L}^{-1}$ ) son reportadas al utilizar la concentración de  $H_2SO_4$  del 1.6 % y 30 min de tratamiento.

### 1.4.1.1 Xilosa

Tradicionalmente se considera al bagazo de sorgo dulce como un desecho que contamina el medio ambiente; sin embargo, este subproducto posee una composición aproximada máxima de 44.8 % de celulosa, 25.9 % de hemicelulosa, 20.1 % de lignina y otros 9.2 % (Kim y Day, 2010). Aprovechando estas características se obtiene por hidrólisis ácida un caldo rico en xilosa, el cual aplicando técnicas de fermentación es utilizado para la obtención de xilitol.

El xilitol (Figura 1.14) es un polialcohol de cinco carbonos que proporciona beneficios a la salud. Previene caries dental y la otitis en niños pequeños, tiene casi el mismo poder edulcorante que la sacarosa, sin embargo posee un poder calórico menor, 2.4 Kcal/g comparado con 4 Kcal/g de la sacarosa. Es utilizado para endulzar gomas de mascar, pastillas, dulces y pastas dentales o como edulcorante para personas diabéticas. Este producto puede ser producido mediante la fermentación de la xilosa, la cual es una azúcar de 5 carbonos que compone acerca de un 50 - 60 % de la hemicelulosa presente en los materiales lignocelulósicos (González *et al.*, 2011).

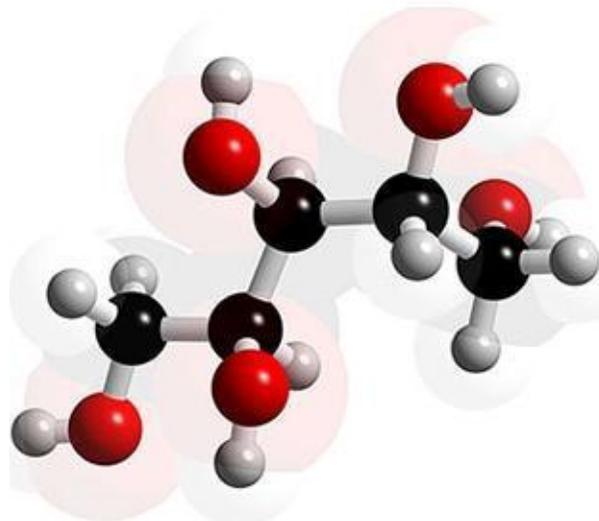


Figura 1.14 Estructura química del Xilitol (Harrison, 2007)

### 1.4.2 Hidrólisis alcalina

El uso de este pretratamiento depende del contenido de lignina en el material. El mecanismo de la hidrólisis alcalina se basa en la saponificación de los enlaces de éster que atraviesan los xilanos en la hemicelulosa y otras componentes como la lignina. Así, el tratamiento con NaOH diluido aumenta el área superficial y disminuye el grado de polimerización y cristalinidad por la remoción de los enlaces entre la lignina y los carbohidratos (Sun y Cheng, 2002).

Según Musatto *et al.*, (2008) al utilizar el método de la hidrólisis alcalina en una muestra no tratada de grano de cerveza, con un contenido de lignina del 28 %, se produce un aumento del rendimiento de glucosa y celobiosa en 3.5 veces. Las condiciones óptimas de uso de este pretratamiento son una solución al 5 % p/v de NaOH al 2 % p/v a 120°C por 90 min.

### 1.4.3 Hidrólisis enzimática

Este proceso se lleva a cabo mediante el uso de enzimas llamadas celulasas las cuales son altamente específicas. Los productos son azúcares reductores incluyendo glucosa. Los costos de utilidad de este proceso de hidrólisis son bajos comparados con la hidrólisis ácida porque se realiza bajo condiciones medias (pH de 4.8 y temperatura de 40 - 50 °C) y no produce problemas de corrosión (Sun y Cheng, 2002).

Amador (2009) obtuvo un rendimiento de glucosa máximo de 54.14 % con una concentración de celulasa de 25 FPU/g. La aplicación de surfactantes no iónicos como el Tween 80 al proceso de hidrólisis enzimática es prometedor ya que implica la reducción de la no bioespecificidad al evitar la adsorción de proteínas sobre la lignina, así como reducir el proceso de desnaturalización de las enzimas alcanzando un mejor desempeño durante la digestión de la celulosa. El Tween 80 ha logrado mejorar el desempeño de las celulasas al alcanzar mayores rendimientos en tiempos

menores a las 80 h con respecto a materiales en los que no se añadió surfactante (Park *et al.*, 1992).

#### 1.4.3.1 Glucosa

La sacarosa es un carbohidrato dulce de forma cristalina y transparente, en fase líquida de color blanco, soluble en agua pero poco soluble en alcohol. Puede ser descompuesta por la presencia de ácidos diluidos o por medio de la enzima invertasa durante la fermentación, desdoblándose en dos azúcares simples, conocidos como glucosa y fructosa.

La glucosa es el principal azúcar (Figura 1.15), es un monosacárido cíclico de seis átomos de carbono, este azúcar simple es derivable de la conversión de almidón. Los procesadores de azúcar pueden hacer este tipo de azúcar de una gran variedad de fuentes: maíz, trigo, arroz, papa, sorgo etc. Muy probablemente sea el compuesto orgánico más abundante en la naturaleza (Esturo, 2012).

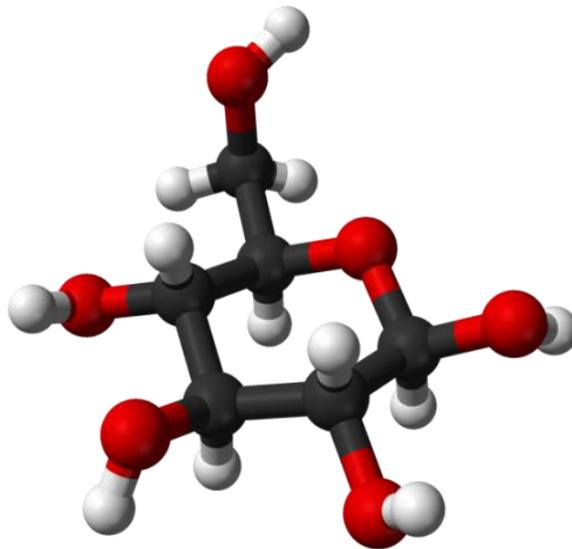


Figura 1.15 Estructura química de la Glucosa (Harrison, 2007)

### 1.4.3.2 Enzimas que contribuyen la hidrólisis de la celulosa a glucosa

La tecnología para generar azúcares fermentables de biomasa lignocelulósica sigue en desarrollo y depende fuertemente de desarrollos en tecnología de las celulasas, dado que el esquema más prometedor para realizar la hidrólisis, involucra enzimas degradantes de celulosa y hemicelulosa. El mayor limitante actual en la comercialización de etanol es el alto costo de estas proteínas, las cuales son claves para la producción del biocombustible (Sun y Cheng, 2002).

Las celulasas se refieren a un grupo de enzimas que contribuyen a la hidrólisis de la celulosa a glucosa. Es comúnmente aceptado que la mayoría de las celulasas provenientes de los hongos consisten en las siguientes enzimas: 1) Endo-1,4- $\beta$ -glucanasa, 2) Exo-1,4- $\beta$ -glucanasa y 3)  $\beta$ -glucosidasa. Debido al uso frecuente de estos términos, una forma común de referirse a las anteriores es endoglucanasa, exoglucanasa y beta glucosidasa (Figura 1.16).

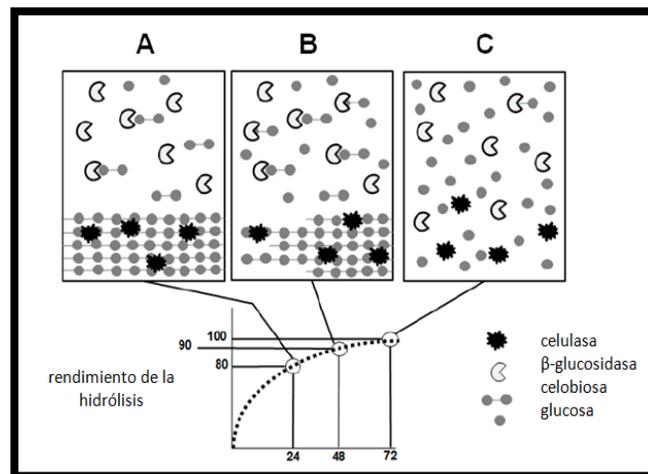


Figura 1.16 Acción de las celulasas sobre el sustrato celulósico (Harris, 2012)

Las endoglucanasas atacan los enlaces  $\beta$ -1,4 glucosídicos de la celulosa en una acción aleatoria, mientras que las exoglucanasas remueven las unidades de celobiosa de los extremos no reductores de la cadena principal. Cabe destacar que la acción aleatoria de la endoglucanasa incrementa la disponibilidad de los extremos

de la cadena principal del glucano. Finalmente la beta glucosidasa digiere la celobiosa para reducirla a monómeros de glucosa (Sun y Cheng, 2002).

#### **1.4.3.3 Surfactantes no-iónicos (Tween 80) como maximizador en la producción de glucosa**

La hidrólisis enzimática de los materiales lignocelulósicos a azúcares fermentables es uno de los pasos más costosos en la producción de bioetanol, principalmente debido al precio de las celulasas y las altas dosis requeridas. Por lo que disminuir dichas dosis es altamente deseable. Se ha demostrado que ciertos aditivos, en particular los surfactantes (agentes actuadores en la interface) son compuestos que contienen una cabeza hidrofílica y una cola hidrofóbica. Los surfactantes son capaces de ensamblarse en micelas y adsorberse en superficies. El grado y tipo de adsorción depende de la estructura del surfactante.

Varios investigadores han reportado (Alkasrawi *et al.*, 2003; Kim *et al.*, 2007) que los surfactantes son adsorbidos al sustrato incrementando los rendimientos en la hidrólisis y se han ofrecido diversas explicaciones tales como: 1) alteran la estructura del sustrato y la hace más accesibles a las enzimas, 2) estabilizan a las enzimas y previenen su desnaturalización durante la hidrólisis; 3) incrementan positivamente las interacciones entre el sustrato y las enzimas y 4) reducen la adsorción no productiva de las enzimas en el sustrato aunque aún no se sabe con certeza el por qué, se han reportado incrementos importantes gracias a estos compuestos (Eriksson y Börjesson, 2002; Qing y Bing, 2010).

El principal obstáculo para la comercialización del etanol celulósico es la carga enzimática a emplear, la cual representa hasta el 60 % del costo total del proceso. Es por eso que la dosis enzimática debe ser lo más baja posible. Aditivos como el Tween 80 podrían mejorar la efectividad de la eficiencia de las celulasas durante la hidrólisis de los residuos agroindustriales. Derivado de la investigación de algunos surfactantes no iónicos como el Tween 80, se han propuesto algunos mecanismos de acción los cuales se dividen en tres categorías principales:

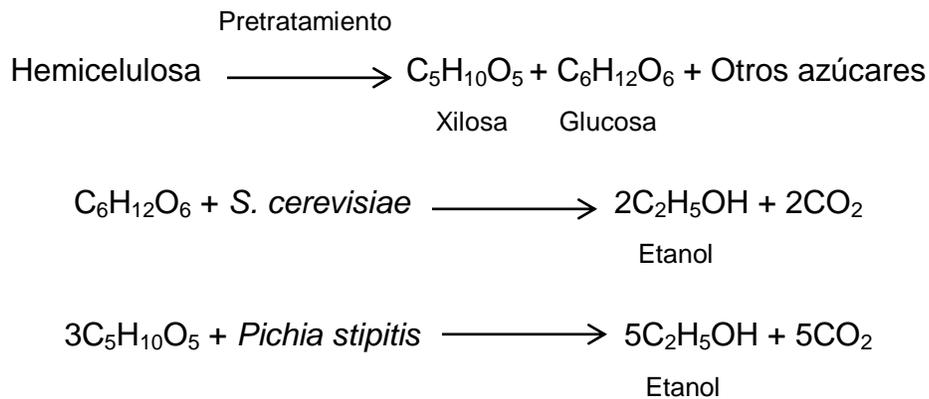
- A. Los surfactantes alteran la ultra estructura del sustrato, haciendo más accesible a la celulosa al ataque enzimático.
- B. Los surfactantes incrementan la estabilidad enzimática al reducir el proceso de desnaturalización de la proteína causada por los esfuerzos cortantes a los que es sometido el medio acuoso.
- C. Los surfactantes reducen la adsorción improductiva de las celulasas sobre la lignina.

Sin embargo, el efecto del Tween 80 sobre la hidrólisis de la celulosa pura como la celulosa cristalina ha sido controversial. Es posible obtener incrementos superiores al 14 % de rendimiento en glucosa para la sacarificación de residuos como el papel periódico, principalmente cuando se añade en cantidades superiores de 0.02 g de Tween 80 por cada gramo de papel (Castanon y Wilke, 2001). En otros casos, este surfactante ha logrado mejorar el desempeño de las celulasas al alcanzar mayores rendimientos en tiempos menores a las 80 h con respecto a materiales en los que no se añadió surfactante (Park *et al.*, 1992). Sin embargo, en algunos casos la adición de otros surfactantes como el Tween 20 no ha demostrado incrementar el rendimiento de la hidrólisis enzimática para celulosa cristalina (celulosa pura).

### **1.5 Fermentación de azúcares a etanol**

La fermentación de azúcares por microorganismos constituye en método más común para producir combustibles como etanol a partir de granos y residuos vegetales. Esta bioconversión está bien establecida para algunos azúcares, como la glucosa proveniente del almidón de maíz y jugo de caña, empleando principalmente a *Saccharomyces cerevisiae*. Sin embargo se ha encontrado que algunos tipos de hongos y levaduras denominadas como no-*Saccharomyces* pueden ser productores de etanol. Por otro lado, la tecnología para obtener bioetanol a partir de biomasa lignocelulósica, se encuentra en desarrollo, con oportunidades de mejorar. Entre ellas, la necesidad de contar con microorganismos que presenten mayores rendimientos y velocidades de conversión, que permitan consolidar etapas del

proceso (Jolly *et al.*, 2006). En una etapa posterior, del pretratamiento se obtiene una solución de azúcares fermentables que contienen principalmente glucosa, así como de pentosas resultantes de la hidrólisis inicial de la hemicelulosa. Estos azúcares son posteriormente convertidos en etanol mediante microorganismos que pueden utilizar uno o varios azúcares presentes en el material lignocelulósico pretratado e hidrolizado. Este complejo proceso puede ser representado por las siguientes reacciones en el caso de la fermentación alcohólica:



De acuerdo a informes hechos por la Unión Nacional de Cañeros, A.C.-CNPR (2013), la máxima producción de etanol que se ha tenido en México fue de 59 millones de litros durante la zafra 2005 - 2006, de los cuales Veracruz aportó más de 37 millones de litros, en ese mismo período. Para evaluar la transformación de azúcares a etanol se utiliza como parámetro estequiométrico el rendimiento biomasa/sustrato ( $Y_{X/S}$ ), que se define como la cantidad de levadura producida por cantidad de sustrato consumido, el rendimiento producto/sustrato ( $Y_{P/S}$ ) el cual es la cantidad de producto sintetizado por cantidad de sustrato consumido, y la productividad ( $Q_P$ ) la cual se define como la cantidad de etanol producido por unidad de tiempo y volumen (Vázquez y Dacosta, 2007).

### 1.5.1 Conversión de xilosa a etanol

Después de la glucosa, la xilosa es el azúcar más abundante del hidrolizado de biomasa vegetal. El promedio en el contenido de xilosa del hidrolizado lignocelulósico

varía de un 5 a un 25 %. Si además de la fracción de hexosa, se fermenta la fracción de xilosa del hidrolizado en etanol y/o xilitol, esto puede mejorar considerablemente la economía del proceso.

A pesar de que en la naturaleza existe una enorme diversidad de microorganismos que pueden fermentar pentosas, es poco probable encontrar en la naturaleza un microorganismo que exprese fermentación etanólica de pentosas y hexosas.

Las levaduras que pueden crecer sobre xilosa no son capaces de fermentarla a etanol, a excepción de pocas especies, tales como *Pichia stipitis* que puede fermentar lentamente este azúcar (Tabla 1.4). Las levaduras que metabolizan xilosa, incluso aquellas que fermentan pentosas lentamente en anaerobiosis, no pueden crecer anaeróticamente, incluso sobre glucosa. Por otro lado, *S. cerevisiae* exhibe un crecimiento anaeróbico vigoroso con hexosas y no puede metabolizar xilosa. En general, las levaduras tienen más de las propiedades requeridas para la aplicación industrial que las bacterias y por lo tanto ofrecen un interesante punto de inicio para la introducción de una vía de fermentación de xilosa.

Tabla 1.4 Propiedades de microorganismos candidatos a la producción industrial de etanol a partir de lignocelulosa

Organismo	Crecimiento sobre D-xilosa	Crecimiento sobre D-glucosa*	Fermentación homoetanólica	Crecimiento a pH 4.0
<i>Escherichia coli</i>	+	+	-	-
<i>Clostridia spp.</i>	+	+	-	-
<i>Zymomonas spp.</i>	-	+	+	-
<i>Pichia stipitis</i>	+	-	+	+-
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	-	+	+	+

\*condiciones anaeróbicas

Fuente: Gutiérrez-Rivera, 2011

En el hidrolizado de biomasa vegetal, el azúcar de cinco carbonos D-xilosa (azúcar de la madera) es el principal monosacárido que no puede ser fermentado por la cepa silvestre *S. cerevisiae*. A pesar de que no puede ni fermentar ni asimilar xilosa, ésta no es una característica general de las levaduras. Las primeras observaciones sobre la fermentación de xilosa por levaduras fueron hechas en 1980. Levaduras como *Pachysolen tannophilus* y *Candida tropicalis* fueron capaces de fermentar xilosa a etanol (Gutiérrez-Rivera, 2011).

En una búsqueda de 200 levaduras capaces de crecer sobre xilosa, 19 se encontraron que producen 0.1 a 1.0 g L<sup>-1</sup> de etanol bajo condiciones fermentativas en un medio conteniendo 2 % (p/v) de xilosa. Cepas como *Brettanomyces naardenensis*, *Candida shahatae*, *Candida tenuis*, *Pachylosen tannophilus*, *Pichia segobiensis* y *Pichia stipitis* producen más de 1.0 g L<sup>-1</sup>. Debido a que la xilosa es un constituyente abundante de la biomasa vegetal, no es de sorprender que el origen de todas esas levaduras sean fuentes relacionadas con la madera (Gutiérrez-Rivera, 2011).

Fein *et al.*, (1984) aislaron siete cepas, que fueron capaces de fermentar xilosa para producir etanol a partir del hidrolizado en cultivo por lote. Se encontró que el xilitol es el principal producto, y que la cantidad de xilitol varía dependiendo de la cepa empleada. El hidrolizado ácido fue inhibitorio para todas las cepas de levaduras, aún en concentraciones diluidas. La aclimatación de la cepa y el pretratamiento químico resultó en un marcado incremento en la utilización de sustratos del hidrolizado ácido. En un intento por desarrollar una levadura fermentadora de xilosa para producción industrial de etanol, se indujo la mutación por la luz UV de *Pachylosen tannophilus*; de las cepas aisladas se observó un consumo más rápido de xilosa. Sorprendentemente, solo un pequeño número de levaduras que fermentan glucosa y que pueden metabolizar xilosa son capaces de fermentar este azúcar a etanol.

### 1.5.2 *Pichia stipitis*

La levadura *Pichia stipitis* tiene la mayor capacidad nativa para la fermentación de xilosa que cualquier otro microorganismo conocido. La levadura *Pichia stipitis* pertenece a un grupo de levaduras que utiliza una alternativa de código genético nuclear en los códigos CUG para serina en lugar de leucina. *Pichia stipitis* es de interés biológico debido a su capacidad única para fermentar la xilosa rápidamente. El aumento de la capacidad de *Pichia stipitis* para la fermentación de xilosa podría mejorar la productividad y sostenibilidad de la agricultura y la silvicultura mediante la alternativa de nuevas salidas para los residuos de las cosechas agrícolas y residuos madereros. La productividad agrícola se vería muy mejorada y los ingresos de los agricultores aumentarían si hubiera mercados más grandes para los residuos agrícolas (Silva *et al.*, 2011).

Dada la abundancia de xilosa y su potencial para la bioconversión de materiales lignocelulósicos a los combustibles renovables, *Pichia stipitis* ha sido ampliamente estudiada. Cepas nativas de *P. stipitis* han demostrado producir aproximadamente 50 g/L de etanol en 48 h a partir de xilosa pura en medio definido utilizando urea como fuente de nitrógeno. Cepas manipuladas genéticamente de *P. stipitis* se producen 57 g/L de etanol a partir de xilosa pura en menos de 48 h y las cepas adaptadas se producen cantidades significativas de etanol a partir de hidrolizados ácidos de la lignocelulosa (Jeffries *et al.*, 2007).

### 1.5.3 Factores que influyen en la fermentación alcohólica

El éxito de una buena fermentación depende de la eficacia del tratamiento preliminar: concentración del azúcar, pH y temperatura óptimos; la adición de sustancias nutritivas al mosto, contaminación por otros microorganismos, empleo de un organismo resistente a altas concentraciones de alcohol, mantenimiento de condiciones anaerobias y la inmediata destilación del producto fermentado.

Para llevar a cabo una fermentación en la cual se puedan obtener mayores rendimientos de bioetanol, se deben tener en cuenta algunos factores de gran importancia, para mantener las condiciones de vida necesarias en donde el microorganismo fermentador pueda vivir, crecer y reproducirse.

- **Concentración de alcohol.** Las levaduras, presentan cierta resistencia a las concentraciones de alcohol que se producen durante la fermentación, debido a que el etanol, inhibe el transporte de D-xilosa, amonio, glicina y algunos aminoácidos, así como afecta la función y estabilidad de algunas enzimas citoplasmáticas como la hexoquinasa, debido a que a concentraciones críticas de etanol, se presenta la formación de un complejo hexoquinasa-etanol el cual puede detener la reacción glucosa a glucosa-6 fosfato. En conclusión la tolerancia al alcohol depende de la habilidad de la célula para exportar el etanol del interior al medio externo, un proceso que depende de la composición de la membrana y de la fluidez de la misma (Rodríguez, 2007).

