
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

OPCION I.- TESIS

TRABAJO PROFESIONAL:

**“OBTENCIÓN DE BIOETANOL A PARTIR DE RESIDUOS LIGNOCELULÓSICOS DE PAPA
(*Solanum tuberosum*) UTILIZANDO ENZIMAS COMERCIALES y *Escherichia coli*
ETANOLOGÉNICA”**

QUE PARA OBTENER ELGRADO DE:

**MAESTRO EN
CIENCIAS EN INGENIERÍA QUÍMICA**

PRESENTA:

I.Q. JAVIER DANIEL RAMÍREZ AMAYA

DIRECTOR DE TESIS

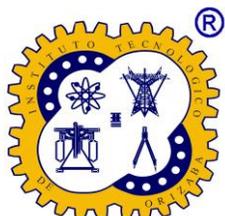
DRA. LETICIA LÓPEZ ZAMORA

CODIRECTOR DE TESIS

DRA. MARÍA GUADALUPE AGUILAR USCANGA

ORIZABA, VER. MEXICO

OCTUBRE 2015



"2015, Año del Generalísimo José María Morelos y Pavón"

FECHA: 20/10/2015
DEPENDENCIA: POSGRADO
ASUNTO: Autorización de Impresión
OPCIÓN: I

C. JAVIER DANIEL RAMIREZ AMAYA
CANDIDATO A GRADO DE MAESTRO EN:
CIENCIAS EN INGENIERIA QUIMICA

De acuerdo con el Reglamento de Titulación vigente de los Centros de Enseñanza Técnica Superior, dependiente de la Dirección General de Institutos Tecnológicos de la Secretaría de Educación Pública y habiendo cumplido con todas las indicaciones que la Comisión Revisora le hizo respecto a su Trabajo Profesional titulado:

"OBTENCIÓN DE BIOETANOL A PARTIR DE RESIDUOS LIGNOCELULÓSICOS DE PAPA (SOLANUM TUBEROSUM) UTILIZANDO ENZIMAS COMERCIALES Y ESCHERICHIA COLI ETANOLOGÉNICA."

Comunico a Usted que este Departamento concede su autorización para que proceda a la impresión del mismo.

A T E N T A M E N T E


M.C. MA. ELENA GARCÍA REYES
JEFE DE LA DIV. DE ESTUDIOS DE POSGRADO



SECRETARÍA DE
EDUCACIÓN PÚBLICA
INSTITUTO
TECNOLÓGICO
DE ORIZABA

ggc



"2015, Año del Generalísimo José María Morelos y Pavón"

FECHA : 28/08/2015

ASUNTO: Revisión de Trabajo Escrito

C. M.C. MA. ELENA GARCÍA REYES
JEFE DE LA DIVISION DE ESTUDIOS
DE POSGRADO E INVESTIGACION.
P R E S E N T E

Los que suscriben, miembros del jurado, han realizado la revisión de la Tesis del (la) C. :

JAVIER DANIEL RAMIREZ AMAYA

la cual lleva el título de:

"OBTENCIÓN DE BIOETANOL A PARTIR DE RESIDUOS LIGNOCELULÓSICOS DE PAPA (SOLANUM TUBEROSUM) UTILIZANDO ENZIMAS COMERCIALES Y ESCHERICHIA COLI ETANOLOGÉNICA."

Y concluyen que se acepta.

A T E N T A M E N T E

PRESIDENTE : **DRA. LETICIA LOPEZ ZAMORA**

SECRETARIO : **DRA. MARIA GUADALUPE AGUILAR USCANGA**

VOCAL : **DR. EUSEBIO BOLAÑOS REYNOSO**

VOCAL SUP. : **DRA. ROSALIA CERECERO ENRIQUEZ**



FIRMA
FIRMA
FIRMA
FIRMA

EGRESADO(A) DE LA MAESTRIA EN **CIENCIAS EN INGENIERIA QUIMICA**

OPCION: I **Tesis**



DEDICATORIAS

A Dios por darme la vida y permitirme lograr este sueño, por guiarme y rodearme de buenas personas que son ángeles que me cuidan y me ayudan en cada momento.

A mis padres Francisco Ramírez y Miguelina Amaya por apoyarme incondicionalmente, por estar siempre aconsejándome, dándome ánimos y por transmitirme su ejemplo de lucha.

A mi hermana Minerva Ramírez que ha sido como una segunda madre que siempre me ha brindado su apoyo incondicionalmente y me ha aconsejado en los buenos y malos momentos.

A mis hermanos Rosa Elena, Araceli, Francisco, Miguel Ángel y José Luis, por siempre estar conmigo y ayudarme a lograr este sueño que también es de ustedes hermanos, y que primeramente Dios nos ayude a todos a tener un mejor futuro.

A mi gran amor Emilene Reyes por acompañarme en este sueño y juntos lograrlo, por estar conmigo en cada momento, por recorrer juntos esta aventura, por soportarme, por compartir sus alegrías, por darme siempre ánimo y motivarme para seguir luchando, por compartir sus experiencias, conocimientos y por ayudarme incondicionalmente, gracias amor, por ser un ángel en mi vida.

A sus padres y familiares de Emilene por apoyarnos incondicionalmente en todo momento, que Dios hoy y siempre los llenen de bendiciones y que primeramente Dios pronto podamos juntos tener un mejor futuro para nuestras familias, gracias por creer en nosotros.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al CONACYT por el apoyo económico brindado para mi desarrollo profesional durante la maestría.

Agradezco a la Dra. Leti por su entrega y dedicación en este proyecto de investigación, por guiarme y apoyarme en todo momento, le doy las gracias por aceptarme en su equipo de trabajo, por creer en mí, por inspirarme hacer cosas grandes y animarme para nunca darme por vencido.

Agradezco a la Dra. Lupita Aguilar por aceptar ser mi coasesora, por permitirme trabajar con ella en laboratorio de bioingeniería del ITV y ser parte de su familia de ese gran equipo de trabajo que dirige, donde aprendí muchas cosas que enriquecieron mi desarrollo profesional y personal.

Agradezco al Dr. Emmanuel Flores Huicochea del IPN Morelos, por creer en mí y permitir realizar mi estancia en su laboratorio para cumplir algunos objetivos de mi proyecto, le agradezco toda su ayuda, tiempo y dedicación.

Agradezco a la Dra. Rosalía Cerecero y al Dr. Eusebio Bolaños por ser parte de mi comité de revisión de tesis, por dedicarle tiempo, empeño, dedicación y por todas sus aportaciones para enriquecer este trabajo.

Agradezco al Dr. Javier Gómez del laboratorio de bioingeniería del ITV y a su alumna Madai por su trabajo y apoyo incondicional en el arreglo y mantenimiento de los equipos para poder realizar nuestros experimentos y terminar nuestro trabajo de investigación. Agradezco al Dr. Benigno Ortiz del laboratorio de bioingeniería del ITV por su amistad, consejos, enseñanzas y aportaciones a este trabajo que ayudaron a enriquecerlo y a cumplir su objetivo.

Agradezco a mis amigos y compañeros del laboratorio de plantas pilotos del ITO y del laboratorio de bioingeniería del ITV por brindarme su amistad incondicional, por todo su apoyo, ayuda, enseñanzas, motivación y por ser parte de mi familia. Gracias Adrián, Kelvin, Chio, Álvaro, Mauricio, Yesenia, Frank, Víctor, Germán, Libia, Gabi, Alberto, Rodolfito, Daniel, Lupita, Inés, Armando, Paola y Lucy.

RECONOCIMIENTOS

Las presentaciones en congresos y publicaciones obtenidas de esta tesis se enlistan a continuación.

PRESENTACIONES EN CONGRESOS

- | | | |
|------|-----------|--|
| 2015 | Expositor | Efecto del tratamiento alcalino en residuos lignocelulósicos de bagazo de papa (<i>S. tuberosum</i>). Academia Mexicana de Investigación y Docencia en Ingeniería Química, A.C. “Retos de la Ingeniería Química en la Globalización”, 5-8 de Mayo, Cancún, Quintana Roo, México. |
| 2015 | Expositor | Obtención de bioetanol a partir de bagazo de papa (<i>Solanum tuberosum</i>) utilizando <i>Escherichia coli</i> etanológica. Academia Journals. Congreso Internacional de Investigación Córdoba 2015, 30 y 31 de Julio. Córdoba, Veracruz, México. |

PUBLICACIONES

Javier Daniel Ramírez Amaya, Emmanuel Flores Huicochea, María Guadalupe Águilar Uscanga, Leticia López Zamora. Efecto del tratamiento alcalino en residuos lignocelulósicos de bagazo de papa (*S. tuberosum*). Memoria de congreso AMIDIQ 2015 online con ISBN 978-607-95593-3-5.

Javier Daniel Ramírez Amaya, Leticia López Zamora, María Guadalupe Águilar Uscanga. Obtención de bioetanol a partir de bagazo de papa (*Solanum tuberosum*) utilizando *Escherichia coli* etanológica. Portal de internet AcademiaJournals.com con ISSN 1946-5351 online y en libro electrónico Compendio Investigativo de Academia Journals Córdoba 2015: Ciencias, Tecnología, Ingeniería y Matemáticas con ISBN 978-1-939982-12-4.

RESUMEN

Obtención de bioetanol a partir de residuos lignocelulósicos de papa (*Solanum tuberosum*) utilizando enzimas comerciales y *Escherichia coli* etanológica

Elaborada por: Ing. Javier Daniel Ramírez Amaya

Dirigida por: Dra. Leticia López Zamora

Dra. María Guadalupe Aguilar Uscanga

El objetivo de esta investigación fue la obtención de bioetanol a partir de residuos lignocelulósicos de papa (*Solanum tuberosum*) utilizando enzimas comerciales y *Escherichia coli* etanológica. Para ello se realizó una caracterización lignocelulósica de la materia prima, en donde se encontró que los tallos de papa y tallo-hoja contienen (35, 20)% celulosa, (28,19)% hemicelulosa y (25, 21)% lignina respectivamente, se realizó un diseño de experimentos 2^3 del pretratamiento alcalino para evaluar el efecto de la temperatura (80 y 120 °C), la concentración de NaOH (0.5 y 1%) y el tiempo (60, 90 min) en muestras de tallo y tallo-hoja en base al contenido de lignina, para este estudio se encontró que los niveles altos de concentración de NaOH (1%), los niveles bajos de temperatura (80 °C) y los niveles altos de tiempo (90 min) favorecen la disminución del contenido de lignina de un 25% a 13% en los experimentos de tallo, en el caso de los experimentos de tallo-hoja se encontró que los niveles altos de concentración de NaOH (1%), con niveles altos de temperatura (120 °C) y niveles bajos de tiempo (60 min) reducen el contenido de lignina de un 21% a 13%. Posterior al pretratamiento alcalino se realizó un diseño de experimentos 2^3 para evaluar el efecto de concentración de enzima hemicelulasas (4 y 6% p/v), concentración de enzima celulasas (4 y 6% p/v) de Novozyme y la temperatura de hidrólisis (40 y 50 °C), la variable de respuesta fue la concentración de azúcares reductores. Los resultados del diseño de experimentos de la hidrólisis enzimática mostraron que la máxima concentración de glucosa fue de 12 g/L, utilizando una relación sólido-Líquido (RSL) de 1:15 (p/v) con 10 g de bagazo de papa en base seca, temperatura de hidrólisis 40 °C y tiempo de reacción de 72 h. Se encontró que la temperatura de hidrólisis fue el único factor significativo, y que los niveles bajos de temperatura (40 °C) favorecen la concentración de glucosa, la concentración de enzima no mostró ningún efecto significativo por lo que es indistinto utilizar niveles bajos o altos (4 o 6 %p/v). Para la optimización de la fermentación de los azúcares del hidrolizado enzimático de bagazo de papa se utilizó la bacteria etanológica *Escherichia coli* CCE14, se empleó un diseño Box-Behnken con tres puntos centrales, los factores y sus niveles fueron pH (6, 6.5 y 7), concentración de inóculo (5, 10 y 15 %v/v) y velocidad de agitación (150, 200 y 250 rpm), la variable de respuesta fue la eficiencia de producción de etanol, η_{EtOH} (%). Las mejores condiciones de operación fueron pH= 6.64, Ci (%v/v)= 5%, Va= 150 rpm y la eficiencia de producción de etanol (η_{EtOH})= 89.58%. En conclusión, la producción de etanol a partir de estos residuos de papa resulta una alternativa interesante, sin embargo, es necesario realizar más experimentos para abordar con mayor profundidad las condiciones óptimas para cada proceso y evaluar su factibilidad económica.

ABSTRACT

Bioethanol from potato lignocellulosic waste (*Solanum tuberosum*) using commercial enzymes and ethanologenic *Escherichia coli*

By: Javier Daniel Ramírez Amaya
Dra. Leticia López Zamora
Dra. Maria Guadalupe Aguilar Uscanga.

The aim of this research was to obtain bioethanol from lignocellulosic wastes from potato (*Solanum tuberosum*) using commercial enzymes and ethanologenic *Escherichia coli*. For that, a lignocellulosic characterization of the raw material was made, where was found that for stalk the content of cellulose, hemicellulose and lignin was 35, 28 and 25 %, respectively and for the mix stalk-leaf the content of cellulose, hemicellulose and lignin was 20, 19 and 21%, respectively. An experimental design 2^3 was performed of the alkaline pretreatment for evaluate the effect of NaOH concentration (0.5 and 1% w/v), temperature (80 and 120°C), and time (60, 90 min) on lignin content reduction for stalk and the mix stalk-leaf. It was found that high level of NaOH concentration (1 % w/v) and time (90 min) in addition to low level of temperature (80 °C) reduce the lining content to 13% for stalk, and high level of NaOH (1%) and temperature (120°C) and low level of time (60 min) in the case of mix stalks-leaf reduce similarly the lignin content to 13%. For the enzymatic hydrolysis of hemicellulose and cellulose was used bagasse of stalk, although the lignin content was reduced at the same level that in the mix stalk- leaf, the first have better yield in dry weight with respect to second. In order to determine the best conditions of this stage, an experimental design 2^3 was made, the variables to evaluate were hemicellulase concentration (4 and 6 % w/v), cellulase concentration (4 and 6 % w/v) and temperature (40 and 50 °C) and the response variable was the reducing sugars concentration. The results show that the maximum glucose concentration (12 g/L), using a solid-liquid ratio of 1:15 (bagasse : buffer) and with 10 g (dry weight), was achieved with a temperature of 40 °C (low level), and that neither the hemicellulase nor the cellulase concentration show a significant effect over the hydrolysis. Finally, for the optimization of the sugars fermentation of the enzymatic hydrolyzed of the potato bagasse a Box-Behnken design with three central points was used, the factors and the levels were: pH (6, 6.5 and 7), inoculum concentration (5, 10 and 15 % v/v) and stirring rate (150, 200 and 250 rpm) and the response variable was the ethanol production efficiency (η_{EtOH}). The best conditions were a pH of 6.64, an inoculum concentration of 5 % and a stirrer speed of 150 rpm with a value of η_{EtOH} of 89.58 %. In conclusion, the potato bagasse is a good option for the bioethanol production, however is necessary more experiments for determine the best conditions of each process stage and evaluate their economic feasibility.

ÍNDICE

	Pág
RESUMEN	
ABSTRACT	
LISTA DE FIGURAS	iv
LISTA DE TABLAS	vi
NOMENCLATURA	viii
INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO 1 FUNDAMENTOS TEÓRICOS	3
1.1 Biocombustibles y su importancia de producción	4
1.2 Biomasa lignocelulósica y su importancia en la producción de Biocombustibles	5
1.3 Otros biocombustibles biotecnológicos	6
1.4 Importancia de los residuos agroindustriales	7
1.5 Composición del material lignocelulósico	8
1.6 Degradación de la celulosa	10
1.7 Pretratamientos de materiales lignocelulósicos	12
1.7.1 Métodos físicos	12
1.7.2 Métodos físico-químicos	12
1.7.3 Métodos químicos	13
1.7.4 Métodos biológicos	15
1.8 Hidrólisis de la hemicelulosa	16
1.9 Compuestos que inhiben la producción de etanol	17
1.9.1 Efectos de los compuestos tóxicos sobre los microorganismos fermentadores y el proceso	17
1.9.2 Métodos de detoxificación	19
1.9.2.1 Métodos biológicos	19
1.9.2.2 Métodos físicos y químicos	19
1.10 Fermentación	21

1.11 Microorganismos productores de etanol	22
1.12 Microorganismos etanogénicos genéticamente modificados	25
1.13 Antecedentes bibliográficos	26
CAPÍTULO 2 MATERIALES Y MÉTODOS	33
2.1 Materia prima	35
2.2 Microorganismo	35
2.3 Acondicionamiento del sustrato y caracterización fisicoquímica	35
2.4 Evaluación de los factores del pretratamiento alcalino	36
2.4.1 Determinación de la concentración de AR por el método del DNS o Método de Miller	37
2.4.2 Curva patrón de glucosa	38
2.4.3 Determinación de extraíbles de la fracción sólida de las muestras pretratadas para la determinación de lignina	39
2.5 Evaluación de las variables en la hidrólisis enzimática	41
2.6 Pretratamiento ácido-alcalino	42
2.7 Activación de la cepa <i>E. coli</i> etanogénica CCE14	43
2.8 Prueba preliminar en glucosa para verificar la actividad de <i>E. coli</i> CCE14	44
2.9 Fermentación de hidrolizado enzimático de bagazo de papa utilizando <i>Escherichia coli</i> CCE14	45
2.10 Optimización de las condiciones del proceso de fermentación	46
2.11 Cuantificación de bioetanol	47
CAPÍTULO 3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	49
3.1 Caracterización físico-química y lignocelulósica	50
3.2 Rendimiento en base al peso de la muestra antes y después del pretratamiento alcalino	51
3.3 Concentración de AR de la fracción líquida del pretratamiento alcalino	52

3.4 Determinación del contenido de Extraíbles para la determinación de lignina	53
3.5 Evaluación de los factores del pretratamiento alcalino	55
3.5.1 Análisis estadístico del pretratamiento alcalino	56
3.6 Evaluación de las variables en la hidrólisis enzimática	63
3.6.1 Análisis estadístico de la hidrólisis enzimática	64
3.7 Prueba preliminar en glucosa para verificar la actividad de <i>E. coli</i> CCE14	68
3.8 Mejoramiento de las condiciones de la fermentación con hidrolizado de bagazo de papa <i>S. tuberosum</i>	74
3.9 Cinética de fermentación con <i>E.coli</i> CCE14 en base a las mejores condiciones obtenidas en el diseño de experimentos Box-Behnken	78
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	80
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	85
ANEXOS	95

LISTA DE FIGURAS

Figura		Pág
1.1	Estructura de la lignocelulosa.	9
2.1	Proceso para la producción de bioetanol a partir de residuos lignocelulósicos de papa	34
2.2	Curva patrón de glucosa	39
2.3	Extracción con etanol-benceno en equipo Soxhlet	40
3.1	Efecto principal del tiempo y la interacción de la concentración de NaOH con el tiempo de pretratamiento del diseño 2^3 en Tallo	58
3.2	Residuales de experimentos de tallo sobre la reducción del contenido de lignina	59
3.3	Efecto principal del tiempo y la concentración de NaOH en el diseño 2^3 en tallo-hoja	60
3.4	Residuales de los experimentos de tallo-hoja	62
3.5	Efecto de la temperatura de hidrólisis enzimática	66
3.6	Residuales de los experimentos de la hidrólisis enzimática	67
3.7	Producción de etanol con 10 g/L de glucosa	68
3.8	Producción de etanol con 20 g/L de glucosa	68
3.9	Medida de crecimiento de <i>E. coli</i> CCE14 por medio de la absorbancia	71
3.10	Variación del pH durante la cinética de fermentación con <i>E. coli</i> CCE14 (a) 10 g/L de glucosa y (b) 20 g/L de glucosa	72
3.11	Cinética de fermentación de <i>E. Coli</i> CCE14 a 20 g/L de glucosa con 120 rpm	73
3.12	Superficies de respuesta estimada de cada factor para la máxima eficiencia de producción de etanol	76
3.13	Concentración de etanol de los experimentos del diseño Box-Behnken	77

3.14 Cinética de fermentación con *Escherichia coli* CCE14 utilizando las mejores condiciones de fermentación (pH, Ci y Va). 79

LISTA DE TABLAS

Tabla		Pág.
1.1	Contenido de celulosa, hemicelulosa y lignina de residuos agrícolas y desechos	10
1.2	Biocombustibles con rutas de producción microbianas	11
1.3	Solubilización de los componentes lignocelulósicos después de pretratamientos fisicoquímicos	13
1.4	Tipos de inhibidores y sus efectos sobre el proceso	18
1.5	Métodos físicos y químicos de detoxificación	19
1.6	Principales microorganismos productores de etanol con aplicación o potencialidad industrial	23
2.1	Diseño de experimentos 2^3 para evaluar las variables que afectan el pretratamiento alcalino	36
2.2	Preparación de la curva patrón de glucosa	38
2.3	Diseño de experimentos 2^3 para evaluar las variables que afectan la hidrólisis enzimática utilizando enzimas comerciales	41
2.4	Preparación del medio Luria LB (pH 7) por litro de agua destilada	44
2.5	Composición de medios para prueba preliminar de <i>E. coli</i> CCE14	44
2.6	Diseño Box-Behnken para la optimización de la producción de etanol a partir de azúcares fermentables de bagazo de papa <i>S. tuberosum</i>	47
3.1	Composición química de residuos de papa <i>S. tuberosum</i>	50
3.2	Caracterización lignocelulósica de tallos y tallo-hojas de papa <i>S. tuberosum</i>	51
3.3	Rendimientos en muestras de tallo en base a los pesos antes y después del pretratamiento alcalino	52
3.4	Determinación de la concentración de AR para la fracción líquida de las muestras pretratadas de acuerdo al diseño de experimentos empleado en el pretratamiento alcalino	53

3.5	Contenido de extraíbles de muestras con pretratamiento tomadas al azar para su posterior análisis de lignina	54
3.6	Determinación del contenido de lignina en Tallo (T) y Tallo-Hojas (TH)	55
3.7	ANOVA de tallo del diseño de experimentos 2^3 del pretratamiento alcalino en base al contenido de lignina	56
3.8	ANOVA de Tallo-hoja del diseño de experimentos 2^3 del pretratamiento alcalino en base al contenido de lignina	60
3.9	Experimentos de hidrólisis enzimática de bagazo de papa pretratado	63
3.10	ANOVA Hidrólisis enzimática para la producción de Azúcares Reductores	64
3.11	Resultados del diseño Box-Behnken para optimización de la fermentación con <i>E. coli</i> CCE14 en la producción de etanol con bagazo de papa <i>S. tuberosum</i>	74
A.1	Resultados de la cinética de fermentación del hidrolizado enzimático del bagazo de papa.	95

NOMENCLATURA

Ad _{zm}	Alcohol deshidrogenasa de <i>Zymomona mobilis</i>
AFEX	Explosión de fibra amoniaco
ART	Azúcares Reductores Totales
DCCO	Diseño Compuesto Central Ortogonal
DNS	Ácido 3,5-dinitrosalicílico
GatC	Glutamil-tRNA (Gln) amidotransferasa, subunidad C
HEFS	Licuefacción y sacarificación y fermentación simultánea
HMF	Furfural e hidroximetilfurfural
HPLC	Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia
HRP	Horseradish peroxidasa
LB	Luria Bertani
LiP	Lignin Peroxidasa
LMS	Sistemas Mediadores de Lacasas
MnP	Manganeso peroxidasa
MSR	Metodología de Superficie de Respuesta
PDA	Agar Papa Dextrosa
Pd _{zm}	Piruvato descarboxilasa de <i>Zymomona mobilis</i>
SSF	Sacarificación y Fermentación Simultánea
UA/mL	Unidades Amilolíticas por mililitro
UI/mL	Unidades Internacionales por mililitro
UPF/g	Unidades de Papel Filtro por gramo
VD	Variable Dependiente
VI	Variable Independiente
Yp/s	Rendimiento substrato/producto (g producto/g sustrato)
Yx/s	Rendimiento biomasa/substrato (g biomasa/g sustrato)

INTRODUCCIÓN

El etanol es un combustible limpio cuyo uso puede disminuir los efectos negativos del cambio climático ocasionado por la combustión de petróleo, carbón mineral y gas natural (Chang, 2007); se produce por fermentación de los azúcares obtenidos de caña de azúcar, maíz, remolacha y biomasa lignocelulósica. El etanol lignocelulósico, también llamado bioetanol de segunda generación, se obtiene mediante la consecución de las siguientes etapas: reducción de tamaño (si es necesario), pretratamiento, hidrólisis de celulosa y hemicelulosa para producir azúcares reductores (principalmente glucosa y xilosa), fermentación llevada a cabo por levaduras y bacterias con capacidad fermentativa, recuperación y purificación de bioetanol.

La producción de biocombustibles es una alternativa que se está investigando actualmente con la cual se busca reducir el uso de fuentes fósiles cuyas emisiones causan el efecto invernadero. La importancia de producir alcohol radica en que es una forma limpia de energía y más allá de esto que la producción de este metabolito provenga de fuentes renovables que permitan que esta tecnología sea autosostenible y en cierta manera inagotable.

Las fuentes de producción de etanol son tan vastas que van desde desechos sólidos municipales, residuos agrícolas, material desechado como papelería, maderas, entre otras, ninguna de estas materias primas tiene algún uso definido. Es por esta razón que esta investigación busca aprovechar en este caso residuos lignocelulósicos de bagazo de papa *S. tuberosum* para optimizar la producción de etanol y con esto solucionar no solo el problema de emisiones de gases a la atmósfera sino también tratar el manejo de desperdicios y residuos sólidos producidos por el hombre.

La justificación de este trabajo es aprovechar la gran cantidad de residuos lignocelulósicos de papa para la obtención de bioetanol, ya que sólo se usan como

abono para el suelo, y de esta manera contribuir a reducir los gases de efecto invernadero.

Para poder llevar a cabo la obtención de bioetanol a partir de residuos lignocelulósicos de papa *S. tuberosum* es necesario realizar un pretratamiento para solubilizar la lignina, aumentar la superficie de contacto de los poros y permitir el acceso a las enzimas, en esta investigación se planteó como objetivo específico evaluar las variables que afectan el tratamiento alcalino para reducir el contenido de lignina en el residuo lignocelulósico de bagazo de papa. Después del pretratamiento, donde la finalidad de este fue reducir el contenido de lignina, se procede a la etapa de la hidrólisis o sacarificación enzimática, donde se hidrolizan los azúcares de la celulosa y hemicelulosa por la acción sinérgica de las enzimas Celulasas y Hemicelulasas que hidrolizan azúcares de 5 y 6 carbonos principalmente xilosa y glucosa. En esta investigación para la etapa de la hidrólisis enzimática su objetivo consistió en evaluar las variables que afectan este proceso empleando enzimas comerciales para la obtención de azúcares reductores, con la finalidad de encontrar las mejores condiciones de operación para llevar a cabo la hidrólisis del bagazo de papa pretratado. Posteriormente se llevó a cabo la fermentación de los azúcares del hidrolizado optimizando las variables que afectan dicho proceso, en esta etapa se fermentó por medio de un microorganismo etanológico (*Escherichia coli* CCE14) la glucosa y xilosa presente en el hidrolizado, a fin de convertirla en bioetanol.

Es importante fomentar este tipo de investigaciones ya que crea una conciencia de conservación y de mejoramiento de la calidad de vida. También cabe recalcar que estas propuestas buscan fomentar y apoyar el uso de los residuos agrícolas.