La levadura *Pichia stipitis* exhibe una tolerancia baja al etanol. En vista de una reciente investigación que relaciona los efectos de etanol a la toxicidad de una acumulación intracelular de etanol. Uno podría especular que se relaciona con la tolerancia bajo la fermentación de la xilosa, las levaduras al hecho que el oxígeno es un requisito previo para la formación del etanol para la *P. stipitis*, ha sido observado que hay un equilibrio entre la formación del etanol y consumo oxígeno las condiciones limitadas (Peña-Poma, 2009).

- **Acidez del sustrato.** El pH es un factor limitante en el proceso de la fermentación debido a que las levaduras se ven afectadas por el ambiente en el cual se desarrollan es decir alcalino o ácido. Las levaduras tienen rango óptimo de pH que va desde 3.5 hasta 5.5. En el proceso de fermentación, el pH tiende a disminuir debido a la producción de ácidos, formados al tomar los nitrógenos de los aminoácidos perdiendo su carácter anfótero.

En los procesos industriales, se hace uso de soluciones tampón para mantener niveles óptimos de acidez (Rodríguez, 2007).

- **Concentración de Azúcares.** Las concentraciones altas de azúcares afectan los procesos de osmosis dentro de la membrana celular, el rango óptimo de concentración de azúcar es de 10 a 18 %, puesto que a concentraciones de 22 % las levaduras empiezan a tener problemas en su proceso de respiración celular (Rodríguez, 2007).
- **Temperatura.** Las levaduras son microorganismo mesófilos, por lo tanto su temperatura no puede sobrepasar los 50 °C, puesto que a esta temperatura o temperaturas superiores se produce su muerte. Por lo tanto debido a que la fermentación es un proceso exotérmico, se debe mantener en el mismo un control de temperatura para mantener la temperatura en su valor optimo que es de 30 °C (Peña-Poma, 2009).
- **Velocidad de agitación.** Es un factor decisivo en toda fermentación, ya que su presencia hace más vigoroso el crecimiento del microorganismo, disminuyendo la tumultuosidad en el medio. Hay tres puntos de vista de gran importancia que favorecen el rendimiento de la fermentación relacionados con una buena agitación: (1) mejor dispersión del calor hacia el exterior permitiendo mantener una temperatura constante, (2) eliminación rápida del CO<sub>2</sub> impidiendo que este decrezca la tasa de crecimiento de la bacteria y (3) mantener en suspensión las células del microorganismo para así tener una distribución uniforme en todo el volumen del medio (Rodríguez, 2007).
- **Concentración de inóculo.** Es muy importante tener una óptima cantidad inicial de microorganismos fermentadores los cuales garanticen una rápida conversión de azúcares a etanol, sin embargo se debe ser cuidadoso y observar el comportamiento de la fermentación a lo largo del tiempo para elegir la cantidad ideal de sustrato, ya que una sobrepoblación de células

podría causar estrés o presión osmótica, lo que causaría bajos rendimientos (Ndams *et al.*, 2011).

- **Tiempo de fermentación.** Los microorganismos fermentadores tienen un ciclo de vida, una fase lag o de adaptación al medio de fermentación, fase exponencial de crecimiento, fase estacionaria y finalmente la fase de muerte. El tiempo de fermentación se determina en el punto donde se obtiene una máxima concentración de bioetanol, ya que un tiempo mayor causa pérdida de etanol por evaporación o en ocasiones cuando se agota el sustrato es consumido por las levaduras (Inei *et al.*, 2001).
- **Inhibidores.** Los inhibidores microbianos potenciales presentes en el hidrolizado de material lignocelulósico son numerosos; el ácido acético, furfural, fenolitos, ácidos aromáticos y neutralización. Todavía los inhibidores desconocidos permanecen sin ser identificados, y se espera que actúen sinérgicamente. Además, el efecto inhibitorio se relaciona con la cantidad de células usada en fermentación. Hay dos maneras de minimizar los efectos inhibitorios presentes de un hidrolizado de material lignocelulósico. Primero con un pretratamiento previo para quitar los inhibidores, por ejemplo, intercambio iónico de resinas y detoxificar la alimentación. Segundo adaptación de la alimentación (Peña-Poma, 2009).
- **Sustancias nutritivas y compuestos minerales.** Un medio de cultivo debe de tener todos los elementos necesarios para el crecimiento microbiano, para esto se debe tener en cuenta los requerimientos nutricionales del microorganismo con el cual se va a trabajar. Como todo ser viviente necesita de vitaminas y minerales para un buen crecimiento, estas sustancias son: peptona de caseína, extracto de levadura, agar-agar,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $(\text{NH}_4)\text{SO}_4$ ,  $\text{MgSO}_4$  (Garzón y Londoño, 2009).

**CAPÍTULO II**  
**MATERIALES Y MÉTODOS**

## CAPÍTULO II. MATERIALES Y MÉTODOS

Las etapas limitantes para la producción de etanol a partir de materiales lignocelulósicos, son el pretratamiento y la hidrólisis enzimática que generan el mayor costo, las cuales deben ser estudiadas para lograr una tecnología eficiente y económica.

Debido a lo anterior, para minimizar los costos de producción, se deben de aprovechar los subproductos procedentes del material lignocelulósico, maximizando los azúcares obtenidos del material y disminuyendo los reactivos requeridos, por lo que en esta investigación, se propuso optimizar la hidrólisis ácida del bagazo de sorgo dulce, para la obtención de xilosa, que es un azúcar que incrementará el valor agregado del mismo, ya que posee aproximadamente un 60 % de su composición total, la cual se encuentra en la fracción hemicelulósica del material lignocelulósico.

Posteriormente se realizó la optimización de la etapa de deslignificación de la materia prima para eliminar la lignina e incrementar los rendimientos en la hidrólisis enzimática; los factores que impactan de manera directa en la hidrólisis enzimática son principalmente el contenido de lignina así como la cantidad de celulasa a emplear para degradar la celulosa a glucosa, empleando pequeñas cargas enzimáticas con ayuda de surfactantes no iónicos (por ejemplo Tween 80) como inhibidor de la desnaturalización y adsorción improductiva de las proteínas sobre la lignina residual posterior a la oxidación alcalina del bagazo de sorgo dulce.

Finalmente se evaluó el uso del hidrolizado ácido mediante una cinética de fermentación para la producción de etanol con una levadura de colección (*Pichia stipitis* NRRL) y una autóctona (*Pichia stipitis* JS-ITV S42) en la composición del medio de cultivo adicionando nutrientes esenciales.

En la Figura 2.1 se muestra la metodología general que se siguió en el presente trabajo.

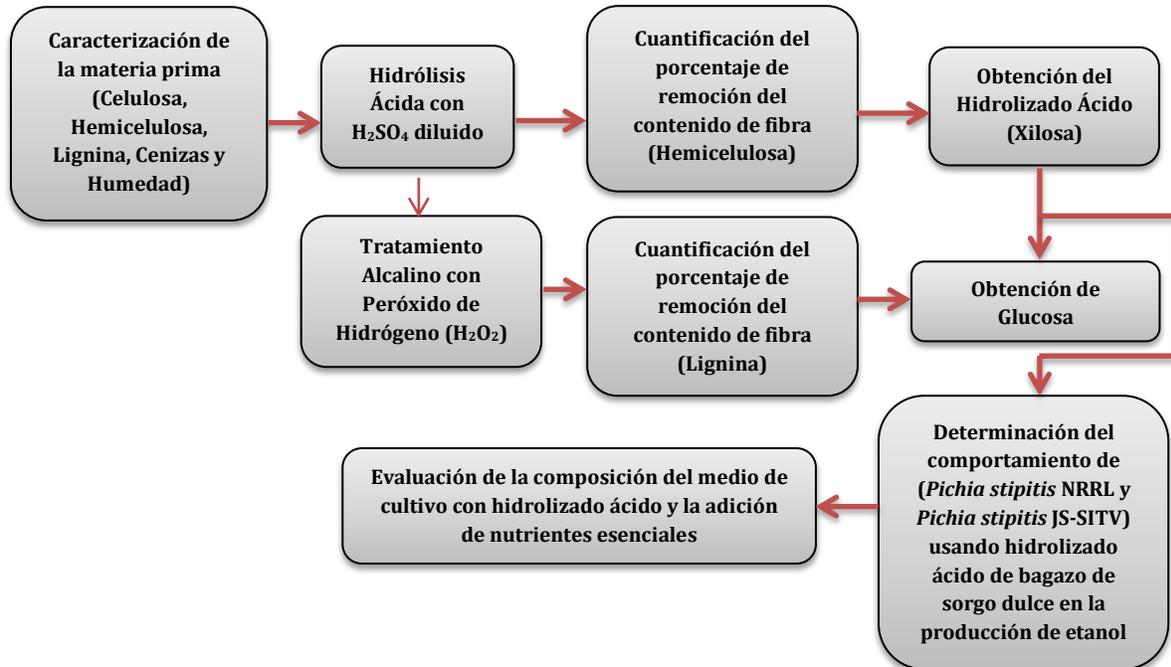


Figura 2.1 Metodología global hacia la obtención de azúcares totales para la producción de etanol del bagazo de sorgo dulce empleando la levadura *Pichia stipitis*

## 2.1 Obtención del bagazo de sorgo dulce

El bagazo de sorgo dulce fue donado de la región del municipio de Cotaxtla, el cual se encuentra ubicado en la zona central del estado de Veracruz, suministrado por el INIFAP zona Golfo-Centro. Cabe mencionar que este bagazo proviene del proceso de lavado y molienda posterior a la extracción del jugo, razón por la cual fue entregado ya molido (Figura 2.2).

Debido a la cantidad de humedad contenida en el bagazo de sorgo dulce, se decidió someter a secado el material mediante radiación solar durante 72 h, para remover la mayor cantidad de agua contenida y garantizar su conservación, así mismo se tomaron en cuenta las condiciones de almacenamiento, que estuviera en un lugar fresco, ventilado y que su empaque (papel encerado) permitiera la aireación del material, con el fin de evitar la proliferación de microorganismos que pudieran crecer en él y posteriormente afectar en los pretratamientos previos a la hidrólisis enzimática.



Figura 2.2 Bagazo de sorgo dulce molido

## 2.2 Caracterización del bagazo de sorgo dulce

La caracterización del bagazo de sorgo dulce se realizó de acuerdo a las normas AOCS (American Oil Chemists Society) y el método tecnológico de ANKOM, Modelo A200 de Ankom Technology, Macedon, NY (Figura 2.3). Esta etapa consiste en determinar el contenido de fibra (celulosa, hemicelulosa y lignina) en las diferentes variedades de sorgo dulce para así poder conocer la eficiencia de los métodos propuestos y obtener los azúcares reductores de la materia prima.



Figura 2.3 Equipo para determinación de lignocelulósicos

La determinación de fibra se realizó tanto a la materia prima, como al bagazo de sorgo dulce prehidrolizado, deslignificado y el remanente posterior a la hidrólisis enzimática. En la Tabla 2.1, se presentan los métodos estandarizados para dichas determinaciones las cuales se encuentran descritas en los anexos 1, 2, 3 y 4).

Tabla 2.1 Parámetros para la caracterización del bagazo de sorgo dulce

Prueba	Método
Hemicelulosa	Fibra detergente neutro y ácido (ANKOM <sup>200</sup> ) (Anexo A.1 y A.2)
Celulosa y lignina	Fibra detergente ácido-lignina (ANKOM Technology) (Anexo A.3)
Humedad	AOCS AB 2-49 (Anexo A.4)
Cenizas	AOCS BA 5A-49 (Anexo A.4)

### 2.3 Hidrólisis ácida del bagazo de sorgo dulce

Como primer tratamiento para el bagazo de sorgo dulce se realizó una hidrólisis ácida con  $H_2SO_4$  diluido, el objetivo principal del pretratamiento ácido es solubilizar la fracción de hemicelulosa de la biomasa y hacer la celulosa más accesible a las enzimas, para obtener la xilosa presente en esta fracción, ya que la xilosa es un azúcar que puede ser convertida a xilitol, el cual es un producto de alto valor comercial.

Cabe mencionar que la hidrólisis ácida del bagazo de sorgo dulce se aprovecha como etapa de lavado para eliminar los azúcares residuales provenientes del proceso de extracción del jugo, de manera que en esta etapa se evita un lavado, lo que implicaría el uso de considerables cantidades de agua que encarecería el proceso.

#### 2.3.1 Condiciones de la hidrólisis ácida

En esta etapa se planteó un diseño experimental Box-Behnken considerándose como variables independientes a tres niveles: concentración de ácido  $H_2SO_4$  (1, 1.5 y 2 % v/v), tiempo de pretratamiento (20, 30 y 40 min) y la relación líquido-sólido (RLS)

de 4, 5 y 6 mL/g, teniéndose como variable de respuesta a la concentración de xilosa (g/L). Posteriormente se realizó un análisis estadístico mediante el software NCSS para determinar las condiciones que maximizaron la producción de xilosa a partir del diseño de experimentos planteado.

En la Tabla 2.2 se muestra el número total de tratamientos/combinaciones a desarrollar.

Tabla 2.2 Diseño Box-Behnken para llevar a cabo el pretratamiento ácido del bagazo de sorgo dulce con valores codificados y naturales

Experimento	Variables Codificadas			Variables Naturales		
	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (% v/v)	Tiempo (min)	RLS (mL/g)	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (% v/v)	Tiempo (min)	RLS (mL/g)
1	-1	-1	0	1	20	5:1
2	1	-1	0	2	20	5:1
3	-1	1	0	1	40	5:1
4	1	1	0	2	40	5:1
5	-1	0	-1	1	30	4:1
6	1	0	-1	2	30	4:1
7	-1	0	1	1	30	6:1
8	1	0	1	2	30	6:1
9	0	-1	-1	1.5	20	4:1
10	0	1	-1	1.5	40	4:1
11	0	-1	1	1.5	20	6:1
12	0	1	1	1.5	40	6:1
13	0	0	0	1.5	30	5:1
14	0	0	0	1.5	30	5:1
15	0	0	0	1.5	30	5:1

El diseño Box-Behnken (Figura 2.4) es una alternativa a los diseños factoriales  $3^k$ , y que se forma a través de la combinación de factoriales  $2^k$  con bloques incompletos está constituido por puntos centrales replicados y el conjunto de puntos que se encuentra en el centro de cada borde del cubo multidimensional que define el área

de interés, por lo que abarca un espacio experimental con menos puntos que un diseño factorial completo y suele ser más eficiente en términos del número de corridas requerido, son rotables o casi rotables (Mason *et al.*, 2003).

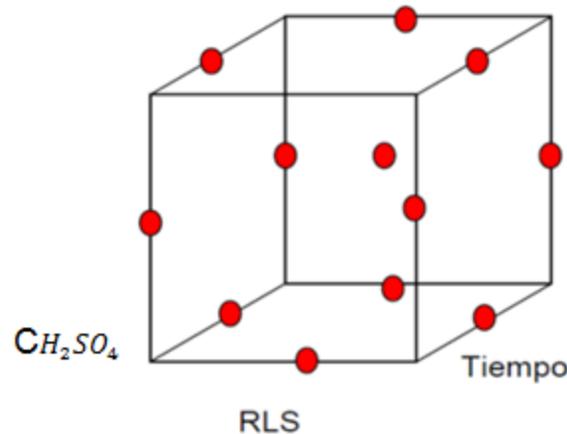


Figura 2.4 Representación del diseño Box-Behnken para tres factores (Domínguez, 2012)

El pretratamiento ácido del bagazo crudo se llevó a cabo en una autoclave marca AESA, modelo CV-250 a una presión de 1.2 Kg/cm<sup>2</sup> con tiempo de calentamiento de la resistencia de 68 min a 121 °C y posterior tiempo de enfriamiento de 80 min, lo cual es importante considerar debido a que la exposición prolongada del hidrolizado ácido podría derivar en la degradación de los azúcares por efecto de las altas temperaturas.

### 2.3.2 Cuantificación de los azúcares (Xilosa)

Posteriormente al enfriamiento del equipo el hidrolizado ácido se filtró con tela de manta para ser prensado, a fin de recuperar la mayor cantidad de hidrolizado que contiene disuelta a la xilosa. Las muestras del hidrolizado se centrifugaron a 10000 rpm por 10 min, a continuación se les aplicó un pretratamiento para precipitar las impurezas y cuantificar mediante cromatografía líquida de alta resolución HPLC modelo Waters 2414 los azúcares: xilosa, glucosa y arabinosa, así como los inhibidores: ácido acético, furfural y 5-hidroximetilfurfural derivados de la descomposición de pentosas y hexosas. Cabe mencionar que el equipo HPLC

cuenta con una columna Shodex SH1011 que utiliza como fase móvil  $\text{H}_2\text{SO}_4$  en una concentración de 5 mM a un flujo de 0.6 mL/min y 55 °C con detector de índice de refracción a 50 °C.

Finalmente el bagazo de sorgo dulce prehidrolizado se sometió a secado por radiación solar durante 72 h, si se realizara en estufa se seca a 70 °C por un tiempo de 24 h para reducir sustancialmente el contenido de humedad (15 %).

### **2.3.2.1 Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)**

La cromatografía de alta eficacia o resolución, es la técnica analítica más ampliamente usada. Las razones de su uso constante, es su sensibilidad, su fácil adaptación a las determinaciones cuantitativas exactas, su idoneidad para la separación de especies no volátiles o termolábiles y sobre todo, su gran aplicabilidad a sustancias que son de primordial interés en la industria, en muchos campos de la ciencia y para la sociedad en general. Algunos ejemplos de estos materiales incluyen: aminoácidos, proteínas, ácidos nucleicos, hidrocarburos, carbohidratos, fármacos, terpenoides, plaguicidas, antibióticos, esteroides, especies órgano-metálicas y una variedad de sustancias inorgánicas.

El HPLC se utiliza ampliamente para la separación de mono y oligosacáridos. Ofrece análisis rápidos y cuantificación precisa. Sin embargo, un problema inherente en el análisis del HPLC es que los azúcares no contienen cromóforos compatibles para su detección por sistemas estándares UV/Vis, por lo que se han utilizado, alternativamente, otros métodos de detención como los de índice de refracción (Jiménez-Ahuja, 2011)

#### ***Pretratamiento para eliminar las impurezas***

Aplicar 125  $\mu\text{L}$  de óxido de bario 0.3 M y 125  $\mu\text{L}$  de sulfato de zinc al 5 % p/v a 1 mL de muestra, la mezcla se coloca en tubos eppendorf, se mezcla, se deja reposar 10 min y se centrifuga durante otros 10 min.

### **2.3.3 Análisis estadístico y optimización de la variable de respuesta**

Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) para establecer los factores significativos y no significativos, se obtuvo un modelo de regresión a través del análisis del diseño de superficie de respuesta, empleando el software estadístico NCSS para predecir la respuesta que se aproxime a la óptima del proceso, lo anterior se comprobó a través de un análisis canónico del modelo cuadrático generado. Finalmente se obtuvieron las gráficas de contorno y de superficie de respuesta con el fin de determinar las regiones de trabajo que caractericen la variación de la respuesta en función de los rangos graficados de las variables independientes (contornos generados).

Cabe resaltar que este análisis se realizó a los diferentes tratamientos (hidrólisis ácida, alcalina y fermentación alcohólica) del bagazo de sorgo dulce empleando en cada uno un diseño de experimentos Box-Behnken.

### **2.4 Deslignificación del bagazo de sorgo dulce prehidrolizado**

El principal obstáculo en la producción de glucosa durante la hidrólisis enzimática del bagazo de sorgo dulce, es la lignina asociada a este residuo agroindustrial, que adsorbe a la celulasa impidiendo su acción sobre los enlaces glucosídicos de la celulosa, también la carga enzimática es un factor importante a considerar ya que se debe maximizar la glucosa obtenida a la menor carga posible para reducir el costo de la primera etapa de obtención de etanol, es decir la hidrólisis enzimática.

En el presente trabajo se utilizó peróxido de hidrógeno en concentraciones bajas para llevar a cabo el pretratamiento oxidativo del bagazo de sorgo dulce, debido a que se han reportado buenos rendimientos de glucosa (40.2 g/L) posterior a la hidrólisis enzimática: 4.7 % v/v de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, RLS de 17.1:1 y tiempo de 26.7 h (Nochebuena, 2012).

### 2.4.1 Condiciones del pretratamiento oxidativo del bagazo de sorgo dulce

Después de la hidrólisis ácida, el bagazo de sorgo dulce se secó a través de radiación solar, y fue sometido a un tratamiento de deslignificación con peróxido de hidrógeno a pH 11.5 en diferentes concentraciones 3.5, 4.5 y 5.5 % v/v con una solución reguladora de hidróxido de sodio 10 M. Se cuantificó la glucosa, xilosa, arabinosa e inhibidores mediante HPLC. El bagazo remanente fue lavado con agua destilada hasta mantener un pH neutro y filtrado con manta, la fracción sólida se secó por medio de radiación solar, la cual podrá ser utilizada posteriormente para la hidrólisis enzimática en trabajos futuros.

Es importante mencionar que la solución de peróxido de hidrógeno debe ser ajustada al pH alcalino inmediatamente después de ser preparada para evitar la descomposición y pérdida de los radicales hidroxilo y superóxidos ya que ellos se encargarán de la oxidación de la lignina del material que va acompañada de un incremento en la temperatura por efecto de la reacción.

Se planteó un diseño de experimentos Box-Behnken que es un método de superficie de respuesta basado en un diseño factorial de tres niveles altamente fraccionado para evaluar las condiciones operacionales del pretratamiento con peróxido de hidrógeno en la subsecuente producción de glucosa durante hidrólisis enzimática del bagazo de sorgo dulce deslignificado.

Se consideraron como variables independientes a tres niveles: la concentración de peróxido de hidrógeno  $H_2O_2$  (3.5, 4.5 y 5.5 % v/v), tiempo de pretratamiento del agente oxidante con el bagazo de sorgo dulce (15, 25 y 35 h) y la relación líquido-sólido (RLS) 10, 17 y 24 mL/g teniéndose como variable de respuesta la concentración de glucosa (g/L), este proceso es independiente de la temperatura, por lo que se trabaja a temperatura ambiente.

En la Tabla 2.3, se muestra el diseño de experimentos empleado. La asignación al azar de cada experimento garantiza que los errores estén distribuidos independientemente.

Tabla 2.3 Diseño Box-Behnken para llevar a cabo el pretratamiento alcalino del bagazo de sorgo dulce con valores codificados y naturales

Experimento	Variables Codificadas			Variables Naturales		
	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (% v/v)	Tiempo (h)	RLS (mL/g)	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (% v/v)	Tiempo (h)	RLS (mL/g)
1	-1	-1	0	3.5	15	17:1
2	1	-1	0	5.5	15	17:1
3	-1	1	0	3.5	35	17:1
4	1	1	0	5.5	35	17:1
5	-1	0	-1	3.5	25	10:1
6	1	0	-1	5.5	25	10:1
7	-1	0	1	3.5	25	24:1
8	1	0	1	5.5	25	24:1
9	0	-1	-1	4.5	15	10:1
10	0	1	-1	4.5	35	10:1
11	0	-1	1	4.5	15	24:1
12	0	1	1	4.5	35	24:1
13	0	0	0	4.5	25	17:1
14	0	0	0	4.5	25	17:1
15	0	0	0	4.5	25	17:1

Se emplearon 4 g de bagazo de sorgo dulce prehidrolizado y deslignificado con una solución reguladora de acetato de sodio 0.05 M, a un pH de 4.8, relación líquido sólido de 9:1 con respecto a la solución reguladora, añadiendo 0.16 mL de celulasa (*Celluclast* 1.5 L) y 0.2 mL de  $\beta$ -glucosidasa (*Novozyme 188*) para posteriormente incubarse a 50 °C, considerando una agitación constante de 200 rpm por 72 h. Previo a la adición de las enzimas, para dar inicio a la hidrólisis, se añadieron 90  $\mu$ L de Tween 80 por cada g de bagazo deslignificado, manteniendo un tiempo de

contacto de 5 h, con la finalidad de mejorar la conversión de celulosa a glucosa en esta etapa (Nochebuena, 2012).

#### 2.4.2 Cuantificación de la glucosa

Transcurridas 72 h se tomaron las muestras del hidrolizado en una campana de flujo laminar en tubos eppendorfs de los 15 experimentos para ser sumergidos en agua a 100 °C por 10 min con la finalidad de desactivar a la enzima. Posteriormente las muestras se centrifugan por 10 min a 10000 rpm para precipitar y así finalmente inyectar las muestras pretratadas y medir la glucosa en el HPLC (sección 2.3.2.1).

#### 2.5 Cinética de fermentación con hidrolizado ácido

Las fermentaciones se realizaron utilizando un medio de cultivo sintético de activación y un medio de preadaptación con jugo de hidrolizado ácido de bagazo de sorgo dulce (Tabla 2.4).

Tabla 2.4 Componentes para el medio de activación y preparación en la fermentación del bagazo de sorgo dulce

Medio de activación		Medio de preparación	
Componente	g/L	Componente	g/L
Xilosa	2		
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.5	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.5
[NH <sub>4</sub> ] <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.2	[NH <sub>4</sub> ] <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.2
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.04	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.04
Extracto de levadura	0.1	Extracto de levadura	0.1

Los medios contenidos en matraces Erlenmeyer de 250 mL son esterilizados en autoclave a 121 °C durante 15 min, así como los matraces de 500 mL que serán utilizados para la cinética.

##### 2.5.1 Condiciones de la fermentación (precultivo y preinóculo)

Con la finalidad de activar las levaduras (*Pichia stipitis* NRRL y *Pichia stipitis* JS-ITV S42) y obtener mejores resultados en cuanto al desarrollo de los microorganismos

durante la fermentación, se toman tres asadas de la caja Petri en las que se encuentran sembradas, y se incuban en un matraz Erlenmeyer de 250 mL conteniendo 100 mL de medio sintético a pH 5.5 durante 12 h, 250 rpm y 30 °C. Una vez transcurrido este tiempo, se realiza el pase al medio del preinóculo de hidrolizado ácido de bagazo de sorgo dulce enriquecido con  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (0.5 g/L),  $[\text{NH}_4]_2\text{SO}_4$  (0.2 g/L),  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0.04 g/L) y extracto de levadura (0.1 g/L) a pH 5.5, a la cual se le inoculan  $3 \times 10^6$  células viables/mL y nuevamente se incuban por 12 h a 250 rpm y 30 °C. Finalmente se inoculan los matraces preparados para la cinéticas con  $3 \times 10^6$  células viables/mL en 300 mL de hidrolizado ácido de bagazo de sorgo dulce muestreando cada 4 h durante 72 h con la finalidad de observar el crecimiento y producción de etanol a lo largo del tiempo.

### ***Cuenta celular***

Mediante el empleo de la cámara de Thoma se realiza la cuenta celular. Las muestras fueron diluidas de tal manera que el número de células viables/mL durante la cuenta en la cámara se encuentre en un rango de 30 a 300 células. Cada conteo se realizó a partir de 5 cuadros grandes (0.25 mm), sabiendo que el volumen de cada cuadro es de  $4 \times 10^6$  mL.

La concentración de células (X) por mililitro está dada por la ecuación 2.1

$$X = \frac{N*d}{N_c*4} * 10^6 \quad (2.1)$$

Dónde N es el número de células contadas, d la dilución empleada y  $N_c$  el número de cuadros contados.

### ***Viabilidad celular***

El conteo de células viables de levadura es llevado a cabo mediante conteo al microscopio de una suspensión celular previa tinción con azul de metileno en una preparación 1:1, después de 10 min de reposo. Determinando como células vivas a

todas aquellas que no presentaron color, mientras que las células muertas se tiñen de una coloración azul.

Lo cual puede atribuirse a dos razones: que la membrana de las células muertas se debilite, permitiendo que el azul de metileno penetre a la célula, a diferencia de las células vivas, las cuales conservan la permeabilidad de su membrana; o a que siendo el azul de metileno un colorante oxido-reducción, sea reducido por una hidrogenasa y este se vuelva incoloro (forma reducido) si la célula está viva (Gutiérrez-Rivera 2011).

La solución de azul de metileno es preparada con 1 g de azul de metileno disuelto en 1 L de solución de tricitrato de sodio trihidratado al 2 % (p/v), filtrado por una membrana de nitrocelulosa (0.22  $\mu\text{m}$ ) marca Millipore. La solución debe conservarse en refrigeración a 4 °C en ausencia de luz.

El porcentaje de viabilidad permite fijar con precisión la tasa de inoculación y el estado fisiológico de las levaduras durante la fermentación. La fórmula para calcular el % de viabilidad está dada por la Ec. 2.2

$$\% V = \frac{N_v}{N_t} * 100 \quad (2.2)$$

Dónde  $N_v$  es el número de células vivas y  $N_t$  el número de células vivas y muertas.

### **2.5.2 Evaluación de la composición del medio de cultivo con hidrolizado ácido y la adición de nutrientes para la fermentación alcohólica**

En esta última etapa, se tomó el mejor tiempo de acuerdo a la cinética de fermentación con la que se obtuvo la mayor producción de etanol.

Se empleó un diseño Box-Behnken de 3 variables con el objetivo de generar una región de trabajo donde se maximice el rendimiento y la producción de etanol, y así posteriormente encontrar las mejores condiciones de producción del mismo. Se seleccionaron como variables independientes: concentración de Urea

(1, 1.5 y 4 g/L),  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0.4, 1.2 y 2 g/L) y  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (3, 4.5 y 6 g/L). Para lo anterior, se prepararon 150 mL de jugo de bagazo de sorgo dulce hidrolizado a pH 5.5 adicionando las cantidades de los nutrientes de acuerdo al diseño experimental propuesto (Tabla 2.5), una vez aplicadas, el sistema se incubó a 30 °C a 250 rpm.

Tabla 2.5 Diseño Box-Behnken para llevar a cabo la fermentación alcohólica con hidrolizado ácido de bagazo de sorgo dulce adicionando nutrientes esenciales en valores codificados y naturales

Experimento	Variables Codificadas			Variables Naturales		
	Urea (g/L)	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (g/L)	$\text{KH}_2\text{PO}_4$ (g/L)	Urea (g/L)	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (g/L)	$\text{KH}_2\text{PO}_4$ (g/L)
1	-1	-1	0	1	0.4	4.5
2	1	-1	0	4	0.4	4.5
3	-1	1	0	1	2	4.5
4	1	1	0	4	2	4.5
5	-1	0	-1	1	1.2	3
6	1	0	-1	4	1.2	3
7	-1	0	1	1	1.2	6
8	1	0	1	4	1.2	6
9	0	-1	-1	1.5	0.4	3
10	0	1	-1	1.5	2	3
11	0	-1	1	1.5	0.4	6
12	0	1	1	1.5	2	6
13	0	0	0	1.5	1.2	4.5
14	0	0	0	1.5	1.2	4.5
15	0	0	0	1.5	1.2	4.5

La variable de respuesta fue rendimiento y productividad de etanol la cual se cuantificó mediante cromatografía líquida de alta resolución HPLC (ver sección 2.3.2.1). Los resultados obtenidos, se analizaron, mediante el software estadístico NCSS 2007 para obtener la variancia, gráficas de contornos y de superficie de respuesta que maximizan la producción de etanol a partir del diseño de experimentos planteado.

**CAPÍTULO III**  
**RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

## CAPÍTULO III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En esta sección se presentan los resultados que abarcan desde la caracterización de la materia prima para tener una mejor comprensión del comportamiento de ésta en la hidrólisis. El pretratamiento con  $H_2SO_4$  diluido, tiene como objetivo obtener azúcares simples que se encuentran polimerizados conformando la estructura lignocelulósica con la finalidad de fermentarlos. Así también se presentan los resultados al realizar el tratamiento alcalino posterior al tratamiento con ácido diluido, que tiene por objetivo la obtención de un material lignocelulósico con baja concentración de lignina. Por último se evaluó el uso del hidrolizado ácido mediante una cinética de fermentación para la producción de etanol con una levadura de colección (*Pichia stipitis* NRRL) y una autóctona (*Pichia stipitis* JS-ITV S42) en la composición del medio de cultivo adicionando nutrientes esenciales. Finalmente se realizó un análisis estadístico de cada una de las etapas, esto con el fin de correlacionarlas.

### 3.1 Caracterización del bagazo de sorgo dulce

La determinación de fibra lignocelulósica en el sorgo dulce sirve para conocer la eficiencia teórica de hemicelulosa a xilosa y celulosa a glucosa y comparar posteriormente el grado de conversión obtenido experimentalmente y determinar el rendimiento de los procesos establecidos.

La caracterización lignocelulósica se realizó a las diferentes variedades de sorgo dulce, que se obtuvieron de Cotaxtla, Ver., en la Tabla 3.1, se presentan los resultados obtenidos de las mejores variedades en base al contenido lignocelulósico (hemicelulosa, celulosa y lignina), dicho análisis fue realizado en el campo experimental “La Posta”, perteneciente al Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) localizado en el kilómetro 22.5 de la carretera Veracruz-Córdoba, Paso del Toro Veracruz.

Tabla 3.1 Concentrado de datos de bagazo de sorgo dulce para las pruebas de hidrólisis

<b>Sorgo (Variedad/Híbrido)</b>	<b>Hemicelulosa (%)</b>	<b>Celulosa (%)</b>	<b>Lignina (%)</b>
<b>P3T3A</b>	25.49	39.61	5.63
<b>P4T4A</b>	24.30	31.87	4.37
<b>P5T5A</b>	23.20	31.49	3.91
<b>P10T10A</b>	29.22	35.86	4.94
<b>P19T19A</b>	25.39	36.36	5.13
<b>P22T22A</b>	29.68	40.41	6.08
<b>P26T26A</b>	30.03	38.43	6.58
<b>PROMEDIO</b>	<b>26.76</b>	<b>36.29</b>	<b>5.23</b>

Donde P = Parcela, T = Variedad de sorgo y A = Siembra de alta densidad

Se puede observar que existe una cantidad mayor de hemicelulosa (26.76 %) y menor de lignina (5.23 %), lo que conlleva a rendimientos altos de cantidad de xilosa presente en el hidrolizado. La diferencia en la composición de material lignocelulósico, puede ser debido a factores de siembra y cosecha del sorgo dulce, tales como humedad, calidad del suelo, el clima entre otros (INIFAP, 2013).

Es importante mencionar que previo a la etapa de hidrólisis ácida, las 7 variedades del bagazo de sorgo dulce fueron totalmente mezcladas, con la finalidad de promediar los contenidos lignocelulósicos de las mismas, ya que sus valores de hemicelulosa, celulosa y lignina se encuentran muy próximos entre sí. Sobre esta mezcla, se determinó el contenido de humedad y cenizas (Anexo A.4), los cuales permiten conocer los valores del peso neto del sorgo libre de humedad y el peso total de orgánicos lignocelulósicos presentes en la muestra, respectivamente.

De la mezcla de las variedades de sorgo dulce pulverizado, se obtuvo un porcentaje de humedad del 9.234 %, el cual aunque ligeramente menor al 10 %, se decidió someter a un proceso de secado en estufa a 70 °C por 24 h para remover la mayor

cantidad de agua contenida, y garantizar su conservación y poca influencia en los procesos subsecuentes. La materia lignocelulósica representó un 68.28 %, y el contenido de cenizas es del orden de 5.16 %, por lo que de manera indirecta se tiene un 26.56 % de materia que pudiera estar representada por ceras y azúcares residuales, entre otros.

El contenido de fibra del bagazo de sorgo dulce muestra una composición similar a las obtenidas por otros autores (Prasad, 2007; Kim y Day, 2010, Montes, 2012) con respecto a la celulosa y hemicelulosa, en cambio si se compara el contenido de lignina para este material es bajo (5.23 %), por lo que no es necesario utilizar altas concentraciones de base en el pretratamiento (Tabla 3.2)

Tabla 3.2 Comparación del contenido de fibra de bagazo de sorgo dulce crudo

Autores	Contenido de Fibra (%)			
	Celulosa	Hemicelulosa	Lignina	Otros
Prasad (2007)	46	27	20	3 - 5
Kim y Day (2010)	44.8	25.9	20.1	9.2
Montes (2012)	35 - 50	15 - 25	20 - 30	-
Presente Trabajo	36.29	26.76	5.23	26.56

### 3.2 Hidrólisis ácida del bagazo de sorgo dulce

El objetivo principal del pretratamiento ácido es solubilizar la fracción de hemicelulosa de la biomasa y hacer la celulosa más accesible a las enzimas, para obtener la xilosa presente en esta fracción, ya que la xilosa es un azúcar que puede ser convertida a xilitol y que hace atractivo el fraccionamiento y aprovechamiento de

los componentes lignocelulósicos. Los resultados obtenidos en este estudio se presentan en la Tabla 3.3.

Tabla 3.3 Resultados obtenidos a partir del primer diseño experimental para la obtención de Xilosa considerando la concentración de  $H_2SO_4$ , tiempo y RLS

Muestra	$H_2SO_4$ (% v/v)	Tiempo (min)	RLS (mL:g)	Xilosa (g/L)	Glucosa (g/L)	Ác. Acético (g/L)	Furfural (g/L)
1	1	20	5:1	22.79	7.55	3.98	0
2	2	20	5:1	29.27	8.01	5.65	0.24
3	1	40	5:1	32.71	9.97	5.61	0
4	2	40	5:1	32.29	11.27	5.84	0.27
5	1	30	4:1	32.77	11.32	5.38	0
6	2	30	4:1	38.65	18.60	6.08	0.46
7	1	30	6:1	25.53	11.34	4.30	0.11
8	2	30	6:1	26.59	12.69	4.71	0.39
9	1.5	20	4:1	36.95	11.79	6.08	0.07
10	1.5	40	4:1	39.58	17.83	3.20	0
11	1.5	20	6:1	25.32	6.90	5.31	0.13
12	1.5	40	6:1	27.88	9.33	4.95	0.14
13	1.5	30	5:1	29.39	13.92	5.10	0.28
14	1.5	30	5:1	31.39	16.00	5.21	0.29
15	1.5	30	5:1	33.74	9.99	5.94	0.12

Se puede observar que las conversiones de xilosa oscilaron en un rango de 22.79 a 39.58 g/L, lo cual es 9.8 % superior a lo obtenido por Chen *et al.*, (2010) y Cheng *et al.*, (2009) de 29.84 y 29.8 g/L respectivamente. Siendo las pruebas 6 y 10 con las que se obtuvo la mayor conversión, teniéndose 3.20 y 0 g/L de ácido acético y furfural respectivamente, lo cual demuestra que hubo degradación de azúcares, sin embargo, no superan el contenido máximo de inhibidores para la producción de xilitol (6 y 1 g/L Rangel-León *et al.*, 2009).

La formación de ácido acético es una consecuencia de la desacetilación de las cadenas laterales de la hemicelulosa por efecto de la hidrólisis ácida, mientras que la aparición de furfural se le atribuye a la descomposición térmica de las pentosas debido a la prolongada exposición de los azúcares a temperaturas superiores a los 120 °C (Jeevan *et al.*, 2011).

### 3.2.1 Análisis de regresión en función de la concentración de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, tiempo y RLS

Empleando el software estadístico NCSS, se realizó un análisis de regresión, con el fin de determinar el polinomio que representa el mejor comportamiento del proceso.

Para ello se considera en variables naturales la concentración de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (CA), tiempo (T) y relación líquido-sólido (RLS), y como variable de respuesta a la Xilosa (g/L). El modelo presentado en la Ec. 3.1, presenta un ajuste del 94.49 %, lo que garantiza la reproducibilidad del proceso.

$$\begin{aligned} \text{Xilosa (g/L)} = & 24.2620 + 48.385 * \text{CA} + 0.9611 * \text{T} - 14.3904 * \text{RLS} - 7.5783 * \text{CA}^2 - \\ & 0.00347 * \text{T}^2 + 1.2729 * \text{RLS}^2 - 0.345 * \text{CA} * \text{T} - 2.41 * \text{CA} * \text{RLS} - 0.00175 * \text{T} * \text{RLS} \end{aligned} \quad (3.1)$$

A partir del modelo de segundo orden obtenido, se genera una gráfica de contornos, la cual es una proyección de una superficie tridimensional sobre un plano bidimensional. Los valores de la superficie ajustada en términos de la variable z son graficados en forma de regiones o patrones cuya coloración varía a través del plano x-y conforme se maximiza o minimiza la variable dependiente. A través de la gráfica de contornos se permite localizar la zona donde se encuentra el punto estacionario que puede ser un punto de respuesta máxima, mínima o un punto de silla.

La Figura 3.1 muestra la gráfica de residuos para el modelo obtenido. Se puede observar que todos los residuos se encuentran dentro de la normalidad y distribuidos aleatoriamente con una ligera dispersión del 5.51 % de los datos los cuales no

ajustan uniformemente sobre la línea recta la cual representa el modelo propuesto. Por lo tanto las diferencias entre los valores de la variable dependiente observados y los valores que predecimos a partir de nuestra recta de regresión aplica para el 94.49 % de los datos experimentales.

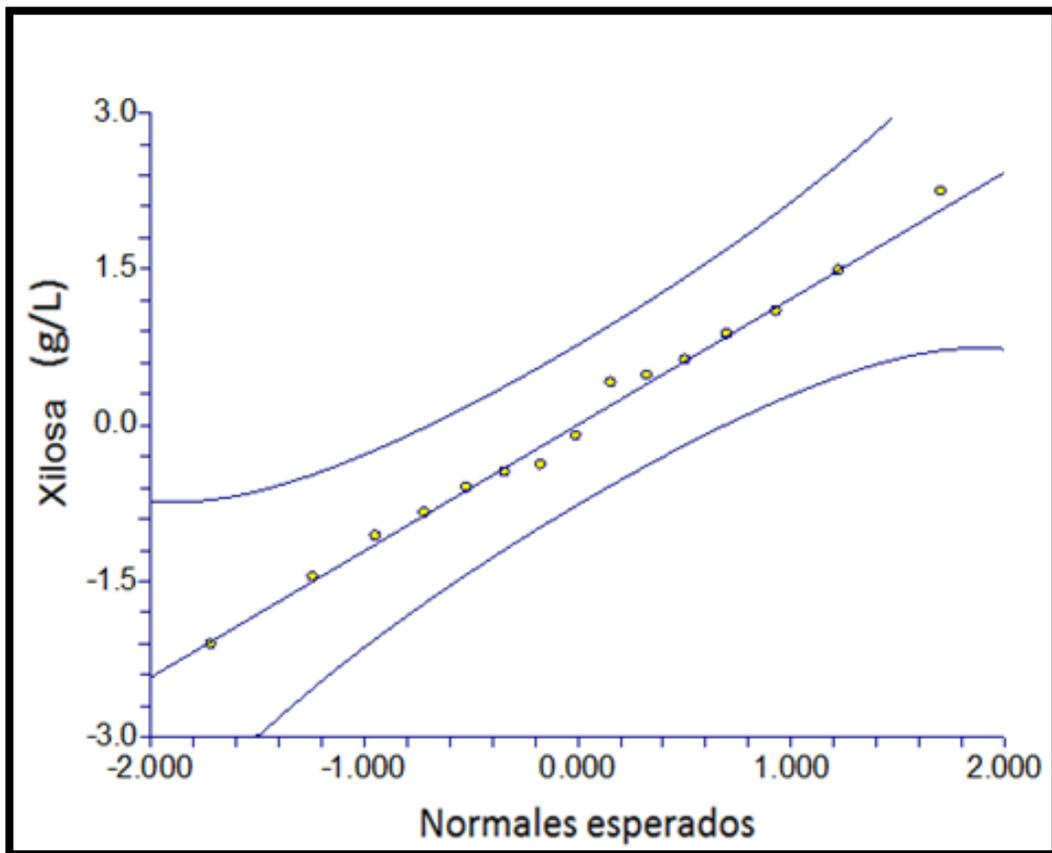


Figura 3.1 Gráfica de residuos de probabilidad del modelo 1(11)

El análisis de varianza sobre la producción de xilosa a partir de la hidrólisis ácida del de bagazo de sorgo dulce, aplicando el estadístico de prueba con distribución “F” utilizando un nivel de significancia del 1 %, se muestra en la Tabla 3.4. Este análisis indicó que el único factor significativo fue la relación líquido sólido (RLS), mientras que las variables concentración de  $H_2SO_4$  y tiempo resultaron no significativas.