CAPÍTULO 1
FUNDAMENTOS TEÓRICOS

CAPÍTULO 1 FUNDAMENTOS TEÓRICOS

1.1 Biocombustibles y su importancia de producción

Los biocombustibles no son los únicos combustibles biológicos renovables, el término bioenergía es más extenso y comprende a cualquier tipo de energía cuyo origen es biológico, incluyendo sólidos, gases y líquidos. Desde que la humanidad aprendió a controlar el fuego, haciendo uso de la bioenergía en forma de leña, la biomasa es el combustible que se ha utilizado por mayor tiempo para usos antropomórficos. La biomasa en general se obtiene por medio de la fotosíntesis, la cual fija energía solar y bióxido de carbono de la atmósfera (Martínez, 2009).

El alza mundial de precios de los alimentos está amenazando con precipitar más pobres bajo la línea de pobreza, esto probablemente se agravará por el desafío que la creciente población y el cambio climático están presentando a la seguridad alimentaria. Existe evidencia de que las actividades humanas que consumen combustibles fósiles y usan tierras están contribuyendo a las emisiones de gases de invernadero y al cambio climático global. La naturaleza agotable de las reservas de combustibles fósiles y el cambio climático están suscitando preocupaciones sobre la seguridad energética, generando interés en la utilización de energías renovables como los biocombustibles. Existen preocupaciones por la producción de biocombustibles a partir de cultivos alimenticios por la posible competencia con su utilización para alimento humano y animal. Pero los biocombustibles pueden ser producidos de otras materias primas como lignocelulosa de pastos perennes, forestales y desechos vegetales. El contenido energético de los biocombustibles no debe exceder la energía de los combustibles fósiles utilizados en su producción, para asegurar su sostenibilidad energética, competitividad económica y aceptación ambiental. El cambio climático y los biocombustibles están desafiando los esfuerzos de la FAO para erradicar la hambruna del mundo en la próxima década. Los cultivos utilizados actualmente en la producción de biocombustibles no han sido domesticados para este fin; la tecnología transgénica de plantas puede ofrecer una enorme contribución al mejoramiento

económico y ambiental de los cultivos para biocombustibles (Acosta y Chaparro-Giraldo, 2009).

1.2 Biomasa lignocelulósica y su importancia en la producción de biocombustibles

La producción de combustibles líquidos a partir de biomasa, como alternativa a los combustibles producidos a partir de petróleo, está actualmente creciendo con una enorme dinámica en muchas regiones del mundo. Esta dinámica tiene sobre todo dos razones: por un lado los precios del petróleo cada vez más altos, y por el otro lado la promoción de los biocombustibles motivada principalmente por razones políticas. Puesto que las fuentes fósiles de energía son limitadas, es inevitable sustituirlas tarde o temprano por fuentes renovables de energía. El alza de los precios de las fuentes fósiles impulsará este proceso. Entre las fuentes fósiles de energía, el petróleo se agotará más pronto, mientras que el gas natural y ante todo la hulla alcanzarán todavía para un tiempo bastante prolongado. Sin embargo, las fuentes fósiles de energía son las fuentes más importantes de generación de gases invernaderos, y en primer lugar el CO₂, por lo cual, desde la perspectiva del cambio climático, no es razonable seguir recurriendo a estas fuentes hasta su agotamiento (Hackenberg, 2008).

La importancia de la implementación de materia prima lignocelulósica se centra en el aprovechamiento de residuos considerados desecho agroindustriales como una alternativa viable que después de un proceso industrial se convierten en combustibles para el transporte o la producción de energía eléctrica. Muchos productos agrícolas pueden transformarse en energía, por ejemplo por combustión; los biocombustibles son el producto de procesos químicos industriales (fermentación y destilación) que transforman ciertas sustancias, como el almidón o el azúcar, en combustibles, como el alcohol. Pueden usarse solos o, más comúnmente, como aditivos de combustibles fósiles tradicionales, como la gasolina o el diesel. El porcentaje de mezcla no supera en general el 15% de biocombustibles, con 85% de combustibles fósiles, debido a la

acción corrosiva del alcohol que afecta a los motores tradicionales, aunque ya se fabrican motores que usan únicamente biocombustibles (Zaratti, 2008).

1.3 Otros biocombustibles biotecnológicos

Existe una gama importante de biocombustibles obtenidos a partir de materia prima lignocelulósica que a su vez requiere de apoyo en conjunto de diversos microorganismos que conviertan la biomasa en compuestos químicos que puedan usarse en la producción de biocombustibles.

El metanol y el hidrógeno producido a partir de biomasa son prometedores combustibles neutros de carbono, puede ser producido a partir de biomasa a través de la gasificación. El metanol se ha obtenido como intermediario de la degradación que realizan las bacterias metanotróficas que usan el metano como fuente de energía para producir CO₂. El metano es un biogás que se genera por la acción un grupo microbiano denominado bacterias metanogénicas debido a que obtienen su energía para crecer de la conversión de un limitado número de substratos a gas metano (Hamelinck y Faaij, 2002).

El alcohol etílico o etanol es un producto químico obtenido a partir de la fermentación de los azúcares que se encuentran en productos vegetales como: cereales, remolacha, caña de azúcar, sorgo o biomasa. Estos azúcares están combinados en forma de sacarosa, almidón, hemicelulosa y celulosa. En la fermentación de los azúcares contenidos en la materia orgánica de las plantas se obtiene un alcohol hidratado, con un contenido aproximado del 5% de agua, que tras ser deshidratado se puede utilizar como combustible y se denomina bioetanol.

El alcohol butílico es uno de los alcoholes primarios de cuatro carbonos que tienen la fórmula molecular C₄H₉OH. Es un líquido incoloro que produce vapores irritantes que tienen efecto sobre las mucosas y a altas concentraciones produce un efecto narcótico.

Debido a sus propiedades puede reemplazar directamente a la gasolina, o pueden servir como un aditivo del combustible (Valverde y Olalde, 2009).

Otro biocombustible de importancia es el biodiesel obtenido a través de aceites, consisten de triglicéridos, tres ácidos grasos son esterificados con una molécula de glicerol. A su vez los triglicéridos reaccionan con metanol en una reacción conocida como transesterificación o alcoholisis. La transesterificación produce metil ésteres de ácidos grasos a los que se les denominan diesel y glicerol (Chisti, 2007).

La industria de los biocombustibles está buscando procesos más eficientes que conduzcan a altas producciones, mínimos residuos y bajo costo.

1.4 Importancia de los residuos agroindustriales

La necesidad de diversificar las fuentes de energía a futuro, que además sean sustentables y amigables con el medio ambiente, plantea la necesidad de desarrollar microorganismos capaces de metabolizar una amplia variedad de azúcares y convertirlos eficientemente en productos de interés. En lo que se refiere a los combustibles, existen varias alternativas para obtenerlos mediante tecnologías renovables. Desde el punto de vista biotecnológico, una de las opciones con mayor viabilidad para sustituir o complementar a la gasolina es el etanol carburante (Ingram *et al.*, 1999). Este compuesto puede ser producido mediante tecnologías biológicas sustentables, originando un ciclo artificial del CO₂, y evitando su incremento neto en la atmósfera. Por otro lado, no es tóxico ni cancerígeno, es fácil de almacenar y transportar.

Una alternativa factible desde diferentes criterios de sustentabilidad (agrícola, de uso de suelo, generación de empleos, políticas públicas, sociales, económicos y de, tecnologías de transformación) para la producción de etanol carburante mediante procesos biológicos, es la utilización de residuos lignocelulósicos como los desechos agroindustriales. Estos residuos son abundantes, contaminan de cierta manera y tienen un uso marginal en el planeta. Los materiales lignocelulósicos constituyen

aproximadamente el 90% del peso seco de las plantas, y representan la fuente de energía más abundante en el planeta (Jarboe *et al.*, 2007). Un ejemplo es el bagazo de caña, el cual es generado en varios países de Latinoamérica y en algunos casos es un problema de contaminación. Este residuo contiene azúcares polimerizados en sus dos fracciones más abundantes: la hemicelulosa y la celulosa, las cuales representan del 30-40% y el 30-50%, respectivamente de su peso seco. Específicamente, la fracción de la hemicelulosa contiene, además de glucosa y manosa, 85% de pentosas, principalmente xilosa y un pequeño porcentaje de arabinosa (Martínez *et al.*, 2000 y 2001).

1.5 Composición del material lignocelulósico

La lignocelulosa (celulosa, hemicelulosa y lignina) es el principal y más abundante componente de la biomasa producida por la fotosíntesis, anualmente se forman 200,000 millones de toneladas en el mundo (Ragauskas *et al.*, 2006). La pared celular de las plantas está formada por lignocelulosa, la composición y porcentajes de los polímeros varían entre las especies de plantas, incluso. La lignocelulosa es el principal y más abundante componente de la biomasa producida por la fotosíntesis, anualmente se forman 200,000 millones de toneladas en el mundo (Ragauskas *et al.*, 2006). La pared celular de las plantas está formada por lignocelulosa, la composición y porcentajes de los polímeros varían entre las especies de plantas, incluso entre la edad y la etapa de crecimiento (Jeffries, 1994).

La celulosa es un polímero de D-glucosa unida por enlaces glucosídicos β -1,4 que se estructuran en largas cadenas lineales (microfibrillas) unidas por puentes de hidrógeno y fuerzas de van der Waals intramoleculares, formando una estructura cristalina resistente a la hidrólisis y regiones amorfas susceptibles a la degradación enzimática (Ovando y Waliszewski, 2005; Béguin y Aubert, 1994). La celulosa es sintetizada, en menores proporciones, por bacterias del género *Acetobacter* y los tunicados (Czaja *et al.*, 2007; Sasakura *et al.*, 2005). La hemicelulosa es un polímero complejo de heteropolisacáridos formado por pentosas (D-xilosa y L-arabinosa) y hexosas (D-

glucosa, D-manosa y D-galactosa) que forman cadenas ramificadas y los ácidos 4-O-metilglucurónico, D-galacturónico y D-glucurónico, los azúcares están unidos por enlaces β -1,4 y ocasionalmente por enlaces β -1,3 (Pérez *et al.*, 2002).

La lignina es un heteropolímero amorfo, tridimensional y ramificado formado por alcoholes aromáticos que da soporte estructural, rigidez, impermeabilidad y protección a los polisacáridos estructurales (celulosa y hemicelulosa) y es altamente resistente a la degradación química y biológica (Aro *et al.*, 2005) (Figura 1.1).

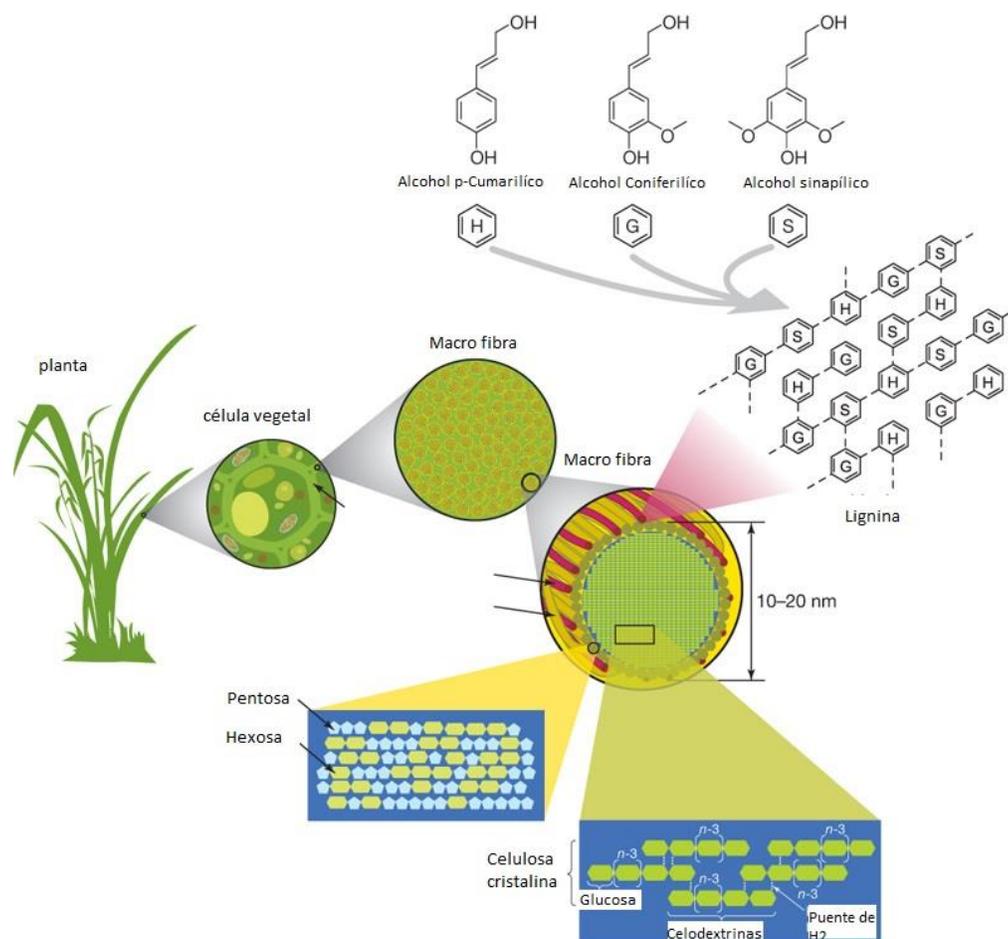


Figura 1.1 Estructura de la lignocelulosa. La celulosa, la hemicelulosa y la lignina forman estructuras llamadas microfibrillas, organizadas en macrofibras que regulan la estabilidad de la pared celular de las plantas (Rubin, 2008).

Existen dos tipos de sistemas enzimáticos extracelulares: los que producen hidrolasas que degradan la celulosa (celulasas) y la hemicelulosa (hemicelulasas) y los que despolimerizan la lignina por reacciones de oxidación (peroxidasas y lacasas) (Pérez *et al.*, 2002). En los residuos lignocelulósicos existe una variación en el contenido de celulosa, hemicelulosa y lignina como se muestra en la Tabla 1.1.

Tabla 1.1 Contenido de celulosa, hemicelulosa y lignina de residuos agrícolas y desechos

Material lignocelulósico	Celulosa (%)	Hemicelulosa (%)	Lignina (%)
Madera dura	40-55	24-40	18-25
Madera suave	45-50	25-35	25-35
Cáscara de nuez	25-30	25-30	30-40
Olote de maíz	45	35	15
Desechos de pastos	25-40	35-40	18-30
Papel	85-99	0	0-15
Paja de trigo	30	50	15
Hojas	15-20	80-85	0
Algodón	80-95	0	0
Papel periódico	40-55	25-40	18-30
Desechos de papel de pulpeos químicos	60-70	10-20	5-10
Desechos sólidos de aguas residuales	8-15	ND	24-29
Desechos de animales (cerdos)	6	28	ND
Desechos sólidos de ganado	1.6-4.7	1.4-3.3	2.7-5.7
Hierba Bermuda	25	35.7	64
Pastos de crecimiento rápido	45	31.4	12

Fuente: Sun y Chen, 2002

1.6 Degradación de la celulosa

Los microorganismos convierten la biomasa en compuestos químicos que pueden usarse en la producción de biocombustibles. Esta actividad ha sido explotada desde hace muchos años en la producción de metano, etanol y butanol, y más recientemente

se incrementó el interés en la producción de hidrógeno, biodiesel; entre otras alternativas (Tabla 1.2) (Valverde y Olalde, 2009).

Tabla 1.2 Biocombustibles con rutas de producción microbianas

Biocombustible	Proceso
Biometanol	Termoquímica/microbiano
Bioetanol	Microbiano
Biobutanol	Microbiano
Biometano	Microbiano
Biohidrógeno	Microbiano
Biodiesel	Físico/químico (enzimático)/microbiano
Bioelectroquímica	Físico/químico/microbiano

Fuente: Valverde y Olalde, 2009

Entre los microorganismos capaces de degradar lignina y celulosa, los hongos son los más importantes por su capacidad de secretar enzimas extracelulares, su adaptación a ambientes ácidos, y al estrés hídrico, su rápido crecimiento y estabilidad genética (Vargas- García *et al.*, 2010). Los hongos degradan la celulosa rompiendo los enlaces glicosídicos β 1-4, por medio de endoglucanasas que cortan la regiones internas amorfas de la celulosa y exoglucanasas que cortan los extremos libres (Sánchez, 2009).

Las especies de hongos celulolíticos más frecuentemente estudiadas pertenecen al género *Trichoderma* por ser los mejores productores de celulasas. Sin embargo otros géneros y especies de hongos tales como *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Neurospora crassa*, incluyendo además hongos comestibles como: *Lentinula edodes*, *Volvariella volvacea*, *Pleurotus sp.*, también producen celulasas. El hongo *Trichoderma reesei* (viride) es el mejor productor de celulasa extracelular, por lo que la mayoría de los estudios concernientes a la naturaleza, modo de acción y aspectos en general de las celulasas han sido realizados usando este microorganismo (Paredes, 2010).

1.7 Pretratamientos de materiales lignocelulósicos

Etapa indispensable para el procesamiento de biomasa lignocelulósica que complementa la hidrólisis enzimática y posibilita la obtención de altos rendimientos. Se hace necesario principalmente porque la lignina en las paredes celulares de la planta forma unas barreras contra el ataque enzimático. Un pretratamiento ideal es reducir el contenido de lignina, disminuir la cristalinidad de la celulosa e incrementar el área superficial. Existen diversos procesos para el pretratamiento de materiales lignocelulósicos como los que se describen a continuación (Sánchez *et al.*, 2010).

1.7.1 Métodos físicos

Fragmentación mecánica y pirolisis. El material lignocelulósico es fragmentado, triturado y molido (hasta 0.2–2 mm) para aumentar el área de contacto, facilitando el acceso de las celulasas a las fibras de celulosa y aumentando su conversión (Millet *et al.*, 1976; citado por Cuervo *et al.*, 2009). En la pirolisis la lignocelulosa se descompone en diferentes productos gaseosos y carbón residual cuando es tratada con temperaturas altas de hasta 300 °C (Kilzer y Broido, 1965; citado por Cuervo *et al.*, 2009). Aunque es un método eficiente para tratar el material lignocelulósico tiene un costo elevado en comparación con otros métodos (Cuervo *et al.*, 2009).

1.7.2 Métodos físico-químicos

Explosión por vapor. Es uno de los pretratamientos más efectivos para las maderas duras y desechos agrícolas, pero menos eficiente para maderas suaves (Clark y Mackie, 1987). La biomasa es tratada con vapor saturado a una temperatura de 160–260 °C (0.69–4.83 MPa) durante cierto tiempo causando reacciones de autohidrólisis, donde la hemicelulosa y lignina son convertidos en oligómeros solubles. La adición de H₂SO₄ mejora la posterior hidrólisis enzimática y disminuye la producción de compuestos inhibitorios. Los factores que afectan el proceso son el tiempo del tratamiento, la temperatura, el tamaño de partícula y el contenido de humedad (Duff y Murray, 1996). Las ventajas de este método son un requerimiento bajo de energía

comparado con los métodos físicos convencionales que requieren 70% más energía para alcanzar el mismo tamaño de reducción de las partículas (Holtzaple *et al.*, 1989). Las limitantes del proceso son la destrucción parcial del xilano y la separación incompleta de la lignina y los carbohidratos, así como la generación de compuestos inhibitorios para los microorganismos utilizados en procesos de fermentación (Mackie *et al.*, 1985).

Explosión de fibra de amoníaco (AFEX). Este pretratamiento mejora significativamente la tasa de sacarificación de diversos sustratos lignocelulósicos los cuales son tratados con amoníaco a alta temperatura y presión. Es eficiente para sustratos con poca lignina, logrando hasta el 90% de la hidrólisis de la celulosa y hemicelulosa (Holtzaple *et al.*, 1991) y no se producen inhibidores ni se requiere que el material lignocelulósico sea triturado. Para reducir los costos y proteger el ambiente, el amoníaco se recicla después del pretratamiento. El efecto de los métodos fisicoquímicos varía de acuerdo al material lignocelulósico, como se observa en la Tabla 1.3.

Tabla 1.3 Solubilización de los componentes lignocelulósicos después de pretratamientos fisicoquímicos

Proceso	Celulosa	Hemicelulosa	Lignina
Explosión de vapor	Despolimerización	80-100%	Poca o nula
Hidrólisis ácida	Despolimerización	Solubilización	Poca o nula
Solventes orgánicos		Solubilización	Solubilización
Termólisis	Poca	80-100%	
AFEX	Descristalización	0-60%	Solubilización
Hidrólisis alcalina	Relajamiento	>50%	Solubilización

Fuente: Lynd *et al.*, 2002

1.7.3 Métodos químicos

Ozonólisis. El ozono degrada la lignina y la hemicelulosa de sustratos como la paja de trigo y de algodón, el bagazo de caña y el aserrín de pino y álamo (Ben-Ghedalia y

Miron, 1981). Las reacciones ocurren a presión y temperatura ambiente, se remueve la lignina hasta en un 8% y el rendimiento aumenta en un 57%, no produce residuos tóxicos pero se requiere una gran cantidad de ozono lo que eleva los costos (Vidal y Molinier, 1988).

Hidrólisis ácida. Los ácidos como el H_2SO_4 y HCl concentrados son poderosos agentes que hidrolizan la celulosa, pero son tóxicos, corrosivos y peligrosos por lo que requieren reactores que resistan su corrosión. Se emplean altas temperaturas y ácidos diluidos que hidrolizan la hemicelulosa en azúcares solubles en agua, en los residuos queda la celulosa y la lignina, esta última se extrae con solventes orgánicos. El pretratamiento con ácidos mejora la hidrólisis de la celulosa, pero su costo es alto en comparación con otros pretratamientos y requiere una neutralización del pH para evitar la inhibición de la fermentación (Eggeman y Elander, 2005).

Hidrólisis alcalina. Es la adición de bases diluidas a la biomasa y su eficiencia depende del contenido de lignina de los materiales. El hidróxido de sodio diluido produce un hinchamiento, permitiendo un incremento en el área de superficie interna reduciendo el grado de polimerización y cristalinidad de la celulosa, causando la separación de las uniones estructurales entre la lignina y los carbohidratos. En las maderas duras hay un incremento en la digestibilidad y un descenso del contenido de lignina, en maderas suaves con lignina hasta en un 26% no se han obtenidos resultados eficientes; en general la utilización de bases permite la disolución de la lignina, pero sus costos son altos, haciendo estos métodos no competitivos a gran escala (Sun y Cheng, 2002).

Deslignificación oxidativa. 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).

Proceso organosolvente. Se utilizan solventes orgánicos como metanol, etanol y acetona así como también ácidos inorgánicos como catalizadores (H_2SO_4 o HCL) que rompen los enlaces de la lignina y la celulosa. La remoción de solventes del sistema es necesaria, ya que inhiben el crecimiento de los organismos, la hidrólisis enzimática y la fermentación (Zhao *et al.*, 2009).

1.7.4 Métodos biológicos

Los tratamientos biológicos son amigables con el ambiente e incrementan la accesibilidad al material celulósico favoreciendo una subsecuente hidrólisis y fermentación, sin embargo, es un proceso lento que limita su aplicación a nivel industrial (Hatakka, 1983). Las principales ventajas son el alto rendimiento del producto, las condiciones moderadas de la reacción, la poca generación de compuestos tóxicos y una mínima demanda de energía (Kirk y Jeffries, 1996). Algunas bacterias y hongos de podredumbre blanca y parda oxidan completamente la madera, por lo que tienen aplicaciones biotecnológicas en la conversión de la lignocelulosa a productos de valor industrial.

Zhang *et al.*, (2007), utilizaron *Coriolus versicolor* en el pretratamiento del bambú, observando una disminución en la cantidad de lignina y hemicelulosa y un aumento hasta del 37% en la tasa de sacarificación después del tratamiento. Schilling *et al.*, (2009), trataron restos de pino y abeto con hongos de podredumbre parda, *Gloeophyllum trabeum* y *Fomitopsis pinicola*, logrando un incremento en el proceso de sacarificación. Algunas bacterias celulolíticas utilizadas en pretratamientos biológicos son *Sphingomonas paucimobilis* y *Bacillus circulans* que incrementan la liberación de azúcares hasta en un 94% a partir de papel de oficina (Kurakake *et al.*, 2007).

El descubrimiento de enzimas con propiedades importantes resulta muy valioso, Quiroz-Castañeda *et al.*, (2009), reportaron la caracterización de la actividad celulolítica de los hongos *P. sanguineus* y *B. adusta* en paja de trigo, cuyas enzimas son capaces de tolerar condiciones elevadas de temperatura y funcionan en un amplio

rango de pH, lo que los hace potenciales candidatos para ser utilizados en procesos industriales que requieren la hidrólisis de la celulosa.

Una alternativa atractiva a la bioconversión es la sacarificación y fermentación simultánea (SSF), en donde las enzimas hidrolíticas y los microorganismos fermentativos están en un mismo reactor (Chandrakant y Bisaria, 1998). La SSF consolida la hidrólisis de la celulosa y la fermentación de los azúcares en un solo paso, sin embargo, la actividad de las celulasas puede ser inhibida por productos finales como la celobiosa y la glucosa. Entre los organismos usados en la sacarificación y fermentación simultánea están *S. cerevisiae*, diversas especies de *Kluyveromyces* y *Candida* (Van Markis *et al.*, 2006). El proceso de SSF tiene las siguientes ventajas: (1) aumenta la tasa de hidrólisis por conversión de los azúcares que inhiben la actividad de las celulasas; (2) disminuye los requerimientos de enzimas; (3) eleva el rendimiento del producto; (4) remueve inmediatamente la glucosa al producir el etanol; (5) duración corta del proceso y (6) utilización de un único reactor. En cuanto a las desventajas se encuentran la incompatibilidad entre la temperatura de hidrólisis y de fermentación, la tolerancia de los microorganismos al etanol así como la inhibición de las enzimas por el producto (Sun y Cheng, 2002).

1.8 Hidrólisis de la hemicelulosa

Existen varios métodos para llevar a cabo la hidrólisis de la fracción hemicelulósica, sin embargo uno de los más estudiados y usado, por su bajo costo y facilidad relativa de implementar, es el proceso termoquímico con ácido sulfúrico diluido. Este tratamiento puede realizarse en procesos lote, con temperaturas que varían de 120-160 °C, usando de 1 a 6% de ácido sulfúrico y tiempos de reacción de una a dos horas. En el caso de procesos continuos, se utilizan temperaturas de 160-240 °C, 1 a 2% de ácido sulfúrico y tiempos de reacción de hasta 15 minutos (Martínez, 2009).

Un método muy utilizado para separar la hemicelulosa de la celulosa es la hidrólisis ácida, donde la materia prima lignocelulósica es sometida a una solución ácida a

temperaturas medias. De este pretratamiento se obtiene una solución rica en xilosa y un residuo sólido que contiene celulosa y lignina. La celulosa podrá ser procesada para la obtención de etanol y la solución rica en xilosa puede ser utilizada para obtener xilosa pura o un derivado de la xilosa o puede ser fermentado a etanol usando microorganismos que fermentan azúcares de 4 o 5 átomos de carbono a etanol (Parajó *et al.*, 1998). Un desarrollo reciente e interesante de la hidrólisis de la hemicelulosa y pre-tratamiento de la celulosa es el proceso ácido carbónico. Este proceso emplea agua líquida comprimida caliente saturada con CO₂, como agente para promover la hidrólisis de la hemicelulosa y el rompimiento de la estructura lignocelulósica, para aumentar o mejorar la subsiguiente hidrólisis de la celulosa. Esta tecnología evita el uso de ácidos minerales y la producción de residuos asociados al proceso y recicla algo del CO₂ producido durante la fermentación (Viñals-Verde *et al.*, 2012).