Tabla 3.4 ANOVA del diseño experimental Box-Behnken para el bagazo hidrolizado de sorgo dulce

Parámetro	Coefficiente de regresión	Error estándar	T-Radio	Nivel de probabilidad
<b>Intercepción</b>	24.2620			
<b>H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b>	48.385	16.7633	2.89	0.0343
<b>Tiempo</b>	0.9611	0.8381	1.15	0.3034
<b>RLS</b>	-14.3904	11.0104	-1.31	0.2480*
<b>H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub><sup>2</sup></b>	-7.5783	4.0703	-1.86	0.1216
<b>Tiempo<sup>2</sup></b>	-3.4708E-03	1.0175E-02	-0.34	0.7469
<b>RLS<sup>2</sup></b>	1.2729	1.0175	1.25	0.2663
<b>H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>*Tiempo</b>	-0.345	0.1955	-1.76	0.1379
<b>H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>*RLS</b>	-2.41	1.9553	-1.23	0.2725
<b>Tiempo*RLS</b>	-0.0017	9.7766E-02	-0.02	0.9864

### 3.2.2 Optimización de la respuesta y establecimiento de las mejores condiciones de producción de xilosa a partir del bagazo de sorgo dulce

El pretratamiento aplicado con ácido diluido conllevó a la hidrólisis de una cantidad significativa de la fracción hemicelulósica de la biomasa, obteniendo altos rendimientos de azúcares solubles provenientes de la hemicelulosa, principalmente xilosa.

La Figura 3.2 muestra las gráficas de contornos con las distintas combinaciones de los efectos. Podemos observar que aunque existen regiones donde se cierran estos contornos no son valores altos para la cantidad de xilosa a obtener, por lo tanto fueron sustituidas las variables de RLS = 4.1, tiempo = 36 min y concentración de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 1.4 % (región en color rojo), en el modelo obtenido mediante regresión cuadrático el cual arroja un valor de 38.9188 g/L conversión de xilosa, 1.0812 % inferior al obtenido experimentalmente.

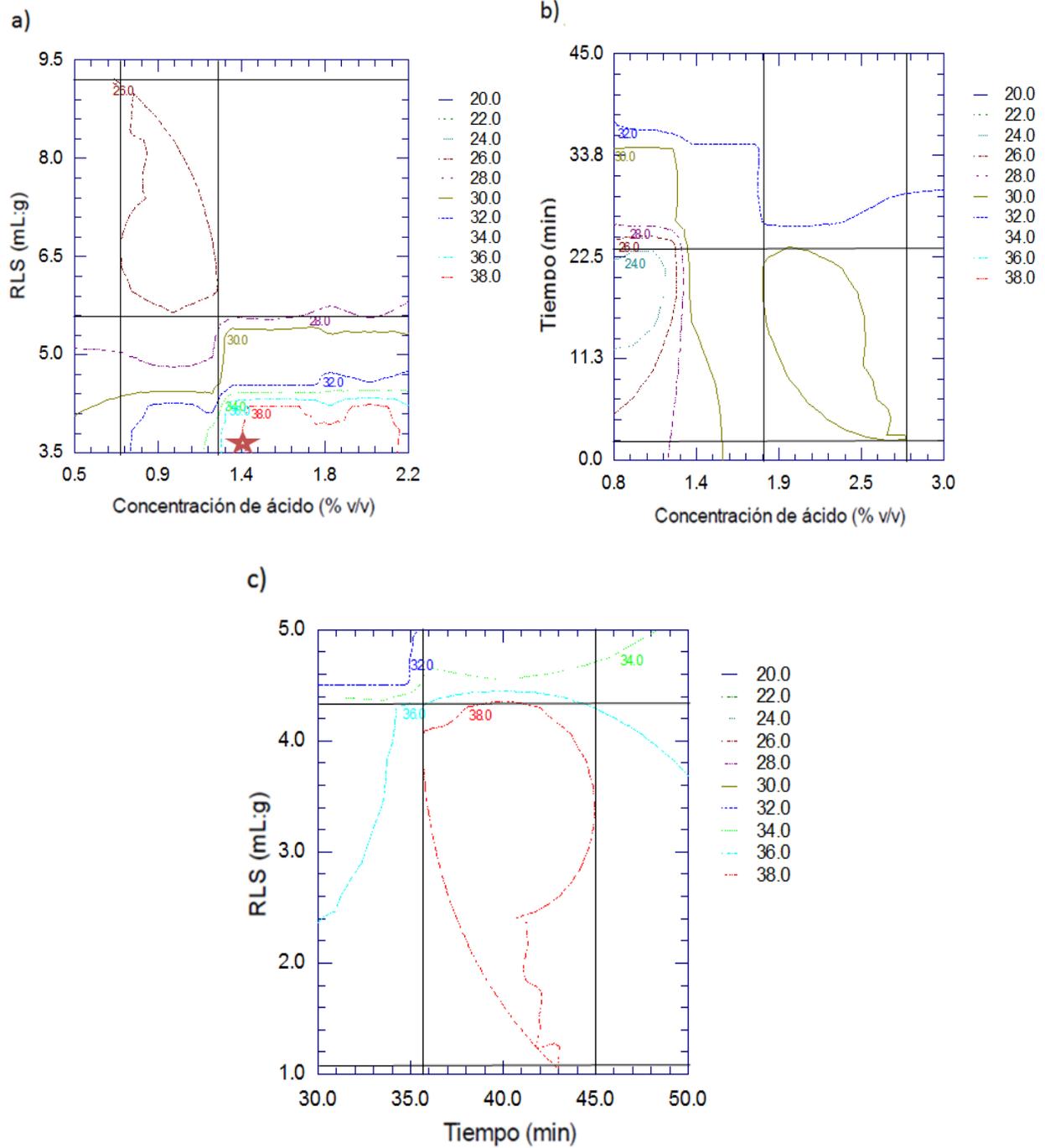


Figura 3.2 Gráfica de contornos del contenido de Xilosa en la prehidrólisis ácida del efecto de: (a) Concentración ácido (% v/v) vs RLS (mL:g), (b) Concentración de ácido (% v/v) vs Tiempo (min) y (c) Tiempo (min) vs RLS (mL:g)

La Figura 3.3 muestra las gráficas de superficie de respuesta con las distintas combinaciones de los efectos a través de los cuales se observa que la mayor concentración de xilosa se vislumbra conforme la concentración de  $H_2SO_4$  se aproxima al punto central, mientras que la RLS debe mantenerse en valores inferiores al punto central, para el caso del tiempo de pretratamiento, la región del punto central (36 min) es un valor adecuado a emplear para la maximización de la xilosa.

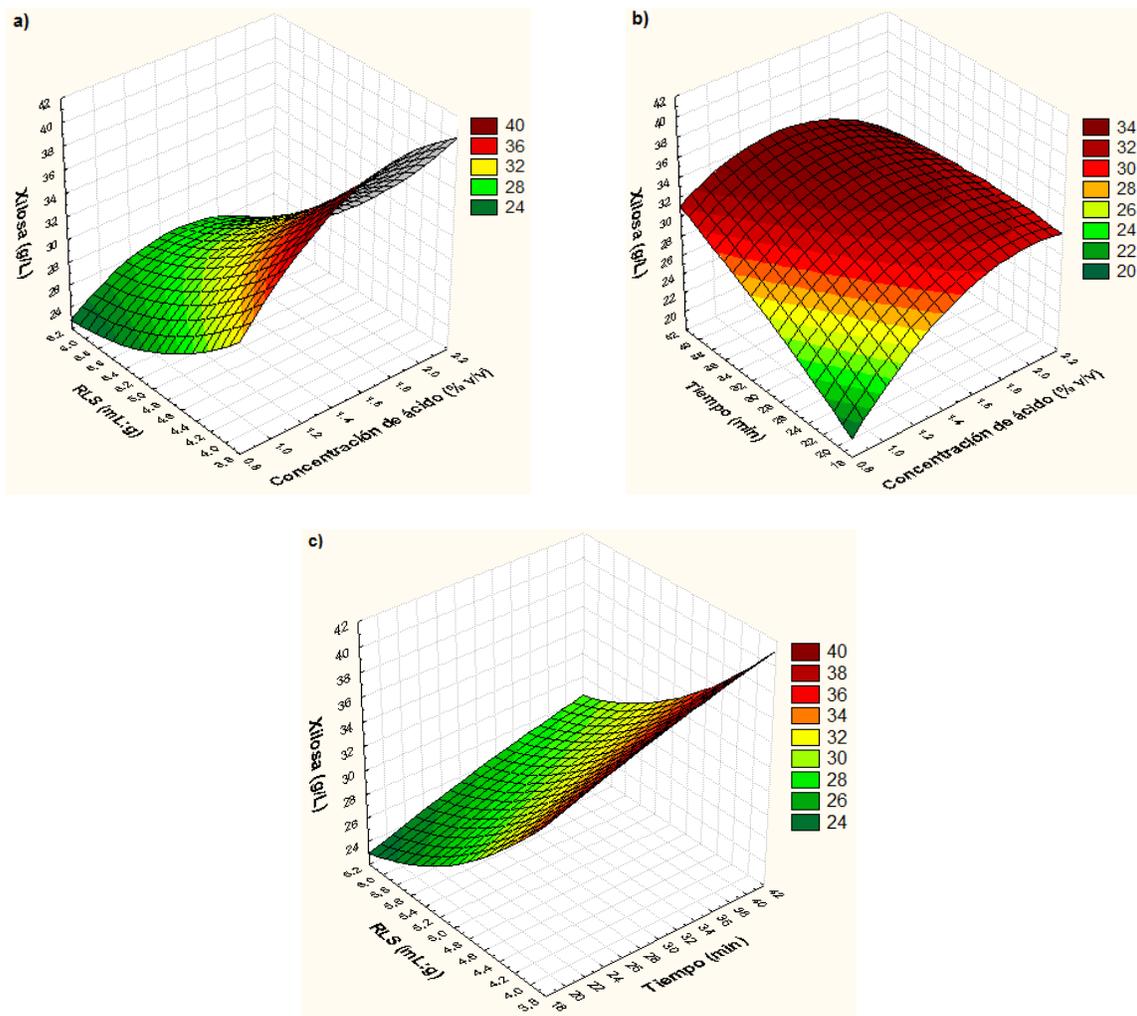


Figura 3.3 Gráfica de superficie de respuesta del contenido de Xilosa en la prehidrólisis ácida del efecto de: (a) Concentración ácido (% v/v) vs RLS (mL:g), (b) Concentración de ácido (% v/v) vs Tiempo (min) y (c) Tiempo (min) vs RLS (mL:g)

Los valores óptimos (RLS 4.1, tiempo 36 min y concentración de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1.4 %) se comprobaron experimentalmente, obteniéndose una concentración de xilosa de 38 - 40 g/L, con lo que queda validado el modelo obtenido. Domínguez, (2012) obtuvo para el olote que las condiciones óptimas de operación son: de 1.56 % v/v y t de 33 min, con una predicción máxima de concentración de xilosa en el prehidrolizado de 42.72 g/L comentando que la magnitud de la degradación depende de la concentración del ácido, la temperatura y el tiempo de la hidrólisis, observándose que a medida que actúa el ácido, el peso molecular y la viscosidad de los productos decrecen y el poder reductor aumenta. Por lo tanto los pretratamientos que utilizan ácido diluido dan como resultado una cantidad significativa de la fracción hemicelulósica de la biomasa, obteniendo altos rendimientos de azúcares solubles provenientes de la hemicelulosa, principalmente xilosa.

La identificación de las características del sistema y la ubicación del punto estacionario son importantes en el análisis de segundo orden (Anexo A.6). La respuesta dependerá de los signos y las magnitudes de los coeficientes del modelo ya sean un máximo, mínimo o punto de silla y para caracterizarla se utiliza un análisis canónico el cual es representado por la ecuación 3.2.

$$\hat{y} = \hat{y}_0 + \lambda_1 w_1^2 + \lambda_2 w_2^2 + \dots + \lambda_k w_k^2 \quad (3.2)$$

Los valores propios  $\lambda_1$  y  $\lambda_2$  son las raíces de la ecuación determinante

$$|B - \lambda I| = 0$$

$$\begin{vmatrix} -7.5783 - \lambda & -0.1725 & -1.2050 \\ -0.1725 & -0.0035 - \lambda & -0.0009 \\ -1.2050 & -0.0009 & 1.2729 - \lambda \end{vmatrix} = 0$$

El cual se reduce a:  $-\lambda^3 - 6.3089\lambda^2 + 11.1061\lambda + 0.0006$

Las raíces de esta ecuación cúbica son  $\lambda_1 = -7.74319$ ,  $\lambda_2 = -0.000054$  y  $\lambda_3 = 1.43435$ . Por lo tanto la forma canónica del modelo ajustado es:

$$\hat{y} = 24.9354 - 7.74419w_1^2 - 0.000054w_2^2 + 1.43435w_3^2$$

Los signos de las  $\lambda$ 's determinan la naturaleza de  $x_s$ , y la magnitud relativa de los eigenvalores los cuales ayudan a comprender mejor la respuesta del sistema.

- ❑ Si los valores de  $\lambda_1, \lambda_2, \dots, \lambda_k$  son todos negativos, el punto estacionario es una respuesta máxima.
- ❑ Si los valores de  $\lambda_1, \lambda_2, \dots, \lambda_k$  son todos positivos, el punto estacionario es una respuesta mínima.
- ❑ Si los valores de  $\lambda_1, \lambda_2, \dots, \lambda_k$  tienen signos mixtos, el punto estacionario es una silla.

En este estudio existe un punto de silla lo que significa que se deberá seguir explorando dentro de la región para poder encontrar un máximo.

### 3.2.3 Fibra remanente del bagazo de sorgo dulce prehidrolizado

Posterior a la hidrólisis ácida del bagazo de sorgo dulce, se procedió a cuantificar el contenido de fibra remanente para calcular el porcentaje de remoción de hemicelulosa. La composición lignocelulósica se muestra en la Figura 3.4.

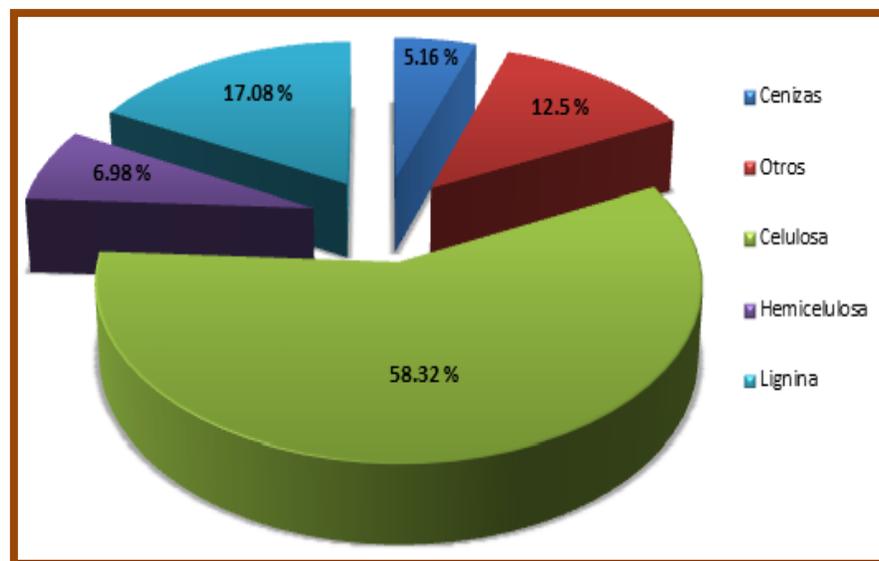


Figura 3.4 Contenido de fibra del bagazo de sorgo dulce prehidrolizado

A partir de la ecuación (3.3), se calcula el porcentaje de remoción de hemicelulosa, valor que servirá de indicativo de la efectividad de la hidrólisis ácida:

$$\% \text{Remoción}_{\text{hemicelulosa}} = \left[ \frac{\% \text{ hemicelulosa}_{\text{inicial}} - \% \text{ hemicelulosa}_{\text{final}}}{\% \text{ hemicelulosa}_{\text{inicial}}} \right] * 100 \quad (3.3)$$

La remoción completa de la hemicelulosa del residuo agroindustrial durante el pretratamiento es un requisito necesario para la eficiente hidrólisis enzimática de la fracción celulósica. Se obtuvo un promedio de un 74 % de remoción de hemicelulosa, 9.8 % por debajo a lo reportado por Chen *et al.*, (2007) para el bagazo de sorgo dulce (121 °C, RLS = 10:1, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> = 1 %, v/v y tiempo = 60 min), este efecto positivo en la remoción de la hemicelulosa en el presente trabajo se le atribuye a la mayor concentración de ácido sulfúrico empleado en comparación con el trabajo reportado por los citados investigadores.

### 3.3 Deslignificación del bagazo de sorgo dulce prehidrolizado

Finalizada la hidrólisis ácida, el bagazo de sorgo dulce se lavó con agua potable hasta alcanzar pH neutro. Posteriormente se efectuó la deslignificación con peróxido de hidrógeno destacando una evidente reacción efervescente acompañada de un incremento en la temperatura hasta alcanzar los 70 °C, al comienzo del proceso.

La biomasa lignocelulósica es atacada alcalinamente por el peróxido de hidrógeno el cual produce un hinchamiento de las paredes celulares que conforman la biomasa, aumentando por ende el área superficial interna. Por lo tanto el objetivo principal del pretratamiento alcalino es quebrar la barrera de la lignina y romper la estructura cristalina de la celulosa. La tasa de la degradación enzimática de la celulosa está relacionada inversamente al índice de lignina. Puede ser efectuado en condiciones más suaves de temperatura llevando a resultados de glucosa ligeramente mayores.

En la Tabla 3.5 se muestran los resultados obtenidos en la obtención de Glucosa para los 15 experimentos.

Tabla 3.5 Resultados obtenidos a partir del segundo diseño experimental para la obtención de Glucosa considerando la concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, tiempo y RLS

Experimento	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (% v/v)	Tiempo (h)	RLS (mL/g)	Glucosa (g/L)	Ac. Acético (g/L)
1	3.5	15	17:1	29.501	3.63
2	5.5	15	17:1	30.566	2.92
3	3.5	35	17:1	28.735	2.55
4	5.5	35	17:1	42.131	3.13
5	3.5	25	10:1	26.300	2.41
6	5.5	25	10:1	27.162	2.87
7	3.5	25	24:1	37.101	2.49
8	5.5	25	24:1	38.928	2.50
9	4.5	15	10:1	25.290	2.36
10	4.5	35	10:1	45.691	2.81
11	4.5	15	24:1	41.662	2.70
12	4.5	35	24:1	32.318	2.85
13	4.5	25	17:1	45.309	2.51
14	4.5	25	17:1	46.594	2.96
15	4.5	25	17:1	48.236	3.05

Se puede observar que las conversiones de glucosa oscilaron en un rango de 25.29 a 48.24 g/L. Los experimentos 1, 3, 5, 6 y 9, no tienen concentraciones altas de glucosa (29.501, 28.735, 26.300, 27.162 y 25.290 g/L) esto pudo deberse a la poca cantidad de peróxido, por lo que tienen un menor grado de deslignificación, impidiendo el acceso de las enzimas al sustrato, una explicación de este fenómeno fue dada por Pakanita *et al.*, (2010), ellos observaron que el efecto de la extracción de la lignina es diverso, por un lado la ruptura parcial de los enlaces tridimensionales de la lignina resultan en una menor adhesión con la fibra lo que incrementaría el acceso de las enzimas al sustrato, sin embargo la remoción de la misma puede

causar un reordenamiento de las moléculas de la celulosa, que conllevaría a un mejor empacamiento de las mismas, lo que causaría un impedimento para la hidrólisis enzimática.

### 3.3.1 Análisis de regresión en función de la concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, tiempo y RLS

Empleando el software estadístico NCSS, se realizó un análisis de regresión, con el fin de determinar el polinomio que representa el mejor comportamiento del proceso.

Para ello se considera en variables naturales la concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (CP), tiempo (T) y relación líquido-sólido (RLS), y como variable de respuesta a la Glucosa (g/L). El modelo presentado en la Ec. 3.4, presenta un ajuste del 92.64 %, lo que garantiza la reproducibilidad del proceso.

$$\begin{aligned} \text{Glucosa (g/L)} = & - 229.6074 + 74.1636 * \text{CP} + 3.2199 * \text{T} + 6.7157 * \text{RLS} - 8.9236 * \\ & \text{CP}^2 - 0.0505 * \text{T}^2 - 0.1105 * \text{RLS}^2 + 0.3082 * \text{CP} * \text{T} + 0.0344 * \text{CP} * \text{RLS} - 0.1062 * \text{T} \\ & * \text{RLS} \end{aligned} \quad (3.4)$$

El análisis de varianza sobre la producción de glucosa a partir de la hidrólisis alcalina del de bagazo de sorgo dulce, aplicando el estadístico de prueba con distribución “F” utilizando un nivel de significancia del 1 %, se muestra en la Tabla 3.6.

Este análisis indicó que las tres variables resultaron significativas con un ligero incremento de la concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> utilizada, lo cual indica que el grado de deslignificación de la materia prima es fuertemente dependiente de la concentración de peróxido utilizada.

La Figura 3.5 muestra la gráfica de residuos para el modelo obtenido. Se puede observar que todos los residuos se encuentran dentro de la normalidad y distribuidos aleatoriamente con una ligera dispersión del 7.36 % de los datos los cuales no ajustan uniformemente sobre la línea recta la cual representa el modelo propuesto.

Tabla 3.6 ANOVA del diseño experimental Box-Behnken para el bagazo de sorgo dulce designificado

Parámetro	Coefficiente de regresión	Error estándar	T-Radio	Nivel de probabilidad
Intercepción	-229.6074			
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	74.1636	18.6782	3.97	0.0106*
Tiempo	3.2199	1.3664	2.36	0.0605*
RLS	6.7157	1.9306	3.48	0.0176*
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> <sup>2</sup>	-8.9236	1.9402	-4.60	0.0058
Tiempo <sup>2</sup>	-5.0561E-02	0.0194	-2.61	0.0479
RLS <sup>2</sup>	-0.1105	3.9596E-02	-2.79	0.0383
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> *Tiempo	0.3082	0.1864	1.65	0.1590
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> *RLS	3.4464E-02	0.2663	0.13	0.9020
Tiempo*RLS	-0.1062	2.6630E-02	-3.99	0.0104

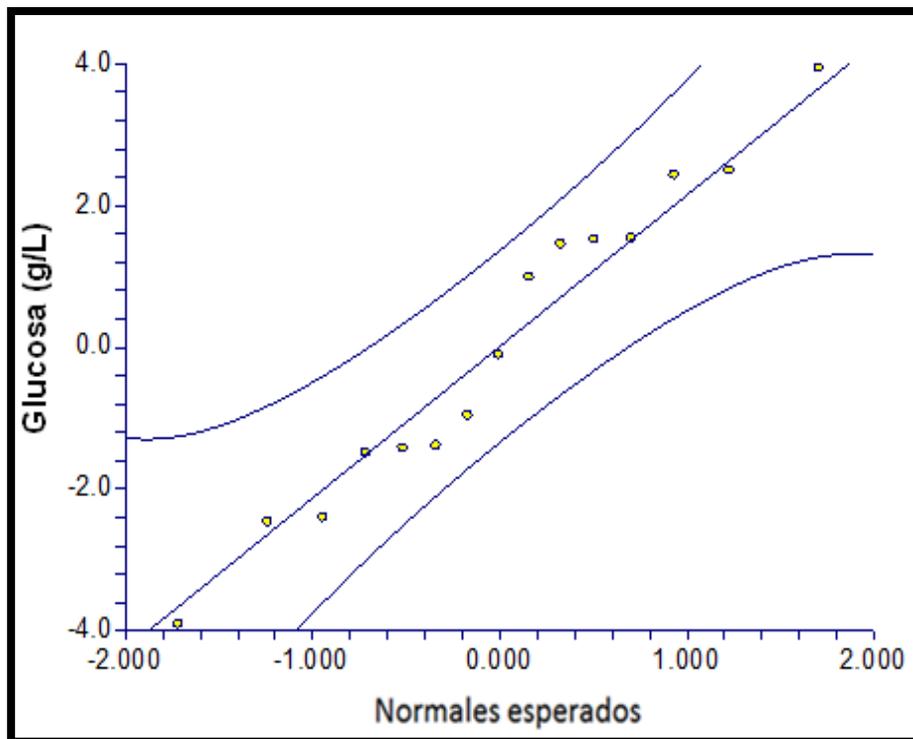


Figura 3.5 Gráfica de residuos de probabilidad del modelo 1(11)

Por lo tanto las diferencias entre los valores de la variable dependiente observados y los valores que predecimos a partir de nuestra recta de regresión aplica para el 92.64 % de los datos experimentales.

### 3.3.2 Optimización de la respuesta y establecimiento de las mejores condiciones de producción de glucosa a partir del bagazo de sorgo dulce

Un análisis de optimización a través de NCSS determinó un máximo de concentración de glucosa de 47.4693 g/L para las siguientes condiciones óptimas: CP de 4.65 %; RLS de 18.11:1 y t de 27.04 h (Anexo A.6), lo anterior puede comprobarse a través del siguiente análisis canónico:

$$\begin{vmatrix} -8.9236 - \lambda & 0.1541 & 0.0172 \\ 0.1541 & -0.0506 - \lambda & -0.0531 \\ 0.0172 & -0.0531 & -0.01105 - \lambda \end{vmatrix} = 0$$

El cual se reduce a:  $-\lambda^3 - 9.0846\lambda^2 - 1.41542\lambda - 0.022277$

Por lo tanto la forma canónica del modelo ajustado es:

$$\hat{y} = 47.4693 - 8.92631w_1^2 - 0.140592w_2^2 - 0.017759w_3^2$$

Las raíces de esta ecuación son  $\lambda_1 = -8.92631$ ,  $\lambda_2 = -0.140529$  y  $\lambda_3 = -0.017759$  por lo que el punto estacionario es un máximo ya que todas son negativas ajustándose dentro de la región experimental. En la Figura 3.6 y 3.7 se muestran las gráficas de superficie de respuesta y de contornos con las distintas combinaciones de los efectos.

Las condiciones de optimización son similares a las obtenidas por Nochebuena, (2012) para bagazo de caña: 4.75 % v/v de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, tiempo 26.9 h y RLS 17.1:1, con una predicción máxima de concentración de glucosa en el hidrolizado de 34.73 g/L, 12.681 % menor a lo obtenido en el presente trabajo. Dichas condiciones fueron validadas experimentalmente obteniéndose una concentración de glucosa de 52.58 g/L, es decir un incremento del 5.2 % con respecto al valor teórico predicho.

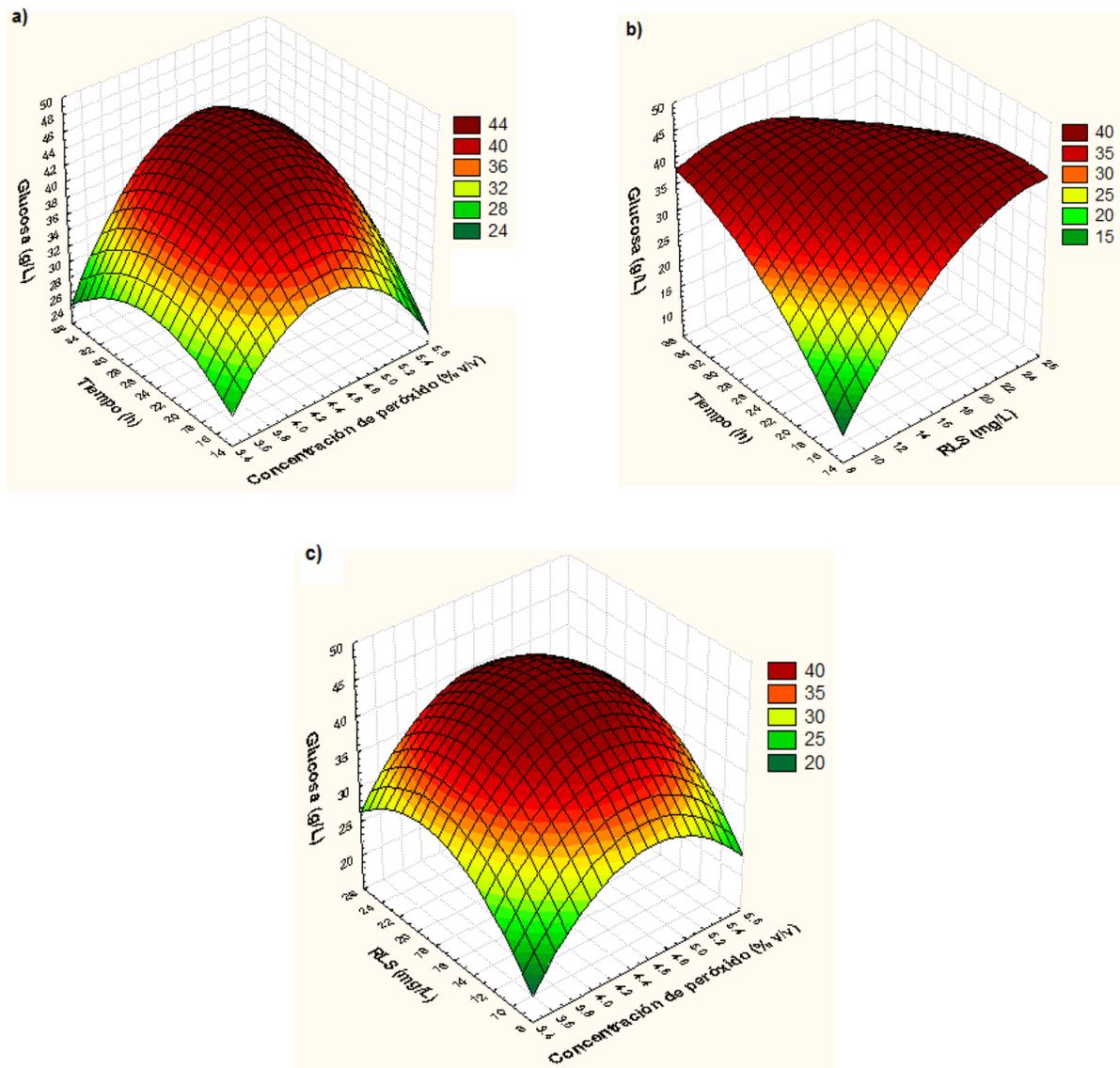


Figura 3.6 Gráfica de superficie de respuesta del contenido de Glucosa en la hidrolisis alcalina del efecto de: (a) Concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (% v/v) vs Tiempo (h), (b) RLS (mL:g) vs Tiempo (h) y (c) Concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (% v/v) vs RLS (mL:g)

Se puede observar que la región óptima se encuentra considerando a la relación líquido-sólido (RLS) en un rango de: 14.5 - 21:1 con un valor intermedio de (18:1), el tiempo de 20 - 30 (25 h) y la concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de 4 - 5 (4.5 %) las cuales se vislumbran muy cerca del punto central para la maximización de la glucosa.

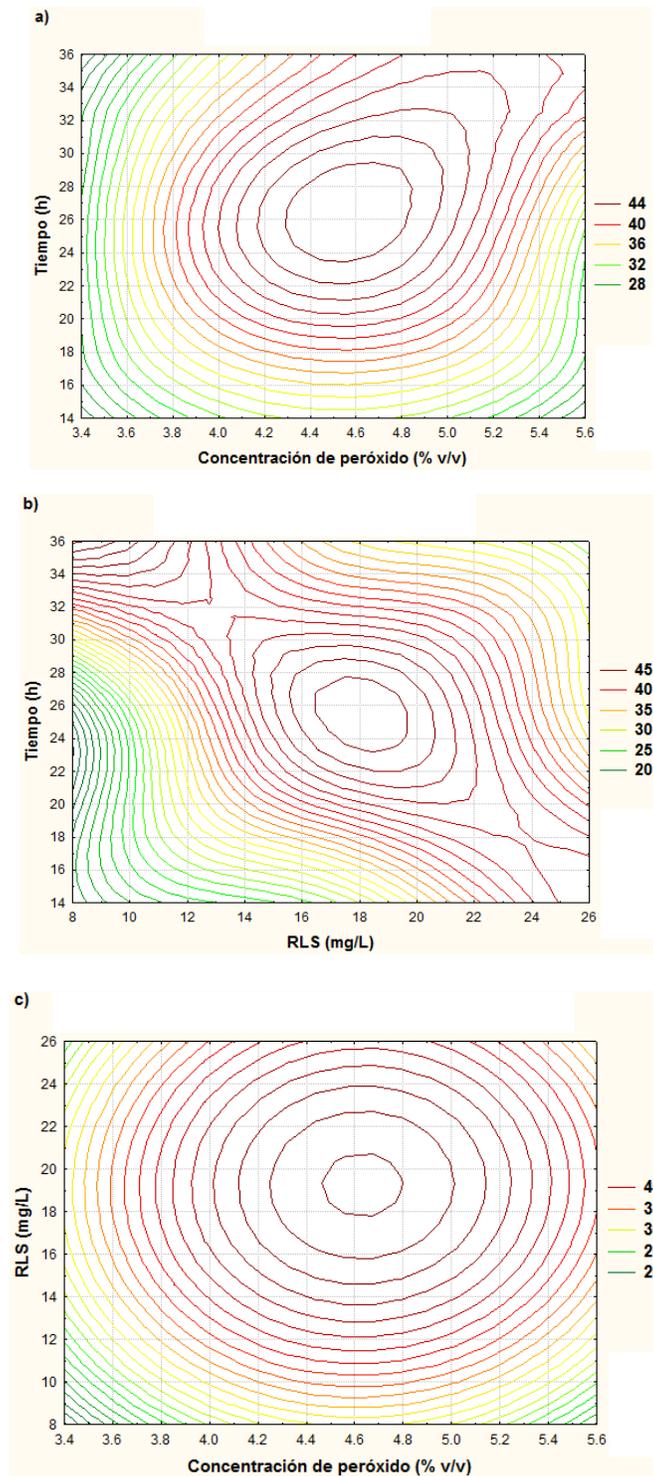


Figura 3.7 Gráfica de contornos del contenido de Glucosa en la hidrolisis alcalina del efecto de: (a) Concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (% v/v) vs Tiempo (h), (b) RLS (mL:g) vs Tiempo (h) y (c) Concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (% v/v) vs RLS (mL:g)

### 3.3.3 Fibra remanente del bagazo de sorgo dulce deslignificado

Posterior a la deslignificación del bagazo de sorgo dulce prehidrolizado, se procedió a cuantificar el contenido de fibra remanente para calcular el porcentaje de remoción de lignina. La composición lignocelulósica se muestra en la Figura 3.8 calculados a partir de la ecuación 3.3.

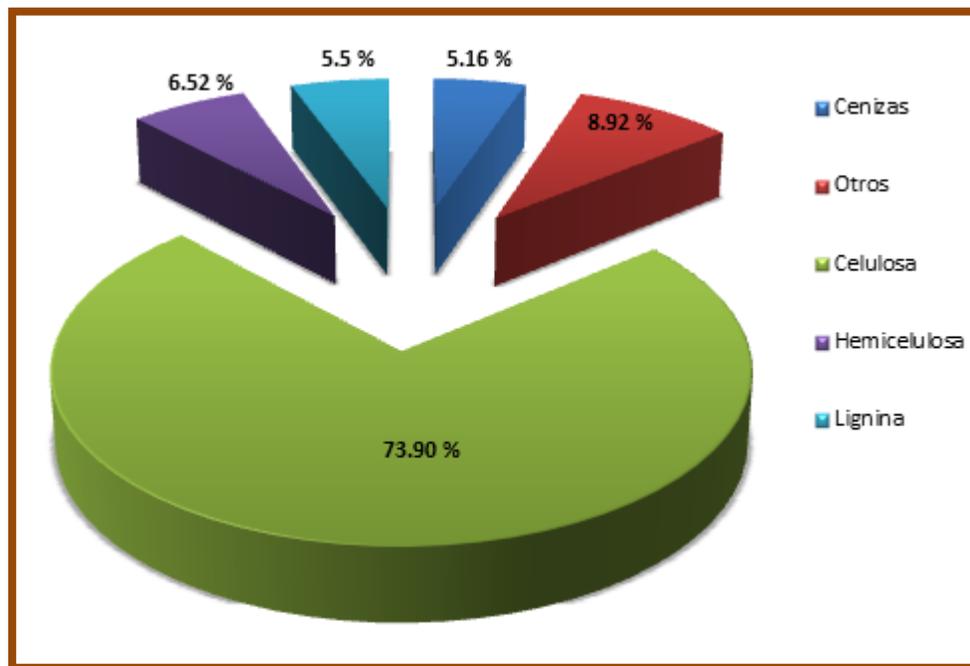


Figura 3.8 Contenido de fibra del bagazo de sorgo dulce deslignificado

El principal obstáculo en la producción de glucosa durante la hidrólisis enzimática del bagazo de sorgo dulce es la lignina asociada a este residuo, que adsorbe a la celulasa impidiendo su acción sobre los enlaces glucosídicos de la celulosa. Se obtuvo un promedio de casi un 68 % de remoción de hemicelulosa, 18 % por encima de lo predicho por (Azzam, 1989) el cual comenta que el pretratamiento con peróxido de hidrógeno (agente oxidante) aumenta la susceptibilidad a la hidrólisis enzimática al eliminar cerca del 50 % de la lignina y la mayoría de la hemicelulosa, las cuales son solubilizadas liberando la glucosa durante la sacarificación.

### 3.4 Cinética de fermentación del hidrolizado ácido de bagazo de sorgo dulce con *Pichia stipitis*

En esta etapa se realizaron dos cinéticas de fermentación, utilizando como fuente de carbono la solución de hidrolizado ácido de bagazo de sorgo dulce con la levadura *Pichia stipitis* NRRL y una autóctona (*Pichia stipitis* JS-ITV S42), para determinar cuál de ellas produce mayor concentración de bioetanol evaluando algunos factores y finalmente mejorar el proceso fermentativo.

La producción de etanol por *Pichia stipitis* muestra una concentración alta 10 g/L a las obtenidas por otros autores con un menor tiempo de fermentación (Méndez, 2010 y Moheno de la Cruz, 2013), cuya comparativa se muestra en la Tabla 3.7.

Tabla 3.7 Comparación de la producción de etanol por *Pichia stipitis* en hidrolizado ácido

Autores	Materia prima	Xilosa (g/L)	Producción Etanol (g/L)	Tiempo de fermentación (h)	$y_{p/s}$ (g/g)	Eficiencia (%)
Méndez (2010)	Cascara de piña	20	5	24	0.25	49.01
Moheno de la Cruz (2013)	Cascara de naranja y toronja	3	1	24	0.33	65.35
Presente Trabajo	Bagazo de sorgo dulce	27	10	16 - 20	0.37	72.60

El principio de adaptación del microorganismo (*Pichia stipitis*) hacia el medio de cultivo rico en xilosa, se enfoca en la asimilación de la misma y se valora por consumo de sustrato y/o producción de etanol, pudiendo observar que para nuestro estudio se obtuvo un mayor rendimiento (0.37 g/g) y por consiguiente una eficiencia alta (73 %). La diferencia entre ellos pudo haberse debido a alguna inhibición en la fermentación o durante su pretratamiento debido a los diferentes métodos de hidrólisis que se aplican.

En la Figura 3.9 se muestra el comportamiento de ambas levaduras ante el sustrato, se observa que en el hidrolizado ácido *Pichia stipitis* NRRL (a) solo asimiló los azúcares aunque no produjo etanol mostrando tolerancia a los inhibidores del medio., por el contrario, se observa que la levadura autóctona *Pichia stipitis* JS-ITV S42 (b), consumió 13 g/L, produciendo 10 g/L de etanol entre las 16 y 20 h de fermentación.

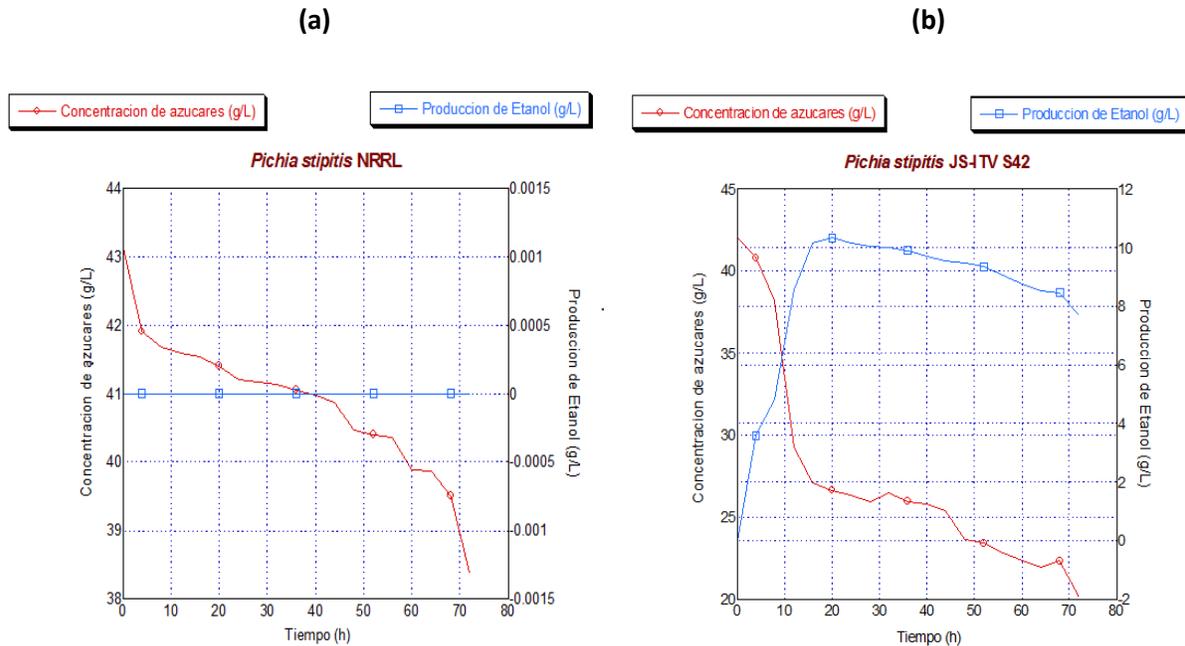


Figura 3.9 Consumo de azúcares y producción de Etanol en función del tiempo de fermentación con sustrato de hidrolizado ácido por: (a) *Pichia stipitis* NRRL, (b) *Pichia stipitis* JS-ITV S42

La levadura *Pichia stipitis* tiene una baja asimilación por xilosa en condiciones anaeróbicas en la cual se acentúa la importancia del suministro de oxígeno en el proceso fermentativo, así también se requiere de una combinación con glucosa en una concentración menor al 2 % para que el consumo de xilosa inicie en una fermentación de sustratos mixtos para favorecer la formación de bioetanol (Gutiérrez-Rivera, 2011).

### 3.4.1 Evaluación de la composición del medio de cultivo con hidrolizado ácido y la adición de nutrientes para la fermentación alcohólica

De acuerdo a los resultados obtenidos en la sección anterior se determinó trabajar con levadura *Pichia stipitis* JS-ITV S42 por presentar mejor adaptación al hidrolizado ácido produciendo alcohol con un buen tiempo de fermentación (16 - 20 h). Por lo anterior se decidió mejorar la composición del medio de cultivo adicionando nutrientes esenciales.

En la Tabla 3.8 se muestran los resultados sobre el rendimiento y la producción de etanol de acuerdo al diseño de experimentos planteado.

Tabla 3.8 Resultados del Diseño Box-Behnken para llevar a cabo la fermentación alcohólica con hidrolizado ácido de bagazo de sorgo dulce adicionando nutrientes esenciales

Experimento	Urea (g/L)	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O (g/L)	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (g/L)	Rendimiento $y_{p/s}$ (g/g)	Productividad $Q_p$ (g/Lh)
1	1	0.4	4.5	0.4586	0.4584
2	4	0.4	4.5	0.4291	0.4166
3	1	2	4.5	0.4846	0.4696
4	4	2	4.5	0.4754	0.4171
5	1	1.2	3	0.4938	0.4569
6	4	1.2	3	0.4389	0.4012
7	1	1.2	6	0.4583	0.4843
8	4	1.2	6	0.4640	0.5817
9	1.5	0.4	3	0.4664	0.6100
10	1.5	2	3	0.4788	0.5973
11	1.5	0.4	6	0.4899	0.4350
12	1.5	2	6	0.4412	0.4293
13	1.5	1.2	4.5	0.4568	0.4747
14	1.5	1.2	4.5	0.4085	0.4577
15	1.5	1.2	4.5	0.4209	0.4650

Se puede observar que el rendimiento (gramos de etanol obtenido por gramo de xilosa consumida) para los 15 experimentos se encuentran dentro de los rangos reportados en la literatura (0.47 - 0.5 g/g, citado por Moheno de la Cruz, 2013). Para el caso de la productividad (gramos de etanol obtenidos por litro de medio de fermentación en una hora), la máxima producción de etanol reportada con *Pichia stipitis* para materiales lignocelulósicos es alrededor de 0.9 g/Lh (La Grage *et al.*, 2010).