1.9 Compuestos que inhiben la producción de etanol

Durante el proceso de hidrólisis ácida de esta fracción, se generan compuestos que inhiben el crecimiento de las bacterias y afectan drásticamente la producción de etanol. Entre estos compuestos se encuentran ácidos orgánicos (principalmente acético, fórmico y levulínico), furanos, a decir derivados de hexosas (hidroximetilfurfural) y pentosas (furfural). También están presentes diversos compuestos aromáticos generados de la descomposición de la lignina, como vainilla, hidroxibenzoaldehído, y siringaldehído, así como sus respectivos ácidos y alcoholes, y iones metálicos, estos últimos liberados como resultado de la corrosión del equipo y una amplia variedad de ácidos, aldehídos y alcoholes fenólicos que varían dependiendo del material lignocelulósico que se emplea y de las condiciones del proceso termoquímico (Martínez, 2009).

1.9.1 Efectos de los compuestos tóxicos sobre los microorganismos fermentadores y el proceso

En la Tabla 1.4, se presentan los efectos negativos de los compuestos tóxicos conforme a su clasificación.

Tabla 1.4 Tipos de inhibidores y sus efectos sobre el proceso

Clasificación	Efectos	Observaciones
Furfural e hidroximetilfurfural (HMF)	<ul style="list-style-type: none"> -Reducción de la tasa específica de crecimiento -Disminución de la productividad volumétrica y específica de etanol -Disminución de la producción de biomasa -Producen daños en la membrana plasmática celular -Inhiben la acción de enzimas 	<p>Los efectos producidos por el HMF son menores que el furfural, pero son los mismos. El furfural inhibe la alcohol deshidrogenasa, induciendo la formación de acetaldehído.</p> <p>En anaerobiosis el furfural se degrada a alcohol furfúrico y furoico. (Oliva, 2003).</p>
Ácidos alifáticos	<ul style="list-style-type: none"> -Descenso del rendimiento en etanol -Disminución de la producción de biomasa -Reducción de la tasa específica de crecimiento -Muerte celular 	<p>El mecanismo de inhibición de estos es aún confuso. Existen teorías tales como: Del acoplamiento acumulación intracelular de aniones (Oliva, 2003).</p>
Compuestos fenólicos	<ul style="list-style-type: none"> -Daño en la membrana plasmática celular -Descenso del rendimiento en etanol -Disminución de la producción de biomasa -Reducción de la tasa específica de crecimiento -Muerte celular 	<p>Son los más tóxicos para los microorganismos. Su efecto inhibitorio es aún desconocido; al parecer afecta la célula alterando su especificidad. Se cree que actúan de manera similar que los alifáticos (Oliva, 2003).</p>
Combinación de varios compuestos tóxicos	<ul style="list-style-type: none"> -Furfural y ácido acético -Descenso de la tasa de crecimiento -Disminución del rendimiento de biomasa -Descenso del rendimiento en etanol -Furfural, ácido acético y derivados de lignina -Descenso del rendimiento en etanol -Descenso de la tasa de crecimiento -Disminución del rendimiento de biomasa 	<p>Estos efectos se conocen como “efecto sinérgico”, ya que el efecto combinado de estos compuestos en conjunto es más alto que el ocasionado por cada uno de manera individual (Mussatto y Roberto, 2004).</p>

Fuente: Sánchez *et al.*, 2010

1.9.2 Métodos de detoxificación

Son variadas las opciones de detoxificación que se han aplicado con éxito o no en distintos tipos de biomasa. Las mismas están clasificadas según el tipo de sustancias y acciones que las constituyen, por lo cual varios autores las agrupan en físicas, químicas y biológicas.

1.9.2.1 Métodos biológicos. Involucran el uso de enzimas y microorganismos específicos que actúan sobre los compuestos tóxicos cambiando su composición (Mussato y Roberto, 2004). Para el caso de la detoxificación con enzimas se encuentran principalmente el uso de peroxidases y lacasas. Las primeras, transforman primordialmente fenoles y aminas aromáticas; estas son de gran efectividad e incluyen enzimas tales como horseradish peroxidase (HRP), lignin peroxidase (LiP), manganese peroxidase (MnP), entre otras; y son producidas por distintos microorganismos en especial de tipo fúngico. En cuanto a las Lacasas, son conocidas bajo el término Sistemas Mediadores de Lacasas (LMS), ya que reúne un complejo enzimático conformado por distintas enzimas (Hamid y Rehman, 2009; citado por Sánchez *et al.*, 2010)

1.9.2.2 Métodos físicos y químicos. En la Tabla 1.5, se describen cada uno de estos métodos de detoxificación, algunos aun no probados en hidrolizados para producción de etanol, pero que pueden considerarse como alternativas de uso y ensayo en esta etapa.

Tabla 1.5 Métodos físicos y químicos de detoxificación

Método	Descripción	Componentes que degrada	Microorganismo que favorece
Tratamientos con hidróxidos	Emplea hidróxidos de cualquier tipo. Forma precipitados con sales de calcio, los cuales son retirados antes de la fermentación. El pH de trabajo es igual a 10.	Furfural, HMF, ácido acético. En baja proporción los azúcares fermentables.	<i>E. coli</i> , <i>Z. mobilis</i> , <i>P. stipitis</i> , <i>S. cerevisiae</i> .

Fuente: Sánchez *et al.*, 2010

Tabla 1.5 Métodos físicos y químicos de detoxificación (continuación)

Método	Descripción	Componentes que degrada	Microorganismo que favorece
Overliming	Ca(OH) ₂ , pH = 9–10,5, luego el pH es ajustado a 5,5–6,5 con H ₂ SO ₄ o HCl.	Ácido acético, furfural y compuestos fenólicos.	<i>S. cerevisiae</i> y <i>E. coli</i> recombinante.
Evaporación	Debe realizarse a pH bajo. Es poco efectivo.	Furfural, ácido acético y ácido fórmico. No elimina HMF, ácido levulinico y compuestos fenólicos.	<i>S. cerevisiae</i> ; <i>P.stipitis</i>
Carbón activo	Su efectividad depende el tipo de material a tratar.	Algunos compuestos orgánicos e iones de metales.	<i>S. cerevisiae</i> .
Carbón vegetal	Obtenido a partir de madera de abeto a 600 °C.	Furfural, HMF y derivados fenólicos.	<i>S. cerevisiae</i>
Resinas de intercambio iónico	Se emplean tanto catiónicas como aniónicas (mejores a pH 10). Tienen alto costo.	Principalmente fenoles, seguido de furanos y ácidos alifáticos. Afectan los azúcares.	<i>Z. mobilis</i> , recombinante y <i>S. cerevisiae</i> .
Lignina Residual	La lignina actúa como absorbente en una extracción en fase solida por sus propiedades hidrofóbicas.		
Utilización de zeolitas	Son minerales naturales o sintéticos, de estructura tridimensional. Poseen alto intercambio iónico, notable superficie específica y lugares activos que permiten actividad catalítica.	Metales tóxicos: cromo, cobalto y níquel.	
Oxidación avanzada	Se basa en la generación de radicales hidroxilo. Reacción de Fenton. Emplean: O ₃ , O ₃ /H ₂ O ₂ y H ₂ O ₂ /UV (en ausencia y presencia de catalizadores TiO ₂ o ZnO).	Todo tipo de compuestos Orgánicos (en especial el método con radicales libres OH)	
Extracción	Solventes Orgánicos (dietil éter, etil acetato, 3:1 Fase orgánica: Tasa fase acuosa volumétrica	Ácido acético, furfural, vanillina, ácido hidroxibenzoico y compuestos fenólicos de bajo peso molecular. Remoción de furanos.	<i>S. cerevisiae</i> ; <i>P. stipitis</i>

Fuente: Sánchez *et al.*, 2010

1.10 Fermentación

La fermentación alcohólica es una bioreacción que permite degradar azúcares en alcohol y dióxido de carbono. La conversión se representa mediante la ecuación (1.1):



Las principales responsables de esta transformación son las levaduras. La *Saccharomyces cerevisiae*, es la especie de levadura usada con más frecuencia. Por supuesto que existen estudios para producir alcohol con otros hongos y bacterias, como *Zymomonas mobilis*, pero la explotación a nivel industrial es mínima (Vázquez y Dacosta, 2007).

A pesar de parecer, a nivel estequiométrico, una transformación simple, la secuencia de transformaciones para degradar la glucosa hasta dos moléculas de alcohol y dos moléculas de bióxido de carbono es un proceso muy complejo, pues al mismo tiempo la levadura utiliza la glucosa y nutrientes adicionales para reproducirse. Para evaluar esta transformación, se usa el rendimiento biomasa/producto y el rendimiento producto/ substrato (Vázquez y Dacosta, 2007).

Rendimiento biomasa/substrato (Y_x/s): es la cantidad de levadura producida por cantidad de substrato consumido. Rendimiento substrato/producto (Y_p/s): es la cantidad de producto sintetizado por cantidad de substrato consumido (Vázquez y Dacosta, 2007).

El rendimiento teórico estequiométrico para la transformación de glucosa en etanol es de 0.511 g de etanol y 0.489 g de CO_2 por 1 g de glucosa. Este valor fue cuantificado por Gay Lussac. En la realidad es difícil lograr este rendimiento, porque la levadura utiliza la glucosa para la producción de otros metabolitos. El rendimiento experimental varía entre 90% y 95% del teórico, es decir, de 0.469 a 0.485 g/g. Los rendimientos en la industria varían entre 87 y 93% del rendimiento teórico (Boudarel, 1984; citado por Vázquez y Dacosta, 2007). Otro parámetro importante es la productividad (g/h/L), la

cual se define como la cantidad de etanol producido por unidad de tiempo y de volumen.

1.11 Microorganismos productores de etanol

Una gran cantidad de microorganismos se reportan en la literatura para la producción de etanol a escala de laboratorio, pero muy pocos de estos tienen aplicación actualmente a nivel industrial. Cepas silvestres de diferentes microorganismos, por sus características bioquímicas, asimilan diferentes compuestos transformándolos en etanol, pero sus bajos rendimientos, su difícil propagación, la generación de subproductos, el estrecho abanico de sustratos asimilables, su baja tolerancia a distintas sustancias y condiciones, entre otras características, hacen que sólo unas pocas tengan actual y exitosa aplicación a escala piloto o industrial. En la Tabla 1.6 se resumen algunos de los microorganismos utilizados para la producción de etanol a partir de diversos sustratos. La levadura *Saccharomyces cerevisiae*, es el organismo universal para la producción de bioetanol usando materias primas ricas en azúcar y almidón, razón por la cual esta levadura constituye uno de los más importantes microorganismos para el campo de la biotecnología (Kopsahelis *et al.*, (2009); citado por Mariscal, 2011).

Zymomonas mobilis, aunque no es usada comercialmente en la actualidad, esta bacteria facultativa gram negativa es considerada el organismo más efectivo para la producción de etanol, debido a que sus características bioquímicas la hacen un organismo obligadamente fermentativo. Por esta razón, esta bacteria produce etanol a mayores tasas y mucho más rápidamente que la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Esta bacteria degrada sólo tres azúcares: D-glucosa, D-fructosa y sacarosa (Drapcho *et al.*, (2008); citado por Mariscal, 2011). Desafortunadamente, los microorganismos que producen etanol de forma natural, como *Saccharomyces cerevisiae* y *Zymomonas mobilis* no metabolizan azúcares de cinco carbonos, por lo que no es posible utilizarlos en la producción de etanol a partir de xilosa o arabinosa.

Tabla 1.6 Principales microorganismos productores de etanol con aplicación o potencialidad industrial

Microorganismo	Sustratos fermentables	Condiciones de fermentación
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Glucosa	Anaeróbico 30 - 37°C
	Fructosa	
	Sacarosa	
	Maltosa	
	Maltotriosa	
	Galactosa	
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	Manosa	Anaeróbico 30 - 35°C
	Glucosa	
	Fructosa	
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	Maltosa	Anaeróbico 40 - 45°C
	Sacarosa	
<i>Candida shehatae</i>	Glucosa	Microaerofílico 20 - 31°C
	Xilosa	
<i>Pichia stipitis</i>	Glucosa	Microaerofílico 26 - 35°C
	Xilosa	
<i>Pachisolen tannophilus</i>	Glucosa	Microaerofílico
	Xilosa	
	Glicerol	
<i>Zymomonas mobilis</i>	Glucosa	Anaeróbico 30°C
	Fructosa	
<i>Clostridium thermocellum</i>	Sacarosa	Anaeróbico 55 - 65°C
	Glucosa	
<i>Thermoanaerobacter thermosaccharolyticum</i>	Celulosa	Anaeróbico 60°C
	Glucosa	
	Xilosa	

Fuente: Mariscal, 2011

En contraste bacterias como *Escherichia coli*, que se utilizan a nivel industrial para obtener muchos productos que los humanos consumimos actualmente, es capaz de metabolizar las hexosas (como glucosa, manosa, fructosa, entre otras), las pentosas (xilosa, arabinosa, ribosa, entre otras), así como mezclas de éstas, presentes en los

residuos agroindustriales. No obstante, produce etanol en bajas cantidades. Actualmente, gracias a las herramientas de la biotecnología moderna, es posible modificar, modular y diseñar vías metabólicas en una amplia variedad de microorganismos (Martínez, 2009)

Particularmente mediante la ingeniería de vías metabólicas, la cual se define como la modificación y/o introducción de nuevas reacciones bioquímicas para el mejoramiento directo de propiedades celulares mediante tecnología de ADN recombinante, es posible obtener microorganismos etanologénicos capaces de metabolizar diversos azúcares que naturalmente no metabolizaban, o bien convertir microorganismos no productores en productores de etanol (Aristidou y Penttilä, 2000).

En años relativamente recientes se han generado cepas de *Z. mobilis* y de *S. cerevisiae* capaces de utilizar xilosa. En el caso de *Z. mobilis*, se han integrado en cromosoma cuatro genes de *E. coli* involucrados en la isomerización y fosforilación de la xilosa, así como en su incorporación a la vía de las pentosas. Dicha estrategia dio como resultado una bacteria capaz de transportar y metabolizar xilosa en etanol, con rendimientos relativamente altos. Sin embargo, la velocidad de síntesis de etanol es al menos 10 veces menor comparada con la mostrada a partir de glucosa (Zhang *et al.*, (1995); citado por Martínez, 2009). Adicionalmente, se han desarrollado bacterias de *Z. mobilis* que fermentan arabinosa. Por otro lado, las cepas modificadas de *S. cerevisiae* producen etanol a partir de xilosa con velocidades y rendimientos de conversión bajos, además de requerir glucosa y aireación (Aristidou y Penttilä, 2000). También se han construido varias cepas etanologénicas de *E. coli*, cuyos esfuerzos han estado dirigidos a la obtención de cepas altamente eficientes en la producción de etanol a partir de residuos lignocelulósicos (Martínez, 2009).

El hongo *Aspergillus niger* produce diversos compuestos de gran interés para las industrias farmacéutica y de alimentos (enzimas, ácidos orgánicos), y es el principal productor de ácido cítrico a nivel industrial por cultivo líquido. Se ha observado que se obtiene un alto rendimiento de ácido cítrico cuando existe una alta acumulación de

éste en el micelio, que puede estar asociada con una alta concentración de glucosa y de oxígeno disuelto en el medio líquido. Sin embargo, no es posible conocer aún todos los factores ambientales y fisiológicos que originan esta acumulación, ni saber cómo estos determinan la morfología del micelio, la cual podría, en principio, usarse como un indicador del nivel de producción del ácido, al realizar mediciones del diámetro promedio de las madejas formadas por las hifas en el medio líquido, que se cree corresponden a un medio con altas concentraciones de glucosa, O₂ y ácido cítrico, antes de que la difusión de sustrato y O₂ sea deficiente cuando la madeja alcance un tamaño crítico (Reyes-Ocampo *et al.*, 2013)

1.12 Microorganismos etanológicos genéticamente modificados

Una alternativa tecnológica viable para la producción de etanol se basa en el uso y aplicación de cepas genéticamente modificadas que mejoren su ruta metabólica y obtengan mejores resultados que las cepas silvestres debido a que para una producción de etanol más eficiente y con menos costo es necesario que la levadura tradicional fermente los azúcares de cuatro y cinco carbonos a etanol o existan otros microorganismos que lo realicen. Para que la producción de etanol a partir de materias primas lignocelulósicas pueda convertirse en fermentación viable, el microorganismo empleado durante la fermentación debe ser capaz tanto fermentar la celulosa (6 Carbonos) y azúcares de la hemicelulosa derivados (5 Carbonos). La levadura *Saccharomyces cerevisiae* se utiliza en la industria del etanol para la producción a gran escala de etanol a partir de melaza y cultivos de almidón. Estas levaduras industriales son capaces de fermentar efectivamente azúcares de (6 Carbonos) glucosa y fructosa y pueden tolerar altas concentraciones de etanol (hasta 17% en volumen) en el caldo de fermentación. Esta levadura no es capaz de fermentar azúcares de (5 Carbonos) (xilosa), derivados de la hemicelulosa. Las investigaciones se han centrado en la modificación genética de las levaduras como *Saccharomyces* combinándola con las bacterias modificadas genéticamente incluyendo recombinantes como la *Zymomonas mobilis* (proceso NREL) y *E. coli* K011 (proceso BCI). Otras opciones son el uso de

Clostridia, que son capaces de fermentar azúcares de 5 carbonos, aunque a tasas relativamente bajas, o el uso de origen natural *Pichia ssp*, que son capaces de fermentar xilosa (Reith *et al.*, 2001).

Otros estudios reportaron la obtención de una bacteria genéticamente modificada de *Escherichia coli* modificada con genes de *Zymomonas mobilis* para producir la cepa KO11, para la fermentación de siropes derivados de las hemicelulosas compuestos por los azúcares hexosas y pentosas presentes en los polímeros de hemicelulosas. También se modificó genéticamente la *Klebsiela oxytoca* MA1 para obtener la cepa P2 y producir etanol de celulosa. Este organismo también tiene la capacidad de fermentar la celobiosa y la celotriosa, y elimina la necesidad de la enzima celulasa a pH 5,0 - 5,5. En la actualidad, se estudia el desarrollo de sistemas enzimáticos que eliminen la necesidad de la hidrólisis ácido diluido u otro pretratamiento lo que debe traer mejoría en la velocidad de producción de etanol, disminución del costo de nutrientes, aumento de la concentración de etanol y debe resultar en una disminución en el costo de producción de etanol (Moniruzzaman *et al.*, 1997).

1.13 Antecedentes bibliográficos

La ventaja del etanol con respecto a los combustibles fósiles es que se obtiene de fuentes renovables y representa una oportunidad importante para el desarrollo agrícola. La desventaja más obvia es que su producción puede competir por el uso de recursos alimenticios (aunque no necesariamente ya que se puede utilizar biomasa lignocelulósica de residuos agrícolas), además de su menor densidad calorífica comparado con la gasolina (63% de su contraparte fósil). Por esta razón una de las líneas de investigación más relevantes se encuentra en la búsqueda y modificación de materias primas para inferir lo menos posible en la producción de alimentos y utilizar de forma más eficiente la energía del proceso.

Cardona *et al.*, (2013), pretrataron pasto elefante y pasto King, empleando un diseño de experimentos 2⁴ en relación sólido-líquido (p/p) 1:15 y 1:20, 80 y 120°C, 30 y 180

min, concentración de NaOH 1% y 2% (p/p), el residuo pretratado se hidrolizó con la enzima Accellerase 1500 de genecor, empleando una carga de enzima de 30 FPU/g de biomasa, carga de sólidos de 11% (p/v), 50°C, pH 4.8 y 180 rpm. Bajo estas condiciones el rendimiento de azúcares reductores para pasto elefante fue de 563.3 mg de azúcares reductores/g de biomasa seca y en pasto King obtuvieron 504 mg de azúcares reductores/g de biomasa seca.

Muñoz-Gutiérrez y Martínez (2013), estudiaron la hidrólisis de polisacáridos con *Escherichia coli* de ingeniería para la producción de biocombustibles. Dentro su investigación mencionan que *Escherichia coli* puede fermentar una amplia gama de azúcares, incluyendo las pentosas, hexosas, ácidos urónicos y polioles. Estas características hacen de *Escherichia coli* un microorganismo adecuado para el desarrollo de biocatalizadores para ser utilizados en la producción de biocombustibles. *Escherichia coli* no puede fermentar directamente polisacáridos, ya que no producen y secretan enzimas sacarolíticas necesarias, sin embargo hay muchas herramientas genéticas que se pueden utilizar para conferir esta capacidad a esta cepa. La construcción de cepas de *Escherichia coli* sacarolíticas reducirá los costos y simplificará el proceso de producción debido a que la sacarificación y la fermentación puede llevarse a cabo en un único reactor con una concentración reducida o ausencia de enzimas sacarolíticas externas adicionales.

Muñoz Gutiérrez *et al.*, (2012), realizaron un estudio sobre la visualización de la superficie celular de la β -glucosidasa que emplea el sistema de secreción de tipo V en *Escherichia coli* etanologénica para la fermentación de la celulosa en etanol. Determinaron que la cepa MS04 es ventajosa para la producción de etanol a partir de hidrolizados de hemicelulosa que contienen acetato y que permite la fermentación de celobiosa en etanol sin la adición de β -glucosidasas externas.

Torres y Molina, (2012), emplearon bagazo de caña de azúcar pretratado con una mezcla de hidróxido de sodio e hidróxido de calcio al 2% p/v, usando relación sólido-liquido 1:10 a 121°C por 90 min. El bagazo pretratado se hidrolizó usando la enzima

comercial Celluclast Novozyme 188 empleando un diseño de experimentos 2^3 con concentración de sustrato de (8 y 12 %), concentración de enzima de (3 y 8 FPU/g), tamaño de partícula de (1.41 a 3.36 mm y 0.71 a 1.0 mm, 50°C), pH 4.8 por 52h. Obtuvieron un rendimiento de 70.2% de glucosa y 83.6% de azúcares reductores a una concentración de 8 FPU/g, concentración de bagazo de 8 g/L y tamaño de partícula de 1.41 a 3.36 mm y determinaron que a 20 PFU/g se aumenta el rendimiento de glucosa a 91.7 %.

Utrilla *et al.*, (2012), estudiaron la Ingeniería y la evolución adaptativa de *Escherichia coli* para la fermentación D-lactato, esta investigación revela GatC como transportador de xilosa. Así mismo, diseñaron una cepa eficiente de *E. coli* capaz de producir D-lactato a partir de xilosa, dedujeron que el transporte de xilosa es la etapa limitante en el metabolismo fermentativo, xilosa es transportada por GatC y por GatCS184L en JU15. El transportador que recientemente descubrieron se puede utilizar para diseñar cepas para la conversión de materias primas lignocelulósicas en productos químicos valiosos.

Castaño-Pelaez *et al.*, (2011), estudiaron la producción de etanol a partir de harina de yuca en un sistema de hidrólisis enzimática y fermentación simultánea. Desarrollaron esta investigación centrándose en el estudio del proceso de producción de etanol a partir de harina de yuca integrando las etapas de hidrólisis enzimática (licuefacción y sacarificación) y fermentación simultánea (HEFS), mediante el uso del complejo enzimático Stargen TM 001. El diseño experimental que utilizaron fue una Superficie de Respuesta de un diseño Central Compuesto de dos factores a dos niveles (48 – 80 ° C y 400 - 600 rpm) en la etapas de prelicuado, ajustaron la temperatura a 37 °C manteniendo las otras condiciones de proceso en la integración de los etapas. La experimentación la desarrollaron con una concentración de sólidos de la harina de yuca de 28% p/v, pH de 5.3, inóculo de 0.75 g/L de la levadura *Ethanol Red®* y una carga enzimática de 4 mL/L. Determinaron que la temperatura es la variable de mayor efecto sobre la producción de etanol si se compará con la agitación; aunque, ambos factores presentan significancia estadística sobre la variable de respuesta. A 64 °C y

500 rpm se alcanza una concentración de etanol de 14.6% v/v y una productividad de 2.5 g/Lh (48 h de proceso).

González-Rentería *et al.*, (2011), realizaron un estudio de la optimización del proceso de hidrólisis enzimática de una mezcla de pajas de frijol de cuatro variedades (pinto villa, pinto saltillo, pinto mestizo y flor de mayo), analizaron pajas pretratadas y las sometieron a hidrólisis enzimática durante 10 días a 45°C y pH 4.5, utilizaron una carga enzimática de 25 UPF/g de celulosa, de un concentrado enzimático comercial (Celluclast 1.5 L). Para determinar los azúcares producidos emplearon el método de Miller y los valores que obtuvieron los utilizaron para calcular el rendimiento de hidrólisis. Las condiciones óptimas de pretratamiento e hidrólisis las obtuvieron utilizando el método de superficie de respuesta, los resultados que obtuvieron muestran que la mezcla de pajas de frijol está compuesta por 31% de celulosa, 23% de hemicelulosa y 9% de lignina, así mismo que el pretratamiento afecta significativamente el rendimiento de hidrólisis y que la sacarificación máxima (98.95±8.38 %) se obtuvo para un pretratamiento con 0.5% de NaOH durante 90 minutos a 121°C, con un tiempo de hidrólisis de 240 h a pH 4.5 y 45°C, utilizando una carga enzimática de 25 UPF/g de celulosa.

Montañez *et al.*, (2011), estudiaron la fermentación de los fructanos del Agave tequilana Weber Azul por *Zymomonas mobilis* y *Saccharomyces cerevisiae* en la producción de bioetanol. Extrajeron los fructanos contenidos en las bases de las hojas del agave y las utilizaron como fuente de carbono a varias concentraciones para la producción de bioetanol. Emplearon dos microorganismos etanolgénicos: la levadura *Sacharomyces cerevisiae* CDBB-L-331 y la bacteria *Zymomona mobilis* CDBB-B-603. Los resultados que obtuvieron muestran que la bacteria *Zymomona mobilis* es capaz de crecer a mayores concentraciones de ART (Azúcares Reductores Totales), produce mayor cantidad de etanol y tolera mayores concentraciones del mismo. Determinaron que el rendimiento en la producción, la eficiencia de conversión y la productividad volumétrica también fueron mayores cuando la fermentación la llevaron a cabo con *Zymomona mobilis* a una concentración de 20% de ART.

Orencio-Trejo *et al.*, (2008), realizaron un análisis de la regulación metabólica de una cepa de *Escherichia coli* etanológica basada en RT-PCR y actividades enzimáticas. *Escherichia coli* etanológica CCE14 derivada del linaje C en comparación con cepas anteriores de ingeniería como KO11, tiene una mayor tasa de producción de etanol en medio mineral, como resultado de la expresión heteróloga las cuales tienen los genes integrados de Pdc_{zm} y Adh_{zm} (Piruvato descarboxilasa y Alcohol deshidrogenasa de *Zymomonas mobilis*). *Escherichia coli* CCE14 en comparación con cepas de KO11 tiene un rendimiento de etanol 90% del teórico en los medios de glucosa mineral en comparación con cepas de *Escherichia coli* de ingeniería tales como *Escherichia coli* KO11 que produce un rendimiento de etanol del 70% teórico en las mismas condiciones.

Chen *et al.*, (2007), utilizaron como sustrato olote de maíz pretratado con H_2SO_4 al 1% con una relación sólido-liquido 1:6 a 108°C por 3h. El material celulósico obtenido lo hidrolizaron usando la combinación de las enzimas Celulasa de *T. reesei* ZU-02 y celobiosa de *A. niger* ZU-07. La hidrólisis en Bach la realizaron en matraces de 250 mL con un volumen de trabajo de 100 mL, pH 4.8, 50°C, 160 rpm por 48 h, obteniendo un rendimiento de hidrólisis del 67.5% con ZU-02 y del 83.9% con ZU-07, en Fed-bach (lote alimentado) con carga de sólido de 100 g/L y una concentración de enzima de 20 FPU/g de sustrato (ZU-02) y 6.5 CBU/g de sustrato (ZU-07) pH 4.8, 50°C, 3L de trabajo y 60 h se obtuvo un rendimiento de hidrólisis del 79.5%.

Kafarov *et al.*, (2006), realizaron un diseño de producción conjunta biodisel-bioetanol en donde evaluaron una nueva tecnología de producción conjunta de biodisel (200 000 L/día) y bioetanol (300 000 L/día) a partir de recursos completamente renovables como el aceite de palma africana y la caña de azúcar. Estos dos procesos los efectuaron de manera conjunta aprovechando los residuos como el bagazo de caña y residuos de palma en la cogeneración de energía. Utilizaron HYSIS®3.1 para simular el proceso y obtener información sobre los requerimientos energéticos y las dimensiones de los equipos necesarios para lograr la producción deseada.

Tabka *et al.*, (2006), estudiaron las mejores condiciones de utilización de enzimas lignocelulolíticas de hongos para la conversión de biomasa lignocelulósica en azúcares fermentables para la producción de bioetanol, utilizando como sustrato paja de trigo. Esta fue pretratada con ácido sulfúrico diluido seguido de explosión de vapor. Varios tratamientos enzimáticos de ejecución hidrolasas (celulasas y xilanasas de *Trichoderma reesei*, feruloil esterasa recombinante (FAE) de *Aspergillus niger* y oxidorreductasas (lacasas de *Pycnoporus cinnabarinus*) fueron investigados para la sacarificación de la paja de trigo. Un efecto sinérgico entre celulasas, FAE y xilanasas fue probada bajo una concentración enzimática crítica (10 U/g de celulasas, 3 U/g de xilanasas y 10 U/g de FAE). Encontraron que el rendimiento de la hidrólisis enzimática se mejora al aumentar la temperatura desde 37°C a 50°C y adición de un agente tensioactivo no iónico, Tween 20. La optimización de hidrólisis enzimáticas permitió el uso de menores cantidades de enzimas y la mejora de la rentabilidad del proceso.

Huerta-Beristain *et al.*, (2005), realizaron un estudio de ingeniería metabólica para incrementar el flux y rendimiento de etanol en *Escherichia coli* etanologénica. Estudiaron el efecto de sobreexpresar genes del metabolismo de carbono sobre la velocidad específica (flux) de formación de etanol, en la cepa de *Escherichia coli* etanologénica KO11, la cual tiene integrado en el cromosoma los genes que codifican para las enzimas piruvato decarboxilasa (Pdc_{zm}) y la alcohol deshidrogenasa (Adh_{zm}) de *Zymomonas mobilis*. Los resultados que obtuvieron muestran que en la cepa KO11, el control de flux de carbono está parcialmente fuera de la glucólisis y existe una actividad limitada de Pdc para canalizar el flux de glucosa o xilosa hacia la formación de etanol. Incrementando la actividad de Pdc_{zm} lograron aumentar el rendimiento de conversión de glucosa o xilosa en etanol en 27%. Determinaron que durante la fase estacionaria, el flux de formación de etanol aumentó 42 y 44% y el de formación de ácidos orgánicos disminuyó 46 y 76% para glucosa y xilosa, respectivamente, al incrementar la actividad intracelular de Pdc (6.1 veces) en KO11. Por otro lado, probablemente como una respuesta a efectos de regulación alostérica y de actividad limitada de Pdc, los incrementos en la actividad enzimática de fosfofructonasa o de

piruvatocinasa redujeron drásticamente el flux de consumo de glucosa o xilosa y de formación de etanol, incrementando el de formación de ácidos orgánicos.

Kaar y Holzapple (2000) obtuvieron azúcares fermentables a partir de rastrojo de maíz mediante hidrólisis enzimática. El pretratamiento se realizó con cal (hidróxido de calcio) con lo cual se aumentó la hidrólisis enzimática de rastrojo de maíz nueve veces en comparación con el rastrojo de maíz sin pretratar. Las condiciones de pretratamiento fueron: cal 0.075 g de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ / (g biomasa seca); carga de agua 5 g H_2O / (g biomasa seca); y calentamiento durante 4 horas a 120 °C. La hidrólisis enzimática se llevó a cabo con las enzimas Beta glucosidasa (Novozyme 188, Novo Nordisk Biochem, Inc., Franklinton, NC) y Celulasa (Spezyme-CP, Biotecnologías Environmental, Inc., Menlo Park, CA) de *Trichoderma reesei*, el volumen de trabajo fue de 150 mL, con carga de sustrato de 50 g/Biomasa*L, pH 4.8, 50°C, 100 rpm con un tiempo de hidrólisis de 72 h. Los mejores resultados fueron con una carga de enzima de 10 FPU/g biomasa seca, 40°C por 72 h. A una carga de 25 FPU/g biomasa seca por 7 días se produjo una conversión de 88% glucano, 87.7% xilano y 92.1% de arabinano.

CAPÍTULO 2
MATERIALES Y MÉTODOS

CAPÍTULO 2 MATERIALES Y MÉTODOS

En la Figura 2.1 se muestra el diagrama de proceso que incluye las etapas empleadas para la producción de bioetanol y los microorganismos utilizados, así como los diseños de experimentos a emplear.

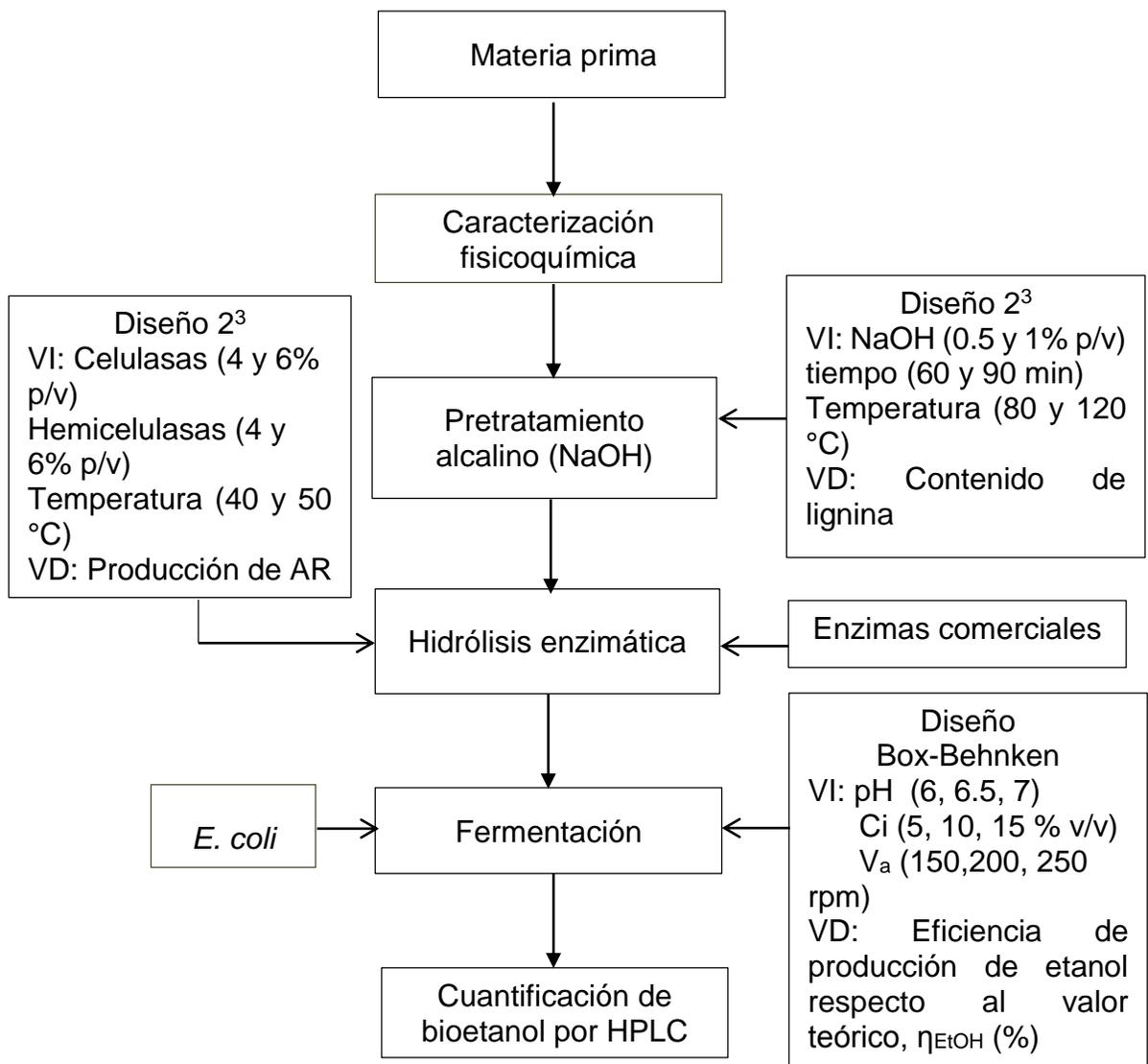


Figura 2.1 Proceso para la producción de bioetanol a partir de residuos lignocelulósicos de papa.

2.1 Materia prima

La papa (*Solanum tuberosum*) es un tubérculo del cual los residuos lignocelulósicos no son aprovechado, pero los cuales pueden emplearse en la producción de etanol. Los desechos del procesamiento agroindustrial de la papa fueron donados por productores agrícolas de la comunidad de Xometla perteneciente al municipio de la Perla (en el Estado de Veracruz de Ignacio de la Llave) y trasladados a las instalaciones del Instituto Tecnológico de Orizaba, específicamente al laboratorio de plantas piloto.

2.2 Microorganismo

Escherichia coli CCE14 deriva del linaje de *Escherichia coli* C, interesantemente la cepa CCE14 posee calcio y valores de actividad PDC_{Zm} y ADH_{Zm} cinco veces mayores a *E. coli* KO11. Las transcripciones de piruvato descarboxilasa y alcohol deshidrogenasa incrementan la velocidad específica de producción de etanol y velocidad de consumo de glucosa (flujo glucolítico) a su vez se incrementa la actividad enzimática. Por otra parte, el flujo glucolítico es controlado por reacciones fuera de la glucólisis.

Esta cepa se obtuvo integrando en cromosoma el operón *pet*, el cual contiene los genes *PDC* y *ADH* de *Z. mobilis* bajo el control de la región de regulación de la piruvato formato-liasa (Orencio-Trejo, 2008). El operón *pet* fue integrado por recombinación homóloga doble reestableciendo la actividad del complejo de Pfl. Con esta cepa se obtienen rendimientos de etanol cercanos al teórico (mayores al 90%) metabolizando glucosa, manosa, xilosa, arabinosa, o mezclas de estos azúcares en medios ricos.

2.3 Acondicionamiento del sustrato y caracterización fisicoquímica

Los residuos (cascara, tallo y hojas) fueron deshidratados en una estufa de secado a 60 °C por 24 h. Posteriormente se redujeron de tamaño en un molino manual para grano hasta obtener un tamaño de malla 20 (tamices marca ASTM) y se retuviera en

la malla 40 (0.841 mm), esto como acondicionamiento previo a los análisis físicos químicos (González-Rentería *et al.*, 2011). La harina que se obtuvo se conservó a temperatura ambiente en bolsas de plástico cerradas herméticamente. Se caracterizó siguiendo la metodología de la AOAC (1990), determinando su composición química por duplicado (humedad, materia seca, cenizas). La cuantificación de celulosa, lignina se realizaron bajo la norma TAPPI T203 05-74 y T 222 om-83, respectivamente; la cuantificación de hemicelulosa se realizó por el método de Browning, (1967).

2.4 Evaluación de los factores del pretratamiento alcalino

En esta etapa se mezclaron 10 g de tallo de los residuos lignocelulósicos de la papa con 100 mL de NaOH en matraces Erlenmeyer de 250 mL, así mismo se realizaron experimentos con 10 g de mezcla de tallo-hoja (5 g de tallo y 5 g de hoja), todos los experimentos se llevaron a cabo de acuerdo al diseño experimental 2³ representado en la Tabla 2.1.

Tabla 2.1 Diseño de experimentos 2³ para evaluar las variables que afectan el pretratamiento alcalino

Experimento	Variables codificadas			Variables naturales		
	NaOH (% p/v)	T (°C)	t (min)	NaOH (% p/v)	T (°C)	t (min)
1	-1	-1	-1	0.5	80	60
2	1	-1	-1	1	80	60
3	-1	1	-1	0.5	120	60
4	1	1	-1	1	120	60
5	-1	-1	1	0.5	80	90
6	1	-1	1	1	80	90
7	-1	1	1	0.5	120	90
8	1	1	1	1	120	90

El pretratamiento alcalino se llevó a cabo en una autoclave para los experimentos de 120 °C y 1.1 kg/cm² de presión manométrica, y en baño María para los experimentos de 80 °C debido a que a esta temperatura no se puede manejar en autoclave ya que son menores a 1.033 kg/cm² de presión.

Una vez completado el tiempo de pretratamiento se dejaron enfriar las muestras hasta temperatura ambiente, para luego filtrarlas con tela de lino, embudo buchner, matraz kitasato y bomba de vacío, se midió el volumen del licor negro filtrado y se guardó en el refrigerador en recipientes de plástico cerrados herméticamente. Posteriormente se midió el contenido de Azúcares Reductores (AR) por el método del ácido 3, 5 dinitro salicílico (DNS). La parte sólida que queda del filtrado se lavó con agua destilada hasta pH neutro, se pesó en húmedo y se secó a 70°C durante 24 h en una estufa. Una vez secas las muestras pretratadas se pesaron y se guardaron en bolsas de plástico cerradas herméticamente hasta su posterior uso para la determinación de lignina, por la norma TAPPI, 1978 (Technical Association of the Pulp and Paper Industry).

El diseño 2³ planteado, considera como variables independientes: Concentración de NaOH (0.5 y 1.0 %), tiempo de pretratamiento (60 y 90 min) y temperatura (80 y 120 °C), teniendo como variable de respuesta el contenido de lignina en cada muestra pretratada. Este diseño permitió establecer los factores que afectan significativamente el pretratamiento alcalino y sus mejores rangos de operación.

2.4.1 Determinación de la concentración de AR por el método del DNS o método de Miller

La concentración de AR se determinó utilizando el método de Miller *et al.*, (1959). Se llevó a cabo la preparación del reactivo DNS: se disolvió 1 g de ácido 3, 5 dinitro salicílico (DNS) y 30 g de tartrato de sodio y potasio (KNaC₄H₄O₆.4H₂O) en 16 mL de NaOH al 10% p/p en 50 mL de agua destilada, se llevó a baño María para disolverlo y se aforó a 100 mL en un matraz volumétrico. Se realizaron diluciones con una muestra patrón de glucosa de 1 g/L, para lo cual se disolvió 0.1 g de glucosa en 90 mL de agua destilada, y se aforó a 100 mL. A partir de la solución patrón de glucosa y agua

destilada se prepararon 10 tubos con diferentes concentraciones como se muestra en la Tabla 2.2.

Tabla 2.2 Preparación de la curva patrón de glucosa

Tubo	Concentración de glucosa (mg/L)	Volumen de solución de glucosa (mL)	Volumen de Agua destilada (mL)
*0	0	0.0	1.0
1	100	0.1	0.9
2	200	0.2	0.8
3	300	0.3	0.7
4	400	0.4	0.6
5	500	0.5	0.5
6	600	0.6	0.4
7	700	0.7	0.3
8	800	0.8	0.2
9	900	0.9	0.1
10	1000	1.0	0.0

*El tubo cero corresponde al blanco de la muestra

La determinación se realizó por cuadruplicado. A cada uno de los tubos, se le adicionó 1 mL de DNS, agitando, y poniendo en un baño María por 15 min, posteriormente los tubos se dejaron enfriar en oscuridad y se agregaron 8 mL de agua destilada. Se midió la absorbancia de cada tubo a 540 nm en un espectrofotómetro Thermo Spectronic GENESIYS 20, utilizando como blanco 1 mL de agua con el reactivo DNS.

2.4.2 Curva patrón de glucosa

Se obtuvo una curva patrón de glucosa (Figura 2.2) con un modelo lineal (Ecuación 2.1) y un coeficiente de ajuste, R^2 , del 99.9%, lo que indica que el modelo tiene una alta capacidad explicativa de la recta y los resultados de la concentración de AR calculados a partir de este modelo son confiables.

$$y = 0.0011x - 0.0624 \quad (2.1)$$

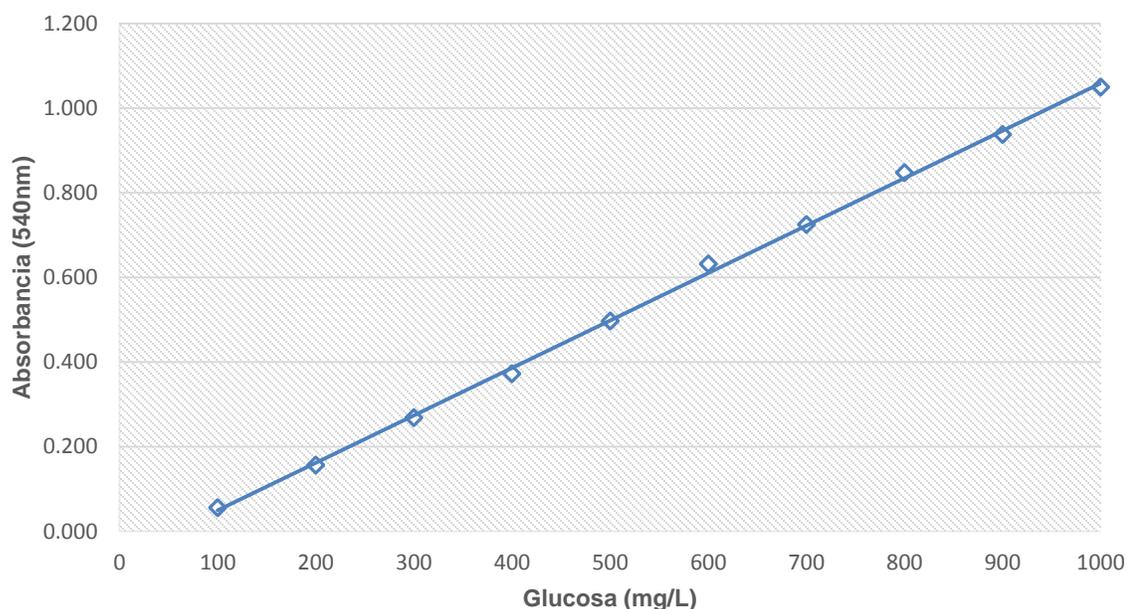


Figura 2.2 Curva patrón de glucosa

2.4.3 Determinación de extraíbles de la fracción sólida de las muestras pretratadas para la determinación de lignina

Los extraíbles son materiales solubles en agua y solventes orgánicos y generalmente representan una pequeña fracción de la planta, pero no por ello dejan de ser de gran importancia en las características y propiedades de la misma. Con la mezcla etanol-benceno se extraen resinas, ceras, grasas, clorofilas, carotenoides, algunas proporciones de gomas y taninos condensados. Esta extracción elimina todo el material hidrofóbico de la madera. La mezcla elegida de alcohol y benceno coincide casi perfectamente con el azeótropo que forman estos dos solventes, es decir que durante todo el tiempo de la extracción la composición de los vapores y por ende de la mezcla de extracción es constante. Es también una ventaja si se quiere recuperar el solvente. Para llevar a cabo la preparación del material libre de extraíbles se utilizó la técnica TAPPI 264 om 88 (1978).

Se pesaron 5 g base seca de muestra de bagazo pretratado y se depositaron en el dedal de extracción (cartucho de celulosa) anteriormente llevado a peso constante, se registró el peso del mismo y se colocó en el interior del equipo Soxhlet. La extracción

se realizó con 300 mL de solvente en relación 1:2 v/v de la mezcla etanol-benceno, durante cuatro horas, manteniendo el líquido en ebullición, para que así el sifoneo del extracto no se presentara menos de cuatro veces por hora (Figura 2.3). El equipo de extracción se colocó dentro de una campana de extracción por el uso de los solventes utilizados.

Terminado el tiempo de extracción y con ayuda de pinzas de bisección se retiró el dedal del interior del equipo, posteriormente se colocó en un vaso de precipitados de 100 mL, dejándose en campana hasta eliminarse los compuestos volátiles de la mezcla, el secado se realizó a 40°C durante 24 h hasta llegar a peso constante.



Figura 2.3 Extracción con etanol-benceno en equipo Soxhlet

Para calcular el porcentaje de Extraíbles se utilizó la Ecuación 2.2

$$\% \text{ Extraíbles} = \frac{P_{\text{mae}} - P_{\text{mde}}}{P_{\text{mae}}} \times 100 \quad (2.2)$$

donde: P_{mae} es el peso de la muestra antes de la extracción (g) y P_{mde} es el peso de la muestra después de la extracción (g).

Los rendimientos de sólido se calcularon con base a la Ecuación 2.3

$$\% \text{ Rendimiento de sólidos} = \frac{\text{Peso de la muestra en base seca después del pretratamiento}}{\text{Peso inicial de la muestra seca sin pretratar}} \times 100 \quad (2.3)$$

2.5 Evaluación de las variables en la hidrólisis enzimática

Se realizó un diseño de experimento 2^3 donde las variables independientes fueron: Concentración de enzimas Hemicelulasas (4 y 6 %), Concentración de enzimas Celulasas (4 y 6%) y temperatura (40 y 50°C), teniendo como variable de respuesta la producción de azúcares reductores.

La Tabla 2.3 contiene el diseño de experimentos 2^3 con las variables naturales y codificadas a evaluar. Para el proceso de hidrólisis enzimática se emplearán hemicelulasas HTec3 y celulasas CTec3 de NOVOZYME.

Tabla 2.3. Diseño de experimentos 2^3 para evaluar las variables que afectan la hidrólisis enzimática utilizando enzimas comerciales

Experimento	Variables codificadas			Variables naturales		
	Hemicelulasas (%)	Celulasas (%)	T (°C)	Hemicelulasas (%)	Celulasas (%)	T (°C)
1	-1	-1	-1	4	4	40
2	1	-1	-1	6	4	40
3	-1	1	-1	4	6	40
4	1	1	-1	6	6	40
5	-1	-1	1	4	4	50
6	1	-1	1	6	4	50
7	-1	1	1	4	6	50
8	1	1	1	6	6	50

Se utilizó una relación sólido-líquido 1:15 (p/v) de material con pretratamiento alcalino (sustrato en base seca), buffer acetato de sodio 0.05 M neutralizado con ácido acético glacial concentrado a pH 4.8, posteriormente se le adicionaron las enzimas en concentraciones de 4 o 6% (p/v) con respecto al diseño de experimentos, se incubaron a 150 rpm, una vez alcanzadas las temperaturas de hidrólisis (40 o 50 °C de acuerdo al diseño de experimentos), en ese momento se comienza a contar el tiempo de reacción.

Se realizó una cinética de hidrólisis enzimática de 72 h, se tomaron muestras de la mezcla de reacción a distintos tiempos (0, 24, 48 y 72 h), una vez extraída la muestra debe detenerse la reacción enzimática y para ello se desnaturaliza la enzima mediante la inmersión del tubo de ensayo, que la contiene, en agua en ebullición durante 5 min. Las muestras se centrifugan por 10 min a 10,000 rpm, separando el sobrenadante de la parte sólida y se almacenan en congelación para su posterior determinación de azúcares reductores por HPLC. Transcurrido el tiempo total de hidrólisis se separaron el residuo y el hidrolizado mediante filtración. Cuando se trabaja con el tamaño de partícula más pequeño se presentan problemas en la filtración y por ello en estos casos la separación sólido-líquido se hace por centrifugación (3.000 rpm, 15 min) en tubos de 50 mL. El residuo sólido presente en el filtro se lavó para recoger todo el hidrolizado que pudo quedar retenido.

2.6 Pretratamiento ácido-alcalino

Debido a que la concentración de glucosa obtenida en la hidrólisis enzimática fue baja (12 g/L) se decidió realizar un tratamiento ácido-alcalino empleando las condiciones óptimas encontradas por Partida (2015), con el fin de eliminar la hemicelulosa, lignina y compuestos inhibidores como el hidroximetil furfural, quedando de esta manera sólo celulosa que posteriormente se llevó a hidrólisis enzimática bajo las mejores condiciones de operación obtenidas en la etapa de hidrólisis enzimática de la sección 2.5 (6% p/p Celulasas y 40 °C).

El pretratamiento ácido del bagazo crudo se llevó a cabo en una autoclave a presión de 15 psi, 121 °C, concentración de H₂SO₄ 1.5 %v/v, RSL 1:5 (1 g de bagazo en base seca:5 mL de H₂SO₄ 1.5 % v/v) con tiempo de pretratamiento de 35 min. Posterior al tiempo de pretratamiento, el bagazo pretratado se dejó enfriar 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. El hidrolizado ácido se filtró para cuantificar mediante cromatografía líquida de alta resolución los azúcares: xilosa, glucosa y arabinosa, así como los inhibidores: ácido acético, furfural y 5 hidroximetilfurfural derivados de la descomposición de pentosas y hexosas. Finalmente el bagazo de papa prehidrolizado se sometió a secado por radiación solar para eliminar totalmente el contenido de humedad.

Para la etapa de oxidación alcalina con peróxido de hidrógeno se llevó a cabo bajo las siguientes condiciones: concentración de peróxido de hidrógeno 4 %v/v, 25 °C, tiempo de pretratamiento del agente oxidante con el bagazo de papa 40 h y una relación sólido-líquido 1:17 (1 g de bagazo de papa en base seca:17 mL de peróxido de hidrógeno 4 %v/v) el ajuste de la solución de peróxido de hidrógeno se llevó a pH 11.5 empleando una solución de hidróxido de sodio a una concentración 10 M. El hidrolizado alcalino se filtró y el bagazo de papa se lavó con la misma relación sólido-líquido con la que se pretrato, finalmente el bagazo se sometió a secado por radiación solar para eliminar totalmente el contenido de humedad y proceder a la etapa de hidrólisis enzimática.

2.7 Activación de la cepa *E. coli* etanológica CCE14

La cepa se activó en caldo Luria (ver Tabla 2.4) conteniendo cloranfenicol a una concentración de 50 µg/mL, se incubó a 37 °C, 300 rpm por 12 h, la cepa reactivada se resembró en medio sólido (adicionando al caldo luria que contiene 50 µg/mL de cloranfenicol 20 g/L de agar) por estriado en un campo y por agotamiento con el fin de obtener cepas puras incubándose a 37 °C por 6 h, para su posterior uso en la etapa de fermentación.

Tabla 2.4 Preparación del medio Luria LB (pH 7) por litro de agua destilada

Componente	Cantidad (g)
Peptona	10
Extracto de levadura	5
NaCl	10

Con el fin de alargar la vida útil de la cepa, se preparó un medio de mantenimiento conteniendo 1 mL del medio de activación de la cepa, adicionándolo en un criovial con glicerol al 80% congelándolo inmediatamente a -70°C con hielo seco.

2.8 Prueba preliminar en glucosa para verificar la actividad de *E. coli* CCE14

Para la prueba de glucosa a etanol con *E. coli* CCE14 se preparó un medio de fermentación como se muestra en la Tabla 2.5. Adicionando cloranfenicol a una concentración de 50 $\mu\text{g/mL}$.

Tabla 2.5 Composición de medios para prueba preliminar de *E. coli* CCE14

Medio sintético A		Medio sintético B	
Composición	(g/L)	Composición	(g/L)
Caldo luria	20	Caldo luria	20
Glucosa	20	Glucosa	10

Se realizó una cinética de fermentación de 24 h tomando muestras sucesivas cada hora, evaluándoles a cada una de ellas: pH y absorbancia a 600 nm, las muestras se centrifugaron por 10 min a 10 000 rpm, posteriormente se congelaron para su posterior análisis. Terminada la cinética las muestras se descongelaron, se filtraron y se colocaron en viales para las determinaciones en HPLC. Los resultados se reportaron en g/L de etanol obtenidos.