La productividad para el hidrolizado ácido de bagazo de sorgo dulce se encuentra en un rango de 0.40 a 0.61 g/Lh (Anexo A.5). Chandel y Singh, (2011) reportan una productividad con *Pichia stipitis* en medio de hidrolizado ácido para la paja de trigo un rango de  $0.41 \pm 0.01$  y para el rastrojo de maíz 0.37 - 0.44. Por lo tanto para este estudio la productividad se encuentra dentro de los rangos reportados por dichos autores.

La productividad de esta levadura es relativamente baja debido a que esta también tiene la capacidad de consumir ácido acético y reducir el anillo de furano en furfural e hidroximetilfurfural (HMF) (Agbogbo y Coward, 2008).

### 3.4.2 Análisis de regresión en función de la concentración de los nutrientes esenciales (g/L)

Empleando el software estadístico NCSS, se realizó un análisis de regresión, con el fin de determinar el polinomio que representa el mejor comportamiento del proceso.

Para ello se consideraron en variables naturales la concentración de Urea g/L (U),  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  g/L (M) y  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  g/L (F), y como variable de respuesta el Rendimiento  $y_{p/s}$  (g/g). El modelo presentado en la Ec. 3.5, presenta un ajuste del 84.75 %, lo que garantiza la reproducibilidad del proceso.

$$\text{Rendimiento (g/g)} = 0.9773 - 0.0639 * U - 0.2266 * M - 0.1958 * F + 0.0170 * U^2 + 0.0118 * M^2 + 0.0219 * F^2 - 0.0227 * U * M - 0.0161 * U * F + 0.1061 * M * F \quad (3.5)$$

La Figura 3.10 muestra la gráfica de residuos para el modelo obtenido.

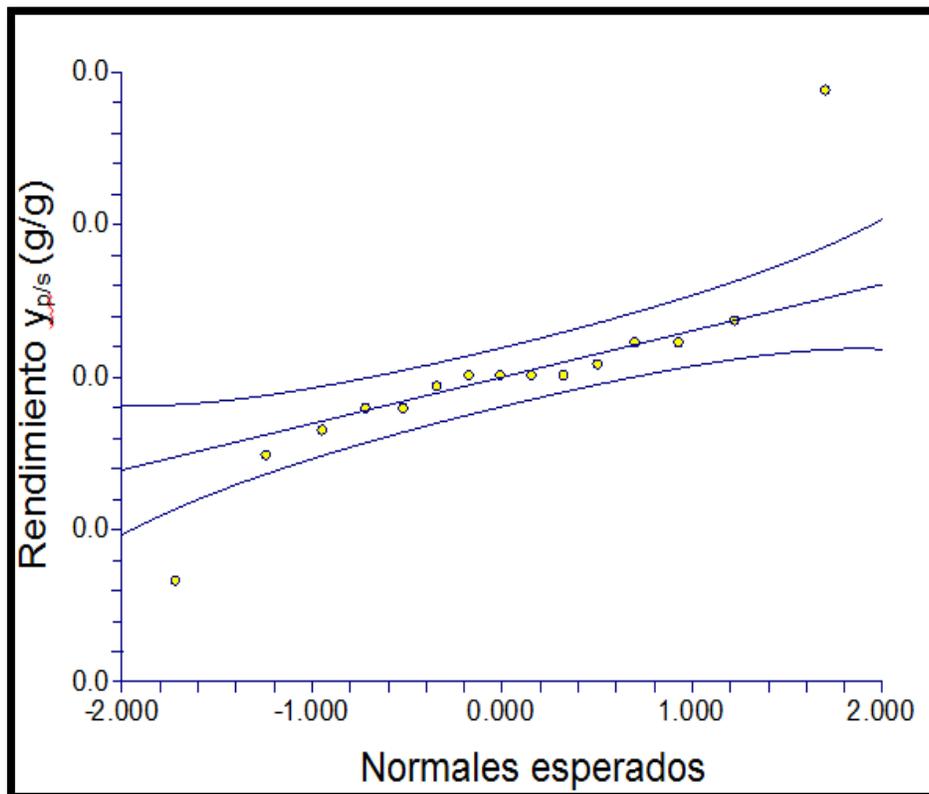


Figura 3.10 Gráfica de residuos de probabilidad del modelo 2(11)

Se puede observar que aunque la mayoría de los residuos se encuentran dentro de la normalidad y distribuidos uniformemente, existen dos datos inusitados, que se encuentran fuera de la normalidad, debido probablemente a errores de tipo experimental o de tipo humano (al realizar las diversas lecturas), así también ligeras variaciones en el tiempo podrían conllevar a la obtención de estos valores fuera de la tendencia representada por la línea recta del modelo.

En la Figura 3.11 y 3.12 se muestran las gráficas de contornos y de superficie de respuesta con las distintas combinaciones de los efectos.

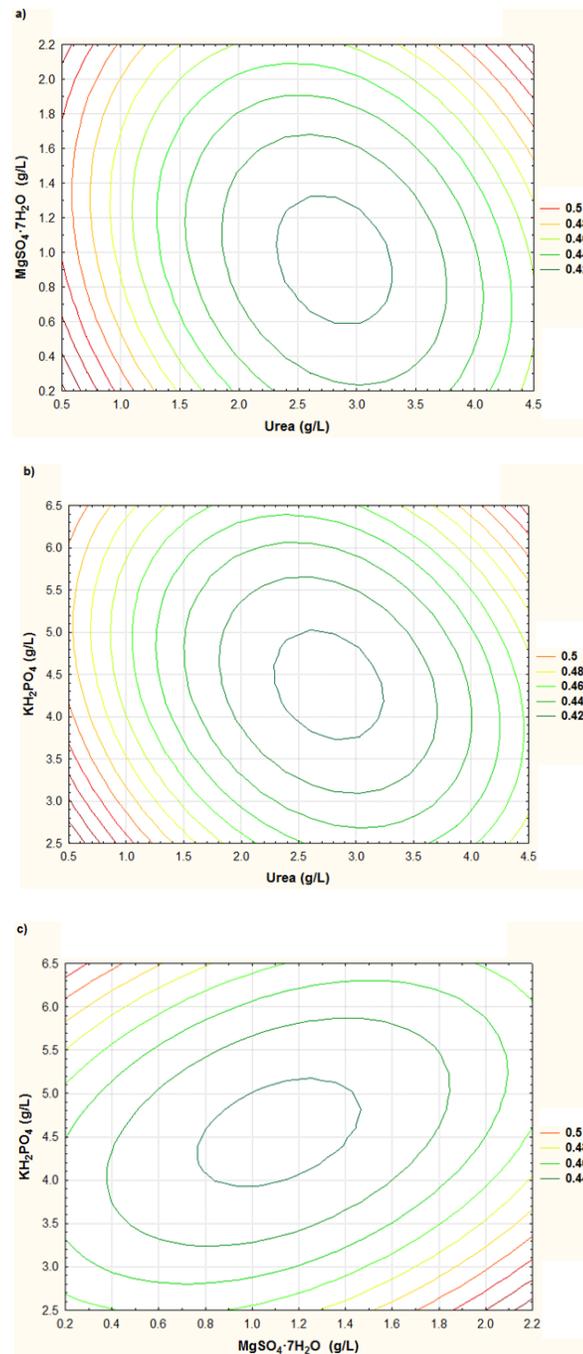


Figura 3.11 Gráfica de contornos del rendimiento de etanol (g/g) del efecto de:  
(a) Concentración de Urea (g/L) vs  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (g/L) (b) Urea (g/L) vs  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (g/L) y  
(c) Concentración  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (g/L) vs  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (g/L)

Tales contornos se encuentran delimitados entre: 2.3 - 3.3 g/L de Urea; 0.6 - 1.3 de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  y  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  de 3.9 a 5.2 g/L. Teniéndose como valores predichos por NCSS a la concentración de Urea = 2.9395 g/L, el  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  con 0.9047 g/L y  $\text{KH}_2\text{PO}_4 = 4.2957$  g/L con un rendimiento de 0.3913 g/g.

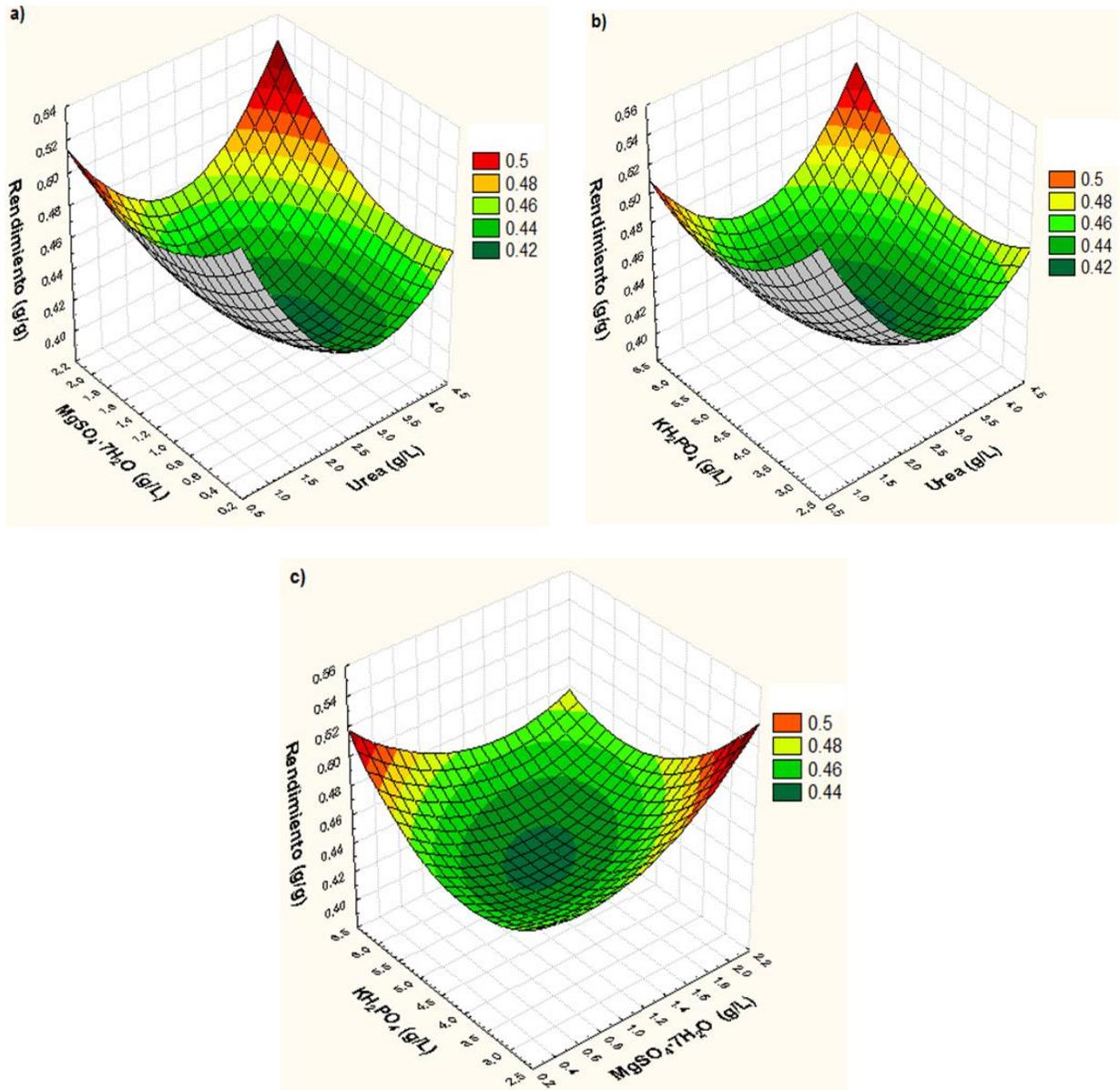


Figura 3.12 Gráfica de superficie de respuesta del rendimiento de etanol (g/g) del efecto de:  
 (a) Concentración de Urea (g/L) vs  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (g/L) (b) Urea (g/L) vs  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (g/L) y  
 (c) Concentración  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (g/L) vs  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (g/L)

Sin embargo lo que se busca es mejorar el proceso fermentativo por lo tanto para el caso de la concentración de Urea esta deberá alejarse ligeramente del punto alto (4 g/L) = 4.0567 g/L, mientras que el  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  debe mantenerse en valores inferiores al punto bajo (3 g/L) = 1.3426 g/L (Figura 3.13 y 3.14), para el caso del  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  la región del punto central (2.7030 g/L) es un valor adecuado a emplear para aumentar el rendimiento de etanol.

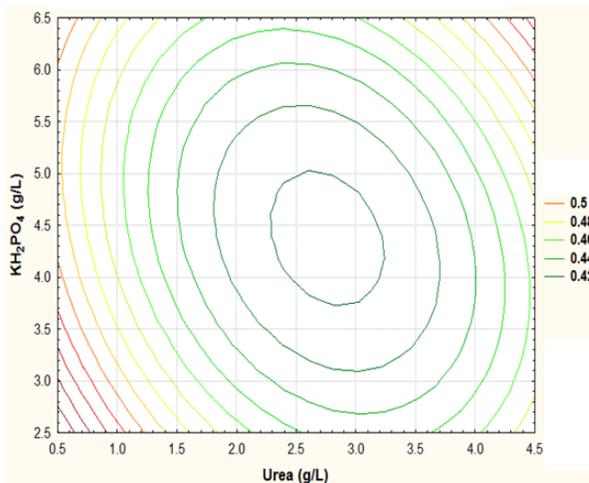


Figura 3.13 Gráfica de contornos del mejor rendimiento de etanol (g/g) en el efecto de Concentración: Urea (g/L) vs  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (g/L)

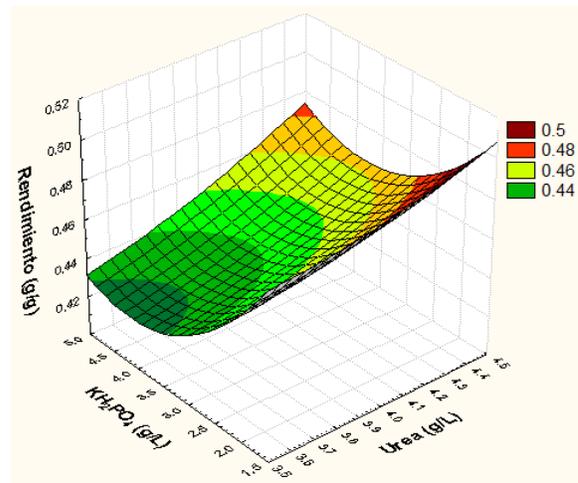


Figura 3.14 Gráfica de superficie de respuesta del mejor rendimiento de etanol (g/g) en el efecto: Concentración de Urea (g/L) vs  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (g/L)

El rendimiento de etanol de acuerdo a la localización del punto estacionario es de 0.4314 g/g (Anexo A.6) encontrando así la mejor respuesta con el siguiente análisis canónico en donde:

$$\begin{vmatrix} 0.0170 - \lambda & -0.0114 & -0.0081 \\ -0.0114 & 0.0119 - \lambda & 0.0531 \\ -0.0081 & 0.0531 & 0.0220 - \lambda \end{vmatrix} = 0$$

El cual se reduce a:  $-\lambda^3 + 0.0509\lambda^2 + 0.002177\lambda - 0.000037$ . Por lo tanto la forma canónica del modelo ajustado es:

$$\hat{y} = 0.4314 - 0.036504w_1^2 + 0.013764w_2^2 + 0.07364w_3^2$$

Las raíces de esta ecuación son  $\lambda_1 = -0.036504$ ,  $\lambda_2 = 0.013764$  y  $\lambda_3 = 0.07364$  por lo que el punto estacionario es un punto de silla lo que significa que se deberá seguir explorando dentro de la región para poder encontrar un máximo rendimiento de etanol.

Los valores predichos se comprobaron experimentalmente (Tabla 3.9), estos no se pueden comparar con los reportados en literatura debido a que las condiciones de fermentación son diferentes.

Tabla 3.9 Resultados del proceso fermentativo para su mejoramiento con y sin la adición de nutrientes esenciales

Tiempo (h)	Sustrato de Hidrolizado ácido con:	Xilosa (g/L)	Etanol (g/L)	Xilitol (g/L)	Ac. acético (g/L)
16	Sin Nutrientes	14.8500	9.9925	-	4.5150
	Valores NCSS	12.0338	6.4338	2.7988	3.6913
	Mejoramiento del proceso fermentativo	6.5050	9.2350	2.5450	3.2688
20	Sin Nutrientes	14.7750	10.1625	-	4.3375
	Valores NCSS	5.5013	4.8550	2.7988	3.6362
	Mejoramiento del proceso fermentativo	5.2300	7.3050	2.4163	3.2400
24	Sin Nutrientes	5.7113	8.7388	-	3.9088
	Valores NCSS	4.8250	4.5050	2.8150	3.5875
	Mejoramiento del proceso fermentativo	5.0050	5.8625	2.5725	3.1888
$y_{p/s}$ (g/g) Sin nutrientes = 0.3497		$y_{p/s}$ (g/g) Valores NCSS = 0.2602		$y_{p/s}$ (g/g) Mejorando el proceso fermentativo = 0.4417	

Como se puede observar al mejorar el proceso fermentativo entre las 16 y 20 h se obtiene un incremento de 2.6 g/L de Etanol, sin embargo se puede observar que existe una producción de Xilitol por lo que se están obteniendo ambos productos, lo que implica que el Etanol que es de importancia en este trabajo disminuya. También la aparición de compuestos inhibidores, particularmente poco volátiles, como el ácido acético lo que ocasiona efectos nocivos sobre la levadura durante la Fermentación.

## **CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES**

## CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

- El sorgo dulce conlleva a una excelente alternativa para la producción de biocombustibles, representando proyectos autónomos con destilería, cogeneración, producción de proteínas de la levadura y el complemento de los carbohidratos de la panoja (concentrados). INIFAP desarrolló una variedad de sorgo dulce capaz de incrementar una mayor cantidad de productividad del cultivo, contando con mayores niveles de azúcar y generando más biomasa (materia prima para la elaboración de biocombustibles).
- El bagazo de sorgo dulce proveniente de la región de Cotaxtla, Ver., contiene un 26.76 % de hemicelulosa, 36.29 % de celulosa y 5.23 % de lignina. El contenido de lignina impacta, eminentemente la eficiencia de la hidrólisis enzimática, dado que a mayor contenido de lignina, las condiciones de oxidación deberán ser más drásticas; por lo tanto para este estudio no fue necesario utilizar altas concentraciones de base en el pretratamiento. La diferencia en la composición de material lignocelulósico pudo deberse a factores en las cuales fue sembrado y cosechado, tales como: humedad, calidad del suelo, clima entre otros.
- El tratamiento aplicado con ácido diluido conllevó a la hidrólisis de una cantidad significativa de la fracción hemicelulósica de la biomasa, obteniendo altos rendimientos de azúcares solubles (68 %), provenientes de la hemicelulosa, principalmente xilosa. La variable de respuesta xilosa, alcanzó un máximo de conversión de 39.58 g/L con una concentración de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 1.5 %, tiempo de 40 min y relación líquido-sólido de 4:1.
- De acuerdo a las gráficas de contornos se establecieron los rangos donde se localizaron las regiones adecuadas para trabajar y posteriormente fueron

sustituidas las variables en el modelo obtenido mediante regresión cuadrática las cuales fueron RLS de 4:1, tiempo de 36 min y concentración de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  al 1.4 %, obteniendo 38.9188 g/L de conversión de xilosa, 1.0812 % inferior al obtenido experimentalmente. La optimización a partir de la localización del punto estacionario con el análisis canónico fue un punto de silla, por lo que se deberá seguir explorando dentro de las regiones establecidas para poder encontrar un máximo de conversión de xilosa.

- La hidrólisis ácida convierte en azúcares principalmente xilosa el 60 % del contenido teórico de material sacarificable (hemicelulosa). A través del proceso de remoción de hemicelulosa del bagazo de sorgo dulce mediante el tratamiento químico con  $\text{H}_2\text{SO}_4$  se obtuvo un promedio de un 74 % el cual tuvo una efectividad en la hidrólisis ácida al obtener una eficiencia del 44.35 % de producción de xilosa. El proceso de remoción de lignina mediante el tratamiento alcalino con  $\text{H}_2\text{O}_2$  se obtuvo un promedio de un 68 % el cual tuvo una efectividad en la hidrólisis al obtener una eficiencia del 50.32 % de producción de glucosa posteriormente. Este pretratamiento se encarga de quebrar la barrera de la lignina y romper la estructura cristalina de la celulosa, la cual puede ser efectuada en condiciones más suaves de temperatura (temperatura ambiente 20 - 25 °C) llevando a resultados de glucosa ligeramente mayores.
- El análisis de varianza de la hidrólisis alcalina mostró que las tres variables resultaron significativas con un ligero incremento en la concentración de  $\text{H}_2\text{O}_2$  utilizada, lo cual indica que el grado de deslignificación de la materia prima es fuertemente dependiente de la concentración de peróxido utilizada. De acuerdo a las gráficas de contornos se establecieron los rangos donde se localizaron las regiones con valores óptimos y posteriormente fueron sustituidas las variables de RLS de 18.11:1, tiempo de 27.04 h y concentración de  $\text{H}_2\text{O}_2$  al 4.65 %, en el modelo obtenido mediante regresión

cuadrático obteniéndose un máximo de conversión de 47.4693 g/L de glucosa estos valores se pudieron comprobar mediante el análisis canónico en el cual las raíces resultaron ser todas negativas ajustándose así dentro de la región experimental de trabajo.