2.9 Fermentación de hidrolizado enzimático de bagazo de papa utilizando *Escherichia coli* CCE14.

Microorganismo empleado

Se utilizó la bacteria etanologénica *Escherichia coli* CCE14 donada por el Dr. Alfredo Martínez del Instituto de Biotecnología (Universidad Autónoma de México). Para el crecimiento y mantenimiento de la cepa se realizó lo siguiente:

Generación de bancos celulares.

De la caja petri con crecimiento de la cepa *E. coli* CCE14 se transfirieron 3 colonias aisladas a un matraz con medio estéril de LB (10 g/L de peptona de caseína, 5 g/L de extracto de levadura y 5 g/L de NaCl) y glucosa (20 g/L), adicionando cloranfenicol (50 µg/mL) el pH se ajustó a 7 con KOH 2M. Se incubaron a 37 °C, 250 rpm de 8-12 h hasta obtener un DO₆₀₀ de 1.3. De esta suspensión se tomaron muestras de 1 mL y se mezclaron con 1 mL de glicerol estéril al 40 % (v/v) en microviales de 2 mL, se mezcló en vortex y se congelaron inmediatamente.

Activación.

A partir de las células congeladas en glicerol (40 %) se realizó la activación en medio LB con glucosa (20 g/L) y pH 7, una vez esterilizado (15 psi, 15 min) se adicionó cloranfenicol (50 µg/mL), incubándose a 37 °C, 300 rpm por 24 h, posteriormente se crecieron en placas de agar (15 g/L) con LB con glucosa (20 g/L) y cloranfenicol (50 µg/mL) y se resembraron de manera sucesiva por dos días para tener colonias frescas y viables.

Preparación del medio M9.

El medio M9 está compuesto por 6 g/L de Na₂HPO₄, 1 g/L de NH₄Cl, 0.5 g/L de NaCl, 2 mL de MgSO₄·7H₂O 1M, 0.1 mL de CaCl₂, 0.1 mL de Tiamina (1 mg/mL), 40 g/L de glucosa o xilosa como fuente de carbono y cloranfenicol (50 µg/mL) (Huerta-Beristain, 2004). Se esterilizaron por autoclave por separado las sales de fosfato y el sulfato y la fuente de carbono (glucosa o xilosa), a 15 psi por 15 min, una vez esterilizados se

adicionaron las sales restantes esterilizándolas por filtración, el volumen de trabajo se ajustó con agua destilada estéril, el pH se ajustó a 7 (Hernández- Bustos 2003).

Inoculo.

Con ayuda de un asa de platino se tomaron 3 colonias aisladas y se adicionaron en el medio M9. Se incubaron a 37 °C, 250 rpm, hasta llegar a una D.O₆₀₀ de 1.3 (Huerta-Beristain, 2004).

Fermentación

A partir del inoculo con una DO₆₀₀ de 1.3, se realizó la inoculación a cada matraz con glucosa de medio hidrolizado y medio básico M9 (en base al diseño Box-Behnken, sección 2.10), el volumen de trabajo de cada matraz fue de 150 mL, temperatura de incubación 37 °C, el tiempo de fermentación fue de 24 h.

2.10 Optimización de las condiciones del proceso de fermentación con *E. coli* CCE14

Una vez establecido el tiempo adecuado de fermentación, se realizó una cinética de fermentación de 50 horas, muestreando a los tiempos 0, 12, 24, 36 y 50 h. Se realizó un diseño Box-Behnken como se muestra en la Tabla 2.6, donde se analizaron las variables independientes: pH (6, 6.5 y 7), concentración de inoculo (Ci) (5, 10 y 15 % v/v) y velocidad de agitación (150, 200 y 250 rpm), manteniendo la temperatura a 37 °C. La variable de respuesta fue la eficiencia de producción de etanol sobre el valor teórico, η_{EtOH} (Ecuación 2.4).

$$\eta_{\text{EtOH}} = \frac{(Y_{\text{EtOH/Glucosa}})_{\text{obtenido}}}{0.51} \times 100 \quad (2.4)$$

Donde η_{EtOH} es la eficiencia de producción de etanol sobre el valor teórico (%) y $(Y_{\text{EtOH/Glucosa}})_{\text{obtenido}}$ es el rendimiento producto sustrato ($\text{g}_{\text{EtOH}}/\text{g}_{\text{glucosa}}$)

Tabla 2.6. Diseño Box-Behnken para la optimización de la producción de etanol a partir de azúcares fermentables de bagazo de papa *S. tuberosum*.

Experimento	Variables codificadas			Variables naturales		
	pH	Ci (%v/v)	rpm	pH	Ci (%v/v)	rpm
1	-1	-1	0	6	5	200
2	1	-1	0	7	5	200
3	-1	1	0	6	15	200
4	1	1	0	7	15	200
5	-1	0	-1	6	10	150
6	1	0	-1	7	10	150
7	-1	0	1	6	10	250
8	1	0	1	7	10	250
9	0	-1	-1	6.5	5	150
10	0	1	-1	6.5	15	150
11	0	-1	1	6.5	5	250
12	0	1	1	6.5	15	250
13	0	0	0	6.5	10	200
14	0	0	0	6.5	10	200
15	0	0	0	6.5	10	200

2.11 Cuantificación de bioetanol

La concentración de etanol, se cuantificó por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Este equipo contiene una columna para la separación específica de azúcares, ácidos orgánicos y alcoholes con las siguientes propiedades: columna Shodex SH-1011. La fase móvil empleada es H₂SO₄ 5 mM. El detector utilizado es de índice de refracción. Las condiciones son: 0.6 mL/min, 50°C. A su vez el volumen de inyección será de 10 µL. El software que se utiliza es el Empower, calculando el área del pico y la concentración de la muestra mediante una correlación con estándares previamente realizados.

Para ello las muestras fueron centrifugadas a 10,000 rpm por 10 min para precipitar la biomasa, fibra y micelio, posteriormente se les realizó un tratamiento de detoxificación de la siguiente manera: 0.8 mL de muestra + 0.1 mL BaO 0.3 M + 0.1 mL ZnSO₄ 5%. Se dejó reposar por 10 min y se centrifugó a 10,000 rpm, 10 min en el equipo marca Eppendorf AG Centrifuge 5424. Posteriormente, se separó el sobrenadante y se filtró cada una de las muestras colocándose en los viales para su análisis mediante HPLC.

CAPÍTULO 3
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

CAPÍTULO 3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Caracterización físico-química y lignocelulósica

En la Tabla 3.1 se muestran los resultados experimentales de la caracterización físico-química de los residuos de papa *S. tuberosum*, los análisis se realizaron por duplicado de acuerdo a la AOAC 1990 (964.22 para Humedad, 942.05 Materia seca y 962.09 Cenizas).

Tabla 3.1 Composición química de residuos de papa *S. tuberosum*

Muestra	Humedad (%)	Materia seca (%)	Cenizas (%)
Cáscara	80.5	19.4	6.15
Tallos	85.6	14.4	8.93
Hojas	79.8	20.1	9.2

La cáscara y las hojas de papa contienen aproximadamente 80 % de humedad, 20 % de materia seca y 6-9 % de cenizas. Así mismo se encontró que los tallos contienen 85.6 % de humedad, 14.4 % de materia seca y 9.2 % de cenizas. Como se puede observar el alto contenido de humedad afecta económicamente el proceso de secado debido al consumo de energía eléctrica empleada por los equipos. El porcentaje de materia seca indica la cantidad de material disponible para realizar las diversas etapas para la obtención de bioetanol el cual en estos residuos es aproximadamente del 20%. En contraste con lo obtenido por Bellido-Diez, (2013), quien reportó que la paja de trigo contiene 6.5 % de humedad y 7.0 % de cenizas y lo obtenido por Ruiz (2004) quien determinó que los tallos de girasol contienen 11.1 % de humedad y 6.6 % de cenizas, a raíz de esto se constata que el porcentaje de humedad de los tallos y las hojas es alto en comparación con otras materias primas debido a su alto contenido de agua, sin embargo su contenido de cenizas es similar (6-9 %).

La Tabla 3.2 muestra los valores obtenidos de celulosa, hemicelulosa y lignina de muestras de tallo y tallo-hojas de la planta de papa *S. tuberosum*.

Tabla 3.2 Caracterización lignocelulósica de tallos y tallo-hojas de papa *S. tuberosum*

Muestra	Celulosa (%)	Hemicelulosa (%)	Lignina (%)
Tallos	35	28	25
Tallo-Hoja	30	19	21

Se encontró en base a los ensayos experimentales que los tallos y tallo-hoja contienen (35, 30 %) de celulosa, (28, 19 %) de hemicelulosa y (25, 21 %) de lignina respectivamente.

Los residuos de papa presentan una composición lignocelulósica similar en comparación con lo investigado por Ruiz, (2004) quien reporta que los tallos de girasol tienen una composición de 36.8% de celulosa, 17.3% de hemicelulosa y 21.2% de lignina. La estructura y composición de los materiales lignocelulósicos varían mucho, dependiendo de las especies vegetales, partes de las plantas y condiciones de crecimiento.

3.2 Rendimiento en base al peso de la muestra antes y después del pretratamiento alcalino

De la Tabla 3.3 se observa que en promedio todos los experimentos tanto de tallo y tallo-hoja tienen alrededor de 50% de rendimiento en peso, esto puede ser debido a que durante y después del pretratamiento se fueron perdiendo sustancias solubles y extraíbles como clorofila, taninos, carotenoides, entre otros (Aguilar, 2004). Así también se observa tanto en los experimentos de tallo y tallo-hoja que existe pérdida de peso posterior al pretratamiento alcalino, lo que se debe a la solubilización de la hemicelulosa y lignina. El tamaño de partícula utilizado influye en la pérdida de sólidos

durante los lavados por lo que en conjunto con los demás factores se tiene un rendimiento de sólidos de aproximadamente del 50%.

Tabla 3.3 Rendimientos en muestras de tallo en base a los pesos antes y después del pretratamiento alcalino.

Experimento	Peso inicial de la muestra (g)	Peso de la muestra seca pretratada (g)		Rendimiento de sólidos (%)	
		T	TH	T	TH
1	10	6.45	5.39	64.54	53.87
2	10	6.38	4.28	63.83	42.82
3	10	5.00	3.99	50.01	39.85
4	10	4.50	3.47	45.01	34.74
5	10	5.57	4.64	55.67	46.39
6	10	5.45	4.38	54.52	43.75
7	10	5.96	4.37	59.57	43.70
8	10	5.05	3.63	50.53	36.34

3.3 Concentración de AR de la fracción líquida del pretratamiento alcalino

En la Tabla 3.4 se muestran los resultados promedio de absorbancia y concentración de AR en g/L de las muestras de los experimentos analizados. Se observa que después del pretratamiento alcalino en los experimentos de tallo, la celulosa no se ve afectada y no se solubilizó en la fracción líquida esto se debe a que el pretratamiento empleado no removió toda la lignina y por ende no se encontró una cantidad significativa de glucosa, en las muestras pretratadas de tallo-hoja se encontró entre 1 y 3 g/L de glucosa esto se debe a que se solubilizó la celulosa de las hojas ya que están no contienen lignina.

Tabla 3.4 Determinación de la concentración de AR para la fracción líquida de las muestras pretratadas de acuerdo al diseño de experimentos empleado en el pretratamiento alcalino.

Experimento	Absorbancia (A) a 540 nm		Concentración de glucosa g/L	
	T	TH	T	TH
1	0.41	1.84	0.43	1.73
2	0.24	0.87	0.27	0.85
3	0.67	3.71	0.67	3.43
4	0.38	2.29	0.40	2.13
5	0.33	2.50	0.35	2.33
6	0.15	0.82	0.19	0.80
7	0.60	3.27	0.60	3.03
8	0.32	2.22	0.35	2.07

Los experimentos 3 (0.5% NaOH, 120°C, 60 min) y 7 (0.5% NaOH, 120°C, 90 min) para tallo-hoja muestran mayor liberación de azúcares reductores, esto debido a que la fracción de hoja no posee lignina y por tal motivo el pretratamiento arrastró parte de la celulosa y la hidrolizó a glucosa.

3.4 Determinación del contenido de Extraíbles para la determinación de lignina

Para la determinación del contenido de lignina, es necesario que las muestras se encuentren libres de extraíbles, esto son principalmente terpenos, resinas, fenoles, ceras, grasas, carotenoides y algunas proporciones de gomas y taninos condensados, que pueden interferir en las determinaciones de lignina.

En la Tabla 3.5 se observa que los experimentos analizados contienen entre 2 y 4% de extraíbles, las muestras testigo (blanco) que son las muestras sin pretratar para el caso del tallo y tallo-hoja tienen 7.7% y 13.77% de extraíbles respectivamente. Por lo que la realización del pretratamiento alcalino facilitó la solubilización de lignina, hemicelulosa y extraíbles.

Tabla 3.5 Contenido de Extraíbles de muestras con pretratamiento tomadas al azar para su posterior análisis de lignina

Experimento	% Extraíbles
Tallo	
3	2.42
4	2.51
6	2.78
BT	7.72
Tallo-Hoja	
1	2.87
2	1.03
4	4.68
6	3.30
BTH	13.77

BT= Blanco de la muestra de tallo
BTH= Blanco de la muestra de tallo-hoja

El bajo contenido de extraíbles (2-4 %) se debe a que durante el pretratamiento alcalino, se extrajeron gran parte de éstos en la fracción líquida, y durante los lavados de la fracción sólida, en el caso de los experimentos de tallo-hoja a pesar de que se solubilizó parte de la celulosa de las hojas en la fracción líquida, las muestras presentaron entre 1 y 4% de extraíbles esto es debido a que no todas las sustancias extraíbles son solubles en agua.

En comparación con lo investigado por Barroso-Casillas (2010) quien pretrató paja de trigo utilizando explosión de vapor para la hidrólisis de la hemicelulosa, encontró que la paja de trigo sin pretratar tiene un contenido de extraíbles de 18.65 % y la paja de trigo después del pretratamiento contiene 12% de extraíbles, esta disminución en el contenido de extraíbles es debido a que se solubilizan en la fracción líquida, así mismo estos extraíbles deben ser tomados en cuenta ya que algunos de estos pueden tener efectos inhibitorios sobre los tratamientos enzimáticos posteriores.

El contenido de extraíbles de las muestras testigo de tallo (7.72 %) y tallo-hoja (13.77 %), son comparables con los resultados obtenidos por Cardona *et al.*, (2013) el cual encontró que el pasto elefante contiene 9.9 % de extraíbles. Así mismo Ruiz (2004) halló que los tallos de girasol contienen 8.4 % de extraíbles. Estos resultados se

asemejan, sin embargo el contenido de extraíbles varía de acuerdo al tipo de material lignocelulósico, edad de la especie vegetal y condiciones de crecimiento.

3.5 Evaluación de los factores del pretratamiento alcalino

Después del acondicionamiento de la muestra (eliminación de extraíbles en etanol-benceno) se determinó el contenido de lignina en blancos de T y TH encontrando 24.9 y 21 %, respectivamente.

La Tabla 3.6 se muestran los diferentes experimentos realizados con base al diseño de experimentos 2^3 para T y TH, en ella se puede observar que el experimento 4 para TH se obtiene la mayor reducción del contenido de lignina con un 13.3 %, y para T los mejores resultados se obtiene en el experimento 6 con un porcentaje de reducción de lignina de 13 %.

Tabla 3.6. Determinación del contenido de lignina en Tallo (T) y Tallo-Hojas (TH)

Experimento	T (°C)	t (min)	NaOH (%)	Lignina (%)	
				T	TH
1	80	60	0.5	15.2	18.6
2	80	60	1.0	24.6	16.1
3	120	60	0.5	21.6	19.1
4	120	60	1.0	22.3	13.3
5	80	90	0.5	14.2	20.2
6	80	90	1.0	13.0	20.2
7	120	90	0.5	20.0	20.0
8	120	90	1.0	14.0	17.3
Blancos	0	0	0	24.9	21.0

En base a los resultados de caracterización lignocelulósica mostrados en la Tabla 3.2, inicialmente se tenía en tallo un porcentaje de lignina del 25%, posterior al pretratamiento se encontró un porcentaje de lignina del 13% lo que implica una remoción del 52% del contenido de lignina empleando 1% de NaOH, 80 °C y 90 min de pretratamiento, para tallo-hoja el porcentaje de lignina después del pretratamiento fue de 13.3 % por lo cual se removió 63.3% de lignina utilizando 1% de NaOH, 120 °C y 60 min. Sin embargo se debe considerar que la fracción de hemicelulosa se solubilizó por la acción del NaOH y los lavados realizados para llevar a pH 7, encontrándose que la hemicelulosa se redujo de 28% a 17% lo que indica un porcentaje de remoción de 60.71%

3.5.1 Análisis estadístico del pretratamiento alcalino

El Análisis de Varianza (ANOVA) del diseño de experimentos 2³, permite observar los factores significativos, estos son aquellos factores que muestran un efecto directo en la reducción del contenido de lignina (Tabla 3.7). El factor A corresponde a la concentración de NaOH, el factor B a la temperatura y C al tiempo de pretratamiento, AB, AC, BC, ABC son las interacciones de dichos factores.

Tabla 3.7 ANOVA de tallo del diseño de experimentos 2³ del pretratamiento alcalino en base al contenido de lignina

Fuente de variación	GL	Cuadrado medio	Razón F	Nivel de probabilidad	Estadísticamente significativo
NaOH (A)	1	2.259	27.59	0	Sí
Temperatura (B)	1	24.595	300.44	0	Sí
AB	1	40.445	494.06	0	Sí
tiempo (C)	1	120.872	1476.50	0	Sí
AC	1	81.726	998.31	0	Sí
BC	1	1.437	17.55	0	Sí
ABC	1	3.466	42.33	0	Sí
Error	8	0.082			
Total	15	275.455			

Se puede observar en la Tabla 3.7 que los factores más significativos fueron: tiempo (C) con un factor F de 1476.5 lo que indica que este es el factor preponderante en el pretratamiento, a su vez se observa que la combinación de la concentración de NaOH (A) y tiempo (C) obtuvieron un valor de F de 998.31 lo que indica que ambos factores son estadísticamente más significativos e influyen directamente sobre el % de reducción de lignina. Con base a los resultados obtenidos se determinó que para lograr la mayor reducción del contenido de lignina de las muestras, el pretratamiento debe ser realizado con 1% de concentración de NaOH y 90 min de pretratamiento, este tipo de pretratamiento influye directamente en la estructura de los materiales lignocelulósicos al incrementar el área de superficie interna reduciendo la polimerización y cristalinidad de la celulosa separando las uniones estructurales entre la lignina y los carbohidratos, logrando la disolución de la lignina y permitiendo el acceso a la celulosa y hemicelulosa.

En comparación con lo reportado por Niño *et al.*, (2013) quienes estudiaron por separado hojas y tallos de yuca (*Manihot esculenta Crantz*) comparando tres diferentes tipos de pretratamiento (H_2SO_4 , NaOH y H_2O_2) dicho residuo fue evaluado al 1% y 5% (p/v) y tamaño de partícula de 1.8 mm y 0.6 mm, determinando el % de remoción de lignina. En tallo de yuca reportaron que al pretratar 1% de material con un tamaño de partícula de 0.6 mm con 5% de NaOH, lograron una reducción del contenido de lignina del 74.077%. Todo lo anterior demuestra que los pretratamientos alcalinos permiten reducir el contenido de lignina, base necesaria para lograr el acceso libre de las enzimas a la celulosa y hemicelulosa y transformarlas a glucosa y xilosa principalmente.

La Figura 3.1 muestra el efecto principal del tiempo y la interacción entre el tiempo y la concentración de NaOH sobre la reducción del contenido de lignina.

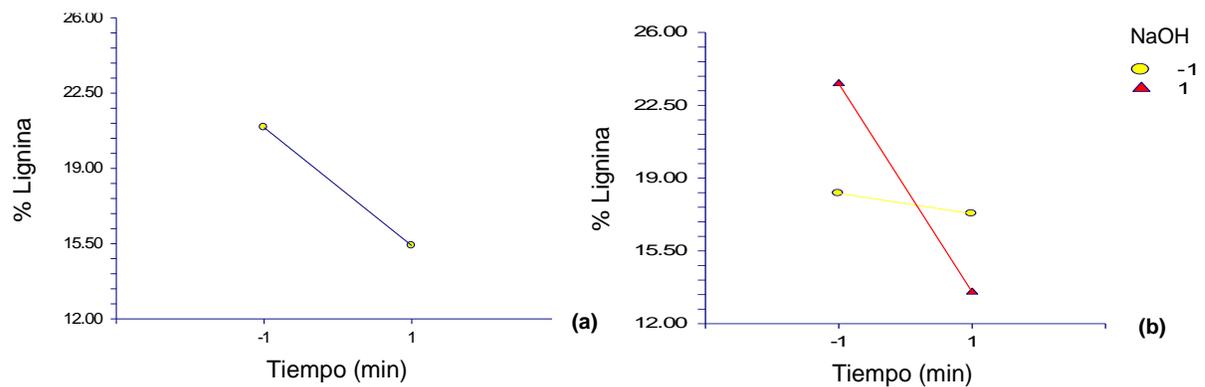


Figura 3.1. Efecto principal del tiempo y la interacción de la concentración de NaOH con el tiempo de pretratamiento del diseño 2^3 en Tallo. (a) Efecto del tiempo (-1=60 min, 1=90 min), (b) Interacción del tiempo (-1=60 min, 1=90 min) con la concentración de hidróxido (-1=0.5%, 1=1%) sobre el contenido de lignina.

En la Figura 3.1 (a) se presenta el efecto principal del tiempo sobre la reducción del contenido de lignina, se puede observar que a niveles altos de tiempo (90 min) de pretratamiento se reduce significativamente el contenido de lignina, permitiendo el hinchamiento de la molécula de lignina y aumentando la superficie de contacto, lo cual ayuda a solubilizarla.

En la Figura 3.1 (b) se observa que en la interacción del tiempo de pretratamiento con la concentración de NaOH, los niveles altos de tiempo (90 min) con concentraciones altas de NaOH (1%) favorecen el decremento del contenido de lignina.

En la Figura 3.2, se puede observar que la mayoría de los residuos estandarizados, con media cero y varianza igual a 1, se encuentran dentro de la normalidad y distribuidos uniformemente, sin embargo existen cuatro datos distanciados, que probablemente se deban 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.

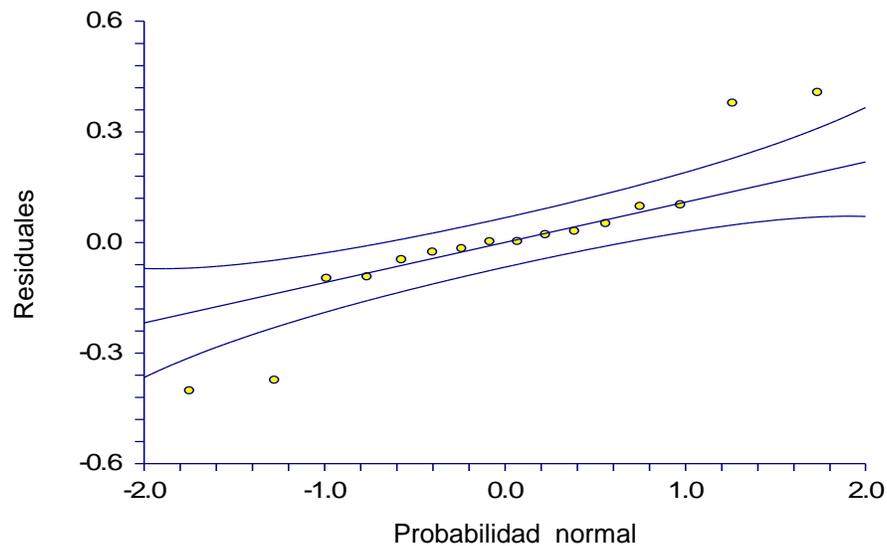


Figura 3.2. Residuales de experimentos de tallo sobre la reducción del contenido de lignina

Los resultados obtenidos en el diseño de experimentos para tallo se ajustaron mediante un polinomio de tercer orden (Ecuación 3.1) debido a que proporciona un mejor ajuste en comparación con un modelo lineal ($R^2=53.6\%$) o cuadrático ($R^2=98.50\%$), esto se debe a que en el ANOVA de tallo (Tabla 3.7) los factores principales, las interacciones cuadráticas y la interacción cúbica resultan significativas sobre la respuesta que es el contenido de lignina.

$$\begin{aligned} \% \text{ Lignina} = & -60.5939 + 125.043\text{NaOH} + 0.5746T + 0.6343t \\ & - 0.7834\text{NaOH} * T - 1.2232\text{NaOH} * t - 0.0037T * t \\ & + 0.0062\text{NaOH} * T * t \end{aligned} \quad (3.1)$$

El polinomio de regresión muestra un valor de R^2 de 0.9976, lo que significa un buen ajuste de los datos para la determinación de reducción del contenido de lignina en tallo.

En la Tabla 3.8, se presenta el ANOVA para el diseño de experimentos de tallo-hoja, el cual permite analizar la diferencia entre las medias de los factores de estudio y determinar su significancia.

Tabla 3.8. ANOVA de Tallo-hoja del diseño de experimentos 2^3 del pretratamiento alcalino en base al contenido de lignina

Fuente de variación	GL	Cuadrado medio	Razón F	Nivel de probabilidad	Estadísticamente significativo
NaOH (A)	1	27.073	314.42	0	Sí
Temperatura (B)	1	7.317	84.97	0	Sí
AB	1	8.810	102.32	0	Sí
tiempo (C)	1	30.175	350.45	0	Sí
AC	1	6.231	72.37	0	Sí
BC	1	1.028	11.94	0	Sí
ABC	1	0.009	0.10	0.76	No
Error	8	0.086			
Total	15	81.332			

De la Tabla 3.8 se observa que existe diferencia entre las medias de todos los factores, exceptuando la interacción NaOH-Temperatura-tiempo, se observa también que existe mayor diferencia entre las medias en la concentración de NaOH y el tiempo de pretratamiento por lo cual estos dos factores son más significativos e influyen directamente sobre la reducción del contenido de lignina.

En la Figura 3.3 se muestra el efecto principal del tiempo y la concentración de NaOH sobre la reducción del contenido de lignina después del pretratamiento.

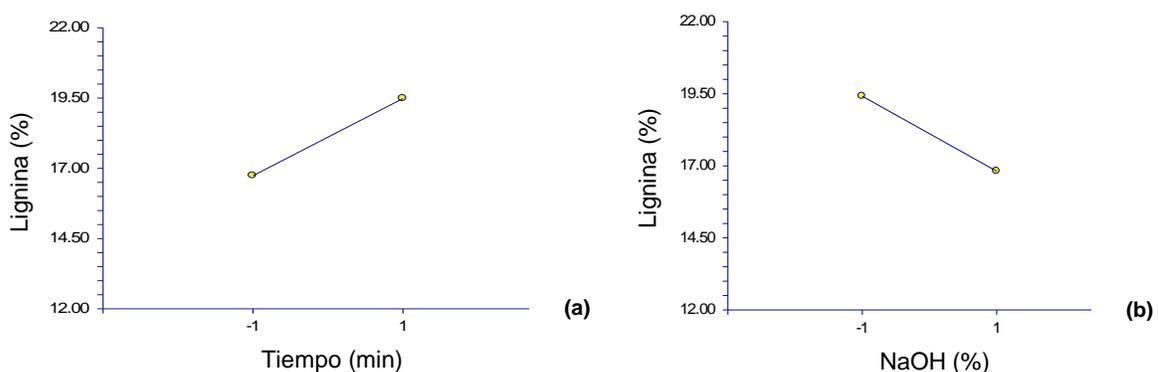


Figura 3.3. Efecto principal del tiempo y la concentración de NaOH en el diseño 2^3 en tallo-hoja. (a) Efecto del tiempo (-1=60 min, 1=90min), (b) Efecto de la concentración de hidróxido de sodio (-1=0.5%, 1=1%).

En la Figura 3.3 (a) se observa que con un tiempo de pretratamiento de 60 min se obtiene 3% menos % de lignina con respecto a 90 min de pretratamiento, en la Figura 3.3 (b) se observa que a 1% de concentración de NaOH se obtiene 2% menos contenido de lignina con respecto al pretratamiento con 0.5% de concentración de NaOH. En base a los resultados obtenidos en tallo se encontró que con una concentración del 1% de NaOH y 60 min de pretratamiento se obtiene menor % de lignina, esto se debe a que el NaOH rompe la unión de la lignina con los carbohidratos, al producir el hinchamiento del material lignocelulósico incrementando la superficie interna y reduciendo la cristalinidad de la celulosa.

Niño *et al.*, (2013) analizaron hojas de yuca (*Manihot esculenta Crantz*) empleando tres diferentes tipos de pretratamiento (H_2SO_4 , NaOH y H_2O_2), obtuvieron un % de remoción del 55.53% de lignina empleando 1% (p/v) de residuo con un tamaño de partícula del 0.6 mm pretratando con NaOH al 5%. Cardona *et al.*, (2013) evaluaron pasto elefante y King grass con base al diseño de experimentos tipo Draper-Li con tres puntos centrales en donde analizaron: Temperatura (80 y 120°C), tiempo de residencia (30 y 180 min), relación sólido-líquido (1:15 y 1:20) (p/p) y concentración de NaOH (1 y 2%) (w/w), sus mejores condiciones fueron a 120°C, 60 min, 2% NaOH y relación 1:20, con las cuales reportaron un porcentaje de reducción de lignina entre 76.2% y 88.4% con respecto al contenido inicial de las muestras sin pretratar. Con base a lo anterior se demuestra que el pretratamiento alcalino permite reducir o eliminar el % de lignina de materiales lignocelulósicos, rompiendo la unión de la lignina y los carbohidratos lo que permite el acceso a la celulosa y hemicelulosa.

Los residuales de la Figura 3.4 muestran que todos los experimentos se encuentran bajo una media en común. Por lo que siguen un mismo comportamiento y no se presentaron errores de calibración en el equipo o de algún otro tipo.

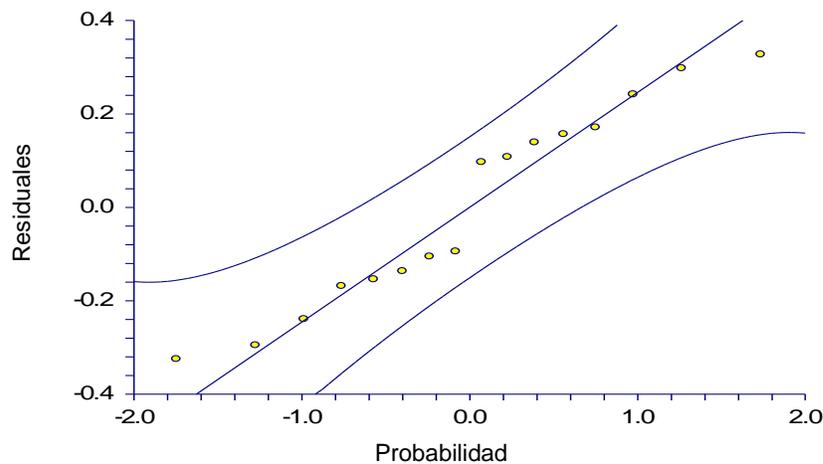


Figura 3.4. Residuales de los experimentos de tallo-hoja

Se obtuvo un polinomio de regresión de segundo orden (Ecuación 3.2) que incluye los factores principales y las interacciones cuadráticas entre los factores que resultaron significativas en el ANOVA de la Tabla 3.8

$$\begin{aligned} \% \text{ Lignina} = & 10.4219 - 2.8432\text{NaOH} + 0.1409T + 0.0513t \\ & - 0.1484\text{NaOH} * T + 0.1664\text{NaOH} * t - 0.0008T * t \end{aligned} \quad (3.2)$$

El polinomio de regresión tiene un valor de R^2 de 0.9914, lo que significa un buen ajuste al modelo para la explicación de la determinación de reducción del contenido de lignina en tallo-hoja. Si se hubiese usado un polinomio de primer orden con los factores principales sin tomar en cuenta las interacciones cuadráticas que resultaron también significativas, el ajuste del modelo tendría un coeficiente de determinación, $R^2=0.7938$, el cual no representaría de forma correcta la respuesta ya que habría un 30% de error que no explicaría el modelo.

Las condiciones con las cuales se llevó acabo el tratamiento alcalino tanto para tallo y tallo-hoja fueron NaOH (0.5 y 1%), tiempo (60 y 90 min) y Temperatura (80 y 120 °C). De las cuales las mejores condiciones para tallo son (80°C, 90 min, 1%) y para tallo-hoja (120°C, 60min, 1%).

3.6 Evaluación de las variables en la hidrólisis enzimática

Seleccionado las condiciones del pretratamiento (NaOH 1% y 90 min) se procedió a evaluar los factores que afectan la hidrólisis enzimática en base al diseño de experimentos 2^3 planteado en la Sección 2.4. Los resultados para el diseño de experimentos 2^3 de la hidrólisis enzimática se muestran en la Tabla 3.9 donde se observa que la máxima concentración de glucosa se obtuvo en el experimento 3 con 12 g/L de glucosa (H=4%, C=6% y T=40 °C), los experimentos 1, 2, 3 y 4 que fueron estudiados a una temperatura de 40 °C muestran los valores más altos sobre la concentración de glucosa, en cambio se puede observar que a niveles altos de temperatura (50°C) la concentración de glucosa es menor a 1 g/L, esto se aprecia en los experimentos 5, 6, 7, y 8. Cabe mencionar que no se tomaron valores de concentración de xilosa debido a que estos fueron menores a 1g/L y por lo tanto no se anexaron.

Tabla 3.9. Experimentos de hidrólisis enzimática de bagazo de papa pretratado

Experimento	Variables codificadas			Variables naturales			Respuesta
	H (%)	C (%)	T (°C)	H (%)	C (%)	T (°C)	Glucosa (g/L)
1	-1	-1	-1	4	4	40	11.08
2	1	-1	-1	6	4	40	10.975
3	-1	1	-1	4	6	40	12.19
4	1	1	-1	6	6	40	10.396
5	-1	-1	1	4	4	50	0.16
6	1	-1	1	6	4	50	0.58
7	-1	1	1	4	6	50	0.665
8	1	1	1	6	6	50	0.515

H= Hemicelulasas, C= Celulasas, T= Temperatura

Cabe mencionar que la concentración de glucosa sólo fue de 12 g/L esta concentración es relativamente baja por lo que se decidió realizar un pretratamiento ácido alcalino con la finalidad de eliminar la hemicelulosa y lignina quedando la celulosa para posteriormente hidrolizarla a glucosa, las condiciones del pretratamiento ácido alcalino se muestran en la sección 2.6, bajo estas condiciones óptimas y empelando las mejores condiciones del diseño de experimentos para la hidrólisis enzimática (4% de

hemicelulasas, 6% de celulasas, 40 °C por 72 h) se logró obtener 20 g/L de glucosa con las cuales se trabajó para realizar las fermentaciones de hidrolizado. A continuación se muestra el análisis estadístico del diseño de experimentos mostrado en la Tabla 3.9.

3.6.1 Análisis estadístico de la hidrólisis enzimática

En el ANOVA del diseño de experimentos para la hidrólisis enzimática mostrado en la Tabla 3.10 se observa que el factor más significativo fue la temperatura (C) con un valor de F de 1431.6.

Tabla 3.10. ANOVA Hidrólisis enzimática para la producción de Azúcares Reductores

Fuente de variación	GL	Cuadrado medio	Razón F	Nivel de probabilidad	Estadísticamente significativo
A: Hemicelulasas	1	0.6642	2.08	0.187	No
B: Celulasas	1	0.2352	0.74	0.415	No
AB	1	1.2769	4.01	0.080	No
C: Temperatura (°C)	1	456.249	1431.60	0	Sí
AC	1	1.1772	3.69	0.091	No
BC	1	0.0020	0.01	0.938	No
ABC	1	0.3136	0.98	0.350	No
Error	8	0.3187			
Total	15	462.468			

Los factores hemicelulasas (A) y celulasas (B) no son estadísticamente significativos debido a que no afectan de forma directa en la concentración de glucosa (g/L), esto se debe a que al analizar las muestras no se encontró xilosa, lo que implica que la hemicelulosa del material lignocelulósico (bagazo de papa) se solubilizó al realizar los lavados hasta pH 7 de la fracción sólida proveniente del pretratamiento alcalino.

En comparación con lo obtenido por Lázaro y Arauzo (1994) quienes emplearon residuos provenientes de las conserva de espárrago y alcachofa, determinaron que

dichos residuos estaban constituidos por 12.1 % de lignina, 43.6 % de celulosa y 12.3 % de lignina, 51 % de celulosa, respectivamente. Dichos residuos únicamente fueron triturados y tamizados sin ningún pretratamiento químico, en la etapa de hidrólisis enzimática emplearon tampón citrato a pH 4.8, celulasas *Trichoderma reesei*, en concentración de 0.450 g/L a 50°C por 24 h. Obteniendo una concentración de 2.12 g/L y 1.07 g/L de glucosa para los residuos de espárrago y alcachofa, respectivamente empleando una concentración de 20 g/L de sustrato. Posteriormente utilizaron un tratamiento con NaOH 0.25 N a 125°C por 60 min y obtuvieron 1.9 g/L de glucosa y 4.5 g/L de glucosa en esparrago y alcachofa respectivamente. En este trabajo se empleó bagazo de papa con pretratamiento alcalino al 1% de NaOH, 80°C por 90 min con lo cual se obtuvo el mayor porcentaje de reducción del contenido de lignina, posteriormente se realizó la hidrólisis enzimática con dos tipos de enzimas (celulasas y xilanasas de NOVOZYME) obteniendo una concentración máxima de 12 g/L de glucosa. El pretratamiento alcalino permite el acceso de las enzimas a la celulosa y hemicelulosa del material lignocelulósico, dependiendo de la eficiencia del pretratamiento se logra la máxima conversión del sustrato al producto final (glucosa y xilosa).

La Figura 3.5 muestra el efecto principal de la temperatura (a), la interacción de la temperatura con la concentración de enzima hemicelulasa (b) y la interacción de la temperatura con la concentración de enzima celulasa (c). En la Figura 3.5 (a) se observa que a niveles bajos de temperatura de hidrólisis enzimática ($T = 40\text{ }^{\circ}\text{C}$) se favorece el incremento de la concentración de glucosa, así mismo en la Figura 3.5 (b) y (c) muestran que al emplear los niveles bajos de temperatura ($40\text{ }^{\circ}\text{C}$) con niveles bajos de concentración de enzima hemicelulasa o celulasa (4%) se obtiene la mayor concentración de glucosa (11 g/L aproximadamente), en cambio utilizar los niveles altos de temperatura ($50\text{ }^{\circ}\text{C}$) disminuyen significativamente la concentración de glucosa a menos de 1 g/L. Por lo tanto se corrobora lo obtenido en el ANOVA de la hidrólisis enzimática, en donde se analizó que sólo la temperatura afecta significativamente la concentración de glucosa, esto se debe a que para este tipo de

sustrato las enzimas trabajan mejor con el nivel bajo de temperatura (40 °C) debido a que no se desnaturalizan e interactúa mejor el sustrato con los sitios activos de las enzimas.

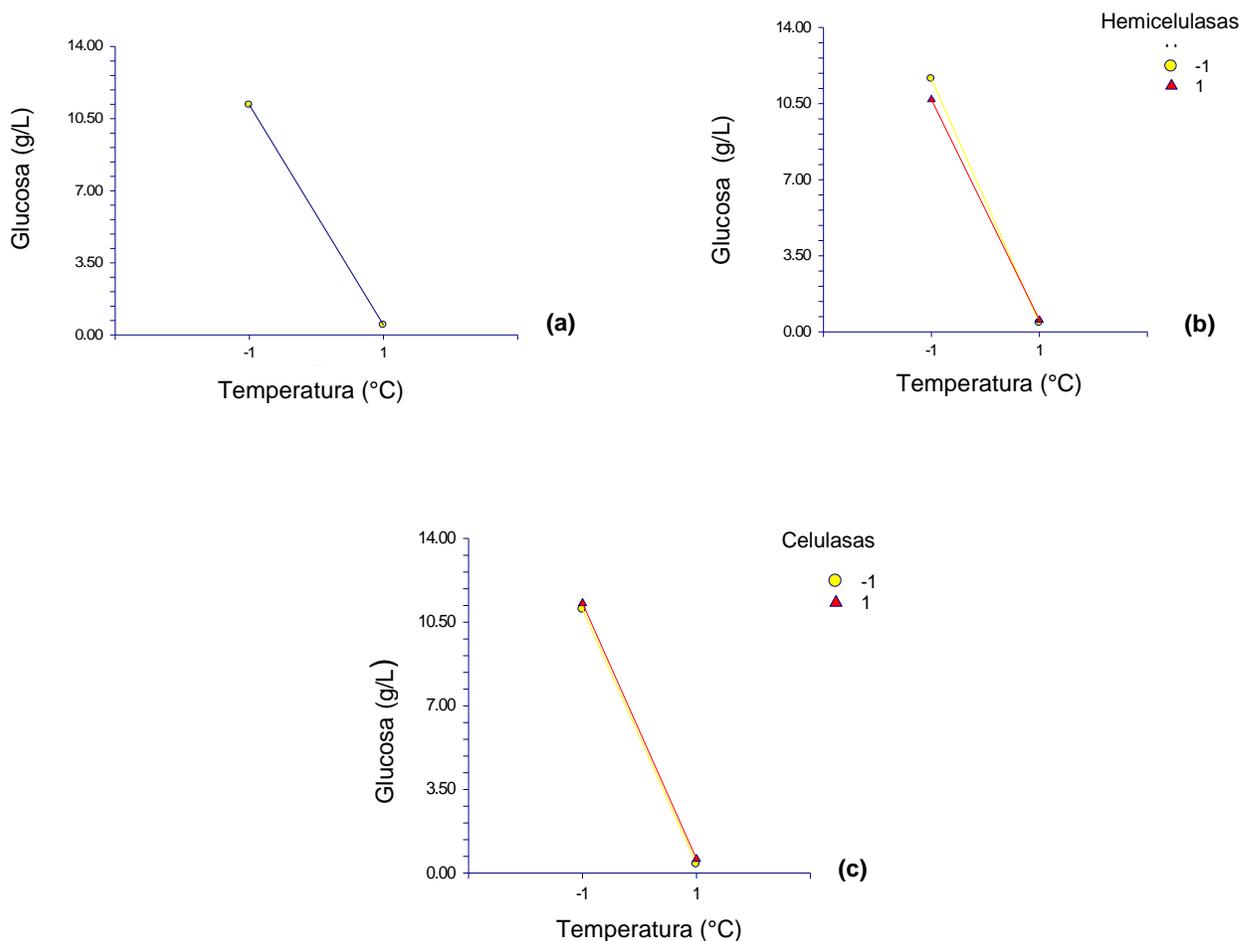


Figura 3.5. Efecto de la temperatura de hidrólisis enzimática. (a) Efecto principal de la temperatura sobre la concentración de glucosa, (b) interacción de la temperatura con la concentración de Hemicelulasas y (c) interacción de la temperatura con la concentración Celulasas.

En la Figura 3.6 se observa el gráfico de residuales que muestran que todos los experimentos se encuentran bajo una media en común. Por lo que siguen un mismo comportamiento y no se presentaron errores de calibración en el equipo o de algún otro tipo.

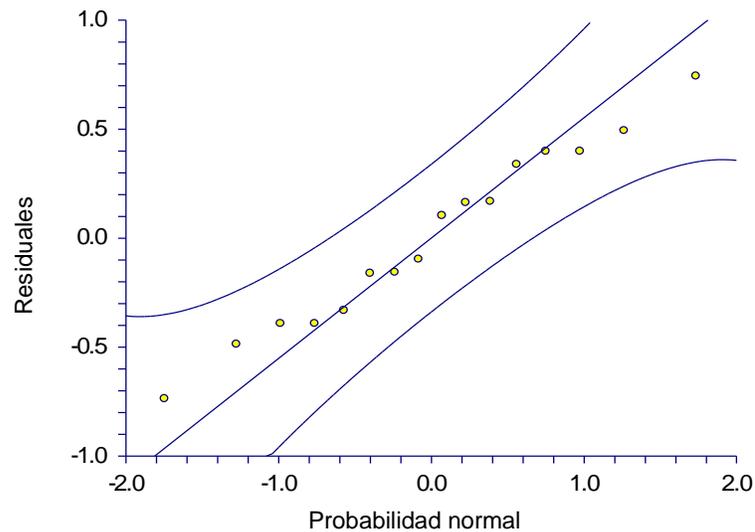


Figura 3.6. Residuales de los experimentos de la hidrólisis enzimática

Del análisis estadístico se determinó el polinomio de regresión de primer orden (modelo) de la hidrólisis enzimática (ecuación 3.3) el cual tuvo un coeficiente de determinación R^2 de 0.988, lo que significa un buen ajuste al modelo para la determinación de la máxima concentración de glucosa en la hidrólisis enzimática.

$$\text{Glucosa (g/L)} = 54.3 - 0.204H + 0.121C - 1.07T \quad (3.3)$$

En comparación con este trabajo González-Rentería *et al.*, (2011) realizaron estudios en paja de frijol de una mezcla de cuatro variedades diferentes y encontraron que las mejores condiciones de pretratamiento se obtienen con una concentración de NaOH de 0.1 % (p/v), 120°C por 30 min, se obtiene la mayor remoción de lignina, y que a su vez las concentraciones de NaOH influyen significativamente en las proporciones de celulosa, hemicelulosa y extraíbles, en tanto que el tiempo afecta únicamente al contenido de celulosa, a su vez encontraron una disminución de peso posterior al pretratamiento del 30%.

3.7 Prueba preliminar en glucosa para verificar la actividad de *E. coli* CCE14

Para determinar las condiciones óptimas de la etapa de fermentación se realizó un estudio preliminar de la cepa etanológica *E. coli* CCE14 con una cinética de 24 h, a 37°C y 300 rpm usando como sustrato glucosa grado reactivo a una concentración de 10 y 20 g/L determinando la producción de etanol mediante HPLC. Los resultados obtenidos se muestran en las Figuras 3.7 y 3.8 respectivamente.

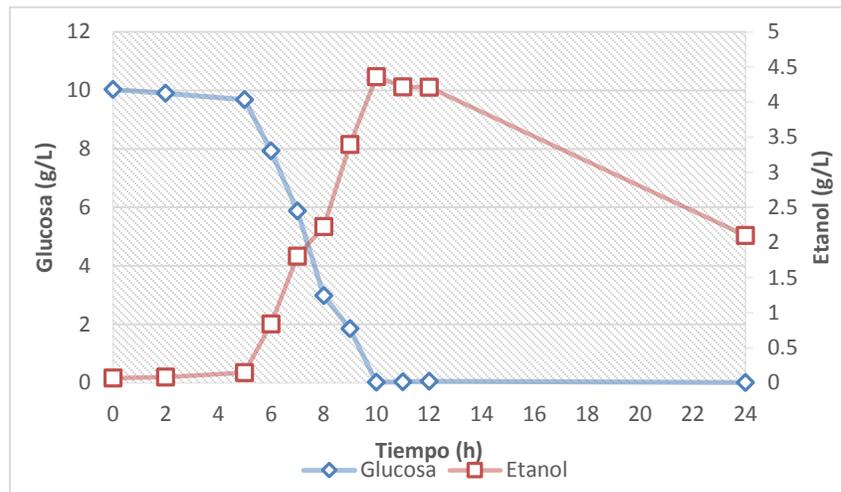


Figura 3.7 Producción de etanol con 10 g/L de glucosa

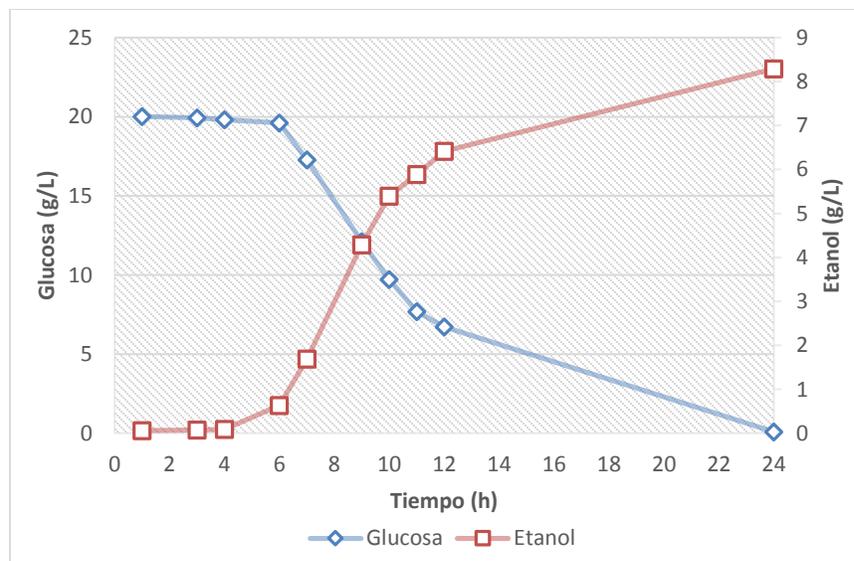
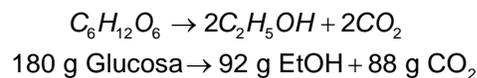


Figura 3.8 Producción de etanol con 20 g/L de glucosa

En la Figura 3.7 se observa que a partir de las 5 h termina la fase de adaptación del microorganismo y es por esta razón que la glucosa permanece en 10 g/L y a medida que el microorganismo se reproduce comienza la fermentación de glucosa a etanol. De manera semejante se observa en la Figura 3.8 el mismo efecto a las 6 h de la cinética de fermentación con 20 g/L de glucosa.

Para la determinación del rendimiento con respecto al valor teórico máximo de conversión de glucosa a etanol por la cepa *E. coli* CCE14 se basó en la ecuación estequiometrica mencionada en la Sección 1, la cual corresponde a la ecuación (1.1).



De acuerdo al balance se tiene que el rendimiento teórico estequiométrico máximo es 0.511 g etanol/g glucosa de acuerdo a la reacción de fermentación alcohólica (el valor teórico estequiométrico máximo se calcula en base a 1 g de glucosa).

Para determinar el rendimiento de producto sustrato de etanol ($Y_{\text{EtOH/Glucosa}}$) y la eficiencia de producción de etanol (η_{EtOH}) se utilizan las ecuaciones 3.4 y 3.5, respectivamente.

$$Y_{\text{EtOH/Glucosa}} = \frac{\text{EtOH}_f - \text{EtOH}_0}{\text{Glc}_0 - \text{Glc}_f} \quad (3.4)$$

$$\eta_{\text{EtOH}} (\%) = \frac{Y_{\text{EtOH/Glucosa}}}{0.51} \times 100 \quad (3.5)$$

Donde EtOH_f es la cantidad final de etanol producido (g/L), EtOH_0 es la cantidad inicial de etanol (g/L), Glc_0 es la cantidad inicial de glucosa (g/L), Glc_f es la cantidad

final de glucosa consumida (g/L) y el valor de 0.51 de la ecuación 3.5 corresponde al rendimiento teórico estequiométrico de la reacción de la fermentación alcohólica de glucosa a etanol.

Por lo tanto, de acuerdo a los resultados obtenidos en las cinéticas de fermentación realizadas se tiene que el rendimiento teórico máximo para la concentración de 10 g/L de glucosa (Figura 3.7) la cepa etanológica *E. coli* CCE14 obtuvo una conversión máxima de 4.362 g EtOH a las 12 h de fermentación lo que corresponde a un rendimiento de 0.4362 g EtOH/g glucosa con una eficiencia de 85.53 %.

Para la concentración de 20 g/L de glucosa, la bacteria *E.coli* CCE14 tuvo una conversión máxima de 8.288 g EtOH a las 24 h de fermentación (Figura 3.8) lo que corresponde a un rendimiento de 0.4144 g EtOH/g glucosa, con una eficiencia de 81.25 %. El rendimiento experimental varía entre 90% y 95% del teórico, es decir, de 0.469 a 0.485 g/g. Los rendimientos en la industria varían entre 87 y 93% del rendimiento teórico (Boudarel, 1984; citado por Vázquez y Dacosta, 2007).

En la prueba preliminar de glucosa cabe mencionar que la cepa *E. coli* CCE14 no se activó con sales minerales, más sin embargo se obtuvieron buenos rendimientos de etanol que fueron alrededor del 83.4 % en promedio. Según Orencio-Trejo *et al.*, (2008), *E. coli* CCE14 en medio mineral aumenta el rendimiento de etanol en un 90%.

Para determinar si el microorganismo tuvo una variación en su rendimiento, se realizaron pruebas del mismo medio de fermentación donde se determinó si el microorganismo fue capaz de crecer, así como determinar si el pH influyó de manera directa en su desarrollo.

En la Figura 3.9, se observan las curvas de crecimiento de *E. coli* CCE14 para las concentraciones de glucosa de 10 y 20 g/L, respectivamente.

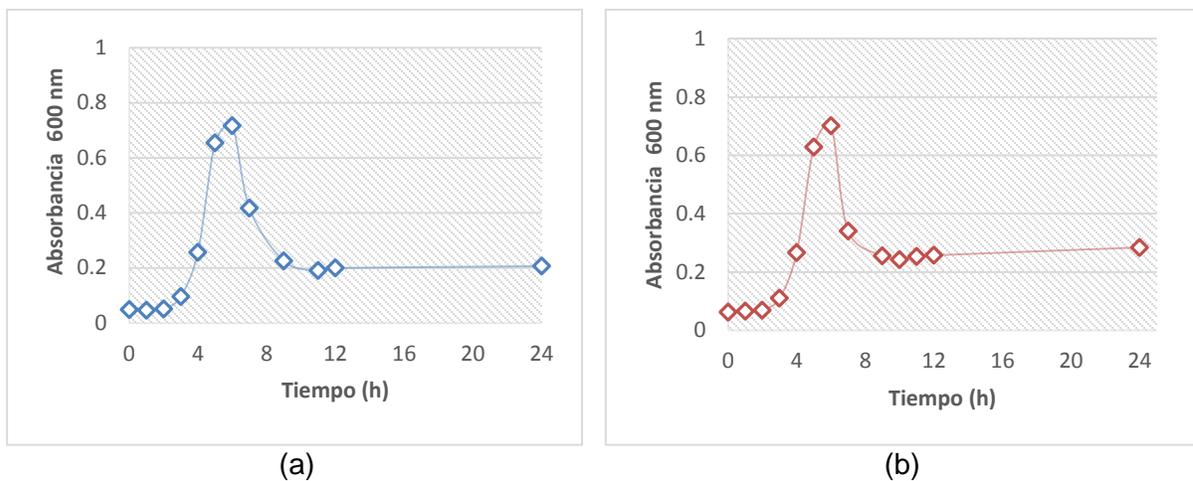


Figura 3.9 Medida de crecimiento de *E. coli* CCE14 por medio de la absorbancia. (a) 20 g/L de glucosa y (b) 10 g/L de glucosa.