- Conforme a los resultados de las cinéticas de fermentación se determinó trabajar con la levadura *Pichia stipitis* JS-ITV S42 por presentar mejor adaptación al hidrolizado ácido produciendo alcohol con un buen tiempo de fermentación (16 – 20 h). El rendimiento (gramos de etanol obtenido por gramo de xilosa consumida) para los 15 experimentos se encuentran dentro de los rangos reportados en la literatura (0.47 - 0.5 g/g).
- Para el caso de la productividad (gramos de etanol obtenidos por litro de medio de fermentación en una hora), la máxima producción de etanol reportada con *Pichia stipitis* para materiales lignocelulósicos es alrededor de 0.9 g/Lh (La Grage *et al.*, 2010). La productividad para el hidrolizado ácido de bagazo de sorgo dulce se encuentra en un rango de 0.40 a 0.61 (g/Lh). Por lo tanto para este estudio la productividad se encuentra dentro de los rangos reportados por dichos autores.
- De acuerdo a las gráficas de contornos y de superficie de respuesta se establecieron los rangos donde se localizaron las regiones con valores de 2.9395 g/L de Urea,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  con 0.9047 g/L y  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  con 4.2957 g/L. obteniéndose un rendimiento de 0.3913 g/g.
- Al mejorar el proceso fermentativo se encontraron regiones donde se obtuvo un rendimiento de etanol más alto 0.4314 g/g esto con las siguientes concentraciones: Urea de 4.0532 g/L;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  de 1.3409 g/L y  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  de 2.7023 g/L. Experimentalmente se comprobaron estos datos obteniéndose un rendimiento de 0.4417 g/g con una desviación estándar del 0.0109 %. La optimización del proceso fermentativo mejorado resulto ser un punto de

silla por que los signos de las raíces fueron diferentes. Para poder encontrar una mejor respuesta se deberá seguir explorando dentro de las regiones propuestas y así poder llegar hacia el máximo rendimiento de etanol.

#### RECOMENDACIONES:

- Evaluar el uso de otros ácidos, como el fosfórico y el clorhídrico, para la etapa de hidrolisis ácida, ver si con estos aumenta la remoción de hemicelulosa y por ende la producción de xilosa.
- Comprobar si el proceso de lavado influye en las etapas posteriores a la hidrolisis con el fin de disminuir el consumo de agua, y reutilizarla sin perder grandes cantidades de fibra.
- Incrementar la concentración de  $H_2O_2$  utilizada en la hidrólisis alcalina ya que este es fuertemente dependiente del grado de deslignificación impidiendo el acceso de las enzimas al sustrato en la posterior hidrolisis enzimática.
- Realizar un estudio sobre los compuestos inhibitorios que se dan en las diferentes etapas de hidrólisis, los que influyen potencialmente en los rendimientos de la fermentación.
- Suministrar oxígeno en el proceso fermentativo para la levadura *Pichia stipitis* ya que esta tiene una baja asimilación por xilosa en condiciones anaeróbicas., así también, requerir de una combinación con glucosa en una concentración menor al 2 % para que el consumo de xilosa inicie en una fermentación de sustratos mixtos para favorecer la formación de bioetanol (Gutiérrez-Rivera, 2011).

## **REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agbogbo, F. and Coward, G. 2008. Cellulosic ethanol production using the naturally occurring xylose-fermenting yeast, *Pichia stipitis*. *Biotechnol Let.* 30:1515–1524.
- Alkasrawi, M., Eriksson, T., Börjesson, J., Wingren, A., Galbe, M., Tjerneld, F., Zacchi, G. 2003. “The effect of Tween 20 on simultaneous saccharification and fermentation of softwood to ethanol. *Enzyme and Microbial Technology* 33:71-78.
- Almodares, A. and Hadi, M.R. 2009. Production of bioethanol from sweet sorghum: A review. *African Journal of Agricultural Research.* 4(9):772-780.
- Alvira, P., Tomás-Pejó, E., Ballesteros, M. and Negro, M.J. 2009. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review. *Bioresource Technology*, 101:4851-4861.
- Amador, J.L. 2009. Evaluación del efecto de tamaño de partícula, tiempo de pretratamiento y concentración de hidróxido de sodio en la hidrólisis enzimática del bagazo de caña de azúcar. Proyecto de graduación para optar por el grado de Licenciatura en Ingeniería Química. Escuela de Ingeniería Química. Universidad de Costa Rica, San José. Costa Rica.
- Azzam A.M. 1989. Pretreatment of cane bagasse with alkaline hydrogen peroxide for enzymatic hydrolysis of cellulose and ethanol fermentation. *J. Environ. Sci. Health.* 24(4):421–433.
- Baker, A. and Zahniser, S. 2006. Ethanol reshapes the corn market. 4(2). *Amber Waves. Economic Research Service/USDA.*
- Balat, M. 2010. Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway. A review. *Energy Conversion and Management.* 52(2):858-875.
- Balint, S., Sipos, B., Réczey, J., Kádár, Z., Dienes, D. y Réczey K. 2009. Sweet Sorghum as Feedstock for Ethanol Production: Enzymatic Hydrolysis of Steam-Pretreated Bagasse, *Applied Biochemistry and Biotechnology.* 153:151-162.
- Breijo, F. y Yúfera, E. 1989. Alcohol de biomasa. III. Hidrólisis de la fracción lignocelulósica obtenida de residuos agrícolas y cosechas de sorgo. Departamento de microbiología CEU San Pablo. Moncada (Valencia). Universidad Politécnica de Valencia.

- Canettieri, E.V., Rocha, G.J.M., Carvalho, J.A. Jr., and Silva J.B.A. 2007. Evaluation of the kinetics of xylose formation from dilute sulfuric and hydrolysis of forest residues of *Eucalyptus grandis*. *Industrial & Engineering Chemistry Research*. **46**(7):1938-1944.
- Castanon, M. and Wilke, C.R. 2001. Effects of the surfactant tween 80 on enzymatic hydrolysis of newspaper. *Biotechnology Bioengineering* 23:1365-1372.
- Chandel, A. and Singh, O. 2011. Weedy lignocellulosic feedstock and microbial metabolic engineering: advancing the generation of “biofuel”. *Applied Microbiology Biotechnology*. **89**(5):1289-1303. ISSN 0175-7598.
- Chandler C., Villalobos, N., González, E., Arenas, E., Mármol, Z., Ríos, J., Aiello, C. 2012. Hidrólisis ácida diluida en dos etapas de bagazo de caña de azúcar para la producción de azúcares fermentables. *Multiciencias* **12**(3):245-253.
- Chen, Y., Sharma-Shivappa, R., Keshwani and D. Chen, C. 2007. Potential of agricultural residues and hay for bioethanol production. *Applied Biochemistry and Biotechnology Part A: Enzyme engineering and biotechnology* 142:276-290.
- Chen, Y., Dong Boyu, Qin Weijun, Xiao Dongguang. 2010. Xylose and cellulose fractionation from corncob with three different strategies and separate fermentation of them to bioethanol. *Bioresource Technology* 101:6994-6999.
- Cheng Ke-Ke, Zhang Jiang-An, Ling Hong-Zhi, Ping Wen-Xiang, Huang Wei, Ge Jing-Ping, Xu Jing-Ming. 2009. Optimization of pH and acetic acid concentration for bioconversion of hemicellulose from corncobs to xylitol by *Candida tropicalis*. *Biochemical Engineering Journal* 43:203-207.
- Chuck-Hernández E, Pérez-Carrillo E, Heredia-Olea S, Serna-Saldívar. 2011. Sorgo como un cultivo multifacético para la producción de bioetanol en México: Tecnologías, avances y áreas de oportunidad. Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa México. ISSN 1665-2738. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*. **10**(3):529-549.
- Dien, B., Jung, H., Vogel, K., Casler, M., Lamb, J., Iten, L., Mitchell, R., Sarath, G. 2006. Chemical composition and response to dilute-acid pretreatment and enzymatic saccharification of alfalfa, reed canarygrass, and switchgrass. *Biomass and Bioenergy*. **30**(10):880–891.
- Domínguez, G.C. 2012. Optimización del pretratamiento (ácido/alcalino) y determinación de la influencia del Tween 80 en la hidrólisis enzimática del

- olote. Tesis de Maestría en Ingeniería Química. Instituto Tecnológico de Orizaba. México.
- Eriksson, T. and Börjesson, J. 2002. Mechanism of surfactant effect in enzymatic hydrolysis of lignocelluloses. *Enzyme and Microbial Technology* 31:353-364.
  - Esturo M.R. 2012. Diferentes tipos de azúcar utilizados para la fabricación de cerveza casera. Resumen Capítulo 17 Libro de Alimentos y Nutrición. Ed. El Ateneo.
  - Fein, J.E., Tallim, S.R. y Lawford, G.R. 1984. Evaluation of D-xylose fermenting yeasts for utilization of a wood derived hemicellulose hydrolysate. *Canadian Journal of Microbiology*. **30**(5):682-690.
  - Foyle, T., Jennings, L. and Mulcahy, P. 2007. Compositional analysis of lignocellulosic materials: Evaluation of methods used for sugar analysis of waste paper and straw. *Bioresource Technology*, 98:3026-3036.
  - Garzón, S.C y Londoño C. 2009. Estudio comparativo para la producción de etanol entre *Saccharomyces cerevisiae* silvestre, *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9763 Y *Candida utilis* ATCC 9950. Tesis de Licenciatura para optar el título de Químico Industrial. Universidad Tecnológica de Pereira. Escuela de Tecnología Química: Química Industrial. Pereira. Colombia.
  - Geoffrey, M., Zhiguang, Z., y Percival, Z. 2008. "Efficient Sugar Release by the Cellulose Solvent-Based Lignocellulose Fractionation Technology and Enzymatic Cellulose Hydrolysis", *J. Agric. Food Chem.*, **56**(17):7885.
  - Gírio, F., Fonseca, C., Carvalheiro, F., Duarte, L., Marques, S. and Bogel-Lukasik, R. 2010. Hemicelluloses for fuel ethanol: A review. *Bioresource Technology*, 101:4775–4800.
  - González, J.C., Álvarez, N.M., Ornelas, H.L., Zamudio, M.A. 2011. Producción y aplicaciones biotecnológicas del xilitol, *Biotechnología*, **15**(2):22-47.
  - Gutiérrez-Rivera. 2011. Producción de etanol a partir de bagazo de caña, utilizando un cultivo mixto de levaduras. Tesis de Doctorado en ciencias en alimentos. Instituto Tecnológico de Veracruz. México.
  - Harris, R.J. 2012. Selección de pretratamientos en base a caracterización físico-química de residuos de *eucalyptus globulus* y *populus canadensis* para la producción de bioetanol. Tesis para optar al grado de magíster en ciencias de la ingeniería, mención química y al título de ingeniero civil en biotecnología. Departamento de Ingeniería Química y Biotecnología. Chile.

- Harrison, K. 2007. Chemistry, Structures & 3D Molecules.
- Hendricks, A. and Zeeman, G. 2009. Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*, 100:10-18.
- Herazo., Irina, C., Ruiz, D. y Arrazola, G. S. (2010). Bioconversión de Xilosa a Xilitol por *Candida guilliermondii* empleando cascarilla de arroz (*Oriza sativa*). Bioconversion of Xylitol to Xylose by *Candida guilliermondii* using rice (*Oriza sativa*).
- Inei, G., Velasco, H., Díaz, M., Tobón, C. 2001. Influencia de la concentración de sustrato inicial de la fase lag en la fermentación alcohólica en cultivo por lote. IX Congreso Nacional de Ingeniería Bioquímica II Congreso Internacional de Ingeniería Bioquímica. Veracruz Ver.
- Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP). 2013. Centro de Investigación Regional Golfo Centro. Campo Experimental Cotaxtla. Sitio Experimental Veracruz, México.
- Jeevan, P., Nelson, R., Rena, A.E. 2011. Optimization studies on acid hydrolysis of corn cob hemicellulosic hydrolysate for microbial production of xylitol. *Journal of Microbiology and Biotechnology Research*. 4:114-123.
- Jeffries, T.W., Grigoriev, I.V., Grimwood, J., Laplaza, M.J., Aerts, A., Salamov, A., Schmutz, J., Lindquist, E., Dehal, P., Shapiro, H., Yong-Su J., Passoth, V and Richardson, P. 2007. Genome sequence of the lignocellulose-bioconverting and xylose-fermenting yeast *Pichia stipitis*. *Nature Biotechnology*. 25:319-326.
- Jimenéz-Ahuja, J. 2011. Degradación de azúcares por hidrólisis ácida. Tesis para obtener el título de Ingeniero Químico en Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Facultad de Ingeniería Química. Morelia Michoacán.
- Jolly, N.P., Augustyn, O.P.H and Pretorius I.S. 2006. The Role and Use of Non-*Saccharomyces* Yeasts in Wine Production. *S. Afr. J. Enol. Vitic.* Vol 27 (1).
- Kim, H.J., Kim, S.B., Kim, C.J. 2007. The Effects of Nonionic Surfactants on the pretreatment and enzymatic hydrolysis of recycled newspaper. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 12:47-151.
- Kim, H. and Day. 2010. The effects of nonionic surfactants on the pretreatment and enzymatic hydrolysis of recycled newspaper. *Biotechnology and Bioprocess Engineering* 12:147-151.

- La Grange, D., Den Hann, R., Van Zil, W. 2010. Engineering cellulolytic ability into bioprocessing organisms. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **87**(4):1195-1208.
- Lemus, R. and Parrish D.J. 2009. Herbaceous crops with potential for biofuel production in the USA. CAB Reviews: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources, **4**(057), doi: 10.1079/PAVSNNR20094057.
- Lenihan, P., Orozco, A., O'Neill, E., Ahmad, M., Rooney, D. and Walker, G. 2010. Dilute acid hydrolysis of lignocellulosic biomass. *Chemical Engineering Journal*, 156:395-403.
- Lozanoff, J., Heinichen, S., Marchi, G. and Risso, E. 2007. Bioenergía: Revisión de tecnologías emergentes. Buenos Aires: Observatorio de Políticas Públicas. CAT. OPP/CAG/2007-13.
- Marzialetti, T., Valenzuela, M., Sievers, C., Hoskins, T., Agrawal, P., Jones, C. 2008. Dilute Acid Hydrolysis of Loblolly Pine: A Comprehensive Approach. *Ind. Eng. Chem. Res.* 47:7131–7140.
- Mason, R.L., Gunst, R.F., Hess, J.L. 2003. *Statistical Design and Analysis of Experiments with Applications to Engineering and Science*. Second Edition, Wiley Interscience 585-587. Hoboken, New Jersey. ISBN 0-471-37216-1.
- Mateos, I. 2006. Aprovechamiento De Residuos Agrarios <http://www.eeci.net.biobase> (consultada diciembre, 2013).
- Méndez, A. 2010. Producción de etanol por *Pichia stipitis* en hidrolizado ácido de cascara de piña. Tesis para acreditar la Experiencia Recepcional. Universidad Veracruzana. México.
- Moheno de la Cruz M.G. 2013. Uso de un hidrolizado de cáscaras de naranjatoronja y dos cepas de levadura para la obtención de bioetanol. Tesis para acreditar la Experiencia Recepcional. Universidad Veracruzana. México.
- Montes, G.N., Pecina, Q.V., Cisneros, L.M.E. y García, G.M.A. 2010. RB Cañero: Sorgo dulce *Sorghum bicolor* (L.) Moench para la producción de etanol. Folleto técnico 43:31.
- Montes, G.N. 2012. Líder Nacional del Programa de Sorgo del INIFAP. Gobierno Federal SAGARPA.
- Montgomery, C.D. 1991. *Diseño y análisis de experimentos*. Grupo editorial iberoamericana, Arizona, EUA.

- Morinelly, J.E., Jensen, J.R., Browne, M., Co, T. B., Shonnard, D.R. 2009. Kinetic Characterization of the Formation and Degradation of Xylose Monomer and Oligomer during Dilute Acid Pretreatment of Lignocellulosic Biomass from Forests and Switchgrass, *Industrial and Engineering Chemistry Research*, 48:9877-9884.
- Mousdale, D. 2008. *Biofuels, biotechnology, chemistry, and sustainable development*, CRC Press, Taylor & Francis Group. ISBN-13:978-1-4200-5124-7.
- Musatto, S., Fernandes, M., Milagres, A., Roberto, I. 2008. *Effect of hemicellulose and lignin on enzymatic hydrolysis of cellulose from brewer's spent grain*. *Enzyme and Microbial Technology*. 43:124-129.
- Mussatto, S.I. and Teixeira, J.A. 2010. Lignocellulosic as raw material in fermentation process. Institute for Biotechnology and Bioengineering, Centre of Biological Engineering, University of Minho, Campus de Gualtar, 4710-057 Braga, Portugal. ISBN 978-84-614-6195-0. *Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*. A. Méndez-Vilas (Ed.) 897- 907.
- Naranjo-Díaz, G.A. 2011. Pdf. *Sorgo dulce una nueva experiencia*. Área Industrial. Ingenio Taboga S.A.
- Nathan M, Wyman C, Dale B, Elander R, Lee Y, Holtzapple M and Ladisch M. 2005. Features of Promising Technologies for Pretreatment of Lignocellulosic Biomass. *Bioresource Technology*. **96**(6):673-686.
- Ndams, S., Tegbe, T., Ogundipe, S., Sheyin, Z. 2011. Determination of the optimum inoculum concentration and fermentation period and their effect on nutrient composition of brewers' dried grains. *Science World Journal*. **6**(1):13-19.
- Nigam, P.S. y Pandey, A. 2009. *Biotechnology for Agro-Industrial Residues Utilization*. Springer Science 13-15.
- Nochebuena, M.L.E. 2012. Estudio del efecto del tratamiento oxidativo y del Tween 80 sobre la hidrólisis enzimática del bagazo de caña de azúcar. Tesis de Maestría en Ingeniería Química. Instituto Tecnológico de Orizaba. México.
- Ochoa, E.X., Borbón, A., Montoya, C.L., Barreras, C.I., Alvarado-Padilla, J.I. y Zamarripa, C.A. 2011. Guía técnica para producir sorgo dulce en el Sur de Sonora. Centro de Investigación Regional del Noroeste. Campo Experimental Norman E. Borlaug. Folleto técnico (84) ISBN-978-607-425-747-2.

- Olvera, G.J., Sánchez, R.J., Bautista, R., Zavaleta, O., Ortega, C., Cortez, C. y Palacios, H. 2009. Revista mensual producida y editada por Apoyos y Servicios a la Comercialización Agropecuaria, Órgano Desconcentrado de la Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural, fundado en 1991.
- Pakanita M, Kunanopparat T, Menut P and Siriwattanayotin S. 2010. Effect of lignin removal on the properties of coconut coir fiber/wheat gluten biocomposite. *Composites Part A: Applied Science and Manufacturing*. **42**(2): 173-179.
- Park, J.W., Takahata, Y., Kajuchi, T. y Akehata, T. 1992. Effects of nonionic surfactant on enzymatic hydrolysis of used newspaper. *Biotechnology Bioengineering* 39:117-120.
- Parveen K, Barrett D, Delwiche M, and Stroeve P. 2009. Methods for Pretreatment of Lignocellulosic Biomass for Efficient Hydrolysis and Biofuel Production. Departments of Chemical Engineering and Materials Science, Food Science and Technology, and Biological and Agricultural Engineering, University of California Davis, Davis, California 95616. *Ind. Eng. Chem. Res.* **48**(8):3713-3729.
- Peña-Poma, M. 2009. Optimización de las condiciones de cultivo de las cepas *Pichia stipitis* CBS 5770, 5773 y 6054 para la producción de bioetanol a partir de hidrolizado de aserrín de curupau como residuo lignocelulósico. Tesis de Licenciatura en Bioquímica. Universidad mayor de San Andrés. Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas. La Paz-Bolivia.
- Prasad, S., Singh, A., Jain, N. and Joshi, H.C. 2007. Ethanol Production from Sweet Sorghum Syrup for Utilization as Automotive Fuel in India. *Energy Fuels* **21**(4):2415-2420.
- Qing, Q. and Bing, Y. 2010. Impact of surfactants on pretreatment of corn stover. *Bioresource Technology* 101:5941-5951.
- Rabelo, S., Maciel, R. y Costa, A. 2008. "A Comparison Between Lime and Alkaline Hydrogen Peroxide Pretreatments of Sugarcane Bagasse for Ethanol Production", *Appl. Biochem. Biotechnol.* **144**(1):87.
- Rajvanshi, A. K., De, T. K., Jorapur, R. M., and Nimbkar, N. 1993. Jaggery and syrup from sweet sorghum. Publication No. NARI-GUR, published by Nimbkar Agricultural Research Institute (NARI), Phaltan, India.
- Rangel-León, E., Guzman-Lagunes F., Gómez-Rodríguez, J., Aguilar-Uscanga Ma. Gpe. 2009. Establecimiento de las condiciones de hidrólisis del bagazo de caña para la obtención máxima de xilosa y mínima de inhibidores. VII Simposio Internacional de Producción de Alcoholes y Levaduras.

- Reddy, B.V., Reddy, S., Kumar, A. y Ramaiah, B. 2007. Variation in the quality parameters of sweet sorghum across different dates of sowing. *Journal of SAT Agricultural Research* **5**(1):1-3.
- REN21. 2010. Renewables Global Status Report **38**(8):4048–4056
- Roberto, M., Madamba, S.G., Moore, S.D., Tallent, M.K., Siggins, G.R. 2003. Ethanol increases GABAergic transmission at both pre- and postsynaptic sites in rat central amygdala neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**:2053–2058.
- Rodríguez, E. 2007. Monitoreo de los parámetros críticos en un fermentador. Ideas sobre la implementación del monitoreo en el crecimiento de los microorganismos involucrados. VII congreso de la sociedad cubana de Bioingeniería. T-105. La Habana, Cuba.
- Sarrouh, B., Jover, J., y González, E. 2005. “Estudio de la Hidrólisis ácida del bagazo con ácido sulfúrico concentrado utilizando dos variantes de una sola etapa y una sola etapa modificada para la obtención de etanol”, *Ingeniería e Investigación*, **25**(3):34.
- Saucedo-Luna, J., Castro-Montoya, A., Rico, J., Campos-García J. 2010. Optimization of acid hydrolysis of bagasse from Agave tequilina Weber. *Rev. Mex. Ing. Química*. **9**(1):91-97.
- Silva, J.P.A., Mussatto, S.I., Roberto, I.C., Teixeira, J.A. 2011. Ethanol production from xylose by *Pichia stipitis* NRRL Y-7124 in a stirred tank bioreactor. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*. **28**(1):151-156. ISSN 0104-6632.
- Sipos, B., Szilágyi, M., Sebestyén, Z., Perazzini R., Dienes, D., Jakab, E., Crestini, C., Réczey, K. 2011. Mechanism of the positive effect of poly (ethylene glycol) addition in enzymatic hydrolysis of steam pretreated lignocelluloses. *Comptes Rendus Biologies* **334**:812-823.
- Smith, G.A. and Buxton, D.R. 1993. Temperate zone sweet sorghum ethanol production potential. *Bioresource Technology*. **43**(1):71-75.
- Sun, Y. and Cheng, J. 2002. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresource Technology*. **83**:1-11.
- Taherzadeh, M.J. and Karimi, K. 2007. Acid-Based and Enzyme-Based Hydrolysis Processes for Ethanol from Lignocellulosic Materials: A Review, *Bioresources* **2**:472-499.