La absorbancia es una medida indirecta para determinar si el microorganismo está creciendo en el medio de alimentación, por lo que en la Figura 3.9 se muestra el comportamiento cinético de crecimiento del microorganismo, como se puede observar aun con concentraciones de sustrato diferentes el comportamiento es similar. Debido a que el microorganismo empleado es una bacteria, se observa que la fase logarítmica es muy corta aproximadamente de 4 h durante esta fase las bacterias consumen los nutrientes del medio para poder reproducirse, la fase exponencial se presenta después de las 4 h y tiene una duración aproximada de una hora al igual que la fase estacionaria que se presentó entre las 5 y 6 h en esta fase se producen metabolitos secundarios (ácido acético y glicerol), posterior a las 6 h de reacción se presentó la fase de muerte donde se observa la reducción del número de bacterias viables del cultivo.

El pH es indispensable para el crecimiento de un microorganismo debido a que muchos de ellos son incapaces de crecer y desarrollarse en medio ácido o alcalino. Los valores óptimos de crecimiento de la cepa etanológica *E. coli* CCE14 son pH 7, 300 rpm y 37 °C, con lo cual se obtiene el mayor rendimiento de conversión de glucosa a etanol de acuerdo a lo reportado por Orencio-Trejo *et al.*, (2008).

La Figura 3.10 muestra el comportamiento del pH con respecto al tiempo de fermentación. Se puede observar en la Figura 3.10 (a y b) que el comportamiento es similar a las dos concentraciones de sustrato empleadas. Como se puede apreciar a partir de las 4 a 6 h el pH se mantuvo entre 7 y 6, en el mismo punto que se presentó la fase exponencial y estacionaria del crecimiento, esto debido a que el pH era idóneo para el crecimiento de *E. coli* CCE14, a partir de la formación de metabolitos secundarios (ácido acético y glicerol) debido a el consumo de sustrato, la presencia de iones promovió la acidificación del medio, que a su vez se vio reflejado en la muerte del microorganismo.

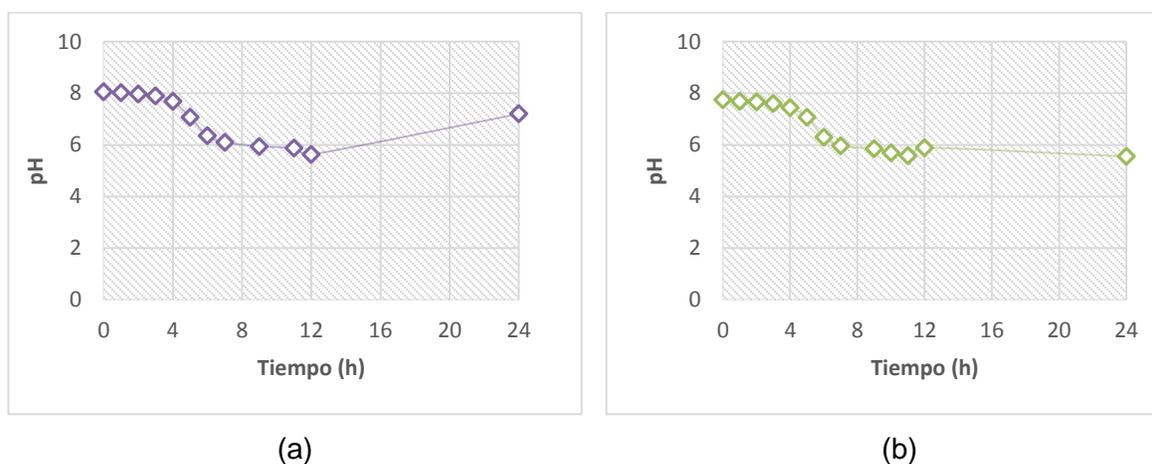


Figura 3.10 Variación del pH durante la cinética de fermentación con *E. coli* CCE14. (a) 10 g/L de glucosa y (b) 20 g/L de glucosa.

A manera comparativa se desarrolló una cinética de fermentación a 20 g/L de glucosa grado reactivo a 120 rpm y 37°C tomando muestra cada 2 h, los resultados se muestran en la Figura 3.11.

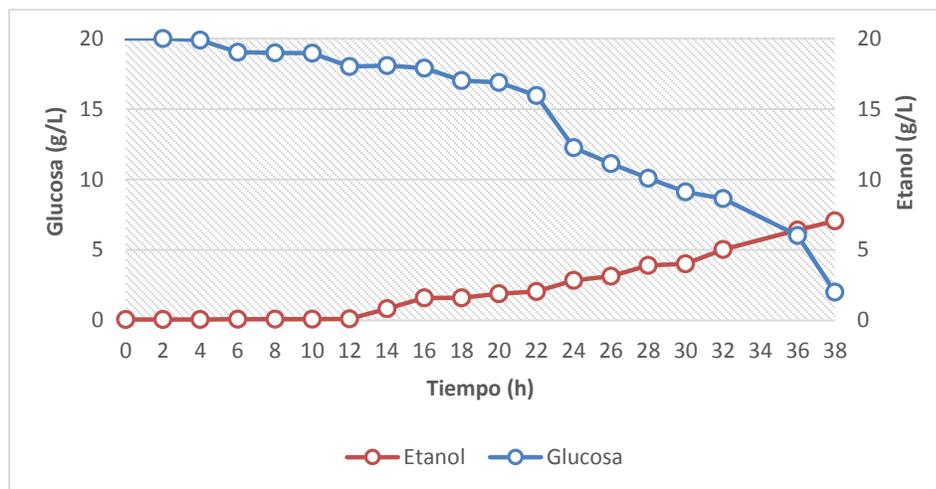


Figura 3.11 Cinética de fermentación de *E. Coli* CCE14 a 20 g/L de glucosa con 120 rpm

Como se puede observar al disminuir las velocidades de agitación se aumenta el tiempo necesario para la fermentación, y la conversión máxima de glucosa a etanol fue de 7.059 g/L, lo que corresponde a un valor teórico máximo de 0.3529 g EtOH/g glucosa con un rendimiento del 69 % (Ecuación 3.5).

En comparación con lo obtenido por Orencio-Trejo *et al.*, (2008) quienes realizaron un estudio comparativo de *E. coli* KO11, *E. coli* CCE14 y *E. coli* C a 35 °C, 100 rpm y pH de 7 y medio de enriquecimiento para activación M9, encontraron que la cepa *E. coli* CCE14 en un medio de 40 g/L de glucosa obtuvo una conversión cercana a 20 g/L en comparación con la *E. coli* KO11 con una conversión menor a los 20 g/L de etanol. El rendimiento de etanol a las 30 h fue de 15, 70 y 90% para *E. coli* C, *E. coli* KO11 y *E. coli* CCE14, respectivamente. En este trabajo empleando la cepa *E. coli* CCE14 con 20 g/L de glucosa a 37 °C, 120 rpm, pH de 7 durante 38 h se obtuvo un rendimiento de etanol del 69%, este rendimiento es similar a lo obtenido por Orencio-Trejo *et al.*, (2008) empleando *E. coli* KO11, y un 21% menor al obtenido con la cepa *E. coli* CCE14, esta diferencia se debe a que utilizaron un medio de enriquecimiento M9 con sales minerales para la activación de la cepa y en este trabajo sólo se empleó caldo luria.

3.8 Mejoramiento de las condiciones de la fermentación con hidrolizado de bagazo de papa *S. tuberosum*

El hidrolizado enzimático de bagazo de papa contiene glucosa (20 g/L), xilosa (1.039 g/L), ácido acético (3.038 g/L), glicerol (0.305 g/L) y no contiene inhibidores como el hidroximetil furfural debido al pretratamiento ácido-alcalino empleado, estos resultados se obtuvieron al realizar la hidrólisis enzimática en base a las mejores condiciones de experimentación obtenidas en la sección 3.6. Con estas características se fermentó el hidrolizado enzimático de bagazo de papa *S. tuberosum* utilizando la bacteria etanológica *Escherichia coli* CCE14. La Tabla 3.11 muestra los resultados obtenidos del diseño Box-Behnken, en donde se tuvo como variable de respuesta la eficiencia de producción de etanol respecto al valor teórico, η_{EtOH} (%) (Los resultados totales de la cinética de fermentación se muestran en el anexo A.1).

Tabla 3.11. Resultados del diseño Box-Behnken para optimización de la fermentación con *E. coli* CCE14 en la producción de etanol con bagazo de papa *S. tuberosum*

Exp.	Variables codificadas			Variables naturales			Respuesta η_{EtOH} (%)
	pH	Ci (%v/v)	V_a (rpm)	pH	Ci (%v/v)	V_a (rpm)	
1	-1	-1	0	6	5	200	72.92
2	1	-1	0	7	5	200	75.55
3	-1	1	0	6	15	200	67.44
4	1	1	0	7	15	200	74.91
5	-1	0	-1	6	10	150	79.05
6	1	0	-1	7	10	150	80.95
7	-1	0	1	6	10	250	73.34
8	1	0	1	7	10	250	72.42
9	0	-1	-1	6.5	5	150	92.06
10	0	1	-1	6.5	15	150	91.88
11	0	-1	1	6.5	5	250	71.69
12	0	1	1	6.5	15	250	71.47
13	0	0	0	6.5	10	200	71.01
14	0	0	0	6.5	10	200	71.14
15	0	0	0	6.5	10	200	71.04

De esta tabla se observa que la eficiencia máxima de etanol sobre el valor teórico fue de 92.06%, el cual se puede apreciar en el experimento 9, la eficiencia más baja de producción de etanol se observa en el experimento 3 con un valor de 67.44 %, estas eficiencias dependen de las condiciones de experimentación y del comportamiento de la bacteria *Escherichia coli* CCE14 en el medio hidrolizado.

Mediante el software Minitab 16 se obtuvo el polinomio de regresión múltiple de segundo orden (Ecuación 3.6), con un coeficiente de determinación de 85.15%, el cual presenta un ajuste satisfactorio y explica el comportamiento de los datos sobre la máxima eficiencia de producción de etanol respecto al valor teórico.

$$\eta_{\text{EtOH}}(\%) = -55.1963 + 85.5793\text{pH} - 6.3157\text{Ci} - 1.1527V_a - 6.3087\text{pH}^2 + 0.1503\text{Ci}^2 + 0.0030V_a^2 + 0.4850\text{pH} \cdot \text{Ci} - 0.0282\text{pH} \cdot V_a \quad (3.6)$$

Así mismo se obtuvieron las gráficas de superficie de respuesta estimada de cada factor (Figura 3.12), en donde se muestra claramente la formación de puntos de silla, así mismo el programa estadístico analiza los resultados y en base al polinomio de regresión genera las condiciones con las cuales se podría obtener la mayor eficiencia de producción de etanol, estas condiciones fueron: pH de 6.64, Ci de 5 % (v/v) y V_a de 150 rpm, con lo que se podría obtener una eficiencia en la producción de etanol del 89.5831%. Para corroborar el tipo de superficie de respuesta se obtuvo el modelo canónico (Ecuación 3.7) a partir del polinomio de regresión de segundo orden de la ecuación (3.6). Los cálculos del modelo canónico se muestran en el Anexo A.2 y A.3.

$$\hat{y} = 69.384 - 6.318w_1^2 + 0.159w_2^2 + 3.026 \times 10^{-3} w_3^2 \quad (3.7)$$

Los coeficientes de regresión del modelo canónico presentan signos alternos por lo tanto la respuesta del punto estacionario es un punto de silla (ver anexo A.3), esto quiere decir que se deberá seguir explorando dentro la región experimental para poder encontrar un máximo.

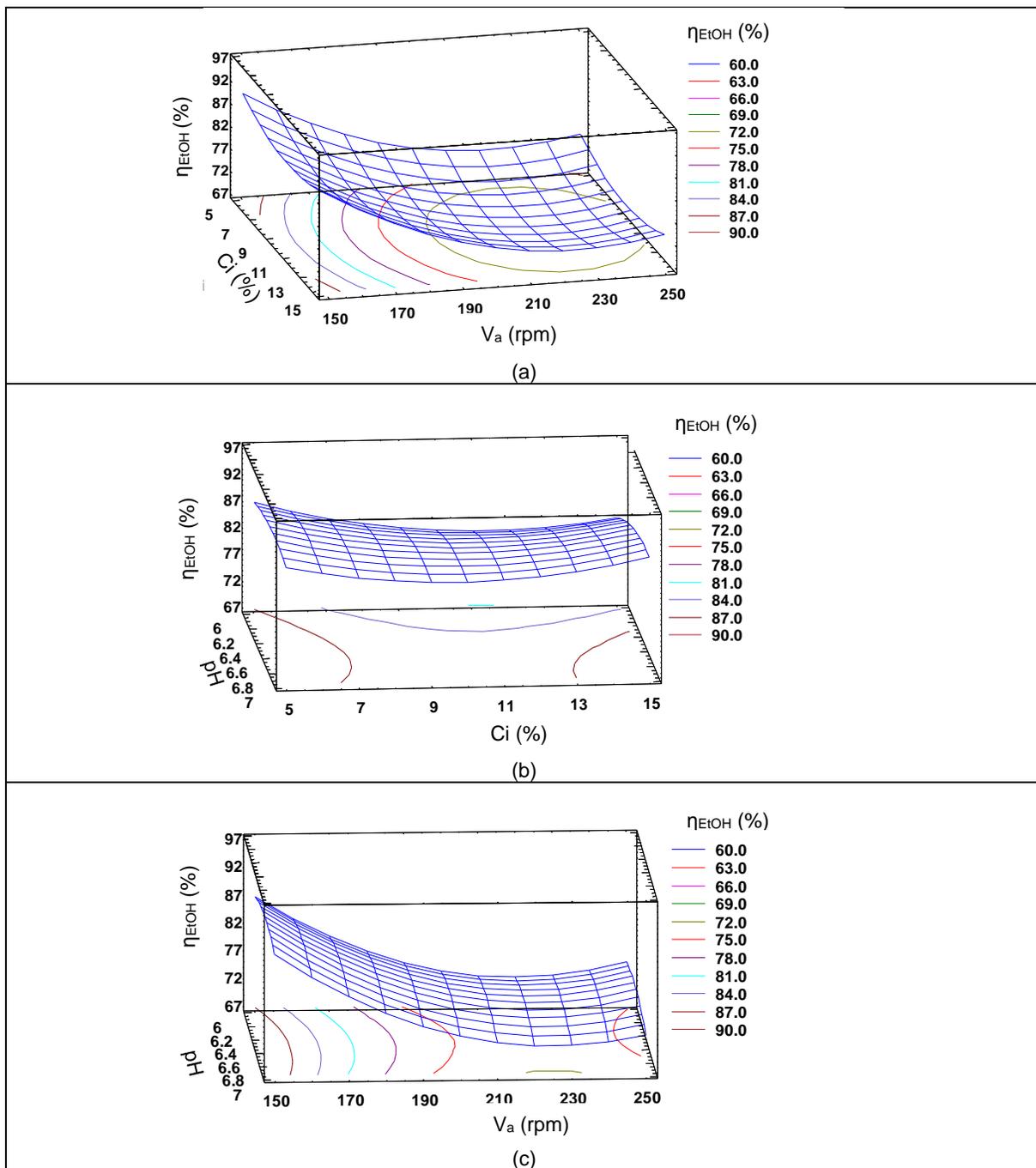


Figura 3.12. Superficies de respuesta estimada de cada factor para la máxima eficiencia de producción de etanol, (a) C_i vs V_a , (b) pH vs C_i , (c) pH vs V_a

La Figura 3.13 muestra la producción de etanol (g/L), se observa que la producción máxima fue de 10 g/L (experimento 9) y la menor producción 7 g/L (experimento 12), la mayor parte de los experimentos mostró una producción de etanol entre 7 y 9 g/L, esto se debe porque al realizar la inoculación en % (v/v) se presenta una variación en el volumen de fermentación, por lo tanto la eficiencia de conversión de etanol se ve diferenciada. La diferencia de etanol (g/L) entre el valor más alto (10 g/L) y el valor más bajo (7 g/L) es 30% y respecto a los valores más altos (9 y 10 g/L) se tiene una diferencia del 10%.

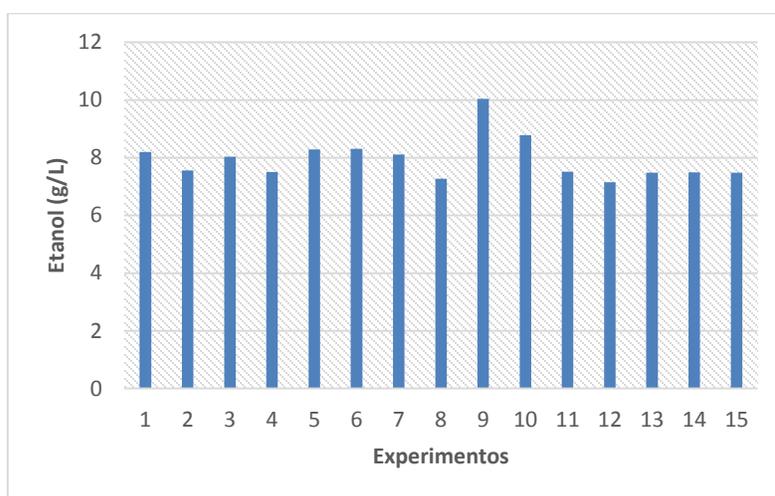


Figura 3.13. Concentración de etanol de los experimentos del diseño Box-Behnken

Debido a las condiciones de trabajo de la bacteria su eficiencia se mantendrá similar aún bajo diferentes condiciones de agitación y concentración de inóculo siempre que sea constante su pH y temperatura de crecimiento. Con ayuda del programa Minitab 16 se determinó que a pH de 6.64, C_i de 5 % (v/v) y V_a de 150 rpm, se puede alcanzar una eficiencia en la producción de etanol del 89.58%. En comparación con lo reportado por Dien *et al.*, (2000) quien empleó hidrolizado de fibra de maíz (2 % (v/v), 2.8 % (v/v) glucosa y 3.7 % (v/v) xilosa) y xilosa, en fermentación a 35°C, 350 rpm y control de pH a 6.5 empleando las cepas *E. coli* FBR4 y FBR5, obtuvo para xilosa un rendimiento entre 88-92% de rendimiento y una conversión de 0.51 g etanol/ g azúcar, para el

hidrolizado obtuvo un rendimiento de FBR4 del 92 % y de 72% por la cepa FBR5. Maki *et al.*, (2000), empleado hidrolizado de hemicelulosa de bagazo de caña (10,0 g/L de glucosa y 40,0 g/L de xilosa), en fermentación a 30°C y pH 7 empleando la cepa *E. coli* KO11 , al suplementar con tiptona y extracto de levadura obtuvo un rendimiento de 91.5 % a las 48 h, y al suplementarlo con polvo de maíz escarpado (CSP) un rendimiento del 86.7 % , y una conversión de 0.44 g etanol/ g azúcares a las 96 h. Martin *et al.*, (2006) empleando medio sintético con la cepa *E. coli* FBR5 , en fermentación con 50 g/L de glucosa y fermentación con 50 g/L de xilosa suplementando con medio LB a 35°C, 200 rpm y control de pH a 6.5, obtuvo para glucosa un rendimiento del 82 % y para xilosa entre 75-85 %. La presencia de ácido acético u otros compuestos tóxicos pueden contribuir a la inhibición de la fermentación y la reducción de la producción de etanol y la productividad. Los resultados presentados aquí demuestran que la bacteria recombinante *E. coli* es útil en xilosa y glucosa presente en los hidrolizados, con la cual es posible obtener altos rendimiento de producción de etanol.

3.9 Cinética de fermentación con *E.coli* CCE14 en base a las mejores condiciones obtenidas en el diseño de experimentos Box-Behnken.

Considerando las mejores condiciones analíticas de fermentación obtenidas en la sección anterior, que fueron pH de 6.64, Ci de 5 % v/v y Va de 150 rpm, y empleando el polinomio de regresión de la ecuación 3.7, se espera obtener una eficiencia en la producción de etanol del 89.58% (9.137 g/L de etanol). Para corroborar experimentalmente estas condiciones se realizó una cinética de fermentación del hidrolizado enzimático de bagazo de papa empleando la bacteria etanológica *Escherichia coli* CCE14, la cual se muestra en la Figura 3.14, se observa que a las 24 h se fermentó toda la glucosa del hidrolizado enzimático de bagazo de papa, obteniéndose la máxima concentración de etanol de 9.8 g/L y por consiguiente una eficiencia de producción de etanol respecto al valor teórico de 86.30 %.

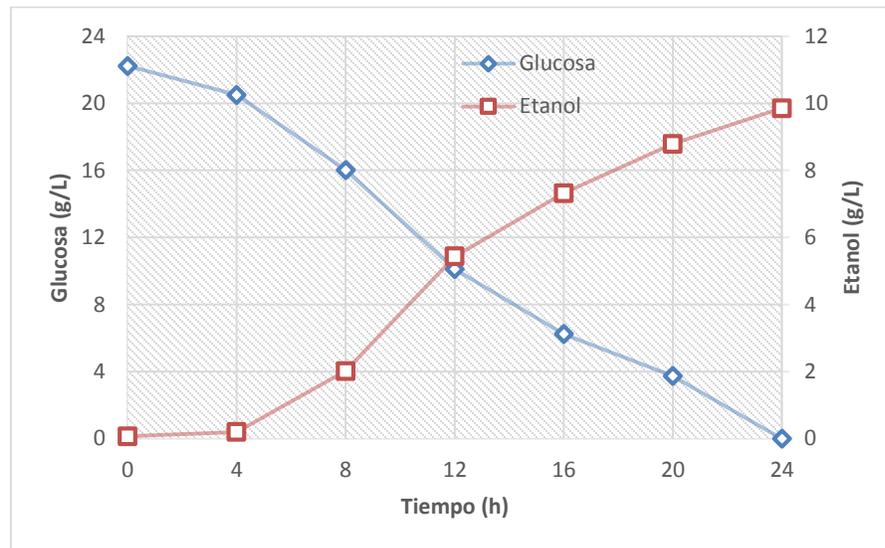


Figura 3.14. Cinética de fermentación con *Escherichia coli* CCE14 utilizando las mejores condiciones de fermentación (pH, C_i y V_a).

La eficiencia obtenida en comparación con la eficiencia teórica predicha por el modelo de la ecuación 3.7 difiere en un 3.3%, esta diferencia se debe al error que contiene el ajuste del modelo para predecir los datos.

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Caracterización química de cáscara, hojas y tallos de papa

Se emplearon las técnicas estandarizadas de la AOAC (1990) para determinar el contenido de humedad, materia seca y cenizas de residuos de papa, y se encontró que la cáscara, y las hojas de papa contienen aproximadamente 80 % de humedad, 20 % de materia seca y 6-9 % de cenizas. En cambio los tallos contienen 85.6 % de humedad, 14.4 % de materia seca y 9.2 % de cenizas. Esta caracterización química no ha sido reportada, por lo tanto servirá de base para comparar con futuras investigaciones. El alto contenido de humedad y el bajo contenido de materia seca implican que se requiere una mayor cantidad de materia prima y a su vez involucra mayores costos de proceso.

Caracterización lignocelulósica de tallos y tallo-hojas de papa.

Se encontró en base a los ensayos experimentales utilizando las técnicas estandarizadas de la TAPPI (1978) que los tallos y tallo-hoja contienen (35, 30 %) de celulosa, (28, 19 %) de hemicelulosa y (25, 21 %) de lignina respectivamente, esta composición es similar a los tallos de girasol y al pasto elefante, sin embargo la estructura y composición de los materiales lignocelulósicos varían mucho, dependiendo de las especies vegetales, partes de las plantas y condiciones de crecimiento. Los resultados obtenidos de esta caracterización servirán de referencia a futuras investigaciones ya que no se encuentra reportada en literatura. El contenido de lignina debido a que es relativamente alto requiere un pretratamiento efectivo que remueva el mayor porcentaje de lignina y disminuya la cristalinidad de la celulosa para la acción de las enzimas en la hidrólisis enzimática. Los porcentajes de celulosa y hemicelulosa son similares a los reportados por Sánchez (2009) para paja de cebada y avena, la celulosa y hemicelulosa pueden ser hidrolizados para la obtención de AR.

Rendimiento en peso en base seca

Se encontró que los experimentos de tallo y tallo-hoja en promedio tienen alrededor de 50% de rendimiento en peso, esto puede ser debido a que durante y después del pretratamiento se fueron perdiendo sustancias solubles y extraíbles como clorofila, taninos, carotenoides, lignina, hemicelulosa y celulosa, entre otros, así mismo el tamaño de partícula utilizado influye directamente en la pérdida de sólidos durante los lavados debido a que después del pretratamiento se observa una reducción significativa de tamaño.

Concentración de AR de la fracción líquida del pretratamiento alcalino

Se analizó la fracción líquida después del pretratamiento alcalino y se encontró que en los experimentos de tallo, la celulosa no se ve afectada y no se solubilizó en la fracción líquida esto se debe a que el pretratamiento empleado no removió toda la lignina y por ende no se encontró una cantidad significativa de glucosa. En las muestras pretratadas de tallo-hoja se encontró entre 1 y 3 g/L de glucosa esto se debe a que se solubilizó la celulosa de las hojas ya que están no contienen lignina. Con respecto al contenido de xilosa, proveniente de la hemicelulosa hubo cantidades muy bajas (menores a 1 g/L) esto es debido a que el pretratamiento alcalino empleado bajo las condiciones de experimentación utilizadas no alcanzo a remover suficiente lignina (se reduce de 25 a 13%).

Contenido de extraíbles de tallo y tallo-hojas

Los experimentos analizados contienen entre 2 y 4% de extraíbles, las muestras testigo (blanco) que son las muestras sin pretratar para el caso del tallo y tallo-hoja contienen 7.7% y 13.77% de extraíbles respectivamente. Por lo que la realización del pretratamiento alcalino facilitó la solubilización de lignina, hemicelulosa y extraíbles. El bajo contenido de extraíbles se debe a que durante el pretratamiento alcalino, se extrajeron gran parte de éstos en la fracción líquida, y durante los lavados de la fracción sólida, en el caso de los experimentos de tallo-hoja a pesar de que se solubilizó parte

de la celulosa de las hojas en la fracción líquida, las muestras presentaron entre 1 y 4% de extraíbles esto es debido a que no todas las sustancias extraíbles son solubles en agua.

Pretratamiento alcalino

En base al diseño de experimentos para tallos se determinó que los factores estadísticamente más significativos fueron: tiempo (C) y la combinación de la concentración de NaOH (A) con el tiempo (C), los cuales influyen directamente sobre el porcentaje de reducción de lignina, permitiendo un incremento en el área de superficie interna, reduciendo el grado de polimerización y cristalinidad de la celulosa, causando la separación de las uniones estructurales entre la lignina, hemicelulosa y celulosa, lo cual ayuda a solubilizar la lignina y parte de los carbohidratos. Con base a los resultados obtenidos se determinó que para lograr la mayor reducción del contenido de lignina en las muestras de tallo, el pretratamiento debe ser realizado con NaOH (1% p/v), empleando un tiempo de 90 min de pretratamiento y una temperatura de 80 °C, bajo estas condiciones se logró disminuir el contenido de lignina inicial de 25 a 13%.

Para el caso de los experimentos de tallo-hoja se encontró que los factores concentración de NaOH y el tiempo de pretratamiento son estadísticamente más significativos y por lo tanto influyen directamente sobre la reducción del contenido de lignina. Se determinó que para lograr la mayor reducción del contenido de lignina en las muestras de tallo-hoja, el pretratamiento debe ser realizado con NaOH (1% p/v), empleando un tiempo de 60 min de pretratamiento y una temperatura de 120 °C, utilizando estas condiciones experimentales permitieron reducir el contenido de lignina inicial de 21 a 13%.