- Tarpley, L. and Vietor, D.M. 2007. Compartmentation of sucrose during radial transfer in mature sorghum culm. *BMC Plant Biol.* 7:33.
- Undersander, D.J., L. H. Smith., A.R. Kaminski., K.A. Kelling, and J.D. Doll 1990. Sorghum – Forage. *Alternative Field Crops Manual*.
- Unión Nacional de Cañeros A C CNPR. XXIX Asamblea General Ordinaria Comité Ejecutivo Nacional 2010 2014. Estadística de la Agroindustria de la caña de azúcar 2004-2013.
- Vázquez, H.J y Dacosta, O. 2007. Fermentación alcohólica: Una opción para la producción de energía renovable a partir de desechos agrícolas. *Ingeniería, Investigación y Tecnología.* 8(4):249-259. ISSN 1405-7743.
- Woods, J. 2000. Integrating Sweet Sorghum and Sugarcane for Bioenergy: Modelling the Potential for Electricity and Ethanol Production in SE Zimbabwe. PhD Thesis, King's College, London, UK. ISBN-13: 978 1 84593 616 7.
- Xiaorong W, Staggenborg S, Propheter J, Rooney W, Yu J, and Wang D. 2010. Features of sweet sorghum juice and their performance in ethanol fermentation. *Industrial Crops and Products.* 31(1):164-170.

# **ANEXOS**

## ANEXOS

### A.1 Determinación de paredes celulares: fibra detergente neutro a través de la técnica de la bolsa filtro de alimentación (ANKOM<sup>200</sup>)

Este método determina la fibra detergente neutro, la cual es el residuo remanente posterior a la digestión efectuada por una solución detergente. Los residuos de fibra son predominantemente hemicelulosa, celulosa y lignina.

#### Equipos:

1. Balanza analítica capaz de pesar hasta 0.1 mg.
2. Horno capaz de mantener una temperatura de  $102 \pm 2$  °C.
3. Instrumento de digestión capaz de realizar la digestión a  $100 \pm 0.5$  °C y mantener la presión de 10 a 25 psi (ANKOM<sup>200</sup>, 65 rpm de agitación, ANKOM Technology).
4. Bolsas filtro capaces de retener partículas de 25 micrones mientras se permite la penetración rápida de la solución (F57, ANKOM Technology).
5. Sellador de calor de las bolsas filtro (1915, ANKOM Technology).
6. Desecador (MoistureStop Weigh Pouch, ANKOM Technology)
7. Marcador solvente resistente al ácido (F08, ANKOM Technology)

#### Reactivos:

Solución detergente neutro. Adicionar 30.0 g de sulfato lauril sódico, USP; 18.6 g de ácido etilendiaminotetracético disódico dihidratado; 6.81 g de tetraborato de sodio decahidratado; 4.56 g de fosfato disódico anhidro y 10 mL de trietilenglicol en 1 L de agua destilada (solución química premezclada disponible en ANKOM Technology). Verificar que el pH que oscile en el rango de 6.9 a 7.1. Agitar y calentar para disolver los reactivos.

**Preparación de la muestra:** Pulverizar la muestra en un molino centrífugo con una malla de 2 mm o en un molino cortador tipo Wiley con una malla de 1 mm.

**Procedimiento:**

1. Marcar las bolsas filtro con un marcador resistente a la temperatura. Pesar la bolsa filtro ( $W_1$ ).
2. Pesar 0.45 - 0.55 g de muestra preparada ( $W_2$ ) directamente en la bolsa filtro.
3. Sellar la bolsa filtro a través de un sellador por calentamiento en los 4 mm superiores de la bolsa.
4. Colocar un máximo de 24 bolsas dentro del contenedor de bolsas. Las nueve bandejas deben ser utilizadas independientemente del número de bolsas a procesar. Colocar 3 bolsas por cada bandeja. Insertar el contenedor de bolsas junto con las bolsas dentro del contenedor analizador de fibra.
5. Adicionar al contenedor analizador de fibra el volumen de 1900 mL a 2000 mL de solución fibra neutro detergente en caso de procesar 24 bolsas. En caso de procesar menos de 20 bolsas, adicionar 100 mL de solución por cada bolsa. Adicionar 20 g de sulfito de sodio a la solución dentro del recipiente.
6. Cambiar el interruptor a modo agitación y calor. Ajustar el reloj automático a 75 min y cerrar la tapa.
7. Al final de la extracción, apagar tanto la agitación como el modo calor. Abrir la válvula de drenado y esperar a que se vacíe el recipiente antes de abrir la tapa.
8. Una vez el recipiente vacío, cerrar la válvula de drenado y abrir la tapa. Agregar 1900 mL (70 °C - 90 °C) de agua destilada. Accionar tanto el modo agitar y enjuague por 5 min. Repetir el lavado con agua caliente 3 veces.
9. Una vez finalizado el proceso de lavado, remover las bolsas del recipiente. Oprimir moderadamente las bolsas para remover el exceso de agua. Colocar las bolsas en vasos de precipitados de 250 mL y adicionar suficiente acetona hasta cubrir las bolsas, dejar remojando de 3 a 5 min.

10. Remover las bolsas de la acetona y colocarlas en una zona donde circule aire hasta evaporar en su totalidad a la acetona. Secar completamente en horno a  $102 \pm 2$  °C.
11. Remover de la estufa las bolsas, colocarlas directamente en un desecador y aplanarlas para remover el aire. Enfriar a temperatura ambiente y pesar las bolsas.

**Cálculos:**

$$\% \text{NDF} = \frac{(W_3 - W_1)}{W_2} * 100 \quad (\text{A1.1})$$

**Dónde:** NDF es la fibra detergente neutro,  $W_1$  es el peso de la bolsa filtro (g),  $W_2$  es el peso de la muestra (g) y  $W_3$  es el peso de la bolsa filtro seca con la fibra después del proceso de extracción (g).

**A.2 Determinación de paredes celulares: fibra detergente ácido a través de la técnica de la bolsa filtro de alimentación (ANKOM<sup>200</sup>)**

Este método determina la fibra detergente ácido, la cual es el residuo remanente posterior a la digestión efectuada por  $\text{H}_2\text{SO}_4$  y CTAB. Los residuos de fibra son predominantemente celulosa y lignina.

**Equipos:**

1. Balanza analítica capaz de pesar hasta 0.1 mg.
2. Horno capaz de mantener una temperatura de  $102 \pm 2$  °C.
3. Instrumento de digestión capaz de realizar la digestión a  $100 \pm 0.5$  °C y mantener la presión de 10 a 25 psi (ANKOM<sup>200</sup>, 65 rpm de agitación, ANKOM Technology).
4. Bolsas filtro capaz de retener partículas de 25 micrones mientras se permite la penetración rápida de la solución (F57, ANKOM Technology).
5. Sellador de calor de las bolsas filtro (1915, ANKOM Technology).
6. Desecador (MoistureStop Weigh Pouch, ANKOM Technology)

---

## 7. Marcador solvente resistente al ácido (F08, ANKOM Technology)

### Reactivos:

Solución detergente ácido. Adicionar 20.0 g de bromuro de cetyltrimetilamonio (CTAB) a 1 L 1 N de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> previamente estandarizada, (solución química premezclada disponible en ANKOM Technology). Agitar y calentar para disolver los reactivos.

**Preparación de la muestra:** Pulverizar la muestra en un molino centrífugo con una malla de 2 mm o en un molino cortador tipo Wiley con una malla de 1 mm.

### Procedimiento:

1. Marcar las bolsas filtro con un marcador resistente a la temperatura. Pesar la bolsa filtro ( $W_1$ ).
2. Pesar 0.45 - 0.55 g de muestra preparada ( $W_2$ ) directamente en la bolsa filtro.
3. Sellar la bolsa filtro a través de un sellador por calentamiento en los 4 mm superiores de la bolsa.
4. Colocar un máximo de 24 bolsas dentro del contenedor de bolsas. Las nueve bandejas deben ser utilizadas independientemente del número de bolsas a procesar. Colocar 3 bolsas por cada bandeja. Insertar el contenedor de bolsas junto con las bolsas dentro del contenedor analizador de fibra.
5. Adicionar al contenedor analizador de fibra el volumen de 1900 mL a 2000 mL de solución fibra ácido detergente en caso de procesar 24 bolsas. En caso de procesar menos de 20 bolsas, adicionar 100 mL de solución por cada bolsa.
6. Cambiar el interruptor a modo agitación y calor. Ajustar el reloj automático a 60 min y cerrar la tapa.
7. Al final de la extracción, apagar tanto la agitación como el modo calor. Abrir la válvula de drenado y esperar a que se vacíe el recipiente antes de abrir la tapa.

8. Una vez el recipiente vacío, cerrar la válvula de drenado y abrir la tapa. Agregar de 1900 mL a 2000 mL (70 °C – 90 °C) de agua destilada. Accionar tanto el modo agitar y enjuague por 5 min. Repetir el lavado con agua caliente 3 veces por 5 min.
9. Una vez finalizado el proceso de lavado, remover las bolsas del recipiente. Oprimir moderadamente las bolsas para remover el exceso de agua. Colocar las bolsas en vasos de precipitados de 250 mL y adicionar suficiente acetona hasta cubrir las bolsas, dejar remojando de 3 a 5 min.
10. Remover las bolsas de la acetona y colocarlas en una zona donde circule aire hasta evaporar en su totalidad a la acetona. Secar completamente en horno a  $102 \pm 2$  °C.
11. Remover de la estufa las bolsas, colocarlas directamente en un desecador y aplanarlas para remover el aire. Enfriar a temperatura ambiente u pesar las bolsas.

**Cálculos:**

$$\% \text{ADF} = \frac{(W_3 - W_1)}{W_2} * 100 \quad (\text{A2.1})$$

**Dónde:** ADF es la fibra ácido detergente,  $W_1$  es el peso de la bolsa filtro (g),  $W_2$  es el peso de la muestra y  $W_3$  es el peso de la bolsa filtro seca con la fibra después del proceso de extracción (g).

**A.3 Determinación de paredes celulares: ácido detergente lignina (ANKOM Technology)****Equipos:**

1. Dispositivo de filtración, ANKOM Technology F57 bolsas filtro.
2. Sellador de bolsas por impulso, ANKOM Technology 1915 sellador por calentamiento.
3. Desecador, ANKOM Technology Moisture stop F39.

#### 4. Vasos de 2 y 3 L.

##### **Reactivos:**

Ácido sulfúrico (72 % en peso) ANKOM Technology-FSA72 o mezclar manualmente para estandarizar  $\text{H}_2\text{SO}_4$  grado reactivo hasta alcanzar 1634 g/L de gravedad específica a 20 °C o 24 normal: adicionar 1200 g de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  a 440 mL de agua en un recipiente volumétrico de 1 L con enfriamiento. Estandarizar esta solución a 1634 g/L gravedad específica a 20 °C, removiendo parte de la solución y añadiendo agua o  $\text{H}_2\text{SO}_4$  según sea requerido.

##### **Procedimiento:**

1. Pesar la bolsa filtro ( $W_1$ ).
2. Pesar 0.5 g ( $\pm 0.05$  g) de muestra libre de aire ( $W_2$ ), la muestra debe tener un tamaño capaz de pasar por 1 mm de tamaño de malla.
3. Sellar la bolsa filtro a través de un sellador por calentamiento en los 4 mm superiores de la bolsa.
4. Distribuir la muestra homogéneamente dentro de la bolsa filtro para eliminar el aglutinamiento.
5. Efectuar las determinaciones de fibra ácido detergente empleando el analizador de fibra (ver procedimiento A2).
6. Posterior a realizar las determinaciones ácido fibra detergente, colocar las muestras secas en un vaso de 3 L y adicionar aproximadamente 250 mL de ácido sulfúrico al 72 % hasta cubrir las bolsas.
7. Las bolsas deben estar completamente secas y temperatura ambiente antes de adicionar el ácido concentrado. Si la humedad está presente en las bolsas, el calor generado por la reacción entre el  $\text{H}_2\text{SO}_4$  y el agua afectará adversamente los resultados.
8. Colocar el vaso de 2 L dentro del vaso de 3 L para mantener las bolsas sumergidas. Agitar las bolsas al inicio y por intervalos de 30 min oprimiendo

moderadamente el recipiente de 2 L sobre las bolsas aproximadamente 30 veces.

9. Después de 3 h de realizar la agitación sobre las bolsas, vaciar el H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y aplicar un lavado con agua destilada para remover el ácido. Repetir los lavados hasta alcanzar pH neutro. Lavar con aproximadamente 250 mL de acetona por 3 min para remover el agua. Secar completamente en horno a 105 °C por un periodo de 2 a 4 h. Remover las bolsas del horno y colocarla directamente en el desecador, aplanándolas para remover el aire. Enfriar a temperatura ambiente y pesar (W<sub>3</sub>).

#### Cálculos:

$$\% \text{ADL} = \frac{(W_3 - W_1)}{W_2} * 100 \quad (\text{A3.1})$$

**Dónde:** ADL es la fibra ácido lignina detergente, W<sub>1</sub> es el peso de la bolsa filtro (g), W<sub>2</sub> es el peso de la muestra y W<sub>3</sub> es el peso de la bolsa filtro seca con la fibra después del proceso de extracción (g).

$$\% \text{Hemicelulosa} = \% \text{NDF} - \% \text{ADF} \quad (\text{A3.2})$$

$$\% \text{Celulosa} = \% \text{ADF} - \% \text{ADL} \quad (\text{A3.3})$$

$$\% \text{Lignina} = \% \text{LAD} \quad (\text{A3.4})$$

$$\text{Otros} = 100 \% - \% \text{Hemicelulosa} - \% \text{celulosa} - \% \text{Lignina} - \% \text{Cenizas} \quad (\text{A3.5})$$

#### A.4 Determinación de humedad y cenizas del bagazo de sorgo dulce

##### ➤ Humedad (Método Oficial AOCS AB 2-49)

#### Procedimiento:

1. Eliminar cualquier material extraño en la muestra que va a ser analizada mediante remoción manual.

2. Reducir el tamaño de la muestra de acuerdo al número de pruebas que se vayan a realizar.
3. Pesar en un crisol previamente tarado de 1 a 1.5 g de muestra.
4. Colocar el crisol con la muestra en una estufa de tiro forzado a una temperatura de  $130\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 3 h.
5. Sacar de la estufa, una vez cumplido el tiempo de secado, enfriar a temperatura ambiente dentro de un desecador y pesar
6. Reportar la humedad mediante la Ecuación A4.1.

$$\% \text{ Humedad} = \frac{M_2 - M_3}{M_2 - M_1} * 100 \quad (\text{A4.1})$$

Dónde:  $M_1$  es el peso del crisol (g);  $M_2$  es el peso del crisol más muestra húmeda (g) y  $M_3$  es el peso del crisol más muestra seca (g).

➤ **Cenizas (Método Oficial AOCS BA 5A-49)**

**Procedimiento:**

1. Pesar 2 g de muestra bien mezclada dentro de una cápsula de porcelana previamente calentada y tarada, colocarla en la mufla y calentar a  $600\text{ }^{\circ}\text{C}$  manteniendo su temperatura ( $\pm 15\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) por 2 h.
2. Transferir la cápsula a un desecador, enfriar a temperatura ambiente, pesar inmediatamente después de enfriada.
3. Calcular las cenizas en la muestra utilizando la Ecuación A4.2.

$$\% \text{ Cenizas} = \frac{(P-p) (g)}{M (g)} * 100 \quad (\text{A4.2})$$

Dónde:  $P$  es el peso del crisol más muestra (g);  $p$  es el peso del crisol (g) y  $M$  es el peso de la crisol muestra seca (g).

## A.5 Rendimientos y productividades

La ecuación de rendimiento  $Y_{P/S}$  (g de producto/g de sustrato consumido) que expresa el producto con respecto al sustrato es:

$$Y_{P/S} = \frac{P_f - P_0}{S_0 - S_f} \quad (\text{A5.1})$$

En Dónde  $P_f$  es el producto final (g/L),  $P_0$  el producto inicial (g/L),  $S_0$  es el sustrato inicial (g/L) y  $S_f$  el Sustrato final (g/L).

La ecuación de productividad  $Q_p$  (g de producto/litro/hora) que expresa la velocidad de formación de producto es:

$$Q_p = \frac{P_f}{t_f} \quad (\text{A5.2})$$

Dónde:  $P_f$  es el producto final (g/L) y  $t_f$  el tiempo final (h)

## A.6 Localización del punto estacionario

De acuerdo a Montgomery (1991), puede obtenerse una solución general para el punto estacionario de acuerdo a la notación matricial a partir del modelo de segundo orden del cual se tiene la siguiente ecuación:

$$\hat{y} = \hat{\beta}_0 + x' b + x' B x \quad (\text{A6.1})$$

Dónde:

$$x = \begin{bmatrix} X_1 \\ X_2 \\ \cdot \\ \cdot \\ \cdot \\ X_K \end{bmatrix} \quad b = \begin{bmatrix} \hat{\beta}_1 \\ \hat{\beta}_2 \\ \cdot \\ \cdot \\ \cdot \\ \hat{\beta}_K \end{bmatrix} \quad y \quad B = \begin{bmatrix} \hat{\beta}_{11}, & \hat{\beta}_{12}/2 & , \dots, & \hat{\beta}_{1K}/2 \\ & \hat{\beta}_{22}, & , \dots, & \hat{\beta}_{2K}/2 \\ \text{sim} & & & \hat{\beta}_{kk} \end{bmatrix}$$

El punto estacionario está dado por la ecuación A6.2 que se muestra a continuación:

$$x_0 = -\frac{1}{2}B^{-1}b \quad (A6.2)$$

Sustituyendo las dos ecuaciones anteriores se determina la respuesta predicha en el punto estacionario, teniendo finalmente la ecuación A6.3.

$$\hat{y} = \hat{\beta}_0 + \frac{1}{2}x_0'b \quad (A6.3)$$

Aplicando el procedimiento anterior se generan las siguientes matrices para el cálculo del punto estacionario:

**a) Xilosa (g/L)**

$$b = \begin{bmatrix} 48.3850 \\ 0.9611 \\ -14.3904 \end{bmatrix} \quad B = \begin{bmatrix} -7.5783 & -0.1725 & -1.2050 \\ -0.1725 & -0.0035 & -0.0009 \\ -1.2050 & -0.0009 & 1.2729 \end{bmatrix}$$

$$x_0 = -\frac{1}{2} \begin{bmatrix} -7.5783 & -0.1725 & -1.2050 \\ -0.1725 & -0.0035 & -0.0009 \\ -1.2050 & -0.0009 & 1.2729 \end{bmatrix}^{-1} * \begin{bmatrix} 48.3850 \\ 0.9611 \\ -14.3904 \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} -0.1016 \\ 5.2135 \\ -0.087 \end{bmatrix}$$

Calculando la respuesta predicha se tiene lo siguiente:

$$y = -229.6074 + \frac{1}{2} \begin{bmatrix} -0.1016 \\ 5.2135 \\ -0.087 \end{bmatrix} * \begin{bmatrix} 48.3850 \\ 0.9611 \\ -14.3904 \end{bmatrix} = 24.9354$$

**b) Glucosa (g/L)**

$$b = \begin{bmatrix} 74.1636 \\ 3.2199 \\ 6.7157 \end{bmatrix} \quad B = \begin{bmatrix} -8.9236 & 0.1541 & 0.0172 \\ 0.1541 & -0.0506 & -0.0531 \\ 0.0172 & -0.0531 & -0.01105 \end{bmatrix}$$

$$x_0 = -\frac{1}{2} \begin{bmatrix} -8.9236 & 0.1541 & 0.0172 \\ 0.1541 & -0.0506 & -0.0531 \\ 0.0172 & -0.0531 & -0.01105 \end{bmatrix}^{-1} * \begin{bmatrix} 74.1636 \\ 3.2199 \\ 6.7157 \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} 4.6574 \\ 27.0407 \\ 18.1185 \end{bmatrix}$$

Calculando la respuesta predicha se tiene lo siguiente:

$$y = -229.6074 + \frac{1}{2} \begin{bmatrix} 4.6574 \\ 27.0407 \\ 18.1185 \end{bmatrix} * \begin{bmatrix} 74.1636 \\ 3.2199 \\ 6.7157 \end{bmatrix} = 47.4693$$

**c) Proceso fermentativo (Rendimiento g/g)**

$$b = \begin{bmatrix} -0.0639 \\ -0.2266 \\ -0.1958 \end{bmatrix} \quad B = \begin{bmatrix} 0.0170 & -0.0114 & -0.0081 \\ -0.0114 & 0.0119 & 0.0531 \\ -0.0081 & 0.0531 & 0.0220 \end{bmatrix}$$

$$x_0 = -\frac{1}{2} \begin{bmatrix} 0.0170 & -0.0114 & -0.0081 \\ -0.0114 & 0.0119 & 0.0531 \\ -0.0081 & 0.0531 & 0.0220 \end{bmatrix}^{-1} * \begin{bmatrix} -0.0639 \\ -0.2266 \\ -0.1958 \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} 4.0532 \\ 1.3409 \\ 2.7023 \end{bmatrix}$$

Calculando la respuesta predicha se tiene lo siguiente:

$$y = 0.9873 + \frac{1}{2} \begin{bmatrix} 4.0532 \\ 1.3409 \\ 2.7023 \end{bmatrix} * \begin{bmatrix} -0.0639 \\ -0.2266 \\ -0.1958 \end{bmatrix} = 0.4314$$