Hidrólisis enzimática

Para el sustrato utilizado (bagazo (tallos) de papa pretratado con NaOH 1%, 90 min, 80 °C), la temperatura resultó ser el único factor significativo, para obtener la máxima

concentración de glucosa de 12 g/L, siendo mejores los niveles bajos de temperatura ($T=40\text{ }^{\circ}\text{C}$), esto se debe a que a temperaturas más altas la enzima se desnaturaliza y pierde su actividad catalítica, con respecto a la concentración de enzimas se determinó que no existe influencia significativa, esto se debe a que no se detectaron cantidades significativas de xilosa y solo había presencia de glucosa. Indudablemente el alto contenido de lignina reduce sustancialmente el desempeño de las celulasas, lo que se traduce en una mínima producción de glucosa (concentraciones menores a los 10 g/L).

Pretratamiento ácido-alkalino

Con la finalidad de incrementar la concentración de glucosa (12 g/L) en el hidrolizado enzimático de bagazo de papa, se empleó un pretratamiento ácido-alkalino bajo las condiciones mostradas en la sección 2.6 y empleando las mejores condiciones del diseño de experimentos de la hidrólisis enzimática, el pretratamiento combinado permitió eliminar la hemicelulosa, la lignina y disminuir la cristalinidad de la celulosa, permitiendo una mayor disponibilidad y accesibilidad a las enzimas celulasas a la celulosa del bagazo de papa para hidrolizarla a glucosa, obteniendo una concentración de 20 g/L, es decir la concentración de glucosa se incrementó de 10 a 20 g/L, este incremento se debe a que la enzima celulasa interactuó mejor con los sitios activos de la celulosa del bagazo de papa.

Fermentación

Las mejores condiciones obtenidas empleando el diseño de optimización Box-Behnken, utilizando la bacteria etanológica *E. coli* CCE14 en glucosa de hidrolizado enzimático de bagazo de papa fueron pH de 6.64, Ci de 5 %v/v y velocidad de agitación de 150 rpm, bajo estas condiciones se esperaba obtener una eficiencia de producción de etanol con respecto al valor teórico de 89.58%.

Evaluación de las mejores condiciones de fermentación

Al evaluar experimentalmente las mejores condiciones de fermentación se obtuvo una eficiencia de producción de etanol respecto al valor teórico de 86.30 %, esta eficiencia difiere en un 3.3 % respecto a la eficiencia de producción de etanol que predice el

modelo, la cual tiene un valor de 89.58 %, por tanto esta diferencia se debe al error que contempla el ajuste del modelo para predecir los datos.

RECOMENDACIONES

Utilizar un pretratamiento más adecuado que elimine la mayor parte de lignina, y encontrar las mejores condiciones para obtener altas concentraciones de xilosa y utilizarlas en el proceso fermentativo con *Escherichia coli* CCE14 para la obtención de etanol.

Implementar un proceso continuo para la obtención de bioetanol a partir del uso completo de la planta de papa (*S. tuberosum*) sin realizar secados en cada etapa para minimizar costos y maximizar beneficios, así mismo evaluar la influencia de los lavados.

Utilizar la papa de desecho en la etapa de hidrólisis enzimática con el fin de aprovechar los almidones presentes en este residuo y convertirlos en azúcares fermentables para la obtención de etanol.

Aumentar la concentración de xilosa y glucosa de los hidrolizados mediante evaporadores.

Realizar las fermentaciones del hidrolizado enzimático a pH controlado de 6.64 mediante la adición automática de KOH 2N para obtener una mayor eficiencia de producción de etanol.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Acosta, O. y Chaparro-Giraldo, A. 2009. Biocombustibles, Seguridad Alimentaria y Cultivos Transgénicos. *Revista de Salud pública*. **11**(2): 290-300.

Aguilar, N. 2004. Importancia, manejo y control de extraíbles e incrustaciones (pitch) en la fabricación de papel. *Madera y bosques*. **10**(1):89-99.

AOAC 1990. Official Methods of Analysis. Association of Official Analytical Chemists. Gaithersburg, MD, EEUU.

Aristidou, A. y Penttilä, M. 2000. Metabolic engineering applications to renewable resource utilization. *Biochemical engineering*. **11**: 187-198.

Aro N, Pakula T y Penttila M. 2005. Transcriptional regulation of plant cell Wall degradation by filamentous fungi. *FEMS Microbiology Reviews*. **29**: 719–739.

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

Barroso-Casillas, M. 2010. Pretratamiento de biomasa celulósica para la obtención de etanol en el marco de una biorrefinería. Tesis de Licenciatura. Universidad Politécnica de Madrid. España.

Béguin, P. y Aubert. J.P. 1994. The biological degradation of cellulose. *FEMS Microbiology Reviews*. **13**: 25-58.

Ben-Ghedalia, D. y Miron, J. 1981. The effect of combined chemical and enzyme treatment on the saccharification and in vitro digestion rate of wheat straw. *Biotechnology and Bioengineering*. **23**: 823–831.

Cardona, E., Rios, J., Peña, J. y Rios L. 2013. Pretratamiento Alcalino de Pasto Elefante (*Pennisetum sp*) y King Grass (*Pennisetum hybridum*) Cultivados en Colombia para la Producción de Bioetanol. *Información Tecnológica*. 24 (5): 69-80.

Castaño-Pelaez, H., Cardona-Betancur, M., Mejía-Gómez, C. y Acosta-Cárdenas, A. 2011. Producción de etanol a partir de harina de yuca en un sistema de hidrólisis enzimática y fermentación simultánea. *Dyna* **169**: 158-166.

Chandrakant, P. y Bisaria, V.S. 1998. Simultaneous bioconversion of cellulose and hemicellulose to ethanol. *Critical Reviews in Biotechnology*. **18**: 295–331.

Chisti, Y. 2007. *Biodiesel from microalgae*. Elsevier. **25**: 294-306.

Clark, T.A. y Mackie, K.L. 1987. Steam explosion of the soft-wood *Pinus radiata* with sulphur dioxide addition. I. Process optimization. *Journal of Wood Chemistry and Technology*. **7**: 373–403.

Cuervo, L., Folch, J.L. y Quiroz, R.E. 2009. Lignocelulosa Como Fuente de Azúcares para la Producción de Etanol. *Bioteología* **13**(3): 11-25.

Czaja, W.K., Young, D.J., Kawecki, M. y Brown, R.M. 2007. The future prospects of microbial cellulose in biomedical applications. *Biomacromolecules* **8**: 1-12.

Dien, B., Nichols N., O'Bryan, P. y Bothast, R. 2000. Development of New Ethanologenic *Escherichia coli* Strains for Fermentation of Lignocellulosic Biomass. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. **84**: 181-196.

Duff, S.J.B. y Murray, W.D. 1996. Bioconversion of forest products industry waste cellulose to fuel ethanol: a review. *Bioresour. Technol.* **55**: 1–33.

Eggeman, T. y Elander, R.T. 2005. Process and economic analysis of pre-treatment technologies. *Bioresource Technology*. **96**: 2019-2025.

González-Rentería, S.M., Soto-Cruz, N.O., Rutiaga-Quiñones, O.M., Medrano-Roldan, H., Rutiaga-Quiñones, J.G. y López-Miranda, J. 2011. Optimización del proceso de hidrólisis enzimática de una mezcla de pajas de frijol de cuatro variedades (pinto villa, pinto saltillo, pinto mestizo y flor de mayo). *Revista Mexicana de Ingeniería Química*. **10**: 17-28.

Hamelinck, C. y Faaij, A. 2002. Future prospects for production of methanol and hydrogen from biomass. *Journal of Power Sources*. Elsevier. **111**:1-22.

Hackenberg, N. 2008. Biocombustibles de segunda generación. *Revista virtual REDESMA*. **2**: 19-61.

Hatakka, A.I. 1983. Pretreatment of Wheat Straw by White-Rot Fungi for Enzymic Saccharification of Cellulose. *Applied Microbiology Biotechnology*. **18**: 350-357.

Hernández-Bustos, C.I. (2003). Crecimiento y formación de productos en cultivos aeróbicos y anaeróbicos de *Bacillus subtilis* con glucosa, xilosa y celobiosa. Tesis de Licenciatura. Instituto Tecnológico de Zacatepec. México.

Holtzapple, M.T., Humphrey, A.E. y Taylor, J.D. 1989. Energy requirements for the size reduction of poplar and aspen wood. *Biotechnol. Bioeng.* **33**: 207–210.

Holtzapple, M.T., Jun, J.H., Ashok, G., Patibandla, S.L. y Dale, B.E. 1991. The ammonia freeze explosion (AFEX) process: a practical lignocellulose pretreatment. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. **28**(29): 59–74.

Huerta-Beristain, G., Utrilla-Carreri, J., Hernández-Chávez, G., Bolivar, F., Gosset, G. y Martínez, A. (2005). Ingeniería metabólica para incrementar el flux y rendimiento de etanol en *Escherichia coli* etanológica. *Revista Mexicana de Ingeniería Química* **4**: 25-36.

Huerta-Beristain, G. (2004). Manipulación del metabolismo central de *Escherichia coli* para incrementar la productividad de etanol. Tesis de Maestría. Universidad Nacional Autónoma de México. México.

Ingram, L. O., Aldrich, H. C., Borges, A. C. C., Causey, T. B., Martínez, A., Morales, F., Saleh, A., Underwood, S. A., Yomano, L. P., York, S. W., Zaldivar, J. y Zhou, S. 1999. Enteric Bacterial Catalysts for Fuel Ethanol Production. *Biotechnology Progress*. **15**: 855-866.

Jarboe, L. R., Grabar, T. B., Yomano, L. P., Shanmugan, K. T. y Ingram, L. O. 2007. Development of Ethanogenic Bacteria. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*. **108**: 237-261.

Jeffries TW. 1994. Biodegradation of lignin and hemicelluloses. *Biochemistry of microbial degradation*. 233–277.

Kafarov, V., Ojeda, K y Sánchez E. 2006. Diseño de producción conjunta biodisel - bioetanol. *Energía y computación* **15**: 9-14.

Kirk, T.K y Jeffries, T.W. 1996. Roles for microbial enzymes in pulp and paper processing. American Chemical Society, Washington DC. 2–14.

Kurakake, M., Ide, N. y Komaki, T. 2007. Biological pretreatment with two bacterial strains for enzymatic hydrolysis of office paper. *Current Microbiology*. **54**: 424-428.

Lázaro, L. y Arauzo, J. 1994. Aprovechamiento de residuos de la industria de conservas vegetales. Hidrólisis enzimática. Centro Politécnico Superior de Ingeniería. Universidad de Zaragoza. **12**: 227-240.

Lynd, L., Weimer, P., Van Zyl, W. y Pretorius, I. 2002. Microbial Cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. **3**: 506–577.

Mackie, K.L., Brownell, H.H., West, K.L., y Saddler, J.N. 1985. Effect of sulphur dioxide and sulphuric acid on steam explosion of aspenwood. *Journal of Wood Chemistry and Technology*. **5**: 405–425.

Maki, C., Gianni, K., Fumie, D., Fumie, D. y Alterthum, F. 2000. Fermentation of sugar cane bagasse hemicellulosic hydrolysate and sugar mixtures to ethanol by recombinant *Escherichia coli* KO11. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*. **16**: 829-834.

Mariscal, J.P. 2011. Evaluación y Selección de Microorganismos para la Producción de etanol a nivel industrial. Tesis de Maestría. Universidad Nacional de Colombia. Colombia.

Martin, G., Knepper, A., Zhou, B. y Pamment, N. 2006. Performance and stability of ethanologenic *Escherichia coli* strain FBR5 during continuous culture on xylose and glucose. *Microbiol Biotechnol*. **33**: 834-844.

Martínez, A. 2009. Biocombustibles biotecnológicos. *Ide@s CONCYTEG*. **54**: 1-18

Martínez, A., Rodríguez, M. E., Wells, M. L., York, S. W., Preston, J. F. y Ingram, L.O. 2001. Detoxification of Dilute Acid Hydrolysates of Lignocellulose with Lime. *Biotechnology Progress*. **17**: 287-293.

Martínez, A., Rodríguez, M. E., York, S. W., Preston, J. F. y Ingram, L. O. 2000. Effects of $\text{Ca}(\text{OH})_2$ Treatments (“Overliming”) on the Composition and Toxicity of Bagase Hemicellulose Hydrolysates. *Biotechnology Bioengineering*. **69**(5): 526-536.

Montgomery, D.C. 2012. Diseño y análisis de experimentos. Limusa Wiley, México, D.F.

Moniruzzaman, M., Dien, B.S., Skory, C.D., Chen, Z.D., Hespell, R.B., Ho, N.W.Y., Dale, B.E y Bothast, R.J. 1997. Fermentation of corn fibre sugars by an engineered

xylose utilizing *Saccharomyces* yeast strain. World Journal of Microbiology & Biotechnology. **13**: 341-346

Montañez, J., Victoria, J.C., Flores, R. y Vivar, M.A. 2011. Fermentación de los fructanos del Agave tequilana Weber Azul por *Zymomonas mobilis* y *Saccharomyces cerevisiae* en la producción de bioetanol. Información Tecnológica. **22**: 3-14.

Morocoima, J.A., Bertsch, A. y Domínguez, G. 2013. Optimización del cocultivo de *Aspergillus niger* y *Saccharomyces cerevisiae* para la obtención de etanol a partir de los residuos del procesamiento agroindustrial de la papa (*Solanum tuberosum*). Interciencia. **38**: 305-309.

Muñoz-Gutiérrez, I. y Martínez, A. 2013. Polysaccharide hydrolysis with engineered *Escherichia coli* for the production of biocommodities. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology. **40**: 401-410.

Muñoz-Gutiérrez, I., Oropeza, R., Gosset, G. y Martínez, A. 2012. Visualización de la superficie celular de β -glucosidasa que emplea el sistema de secreción de tipo V en *Escherichia coli* etanologénica para la fermentación de la celulosa en etanol. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology. **39**: 1141-1152.

Mussatto, S. y Roberto, I. 2004. Alternatives for detoxification of diluted-acid lignocellulosic hydrolyzates for use in fermentative processes: a review. Bioresource Technology **93**: 1–10

Niño, L., Acosta, C. y Gelves, R. 2013. Evaluación de pretratamientos químicos para la hidrólisis enzimática de residuos lignocelulósicos de yuca (*Manihot esculenta Crantz*). Revista de la Facultad de Ingeniería Universidad de Antioquia. **69**: 317-326.

Oliva, J.M. 2003. Efecto de los productos de degradación originados en la explosión por vapor de biomasa de chopo sobre *Kluyveromyces marxianus*. Tesis doctoral. Universidad Complutense de Madrid. España.

Orencio-Trejo, M., Flores, N., Escalante, A., Hernández-Chávez, G., Bolivar, F., Gosset, G. y Martínez, A. 2008. Análisis de la regulación metabólica de una cepa de *Escherichia coli* etanológica basada en RT-PCR y actividades enzimáticas. *Biotechnology for Biofuels*. **1**(8): 1-13.

Ovando-Chacón S.L y Waliszewski K.N. 2005. Preparativos de celulasas comerciales y aplicaciones en procesos extractivos. *Universidad y Ciencia*. **21**: 111-120.

Parajó, J.C., Domínguez, H. y Domínguez, J.M. 1998. Biotechnological production of xylitol: Part 3: Operation in culture media made from lignocellulosic hydrolysates. *Bioresource Technology* **66**: 25-40.

Paredes D. 2010. Obtención de enzimas celulasas a partir de hongos (*Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus pulmonarius* y *Lentinula edodes*) utilizando como sustratos los residuos del cultivo del banano (*Musa cavendish*). Tesis de licenciatura. Universidad Técnica de Ambato. Ecuador.

Partida, G. 2015. Producción de etanol a partir de jugo y bagazo de sorgo dulce (*sorgum bicolor* (L.) Moench) mejorado genéticamente. Tesis de Doctorado (en proceso). Instituto Tecnológico de Veracruz. México.

Pérez, J., Muñoz-Dorado, J., De la Rubia, T. y Martínez, J. 2002. Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview. *International Microbiology*. **5**: 53-63.

Quiroz-Castañeda, R.E., Balcázar-López, E., Dantán-González, E., Martínez, A., Folch- Mallol, J.L. y Martínez-Anaya, C. 2009. Characterization of cellulolytic activities of *Bjerkandera adusta* and *Pycnoporus sanguineus* on solid wheat straw medium. *Electronic Journal of Biotechnology*. **12**(4): 2-8.

Ragauskas, A.J., Williams, C.K., Davison, B.H., Britovsek, G., Cairney, J., Eckert, C.A., Frederick, W.J., Hallett, J.P., Leak, D.J, Liotta, C.L., Mielenz, J.R, Murphy, R., Templer,

R. y Tschaplinski, T. 2006. The path forward for biofuels and biomaterials. *Science*. **311**: 484-489.

Reith, J.H., Veenkamp, J.M. y Van Ree, R. 2001. Co-Production of Bio-ethanol, Electricity and heat from biomass wastes: potential and R&D issues. ECN-RX-01-011. **1**: 1-12.

Reyes-Ocampo, I., González-Brambila, M. y López-Isunza, F. 2013. Un análisis del metabolismo de *Aspergillus niger* creciendo sobre un sustrato sólido. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*. **12**: 41-56.

Rubin, E.M. 2008. Genomics of cellulosic biofuels. *Nature*. **454**(14): 841-845.

Ruiz, E. 2004. Hidrólisis y fermentación de residuos de tallo de girasol. Tesis de doctorado. Universidad de Jaén. España.

Sánchez, A.M., Gutiérrez, A.I, Muñoz, J.A y Rivera, C.A. 2010. Producción de bioetanol a partir de subproductos agroindustriales lignocelulósicos. *Tumbaga*. **5**: 61-91.

Sánchez, C. 2009. Lignocellulosic residues: Biodegradation and bioconversion by fungi. *Biotechnology Advances*. **27**: 185-194.

Sasakura, Y., Nakashima, K., Awazu, S., Matsuoka, T., Nakayama, A., Azuma, J. y Satoh, N. 2005. Transposon-mediated insertional mutagenesis revealed the functions of animal cellulose synthase in the ascidian *Ciona intestinalis*. *The National Academy of Sciences of the USA*. **102**(42): 15134-15139.

Schilling, J.S., Tewalt, J.P. y Duncan, S.M. 2009. Synergy between pretreatment lignocellulose modifications and saccharification efficiency in two Brown rot fungal systems. *Applied Microbiology Biotechnology*. **84**: 465-475.

Sun y Cheng, J. 2002. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresource Technology*. **83**: 1–11.

TAPPI. 1978. Technical Associaton for the Pulp and Paper Industries. TAPPI Press. Atlanta.

Utrilla, J., Licona-Cassani, C., Marcellin, E., Gosset, G., Nielsen, L. y Martinez, A. 2012. Engineering and adaptive Evolution of *Escherichia coli* for D-lactate fermentation reveals GatC as a xylose transporter. *Metabolic Engineering*. **14**: 469–476.

Valverde, E.M. y Olalde, V. 2009. Rutas, procesos y microorganismos implicados en la producción de biocombustibles. *Concyteg*. **54**: 1216-1233.

Van Markis, A.J.A., Abbott, D.A., y Bellissimi, E. 2006. Alcoholic fermentation of carbón sources in biomass hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*: Current Status. *Antonie van Leeuwenhoek*. **90**: 391-418.

Vargas-García, M.C., Suárez-Estrella, F., López, M.J. y Moreno, J. 2010. Microbial population dynamics and enzyme activities in composting processes with different starting materials. *Waste Management*. **30**: 771-778.

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**: 249-259.

Vidal, P.F. y Molinier, J. 1988. Ozonolysis of lignin, improvement of in vitro digestibility of poplar sawdust. *Biomass*. **16**: 1–17.

Viñals-Verde, M., Bell-García, A., Michelena-Álvarez, G. y Ramil-Mesa, M. 2012. Obtención de etanol a partir de biomasa lignocelulósica. *ICIDCA sobre los derivados de la caña de azúcar*. **46(1)**: 7-16.

Zaratti, F. 2008. Los agro-combustibles: Entre ideología y tecnología. *Revista virtual REDESMA*. **2**: 69-76.

Zhang, X., Xu, C. y Wang, H. 2007. Pretreatment of bamboo residues with *Coriolus versicolor* for enzymatic hydrolysis. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. **104**: 149-51.

Zhao, X., Cheng, K. y Liu, D. 2009. Organosolv pretreatment of lignocellulosic biomass for enzymatic hydrolysis. *Applied Microbiology Biotechnology*. **82**: 815–827.

ANEXOS

A.1 Resultados de la cinética de fermentation de hidrolizado enzimático de bagazo de papa

Tabla A.1. Resultados de la cinética de fermentación del hidrolizado enzimático del bagazo de papa.

Exp.	Glucosa (g/L)		Etanol (g/L)		Yp/s (g/g)	Qp (g/Lh)	Eficiencia (%)
	t=0 h	t=24 h	t=0 h	t=24 h			
1	18.76125	0.45375	1.3925	8.20125	0.372	0.342	72.924
2	16.75	0.56125	1.3175	7.555	0.385	0.315	75.549
3	19.12875	0	1.4525	8.03125	0.344	0.335	67.435
4	15.8425	0	1.45375	7.50625	0.382	0.313	74.910
5	17.3975	0	1.275	8.28875	0.403	0.345	79.048
6	16.58	0	1.4675	8.3125	0.413	0.346	80.950
7	17.5825	0.00375	1.54	8.115	0.374	0.338	73.339
8	16.1175	0.065	1.34625	7.275	0.369	0.303	72.419
9	18.13125	0.0225	1.54	10.0425	0.470	0.418	92.064
10	16.2525	0.425	1.36125	8.7775	0.469	0.366	91.876
11	17.64875	0.5925	1.27375	7.51	0.366	0.313	71.692
12	16.36875	0	1.185	7.15125	0.364	0.298	71.469
13	17.18875	0	1.252625	7.4775	0.362	0.312	71.009
14	17.18875	0	1.2525	7.48875	0.363	0.312	71.139
15	17.18875	0	1.25125	7.47875	0.362	0.312	71.039

A.2 Localización del punto estacionario y caracterización de la superficie de respuesta

De acuerdo a Montgomery (2012), puede obtenerse una solución matemática general para el punto estacionario. Al escribir el modelo de segundo orden en notación matricial como se muestra en la Ecuación A2.1

$$\hat{y} = \hat{\beta}_0 + x'b + x'Bx \quad (\text{A2.1})$$

Donde:

$$\mathbf{x} = \begin{bmatrix} x_1 \\ x_2 \\ \vdots \\ x_k \end{bmatrix} \quad \mathbf{b} = \begin{bmatrix} \hat{\beta}_1 \\ \hat{\beta}_2 \\ \vdots \\ \hat{\beta}_k \end{bmatrix} \quad \text{y} \quad \mathbf{B} = \begin{bmatrix} \hat{\beta}_{11}, & \hat{\beta}_{12}/2, & \dots, & \hat{\beta}_{12}/2 \\ & \hat{\beta}_{22}, & \dots, & \hat{\beta}_{2k}/2 \\ & & \ddots & \\ \text{sim.} & & & \hat{\beta}_{kk} \end{bmatrix}$$

Es decir, \mathbf{b} es un vector $(k \times 1)$ de los coeficientes de regresión de primer orden y \mathbf{B} es una matriz simétrica $(k \times k)$ cuyos elementos de la diagonal principal son los coeficientes cuadráticos puros $(\hat{\beta}_{ii})$ y cuyos elementos que están fuera de la diagonal son la mitad de los coeficientes cuadráticos mixtos $(\hat{\beta}_{ij}, i \neq j)$.

El punto estacionario (x_s) es la solución de la ecuación (A2.2)

$$x_s = -\frac{1}{2} \mathbf{B}^{-1} \mathbf{b} \quad (\text{A2.2})$$

La respuesta predicha al punto estacionario se puede encontrar a partir de la ecuación (A2.3)

$$\hat{y}_s = \hat{\beta}_0 + \frac{1}{2} x_s \mathbf{b} \quad (\text{A2.3})$$

Caracterización de la superficie de respuesta

Montgomery (2012) menciona que una vez encontrado el punto estacionario, generalmente es necesario caracterizar la superficie de respuesta en la vecindad inmediata de ese punto. Por caracterizar se entiende determinar si el punto estacionario es el punto de respuesta máxima, mínima o un punto de silla. La forma más sencilla es examinar una gráfica de contorno del modelo ajustado. Un análisis más formal de caracterizar la superficie de respuesta es el análisis del modelo canónico (ecuación A2.4).

$$\hat{y} = \hat{y}_s + \lambda_1 w_1^2 + \lambda_2 w_2^2 + \dots + \lambda_k w_k^2 \quad (\text{A2.4})$$

Donde las $\{w_i\}$ son las variables independientes transformadas y las $\{\lambda_i\}$ son constantes, además las λ_i son sólo eigenvalores o raíces características de la matriz B.

La naturaleza de la superficie de respuesta puede determinarse a partir del punto estacionario y de los signos y magnitudes de las $\{\lambda_i\}$ de acuerdo al siguiente criterio. Si todas las $\{\lambda_i\}$ son positivas, x_s es un punto de respuesta mínima; Si todas las $\{\lambda_i\}$ son negativas, x_s es un punto de respuesta máxima; y si las $\{\lambda_i\}$ tienen signos diferentes, x_s es un punto de silla.

A.3 Determinación del punto estacionario y el modelo canónico de la superficie de respuesta para la eficiencia de producción de etanol respecto al valor teórico.

Los cálculos del punto estacionario y el modelo canónico se realizaron mediante el software Mathcad 14.

$$x_s = -\frac{1}{2} B^{-1} b \quad (\text{A3.1})$$

$$b := \begin{pmatrix} 85.5793 \\ -6.31568 \\ -1.15266 \end{pmatrix} \quad B := \begin{pmatrix} -6.30872 & 0.242 & -0.014 \\ 0.242 & 0.150345 & -1.776 \times 10^{-5} \\ -0.014 & -1.776 \times 10^{-5} & 0.00299737 \end{pmatrix}$$

$$x_s := \left(\frac{-1}{2} \right) \cdot (B^{-1}) \cdot (b) \quad x_s = \begin{pmatrix} 6.681 \\ 10.277 \\ 223.544 \end{pmatrix}$$

Respuesta predicha en el punto estacionario (y_s), ecuación (A3.2)

$$\hat{y}_s = \hat{\beta}_0 + \frac{1}{2} x_s b \quad (\text{A3.2})$$

$$y_s := -55.1963 + \frac{1}{2} \cdot x_s \cdot b \quad y_s = 69.384$$

Eigenvalores (e) o raíces características de la matriz B

$$e := \text{eigenvals (B)} \quad e = \begin{pmatrix} -6.318 \\ 0.159 \\ 3.026 \times 10^{-3} \end{pmatrix}$$

Las raíces características tienen signos diferentes por lo tanto x_s es un punto de silla.

Realizando el modelo canónico (\hat{y}), ecuación (A3.3)

$$\hat{y} = \hat{y}_s + \lambda_1 w_1^2 + \lambda_2 w_2^2 + \dots + \lambda_k w_k^2 \quad (\text{A3.3})$$

$$\lambda_1 := -6.318 \quad \lambda_2 := 0.159 \quad \lambda_3 := 3.026 \times 10^{-3}$$

$$y(y_s, w_1, w_2, w_3) := y_s + \lambda_1 \cdot w_1^2 + \lambda_2 \cdot w_2^2 + \lambda_3 \cdot w_3^2$$

Modelo canónico de segundo orden para la eficiencia de producción de etanol con respecto al valor teórico.

$$y(y_s, w_1, w_2, w_3) \rightarrow -6.318 \cdot w_1^2 + 0.159 \cdot w_2^2 + 0.003026 \cdot w_3^2 + 69.383512919009655142$$